МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МУРМАНСКИЙ АРКТИЧЕСКИЙ НИВЕРСИТЕТ»
(ФГАОУ ВО «МАУ»)

УДК 604.2:547.458.001.891
Коды ГРНТИ 31.25.15, 31.23.27, 65.09.03

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по образовательной деятельности
_____ В.В. Яценко
«27» ноября 2024 г.

ОТЧЕТ
О ВЫПОЛНЕНИИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

«РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ И БЕЛКОВ ИЗ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ ДЛЯ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИ СОЗДАНИИ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ»

Руководитель НИР,
докт. хим. наук, профессор _____ С.Р. Деркач

Мурманск 2024

Руководитель темы,

Профессор, докт. хим. наук
главный научный сотрудник — подпись, дата — С.Р. Деркач (Введение, Заключение, Разделы 1–6)

Исполнители:

Профессор, докт. техн. наук — 27.11.2024 — подпись, дата — В.А. Гроховский В.А. (Раздел 1)

Канд. техн. наук — Кучина 27.11.24 — подпись, дата — Ю. А. Кучина (Раздел 1, 2)

Канд. хим. наук — 27.11.24 — подпись, дата — Д.С. Колотова (Раздел 4, 5)

Доцент, докт. хим. наук — 27.11.24 — подпись, дата — Н.Г. Воронько (Раздел 5)

Мл. научн. сотр. — 27.11.24 — подпись, дата — Е.В. Боровинская (Раздел 3, 4)

Нормоконтролер — 27.11.24 — подпись, дата — К.В. Коллерт

Реферат

Отчет 44 с., 23 рис., 17 табл., 40 источн.

ИЗОЛЯТ РЫБНОГО БЕЛКА, ЖЕЛАТИН, ПОЛИСАХАРИДЫ, ХИТОЗАН, АЛЬГИНАТ НАТРИЯ, ФУКОИДАН, ОТХОДЫ РЫБОПЕРЕРАБОТКИ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ТЕХНОЛОГИИ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ, ОПЫТНАЯ ПАРТИЯ.

Объектом исследования являются отходы рыбопереработки – котно-мышечная ткань, кожа атлантической трески, рыбный желатин, изолят рыбного белка; отходы переработки морских организмов – панцири крабов, панцири креветки, хитин, хитозан; растительные морские гидробионты – водоросли, полисахариды альгинат натрия, фукоидан. Предметом исследования является изучение условий получения и физико-химических свойств фукоидана и альгината натрия, извлеченных из бурых водорослей (*Fucus vesiculosus*); хитозана, выделенного из панциря камчатского краба *(Paralithodes camtschaticus)* и из панцирей северной креветки (*Pandalus borealis*). Основной целью научно-исследовательской работы являлось определение необходимых технологических условий для выделения изолята рыбного белка из отходов рыбопереработки и для выделения полисахаридов – фукоидана и альгината натрия из растительных морских гидробионтов. В рамках НИР разработаны технологические схемы получения изолята рыбного белка и полисахаридов (фукоидана). Получены опытные партии изолята рыбного белка и углеводов. Исследованы физико-химические свойства полученных белков и полисахаридов. Исследованы физико-химические свойства комплексов рыбного желатина с сульфатированным полисахаридом. Изолят рыбного белка, комплексообразующие полисахариды морского происхождения – хитозан, альгинат натрия и фукоидан, а также супрамолекулярные комплексы полисахарид-белок могут быть использованы в пищевых технологиях при разработке продуктов питания.

Оглавление

Введение

Научно-исследовательская работа направлена на получение белков и полисахаридов из морских биологических ресурсов Арктического региона, а также из отходов их промышленной переработки с целью дальнейшего использования в пищевых технологиях при создании продуктов питания лечебно-профилактического назначения, а также функциональных продуктов питания [1].

На втором этапе проекта особое внимание уделено получению изолята рыбного белка из отходов рыбопереработки – из мышечной ткани атлантической трески. Необходимо было усовершенствовать существующую технологию изолята рыбного белка, определить технологические параметры каждой стадии с учетом запланированных физико-химических и функциональных свойств извлекаемого белка. Изолят рыбного белка в дальнейшем будет использован в качестве белкового компонента для производства обогащенных продуктов питания, а также в качестве структурообразователя при создании гелеобразных продуктов.

Другая задача второго этапа проекта заключалась в разработке технологии получения углеводного биополимера – фукоидана из бурых водорослей Арктических морей. Полисахарид фукоидан обладает антиоксидантной активностью, что подтверждает его перспективность для фармацевтической промышленности и пищевых технологий [2]. Особое внимание уделено совершенствованию технологии извлечения фукоидана из бурых водорослей с учетом свойств сырья.

Совместное использование белков и полисахаридов приводит к взаимному усилению их физико-химических свойств в процессах структурообразования, стабилизации различных дисперсных систем при сохранении устойчивости к изменению внешних факторов (pH, ионной силы растворов, изменение температурного режима), что связано с образованием нековалентных комплексов белка с полисахаридом.

Спопособность белка к образованию супрамолекулярных комплексов с полисахаридами является основой для направленного конструирования пищевых комплексных гидрогелей с заданными физико-химическими и функциональными свойствами [3]. Развитие фундаментальных знаний в области управления свойствами формирующихся супрамолекулярных комплексов обусловлено востребованностью гидрогелей на основе белок-полисахаридных систем в технологических процессах пищевых производств при создании продуктов питания, в том числе новых искусственных форм, что имеет большое значение для обеспечения технологической безопасности.

Поэтому изучение процессов комплексообразования в системах белок-полисахарид и свойств комплексов являлось еще одной задачей второго этапа проекта. Исследования проводились с использованием биополимеров, извлеченных из морских биоресурсов Арктических морей, что с одной стороны обеспечивает расширение сырьевой базы пищевой индустрии, а с другой стороны позволяет решать технологические задачи освоения биологических ресурсов.

Исследования выполнены в соответствии с Договором от 01.04.2024 № 114/02-03/29-24/223, заключенному ФГАОУ ВО «Мурманский арктический университет» с ФГБУН ФИЦ КазНЦ РАН.

1. Оптимизация (постадийная) разработанных принципиальных технологических схем получения изолята рыбного белка (ИРБ). Исследование химического состава, физико-химических и функциональных свойств готовых продуктов – изолятов рыбного белка

Белковый изолят представляет собой высококонцентрированные белковые фракции с содержанием белка не менее 90% масс., выделенные из белоксодержащего сырья растительного и животного происхождения. Белковые изоляты, как правило, обладают обезличенными органолептическими показателями, ярко выраженный цвет, вкус и запах отсутствует. Промышленное производство белковых изолятов практически полностью основано на переработке белоксодержащего сырья растительного происхождения [4]. Однако, растительные белки содержат меньшее количество незаменимых аминокислот и хуже усваиваются, по сравнению с белками животного происхождения.

Морская рыба является источником полноценных пищевых белков, липидов и минеральных веществ [5]. В процессе промысла и переработки на филе образуется большое количество белоксодержащих отходов, которые содержат в своем составе ценные биологически активные вещества и могут быть использованы для получения белковых изолятов пищевого назначения. Выделение и использование ценных компонентов, содержащихся во вторичном рыбном сырье, должно повысить эффективность переработки морских биоресурсов. Для получения белковых изолятов широко используют различные физические и химические методы, такие как термическое извлечение, обработка ультразвуком, гомогенизация, высаливание, щелочное или кислотное растворение, изоэлектрическое осаждение, ферментативный гидролиз и др.

Щелочное растворение с последующим изоэлектрическим осаждением (метод pH сдвига) является наиболее распространенным методом из-за его экономической эффективности. Щелочная (pH>7) водная среда используется для извлечения белков из сырья растительного и животного происхождения путем их растворения. В то же время в щелочной водной среде происходит изменение вторичной структуры белка, что увеличивает его растворимость [6]. Затем pH водной среды доводят до изоэлектрической точки растворенных белков; суммарный заряд макромолекул становится равным нулю, растворимость резко падает, что приводит к осаждению белков.

1.1. Совершенствование технологии изолята рыбного белка

Изоляты рыбного белка (ИРБ) получали по технологии, предложенной в работе [7]. В качестве белоксодержащего сырья использовали измельченные отходы переработки трески атлантической (*Gadus morhua*), соответствующие требованиям ГОСТ 34190-2017 «Субпродукты рыбы мороженые. Технические условия». Отходы представляли собой срезки мяса — кусочки мышечной ткани рыбы произвольной формы и размера с кожей или без кожи; без чешуи. Отходы были измельчены на волчке и заморожены. Химический состав белоксодержащего сырья представлен в Таблице 1.

Таблица 1 - Химический состав измельченного сырья

Влага ω_M, % масс.	Общий азот N_T, % масс.	Белок* P, % масс.	Жир, ω_F, % масс.	Зола, ω_A, % масс.
80±1	3,0 ±0,1	18,8±0,6	-	0,9±0,1

* Массовую долю белка рассчитывали как $P = N_T \times 6.25$ (6.25 - коэффициент пересчета количества азота на белок).

