Научный отчет
по проекту РНФ 23-64-10020

Специфика научно-исследовательской работы по настоящему проекту включает объединение усилий 3-х партнеров. План работы основного исполнителя по проекту, коллектива из КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, включает изучение структуры и свойств биополимеров, выделенных из гидробионтов Арктических морей партнером из Мурманского арктического университета (в заявке поименован как МГТУ). Полученная информация основного исполнителя проекта будет использоваться как фундаментальная основа для пищевых технологий функциональных продуктов питания из недоиспользованных морских биоресурсов. Второй партнер, коллектив из ВГУ, г. Воронеж, основные усилия направляет на инженерию биотехнологических конструкций для пищевой промышленности на основе биополимеров, полученных из организмов Арктических морей. При этом все три партнера, задействованных в проекте, будут объединять свои усилия в использовании своих взаимодополняющих методов и подходов во всестороннем исследовании свойств исходных биополимеров и их комплексов.

На этапе 2023 года основной исполнитель проекта изучал структуру и свойства белков, полисахаридов и их комплексов (желатин, коллаген, немодифицированные полисахариды – альгинат натрия, хитозан, фукоидан, каррагинаны) на молекулярном и супрамолекулярном уровнях с использованием стандартных препаратов и биополимеров, выделенных из гидробионтов Арктических морей партнером из МГТУ.

Объекты исследования: 4 типа желатинов (желатин – частично гидролизованный коллаген): 1 - Желатин, выделенный Мурманским партнером из кожи трески; 2 - Этот же желатин, очищенный от примесей различных ионов; 3 - рыбный желатин (Sigma–Canada, G 7041, Lot #S LCC7087); 4 – желатин из кожи свиньи (Sigma – Switzerland, G6144, Lot # BCBR5299V). Коммерческие образцы 3 и 4 использовались для сравнения. В качестве полисахаридов использовались: 1 - коммерческий альгинат натрия (A-2033 “Sigma”, St. Louis, MO, USA); 2 – хитозаны, выделенные из панцирей креветок и крабов Мурманским партнером; 3 – фукоидан коммерческого происхождения (Россия); 4 – каррагинаны - каппа-каррагинан (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA, 22048, lot BCBT9953,), йота-каррагинан (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA, J60603, lot T16F031) и лямбда-каррагинан (TCI Europe N.V., Zwijndrecht, Belgium, C3313, lot 46QNC-OT).

Очистка рыбного желатина, выделенного из кожи трески партнерами из Мурманска, **от неорганических солей**.

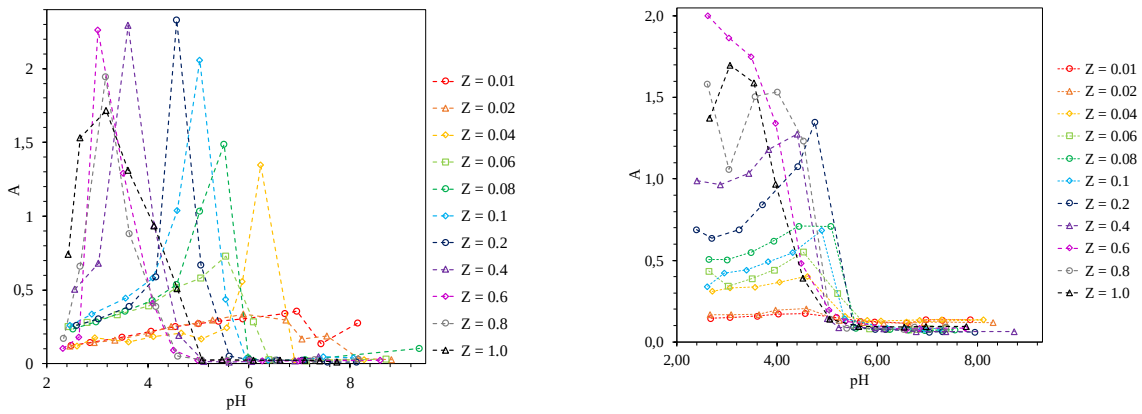
В процессе исследований выяснилось, что желатин, полученный партнером из Мурманска, содержит большое количество различных неорганических солей. Это привело к серьезным сложностям в работе со смесями желатин/альгинат, поскольку для альгината натрия характерно ион-индуцированное гелеобразование [O.S. Zueva, T. Khair, M.A. Kazantseva, L. Latypova, Yu.F. Zuev // Ions-Induced Alginate Gelation According to Elemental Analysis and a Combinatorial Ap-proach // Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 16201. https://doi.org/10.3390/ijms242216201] и присутствие ионов в системах желатин-альгинат провоцировало гелеобразование полисахарида, нарушавшее получение однородных белок-полисахаридных систем. Поэтому рыбный желатин, предоставленный партнером из Мурманска, очищался от неорганических солей. Схема включала 4 этапа:

1. диализ раствора желатина против раствора этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), за счет этого достигается связывание двух- и трехвалентных катионов, присутствующих в исходном препарате, и удаление низкомолекулярных водорастворимых примесей;
2. очистка препарата от ЭДТА;
3. заключительная очистка - удаляются одновалентные катионы и анионы;
4. лиофильная сушка

Приборная база: pH-метр pH (HANNA Instruments), спектрофотометрУФ-ВИД Agilent Technologies Cary 100, ИК-спектрометр IR-Affinity (Shimadzu), КД-спектрометр Jasco J-1500, термогравиметрически/ДСК анализатор STA 449 C Jupiter (Netzsch, Германия), дифференциальный сканирующий калориметр 204 F1 Phoenix (Netzsch, Германия), ЯМР-спектрометр Bruker Avance III WB 400 (Bruker) с рабочей частотой 400,27 МГц, спектрометр статического и динамического рассеяния света Фотокор, диэлектрические спектрометры PNA-X Agilent N5247A network analyzer и Novocontrol BDS-80 (частотный диапазон от 1 Гц до 60 ГГц); рентгеновский дифрактометр D8 Advance («Bruker», США) с приставкой Vario и линейным координатным детектором Vantec - отделение рентгеноструктурных исследований ЦКП САЦ на базе лаборатории дифракционных методов исследования ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, сканирующий электронный микроскоп "Merlin" ("Carl Zeiss", Germany) – междисциплинарный центр «Аналитическая микроскопия» Казанского Федерального университета.

1.Определение условий для существования стабильных полиэлектролитных комплексов. Эксперименты по УФ-спектроскопии указанных систем при вариации соотношения белок/полисахарид.

Исследовано влияние соотношения полисахарид/белок и pH на агрегацию биополимеров в смесях желатинов с полисахаридами. Для этого регистрировалась оптическая плотность растворов полисахарида и желатина при длине волны λ = 400 нм в системах с массовым соотношением полисахарида и желатина (Z = полисахарид/желатин) от 0,01 до 1,00 при постоянной концентрации желатина 0,1 вес. %. Для изучения влияния pH на фазовое поведение смесей полисахарида с желатином для Z от 0,01 до 1 водные смеси титровали до pH ~2, добавляя по капле растворы уксусной кислоты с возрастающей концентрацией (для достижения низких pH использовалась ледяная уксусная кислота, что минимизирует эффект разбавления). Другую порцию каждой смеси титровали растворами NaOH до pH ~9. В ходе титрования регистрировали значения pH и оптической плотности при длине волны λ = 400 нм. На основе полученных данных получены зависимости оптического поглощения при длине волны 400 нм от значения pH для водных смесей полисахаридов с желатином при разных соотношениях полисахарид/белок (рис. 1).



а б

Рис. 1. Изменения в оптическом поглощении при изменении pH водных смесей (а) альгината с желатином (рыбный желатин из кожи трески МГТУ без содержания солей) и (б) - к-каррагинана с желатином (исходный желатин из кожи трески МГТУ).

С увеличением соотношения альгинат/желатин пик поглощения смещается в область более кислых сред (Рис.1а). У смесей альгината с каждым видом желатина при самых низких соотношениях Z (0,01, 0,02, и 0,04), в отличие от более высоких значений, максимум оптической плотности наблюдается при pH больше 6,0. У свиного желатина пики с максимальным поглощением наблюдаются при Z = 0,2 (pH 4,52) и 0,4 (pH 3,68), у рыбных желатинов пик с самым большим оптическим поглощением приходился

на Z = 0,6 (pH ~ 3). Стоит отметить, что поглощение смесей альгината со свиным желатином меньше, чем у смесей альгината с рыбными желатинами.

Для смесей с к-каррагинаном (Рис. 1б), как и в случае с альгинатом, наблюдается смещение пиков в область более низких pH при увеличении соотношения Z. При самых маленьких соотношениях Z (0,01, 0,02) в смесях со свиным желатином заметное поглощение наблюдается лишь при pH > 4,0. Для рыбных желатинов поглощение в области кислых pH наблюдается при любых Z. У свиного желатина пики с максимальным поглощением соответствуют Z = 0,08 (pH 5,24) и 0,1 (pH 5,04), у рыбных желатинов – при том же Z = 0,6 (pH ~2,5), что и в случае с альгинатом. Стоит отметить, что кривые изменения оптической плотности при изменении pH для смесей к-каррагинана с рыбным желатином МГТУ в присутствии солей и после обессоливания отличаются. В смесях к-каррагинана с очищенным желатином при соотношениях Z = 0,01, 0,02, 0,04, 0,06 и 0,08 наблюдалось заметное поглощение при pH больше 6, а для смесей в присутствии солей поглощения не наблюдалось.

Таблица 1. Области существования видимых невооруженным глазом осадков в смесях желатина/полисахарид.

