Научный отчет
по проекту РНФ 23-64-10020
за 2024 год

Введение. Желатин – один из наиболее распространенных природных желирующих агентов в пищевой биомедицинской, косметической и фармацевтической промышленности. Преобладающими источниками желатина являются млекопитающие, в первую очередь используются свиная и бычья кожа. В последние годы проявляется большой интерес к рыбному сырью как к альтернативному источнику желатина. Одна из причин связана с религиозными ограничениями в использовании продуктов питания животного происхождения (халяльные и кошерные продукты). Другая, не менее важная причина связана с тем фактом, что рыбная промышленность производит большое количество отходов (кожа, чешуя, кости и субпродукты) при производстве товарной продукции. Как нами было показано на первых этапах работы по проекту, проблема ограниченного использования рыбного желатина проистекает из его низких вязкоупругих свойств, прочности и низкой термостабильности при плавлении. Это является следствием структурных особенностей рыбного желатина, который по сравнению с желатином из млекопитающих содержит меньшее количество аминокислотных триад Gly-Pro-Hyp. Основной задачей проекта является управление свойствами рыбного желатина и получения желатиновых гидрогелей по своим основным характеристикам (прочность, модуль упругости, плавление и скорость гелеобразования) близким к аналогам из млекопитающих. Нами уже показано, что разработанная Мурманскими партнерами методика получения рыбного желатина позволяет получить гидрогели близкие по свойствам к желатину из млекопитающих и значительно превосходящие коммерческий желатин из холодноводной рыбы. Работа по проекту направлена на оптимизацию характеристик полученного рыбного желатина за счет дополнительных модификаций, таких как введение полисахаридов и использования сшивающих агентов.

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 используется 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.

На этапе 2024 года основной исполнитель проекта изучал структуру и свойства белков, полисахаридов и их комплексов (желатин, полисахариды – альгинат натрия, хитозан, фукоидан, каррагинаны, агар) на молекулярном и супрамолекулярном уровнях с использованием стандартных препаратов и биополимеров, выделенных из гидробионтов Арктических морей партнером из Мурманского арктического университета.

Объекты исследования: 4 типа желатинов (желатин – частично гидролизованный коллаген): 1 - Желатин, выделенный Мурманским партнером из кожи трески; 2 - Этот же желатин, очищенный от примесей низкомолекулярных ионов; 3 - рыбный желатин (Sigma–Canada, G 7041, Lot #S LCC7087); 4 – желатин из кожи свиньи (Sigma – Switzerland, G6144, Lot # BCBR5299V). Изолят рыбного белка из отходов рыбопереработки (мышечная ткань атлантической трески). В качестве полисахаридов использовались: 1 - альгинат натрия (коммерческий, A-2033 “Sigma”, St. Louis, MO, USA, и выделенный мурманским партнером); 2 – хитозаны, выделенные из панцирей креветок и крабов (Мурманск); 3 – фукоидан (Мурманск); 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), агар, а также хитозан, химически модифицированные партнером из Воронежского госуниверситета.

Приборная база: pH-метр pH (HANNA Instruments), спектрофотометрУФ-ВИД Agilent Technologies Cary 100, ИК-спектрометры IR-Affinity (Shimadzu) и Invenio S (Bruker), оснащенных приставками полного внутреннего отражения (НПВО) на основе кристалла ZnSe, КД-спектрометр Jasco J-1500, термогравиметрически/ДСК анализатор STA 449 C Jupiter (Netzsch, Германия), дифференциальный

сканирующий калориметр 204 F1 Phoenix (Netzsch, Германия), ЯМР-спектрометры Bruker Avance III WB 400 (Bruker) с рабочей частотой 400,27 МГц и Bruker AVANCE III 600 MHz с рабочей частотой 600,17 МГц, спектрометр статического и динамического рассеяния света Фотокор, диэлектрические спектрометры PNA-X Agilent N5247A network analyzer, Agilent E4991A Frequency Response Analyzer и Novocontrol BDS-80 (общий частотный диапазон от 1 Гц до 60 ГГц), сканирующий электронный микроскоп "Merlin" ("Carl Zeiss", Germany) – междисциплинарный центр «Аналитическая микроскопия» Казанского Федерального университета. Термодинамические эксперименты выполнены с помощью капиллярного дифференциального сканирующего калориметра NanoDSC (TA Instruments, Нью-Касл, Делавэр, США). Малоугловые и широкоугловые эксперименты выполнены в Научном центре генетики и наук о жизни Университета Сириус (г. Сочи) с использованием комбинированного SAXS/WAXS дифрактометра XeuSS (Xenocs, Франция), (источник Genix3D, двумерный детектор Pilatus 300k, излучение CuKα, λ=1,5418Å) при температурах 1°, 26° и 45°C. Образцы в жидком виде заполнялись в капилляры диаметром 2 мм или 1.5 мм, изготовленные из бор-силикатного стекла, имеющего низкий коэффициент поглощения рентгеновских лучей. Расстояние образец-детектор составляло в режиме WAXS 5 см и 70 см в малоугловом (SAXS) режиме, калибровка данного расстояния произведена с использованием бегената серебра в качестве калибровочного стандарта. Интегрирование двумерных дифрактограмм проводили при помощи программного пакета, созданного в программной среде Igor Pro. Эксперименты по определению краевого угла смачивания пленок на основе желатинов и комбинаций желатин-полисахарид проводили методом сидящей капли на приборе Easy Drop Kruss DSA 20E (Германия) с системой автодозирования.

1. Исследование вторичной структуры белков и полисахаридов, выделенных из гидробионтов Арктических морей и их структурное состояние в составе белок-полисахаридных комплексов методами оптической спектроскопии.

ИК-спектроскопия использована для исследования вторичной структуры коммерческих и лабораторных образцов желатина. Проведено сравнение трех коммерческих желатинов от Sigma-Aldrich Corp. (Saint Louis, MO, USA):
1. MGP — желатин животного происхождения из свиной кожи (Type A) G6144, Lot No BCBR5299V, Switzerland;
2. MGB —желатин животного происхождения из кожи коровы (Type B) G9382, Lot No SLBM7200V, USA;
3. FGC—коммерческий рыбный желатин из кожи холодноводных рыб G7041, Lot No SLCC7087, Canada.
Исследованы 2 образца лабораторного рыбного желатина:
4. FGE— рыбный желатинfish, выделенный в Мурманске из кожи трески при pH 5.0);
5. FGED—рыбный желатин, выделенный в Мурманске из кожи трески при pH 5.0) с последующим диализом от присутствия солей.

Для анализа использовалась полоса Амид I, наиболее чувствительная к изменению вторичной структуры белка. Для характеристики вторичной структуры желатина использовали разложение полосы Амид I на вклады, относящиеся к различным элементам вторичной структуры белка (Рис. 1). Анализ тонкой структуры полосы Амид I показывает, что спектр свиного желатина MGP отличается от рыбных желатинов FGC и FGED резким ослаблением компонент при 1618, 1642, 1683 см-1, что указывает на более высокую долю тройных спиралей в свином желатине. Аналогичную структуру с высоким содержанием тройных спиралей демонстрирует мурманский рыбный желатин FGE. Содержание тройных спиралей во вторичной структуре желатина является важной характеристикой, поскольку уровень ренатурации коллагеноподобных структур определяет способность желатина образовывать высокопрочные гели. Для расчета содержания тройных коллагеноподобных спиралей мы разложили полосу Амид I на компоненты, соответствующие полосам поглощения при 1618, 1630, 1642, 1660, 1683 и 1692 см-1 - свободные гидратированные группы C=O (Pro) и C=O (Gly), что указывает на высокую долю тройных спиралей в свином желатине. Аналогичную структуру с высоким содержанием тройных спиралей демонстрирует рыбный желатин FGE. Гидратированные компоненты C=O (Pro, Hyp) и C=O (Gly) могут находиться как внутри тройной спирали, так и вне ее, но спектрально неразличимы. Поэтому в качестве меры спиральности мы использовали содержание групп C=O (Pro), связанных водородной связью с N-H (Gly), поглощающих при 1660 см-1. Следует отметить, что доля этих групп пропорциональна содержанию

тройных спиралей, но не равна ему. Результаты декомпозиции представлены на рис. 2. Самый высокий уровень содержания тройных коллагеноподобных спиралей, демонстрируют MGP и FGE, полученные из кожи трески (рисунок 2a).

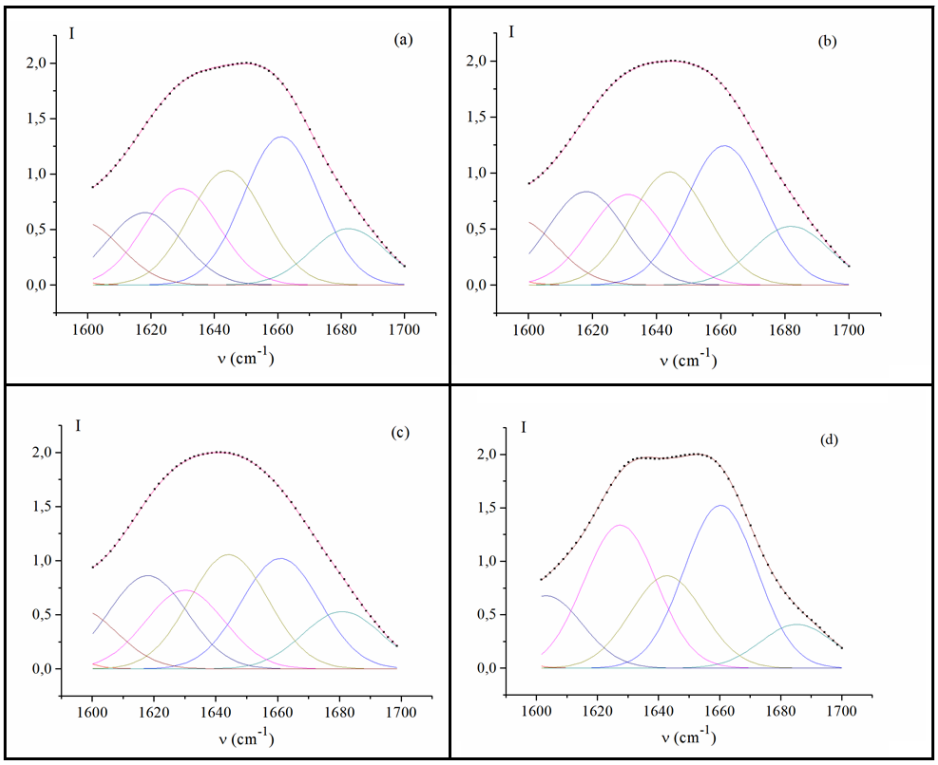


Рис. 1. Разложение полосы Амид I на компоненты для желатинов FGE (a), FGED (b), FGC (c), MGP (d).

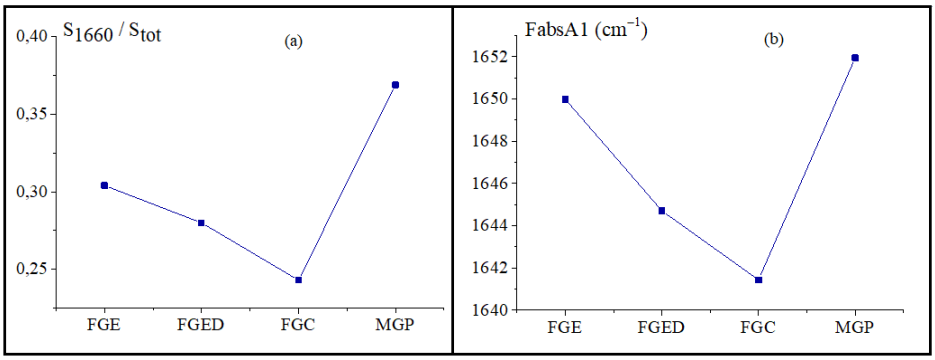


Рис. 2. a - отношение площади компоненты 1660 cm−1 к общей площади пика поглощения C=O групп в полосе Амид I. b – положение максимума поглощения Амид I.

Увеличение максимума волнового числа полосы Амид I отражает увеличение компоненты 1660 см-1, то есть увеличение доли имида C=O (Pro), связанного водородной связью с N-H (Gly), ответственного за стабилизацию тройной спирали. Полоса Амид I появляется при волновых числах 1649,98 см-1 и 1651,94 см-1 для желатинов FGE и MGP соответственно (рис. 2). Эти данные также подтверждают сходство вторичной структуры мурманского рыбного FGE и свиного MGP желатинов по содержанию спиралей.

Следующим этапом было изучение влияния химических сшивок на вторичную структуру желатиновых гелей. Данное исследование пока приведено только для свиного желатина. В последнее время большой интерес вызывают желатиновые гидрогели, сшитые с помощью новой технологии, включающей обработку быстрым замораживанием, медленным оттаиванием и последующей реакцией фотосшивки, индуцированной фотосенсибилизатором - бисульфитом натрия менадиона. (MSB). На рис. 3 (а, б) видно, что качественно характер температурных спектральных изменений идентичен для исходного и химически сшитого гидрогелей. Это означает, что в целом структурное состояние двух систем близко.

Однако наблюдаются некоторые структурные изменения, определяющие температурную стабильность двух изученных систем. Температурное разрушение коллагеноподобных тройных спиралей сопровождается разрывом водородной связи N-H(Gly)...O=C(Pro), что отражается в сдвиге максимума полосы Амида II (деформационные колебания N-H), показанном на рисунке 3 в.