Содержание влаги, жира, общего азота и минеральных веществ в сырье и ИРБ определяли по стандартным методикам [8]. Содержание влаги в образцах определяли после их сушки до постоянной массы при t=105±5 ºС. Количество жира – методом Сокслета (экстракция растворителем); азот общий - по Кьельдалю, минеральные вещества - методом сжигания проб в муфельной печи при t=550±10 °С.

Технологическая схема процесса извлечения изолята рыбного белка представлена на Рисунке. 1.

Рисунок – 1 Технологическая схема получения изолята рыбного белка.

Описание технологической схемы получения белкового изолята приведено ниже.

1. Прием и хранение сырья

Мороженое сырье (измельчённые срезки трески) хранили при температуре не выше минус 18 °С.

2. Подготовка сырья

Фарш трески размораживали и промывали холодной водопроводной водой 2 раза. Для этого фарш смешивали с водой в массовом соотношении фарш : вода = 1 : 2, перемешивали при комнатной температуре в течение 5 минут и фильтровали через 4 слоя марлевой ткани. Промывку рыбного фарша осуществляли для удаления водорастворимых веществ, формирующих неприятный рыбный запах. К таким веществам относятся свободные аминокислоты, пептиды и летучие основания (аммиак, ди- и триметиламины).

3. *Растворение белка*

Промытый фарш смешивали с дистиллированной водой в массовом соотношении 1:7 и доводили значение pH реакционной среды до необходимых значений при постоянном перемешивании. Значения pH реакционной среды варьировали от 11,0 до 12,2 ед. с помощью 5М раствора NaOH. После доведения pH реакционную смесь выдерживали в течение 20 часов при температуре 4±1 °С или 24±1 °С без перемешивания. Необходимое соотношение твердой и жидкой фазы (гидромодуль) было подобрано опытным путем. Гидромодуль позволяет получить однородную смесь, обеспечивающую хорошее перемешивание и последующее отделение твердой фазы от раствора.

4. *Центрифугирование*

Отделение нерастворимых фракций белка осуществляли с помощью центрифугирования (условия разделения: скорость – 5000 об/мин., время – 40 минут). Осветленный раствор белков направляли на изоэлектрическое осаждение, осадок – на утилизацию.

5. *Изоэлектрическое осаждение*

Осаждение белков проводили при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Для этого доводили pH реакционной среды до значения pH=5,5±0,1 с помощью 2М раствор HCl.

6. *Отделение белка*

Систему с осажденными белками обезвоживали центрифугированием (условия разделения: скорость – 3000 об/мин., время – 4 минут). Осадок (ИРБ) направляли на дальнейшую обработку, раствор (супернатант) – на утилизацию.

7. *Промывка*

Полученный осадок (ИРБ) 2 раза промывали дистиллированной водой. Для этого изолят смешивали с водой в массовом соотношении ИРБ : вода = 1 : 10, перемешивали и обезвоживали с помощью центрифугирования (условия разделения: скорость – 3000 об/мин., время – 4 минут).

8. *Сушка*

Полученный белковый изолят сушили в лиофильной сушилке при температуре минус 50 °С и остаточном давлении 2,8–4,5 Па. Хранили полученный продукт при температуре 5 ± 1 °С. Полученные ИРБ (см. Рисунок 2) представляет собой мелкодисперсный порошок светло-бежевого цвета, без постороннего запах (слабый рыбный запах присутствует).

Выход белкового изолята (В, %) рассчитывали по формуле:

$$\text{В} = \frac{m_{\text{FPI}}}{m_{\text{F}}} * 100, \quad (1)$$

где m_F - масса влажного сырья, кг; m_{FPI} - масса высушенного изолята, кг.

Рисунок 2 – Образец ИРБ, полученный по предложенной технологии.

Показано [7], что условия щелочного растворения влияют на функциональные свойства белковых изолятов. Было изучено влияние технологических режимов, а именно, значений pH реакционной среды и температуры щелочного растворения на физико-химические и функциональные свойства (влагоудерживающая способность, растворимость) изолятов белка. Результаты исследования представлены в Таблицах 2, 3.

1.2. Химический состав

Химический состав образцов ИРБ, полученных при разных условиях щелочного растворения, приведен в Таблице 2.

Таблица 2 – Химический состав белковых изолятов, полученных при различных условиях щелочного растворения

Образец	Условия растворения *(схема, Рисунок 1)*		Влага ω_M, %	Общий азот N_T, %	Белок* P, %	Зола, ω_A, %	Выход ИРБ, В, %,
	pH среды	t, °C					
1	11,00±0,10	4±1	4,7 ± 0,1	15,1 ± 0,1	94,4 ± 0,6	0,6 ± 0,1	8,9
2		24±1	4,3 ± 0,1	15,2 ± 0,1	95,0 ± 0,6	0,7 ± 0,1	8,7
3	11,50±0,05	4±1	6,1 ± 0,1	14,9 ± 0.1	93,2 ± 0,6	0.7 ± 0,1	10,7
4		24±1	4,5 ± 0,1	15,2 ± 0,1	95,0 ± 0,6	0,6 ± 0,1	10,1
5	11,80±0,05	4±1	3,9 ± 0,1	15,3 ± 0,1	95,6 ± 0,6	0,5 ± 0,1	11,6
6		24±1	5,9 ± 0,1	15,0 ± 0,1	93,8 ± 0,6	0,4 ± 0,1	9,9
7	11,90±0,05	4±1	6,4 ± 0,1	14,9 ± 0.1	93,1 ± 0,6	0,5 ± 0,1	15,6
8		24±1	5,2 ± 0,1	15,1 ± 0,1	94,4 ± 0,6	0,5 ± 0,1	13,7
9	12,10±0,10	4±1	5,0 ± 0,1	15,1 ± 0,1	94,5 ± 0,6	0,4 ± 0,1	16,5
10		24±1	5,9 ± 0,1	15,0 ± 0,1	93,8 ± 0,6	0,4 ± 0,1	14,4

* Массовую долю белка рассчитывали как $P = N_T \times 6.25$ (6.25 - коэффициент пересчета количества азота на белок).

Анализ данных, представленных в Таблице 2, показал, что изоляты рыбного белка характеризуются высоким содержанием белка (более 93 %, масс.) и небольшим количеством золы (не более 0,7 % масс.). Изменение условий щелочного растворения, в исследуемом диапазоне, не оказывает существенного влияния на химический состав

полученных изолятов. Однако, с увеличением значений pH реакционной среды на стадии щелочного растворения повышается выход ИРБ. Выход готового продукта является важным показателем технологического процесса. Возможно, при температуре выше 20 °C происходит частичный гидролиз белков до низкомолекулярных пептидов, которые не осаждаются при pH=5,5.

1.3. Физико-химические и функциональные свойства

Растворимость является важной характеристикой белковых продуктов, определяющей их дальнейшее использование. Растворимость белков в воде обусловлена наличием на поверхности белковой молекулы гидрофильных групп (гидроксильных, сульфгидрильных, амидных), принадлежащих полярным аминокислотам и способных связывать воду [9]. На растворимость белковых изолятов в воде влияют множество факторов – pH водной фазы, присутствия электролитов, температура и др. [10]. Начальная стадия растворения заключается в диффузии молекул воды в объем биополимера и увеличении его объема и массы. Количественная характеристика этого процесса – влагоудерживающая способность (S_W, г/г), показывает, во сколько раз увеличивается масса биополимера при контакте с растворителем.

Влагоудерживающую способность (S_W) ИРБ определяли весовым методом. Метод основан на измерении количества воды, поглощенной образцом. В сухие пробирки для центрифугирования помещали ИРБ и дистиллированную воду в массовом соотношении 1:100. Содержимое пробирок в течение 2 часов перемешивали (использовали шейкер, скорость 150 об/мин) и оставляли на 6–8 часов при комнатной температуре (20–25 °C) для набухания. Избыток воды удаляли центрифугированием (условия разделения: скорость – 3000 об/мин, время – 10 мин), содержимое пробирок взвешивали. Влагоудерживающую способность (Sw, г/г) рассчитывали по формуле:

$$S_w = \frac{m_1}{m_2} \qquad (2)$$

где m_1 – масса образца после набухания и центрифугирования (г); m_2 - масса исходной сухой пробы ИРБ, взятой на анализ (г).

Таблица 3 – Функциональные свойства белковых изолятов, полученных при различных условиях щелочного растворения.

Образец	Условия растворения		Влагоудерживающ. способность S_W, г/г	Растворимость, S %, при разных pH водной фазы			
	pH среды	t, ºC		8,0	8,5	9,0	9,5
1	11,00±0,10	4±1	4,4	52,8	58,5	77,8	88,6
2		24±1	4,6	52,7	57,8	74,7	86,0
3	11,50±0,05	4±1	4,9	52,5	51,8	59,7	79,4
4		24±1	4,9	54,1	53,9	62,8	88,0
5	11,80±0,05	4±1	4,7	55,3	65,4	70,8	87,9
6		24±1	5,0	59,2	72,7	82,5	92,9
7	11,90±0,05	4±1	4,9	57,7	55,8	80,4	97,8

8	12,10±0,10	24±1	5,2	72,1	75,7	84,5	96,0
9		4±1	5,3	57,1	68,1	87,9	93,2
10		24±1	5,8	91,8	94,0	97,9	98,3

Определение растворимости ИРБ

Растворимость ИРБ определяли при различных pH водной фазы. Для этого готовили 1 % масс. суспензии изолятов, pH которых доводили до необходимых значений с помощью 2M и 0.1M NaOH. Полученную смесь тщательно перемешивали при комнатной температуре в течение 120 минут, и выдерживали при температуре 5 ± 1 °C в течение 12-14 часов. Нерастворившийся изолят удаляли с помощью центрифугирования (условия разделения: скорость – 5000 об./мин., время – 10 минут). В высушенном супернатанте (надосадочная жидкость) определяли общий азот по методу Кьельдаля.