	Альгинат							
Z	Свиной желатин Sigma		Рыбный желатин Sigma		Рыбный желатин МГТУ, без солей			
	pH_{min}	pH_{max}	pH_{min}	pH_{max}	pH_{min}	pH_{max}		
0,01	7,56	8,99			4,55	8,16		
0,02	6,53	9,45			3,35	8,83		
0,04					3,62	5,57		
0,06	5,08	5,56	< 2,5	4,74	3,4	5,55		
0,08	4,95		< 2,5	5,03				
0,1	3,02	4,69	< 2,5	4,47				
0,2	< 2,5	3,9	< 2,5	4,07	< 2,5	4,16		
0,4	< 2,5	3,1	< 2,5	3,56	< 2,5	4,13		
0,6	< 2,5	3,15	< 2,5	3,15	< 2,5	3,01		
0,8	< 2,5	2,53	< 2,5	2,6	< 2,5	3,17		
1	< 2,5	2,54	< 2,5	2,61	< 2,5	2,66		
	к-каррагинан							
Z	Свиной желатин Sigma		Рыбный желатин Sigma		Рыбный желатин МГТУ, без солей		Рыбный желатин МГТУ	
	pH_{min}	pH_{max}	pH_{min}	pH_{max}	pH_{min}	pH_{max}	pH_{min}	pH_{max}
0,01	< 2,5	9,14	< 2,5	8,43	< 2,5	9,18	< 2,5	7,86
0,02	< 2,5	9,13	< 2,5	8,08	< 2,5	9,12	< 2,5	8,32
0,04	5,11	6,47	< 2,5	6,02	< 2,5	8,59	< 2,5	8,12
0,06	5,13	6,72	< 2,5	4,63	< 2,5	9,15	< 2,5	4,53
0,08	3,41	5,24	< 2,5	4,5	< 2,5	6,49	< 2,5	5,08
0,1	3,42	5,56	< 2,5	4,54	< 2,5	6,45	< 2,5	4,89

0,2	2,92	5,38	< 2,5	4,63	< 2,5	5,09	< 2,5	4,76
0,4	< 2,5	4,5	< 2,5	4,72	< 2,5	4,48	< 2,5	4,41
0,6	< 2,5	3,84	< 2,5	3,88	< 2,5	4,59	< 2,5	4,49
0,8	< 2,5	3,87	< 2,5	2,93	< 2,5	3,91	< 2,5	4,53
1	< 2,5	3,56	< 2,5	2,59	< 2,5	4,34	< 2,5	3,98

Были определены области существования видимых невооруженным глазом осадков в смесях полисахарида с желатином в исследованных диапазонах pH и Z (0,01 – 1,0) (Табл. 1). Из этих данных видно, что смеси всех желатинов с полисахаридами с самыми низкими соотношениями Z содержат нерастворимые частицы в самом широком диапазоне pH, который сужается при более высоких соотношениях. В смесях с соотношениями Z = 0,2 и выше осадок появляется при значении pH ниже 5. Визуально самые крупные осадки в смесях альгината с желатинами наблюдаются при соотношениях Z = 0,1 и 0,2, а в случае к-каррагинана – при Z = 0,2 и 0,4. Кроме того, у образующихся осадков в смесях рыбного желатина Sigma с полисахаридами есть отличительная особенность от смесей полисахаридов с другими желатинами: он сразу же при образовании прилипает к стенкам и дну кювет, у свиного желатина и рыбного желатина МГТУ образующийся осадок всегда плавает по всему объему смеси в кювете. Полученная информацию необходима для проведения последующих исследований систем белок/полисахарид. Различные методы по-разному реагируют на фазовое состояние исследуемого образца (присутствие осадка) и это необходимо принимать во внимание в конкретных исследованиях.

Аналогичная информация получена для смесей желатинов с йота и лямбда каррагинанами.

2. Исследование вторичной структуры белковой и полисахаридной компоненты в комплексах методами ИК- и КД-спектроскопии в системе.

2.1. Для изучения вторичной структуры белковой компоненты на ИК-спектрометре IR-Affinity (Shimadzu) в условиях разрешения 4.0 $см^{-1}$, 128 сканов, 25°C, ATR ZnSe, регистрировали спектры 10% растворов желатинов (желатин рыб МГТУ, желатин рыб Sigma, свиной желатин Sigma) после суточной инкубации при 4°C. Аликвоты растворов с температурой 4°C наносили на поверхность кристалла НПВО, термостатируемого при 25°C. Снимали спектры сразу после нанесения и через 10 мин инкубации.

Специфический состав желатинов, в которых чередуются аминные и иминные группы в триплетах вида gly-pro-pro (вместо pro некоторые позиции могут занимать остатки hyp или иные аминокислоты), исключает возможность межпептидного взаимодействия. По этой причине корреляции между положением компонент амид 1 и вторичной структурой, установленные для глобулярных и фибриллярных белков, не работают. Тонкая структура полосы амид1 обусловлена различиями в колебательных свойствах пептидных C=O в составе триплета, а также присутствием иных кроме gly аминных групп. Проведенные исследования показали, что свиной желатин при 25°C содержит небольшую долю тройной спирали, а оба рыбных желатина при 25°C практически не содержат тройной спирали. При нагревании образцов до 60°C тройная спираль свиного желатина разрушается полностью. Изменения в спектрах рыбного желатина МГТУ также указывают на разрушение остаточных элементов тройной спирали. Изменения в спектрах рыбного желатина Sigma наименее выражены, что указывает на отсутствие в нем тройных спиралей уже при 25°C.

2.2. Вторичная структура желатинов в разбавленных растворах (0,1 и 1 мг/мл) исследовалась методом кругового дихроизма (КД). Спектры КД снимали в диапазоне 260 – 178 нм, ширина щели 2 нм, сканирование пошаговое, время интегрирования 2 сек, количество накоплений 3. Перед измерениями растворы инкубировали при 40°C около 1 часа, затем охлаждали до 25°C, помещали в кювету и инкубировали при 10°C, измеряя спектры через 10 и 20 мин инкубации. Затем температуру повышали до 40°C и измеряли спектры через 10 и 20 мин инкубации. Оценку

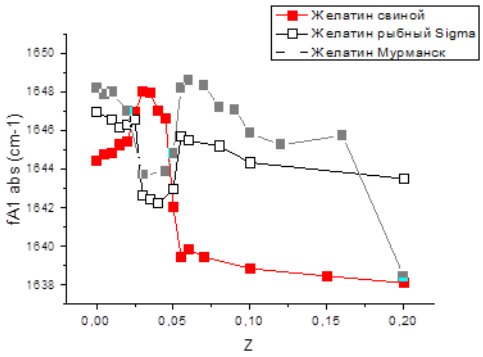
содержания тройных спиралей проводили, сравнивая значения молярной эллиптичности на 221 нм со значениями для нативного коллагена (4690 deg*cm2/dmol = 100% спиралей) и денатурированного температурой (-580 deg*cm2/dmol = 0% спиральности) [Toshikazu Nishio, Rikimaru Hayashi, Regeneration of a Collagen-like Circular Dichroism Spectrum from Industrial Gelatin, Agricul. and Biol. Chemistry, V. 49, P. 1675–1682, https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866972]. Полученные результаты приведены в Табл. 2.

Табл. 2. Доля структуры желатинов в составе тройных спиралей.

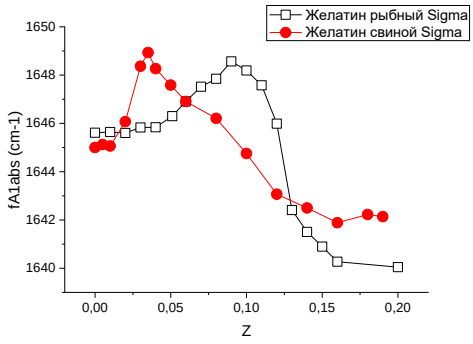
Белок	Доля тройных спиралей, %	
Температура	10°C	40°C
Коллаген	100	0
Желатин свиной Sigma	21	1.5
Желатин рыбный Sigma	7	1
Желатин рыбный (Мурманск) без солей	7	1
Желатин рыбный (Мурманск) неочищенный	4	0

Как следует из приведенных данных содержание тройных спиралей в рыбных желатинах при 10 С не превышает 5-7%. Наименьшее содержание тройных спиралей в неочищенном желатине.

2.3. Исследована вторичная структура желатинов в комплексах с альгинатом и к-каррагинаном. На рис. 2а показано, как меняется положение максимума полосы амид1 желатинов в комплексах с альгинатом при вариации массового отношения Z. Положение максимума является интегральным параметром, отражающим специфическое распределение компонент вторичной структуры в спектрах желатинов. Помимо того, что при Z=0 положение максимумов различается, рост содержания альгината в комплексах также оказывает различное действие на структуру желатинов. В спектрах свиного желатина в области образования нерастворимых комплексов Z= 0.02 – 0.04 происходит рост частоты амид1 за счет увеличения доли гидратированных амидных карбонилов (Gly) без разрушения тройной спирали, тогда как у обоих рыбных желатинов образование нерастворимых комплексов сопровождается сдвигом максимума в низкочастотном направлении за счет преимущественного разрушения остаточных фрагментов тройной спирали и ростом доли гидратированных имидных карбонилов (Pro).



а



б

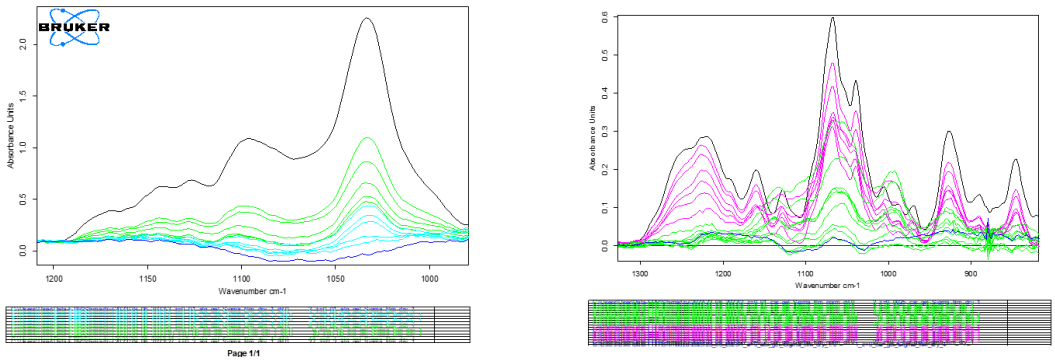
Рис. 2. Положение максимума полосы амид1 желатинов в комплексах с альгинатом (а) и каппа-каррагинаном (б) при вариации массового отношения Z.

Образование нерастворимых стехиометрических комплексов желатинов с альгинатом сопровождается изменениями вторичной структуры. У рыбных желатинов происходит разрушение остаточных фрагментов тройной спирали и рост доли гидратированных имидных карбонилов. При Z больше стехиометрического происходит растворение комплексов и возврат структурных параметров к исходным значениям. Напротив, у свиного желатина образование нерастворимых

стехиометрических комплексов приводит к росту спиральности, а избыток альгината – к ее разрушению.