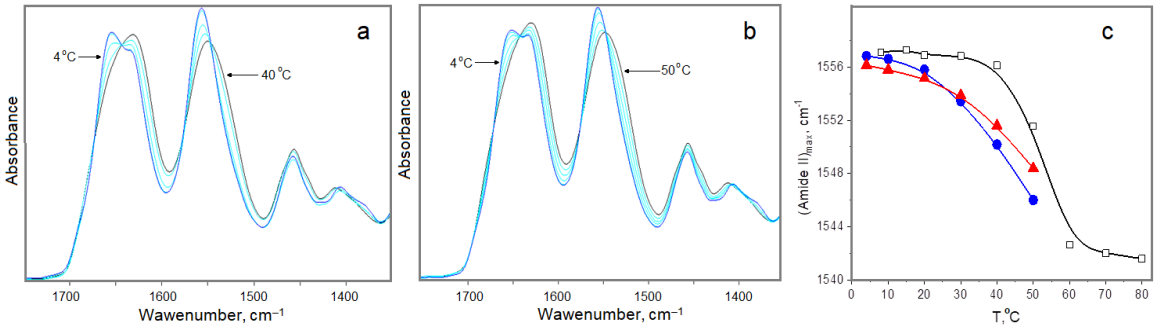


Рис. 3. ИК-спектр в диапазонах Амид I (C=O) and Амид II (N-H) для исходного (a) и химически сшитого (b) желатиновых гидрогелей и изменение максимума Амид II (c) для исходного (голубой) и химически сштого (красный) гидрогелей в сравнении с коллагеном из хвоста крысы (черный).

Можно отметить более высокую термостабильность химически сшитого желатинового гидрогеля по сравнению с исходным (умеренный сдвиг адсорбции в сторону более высоких температур), несмотря на то что стартовый уровень спиральности при 4°C у первого ниже (умеренный сдвиг адсорбции в сторону более высоких температур). Другими словами, наличие внутри- и межмолекулярных химических контактов приводит к умеренному увеличению «жесткости» коллагеноподобных тройных спиралей. Возможно, существование сшивающих химических связей вблизи тройных спиралей в некоторой степени препятствует их «раскручиванию». Таким образом, проведенные ИК-эксперименты показали, что химические сшивки молекул желатина приводят к увеличению «жесткости» коллагеноподобных тройных спиралей в результате инфузионного ограничения молекулярной подвижности белка.

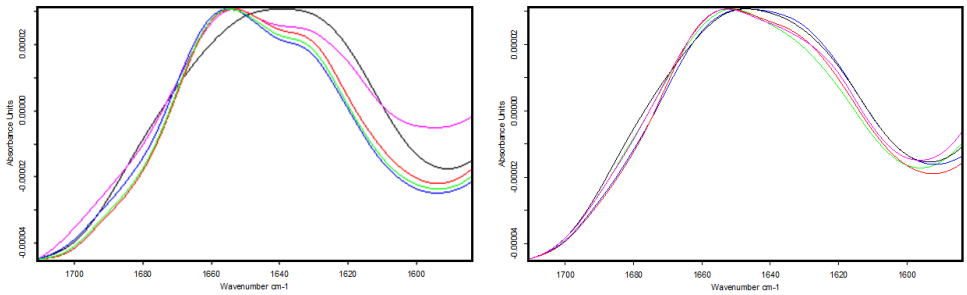


Рис. 5. Спектры поглощения свиного (слева) и рыбного (справа) желатина при 4 С: желатин (синий), желатин свиной /каррагеннан (фиолетовый), желатин свиной /альгинат (зеленый), желатин свиной /хитозан (красный). Спектры желатина при 45 С – черный.

Исследованы образцы свиного (1%, Сигма) и рыбного (1%, МГТУ) в смеси с полисахаридами: альгинатом (z=0.4), хитозаном креветки (z=0.4), к-каррагинаном (z=0.8). Сопоставление спектров чистого свиного желатина при 4 С и 45 С позволяет идентифицировать компо ненты, характеризующие нативное упорядоченное и денатурированное состояния белка. При 4 С на вторых производных выявляются компоненты 1660 см-1 (C2=O2 водородно-связанные с H1-N1 в составе тройной спирали), 1630 см-1 - гидратированные C3=O3 (Pro, Hyp), 1692 см-1 - бета-повороты. Полоса 1660 см-1 уширена за счет компоненты 1652 см-1 - гидратированные C1=O1 (Gly) + C=O иных, чем Pro и Hyp, аминокислот. Компонента 1618 см-1 - гидратированные C2=O2 (Pro) проявляется в виде плеча полосы 1630 см-1. В спектрах рыбного желатина присутствуют те же компоненты, что и в свином. Но при 4 С рыбный желатин менее упорядочен, а нагрев до 45 С вызывает менее выраженные изменения в спектрах. Обращает внимание относительно более высокая интенсивность компоненты 1652 см-1 при 45С в спектре рыбного желатина по сравнению со свиным. Возможно, это указывает на меньшее содержание иминокислот в структуре рыбного желатина, что и является причиной более слабых температурных изменений.

В присутствии полисахаридов в спектрах желатина наблюдаются разнонаправленные изменения. Положение максимума суммарной полосы, таким образом, можно использовать для характеристики сохранности тройной спирали желатина (Рис. 5). Можно заключить, что к-каррагиннан оказывает максимальное дестабилизирующее влияние на структуру желатина, тогда как в присутствии хитозана спиральность остается на прежнем уровне.

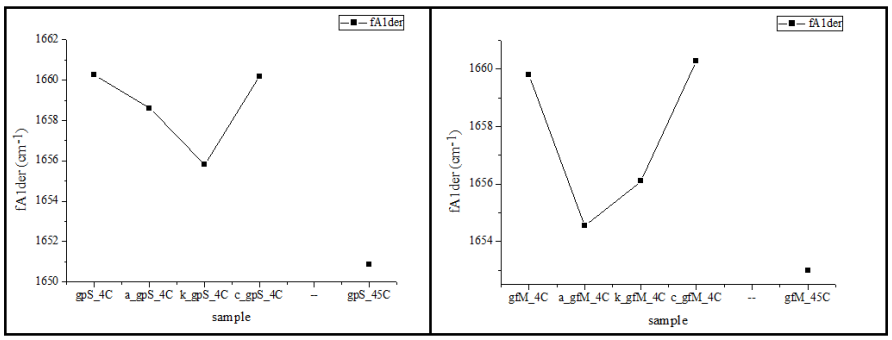


Рис. 5. Положение максимума суммарной полосы 1660+1652 см-1 в спектре второй производной свиного (слева) и Мурманского рыбного (справа) желатинов и их смесей с полисахаридами: gpS – желатин свиной, gfM – желатин рыбный (Мурманск), a_gpS – желатин/альгинат, k_gpS – желатин/каррагиннан, c_gpS – желатин/хитозан. Температура образцов обозначена как 4C и 45C.

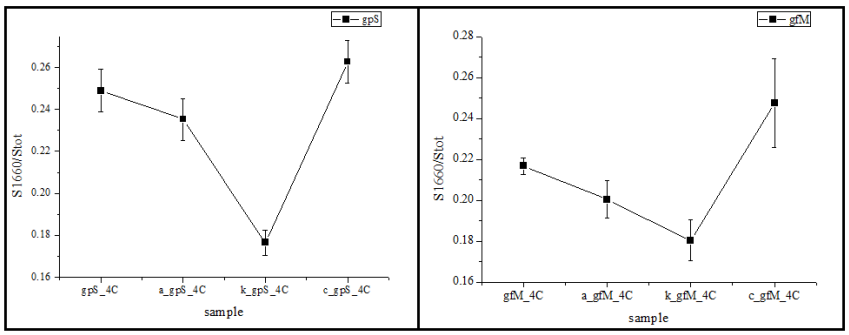


Рис. 6. Доля поглощения спирализованных групп в общем поглощении полосы амид I в спектрах желатинов и их смесей с полисахаридами (слева – свиной, справа - рыбный).

Для количественного определения содержания тройной спирали в образцах осуществляли разложение спектров поглощения на компоненты, приведенные на рис. 6. Установлено, что в области существования нерастворимых комплексов альгината со свиным желатином (z, молярное отношение полисахарида к желатину =0.005 – 0.06) имеют место конформационные перестройки остатков маннуроновой кислоты. Конформация остатков гиалуроновой кислоты, по-видимому, не меняется, хотя наблюдается высокочастотный сдвиг соответствующей полосы поглощения, указывающий на взаимодействие. Выше z=0.06 вплоть до z=0.2 спектр альгината приближается к спектру свободного альгината. В то же время, в смесях с рыбным желатином во всем диапазоне составов спектральных признаков изменения конформации маннуроновой или гиалуроновой кислот не обнаружено, что свидетельствует о его слабом взаимодействии с альгинатом. Спектр смеси рыбного желатина (МГТУ) с альгинатом также показывает отсутствие конформационных изменений в белке. Выше z=0.1 вплоть до z=0.2 нарастает доля молекул к-каррагинана в спиральной конформации. При z=0.8 часть молекул каррагинана непосредственно связана с желатином и находится в неупорядоченной конформации, а другая (большая) часть спирализована. Как и в случае свиного желатина, спектр каррагинана, полученный компенсацией поглощения желатина в смеси, указывает на спиральную конформацию полисахарида при z=0.8. Однако спектр к-каррагинана в смеси почти полностью (в пределах шумов) компенсируется спектром чистого полисахарида. Это может свидетельствовать о более слабом взаимодействии к-каррагинана и рыбного желатина (МГТУ) в комплексах по сравнению со свиным желатином.

Спектр хитозана в смеси с желатином демонстрирует значительные отличия от спектра чистого хитозана в области поглощения С-О связей, что выражается в снижении интенсивности компонент 1090-1070 см-1 относительно поглощения в области 1040-1030 см-1. По нашим данным и данным литературы полоса С-

O(H) крайне чувствительна к степени ионизации NH2-групп, то есть к pH раствора. Изменения наблюдаются при сдвиге pH к более щелочным значениям, что вполне возможно, поскольку pH индивидуальных растворов желатина и хитозана значительно отличаются (pH хитозана ~ 3, pH желатина >5).

2. Изучение супрамолекулярной структуры комплексов биополимеров методами порошковой рентгеновской дифракции (фазовое состояние систем, включая структурные изменения в образцах различного состава, происходящие в процессе образования и разрушения гелей), малоуглового рентгеновского рассеяния (получение информации о дисперсной структуре белок-полисахаридных гидрогелей, о размерах статических неоднородностей в изучаемых системах, возникающих в процессе гелеобразования и его разрушения, оценка фрактальной размерности) и электронной микроскопии (морфология гидрогелей).

В качестве объектов исследования были представлены образцы гелей на основе свиного и рыбного (Мурманск) желатинов, модифицированные добавкой каппа-каррагинана (Z=0.8), альгината натрия (Z=0.4) и хитозана (Z=0.4). Методы исследования – широкоугловая рентгеновская дифракция и малоугловое рентгеновское рассеяние. Широкоугловые эксперименты выполнялись с гелеобразными жидкими образцами в стеклянных капиллярах при температурах 1°C, 26°C и 45°C в университете «Сириус». Широкоугловые эксперименты в реальном масштабе времени (в процессе высыхания гелей на поверхности кремниевой пластинки) также выполнялись на дифрактометре D8 ADVANCE в ИОФХ при комнатной температуре. Малоугловые эксперименты выполнялись с гелеобразными жидкими образцами в стеклянных капиллярах при температурах 1°C, 26°C и 45°C в университете «Сириус».

Все свежеприготовленные гели перед измерением выдерживались в холодильнике не менее 5 часов (+4 - +5 С). Согласно полученным данным порошковой рентгеновской дифракции, в жидком и гелеобразном состоянии все образцы исследованных гелей, включая и исходные, характеризуются практически идентичными порошковыми дифрактограммами, слабо меняющимися при изменении состава и температуры образцов (Рис. 7). На всех дифрактограммах наблюдаются три размытых дифракционных пика с максимумами в области углов дифракции 2θ° 8.4-8.7°, 23.7-24° и 36.4-36.8°, соответствующих межплоскостным расстояниям 10.1-10.5Å, 3.7-3.74Å и 2.43-2.47Å. Температурные переходы не оказывают заметного влияния на их положение, причем такое поведение характерно для всех вариантов гелей с обоими желатинами. Наблюдаемые изменения при повышении температуры образцов с 1°C до 45°C связаны в основном с возрастанием интегральной интенсивности кривых дифракции (на рис. 8 цвет кривых соответствует температурам образцов 1°C (синяя), 26°C (зеленая) и 45°C (красная)) и некоторым уменьшением разрешения пика при 36.4-36.8°.

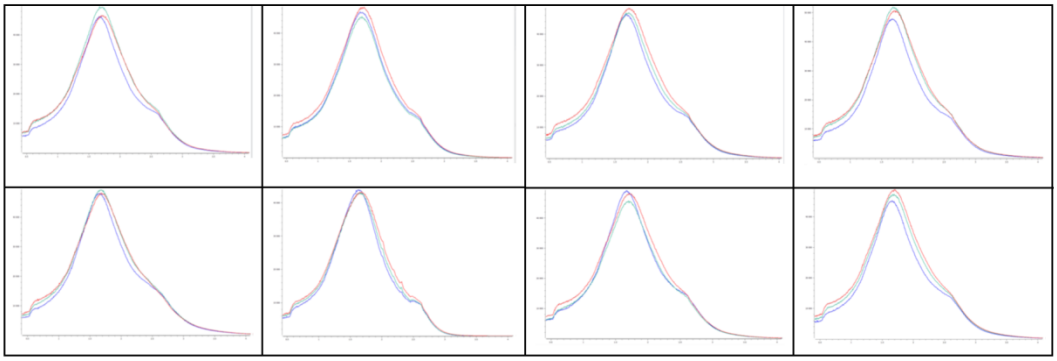


Рис. 7. Дифрактограммы рыбного (верхний ряд) и свиного (нижний ряд) желатинов при 1, 26 и 45°C. Слева направо: 1 – чистый желатин (1%), 2 – с добавкой к-каррагинана, 3 – с добавкой хитозана, 4 – с добавкой альгината.

Исходя из вида экспериментальных дифрактограмм (Рис. 7) можно полагать, что фазовые состояния образцов, находящихся в капиллярах в герметичных условиях, заметно не меняются при добавлении различных полисахаридов, поскольку в образцах их количество недостаточно для образования отдельной фазы из компонентов ни при каких температурах, а характерные межатомные расстояния или какая-либо упорядоченность в этом масштабном диапазоне оказывается идентичной для всех образцов.

Аналогичным образом, и в серии образцов на основе свиного желатина, и образцов рыбного желатина наблюдаемая дифракционная картина характеризуется схожими диффузным пиком аморфного типа с максимумом в области углов дифракции 23.7-24°, и небольшими пиками в области углов дифракции 2θ° 8.4-8.7°, и 36.4-36.8°, которые в основном определяются структурными особенностями используемого желатина.