Растворимость (S, %) изолятов рыбного белка определяли по формуле:

$$S = \frac{N_{T_1}}{N_{T\,\text{ИРБ}}} \cdot 100\% \qquad (3)$$

где $N_{T\,1}$– количество общего азота в высушенном супернатанте (%, масс.); $N_{T\,\text{ИРБ}}$ – количество общего азота в рыбном изоляте (%, масс.).

Результаты (Таблица 3) показали, что изоляты, полученные при pH 11,0–11,5 (образцы № 1–4) характеризуются низкой растворимостью (не более 88 %). Более жесткие условия щелочного растворения (pH 11,9–12,1, t=24±1 °C) позволяют получить изоляты, растворимые в слабощелочной среде. Образец № 10 характеризуется самой высокой растворимостью (91,8 %) при pH 8,0. Изоляты, полученные в более жестких условиях (образцы № 7–10) практически полностью растворяются при pH 9,5.

Влияние продолжительности щелочного растворения

Изучено влияние продолжительности процесса щелочного растворения на физико-химические и функциональные свойства ИРБ. Белковые изоляты были получены по технологии, описанной выше (см. Рисунок 1) с небольшими изменениями. А именно, промытый фарш смешивали с дистиллированной водой (гидромодуль 1:10) и доводили pH реакционной среды до 12,0±0,1 с использованием 5M NaOH. Растворение белков проводили в течение 2–4 часов при постоянном перемешивании и температуре не выше 10 °C (образец №11 и №12, Таблица 4 и 5). Затем раствор белка отделяли от нерастворимых фракций с помощью фильтрации (фильтр – 4 слоя марлевой ткани), фильтрат направляли на осаждение белков. Далее процесс получения ИРБ проводили без изменений. Результаты исследования представлены в Таблицах 4, 5.

Таблица 4 – Химический состав белковых изолятов, полученных при различной продолжительности щелочного растворения

Образец	Условия растворения, τ, ч	Влага $\omega_М$, %	Общий азот $N_Т$, %	Белок* Р, %	Зола, $\omega_А$, %	Выход ИРБ, В, %,
11	2	5,2 ± 0,1	15,0 ± 0,1	93,8 ± 0,6	0,75 ± 0,05	10,4
12	4	5,0 ± 0,1	15,1 ± 0,1	94,3 ± 0,6	0,87 ± 0,05	10,5

Таблица 5 – Функциональные свойства белковых изолятов, полученных при различных условиях щелочного растворения

Образец	Условия растворения, τ, ч	Влагоудерживающ. способность S_W, г/г	Растворимость, S %			
			$pH_{в.ф.}8{,}0$	$pH_{в.ф.}9{,}0$	$pH_{в.ф.}10{,}0$	$pH_{в.ф.}11{,}0$
11	2	6,2	60,6	64,2	68,5	-
12	4	5,5	63,9	70,6	71,3	73,0

Анализ данных, представленных в Таблицах 4, 5 показал, что уменьшение продолжительности стадии щелочного растворения до 2–4 часов не оказывает существенного влияния на химический состав ИРБ (см. Таблицу 2). Полученные изоляты характеризуются низкой растворимостью (не более 63,9 %) при pH 8,0. Увеличение pH. до 10,0 приводит к незначительному (на 8 %) повышению растворимости.

Влияние параметров щелочного растворения. Двухфакторный эксперимент

Для поиска оптимальных условий получения белковых изолятов с высокой растворимостью был использован двухфакторного эксперимента [11]. В качестве значимых факторов, влияющих на физико-химические свойства ИРБ, были выбраны параметры процесса щелочного растворения: значение pH реакционной среды (X_1) и температура процесса (X_2, ºС). В качестве параметров оптимизации были выбраны выход продукта (Y_1, *%)* и растворимость белкового изолята при значении pH водной фазы равном 8,0 (Y_2, *%)*.

Функцией отклика по выбранным факторам X_1 и X_2 является обобщенный параметр оптимизации Y, включающий значения Y_1 и Y_2.

Обобщенный параметр оптимизации рассчитывали по формуле:

$$Y = 0{,}3Y_1 + 0{,}7Y_2 \qquad (4)$$

где 0,3 и 0,7 - коэффициенты значимости параметров оптимизации (определены экспертным методом).

Условия оптимизации параметров щелочного растворения белков (pH среды, температура процесса) и результаты обработки данных для двухфакторного эксперимента представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – План и результаты эксперимента по изучению влияния параметров щелочного растворения на выход и растворимость белковых изолятов.

X_1	X_2	Y_1	Y_2	*Y, %*
11,0	5	8,9	54,4	40,75
11,0	18	8,7	53,8	40,27
11,5	5	10,5	52,5	39,90
11,5	18	10,4	59,0	44,42
12,1	5	16,0	57,1	44,47
12,1	18	14,2	93,0	69,36
11,0	11	7,9	33,5	25,82
11,5	11	8,2	30,0	23,46
12,1	11	10,4	50,6	38,54

В результате обработки данных, представленных в Таблице 4, с использованием стандартной программы DataFit ver 8.1. было получено уравнение регрессии:

$$Y = 3092{,}21 - 516{,}95\mathrm{X}_1 - 29{,}18\mathrm{X}_2 + 22{,}10\mathrm{X}_1^2 + 0{,}40\mathrm{X}_2^2 + 1{,}79\,\mathrm{X}_1\mathrm{X}_2 \qquad (5)$$

Критерий Фишера составил 44,41, вероятность неадекватности – 0,5 %. Все коэффициенты регрессии значимы с вероятностью не менее 0,95. На основании полученных данных построена поверхность отклика (Рисунок 3), которая позволяет проанализировать влияние различных факторов на обобщенный параметр оптимизации.

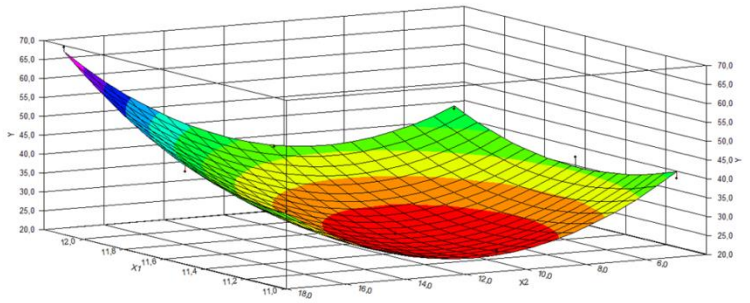


Рисунок 3 – Поверхность отклика в эксперименте по изучению влияния условий щелочного растворения белков на обобщенный параметр оптимизации *Y*.

В рассмотренном диапазоне варьирования факторов невозможно найти оптимум (поверхность отклика имеет форму седла), однако имеется явная тенденция к получению продукта с высоким содержанием водорастворимого белка. Однако, дальнейшее увеличение pH реакционной среды нецелесообразно, т.к. возможно протекание щелочного гидролиза, что приведет к снижению качества продукта. По результатам эксперимента, были приняты параметры щелочного растворения, позволяющие получить белки хорошо растворимые в слабощелочном растворе, а именно значение pH реакционной среды X_1 равным 12,0; температура X_2 – 24 °С.

1.4. Гелеобразующие свойства ИРБ

Использование белковых изолятов в качестве ингредиентов пищевых систем, способствует не только увеличению пищевой ценности, но и формирует текстуру готового продукта за счет проявления таких функциональных свойств как растворимость, гелеобразование, эмульгирование, способность связывать воду, масло и др.

Были изучены гелеобразующие свойства полученных изолятов рыбного белка при различных pH водной фазы.

Приготовление гелей. Способ 1

Готовили 10 %, масс. дисперсии изолятов: к навескам ИРБ добавили расчетное количество дистиллированной воды и оставили при комнатной температуре и постоянном перемешивании на 1-2 часа для набухания. Затем к полученным смесям добавляли 1н / 0,1н NaOH до pH 8,0; 9,0 и 10,0 и тщательно перемешивали. После доведения pH образцы

помещали в герметичную емкость (бюкс, пробирки с притертой пробкой), обезгаживали и выдерживали при температуре 4–5 °С в течение 20 часов. Далее полученные образцы термостатировали при температуре 93–94 °С в течение 20 минут, охлаждали при комнатной температуре в течение 5 минут и вновь выдерживали при температуре 4–5 °С в течение 20 часов. (Для изготовления гелей использовали изолят, полученный при следующих условиях щелочного растворения: pH=11,9, t=24 °С, τ=20 часов, образец № 8, Таблица 3). Результаты представлены на Рисунке 4.