Величина Z, соответствующая максимуму образования нерастворимых стехиометрических комплексов желатина с к-каррагиннаном, различается у свиного и рыбного желатинов и составляет 0.04 и 0.1, соответственно. При этом, положение максимума амид1 у этих систем меняется сходным образом (рис. 2б): вначале максимум сдвигается в высокочастотном направлении, а после достижения максимальной концентрации нерастворимых стехиометрических комплексов сдвигается в обратном направлении. У свиного желатина образование нерастворимых стехиометрических комплексов сопровождается ростом содержания тройной спирали, а их растворение при увеличении Z>0.04 приводит к ее разрушению. Спектральные изменения сводятся к перекачке интенсивностей компонент 1660 см-1 – водородно-связанные C2=O2 и N1-H1 группы триплетов в составе тройной спирали, и 1633 см-1 – те же группы, гидратированные молекулами воды. Напротив, у рыбного желатина исходное содержание тройной спирали крайне мало, большая часть карбонильных кислородов гидратированы, а структура очень лабильна. Содержание тройной спирали растет по мере образования нерастворимых стехиометрических комплексов, достигая максимума при Z=0.1, после чего вновь уменьшается. При этом, наблюдаются также сдвиги положения компоненты 1633 см-1, отражающие изменение доступности этих групп воде. Наблюдаемые отличия спектральных изменений желатинов могут быть связаны с различиями химического состава, в частности, большим содержанием остатков Hyp в рыбном желатине по сравнению со свиным. Известно, что присутствие Hyp понижает стабильность тройной спирали, а изменение ее гидратации влияет на конформацию остатка в целом.

2.4. Исследована вторичная структура полисахаридов в комплексах с желатином.



а б

Рис. 3. Разностные (Zi минус Z_0) спектры в области поглощения C-O групп полисахарида в присутствии рыбного желатина (Мурманск). Спектры нормированы на интенсивность в максимуме полосы 1450 см-1. а – альгинат натрия: Z= 0.01 ÷ 0.04 (синим и голубым), Z= 0.05 ÷ 0.1 (зеленым), Z= 0.2 (черным). б - z=0.01 (синим), z=0.02 – 0.1 (зеленым), z=0.11 – 0.16 (фиолетовым), z=0.2 (черным).

В диапазоне Z = 0.01 – 0.04 образование нерастворимых стехиометрических комплексов рыбного желатина с альгинатом сопровождается падением интенсивности поглощения в области 1000 – 1100 см-1, где поглощают CH2-группы пролина и C-O группы боковых цепей Asp и Glu (рис. 3а). Падение интенсивности в указанном диапазоне и сдвиг поглощения к более высоким частотам (1150-1170 см-1) может указывать на дегидратацию этих групп в комплексах с альгинатом. На фоне падения интенсивности белковых групп спектр C-O групп альгината проявляется слабо, что затрудняет его анализ. При Z>0.04, когда в растворе присутствует избыток альгината, интенсивность поглощения линейно растет с концентрацией полисахарида, а форма спектра близка спектру свободного альгината в растворе.

Для систем с капа-каррагинаном винтервале z=0.01- 0.09 наблюдается однокомпонентная уширенная полоса с общим максимумом ~1060 см-1 (рис. 3б). В области межгликозидной связи присутствует однокомпонентная уширенная полоса на 1138 см-1. Выше z=0.1 происходит резкое сужение и расщепление полосы 1060 см-1 на несколько компонент, наиболее интенсивные из которых – 1067 и 1039 см-1. Наблюдаемые спектральные изменения свидетельствуют о том, что в интервале z= 0 – 0.09, соответствующем образованию нерастворимых стехиометрических комплексов, к-каррагнан находится в неупорядоченной конформации. При избытке к-каррагинана происходит его спирализация.

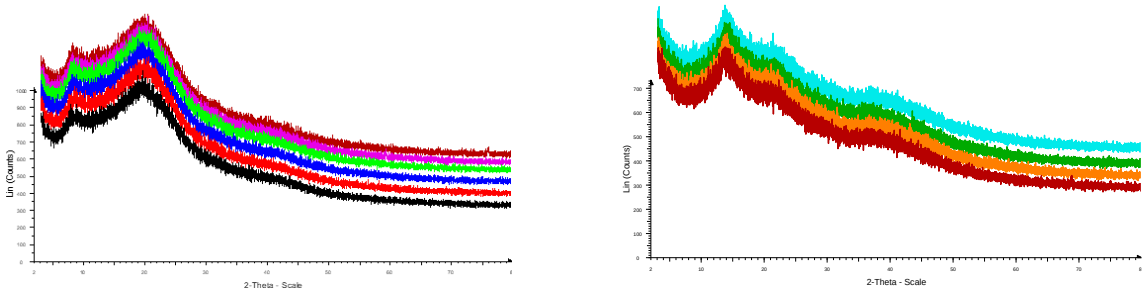
Образование нерастворимых стехиометрических комплексов рыбного желатина с к-каррагиннаном происходит при более высоком содержании полисахарида, чем комплексов с альгинатом, что может быть следствием меньшей плотности заряда на к-каррагиннане по сравнению с альгинатом. В нерастворимых стехиометрических комплексах с желатином к-каррагинан находится в неупорядоченной конформации. При избытке к-каррагинана происходит его спирализация. О конформации альгината в комплексах судить затруднительно. При избытке альгината его конформация соответствует свободному альгинату натрия.

3. Исследование супрамолекулярной структуры комплексов методами рентгеновской дифракции и электронной микроскопии.

Проведены исследования строения образцов желатина и альгината в индивидуальном виде, и в составе гидрогелей с содержанием желатинов 1.5, 2.5, 5 и 10% различного происхождения. Рентгенодифракционные эксперименты выполнены на рентгеновском дифрактометре D8 Advance («Bruker», США), оснащенном приставкой Vario и линейным координатным детектором Vantec. Использовано Cu Kα1 излучение (λ= 1,54063 Å), монохроматизированное изогнутым монохроматором Йохансона, режим работы рентгеновской трубки 40 кВ, 40 мА. Эксперименты выполнены при комнатной температуре в геометрии Брэгг-Брентано с плоским образцом. Структуры желатинов в индивидуальном виде изучались дифрактометрическим методом в процессе естественного высыхания гелей на поверхности кремниевой пластинки. Образцы в гелеобразном виде наносились на поверхность пластинки монокристаллического кремния, обладающей минимальным фоновым рассеянием. Порошковые дифрактограммы записаны в режиме реального времени в диапазоне 2θ от 3 до 60º, с шагом 0.008º и временем набора 0,3 сек в точке. Обработка полученных данных выполнена с использованием пакета программ EVA [DIFFRAC Plus Evaluation package EVA, Version 11 (2005). User's Manual, Bruker AXS, Karlsruhe, Germany, 258p]. Для идентификации кристаллических фаз была использована база данных порошковой дифрактометрии PDF-2 (ICDD PDF-2, Release 2005-2009).

3.1. Структура индивидуальных желатинов, альгината и гидрогелей на основе желатина и альгината натрия с различной концентрацией желатина в индивидуальном виде и в составе гидрогелей изучались дифрактометрическим методом, в том числе и в процессе естественного высыхания гелей на поверхности кремниевой пластинки. На рентгеновских дифрактограммах индивидуального желатина видны два типичных характерных для желатина дифракционных пика при 2θ = 8 и 20° (рис. 4а), которые характерны для структуры желатинов с тройной коллагеноподобной спиралью [Y. Dong, S. Zhao, W. Lu, N. Chen, D. Zhu, Y. Li. Preparation and characterization of enzymatically cross-linked gelatin/cellulose nanocrystal composite hydrogels. RSC Adv. (2021) Vol. 11. P. 10794. 10.1039/D1RA00965F] и соответствуют аморфно-кристаллической природе желатина [C. Zhuang, F. Tao, Y. Cui. Anti-degradation gelatin films crosslinked by active ester based on cellulose. RSC Adv. (2015). Vol. 5. P. 52183-52193. 10.1039/C5RA04808G]. Принято считать, что широкий пик при 18-21° 2θ связан с кристалличностью желатинов, а острый пик при 7-8° соответствует остаточной тройной спирали нативного коллагена (при гидролизе коллагена, который разрушает его структуру тройной спирали и образует случайные клубки, желатин способен частично восстанавливать нативную структуру коллагена - явление, известное как переход от клубка к спирали). На рис. 4б представлена типичная рентгенограмма порошкообразного альгината натрия. Изменений со временем с образцом не происходит. Дифрактограмма характеризуется наличием трех основных

сильно уширенных дифракционных пиков в области углов 2θ = 13, 22 и 28°. Согласно литературным данным, дифрактограммы различных образцов альгината действительно характеризуются набором пиков в указанных угловых диапазонах.



а б

Рис. 4. Рентгеновские дифрактограммы свиного желатина (а) и альгината натрия (б), полученные в процессе естественного высыхания образца на поверхности кремниевых пластинок (снизу-вверх). Для наглядности кривые сдвинуты вдоль оси интенсивностей.

В целом полученные дифрактограммы для индивидуальных образцов желатина и альгината соответствуют литературным данным [E.W. Elsayed, A.A. El-Ashmawy, G.T. El-Bassyouni, S.M. Mousa, M. El-Manawaty, L.H. Emara Formulation and evaluation of alginate-gelatin hydrogel scaffolds loaded with zinc-doped hydroxyapatite and 5-fluorouracil Int. J. Biol. Macromol., 237 (2023), p. 124147, DOI: /10.1016/j.ijbiomac.2023.124147]. Учитывая стабильность обоих образцов, экспериментальные данные по сериям были просуммированы, что позволило получить более точные дифрактограммы, показанные на рис. 5. Сравнение двух дифрактограмм свидетельствует об определенной их схожести - для обоих компонент образцов характерны близкие межатомные расстояния (длины связей) и в образуемых на их основе гидрогелях, в случае их аморфной природы, следует ожидать достаточно близкой дифракционной картины. Для всех исследованных образцов гидрогелей на основе желатина и альгината в состоянии гель характерна однотипная картина дифракции в виде двух сильно уширенных аморфных гало в области углов 2θ = 28 и 40°, соответствующих средним межатомным расстояниям в них. По мере высыхания геля дифракционная картина заметно меняется, приводя к исчезновению двух отмеченных дифракционных пиков и появлению сильно уширенного пика в области углов дифракции 2θ = 12 и 24°, что отражает заметные структурные изменения в гелях по мере их перехода в золь-состояние.

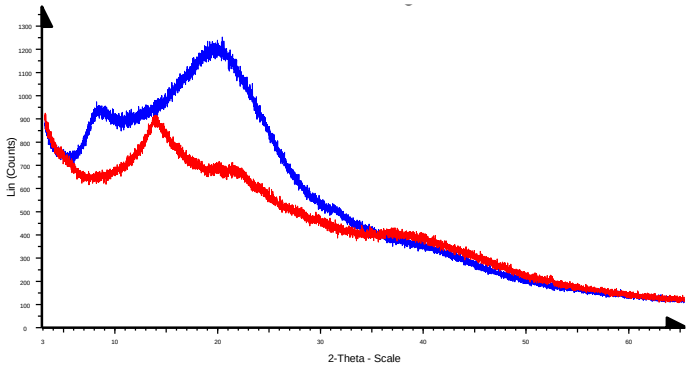


Рис. 5. Сравнение экспериментальных дифрактограмм желатина (синяя кривая) и альгината (красная кривая).