Объяснением сходства между экспериментами может служить отсутствие физического или ориентационного воздействия на данные гелеобразные образцы в герметичных капиллярах. А в жидком состоянии средние межатомные расстояния в различных образцах практически идентичны и их изменения не столь заметны ни между собой, ни при изменении температуры. По-видимому, упорядоченности цепочек между собой также не наблюдается в заметной степени. Таким образом, изменение температуры от 1°C до 45°C, теоретически представляющее собой переход данных образцов из состояния гелей в состояние золей, не сопровождается заметным изменением их фазовой структуры, которое можно было бы идентифицировать рентгенодифракционным методом.

Иное дело, когда выполняются эксперименты с жидкими образцами гелей в процессе их естественного высыхания на поверхности кремниевых пластинок по мере удаления воды из них. Наблюдаемые изменения при этом позволяют отчетливо наблюдать происходящие в образцах фазовые переходы, хотя эти изменения уже связаны с переходом «гель –ксерогель», а не «гель-золь». Согласно данным порошковой рентгеновской дифракции, присутствие в композитных гидрогелях на основе свиного и рыбного желатинов полисахаридов различного типа благоприятно влияет на фазовую структуру образцов, так что кристаллизации исходных компонентов не наблюдается. Это может косвенно свидетельствовать о гомогенизации системы без разделения исходных компонентов на индивидуальные кристаллические ассоциаты. В гелеобразном состоянии дифрактограммы образцов характеризуются однотипной дифракционной картиной в виде аморфного гало, соответствующего средним межатомным расстояниям в них, и двух сильно уширенных дифракционных пиков, характеризующих тройные спиральные структуры желатина. Заметных системных различий в положении и интенсивности данных пиков в зависимости от природы желатина не отмечается. При этом, изменение температуры жидких образцов от 1°C до 45°C, теоретически представляющее собой переход данных образцов из состояния гелей в состояние золей, не сопровождается заметным изменением их фазовой структуры, которое можно было бы идентифицировать рентгенодифракционным методом.

Для гелей на основе чистых желатинов температурное поведение кривых малоуглового рентгеновского рассеяния заметно различается (рис. 8). Для геля из рыбного желатина характерно рассеяние, форма и интенсивность которого слабо зависят от температуры (хотя синяя кривая для температуры 1С все же несколько выше двух других), т.е. морфологические изменения в системе в данном температурном интервале минимальны. Для геля из свиного желатина малоугловые кривые при 1С и 26С близки и характеризуются подъемом в области самых малых углов (признаком наличия агрегации или больших частиц). При повышении температуры до 45 С агрегация несколько уменьшается, но рассеяние сохраняет свою интенсивность. Учитывая, что интенсивность пропорциональна квадрату разности плотностей «среды» и «частиц», можно полагать, что этот «контраст» сохраняется и при этой температуре. Очевидно, это объясняется тем, что температуре гель-золь перехода гораздо ниже для рыбного желатина. Здесь наблюдается четкая корреляция с данными метода изотермической калориметрии - для геля из свиного желатина малоугловые кривые при 1С и 25С близки, поскольку при 25 С переход гель-золь еще не завершается, а для рыбного синяя кривая все же несколько выше двух других, поскольку для него при 25 и 45 С это тот же золь.

В случае свиного желатина (рис. 9) композит с каррагинаном дает самую высокую интегральную интенсивность (т.е. это самый микрогетерогенный образец), а сильный рост интенсивности вблизи первичного пучка указывает на очень большие размеры неоднородностей, или агрегацию/ассоциацию средних, причем небольшой перегиб кривой при 1С может указывать на скоррелированное расположение неоднородностей. Форма кривых для геля с альгинатом практически не меняется с температурой. Для геля на основе хитозана характерно наличие диффузного пика, что указывает на упорядоченное расположение неоднородностей в геле, которое слабо меняется с температурой (обычно так себя ведет полимерная сетка с узлами). В случае рыбного желатина композит с каррагинаном так же

дает самую высокую в серии интегральную интенсивность (самый микрогетерогенный), особенной агрегации не наблюдается, а при повышении температуры интегральная интенсивность снижается, но неоднородности сохраняются. На втором месте по интенсивности (и наличии неоднородностей) оказывается композит с альгинатом натрия. Для геля с хитозаном, как и в случае свиного желатина так же характерно наличие диффузного пика, что указывает на упорядоченное расположение неоднородностей в геле, и которое не сильно меняется с температурой (сетка с узлами).

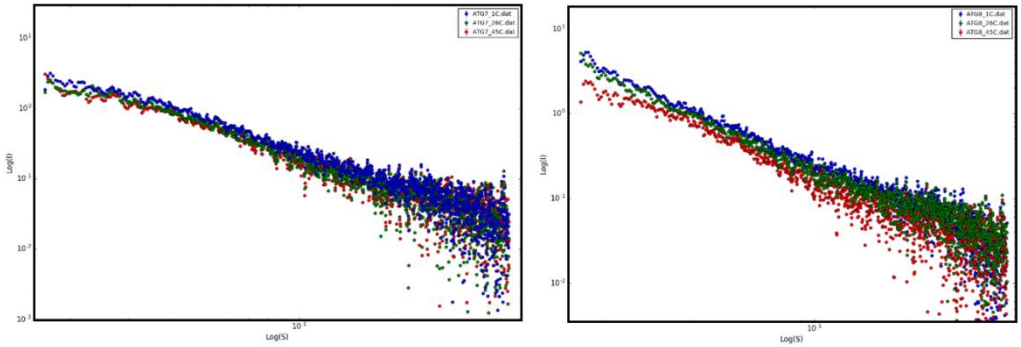


Рис. 8. Малоугловое рентгеновское рассеяние образцов (1%) мурманского рыбного (слева) и свиного (справа) желатинов при температурах 1 (синий), 26 (зеленый) и 45 С (красный).

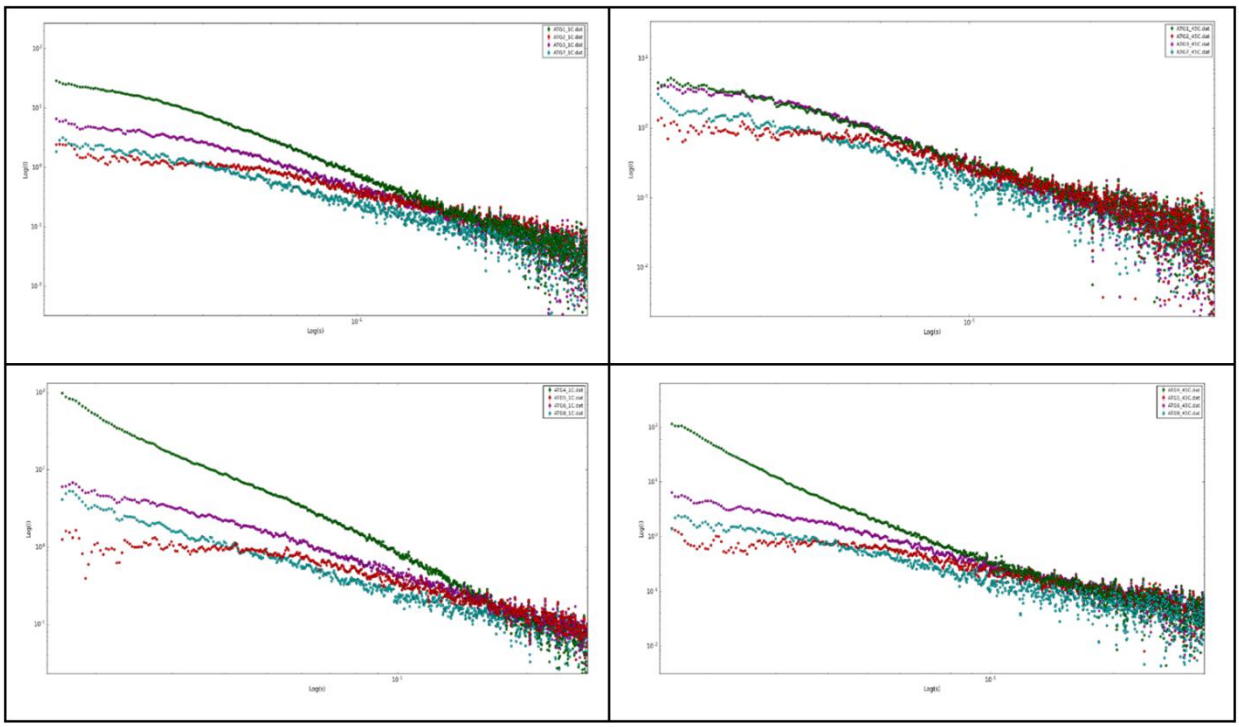


Рис. 9. Кривые рассеяния для рыбного (вверху) и свиного (внизу) желатинов. Слева 1 С, справа 45 С. Чистый желатин – голубой, с добавкой хитозана -красный, альгината – фиолетовый, к-каррагинана – зеленый.

Структурные параметры исследованных систем были проанализированы в соответствии с использованной нами ранее методологией (A.T. Gubaidullin, et. al // Modulation of Molecular Structure and Mechanical Properties of k-Carrageenan-Gelatin Hydrogel with Multi-Walled Carbon Nanotubes // Polymers 2022, 14, 2346. https:// doi.org/10.3390/polym14122346.). Гель на основе чистого рыбного желатина характеризуется присутствием частиц с радиусом инерции R_g равным 37-38Å, слабо зависящим от температуры. Эта величина соответствует сферическим частицам с эффективным радиусом 48-49 Å. Полученное значение фрактальной размерности (d_f=2.14) близко к значению 2, характерному для гладких поверхностей набухших гелей. Размер частиц R_{sp} в данном геле, рассчитанный из радиусов инерции частиц, соответствующий диаметру частиц 96-98 Å, которые довольно хорошо коррелируют с длинами статических корреляций Ξ, определенными из моделирования малоугловых кривых рассеяния в

приближении гелей Лоренца-Гаусса (95-98 Å). При этом динамическая длина **ξ** практически остается неизменной при изменении температуры, а ее значение указывает на достаточно плотную сшивку молекулярных цепей внутри частиц. Для геля на основе свиного желатина наблюдается чуть более заметная зависимость параметров структуры от температуры. Так, если при температурах 1°C и 26°C радиус инерции частиц Rg равен примерно 55Å, то повышение температуры до 45°C приводит к уменьшению этого параметра до 41Å. В предположении сферической формы частиц это равносильно уменьшению эффективного радиуса частиц с 72 до 53Å. Известные из литературы значения радиусов инерции распределены в достаточно широком диапазоне величин, в зависимости от концентрации, включающем и полученные нами величины. Подобное изменение этого параметра может быть объяснено в предположении, что переход от 1°C к 26°C (что близко, но ниже температуры плавления геля свиного желатина) сопровождается не разрушением геля, а наоборот - стабилизацией его состояния. Дальнейшее повышение температуры до 45°C приводит к компактизации частиц геля, но не к их разрушению. Увеличение параметра фрактальной размерности до 1.99 так же говорит в пользу предположения о «выравнивании» их поверхности в результате компактизации.

Добавление в системы каппа-каррагинана приводит к заметному увеличению радиуса инерции частиц для обоих желатинов (с 37-38Å до 51-42Å для рыбного и с 55Å до 93-114Å свиного желатина, причем по мере повышения температуры до 45°C размер частиц продолжает возрастать, а статические и динамические параметры цепей в рамках модели геля Лоренца-Гаусса остаются практически неизменными (Ξ ≈ 100 Å и ξ ≈ 21.5 Å). Рассчитанное значение фрактальной размерности геля ближе по значению к системам с развернутыми цепями. В случае композитов рыбного желатина с хитозаном и альгинатом наблюдается заметное уменьшение размеров частиц по сравнению с гелем на основе каппа-каррагинана, причем эти значения стабилизируются во всем диапазоне исследованных температур. Так, радиус инерции Rg частиц в геле с альгинатом (36-37 Å) оказывается практически равным Rg частиц исходного геля желатина (37-38 Å), а в случае геля с хитозаном частицы становятся даже заметно меньше, их радиус инерции при вариации температур лежит в диапазоне значений 20 -22 Å. В обоих случаях Rg частиц (и, соответственно, их радиус в сферическом приближении) слабо изменяются с температурой, а рассчитанные расстояния Dmax указывают на небольшое отклонение их формы от сферической.

В целом, можно отметить, что для композитов с хитозаном и альгинатом на основе обоих желатинов, по-видимому, происходят одинаковые процессы сегрегации отдельных фаз, содержащих либо альгинат, либо хитозан. Дальнейшие взаимодействия происходят, вероятно, на поверхности частиц этих фаз. Видимо, все температурные изменения в данных композитах в первую очередь определяются морфологическими изменениями желатиновой фазы. Наиболее стабильной с точки зрения температурного поведения обладают композиты на основе каппа-каррагинана, причем при использовании желатинов обоих типов. Хотя и в этих случаях (особенно для композита на основе свиного желатина) нельзя исключать образования отдельной фазы молекулами каррагинана, что может обуславливаться целым рядом варьируемых параметров систем. По своим предыдущим исследованиям малоугловым и порошковым методами мы знаем, что каррагинан может кристаллизоваться и образовывать гелевые частицы с соизмеримыми с желатиновыми частицами размерами. Учитывая это можно полагать, что каррагинан определенным образом гомогенизируется в среде желатина и образовывает смешанные молекулярные клубки (электронная плотность которых несколько выше плотности водно-желатиновой среды). В случаях хитозана и альгината, по-видимому, специфика этих полисахаридов приводит к образованию этими компонентами молекулярных клубков индивидуальной фазы, а молекулы желатина фактически их обволакивают и связывают между собой. Учитывая, что эта "оболочка" почти эквивалентна по электронной плотности окружающей водно-желатиновой среде, мы фактически наблюдаем размеры индивидуальных фаз (по крайней мере из радиусов инерции).