Однако в условиях промышленного производства получение гелей таким способом нецелесообразно, поскольку это трудоемкий процесс.

Рисунок 4 – Гели изолята рыбного белка, полученные при различных значениях pH водной фазы.

Приготовление гелей. Способ 2

Для упрощения процесса было предложено готовить дисперсии путем смешения сухого ИРБ с водой, pH которой равно 11,5–12,0. (значение pH доводили с помощью 0,1 н раствора NaOH).

Полученные дисперсии (с pH 7,2–8,0) тщательно перемешивали, помещали в герметичную емкость (бюкс, пробирки с притертой пробкой) и выдерживали при температуре 4–5 °С в течение 20 часов. Далее образцы обезгаживали, термостатировали при температуре 93–94 °С в течение 20 минут, охлаждали и вновь выдерживали при температуре 4–5 °С. (Для изготовления гелей использовали изолят, полученный при следующих условиях щелочного растворения: pH=12,0, t≤10 °С, τ=4 часа, образец № 12, Таблица 4 и 5). Результаты представлены на Рисунке 5. Для сравнения представлены изображения дисперсии, полученной путем смешения сухого ИРБ с дистиллированной водой (значение pH смеси 5,2–6,2).

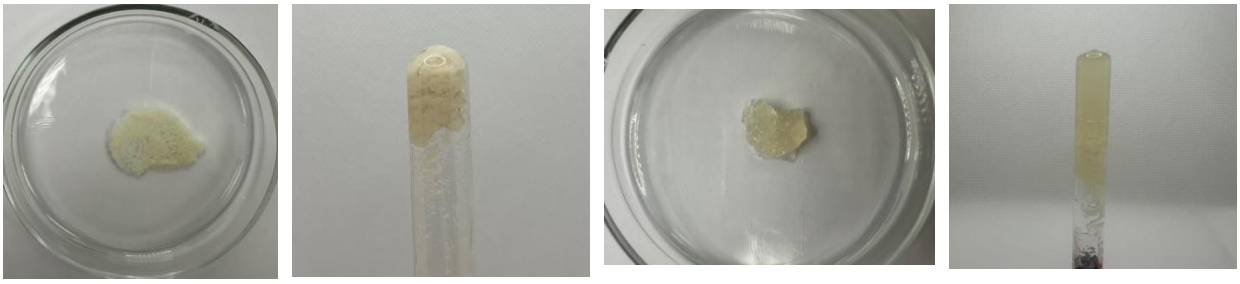


Рисунок 5 – Гели ИРБ, полученные по упрощенной методике (Способ 2).

Результаты показали, что образование гелей изолятов рыбного белка происходит при pH ≥ 7,2.

Влияние pH на влагоудерживающую способность ИРБ

Изучено влияние значений pH водной фазы на влагоудерживающую способность изолятов (см. Таблицу 7). Образцы готовили следующим образом: в сухие пробирки с ИРБ добавляли дистиллированную воду или воду с pH=11,5–12,0 в массовом соотношении 1:100, содержимое пробирок перемешивали в течение 2 часов и оставляли на 6–8 часов при комнатной температуре для набухания. Затем избыток воды удаляли, содержимое пробирок взвешивали. Влагоудерживающую способность (S_W, г/г) рассчитывали по формуле, представленной выше.

Таблица 7 – Влагоудерживающая способность ИРБ при различных pH водной фазы

Образец	Условия щелочного растворения (при получении ИРБ)			Влагоудерживающая способность, S_W, г/г	
	pH	t °C	τ, час	pH 5,2–6,2	pH 7,2–8,0
7	11,9	4	20	4,9	16,2
8	11,9	24	20	5,2	15,8
9	12,0	4	20	5,3	15,1
11	12,0	≤10	2	6,2	27,7
12	12,0	≤10	4	5,5	25,7

Установлено, что продолжительность процесса щелочного растворения оказывает наибольшее влияние на влагоудерживающую способность изолятов. Увеличение времени растворения приводит к уменьшению способности белков удерживать воду. Кроме того, полученные ИРБ сильнее проявляют влагоудерживающие свойства в щелочной среде. Так, наибольшей влагоудерживающей способностью (6,2 г/г – в дистиллированной воде, 27,7 г/г – в щелочном растворе) характеризуется белковый изолят (образец № 11) с наименьшей продолжительностью стадии щелочного растворения. Возможно, при длительном ведении стадии щелочного растворения происходит не только процесс растворения, но и частичное разрушение нативной структуры белка (в результате гидролиза белков).

2. Изготовление опытных партий белкового продукта – изолята рыбного белка из недоиспользованных рыбных ресурсов и/или отходов рыбопереработки

Методом изоэлектрического осаждения (Технологическая схема, Рисунок 1) были получены две опытные партии изолята рыбного белка (ИРБ) из отходов переработки трески, исследован их химический состав и функциональные свойства (см. п. 1). Результаты представлены в Таблицах 8–10. Партия 1 получена в количестве 30 г, партия 2 – 20 г.

Таблица 8 – Химический состав полученных образцов ИРБ

Номер партии	Дата получения	Условия щелочного растворения	Влага $\omega_М$, %	Общий азот $N_Т$, %	Белок* Р, %	Зола, $\omega_А$, %	Выход, В, %,
1	18.07.2024	pH=12,2, t=24 °C, τ=20 часов	5,9 ± 0,1	15,0 ± 0,1	93,8 ± 0,6	0,4 ± 0,1	14,4
2	17.10.2024	pH=12,0, t≤10 °C, τ=2 часа	5,2 ± 0,1	15,0 ± 0,1	93,8 ± 0,6	0,75 ± 0,05	10,4

Таблица 9 – Функциональные свойства полученных образцов ИРБ

Номер партии	Дата получения	Условия щелочного растворения	Влагоудерживающ. способность S_W, г/г	Растворимость, S %, при разных pH			
				8,0	8,5	9,0	9,5
1	18.07.2024	pH=12,2, t=24 °C, τ=20 часов	5,8	91,8	94,0	97,9	98,3
2	17.10.2024	pH=12,0, t≤10 °C, τ=2 часа	6,2	60,6	60,7	64,2	68,6

Определен аминокислотный состав изолята, полученного 18.07.2024 (партия № 1). Массовую долю аминокислот определяли методом капиллярного электрофореза по ГОСТ Р 55569-2013 «Корма, комбикорма, комбинированное сырье. Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза». Использовали систему капиллярного электрофореза («Капель», Россия) с источником высокого напряжения положительной полярности, оснащенную кварцевым капилляром длиной 75 см и внутренним диаметром 50 мкм, спектрофотометрическим детектором, позволяющим проводить измерения при длине волны 254 нм. Анализ проводили в ФБУ "Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в г. Санкт-Петербурге, Ленинградской и Новгородской областях, Республике Карелия" (ФБУ «Тест-С.-Петербург»).

Таблица 10 – Аминокислотный состав ИРБ от 18.07.2024 г. (партия №1), содержание аминокислот, г/100 г белка.

Аминокислота	Мышечная ткань трески [12]	ИРБ
Глицин	4,1	3,9±0,2
Пролин	3,1	3,0±0,1
Триптофан	1,3	1,4±0,1
Аспарагиновая кислота и аспарагин	10,0	10,5±0,5
Глутаминовая кислота и глутамин	15,0	11,0±0,5
Серин	5,0	5,0±0,2
Гистидин	2,8	3,0±0,1
Треонин*	5,6	5,0±0,2
Аргинин	6,3	9,0±0,5
Аланин	5,6	5,8±0,3
Цистин	1,3	1,5±0,1
Тирозин	3,8	3,5±0,1
Валин*	5,6	5,1±0,2
Метионин*	3,1	3,5±0,2

Лейцин* и Изолейцин *	12,5	12,6±0,6
Лизин*	9,4	10,5±0,5
Фенилаланин*	5,0	3,6±0,2
∑	99,5	97,9±3,0
∑ (НАК)	41,2	40,3±1,2

* - незаменимые аминокислоты (НАК)

3. Разработка технологии получения углеводных биополимера фукоидана из бурых водорослей Арктических морей

Сырьем для получения фукоидана являлись бурые водоросли Белого моря вида Fucus vesiculosus (фукус пузырчатый) (Рисунок 6, 7). Район сбора: литораль губы Малая Питкуля, Мурманская область, Кандалакшский район. Дата сбора:30 июня 2024 года.

Рисунок 6 - Водоросли Fucus vesiculosus.

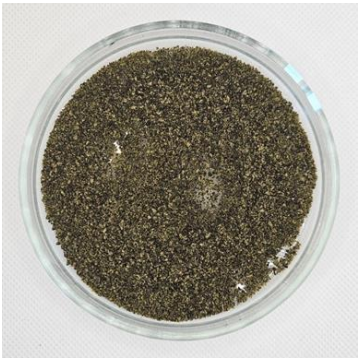


Рисунок 7 – Высушенные измельченные водоросли Fucus vesiculosus

Подготовка сырья для экстракции фукоидана

Свежесобранные водоросли *Fucus vesiculosus* очищали от песка, моллюсков и прочих примесей, промывали в проточной воде, высушивали на воздухе при температуре 25±2 °С в течение 3 суток. Высушенные водоросли измельчали на лабораторной мельнице в порошок (Рисунок 2) и хранили при комнатной температуре в герметичной таре. Физико-химические свойства фукуса пузырчатого приведены в Таблице 11.