3.2. Проведено сравнительное исследование структуры гидрогелей на основе желатинов различного происхождения (1 - желатин из кожи свиньи (Sigma), 2 - желатин, полученный из кожи холодноводных рыб (Sigma) и 3 - желатин, полученный в Мурманске из кожи холодно-водной трески). Эксперименты по порошковой рентгеновской дифракции (PXRD) показали различие

кристаллических структур исследованных желатинов. Желатиновые гидрогели изучали при их естественной сушке при комнатной температуре на поверхности кремниевой пластины. Все три исследованных образца желатина в состоянии геля характеризуются однотипной дифракционной картиной жидкостного типа в виде сильно уширенного аморфного гало в диапазоне углов 2θ ≈ 20–45°, на котором можно выделить два максимума при 28° и 40°, что соответствует средним межатомным расстояниям в гелях (рис. 6, а). Следует обратить внимание, что исследованные образцы рыбного желатина более «жидкие» и не показывают стабильного геля при комнатной температуре. В процессе высыхания гидрогеля их дифрактограммы заметно изменяются, отражая структурные изменения белков при переходе из желеобразного состояния в ксерогелевое, а также различаются для образцов желатина различного происхождения.

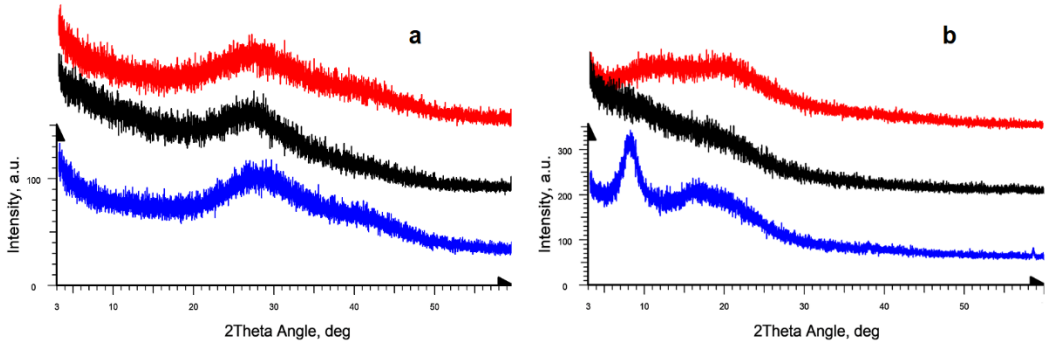


Рис. 6. Рентгенограммы исходных желатиновых гидрогелей (а) и образцов высушенного желатина (б): свиной желатин Sigma (синий), рыбный желатин Sigma (черный) и желатин рыбы, полученный в Мурманске из кожи трески (красный). Для наглядности кривые сдвинуты по оси интенсивности.

Для рыбного желатина, выделенного из кожи трески в лабораторных условиях, начальные этапы высыхания геля приводят к таким же изменениям дифракционной картины. На заключительном этапе высыхания гидрогеля происходит изменение дифракционной картины. Это изменение связано с появлением двух сильно уширенных дифракционных пиков под углами 2θ ≈ 8–10 и 18° (рис. 2б, синяя кривая) примерно равной относительной интенсивности. Отсутствие пика в области 8° на дифрактограмме может свидетельствовать о заметном уменьшении содержания тройных спиралей в образцах желатина рыб по сравнению с желатином млекопитающих и, как следствие, о различных изменениях его вторичной структуры при формировании ксерогеля. Это также согласуется с визуальным свидетельством более слабого гелеобразования в образцах рыбного желатина.

Во всех случаях наблюдаемые изменения при сушке оказались обратимыми для всех трех образцов желатина. При добавлении воды на поверхность высушенных гелей исходное состояние образцов восстанавливается, что отражается на изменении соответствующих дифрактограмм. Причем подобные превращения можно проводить многократно, однако при длительном хранении высушенного образца заметных изменений дифракционной картины не наблюдается. Это свидетельствует об отсутствии изменений характера и интенсивности нековалентных взаимодействий в структуре желатина и неизменной степени кристалличности желатиновых доменов.

3.3. Морфология желатинов изучалась методом электронной сканирующей микроскопии (СЭМ). Полученные структуры (рис. 7) являются результатом лиофилизации исходных растворов желатина при приготовлении образцов для СЭМ. Тем не менее, структура ксерогелей определяет исходную морфологию желатиновых гидрогелей и может служить свидетельством более плотной полимерной сетки в желатине, экстрагированном из кожи трески в Мурманске (образец 3). Как видно, структура обоих рыбных желатинов резко отличается от желатины, выделенной из млекопитающих (свиная кожа), которая имеет крайне нерегулярное строение. Тем не менее, гелевая структура желатина

трески, полученного в лабораторных условиях, кажется более плотной, чем у коммерческого рыбного желатина и по этим характеристикам близка к желатину млекопитающих.

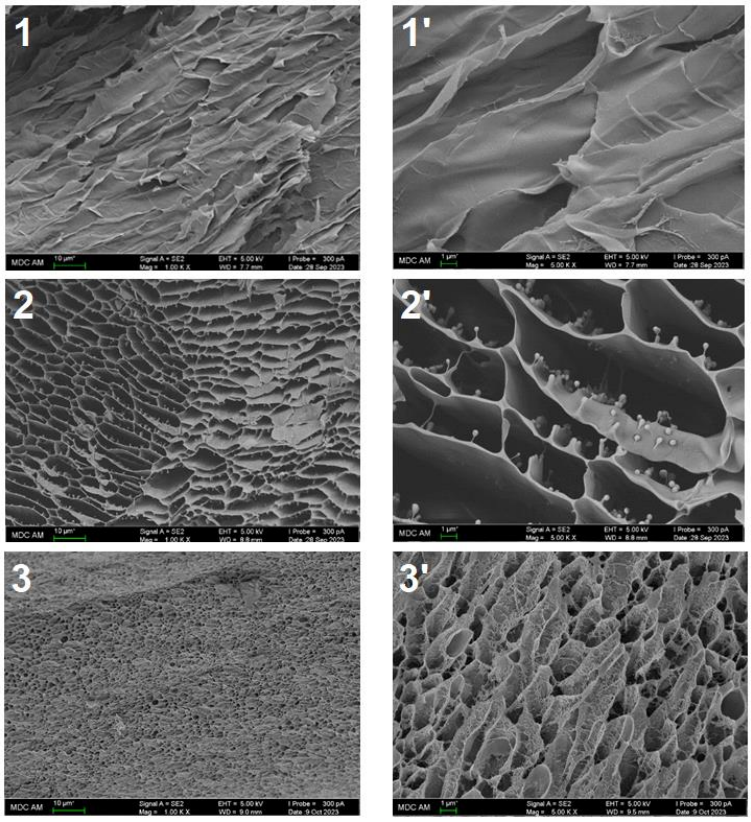


Рис. 7. СЭМ-изображения желатиновых ксерогелей с двумя разрешениями. Сверху вниз: свиной желатин Sigma (1), рыбный желатин Sigma (2) и лабораторный желатин (3).

4. Подготовительная работа по исследованию межмолекулярных взаимодействий и пространственной структуры супрамолекулярных комплексов расчетными методами – подготовка наборов репрезентативных фрагментов в пределах 30 аминокислот для понижения «расчетной» размерности, которые в дальнейшем будут использованы для моделирования белка. Подготовка библиотек репрезентативных фрагментов полисахаридов, варьируемых по длине и степени замещения боковых групп, которые будут использованы для молекулярного моделирования.

Созданы библиотеки структуры фрагментов белка для молекулярного моделирования. Коллаген состоит из трех длинных (~1000) спиралевидных цепочек аминокислот. Цепи полипептида состоят из повторяющейся последовательности $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$, где X и Y могут быть заняты любой аминокислотой, хотя эти положения чаще занимают пролин и 4-гидроксипролин. Исходные последовательности для in silico библиотек репрезентативных фрагментов желатина были взяты из [Nimni, M. E. (1988). Collagen: Biochemistry, Biomechanics, Biotechnology. Boca Raton, FL: CRC Press Inc] для желатина млекопитающих и модифицированы с учетом особенностей аминокислотного состава рыбьего желатина. Рыбный желатин имеет более низкое содержание пролина и гидроксипролина, что обусловливает его более низкую температуру денатурации. Более детальный анализ литературы показал, что кроме разницы в содержании гидроксипролина (6% против 9,5% в коллагене млекопитающих), в рыбном коллагене превалируют гистидины (1% против 0.5%), серины (6,5% против 3,5%) и треонины 2,5% против 1,8%).

Было построено 10 фрагментов по 27 аминокислотных остатков. Длина фрагментов была выбрана исходя из соображений оптимальности для расчетов и максимального покрытия топологических особенностей и зарядового распределения, представляющих структурное разнообразие длинной молекулы желатина. Пространственные структуры были сконструированы в

виде тройной цепи с помощью онлайн сервиса http://www.cgl.ucsf.edu/cgi-bin/gencollagen.py. После чего 3Д-структуры были разделены на одиночные молекулы (рис. 8).

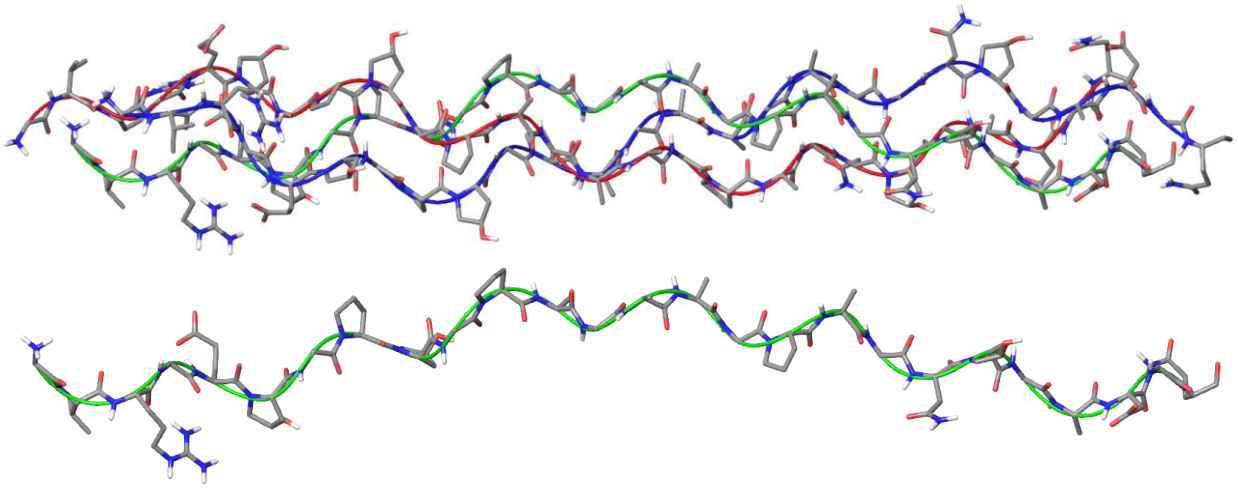


Рис. 8. Пример тройной (вверху) и одинарной (внизу) спирали рыбного желатина из созданной in silico библиотеки.