3. Межмолекулярное взаимодействие и пространственная структура супрамолекулярных комплексов исходных биополимеров с применением методов молекулярного докинга. Структурно-энергетические характеристики молекулярных контактов полисахаридов с белком. Структура наиболее вероятных комплексов полисахарид-белок по данным метода молекулярной динамики.

Метод молекулярного докинга был применен для предварительного анализа комплексов полисахаридов с молекулами желатина. В желатине три цепочки образуют тройную спираль, каждая цепь состоит из триплетных субъединиц, расположенных по схеме Gly-X-Y, с пролином в качестве основной аминокислоты в положениях X и Y. На C- и N-концах каждой нити в природном тропоколлагене находятся телопептиды. Основной характеристикой желатинов из разных источников является аминокислотный состав желатинов. Желатины, полученные из рыб и, особенно, из рыб холодных морей характеризуются значительно более низким содержанием пролинов и гидрооксипролинов, что определяет их температурную нестабильность. Второй особенностью желатинов является сложное распределение заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков по цепочке. Например, несмотря на то, что в желатине трески из 1017 аминокислотных остатков, 242 остатка несут положительный или отрицательный заряд, общий заряд равен -8. В тоже время, белок имеет небольшие по протяженности положительно и отрицательно заряженные зоны, что определяет сложный механизм их взаимодействия с другими молекулами.

Для молекулярного докинга была выбрана аминокислотная последовательность желатина трески. Каждая цепочка из тройной спирали состояла из 27 аминокислотных остатков. Три модельные системы были использованы. Модель 1 (желатин-1) не содержала заряженных аминокислотных остатков. В модели 2 (желатин-2) каждая цепочка содержала один положительно и один отрицательно заряженный остаток, общий заряд был равен нулю. В модели 3 (желатин-3), каждая цепочка содержала 2 остатка Lys, 1 Arg, 1 Asp, общий заряд был равен 6. Результаты расчетов представлены в таблицах 2 и 3. В таблицах 1 и 2 представлена общая энергия взаимодействия лиганда с белком в наиболее энергетически выгодной позиции, а также электростатический вклад в энергию взаимодействия. Общая энергия взаимодействия включает в себя электростатическое взаимодействие, Ван дер Ваальсовое взаимодействие, энергию образования водородных связей и десольвационную энергию. В таблице 2 показана энергия взаимодействия полисахаридов с модельными белками в зависимости от длины полисахарида (Альгинат 4 означает, что полисахарид содержит 4 субъединицы, Альгинат 8 – содержит 8 субъединиц, Альгинат 18 – 18 субъединиц), его заряда и заряда желатинового фрагмента. Анализ показывает, что увеличение длины полисахарида и соответственный рост его заряда приводит только к слабому росту энергии взаимодействия. Это связано, прежде всего, с достаточно равномерным распределением противоположно заряженных аминокислотных остатков в первичной последовательности желатина. При полном отсутствии заряженных остатков во фрагменте желатина (модель 1), взаимодействие полисахаридов происходит, в основном, за счет образования водородных связей и Ван дер Ваальсового взаимодействия. Наличие заряженных остатков даже при том, что общий заряд фрагмента равен нулю (модель 2) приводит к усилению электростатического взаимодействия. Несмотря на то, что альгинат имеет общий отрицательный заряд, а хитозан – положительный заряд, оба полисахарида образуют устойчивые комплексы с положительно заряженным желатином -3. Увеличение общего заряда белка (модель 3), так же как удлинение полисахарида до 18 остатков оказывают слабое влияние на энергию взаимодействия полисахаридов с желатинами (Таблица 1). В таблице 2 показаны энергии взаимодействия модельных каррагинанов с двумя типами желатиновых фрагментов. Все каррагинаны образуют устойчивые комплексы с желатином. Разница в количестве и распределении сульфатных групп оказывает слабое влияние на энергию взаимодействия с каррагинанов с желатином.

Таблица 1. Энергия взаимодействия альгината и хитозана с тремя типами желатиновых фрагментов.

Ligand	Charge	Protein model	Charge	Total Energy (kcal/mol)	Electrostatics (kcal/mol)
альгинат 4	-4	1	0	-6.09	-0.23
хитозан 4	4	1	0	-6.29	-0.16
альгинат 8	-8	1	0	-7.88	+0.08
хитозан 8	8	1	0	-7.15	-0.49
альгинат 4	-4	2	0	-9.81	-2.85
хитозан 4	4	2	0	-11.4	-5.66
альгинат 8	-8	2	0	-10.3	-6.96

хитозан 8	8	2	0	-7.6	-3.71
альгинат 4	-4	3	6	-8.39	-3.59
хитозан 4	4	3	6	-6.58	-2.26
альгинат 8	-8	3	6	-10.04	-4.89
хитозан 8	8	3	6	-7.6	-0.28
альгинат 18	-18	2	0	-10.38	-4.08
альгинат 18	-18	3	6	-11.57	-3.51
хитозан 18	9	2	0	-4.15	0.45
хитозан 18	9	3	6	-6.17	-2.64

Таблица 2. Энергия взаимодействия модельных каррагинанов с двумя типами желатиновых фрагментов

Ligand	Charge of ligand	Protein model	Charge of protein	Total Energy (kcal/mol)	Electrostatics (kcal/mol)
i-car	-6	2	0	-9.25	-5.45
l-car	-9	2	0	-12.84	-5.54
k-car	-3	2	0	-10.32	-3.55
i-car	-6	3	6	-11.77	-8.77
l-car	-9	3	6	-13.45	-8.96
k-car	-3	3	6	-10.59	-5.62

Для ответа на вопрос, как образованный комплекс полисахарид-желатин будет влиять на присоединение новых молекул желатина или полисахарида к комплексу, были использованы комплексы альгината-18 и альгината-8 с желатином 2 и 3. В зависимости от заряда образованного комплекса возможно присоединение к нему других молекул. Комплекс альгинат-18-желатин-2 имеет сильный отрицательный заряд и может присоединять к себе дополнительные молекулы желатина и не взаимодействует с молекулами альгината. Докинг одной молекулы желатина к другой показал, что, несмотря на одинаковый положительный заряд и неблагоприятную энергию электростатического взаимодействия, молекулы желатина -3 образуют устойчивый комплекс, димер, в котором две молекулы расположены параллельно друг другу. К полученному димеру может присоединяться молекула альгината (таблица 5) и образовывать с димером более устойчивый комплекс, чем с мономером желатин-3. Энергия взаимодействия альгината-8 с одной молекулой желатина-3 равна -10 kcal/mol, а с димером желатина -3 она равна -14.3 kcal/mol. Кроме того, молекула альгината-8 может связывать две молекулы желатина находящихся на достаточно большом расстоянии друг от друга (12 Å), энергия взаимодействия альгината-8 с двумя молекулами желатина-3 в этом случае равна -16 kcal/mol.

Метод молекулярной динамики (МД) был применен для исследования взаимодействия полисахаридов с модельными молекулами желатина. Молекулярная динамика была выполнена с помощью программы GROMACS с использованием силового поля CHARMM36m. Исходная структура комплексов (полисахарид/желатин) была получена предварительно методом молекулярного докинга. Для каждого комплекса были построены МД траектории длиной 50-100 нс. Моделирование проводилось при двух pH, 4 и 7. Комплекс считался устойчивым, если энергия белок-лигандного взаимодействия была отрицательна в течение 50-100 нс. Анализ взаимодействия полисахаридов с желатином базировался на расчете энергии взаимодействия белка с лигандами и с растворителем, на определении количества водородных связей, образованных между белком и лигандами, белком и водой, а также между лигандом и водой.

Исследовано взаимодействие желатина с тремя типами каррагинана, различающихся количеством сульфатированных групп. Молекула желатина представлена трехцепочечной спиралью, каждая цепочка

содержит 27 аминокислотных остатков, из них, три положительно заряженных остатка (2 остатка Lys, 1 Arg) и один отрицательно заряженный остаток Asp, общий заряд белка равен 6 (рис. 10).

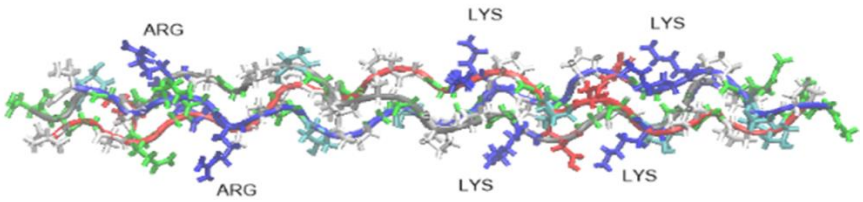


Рис. 10. Пространственная структура модели желатина. Спираль образована тремя цепочками. Положительно заряженные остатки (Arg, Lys) показаны синим цветом, отрицательно заряженные (Asp) – красным, гидрофобные остатки белым и полярные остатки – зеленым цветом.

Каррагинаны сформированы чередованием 1,3-β- и 1,4-α-D-галактозы и отличаются количеством сульфатных групп. Две субъединицы (один дисахарид) к-каррагинана содержат одну отрицательно заряженную SO_3 группу, две субъединицы i- каррагинана – 2 SO_3 группы, и две субъединицы λ – каррагинана содержат 3 SO_3 группы. Тетра- каррагинаны, Kcarr4, Icarr4, Lcarr4 содержат 4 субъединицы к-каррагинана, i – каррагинана и λ - каррагинана, соответственно. Дека- каррагинаны, Kcarr10, Icarr10, Lcarr10 состоят из десять субъединиц. На рис. 11 для примера показаны структуры стабильных комплексов каррагинанов с желатином при pH 4. Лиганды ориентировались таким образом, чтобы установить ионную связь между заряженными SO_3 группами и остатками Arg, а также несколько водородных связей с полярными аминокислотными остатками.

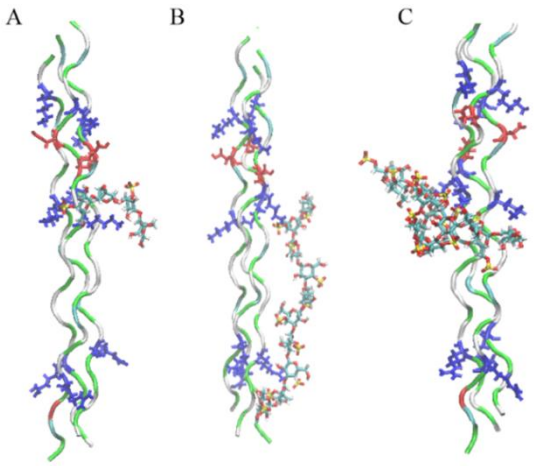


Рис. 11. Комплекс Kcarr4 (A), Icarr10 (B) и Lcarr10 (C) с молекулой желатина. Для упрощения рисунка, для белка показаны только заряженные аминокислотные остатки. Положительно заряженные остатки (Arg, Lys) показаны синим цветом, отрицательно заряженные (Asp) –красным. Каррагинаны показаны в виде палочек и покрашены согласно типу атомов, углероды –голубым, кислороды –красным.

В табл. 3 показаны энергии взаимодействия белка с лигандами при разных pH. Показано, что при кислых pH все каррагинаны взаимодействуют с желатином и образуют комплексы стабильные в течение 50 – 100 нс. Каррагинаны с небольшим зарядом (Kcarr4, Kcarr10, Icarr4) образуют с желатином достаточно свободные комплексы, в которых лиганд может скользить по поверхности белка. Это вызвано тем, что на поверхности желатина заряженные аминокислотные остатки расположены небольшими группами, и на поверхности белка находится несколько зон одновременно, с которыми могут связываться каррагинаны. Энергия белок – лигандного взаимодействия при этом небольшая, порядка 70-100 kcal/mol. Увеличение заряда каррагинанов (Icarr10, Lcarr4, Lcarr10) приводит к образованию более стабильных комплексов, с энергией взаимодействия 230-460 kcal/mol. λ – каррагинан (Lcarr10) с зарядом -15 демонстрирует наиболее устойчивые комплексы с желатином (табл. 3). Образование комплексов приводит к ослаблению

энергий взаимодействия желатина с водой и лигандов с водой, при этом количество водородных связей между желатином и водой, а также между лигандами и водой уменьшается. При переходе к нейтральным pH, положительный заряда белка уменьшается, что приводит к ослаблению энергии белок-лигандного взаимодействия. Тетра-каррагинаны с небольшим зарядом не образуют комплексов с желатином. Дека-к-каррагинан образует с желатином неустойчивый комплекс со временем жизни -25 нс и с энергией взаимодействия 25 kcal/mol. Дека- каррагинаны с большим зарядом (Icarr10, Lcarr10) образуют достаточно устойчивые комплексы с желатином с гораздо меньшей энергией взаимодействия (150-300 kcal/mol), чем при pH 4. Энергии взаимодействия каррагинанов с желатином коррелируют с зарядом лиганда. При увеличении отрицательного заряда каррагинана наблюдается резкий рост энергии белок-лигандного взаимодействия.

Таблица 3. Энергия взаимодействия полисахаридов с желатином (ккал/моль)

Полисахарид	pH 4	pH 7
Тетра-к-каррагинан	-70	0
Тетра- i-каррагинан	-110	0
Тетра- λ-каррагинан	-103	0
Дека-к-каррагинан	-239	-25
Дека- i-каррагинан	-243	-152
Дека- λ-каррагинан	-467	-275
Тетра-альгинат	-227	0
Окта-альгинат	-210	-173

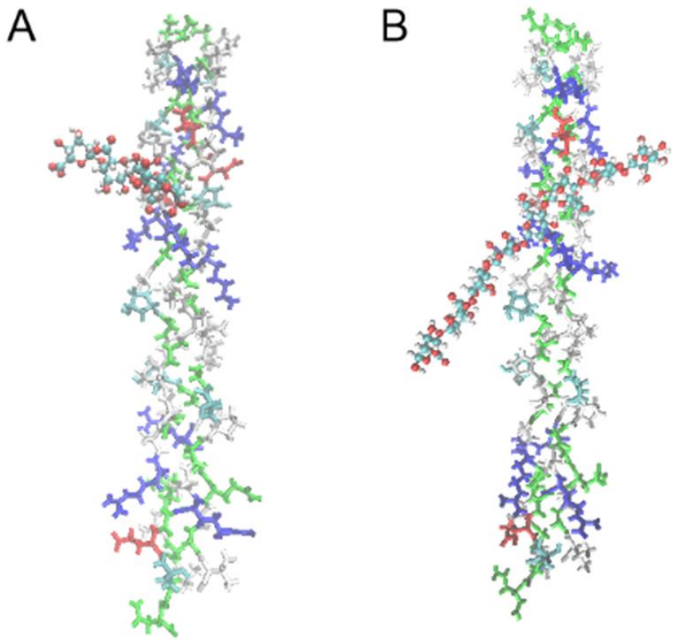


Рис. 12. Комплексы альгинатов с желатином при pH 4. Для желатина положительно заряженные остатки показаны синим цветом, отрицательно заряженные - красным, гидрофобные остатки - белым и полярные остатки – зеленым цветом. Альгинаты покрашены согласно типу атомов, углероды –голубым, кислороды – красным.