Таблица 11. Физико-химический состав фукуса пузырчатого

Компонент	Метод исследования, ГОСТ	Содержание*, %	Содержание %
Вода	ГОСТ 3333-2015	-	13,95
Минеральные вещества (зола)	ГОСТ 3333-2015	18-25	14,74
Общий азот (ОА)	Метод Кьельдаля, ГОСТ 26185-84 (3.4)	-	0,12
Белок (ОА·6,25)	Метод Кьельдаля, ГОСТ 26185-84 (3.4)	4,31-15,00	11,00
Липиды	Метод Сокслета	0,72-3,76	0,18

* Примечание: литературные данные [2, 13, 14]. Разброс в содержании веществ зависят от сезона сбора.

Технологическая схема получения фукоидана

Фукоидан получен в соответствии с технологической схемой, представленной ниже (Рисунок 8).

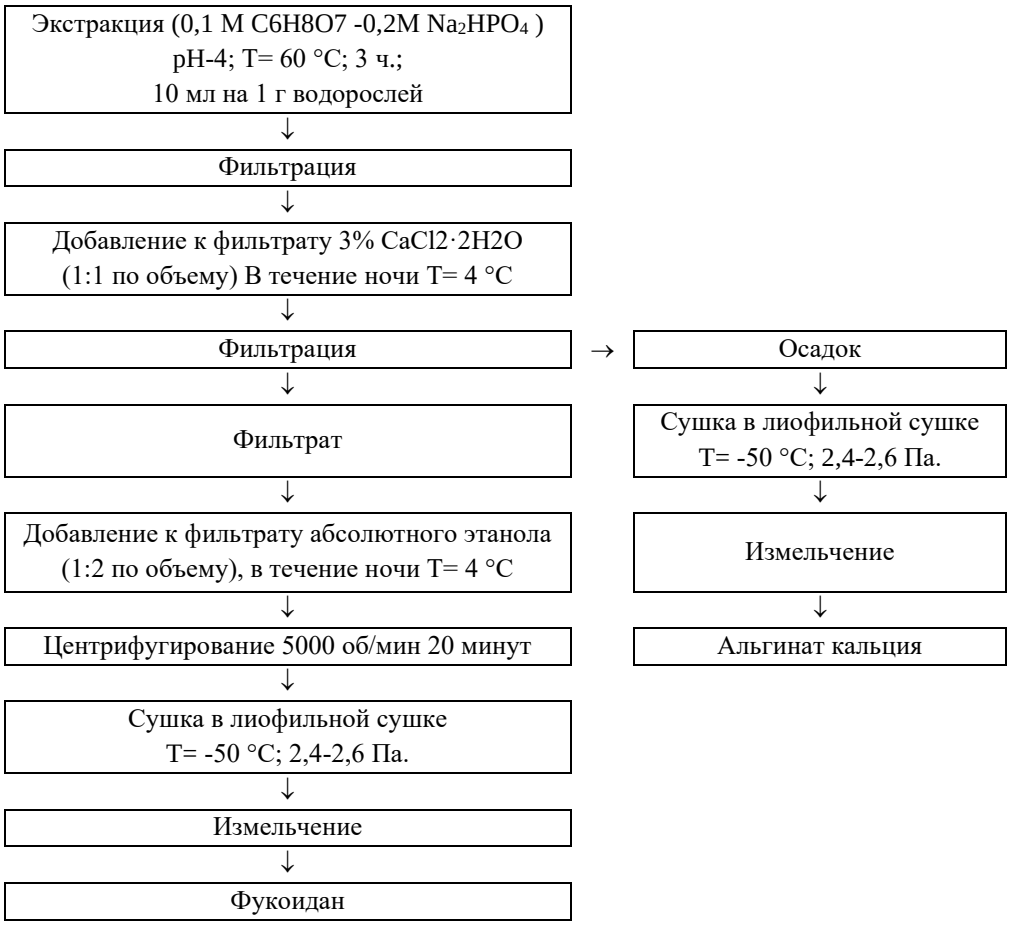


Рисунок 8 – Технологическая схема получения фукоидана [15].

Описание технологической схемы получения белкового изолята приведено ниже.

1. *Экстракция*

Высушенные измельченные водоросли смешивали с буферным раствором Макилвейна* pH 4 в соотношении 1:10. Экстракция проводилась в течение 3 часов при температуре 60 °C при постоянном перемешивании. Состав буферного раствора: 0,1М $C_6H_8O_7$ – 153,6 мл; 0,2М Na_2HPO_4 – 96,4 мл.

2. *Фильтрация*

Полученную смесь фильтровали через слой капроновой ткани, осадок направляли на утилизацию.

3. *Осаждение альгината кальция*

К фильтрату приливали 3% раствор $CaCl_2$ в соотношении 1:1. Осаждение проводилось в течение ночи при температуре 4 °C.

4. *Фильтрация*

Полученную смесь фильтровали через слой капроновой ткани, осадок (альгинат кальция) направляли на лиофильную сушку.

5. *Осаждение фукоидана*

К фильтрату приливали двойной объём этанола. Осаждение проводилось в течение 12 часов при температуре 4 °C.

6. *Центрифугирование*

Отделение осадка осуществляли с помощью центрифугирования (условия разделения – скорость: 5000 об/мин., время: 20 минут). Раствор направляли на утилизацию, осадок (фукоидан) – на сушку.

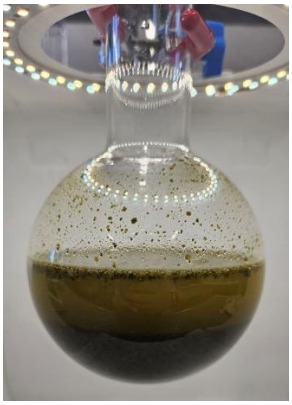
7. *Сушка фукоидана*

Полученный фукоидан сушили в лиофильной сушилке при температуре -50 °C и остаточном давлении 2,4–2,6 Па.

8. *Измельчение*

Полученный фукоидан измельчали вручную в ступке, хранили фукоидан при комнатной температуре в герметичной таре.

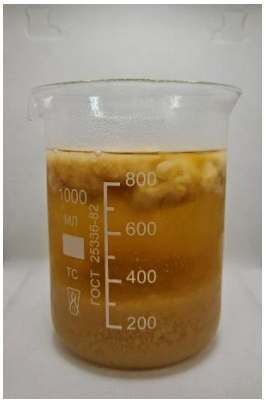
Основные технологические операции проиллюстрированы на Рисунке 9, фото полученного продукта – на Рисунке 10. Полученный фукоидан представляет собой порошок светло-бежевого цвета с присутствием незначительного запаха, свойственного используемому сырью (водорослям).



Экстракция в буферном растворе Макилвейна.

Осаждение альгината кальция 3% раствором $CaCl_2$.

Осаждение фукоидана этанолом в начале цикла.



Осаждение фукоидана этанолом в конце цикла.

Рисунок 9– Основные технологические операции получения фукоидана

Фукоидан до лиофильной сушки

Лиофильно высушенный фукоидан

Рисунок 10 – Внешний вид полученного продукта - фукоидана

Органолептические и физико-химические свойства фукоидана

Полученные образцы фукоидана представляют собой порошок светло-бежевого цвета с присутствием незначительного запаха свойственного используемому сырью. Физико-химические свойства полисахарида приведены в Таблице 2.

Таблица 12. Физико-химические свойства фукоидана.

Компонент	Метод исследования, ГОСТ	Содержание %
Вода	ГОСТ 3333-2015	50,13
Минеральные вещества (зола)	ГОСТ 3333-2015	7,56
Общий азот (ОА)	Метод Кьельдаля, ГОСТ 26185-84 (3.4)	0,12
Белок (ОА·6,25)	Метод Кьельдаля ГОСТ 26185-84 (3.4)	0,74
Растворимость (при 22 °С), %	ГОСТ 26185-84	56,3
Растворимость после диализа* (при 22 °С), %	ГОСТ 26185-84	31,0
Выход фукоидана		18,17

* *Диализ:* 10% раствор фукоидана направлен на диализ в дистиллированной воде с размером пор 8000-14000 Да, диализ проводился в течение 48 часов с 5-кратной сменой воды. Полученный фукоидан сушили в лиофильной сушилке FreeZone при температуре -50 °С и остаточном давлении 2,4-2,6 Па.

Выход (X, %) фукоидана из сухого сырья рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{m}{M} \times 100\% \quad (6)$$

где m – масса высушенного альгината натрия, г; M – масса высушенных водорослей, г.