Созданы библиотеки структуры фрагментов полисахаридов для молекулярного моделирования. С этой целью составлены библиотеки 3Д структур репрезентативных фрагментов полисахаридов, заявленных к использованию в проекте:

1. Альгинат натрия, состоящий из 1,4-β-D-маннуроновой кислоты (M) и 1,4-α-L-гулуроновой кислоты (G). Поскольку их чередование вдоль цепи полисахарида нерегулярное, были сконструированы геометрии следующих фрагментов MMMM, GGGG, MGMG, GMMG, MGGM для выполнения докинга, основанного на фрагментах. Также были получены геометрии фрагментов олигосахаридов из 18 остатков - длиной, сравнимой с длиной фрагментов желатина (см. п.1). Олигомеры былb сформированы комбинацией вышеобозначенных коротких фрагментов.
2. Хитозан, состоящий из остатков 1,4-β-N-ацетил-D-глюкозамина (A) и 1,4-β-D-глюкозамина (D). Набор геометрий был составлен с учетом вариации возможных положений деацетилирования: AAAA, DDDD, ADAD, ADDA, DAAD для выполнения докинга, основанного на фрагментах. Также были получены геометрии фрагментов олигосахаридов из 18 остатков - длиной, сравнимой с длиной фрагментов желатина (см. п.1). Олигомеры былb сформированы комбинацией вышеобозначенных коротких фрагментов.
3. Фукоидан, состоящий из α-1,3 и α-1,4 связанных остатков фукозы (F) с сульфатными группами в положении 2, 3, и/или 4. Набор геометрий был составлен с учетом вариации возможных положений сульфатирования: FFFF, F2SF2SF2SF2S, F3SF4SF3SF4S, FF2SFF2S, F2S3SF2S4SF2S3SF2S4S. Также были получены геометрии фрагментов олигосахаридов из 18 остатков - длиной, сравнимой с длиной фрагментов желатина (см. п.1). Олигомеры была сформированы комбинацией вышеобозначенных коротких фрагментов.
4. Каррагинаны, сформированные чередованием 1,3-β- и 1,4-α-D-галактозы. Были получены геометрии фрагментов κ-, ι- и λ-каррагинана длиной четыре и восемнадцать углеводных остатков.

Для химически модифицированных полисахаридов составлены файлы с топологией, удовлетворяющие концепции силового поля Amber (Glycam) (рис. 9). Парциальные атомные заряды получены на основе квантово-химических расчетов на уровне B3LYP/6-31* с использование метода ограниченного электростатического потенциала (RESP). Заряды, полученные таким образом могут быть использованы совместно с параметрами силового поля AMBER [J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 5179-5197] и силового поля GLYCAM [J. Comput. Chem., 2008, 29, 622-655]. Параметры для связанных взаимодействий для амидной группы на границе двух силовых полей (GLYCAM06j для углеводов и GAFF для линкерной последовательности) были взяты из силового поля Amber14SB.

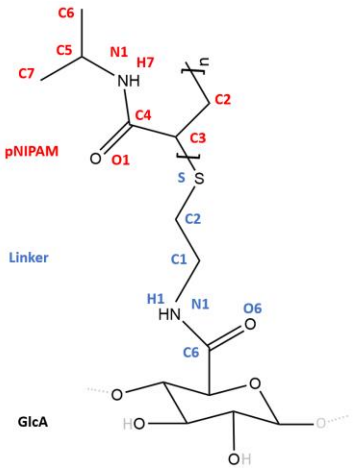


Рис. 9. Пример графт-сополимеризации полисахарида с поли(N-изопропилакриламидом) по остатку уроновой кислоты. Парциальные заряды, полученные в результате параметризации, приведены в таблице 3.

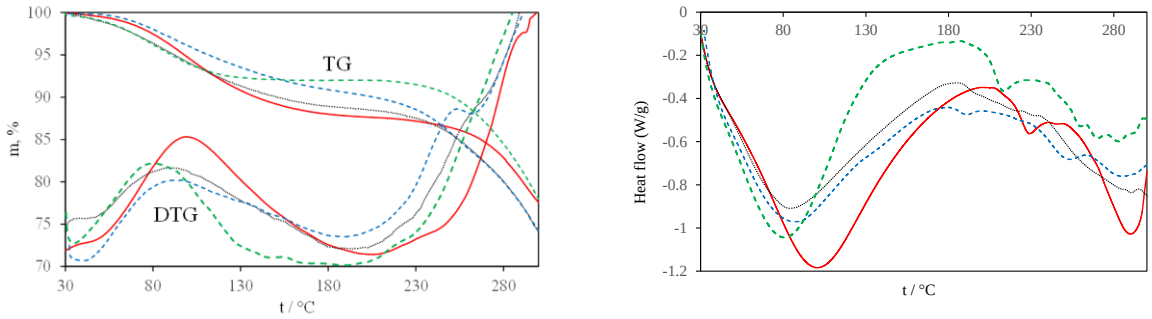
Таблица 3. Парциальные атомные заряды, полученные для остатка уроновой кислоты, сополимеризованного с поли(N-изопропилакриламидом).

Linker		NIPAM	
Atom	Partial charge	Atom	Partial charge
C6	0.6250	C2	0.0663
O6	-0.3730	H4	-0.0215
N1	-0.6016	H5	-0.0215
H1	0.3535	C3	-0.0249
C1	0.2983	H6	0.0275
H3	0.0156	C4	0.5338
H4	0.0156	O1	-0.5386
C2	-0.0807	N1	-0.6114
H5	0.0857	H7	0.3358
H6	0.0857	C5	0.4774
S	-0.2929	H8	0.0389
		C6	-0.5206
		H9	0.1299
		H10	0.1299
		H11	0.1299
		C7	-0.5206
		H12	0.1299
		H13	0.1299
		H14	0.1299

5. Определение энтальпии взаимодействий между полисахаридами либо белками и полисахаридами в водных растворах методом изотермической калориметрии.

5.1. Термический анализ твердых образцов желатинов. Совмещенный ТГ/ДСК-анализ твердых образцов желатинов был проведен с помощью анализатора STA 449 C Jupiter (Netzsch, Германия) в потоке аргона со скоростью 75 мл/мин. В типичном эксперименте 5–10 мг образца помещали в алюминиевый тигель с проколотой крышкой, выдерживали в токе аргона внутри анализатора при комнатной температуре до достижения постоянной массы, а затем нагревали с постоянной скоростью 10 К/мин. При нагревании всех трех твердых образцов желатинов наблюдается два последовательных процесса, приводящих к потере массы и поглощению теплоты (рисунок 10а): дегидратация, наиболее интенсивно протекающая при 80–120 °C и сопровождающаяся потерей около 10% массы образца (8% массы в случае очищенного рыбного желатина МГТУ), и разложение

желатина, которое начинается выше 220 °C и приводит к образованию черной массы, сильно превышающей по объему исходный образец. Различия в термостабильности трех образцов желатина невелики. Свиной желатин обладает чуть большей устойчивостью к разложению и начинает заметно разлагаться при 250 °C, в то время как рыбные желатины – при 230 °C. Рыбный желатин МГТУ содержит более прочно связанную воду и теряет ее при несколько более высоких температурах (теряет 5% массы при нагревании до 112 °C, 10 % массы – при 185 °C), чем рыбный желатин от Sigma (теряет 5% массы при нагревании до 92 °C, 10 % массы – при 150 °C). Однако после очистки образец связал заметно меньше воды (8% по массе), которую он полностью теряет при нагревании до 130–140 °C.



а б

Рис. 10. Термогравиметрические кривые TG и их производные DTG (а) и ДСК-кривые совмещенного ТГ/ДСК-анализа (б) твердых образцов твердых образцов свиного желатина Sigma (красные сплошные линии), рыбного желатина Sigma (черные пунктирные линии) и рыбного желатина, полученного в Мурманске, (синие штриховые линии – неочищенный, зеленые штриховые линии – очищенный).

На всех калориметрических кривых образцов (см. рисунок 10б) наблюдается большое поглощение тепла при дегидратации. Этот пик перекрывает эффекты стеклообразного перехода и плавления гидратированного желатина, которые можно наблюдать в экспериментах в герметичных ячейках под давлением при температурах около 75 и 100 °C соответственно [I. Mukherjee, M. Rosolen. Thermal transitions of gelatin evaluated using DSC sample pans of various seal integrities. J. Therm. Analys. Calorim. 2013, V. 114, P. 1161–1166. 10.1007/s10973-013-3166-4]. Помимо этого, в случае свиного желатина присутствует пик с температурой максимума 22.7 °C и площадью 8.2 Дж/г. Образцы рыбного желатина демонстрируют схожие термограммы.

Для характеристики возможных фазовых переходов безводного желатина отдельно были проведены эксперименты с использованием дифференциального сканирующего калориметра 204 F1 Phoenix (Netzsch, Германия), откалиброванного путем измерения температур плавления и энтальпий стандартных соединений (Hg, In, Sn, Bi, Zn и CsCl). Образцы желатинов массой 5–10 мг в алюминиевых тиглях с проколотой крышкой сначала высушивались в атмосфере аргона при 130 °C, затем охлаждались до комнатной температуры и нагревались со скоростью 10 К/мин до 180 °C, что заведомо ниже температуры разложения. Циклы охлаждения/нагрева повторялись 3 раза. На полученных термограммах не наблюдалось пиков фазовых переходов или скачков теплоемкости, соответствующих расстекловыванию.