Для альгината натрия использовались 2 модели, тетра-альгинат содержал 4 субъединицы, две субъединицы 1,4-β-D-маннуроновой кислоты (M) и две субъединицы 1,4-α-L-гулуроновой кислоты (G) в комбинации MGMG, общий заряд -4. Вторая модель, окта-альгинат, состояла из 8 субъединиц маннуроновой кислоты (заряд -8).

В табл. 3 показана энергия взаимодействия альгинатов с желатином при различных pH. Желатин-имеет при нейтральных pH общий положительный заряд +6. Однако, только октамер альгината образует устойчивый компплекс с желатином при pH 7. Тетрамер альгината не образует устойчивого комплекса с желатином, несмотря на то что электростатическое взаимодействие благоприятствует образованию такого комплекса. При понижении pH до 4 взаимодействие между отрицательно заряженными лигандами и белком усиливается, и исследованные альгинаты образуют устойчивые комплексы с желатином с примерно одинаковой энергией взаимодействия (табл. 3, рис. 12).

Для исследования взаимодействия хитозана с желатином были использованы две модели хитозана. Одна содержала две молекулы 1,4-β-N-ацетил-D-глюкозамина (A) и две молекулы 1,4-β-D-глюкозамина (D) в комбинации DADA (заряд +2). Вторая молекула содержала 6 молекул 1,4-β-D-глюкозамина (заряд +6). Исследованный желатин имеет положительный заряд, что препятствует образованию комплексов с положительно заряженным хитозаном. Расчеты показывают, что при pH 4 молекулы хитозана не образую устойчивых комплексов с желатином. Возможно, что полностью ацетилированный хитозан будет образовывать устойчивый комплекс с фрагментом желатина, в котором нет заряженных остатков, но в наших расчетах такие комплексы не были получены. При pH 7, желатин содержит отрицательно заряженные зоны, но нам не удалось получить стабильные комплексы хитозан-желатин. Это можно объяснить распределением отрицательно и положительно заряженных остатков белка и недостаточным стерическим соответствием поверхности лиганда и белка (отсутствием на поверхности желатина карманов, в которые, обычно, встраиваются лиганды). Сравнительный анализ энергий взаимодействия цепочек желатина в трехцепочечной спирали в свободном желатине и в комплексе с полисахаридами, показал, что образование комплексов полисахарид- желатин не приводит к изменению энергии взаимодействия цепочек желатина между собой.

4. Определение энтальпии взаимодействия между полисахаридами, полисахаридами и белками в водных растворах. Определение температуры и энтальпии гель-золь переходов в системах желатин-полисахариды методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

Все эксперименты проведены с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии. С изотермической эксперименты проводились, но оказались абсолютно неинформационными из-за огромной вязкости растворов при концентрациях растворенного вещества, необходимых для измерений. Изучение зависимости перехода гель–золь желатинов млекопитающих и рыб выполнено методом капиллярной дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Исследованы выполнены для желатинов, перечисленных в п.1.

- MGP (МГП) — коммерческий желатин из свиной кожи;
- FGC (ФГС) —коммерческий рыбный желатин из кожи холодноводных рыб;
- FGE (ФГ) —лабораторный желатин из кожи трески;
- FGED (ФГД) — лабораторный желатин из кожи трески диализованный от низкомолекулярных примесей.

На рис. 13 представлены ДСК-термограммы нагревания желатина после инкубации в течение 5 ч при различных постоянных температурах (Tf) для образования геля. Предварительные эксперименты показали, что этого времени достаточно для достижения максимально возможного гелеобразования, поскольку энтальпия плавления не меняется при дальнейшем увеличении времени инкубации. Значительное увеличение температуры плавления (пикового максимума) всех желатинов с увеличением температуры наблюдается гелеобразование (рис. 13а). Энтальпия гель-золь перехода в случае МГП имеет максимум около 10С при температуре Tf. На термограмме после инкубации желатина при 25С наблюдается двугорбая кривая, которая представляет собой сумму двух пиков. Пик, наблюдаемый при более высоких температурах, соответствует части желатина, загустевшей при 25С, а низкотемпературный пик соответствует гелю, образовавшемуся из оставшегося желатина в процессе его последующее охлаждение до 1С для записи

термограммы. Эксперименты показали, что этого времени достаточно для достижения максимально возможного гелеобразования, поскольку энтальпия плавления не меняется при дальнейшем увеличении времени инкубации. Значительное повышение температуры плавления (пикового максимума) всех желатинов наблюдается с повышением температуры гелеобразования (рис. 13 a). Энтальпия перехода гель-золь в случае МГП имеет максимум при температуре Tf около 10 C. При повышенных температурах выход геля, вероятно, становится ниже, несмотря на его более высокую термическую стабильность. На термограмме после инкубации желатина при 25C, что представляет собой сумму двух пиков. Пик, наблюдаемый при более высоких температурах, соответствует части желатина, загустевшей при 25C, а низкотемпературный пик низкотемпературный пик соответствует гелю, образовавшемуся из оставшегося желатина в процессе его последующего охлаждения до 1C.

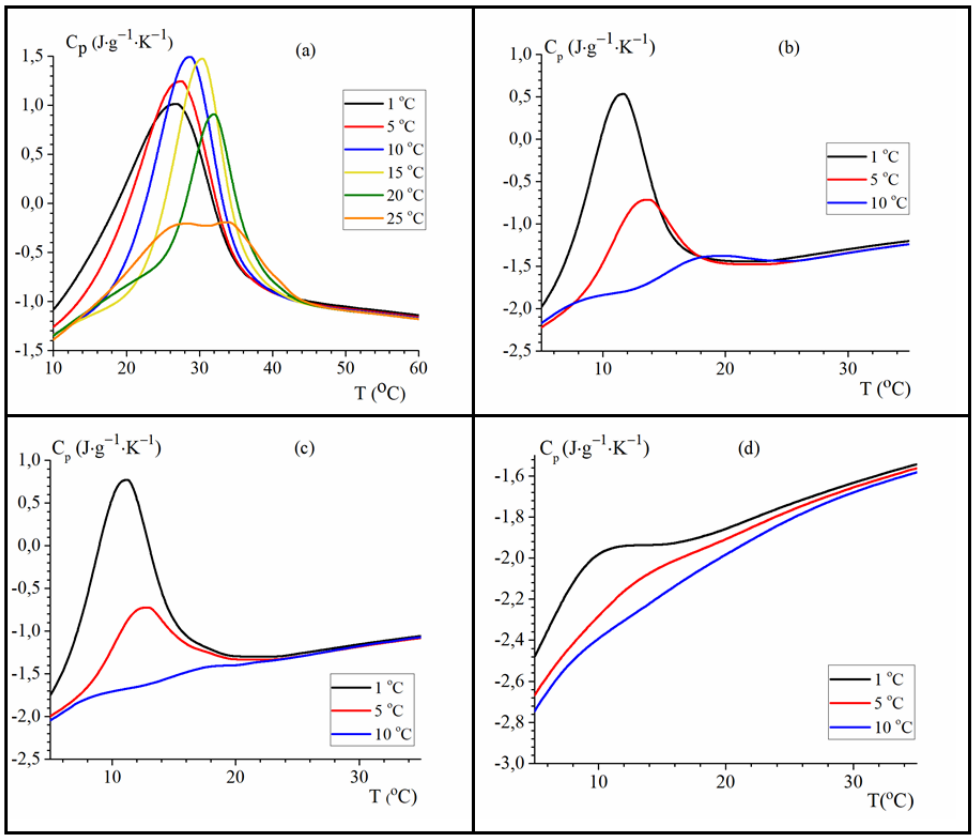


Рис. 13. ДСК термограммы нагревания желатиновых гелей (0,5%), образовавшихся при различных температурах Tf: а) МГП, б) ФГС, в) ФГД, г) ФГ.

Рыбный желатин (рис. 13 b–d) имеет гораздо более низкую температуру плавления геля, чем свиной желатин. Энтальпия перехода гель–золь сильно уменьшается с увеличением Tf, и при Tf = 10 C пик плавления практически подавляется. Для двух образцов рыбного желатина ФГ и ФГД существенных различий в параметрах перехода гель–золь не наблюдается. Коммерческий рыбий желатин ФГС (рис. 13 d) имеет немного меньшую температуру перехода гель-золь, чем ФГ и ФГД, но гораздо более низкая энтальпию перехода.

Известно, что при низких температурах гелеобразования происходит быстрая ренатурация тройных спиралей и объединение желатиновых цепей. В результате образуется слабая гелевая сетка с низкой температурой плавления. Если гелеобразование происходит при более высоких температурах, ренатурация спиралей происходит медленнее, но образуются жесткие (шероховатые) сети с высокой термостабильностью, приближающиеся к коллагену. Наши результаты полностью подтверждают эти выводы.

Исследованы фазовые переходы в смешанных системах к-каррагинана и желатина. Были получены ДСК-термограммы нагревания исследуемых образцов к-каррагинана с рыбным и свиным желатином при различной концентрации (рис. 14). В случае рыбного желатина на ДСК-термограммах (рис. 14а) мы наблюдаем 2 пика: первый пик от компоненты желатина в комплексе и второй пик – от компоненты полисахарида. В случае свиного желатина мы наблюдаем только один пик (Рисунок 14 б). Это связано с тем, что гель-золь переход рыбного желатина проходит при более низких температурах, чем у свиного желатина. Для чистого свиного желатина температура максимума пика гель-золь перехода 27,0 С, что близко к температуре максимума пика гель-золь перехода к-каррагинана в 25 мМ Трис-буфере, pH 7,4 – 28,39 С, поэтому компоненты белка и полисахарида слились на ДСК-термограмме.

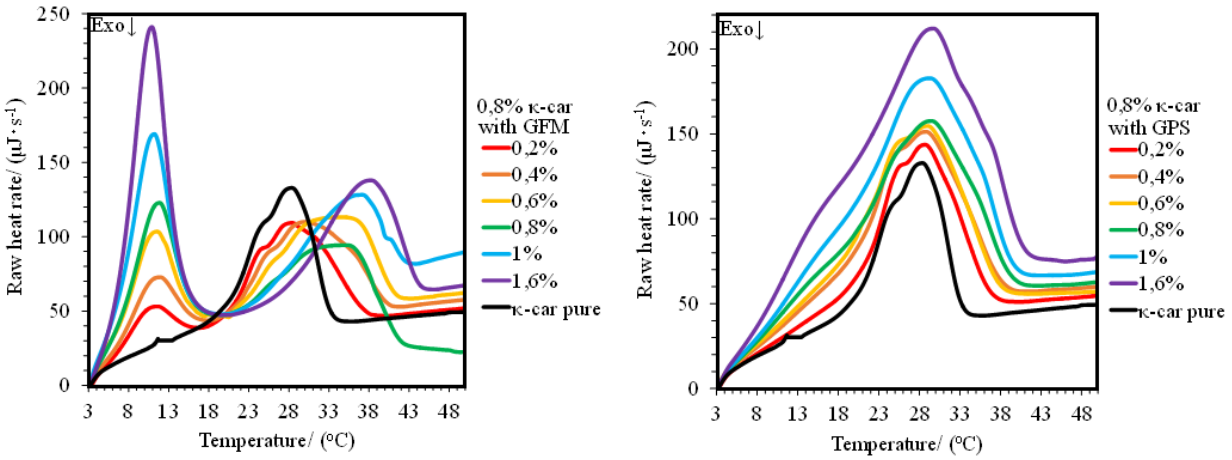


Рис. 14. ДСК-термограммы нагревания образцов 0,8% к-каррагинана с неочищенным рыбным желатином МГТУ (слева) и свиным желатином Sigma (справа) при различной концентрации белка.

Изменение энтальпии гель-золь перехода также отличается для каждого вида желатина (Рисунок 15). В смесях полисахарида со свиным желатином энтальпия увеличивается с 19,16 до 42,56 Дж/г в исследуемом диапазоне концентраций белка, когда с рыбным желатином изменение незначительное – до 23,65 Дж/г.

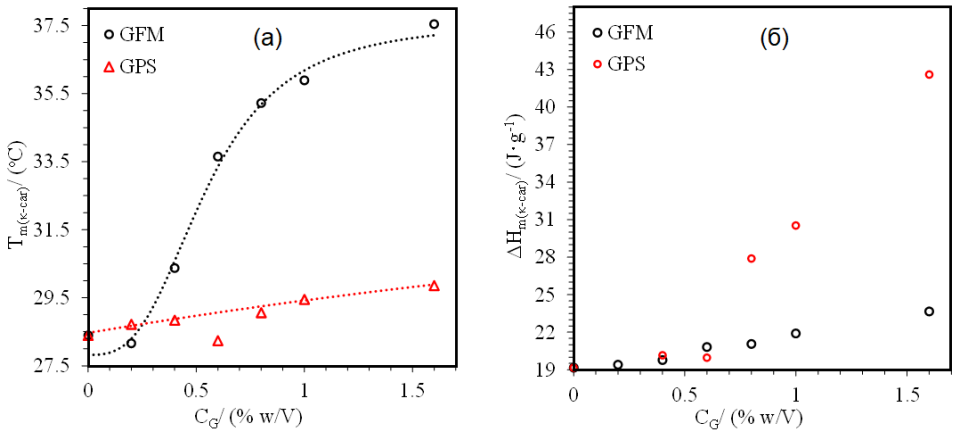


Рис. 15. Зависимость температуры максимума пика (а) и энтальпии (б) перехода гель-золь смеси 0,8% к-каррагинана в присутствии рыбного желатина (GFM) и свиного желатина (GPS) с различной концентрацией в Трис буфере (25 мМ, pH 7,4).