Массовую долю веществ, растворимых в воде (при комнатной температуре) вычисляли по формуле:

$$X_{24} = \frac{[(m-m_1)\times 100 - m_2 \times m]\times 100\%}{m(100-m_2)} \quad (7)$$

где m – масса фукоидана, израсходованная для определения, г; m_1 – масса высушенного осадка в тигле, г; m_2 – массовая доля воды в фукоидане, %.

Массовая доля веществ, растворимых в воде комнатной температуры фукоидана после диализа составила 31,0 %

ИК-спектры поглощения

Готовили суспензию фукоидана в воде, концентрация 1,0%. Суспензию центрифугировали, отделяли надосадочную жидкость от осадка, затем надосадочную жидкость и осадок сушили в лиофильной сушилке BK-FD10T (Biobase, Китай) при температуре -60 °С и остаточном давлении не более 1 Па в течение 8 ч.

Исследуемые образцы (фукоидан, осадок, надосадочная жидкость) смешивали с KBr, после чего сушили в вакуумном сушильном шкафу VAC-24 (Stegler, Китай) при температуре 60 °С в течение 24 ч для удаления остаточной влаги, готовили таблетки массой 0,3 г с использованием гидравлического пресса. В качестве образца сравнения использовали таблетки, изготовленные из чистого KBr.

ИК-спектры пропускания фукоидана, осадка и надосадочной жидкости регистрировали с использованием инфракрасного спектрометра с Фурье-преобразованием ФСМ 2202 (Инфраспек, Россия) в диапазоне частот 4000-450 $см^{-1}$ (количество сканирований – 50) с разрешением 4 $см^{-1}$. Полученные ИК спектры приведены на Рисунке 11.

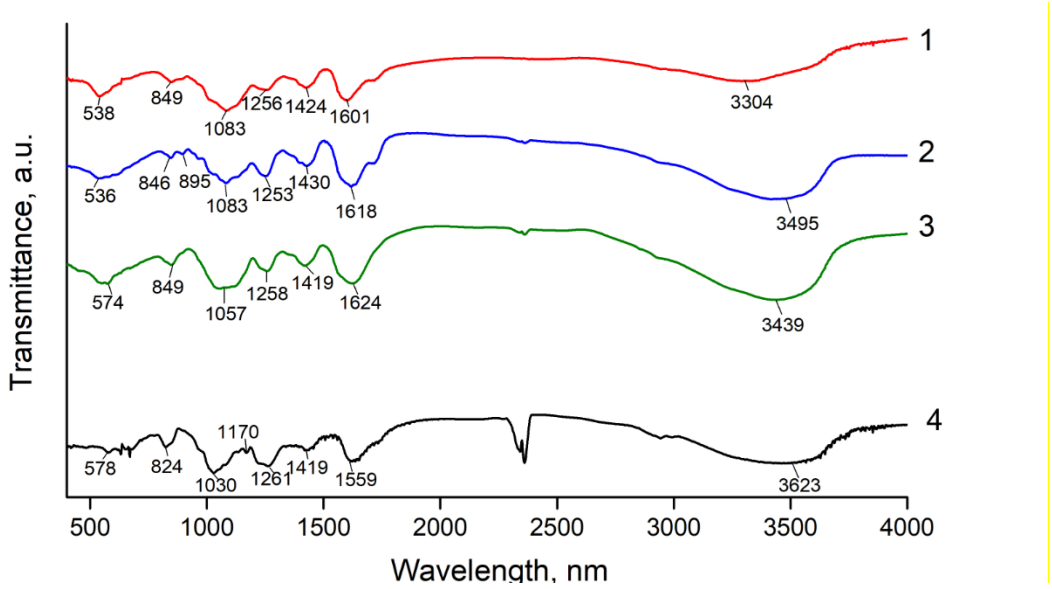


Рисунок 11 – ИК-спектры поглощения фукоидана (1), надосадочной жидкости (2) и осадка (3), полученных после разделения 1% суспензии фукоидана, и препарата Фуколам[1] (4)

Для всех спектров характерно наличие широких полос поглощения в области 3600-3300 $см^{-1}$, отвечающих растягивающим колебаниям -OH и H_2O и несколько меньших полос в области 2 900 $см^{-1}$, относящихся к CH-растяжению в пираноидном кольце и C-6 группах фукозных единиц [16]. Небольшое плечо в области 1540 $см^{-1}$ характерно для полосы Амид II [17]. Наличие полос поглощения в области волновых чисел 1030 $см^{-1}$ может быть обусловлено остатками гулуроновой и маннуроновой кислот из-за остаточного содержания альгината. Интенсивные полосы в области 1559-1624 могут быть связаны с содержанием уроновой кислоты. Все проанализированные образцы демонстрируют широкую полосу в районе 1253-1261 $см^{-1}$, которая может быть обусловлена присутствием сульфатно-эфирных групп (S=O), характерного компонента фукоиданов. Дополнительная полоса поглощения сульфата около 845 $см^{-1}$ (C-O-S, вторичный аксиальный сульфат) может указывать на то, что сульфатная группа расположена на C-4 фукопиранозильного остатка.

Основным сахаром, содержащимся в полимерной цепи фукоидана, является фукоза, отсюда и название фукоидан. Наряду с фукозой часто присутствуют другие сахара, включая галактозу, ксилозу, арабинозу и рамнозу. Молекулярная масса фукоиданов обычно высока (около 50-1000 кДа), а молекулярно-массовое распределение полидисперсное. Определение точного анализа химического состава фукоидана, а именно, количественного определения

[1] Фуколам. Биологически активная добавка к пище – источника полисахаридов (фукоидана). Состав: Полисахарид из морских водорослей-фукоидан (1 капсула содержит 60 мг фукоидана). ТУ 9284-065-02698170-2006. Разработано и произведено Тихоокеанским институтом биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН). Оказывает положительное действие на кровеносную и иммунную систему.

углеводов, сульфатирования, ацетилирования, катионов, а также молекулярной массы возможно с использованием ряда анализов, включая УФ-видимую спектрометрию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, атомно-абсорбционную спектрометрию и спектрометрию с индуктивно связанной плазмой. Газовая хроматография также часто используется для определения сахарного состава углеводного каркаса.

4. Изготовление опытных партий полисахаридов. Характеристика полученных образцов в соответствии с ГОСТами и ТУ

4.1. Хитозан

Получена опытная партия хитозана (Таблица 13) из панцирей камчатского краба и изучены его физико-химические свойства. Для описания характеристик полученных образцов хитозана использовали нормативно-техническую и техническую документацию:

1. Характеристики полученных образцов хитозана должны соответствовать требованиям ТУ 9289-067-00472124-03 «Биологически активная добавка «Хитозан пищевой»;
2. ГОСТ 7636 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа»;
3. ГОСТ 27184-86 «Реактивы. Определение остатка после прокаливания».

Процесс получения хитозана из хитинсодержащего сырья (панцирей ракообразных) состоит из двух этапов: выделение хитина и его последующее щелочное деацетилирование.

Выделение хитина из хитинсодержащего сырья

Сухое измельченное сырье (панцирь крабов) смешивали с 4 % (масс.) раствором гидроксида натрия (гидромодуль 1:8), нагревали до температуры 50±1 ^{0}C и выдерживали при постоянном перемешивании в течение 1 часа. Затем депротеинизированный панцирь (осадок) отделяли от щелочного раствора, промывали (до значений pH промывной воды не более 8,0) и сушили. Сухой промытый осадок направляли на деминерализацию. Для этого депротеинизированное сырье смешивали с 3,9 % (масс.) раствором соляной кислоты (гидромодуль 1:8) и выдерживали при температуре не выше 25 ^{0}C в течение 1 часа при постоянном перемешивании.

Осадок отделяли, промывали холодной дистиллированной водой (t=15 – 25 ^{0}C) до значений pH промывной воды не ниже 5,5 и сушили. Затем высушенный после деминерализации панцирь смешивали с 4 % (масс.) раствором гидроксида натрия (гидромодуль 1:8), нагревали до температуры 95±5 ^{0}C и выдерживали при постоянном перемешивании в течение 1 часа. Далее депротеинизированный панцирь (хитин) отделяли от щелочного раствора, промывали горячей дистиллированной водой до значений pH промывной воды не более 8,0 и сушили. Промытый хитин сушили при комнатной температуре и направляли на получение хитозана (стадия деацетилирования).

Щелочное деацетилирование хитина

Измельченный хитин смешивали с 50%, масс. раствором гидроксида натрия (гидромодуль 1:18), смесь тщательно перемешивали и выдерживали при температуре 98±2 °C в течение 3 часов при постоянном. Затем полученный хитозан отделяли от щелочного раствора и промывали горячей дистиллированной водой (t=80 – 85 ^{0}C) 5 – 6 раз, до значений pH

промывной воды не более 8,0. Промытый осадок (хитозан) сушили при комнатной температуре. Технологическая схема щелочного деацетилирования хитина представлена на Рисунке 12.