5.2. Калориметрическое исследование гель-золь переходов желатинов. Для характеристики гель-золь перехода 10%-ных гелей желатинов были проведены эксперименты с использованием дифференциального сканирующего калориметра 204 F1 Phoenix (Netzsch, Германия), откалиброванного путем измерения температур плавления и энтальпий стандартных соединений (Hg, In, Sn, Bi, Zn и CsCl). Были исследованы образцы свиного желатина и рыбных желатинов Sigma и МГТУ (в очищенном и неочищенном состоянии). Образцы гелей массой 5–10 мг в алюминиевых тиглях нагревали до 40 °C (что выше температуры плавления любого из образцов), затем выдерживали в течение 3 часов при температуре примерно на 10 °C ниже температуры перехода в золь (при 20 °C в случае свиного, при –1 °C в случае рыбного МГТУ, при –4 °C в случае рыбного Sigma). Затем образцы нагревались со скоростью 5 К/мин до 50 °C.

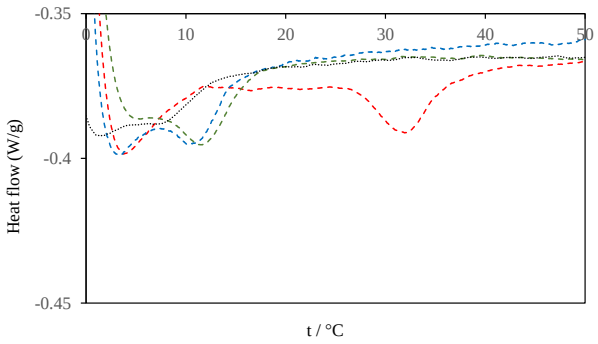
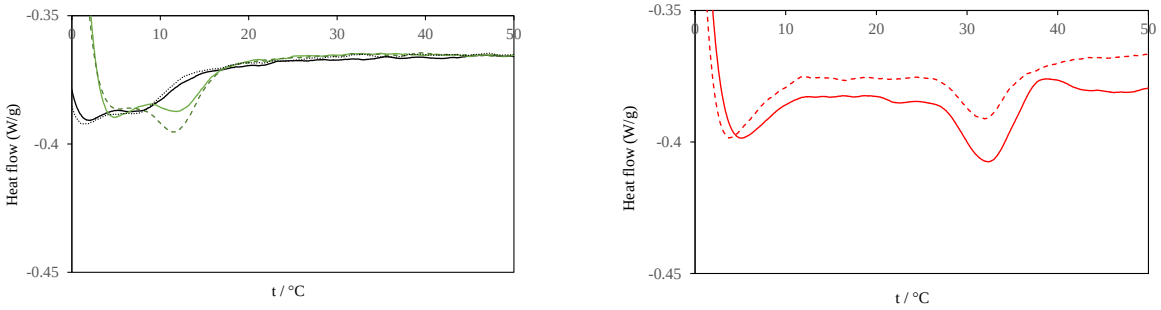


Рис. 11. ДСК-кривые гелей свиного желатина (красная штриховая линия), рыбного желатина Sigma (черная пунктирная линия) и рыбного желатина МГТУ (неочищенный – синяя штриховая линия, очищенный – зеленая штриховая линия).

На полученных термограммах (рисунок 11) присутствуют эндотермичные пики. Их температуры соответствуют наблюдаемому плавлению гелей с образованием золей при исследовании в приборе для визуального определения температуры плавления (Electrothermal IA 9100 Melting Point Apparatus). Для свиного желатина по данным ДСК переход наблюдался в интервале 28–37 °С, температура минимума пика 31,9 °С, энтальпия плавления 12 Дж/г (в пересчете на чистый желатин). Для рыбного желатина, полученного в Мурманске, переход наблюдался в интервале 9–14 °С, температура минимума пика 11,4 °С, энтальпия плавления 7 Дж/г (грубая оценка из-за попадания на начало базовой линии). Очистка желатина от неорганических ионов приводит к несущественному сдвигу пика (температура минимума 11,9 °С). Рыбный желатин Sigma обладает еще более низкой температурой плавления геля (интервал 4–12 °С, температура минимума пика 8,4 °С, энтальпия плавления 3 Дж/г.

5.3. Добавление альгината натрия не привело к смещению температуры пиков плавления гелей.



а б

Рис. 12. ДСК-кривые гелей рыбного (а) и свиного (б) желатинов в отсутствии (пунктирные линии) и присутствии альгината натрия (сплошные линии). Рыбный желатин лабораторный – зеленым, рыбный Sigma – черный, свиной Sigma - красный.

Для рыбного желатина Sigma кривые в отсутствии и присутствии альгината почти точно совпадают, для рыбного желатина МГТУ площадь пика уменьшилась до соответствующей энтальпии плавления 5 Дж/г при незначительном сдвиге температуры максимума пика (с 11,9 °С до 12,3 °С). Это может быть связано с замедлением скорости образования геля желатина в присутствии альгината. В то же время для свиного желатина с добавлением альгината при столь же незначительном изменении температуры максимума пика (с 31,9 °С до 32,6 °С) произошло увеличение его площади до 20 Дж/г.

Полученные данные свидетельствуют о гораздо более высокой термоустойчивости гелей свиного желатина. Помимо более высокой температуры плавления, гель свиного желатина обладает большей энтальпией плавления. Это с большой вероятностью говорит о большем числе кросс-сшивок между пептидными цепями в свином желатине. Это соответствует проведенным ранее

сравнениям свойств желатинов рыб и млекопитающих [A.A. Karim, R. Bhat. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids, 2009, V. 23, P. 563-576. 10.1016/j.foodhyd.2008.07.002]. Рыбный желатин Sigma образует менее термоустойчивый гель, чем лабораторный вариант рыбного желатина, полученного в Мурманске.

6.Исследовать электрокинетические свойства и дзета потенциал комплексов полисахарид-белок в системах на основе немодифицированных биополимеров.

Проведены пробные исследования светорассеяния молекулярных комплексов. Ниже приведен пример применения метода светорассеяния к растворам различных желатинов. Проведенные исследования показывают гетерогенность исследуемых систем, что очевидно потребует проведения подготовительных работ. На рис. 13 приведены результаты светорассеяния для рыбного желатина, полученного в лабораторных условиях в Мурманске. Очевидно, что очистка полученного желатина от примесей неорганических солей приводит к более монодисперсной системе. Тем не менее полученные данные показывают, что в растворе желатина с концентрацией 1 мг/мл при 30°C присутствуют как мономерные белковые макромолекулы, так и их небольшие агрегаты (Табл. 4). Оценка поверхностного дзета-потенциала желатина дает невысокие значения 1-2 мВ.

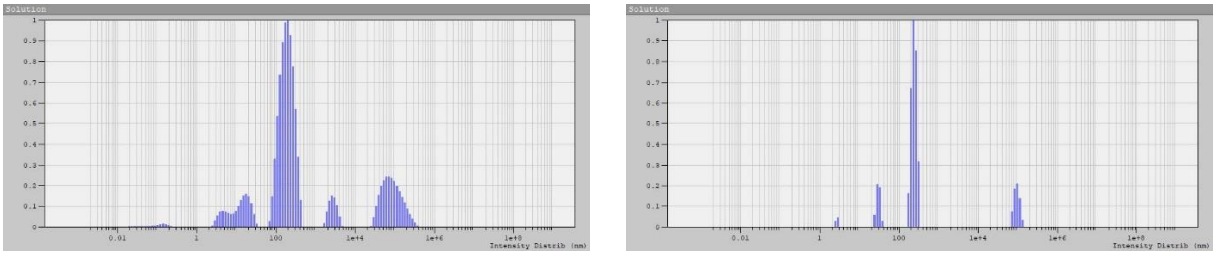


Рис. 13. Интенсивность светорассеяния в 1 мг/мл растворах неочищенного (слева) и очищенного (справа) рыбного желатина, полученного мурманским партнером.

Таблица 4. Гидродинамический диаметр (нм) молекул и агрегатов желатина.

Образец	Молекула, нм	Агрегат, нм
Свиной желатин Sigma	12.9	145.1
Рыбный (Мурманск) неочищенный	17.5	196.4
Рыбный (Мурманск) очищенный	27.5	228.5

7. Эксперименты ЯМР по ограниченной диффузии воды и органической жидкости в гидрогелях альгинат-коллаген (тип жидкости будет подбираться исходя из термодинамической устойчивости системы) в системе.

Методом ЯМР исследовано поведение воды в сетках гидрогелей на основе различных желатинов и в смешенных системах желатин-альгинат и желатин-к-каррагинан. Исследование влияния органической среды исследовано на примере растворов желатина в водно-глицериновых средах и в микроэмульсиях вода/масло.

Для описания экспериментальных результатов по спин-спиновой и спин-решеточной релаксации в жидких системах, характеризуемых различным набором населенностей и связанных с ними временами релаксации, была использована теоретическая модель [Zimmermann, J. R, and Brittin, W. E. J. Phys. Chem. 1957, 61, 1328]. В этой модели постулируется обмен молекулами жидкости между фазами, который обеспечивает перенос намагниченности от одной фазы к другой и влияет на наблюдаемую скорость релаксации. При быстром обмене между фазами скорость спин-спиновой и спин-решеточной релаксации описывается одной экспонентой. Для медленного обмена наблюдаемая скорость релаксации есть суперпозиция скоростей релаксации каждой фазы и соответствующих населенностей фаз p_i. В этом случае зависимость продольной и поперечной намагниченности от времени описывается двумя экспонентами.

$$(1/T_{1,2})_{набл} = (p_а/T_{1,2а})+(p_в/T_{1,2в})$$

В наших экспериментах кривая инверсии-восстановления для протонов воды в исследуемых системах желатин-вода хорошо описывается двумя значениями времен спин-решеточной релаксации $T_{1а}$ и $T_{1в}$. На рис. 14 показана зависимость медленной компоненты времени спин-решеточной релаксации от температуры в аррениусовых координатах.

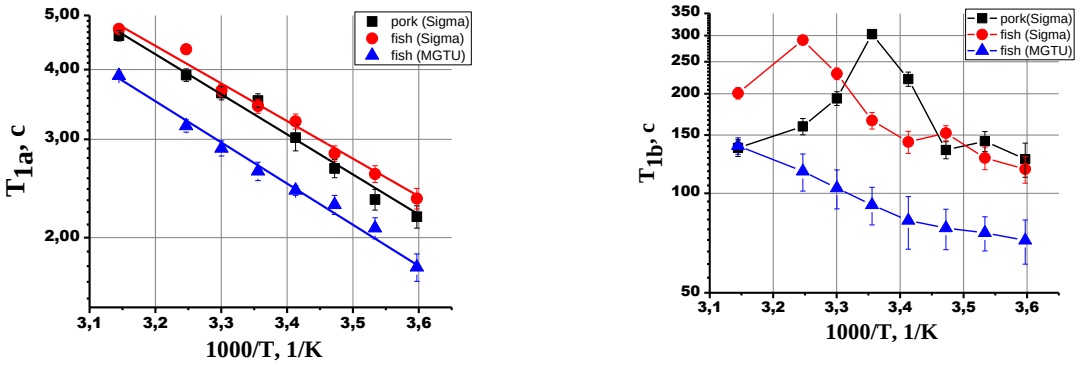


Рис. 14. Зависимость компонент времени спин-решеточной релаксации воды $T_{1а}$ и $T_{1в}$ от температуры в гидрогелях на основе желатины.