Определены температуры максимума пика и энтальпия гелеобразования, а также рассчитан гистерезис температур (табл. 4).

Таблица 4. Температура максимумов пика (T_g) и энтальпия (ΔH_g) гелеобразования, значение гистерезиса температур (ΔT) образцов 0,8% к-каррагинана с неочищенным рыбным желатином МГТУ (GFM) и свиным желатином Sigma (GPS) при различной концентрации белка

	T_g (°C)	ΔH_g (Дж·г$^{-1}$)	ΔT (°C)
0,8 % к-каррагинан	20,96	21,06	7,43
0,8 % к-каррагинан + рыбный желатин МГТУ			
C_{GFM} (% *w/V*)			
0,2	22,29	21,17	5,87
0,4	21,96	21,35	8,41
0,6	22,74	21,4	10,91
0,8	23,31	21,82	11,91
1	23,94	21,91	11,95
1,6	24,64	22,05	12,9
C_{GPS} (% *w/V*)			
0,2	21,3	21,17	7,42
0,4	20,2	20,05	8,64
0,6	21,04	23,58	7,2
0,8	20,74	25,72	8,32
1			
1,6	22,57	33,47	7,29

Значения ΔT вычисляются по формуле: $\Delta T = T_m - T_g$

Из полученных данных мы видим, что температура гелеобразования к-каррагинана возрастает с увеличение концентрации рыбного желатина в смеси с 20,96 С до 24,64 С, а с увеличением концентрации свиного желатина только до 22,57 С в диапазоне исследуемых концентраций белка (Рисунок 16а). В отличие от гель-золя перехода в золь-гель переходе мы наблюдаем, что температура полного превращения образца в гель с увеличением концентрации рыбного желатина растет, а с увеличением концентрации свиного желатина уменьшается. Значение энтальпии гелеобразования к-каррагинана больше возрастает с увеличением концентрации свиного желатина, чем с увеличением концентрации рыбного желатина (рис. 16 б).

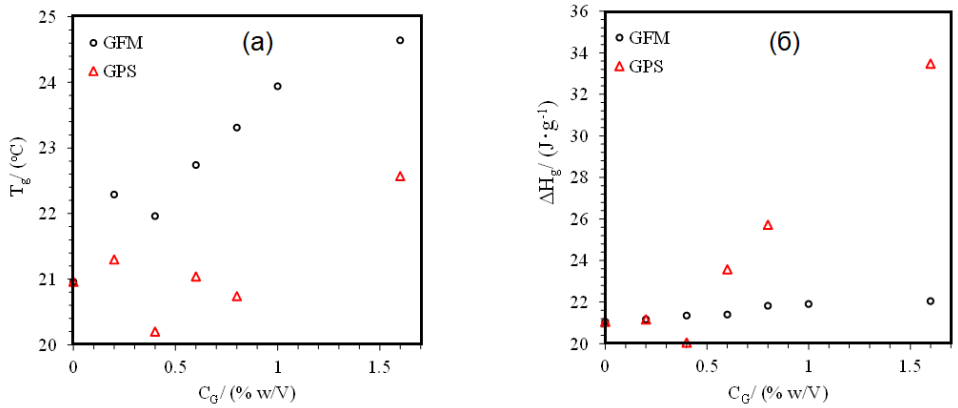


Рис. 16. Зависимость температуры максимума пика (а) и энтальпии (б) перехода золь-гель смеси 0,8% к-каррагинана в присутствии рыбного желатина (GFM) и свиного желатина (GPS) с различной концентрацией в Трис буфере (25 мМ, pH 7,4).

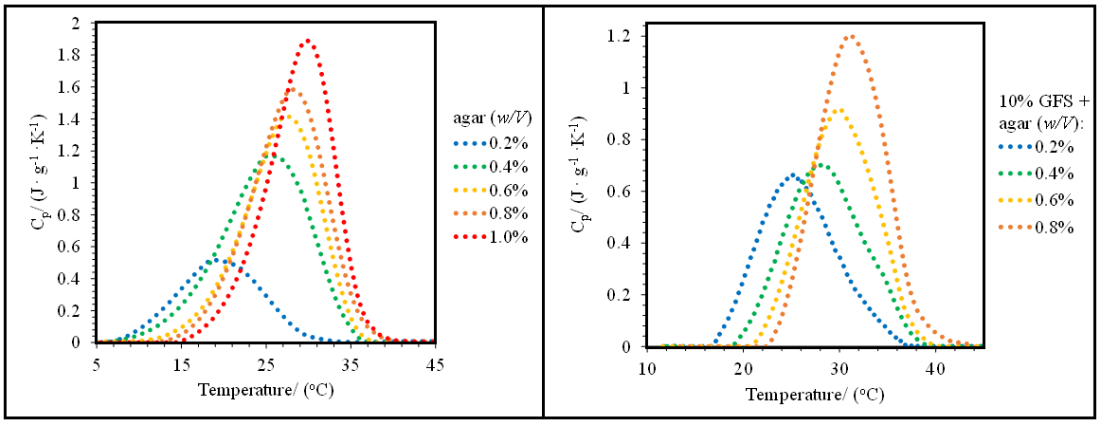


Рис. 17. ДСК-термограммы охлаждения образцов агара при различной концентрации полисахарида в отсутствии (слева) и в присутствии 10% рыбного желатина (справа) после конвертации данных нормализацией по массе агара и массе желатина и вычета базовой линии.

Были получены ДСК-термограммы нагревания и охлаждения исследуемых образцов чистого агара и смеси агара с рыбным желатином (рис. 17). Из полученных ДСК-термограмм можно заметить, что золь-гель переход агара имеет концентрационную зависимость: с увеличением концентрации полисахарида увеличивается температура максимума пика и энтальпия золь-гель перехода. Для гель-золь перехода такая зависимость не наблюдается. Добавление желатина к смеси увеличивает температуру максимума пика гелеобразования агара и практически не влияет на температуру максимума пика плавления этой компоненты. Агар индуцирует желирование желатина, однако гель получается тот же, что и у чистого желатина, при минимальном взаимодействии с агаром в структуре геля.

Таким образом, показано, что процесс термически индуцированного гель-золь перехода в смесях желатинов с полисахаридами носит двухстадийный характер. На первом этапе при более низкой температуре происходит разрушение тройных спиралей желатина. На температуру и энтальпию этого процесса практически не оказывает влияния присутствие каррагинанов. При более высокой температуре разрушаются физически сшитые структуры, образованные молекулами полисахаридов. При этом для каррагинанов наблюдается повышение термостабильности с ростом отношения концентрации желатина к полисахариду, что говорит об образовании комплекса между ними. В случае агара влияния желатина на температуру второго перехода не наблюдается. На кривых охлаждения расплавов гелей наблюдается обратимость процесса и эффект гистерезиса для более высокотемпературного перехода. Восстановление тройных спиралей желатина происходит медленно и не проявляется в виде пика в случае чистого белка и в его смесях с каррагинанами. Однако в присутствии агара для рыбного желатина этот процесс сильно ускоряется, пик проявляется вблизи 0 °C, при этом сильно повышается доля белка, сформировавшего тройные спирали.

5. Эксперименты ЯМР и диэлектрической спектроскопии по релаксации и диффузии воды и органической жидкости в гидрогелях и органогелях на основе белков и полисахаридов из гидробионтов Арктических морей с целью получения характеристик воды в ограниченном пространстве белок-полисахаридных гидрогелей и оценки пространственной организации биополимерной сетки.

Для объединения поставленных задач были исследована динамическая структура микроэмульсий вода-масло, с желатином, иммобилизованным в водной фазе обращенных мицелл и химически сшитый желатин. Одним из относительно новых подходов к использованию, переработке и обработке желатина являются олеогели или органогели. Олеогелеобразование – достаточно новый подход, используемый для создания мягких и твердых продуктов на основе природных масел. Олеогели - системы с непрерывной фазой, образованной гидрофобной жидкой средой. В настоящей работе мы сосредоточили внимание на влиянии молекул желатина на свойства и динамическую стабильность микроэмульсионной среды. Нами изучен результат инкапсуляции белка в водное ядро обратных мицелл ПАВ. В качестве наполнителей водной фазы микроэмульсии использовали желатин рыб и млекопитающих. Метод

электропроводности был использован для детекции устойчивости обратных мицелл к температурному воздействию как контейнеров для пищевых белков.

Таблица 5. Коэффициенты диффузии и гидродинамические радиусы свиного и рыбного желатина

Желатин	Коэффициент диффузии, $м^2с^{-1}$		Гидродинамический радиус, нь	
	ЯМР	ДРС	ЯМР	ДРС
Свиной	5.0 ± 0.6	4.0 ± 1.8	5.6 ± 0.7	6.7 ± 2.9
Рыбный	4.9 ± 0.6	5.7 ± 0.8	6.4 ± 0.8	5.5 ± 0.8

Значение молярного отношения воды к ПАВ было выбрано равным W = 35, чтобы обеспечить достаточно места для одной молекулы желатина внутри водного ядра обращенной мицеллы ПАВ. W=35 соответствует радиусу водного ядра мицеллы 5,3 нм. Он близко к гидродинамическому радиусу молекул использованного желатина, полученному нами из экспериментов ЯМР и динамического рассеяния света (ДРС) ~5-6 нм как для свиного, так и для рыбного желатина (табл. 5), что означает, что в среднем в каждой мицелле содержится по одной молекуле желатина.

При тепловом движении мицеллы сталкиваются друг с другом, обмениваются ионами ПАВ и водным содержимым, содержащим противоионы. С повышением температуры увеличивается вероятность ионизации головных групп ПАВ, увеличивается подвижность микрокапель, что увеличивает вероятность их контактов и обмена содержимым мицелл по механизму коалесценции. При этом образуются скопления микрокапель, объединяющие все большее количество отдельных единиц. При определенной температуре образуются кластеры микрокапель, что создает путь для переноса заряда при деформации поверхности мицелл и образовании короткоживущих водных каналов между соседними мицеллами (рис. 18, слева), вызывая резкое увеличение электропроводности микроэмульсии (рис. 18 а,в). Образование проводящих цепей в изоляционном материале масляной фазы называется электрической перколяцией.

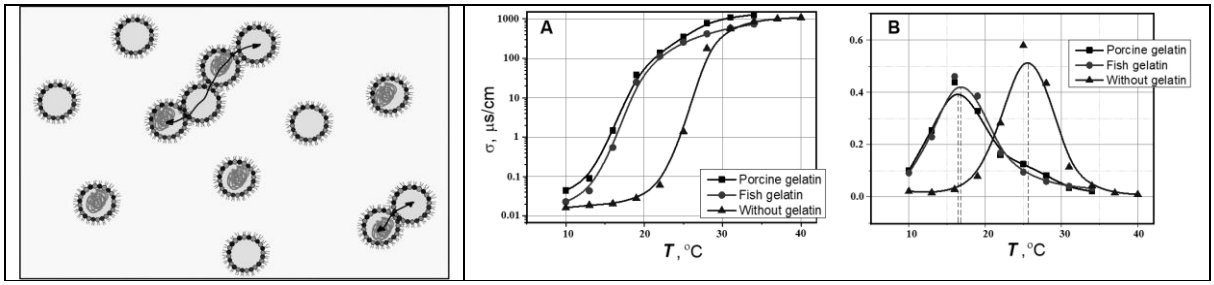


Рис. 18. Схема столкновений мицелл и межмицеллярного обмена водной фазы (слева). А – Температурная зависимость электропроводности микроэмульсий с полярной фазой, содержащих чистую воду (треугольники), свиной (квадратики) и рыбный (кружки) желатин. Б - 1-я производная электропроводности – положения максимумов соответствуют порогу перколяции 26 °С для «пустых» обратных мицелл (треугольники), 16,3 °С с содержанием свиного желатина (квадратики) и 16,8 °С с содержанием рыбного желатина (кружки).

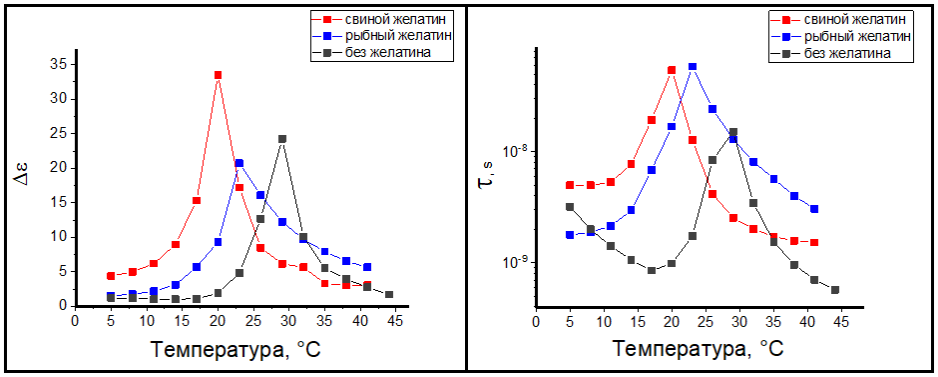


Рис. 19. Амплитуда (слева) и время релаксации связанной воды в микроэмульсии АОт-вода-декан (W-35).

Процесс образования кластеров из мицелл носит динамический характер; они образуются и разрушаются в объеме дисперсии под действием теплового движения, но выше определенной температуры, называемой порогом перколяции, в объеме микроэмульсии всегда присутствует хотя бы один «бесконечный» кластер, обеспечивающий высокую электропроводность системы. Белковые молекулы, солюбилизированные в водном ядре обратных мицелл, взаимодействуют с оболочкой ПАВ, изменяя ее «жесткость» и изменяя положение перколяции. Таким образом, изучение электропроводности под действием инкапсулированного белка может дать информацию о динамике и стабильности микроэмульсии В/М, что может быть полезно в различных пищевых и фармацевтических технологиях. Наши результаты показывают, что белковые молекулы, захваченные водным ядром обратных мицелл, не разрушают структуру микроэмульсии, хотя свойства системы претерпевают определенные изменения, в частности, она существенно теряет термическую стабильность, ускоряя обменные процессы между обратными мицеллами при более низких температурах.