Рисунок 12 – Технологическая схема получения хитозана из хитина

Физико-химические свойства хитозана определяли по стандартным методикам. Содержание влаги в образце определяли после высушивания до постоянной массы при t=105±5 ºС; минеральные вещества – методом сжигания образцов в муфельной мечи при t=700±10 °С; степень деацетилирования (СД, %) – методом потенциометрического титрования [18]. Средневязкостную молекулярную массу (ММ, кДа) образца хитозана определяли вискозиметрическим методом по уравнению Марка–Куна–Хаувинка [19]. В качестве растворителя хитозана использовали 0,334 М CH_3OOH/0,3 М NaCl, растворяли при 21 ºС в течение 24 ч. Физико-химические свойства полученного образца хитозана представлены в таблице 13.

Таблица 13. Физико-химические свойства полученного образца хитозана из панциря камчатского краба

№ партии	Дата изготовления	Дата отправки партнерам	Масса г	Физико-химические свойства				
				Влага, %	Зола, %	ММ, кДа	СД, %	$R^{v}_{ef,\infty}$ нм
2	13.11.2023	14.02.2024	30	9,6±0,2	1,10±0,05	99,9	95,1±0,4	18,9

4.2. Альгинат натрия

Получена опытная партия альгината натрия из высушенных измельченных водорослей Белого моря вида Fucus vesiculosus (фукус пузырчатый). Для описания характеристик

полученных образцов альгината натрия (и фукоидана, см. п. 4.3) использовали нормативно-техническую и техническую документацию:

1. ГОСТ 26185-84 «Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки. Методы анализа».
2. M.R. Kasaai. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. Carbohydrate Polymers. 2007. V. 68. P. 477–488.
3. ГОСТ 33331-2015 "Водоросли, травы морские и продукция из них. Методы определения массовой доли воды, золы и посторонних примесей".
4. ГОСТ 26185-84 "Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки. Методы анализа"
5. Массовую долю веществ, растворимых в воде комнатной температуры, определяли в соответствии с ГОСТ 26185-84 «Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки. Методы анализа».

Процесс получения альгината натрия соответствует технологической схеме (Рисунок 13).

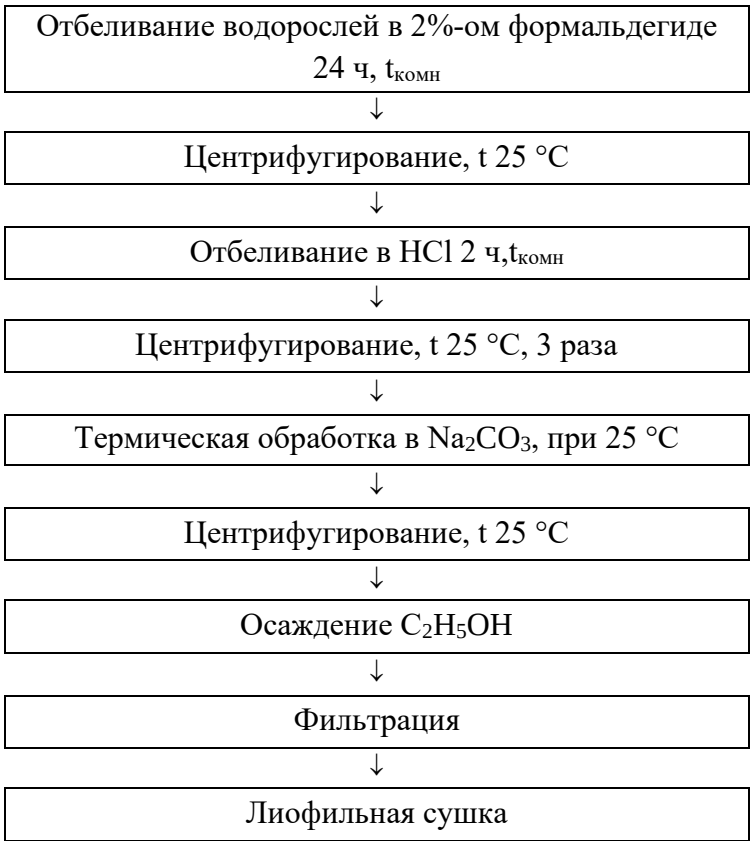


Рисунок 13 – Технологическая схема получения альгината натрия

1. Свежесобранные водоросли очищали от песка, моллюсков и прочих примесей, промывали в проточной воде, высушивали на воздухе при температуре 25±2 °C в течение 3 суток. Высушенные водоросли измельчали на лабораторной мельнице в порошок и хранили при комнатной температуре в герметичной таре.

   Для удаления фенольных соединений и бурого пигмента высушенные и измельченные водоросли обрабатывали раствором формальдегида с концентрацией

2 об. % (соотношение водоросли: формальдегид = 1:4 по массе) при постоянном перемешивании в течение 24 часов при температуре 25±2 °С.

2. Затем обработанные водоросли 5 раз промывали дистиллированной водой и фильтровали через слой капроновой ткани.
3. Далее проводили обработку водорослей 0,2 М раствором HCl (соотношение водоросли: HCl =1:4 по массе) при постоянном помешивании в течение 2 часов при температуре 25±2 °С.
4. Обработанные водоросли 5 раз промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и фильтровали через слой капроновой ткани.
5. Обработанные водоросли смешивали с 2 % раствором Na_2CO_3 в соотношении 1:4 по массе. Проводили экстракцию при постоянном перемешивании в течение 1 часа при температуре 25 °С.
6. По окончании экстракции полученную смесь фильтровали через слой марлевой ткани, осадок от фильтрации направляли на утилизацию. Для полного удаления мелких частиц водорослей полученный раствор центрифугировали на медицинской центрифуге РС-6МЦ (Дастан, Россия) в течение 15 минут со скоростью 3500 об/мин при температуре 25±2 °С.
7. Для осаждения альгината натрия к фильтрату добавляли 95 % раствор этанола в соотношении фильтрат: этанол = 1:1 при постоянном перемешивании.
8. Полученный альгинат натрия отфильтровывали через слой капроновой ткани.
9. После чего сушили в лиофильной сушилке BK-FD10T (BioBase, Китай) при температуре не выше –50 °С и остаточном давлении не более 1 Па.

Физико-химические свойства альгината натрия представлены в таблице 14, элементный состав альгината натрия представлены в Таблице 15**.**

Таблица 14. Физико-химические свойства альгината натрия из *Fucus vesiculosus* (фукус пузырчатый)

№ партии	Дата изготовления	Дата отправки партнерам	Масса г	Физико-химические свойства				
				Влага, %	Зола, %	ММ, кДа	Вязкость 1% р-ра, Па·с	Выход, %
2	27.10.2023	14.02.2024	15	14,5±0,2	33,3±0,05	590±15	145,0	7,5

Таблица 15. Элементный состав фукуса пузырчатого и альгината натрия

Элемент	ПДК*	Фукус (высушен.)	Альгинат натрия (Дата изготовления 27.10.2023)
Содержание элементов, мг/кг			
Ртуть	1,0	<0,05	0,13
Кадмий	1,0	<0,1	<0,1
Свинец	5,0	0,15	2,58
Мышьяк	3,0	11,1	0,52
Цинк		65	26,4
Медь		14,48	1,45
Никель		9,0	0,74

Кобальт	0,44	<0,1
Марганец	13,93	3,37
Хром	2,05	1,3
Кальций	12800	9500
Калий	9070	502
Натрий	12900	81500
Магний	11700	1190
Железо	84	22,5
Литий	0,16	<0,1
Фосфор	403	9,1
Стронций	830	880
Цезий	<0,1	<0,1
Барий	20,5	23,2
Рубидий	5,2	0,33

* для пищевых добавок и комплексных пищевых добавок (Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств»).

4.3. Фукоидан

Получена опытная партия фукоидана из высушенных измельченных водорослей Белого моря вида *Fucus vesiculosus* (фукус пузырчатый). Для описания характеристик полученных образцов фукоидана использовали нормативно-техническую документацию (см. п.4.2).

Процесс получения фукоидана соответствует технологической схеме, приведенной на Рисунке 8, подробное описание схемы представлено в п. 3. Элементный состав сырья для получения фукоидана – фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus*) приведен в Таблице 15. Физико-химические свойства фукуса представлены в таблице 16.