Во всех исследуемых системах поведение $T_{1а}$ от температуры одинаково, то есть $T_{1а}$ растет с ростом температуры. Значения времен спин-решеточной релаксации T1a для температурного диапазона от 5 до 45°C изменяются от 1.7 до 4.8 сек. Такие значения близки к величинам спин-решеточной релаксации протонов чистой воды. Из температурных зависимостей времени спин-решеточной релаксации можно определить кажущуюся энергию активацию процесса релаксации $E_а$=13.6±0.6 кДж/моль. Данное значение близко по величине для энергии активации чистой воды 14–16 кДж/моль. Поэтому мы считаем, что время $T_{1а}$ относится к протонам свободной воды в данных системах. Компонента $T_{1в}$ для данного температурного диапазона изменяется в интервале от 70 до 300 мс. Зависимость компоненты $T_{1в}$ спин-решеточной релаксации от температуры показаны на рис. 14. Также как и для компоненты $T_{1а}$ с ростом температуры увеличивается и время $T_{1в}$ спин-решеточной релаксации. Кроме того, на зависимости T_1 от температуры для образцов желатины, полученных из свиного и рыбного желатина, наблюдаются экстремумы, которые могут быть связаны с началом процесса гелеобразования в этих системах. При этом положения экстремумов для желатины, полученных из свиного и рыбного материала, различаются. Этот факт может указывать на отличие в структуре, образованной в процессе гелеобразования трехмерной сетки.

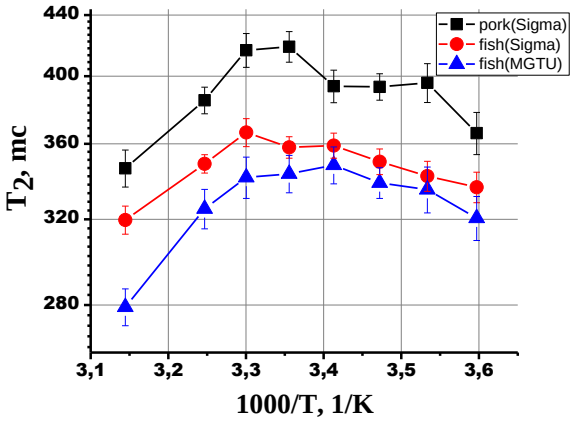


Рис. 15. Зависимость времени спин-спиновой релаксации T_2 воды от температуры в гидрогелях на основе желатины.

Для зависимости времени спин-спиновой релаксации от температуры для трех образцов желатины, мы наблюдаем близкое поведение (рис. 15) спин-спиновой релаксации во всех системах. Полученные зависимости имеют нелинейный вид с широким экстремумом. Подобного вида зависимости указывают на то, что измеренные времена релаксации могут представлять собой вклад различных состояний протонов воды. В нашем случае это связано с эффектами химического обмена и спиновой диффузии. В области температур от 293K до 278K обмен молекулами воды между фазой свободной воды и фазой, связанной с протеином, происходит медленно и время спин-спиновой релаксации контролируется изменением времени корреляции от температуры для трансляционной и вращательной диффузии и внутримолекулярным диполь-дипольным взаимодействием протонов воды. В области температур выше 293K в скорость спин-спиновой релаксации все больший вклад начинает вносить релаксация за счет потери фазовой когерентности спинов протонов при обмене между свободной и связанной с молекулой желатины фазами.

Для данных систем вода-желатина были измерены зависимости коэффициентов самодиффузии (КСД) воды от температуры и от времени диффузии для температур 293 и 283K. На рис. 16 показаны температурные зависимости коэффициентов самодиффузии протонов воды от температуры для гидрогелей на основе разных типов желатин. Температурные зависимости КСД характеризуются близкими значениями кажущейся энергией активации, которая составила E_a=16.2±0.5 кДж/моль. Данное значение совпадает по величине с энергией активации для процесса самодиффузии в чистой воде. В измерениях зависимостей КСД от времени диффузии, времена диффузии варьировались в диапазоне от 25 до 2000 мс. На рис. 17 показаны зависимости КСД протонов воды от времени диффузии для температур 293K и 283K. Была показана независимость коэффициентов самодиффузии от времени диффузии, что говорит об отсутствие пространственных ограничений для диффузионного процесса молекул воды в данных системах. Это может указывать на образование крайне редкой или очень мобильной сеточной структуры, образованной молекулами белка.

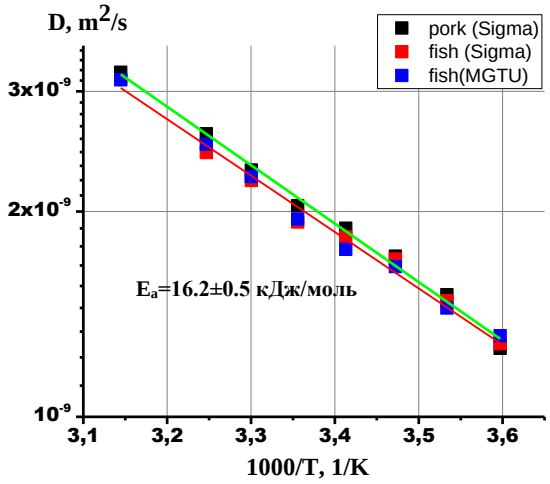


Рис. 16. Зависимость КСД воды от температуры для гидрогелей на основе разных типов желатины.

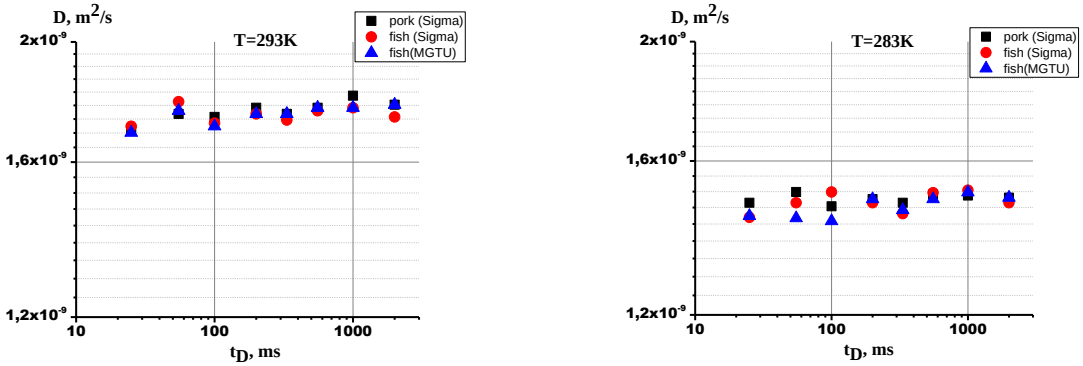


Рис. 17. Зависимость КСД воды от времени диффузии для температур 293К и 283К для гидрогелей на основе разных типов желатины.

Температурные зависимости времен спин-решеточной и спин-спиновой релаксации в гидрогелях, полученных на основе желатинов различного происхождения, показывают наличие сложного процесса обмена между протонами воды в свободном и связанном с макромолекулами протеина фазами. При этом процессы самодиффузии в том же температурном диапазоне не чувствительны к указанному обмену, что связано, вероятно, с разным масштабом времен для процессов диффузии и релаксации. Независимость КСД протонов воды от времени диффузии ($D \sim t_D^{-1}$) указывает на отсутствие пространственных ограничений для диффузионного процесса молекул воды в данных системах.

8. Исследование изменений вторичной структуры цистеиновых протеаз (фицина, бромелина и папаина) при иммобилизации на коммерческих хитозанах методами ИК- и КД-спектроскопии.

Сухие препараты хитозанов промывали трижды боратным / D_2O буфером с pH9 для удаления присутствующих растворимых примесей и буферных солей и замещения протонов N-H-групп белка и хитозана. После центрифугирования снимали спектры влажных препаратов на ИК-спектрометре IR-Affinity-1 (Shimadzu) с НПВО-приставкой. Препарат помещали на поверхность измерительного элемента из ZnSe при 25оС. Для выделения спектра белка вычитали спектр буфера/D_2O и спектр чистого хитозана. Содержание вторичных структур рассчитывали путем разложения спектра полосы амид1 на компоненты.

8.1. Вторичная структура цистеиновых протеаз при иммобилизации на коммерческих хитозанах разной степени ацетилирования (СА).

Содержание вторичных структур представлено в Табл. 5. В целом, с ростом СА наблюдается уменьшение доли спиральности и увеличение доли бета-структур. Отношение долей альфа/бета ярче выявляет эту тенденцию (рис. 18).

Таблица 5. Содержание вторичных структур в образцах бромелина, папаина и фицина. СА – степень ацетилирования хитозанов. Данным для раствора условно присвоена степень ацетилирования 0.

Бромелин, N образца	СА, %	Доля спиральных структур	Доля бета-структур	М.в. хитозана, кДа
раствор	0	0.42	0.32	0
98	11.5	0.4	0.37	50
103	11.5	0.38	0.45	50
99	9.5	0.39	0.36	190
104	9.5	0.38	0.45	190
100	18.2	0.38	0.4	310
105	18.2	0.31	0.46	310
101	14.7	0.36	0.47	190
106	14.7	0.31	0.4	190
102	16	0.4	0.4	
107	16	0.39	0.39	

Папаин N образца	СА, %	Доля спиральных структур	Доля бета-структур	М.в. хитозана, кДа
раствор	0	0.33	0.368	0
88	11.5	0.29	0.45	50
93	11.5	0.28	0.5	50
89	9.5	0.28	0.41	190
90	18.2	0.21	0.44	310
95	18.2	0.26	0.38	310
91	14.7	0.27	0.41	190
96	14.7	0.24	0.4	190

Фицин N образца	СА, %	Доля спиральных структур	Доля бета-структур	М.в. хитозана, кДа
раствор	0	0.32	0.45	0
17	9.5	0.33	0.4	190
18	18.2	0.11	0.44	310
21	11.5	0.37	0.39	50
22	9.5	0.33	0.44	190
23	18.2	0.28	0.58	310
20	16	0.36	0.53	
24	14.7	0.24	0.48	190
25	16	0.26	0.56	

92	16	0.29	0.38			

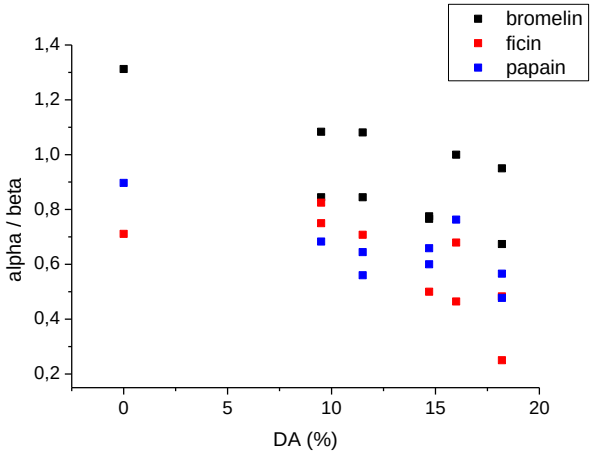


Рис. 18. Отношение доли спиралей к вытянутым структурам от степени ацетилирования (DA,%) хитозанов.