Похожие температурные эффекты наблюдались нами и при изучении процесса диэлектрической релаксации, связанного с поляризацией внутренней поверхности обращенных мицелл (рис. 19). Из приведенных данных видно, что желатин, иммобилизованный в водном ядре мицелл, взаимодействует с поверхностью раздела и оказывает существенное влияние на процесс диэлектрической релаксации.

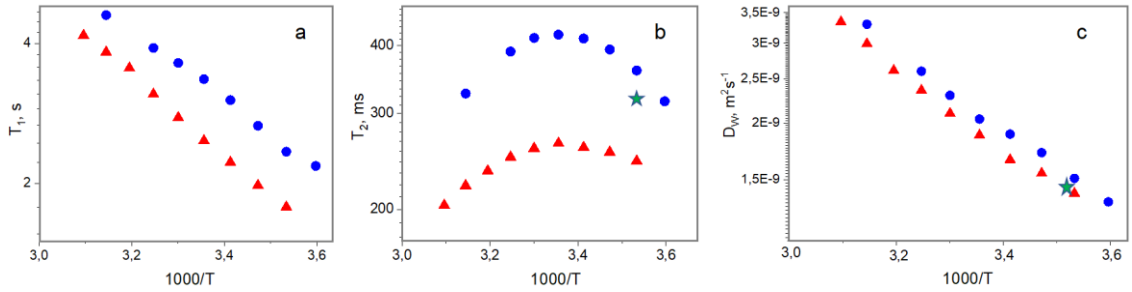


Рис. 20. Температурные зависимости времен релаксации T1 (а), T2 (в) и коэффициента самодиффузии D (с), характеризующие подвижность воды в исходных (синий), сшитых (красный) гидрогелях.

В отчетный период нами также проведено изучение подвижности воды в ограниченном пространстве желатинового гидрогеля для оценки пространственной организации биополимерной сетки. Мы изучили молекулярные свойства воды и желатина в «физически» и «химически» сшитых желатиновых гидрогелях методами ЯМР-, ИК- и широкополосной диэлектрической спектроскопии - чувствительными к динамической структуре воды, т.е. использовали воду как структурный маркер сетчатой структуры полимера. Все эксперименты продемонстрировали определенное «усиление» сетчатой структуры гидрогеля и увеличение количества гидратной воды в химически сшитом геле. Эксперименты показали, что химическое сшивание молекул желатина инициирует увеличение «жесткости» коллагеноподобных тройных спиралей в результате дополнительных ограничений молекулярной подвижности белка. Уменьшение подвижности белковых цепей вносит сложные изменения в структурные свойства воды и предохраняя их от возмущающего действия повышения температуры вплоть до 30-40°C. На рис. 20 приведены результаты исследования динамики воды в гелях желатина методом ЯМР-спектроскопии. Мы

наблюдаем замедление подвижности воды в химически сшитой системе, которое возникает из-за зацепления гидрогелевой сетки и небольших нарушений структуры белка.

6. Электрокинетические свойства и дзета потенциал различных желатинов, полисахаридов и комплексов полисахарид-белок.

Эксперименты по определению дзета-потенциала проводили на анализаторе частиц Фотокор при температуре 30С. Исследовали растворы двух видов желатина (свиной и рыбный) с различными концентрациями в чистом виде и в присутствии различных полисахаридов (рис. 21 22).

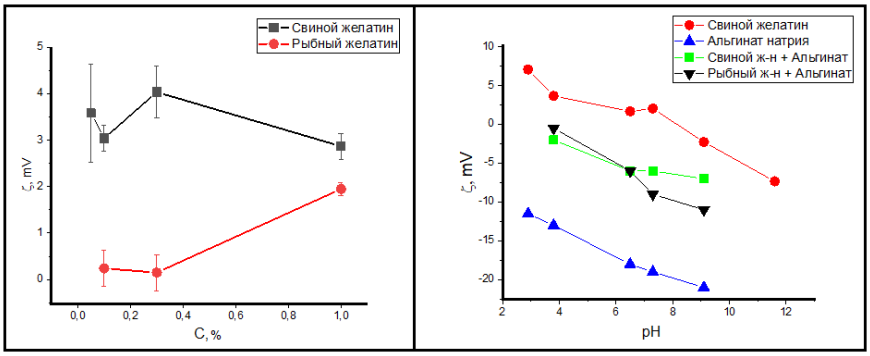


Рис. 21. Дзета-потенциал желатинов при различной концентрацией (слева). Справа - влияние альгината натрия на дзета-потенциал pH супрамолекулярных образований в гелях желатинов.

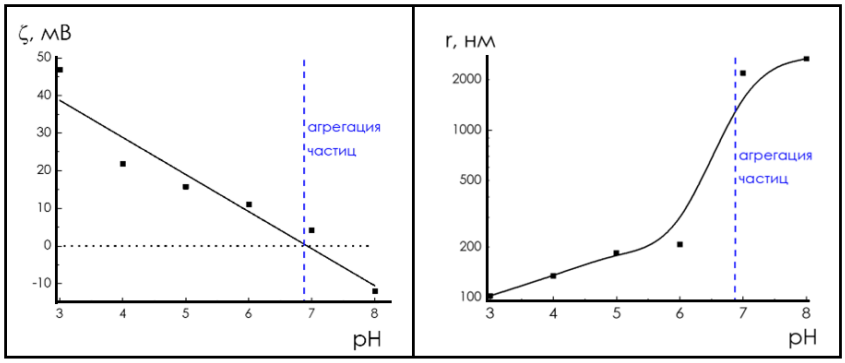


Рис. 22. Зависимость дзета-потенциала (слева) и среднего гидродинамического радиуса (справа) частиц хитозана (0.5 % в 1.5 % уксусной кислоте) от величины pH

7. Вторичная структура цистеиновых протеаз (фицина, бромелина и папаина), иммобилизованных на коммерческих и химически-модифицированных (ВГУ) хитозанах, полученных из гидробионтов Арктических морей.

Хитозан занимает второе место среди наиболее распространенных полисахаридов, вырабатываемых естественным путем живыми организмами. Благодаря своему обилию и уникальным свойствам, таким как поликатионная природа, способность к образованию прочных эластичных пористых пленок и антибактериального потенциала хитозан широко используется в пищевой промышленности и биомедицине. Однако его низкая растворимость как в воде, так и в органических растворителях затрудняет его применение. Мы разработали экологически чистый метод получения водорастворимых сополимеров хитозана и поли(N-винилпирролидона) с высокой эффективностью прививки и низким выходом побочных продуктов.

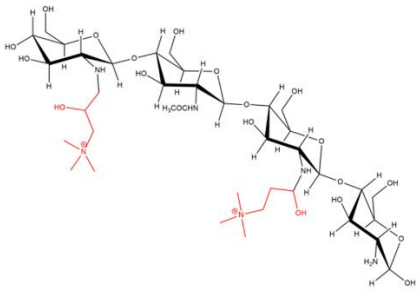


Рис. 23. N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозан (ГПХ).

С целью увеличить растворимость хитозана для дальнейшего использования в инженерии полисахарид-желатиновых гидрогелей, была проведена модификация структуры полисахарида (рис. 23). Соединение N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозан (ГПХ) получали по следующей методике: навеску хитозана массой 3.00 г суспендировали в 30 мл дистиллированной воды в течение 30 минут при 85 ºС. Затем по каплям вводили глицидилтриметиламмоний хлорид (ГТМАХ) из расчета на 1 моль хитозана 3 моль ГТМАХ и выдерживали при 85 ºС в течение 10 часов. Продукт из реакционной смеси выделяли осаждением в ацетон, после чего трижды промывали этиловым спиртом и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы. Выход продуктов был равен 62-74 %.

Нами исследована вторичная структура цистеиновых протеаз (фицина, бромелина и папаина), иммобилизованных на химически-модифицированных (ВГУ) хитозанах. На рис. 24 приведены ИК спектры иммобилизованных протеаз. К сожалению в образцах с папаином и бромелином белка оказалось недостаточно для дальнейшего анализа, который был выполнен для фицина. Числовые результаты представлены в табл. 6.

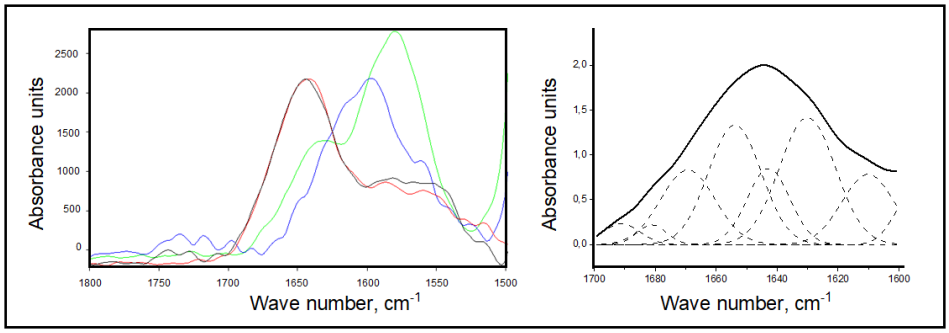


Рис. 24. Спектры поглощения образцов ферментов, иммобилизованных на ГПХ (область 1800-1500 см-1): черный - фицин, синий – папаин, зеленый – бромелин. Справа - результаты разложения полосы поглощения Амид-I фицина, иммобилизованного на ГПХ.

Таблица 6. Содержание элементов вторичной структуры в фицине.

	Фицин (раствор)	Фицин ГПХ	Фицин на немодифицированном хитозане
Альфа-спираль	0.29	0.23	0.28
Бета-складки	0.18	0.26	0.16
Неупорядоченная	0.53	0.51	0.56

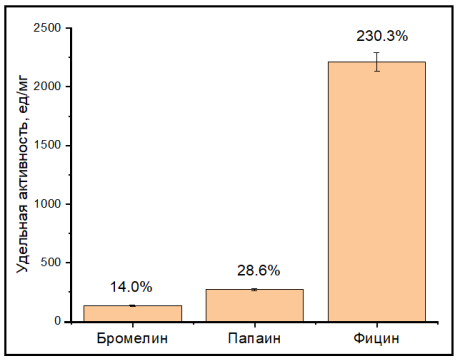


Рис. 25. Удельная каталитическая активность (ед./мг белка) комплексов бромелина, папаина и фицина с N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозана. Выражена в процентах по отношению к активности ферментов в растворе, принятой за 100%.

Структура фицина, иммобилизованного на ГПХ, отличается от структуры белка в растворе и адсорбированного на немодифицированном хитозане пониженным содержанием спиральных структур и увеличенным содержанием β-структур. Несмотря на довольно значительные изменения во вторичной структуре фицина при иммобилизации, фермент показывает каталитическую активность, превышающую этот показатель в водном растворе (рис. 25).

9 Гелеобразование рыбного изолята

Отработана методика приготовления гелей из рыбного изолята от Мурманского арктического университета. Приготовленные образцы рыбного изолята (10%) после предварительной подготовки (замачивание водой и длительное набухание) далее термостатировались при 95°C в течение 1 часа в термостате BioSan. После этого Пробирки с образцами охлаждались до комнатной температуры в течение 5 минут и были помещены в холодильник при 4 °C для охлаждения на 5 часов. В геле рыбного изолята, доведенного до pH 8, присутствуют остатки нерастворимых хлопьев. Гели, доведенные до pH 9 и 10, получились более прозрачными в отсутствии механических включений. Стабильность гелей при комнатной температуре показана на рис. 26.

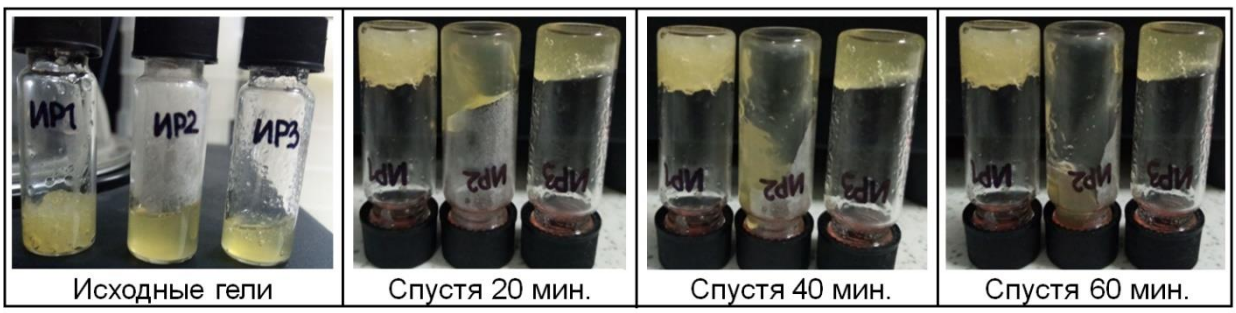


Рис. 26. ИР1 – рыбный изолят (pH = 8); ИР2 – рыбный изолят (pH = 9); ИР3 – рыбный изолят (pH = 10). Разрушение гелей при комнатной температуре.

Таким образом, рыбный изолят почти полностью растворяется при значениях pH больше 9, при этом гель рыбного изолята, доведенного до pH 9, при комнатной температуре плавится быстрее других исследуемых гелей.

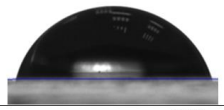
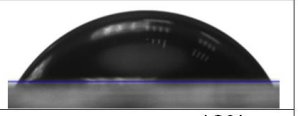
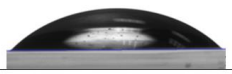
8 Смачивающая способность и адгезионные свойства пленок желатинов и желатин-полисахаридных композиций (внеплановая работа)

На основании измерения краевых углов смачивания (углов натекания) методом сидящей капли на приборе Easy Drop Kruss DSA 20E с системой автодозирования в термостатируемой ячейке при 25±1 °C определяли смачивающую способность образцов. В качестве подложек использовали стекло с нанесенными и подсушенными гидрогелями исследуемых биополимеров. Для определения среднего значения углов

смачивания с помощью автоматической системы дозирования на подложку наносились три одинаковые капли тестовой жидкости (вода, глицерин, ДМСО, ДМФ, ЭГ, йодистый метилен, анилин). Точность определения угла смачивания составляла ±0,1° при T = 25±1 °C.