Вторичная структура фицина, бромелина и папаина в растворе характеризуется преобладанием бета-структуры с поглощением на 1630 $см^{-1}$. При иммобилизации на хитозанах проявляется агрегационная бета-структура с поглощением на 1615 $см^{-1}$. Суммарная доля бета-структур выше, а спиралей - ниже при иммобилизации на хитозанах с более высокой степенью ацетилирования.

8.2. Исследования вторичной структуры цистеиновых протеаз при иммобилизации на модифицированных хитозанах и целлюлозе показали, что:

1. Ферменты в комплексе с модифицированными хитозанами в некоторых случаях вызывают деструкцию привитых групп из-за чего не удается выделить спектр самого белка на фоне матрицы.
2. Комплексы ферментов с модифицированной целлюлозой более устойчивы.
3. Связывание цистеиновых протеаз на модифицированных хитозанах и целлюлозе сопровождается изменениями вторичной структуры, которые зависят от вида привитых боковых групп.

9. Разработан алгоритм определения пространственной структуры полимерной сетки ион-индуцированного геля альгината натрия, основанный на экспериментальном определении элементного состава геля и комбинаторном анализе вероятности формирования зон связывания ион-полисахарид [Zueva O.S., Khair T., Kazantseva M.A., Latypova L., Zuev Yu.F. Ions-Induced Alginate Gelation According to Elemental Analysis and a Combinatorial Approach // International Journal of Molecular Science. – 2023. – V. 24. – 16201. doi:10.3390/ijms242216201].

Разработана модель ион-индуцированного гелеобразования альгината натрия, основанная на данных элементного анализа ионотропных гелей полисахаридов в определения зон соединения двухвалентных катионов с полисахаридной матрицей. Разработанный алгоритм обеспечивает определение вкладов физически адсорбированных и структурообразующих ионных соединений, при этом полученные результаты масштабируются на альгинатный блок С12. В рамках модели «яичной упаковки» проанализированы возможные варианты объединения полисахаридных цепей в димеры и их последующая интеграция в зоны плоских соединений (рис. 19). Применение комбинаторного анализа позволило вывести теоретические соотношения для нахождения вероятности появления различных типов яичных клеток для альгинатных цепей с произвольным соотношением мономерных звеньев M/G, что позволяет сравнивать экспериментальные данные для альгинатов разного происхождения и химической структуры. На основании литературных данных и полученных химических формул установлено возможное соответствие конкретных биополимерных ячеек наиболее предпочтительным для заполнения щелочноземельными катионами. Выявленные особенности элементного состава позволяют предположить образование сложных гидратных комплексов с участием катионов переходных металлов. Установлена возможность количественной

оценки упорядоченных вторичных структур, образующихся в результате физической сорбции ионов и молекул из окружающей среды, коррелирующих с сорбционными способностями альгината Me2+.

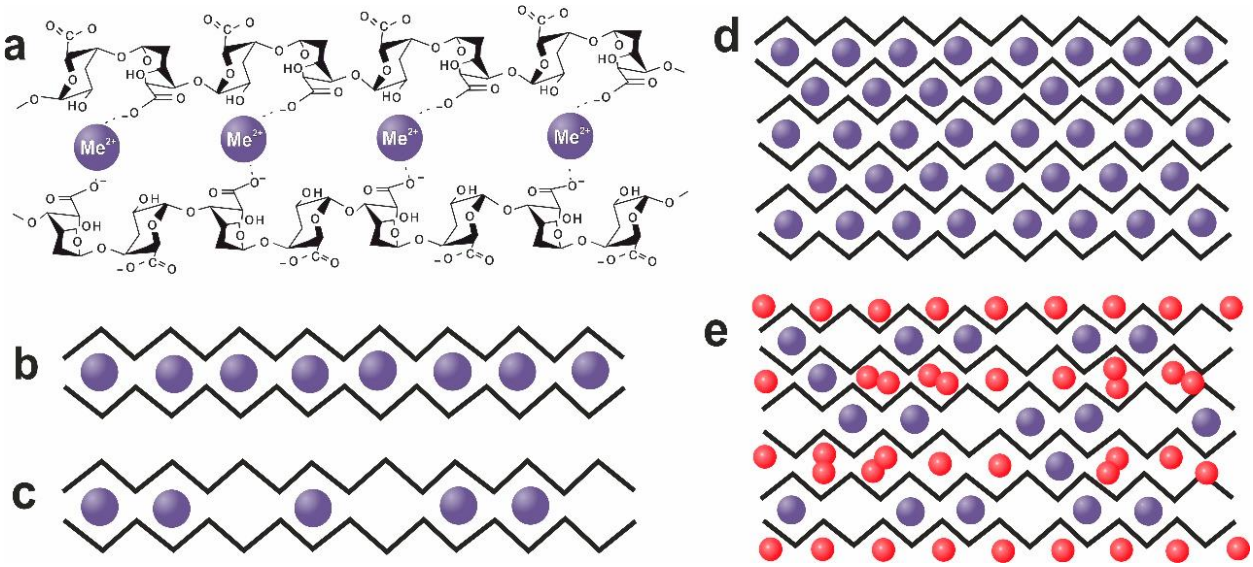


Рис. 19. Схема формирования димеров альгинатными цепями (a); схематический вид димера с полностью (b) и частично (c) связанными клетками; типы зон соединения (d) и (e) при ассоциации димеров. Синие шарики соответствуют ионам Me2+, красные – ионам натрия и водорода.

10. Показано, что сульфатированные полисахариды способны препятствовать агрегации белков смещая конформационное равновесие между нативной и агрегированной структурой белков, вплоть до дезагрегации последней и последующего восстановления исходной структуры белковых макромолекул. Это равновесие зависит от плотности распределения зарядов и гибкости полисахаридной цепи, которые демонстрируют противонаправленные эффекты [Makshakova O., Bogdanova L., Faizullin D., Ermakova E., Zuev Y. Sulfated polysaccharides as a fighter with protein non-physiological aggregation: the role of polysaccharide flexibility and charge density // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V.24. – P. 16223. doi:10.3390/ijms242216223].

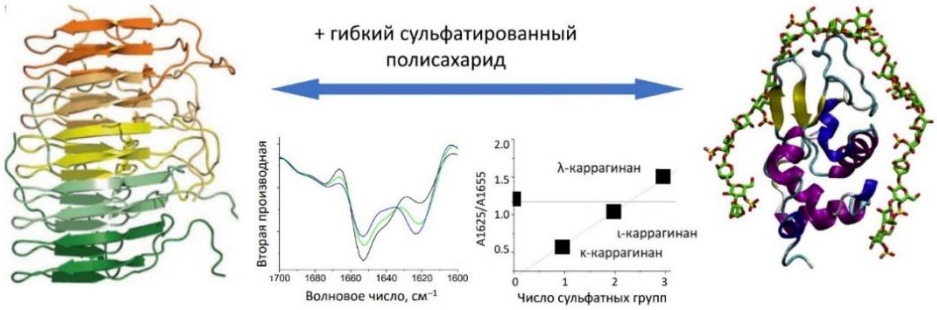


Рис. 20. Схема формирования белковых структур, обогащенных β-слоями, (1) и обратной ренатурации при связывании с к-каррагинаном (2).

Разработка способов ингибирования агрегации белков и дезагрегации белковых ассоциатов на любом этапе их роста является актуальной задачей различных биотехнологий. На примере модельного белка (лизоцим) показан потенциал природных сульфатированных полисахаридов в восстановлении поврежденных белковых структур. С помощью ИК-спектроскопии показано, что конформационный баланс между амилоидными мотивами и нативной структурой белка может смещаться за счет взаимодействия с сульфатированными полисахаридами. Этот баланс зависит от плотности сульфатирования и от гибкости полисахаридной цепи, которые действуют

противонаправленным образом (рис. 20). Гибкие и менее заряженные полисахариды способствуют полной перестройке амилоидных структур белка в нативную структуру, а более сульфатированные провоцируют усиление амилоидных мотивов. Наиболее жесткие полисахариды полностью теряют способность восстанавливать исходные белковые структуры.

Заключение.

Дополнительные результаты работы по проекту в 2023 году:

1. На конкретных примерах отработана схема взаимодействия с партнерами. Ее основной особенностью является обратная связь между партнерами. С одной стороны, партнер из Мурманска обеспечивает другие взаимодействующие стороны объектами исследования. Эти стороны получают результаты по структуре, физико-химическим и функциональным свойствам биополимеров, выделенных из гидробионтов Арктических молей, и их комплексов, и предоставляют свои рекомендации Мурманскому партнеру для внесения корректив в методики получения биополимерного сырья с требуемыми характеристиками. Модифицированные объекты снова проходят тестирование в сравнительном плане с исходными образцами. Такое взаимодействие между партнерами позволяет получить сырье с необходимыми свойствами. В качестве примера можно привести выявленную необходимость очистки «лабораторного» желатина от примесей неорганических солей.
2. Широкий круг физических и физико-химических методов и подходов адаптирован к исследованию белков, полисахаридов и их комплексов с учетом особенностей природных биополимеров, выделенных из разных источников. Специфика этих объектов – большой размер, отсутствие четко выраженной вторичной и третичной структуры у желатина и коллагена, специфическая гибкость коллагеновой цепи, обусловленная присутствием большого количества пролиновых остатков, сочетание высокой гибкости полисахаридов и специфического распределения электрических зарядов вдоль их полимерных цепей, высокая активность этих биополимеров в образовании агрегатов. Применение большого числа взаимодополняющих методов потребовало особого внимания в их использовании, поиску корреляций между полученными результатами всеми тремя партнерами и отработки модифицированных экспериментальных условий.