В Табл. 7 приведен вид капель на поверхности пленок свиного и рыбного желатинов, которые имеют вид, характерный для подобного типа кривых. На основании данных по краевому углу смачивания водой поверхности пленок (рис. 27-А) и кинетических кривых растекания воды на поверхности пленки определены работа адгезии воды к поверхности пленки (рис. 27-Б, табл. 8), а также свободная энергия поверхностей и ее полярная и дисперсионная составляющие (данные не приведены), что позволило сравнить свойства двух исследованных желатинов и влияние каппа-каррагинана, хитозана и альгината.
Свободная поверхностная энергия, ее полярная и дисперсионная составляющие, были определены методом геометрической аппроксимации на основе концепции аддитивности по данным измерения краевых углов смачивания поверхности тестовыми жидкостями и анализа графических зависимостей в координатах Фоукса.

Таблица 7. Вид капель воды на поверхности пленок свиного и рыбного желатина, сформированных из гидрогелей разной концентрации.

Жидкость	поверхность: 1% свиной·желатин	поверхность: 5% свиной желатин	поверхность: 10% свиной желатин
Вода			
	поверхность: 1%· рыбный·желатин¤	поверхность: 5% рыбный желатин	поверхность: 10% рыбный желатин
			

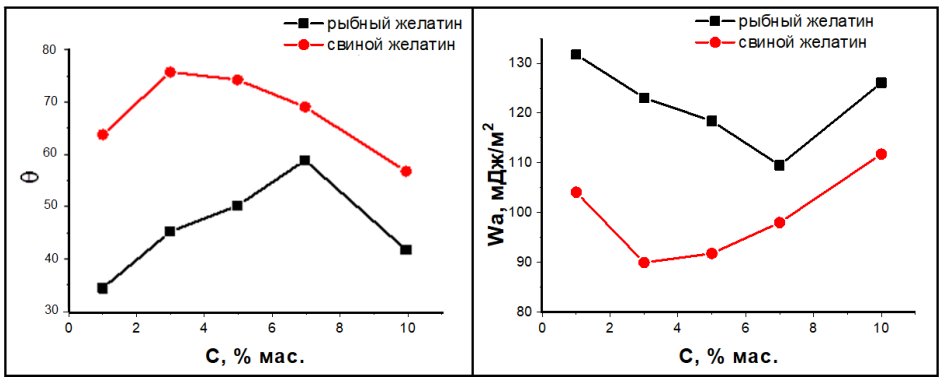


Рис. 27. Краевой угол смачивания водой поверхности пленки (слева) и работа адгезии воды к поверхности пленки (справа) на основе рыбного и свиного желатина в зависимости от концентрации.

Таблица 8. Работа адгезии тестовых жидкостей к поверхности пленок на основе10% очищенного и неочищенного рыбного желатина

Wa, мДж/м^2								
			Неочищенный желатин			Очищенный желатин		
Тестовая жидкость	10% рыбный жела-тин	10% рыбный желатин + альги-нат	10% рыбный желатин + хитозан	10% рыбный желатин – карраги-нан	10% рыбный желатин	10% рыбный желатин + альгинат	10% рыбный желатин + хитозан	10% рыбный желатин - карраги нан
вода	132.82	115.55	103.96	110.35	134.02	126.77	129.56	121.81

глицерин	99.04	102.96	94.44	110.12	110.58	107.48	106.32	105.99
ДМСО	80.62	85.65	83.73	84.80	83.97	85.51	84.17	83.40
ДМФ	74.22	74.32	71.56	74.10	74.45	74.52	74.37	74.30
ЭГ	83.04	92.66	89.57	91.34	89.04	90.30	91.79	94.46
Йодис-тый метилен	93.40	94.97	93.21	91.48	94.53	94.97	93.50	95.70
Анилин	84.10	84.77	82.16	84.12	85.47	85.01	84.60	85.63
Альфа бром наф	88.56	88.80	87.97	88.18		88.34	88.55	88.44

Установлено, что значения работы адгезии воды к поверхности пленки на основе свиного желатина меньше, чем для рыбного желатина. Модификация поверхности стекла 10% рыбным желатином способствует росту лиофильности поверхности (< 90°). Вероятно, поэтому наблюдаются более низкие значения углов смачивания при использовании подложки стекло/ 10% рыбный желатин по сравнению с остальными. Введение в рыбный желатин добавок способствует увеличению значений свободной поверхностной энергии (СПЭ), т.е энергии межмолекулярного взаимодействия частиц на поверхности раздела фаз с частицами каждой из контактирующих фаз (воды). Данная закономерность коррелирует с результатами смачивания модифицированных подложек водой. Для модифицированных подложек свиного желатина наблюдается обратная зависимость: добавки способствуют увеличению смачивающей способности тестовой жидкостью (водой) и снижению СПЭ. Минимально значение СПЭ наблюдается для подложки из рыбного желатина, а максимальное – для свиного желатина. Системы свиного и рыбного желатина с хитозаном, обладают жидкокристаллической ламеллярной мезофазой и характеризуются близкими значениями энергетических характеристик, что может быть связано с упаковкой молекул и самоорганизацей слоистой структуры на стеклянной поверхности.

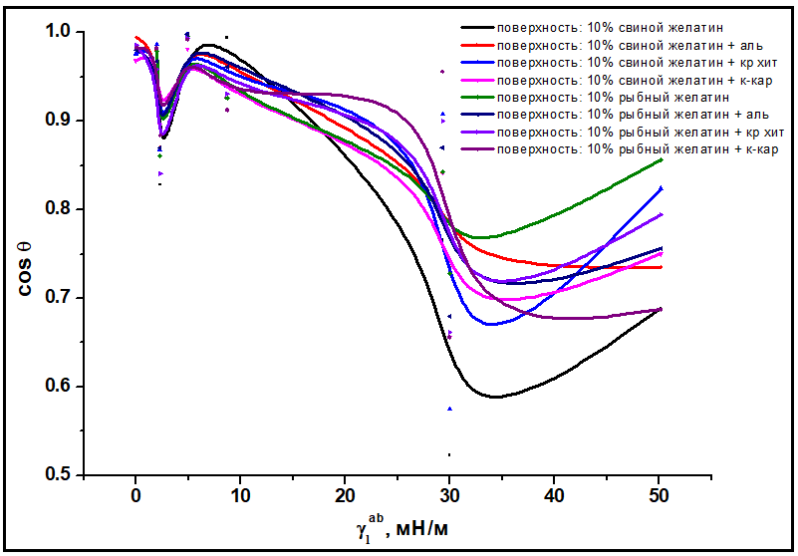


Рис. 28. Влияние полисахаридов на полярную составляющую свободной поверхностной энергии свиного и рыбного желатинов.

Свободная поверхностная энергия (представляет собой одну из главных характеристик при исследовании поверхностных явлений в полимерах и зачастую является определяющей при изучении свойств полимерных композиций, адгезионных контактов и адсорбции благодаря своей универсальности и информативности (рис. 28). Она является интегральной функцией отклика существования полярных групп в поверхностном слое полимера, условий формирования поверхности, процессов окисления, степени кристалличности, присутствия модифицирующих добавок, играет важную роль в адгезионном взаимодействии контактирующих фаз. За отчетный период начаты масштабные эксперименты по определению различных коллоидных свойств желатинов и их комбинаций с природными полисахаридами,

которые мы планируем продолжить и реализовать на следующих этапах под задачи пищевой промышленности.

Заключение

Решение задач Мировой продовольственной программы является поиск и оптимизация свойств потенциальных пищевых ресурсов из альтернативных природных источников. Проект направлен на оптимизацию свойств белок-полисахаридных гидрогелей как основы для новых пищевых технологий функциональных продуктов питания из недоиспользованных морских биоресурсов. Основным, и по сути, неограниченным источником белковой компоненты являются недоиспользованные отходы (кожа, чешуя, кости и субпродукты), возникающие при добыче и переработке морской рыбы. Другая, но не менее важная причина связана с религиозными ограничениями в использовании продуктов питания животного происхождения (халяльные и кошерные продукты). Основная проблема ограниченного использования рыбного желатина проистекает из его низких вязкоупругих свойств, прочности и низкой термостабильности при плавлении. Нами показано, что разработанная Мурманскими партнерами методика получения рыбного желатина позволяет получить гидрогели близкие по свойствам к желатину из млекопитающих и значительно превосходящие коммерческий желатин из холодноводной рыбы. Другое направление работ по проекту связано с оптимизацией характеристик полученного рыбного желатина за счет физических модификаций, таких как введение полисахаридов и использования сшивающих агентов.

Специфика научно-исследовательской работы по настоящему проекту включает объединение усилий 3-х партнеров. Работа основного исполнителя по проекту, коллектива из КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, сконцентрирована на изучении структуры и физико-химических свойств биополимеров, выделенных из гидробионтов Арктических морей партнером из Мурманского арктического университета (в заявке поименован как МГТУ). Полученная структурная информация основного исполнителя проекта используется мурманским партнером как фундаментальная основа для модификации технологий выделения биополимеров из гидробионтов Арктических морей разработки пищевых технологий. Второй партнер, коллектив из ВГУ, г. Воронеж, основные усилия направляет на инженерию новых биотехнологических конструкций для пищевой промышленности.

За отчетный период основным исполнителем по проекту проведена комплексная работа по изучению сравнительных характеристик желатинов из разных источников и выбору полисахаридов-лидеров по удобству использования в качестве средства модификации свойств желатиновых гелей. Нами показано, что лабораторные образцы рыбного желатина, полученные в Мурманске, по своим структурным, термодинамическим, вязкоупругим характеристикам и прочности существенно превосходит коммерческие варианты рыбного желатина. Нами проведен скрининг свойств различных желатинов и их комплексов с полисахаридами (каррагинаны, агар, альгинат натрия, хитозаны, фукоидан) из Арктических морей. Установлено, что:

- Уникальные свойства рыбного желатина, полученного в Мурманском арктическом университете обусловлены сходством вторичной структуры этого варианта рыбного желатина со свиным аналогом по содержанию тройных коллагеноподобных спиралей;
- Сравнительный анализ (Молекулярная динамика) энергии взаимодействия цепочек желатина в трехцепочечной спирали в свободном желатине и в комплексе с полисахаридами, показал, что образование комплексов полисахарид- желатин не приводит к изменению энергии взаимодействия цепочек желатина между собой, т.е. образование полиэлектролитных комплексов не разрушает супрамолекулярную структуру и механизмы гелеобразования самого желатина;
- Выполнен скрининг структуры и свойств различных желатинов и их комплексов с полисахаридами (каррагинаны, агар, альгинат натрия, хитозаны, фукоидан). На основании данных комплекса методов определено, что максимальное влияние на структуру и свойства желатинов из набора исследованных полисахаридов оказывают каррагинаны:
    - По данным ИК-спектроскопии к-каррагиннан оказывает максимальное дестабилизирующее влияние на структуру желатина, тогда как в присутствии, например, хитозана спиральность остается на прежнем уровне.
    - Температура полного перехода золя в гель для смесей к-каррагинана с рыбным желатином возрастает с увеличением концентрации белка, а со свиным желатином – снижается.

    - Сравнительный анализ взаимодействия модельного желатина по данным Молекулярного докинга с полисахаридами показал, что каррагинаны образуют более устойчивые комплексы, чем альгинат и хитозан.
    - По данным порошковой рентгеновской дифракции и МУРР зафиксировано, что наибольшей термодинамической стабильностью стабильной композиты на основе каппа-каррагинана, причем при использовании желатинов обоих типов.
    - Температура гель-золь и золь-гель перехода компоненты к-каррагинана значительно возрастает с увеличением концентрации рыбного желатина, нежели свиного желатина.
- Следующим после к-каррагинана полисахаридом в ряду изученных по «удобству» и эффективности влияния на свойства желатина является агар. Агар индуцирует желирование желатина, однако гель получается тот же, что и у чистого желатина, при минимальном взаимодействии с агаром в структуре геля. С увеличением концентрации агара в смесях увеличивается стабильность гелей рыбного желатина при комнатной температуре.
- Для композитов с хитозаном и альгинатом на основе обоих желатинов, по-видимому, происходят одинаковые процессы сегрегации отдельных фаз, содержащих либо альгинат, либо хитозан, что затрудняет использование этих полисахаридов для модификации свойств желатиновых гелей.
- Необходимо дальнейшее уточнение деталей работы с желатином в присутствии фукоидана и хитозанов в связи с установленными особенностями их растворения. Альгинат натрия, как полисахарид с ионотропным механизмом гелеобразования, требует дополнительной очистки исследуемых систем от присутствия ионов металлов, что может существенно удорожить последующее его использование в пищевых технологиях.
- Установлена высокая термостабильность химически сшитого желатинового гидрогеля по сравнению с исходным. Наличие внутри- и межмолекулярных химических контактов приводит к умеренному увеличению «жесткости» коллагеноподобных тройных спиралей. Возможно, существование сшивающих химических связей вблизи тройных спиралей в некоторой степени препятствует их «раскручиванию». Таким образом, проведенные ИК-эксперименты показали, что химические сшивки молекул желатина приводят к увеличению «жесткости» коллагеноподобных тройных спиралей.
- На основании измерения краевых углов смачивания методом сидящей капли на приборе определена смачивающая способность образцов. Установлено, что значения работы адгезии воды к поверхности пленки на основе свиного желатина меньше, чем для рыбного желатина. Введение в рыбный желатин добавок способствует увеличению значений свободной поверхностной энергии (СПЭ), т.е. энергии межмолекулярного взаимодействия частиц на поверхности раздела фаз.

В рамках следующих этапов проекта будут подготовлены рекомендации для использования полученных результатов в пищевой промышленности. Запланирована разработка принципиальных технологических схем получения формованных и структурированных продуктов питания повышенной пищевой и биологической ценности с использованием комплексов полисахарид-белок в качестве стабилизаторов и структурообразователей.