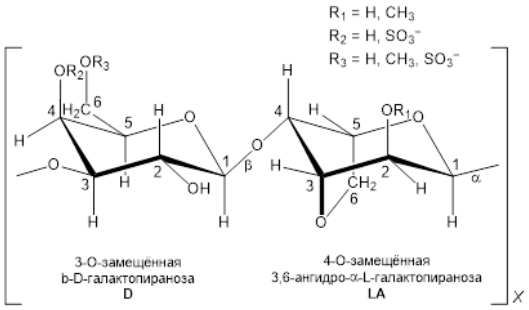
Таблица 16. Физико-химические свойства полученного образца фукоидана из *Fucus vesiculosus* (фукус пузырчатый)

№ партии	Дата изготовления	Дата отправки партнерам	Масса, г	Физико-химические свойства				
				Влага, %	Зола, %	Белок (ОА·6,25), %	pH (суспензия, 1%)	Выход, %
1	03.09.2024	17.09.2024	9,1	7,6±0,2	50,1±0,05	0,74±0,01	5,67	18,17

5. Изучение супрамолекулярных комплексов полисахарид-белок с целью определения взаимосвязи состава комплекса с его гелеобразующими свойствами по данным сдвиговой реологии

Для изучения супрамолекулярных комплексов полисахарид-белок использовали систему, содержащую агар и рыбный желатин. Описание методов исследования приведено в Приложении 1. Использован рыбный желатин Gelatin from cold water fish skin G7041 (РЖ) производства Sigma-Aldrich Corp, содержание белка 87,4%, влаги 12,7%; pI 7,8; M_η, =133 kDa. Использовали агар (А) Agar A7002 производства Sigma–Aldrich Corp. Страна

производства – Португалия. Содержание влаги 11.0%, золы – 2.70%, M_η = 240 kDa, структурная формула приведена ниже:



5.1. Свойства растворов комплексов рыбный желатин–агар

Взаимодействие агар-рыбный желатин по данным УФ спектроскопии

Взаимодействия в системе агар–рыбный желатин изучены методом УФ-спектроскопии. Использовали спектрометр T70 UV/visible (PG Instruments Ltd., Великобритания), толщина кварцевой кюветы l = 0.01 м. Получены спектры водных дисперсий агар с концентрациями C_A = 0.01–0.08%, рыбного желатина и их смесей при массовых соотношениях биополимеров Z = 0.1–0.8$г_А/г_{РЖ}$ в условиях постоянной концентрации рыбного желатина $C_{РЖ}$ = 0.1% (Рисунок 14).

Максимум поглощения дисперсии рыбного желатина соответствует λ_{max} = 224 нм. По сравнению с желатином максимум поглощения дисперсий агара лежит в области меньших длин волн (≤ 196 нм). Увеличение концентрации агара вызывает смещение максимума в длинноволновую область. Наблюдаемое явление (батохромный сдвиг) можно объяснить увеличением доли двухспиральных структур за счёт агрегации макромолекул полисахарида.

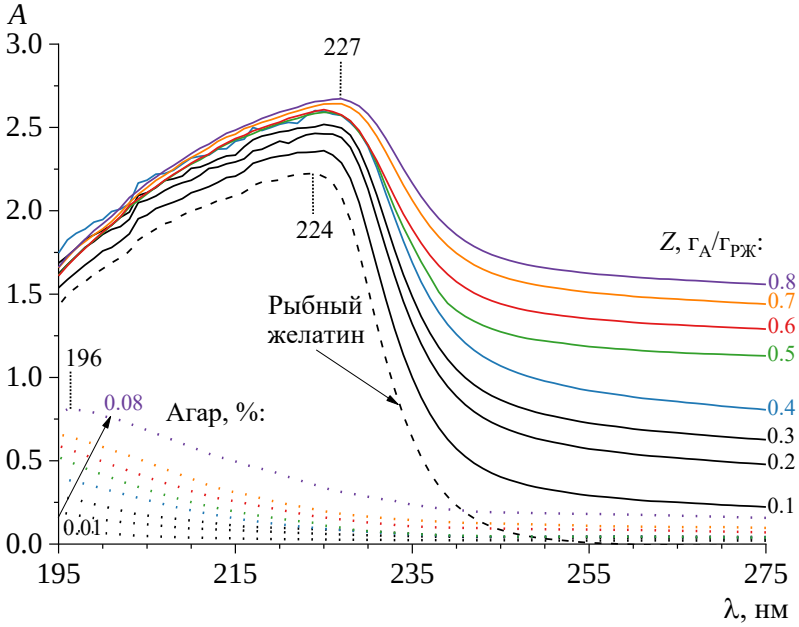


Рисунок 14 – УФ-спектры поглощения водных дисперсий агара, рыбного желатина и смесей агар–рыбный желатин; $C_{РЖ}$ = 0.1%, l = 0.01 м, 23 ºС

Добавление агара к дисперсии рыбного желатина также вызывает батохромный сдвиг максимума поглощения; величина сдвига возрастает с увеличением концентрации

агара (массового соотношения биополимеров Z), достигая 4 нм (с 224 до 227 нм) при C_A= 0.08%. Поскольку величина λ_{max} зависит от окружения хромофоров [20], смещение максимума свидетельствует об их участии в межмолекулярных взаимодействиях: формировании водородных связей между гидроксильными группами и электростатических взаимодействиях сульфогрупп агара и аминокислотных остатков *His*, *Arg* и *Lys* желатина. Непрерывное возрастание оптической плотности смесей при одной и той же длине волны с увеличением концентрации агара позволяет предварительно предположить формирование комплексов стехиометричного состава, т. е. скомпенсированность зарядов на макромолекулах агара ниже Z = 0.8 $г_А/г_{РЖ}$.

Кроме того, по мере роста C_A (и соответственно Z) происходит уширение полосы поглощения дисперсий смесей по сравнению с дисперсией «чистого» рыбного желатина. В уширении спектров проявляется отклонение светорассеяния на укрупняющихся частицах комплексов от рэлеевского. В соответствии с теорией Ми, описывающей более общий случай светорассеяния, оптическая плотность дисперсии зависит от длины волны согласно модели Ангстрёма (6), т. е. обратно пропорциональна ей в степени, равной волновому экспоненту N [21]. Как следует из выражений (7–8), N как функция размера светорассеивающих частиц уменьшается с увеличением их радиуса, что выражается графически в виде уширения спектра.

Размер частиц в смеси агар-рыбный желатин

Количественное подтверждение укрупнения частиц дисперсной фазы, выявленного по результатам УФ-спектроскопии, в ходе комплексообразования получено при исследовании гидродинамических свойств водных дисперсий смесей биополимеров – в частности, зависимости среднего радиуса R частиц и комплексов агар–рыбный желатин (Z = 0.1–1.0 $г_А/г_{РЖ}$) при постоянной концентрации рыбного желатина $C_{РЖ}$ = 0.1% от концентрации полисахарида турбидиметрическим методом (метод «спектра мутности») и методом квазиупругого лазерного рассеяния (КУЛС) (Рисунок 14). На тот же график нанесены аналогичная зависимость для агара (C_A = 0.01–0.1%) и величина радиуса рыбного желатина ($C_{РЖ}$ = 0.1%). Использовали спектрометр T70 UV/visible (PG Instruments Ltd., Великобритания) и Photocor Complex-Z (Photocor Corp., Россия).

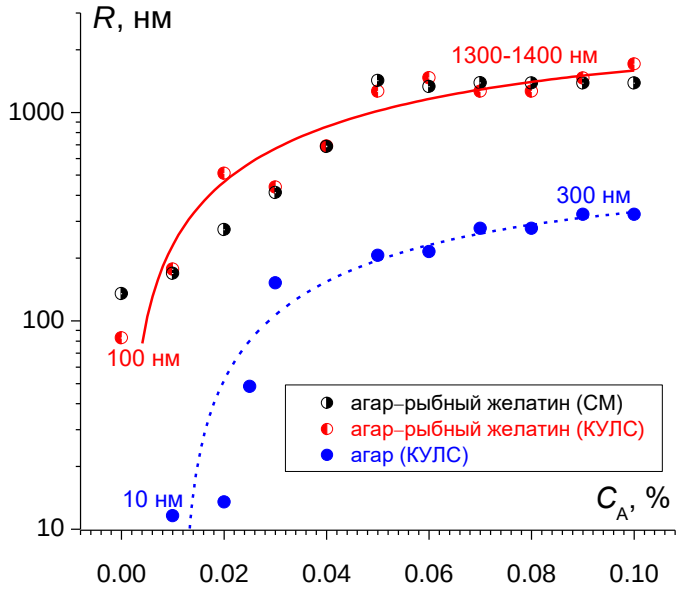


Рисунок 14 – Зависимость среднего радиуса R частиц агара, рыбного желатина

и комплексов агар–рыбный желатин в водных дисперсиях, определённого методом динамического квазиупругого лазерного светорассеяния (КУЛС) и турбидиметрическим методом «спектра мутности» (СМ) от концентрации агара C_A; $C_{РЖ}$ = 0.1%, 23 ºС

В диапазоне значений $C_A \leq 0.05\%$ размер частиц комплексов агар–рыбный желатин демонстрирует зависимость от концентрации агара, возрастая с её увеличением (ростом массового соотношения биополимеров); укрупнение происходит в результате агрегации комплексов за счёт димеризации участков макромолекул полисахарида. Область максимальных значений (плато) R 1300–1400 нм достигается при C_A = 0.05 $г_A/г_{РЖ}$ (Z = 0.5 $г_A/г_{РЖ}$). Сопоставимые значения радиуса частиц были получены для комплексов желатина из млекопитающих типа В с другими анионными полисахаридами – к-каррагинаном (~1400 нм при Z = 0.5 $г_{кк}/г_Ж$) [22] и альгинатом натрия (~1500 нм при Z = 0.95 $г_{АН}/г_Ж$) [23].

Формирование супрамолекулярных комплексов разного состава

Для определения областей формирования супрамолекулярных комплексов стехиометричного и нестехиометричного состава было проведено турбидиметрическое титрование раствора рыбного желатина с концентрацией $C_{РЖ}$ = 0.2% раствором агара с концентрацией C_A= 0.2%. Кривая титрования приведена на Рисунке 15.

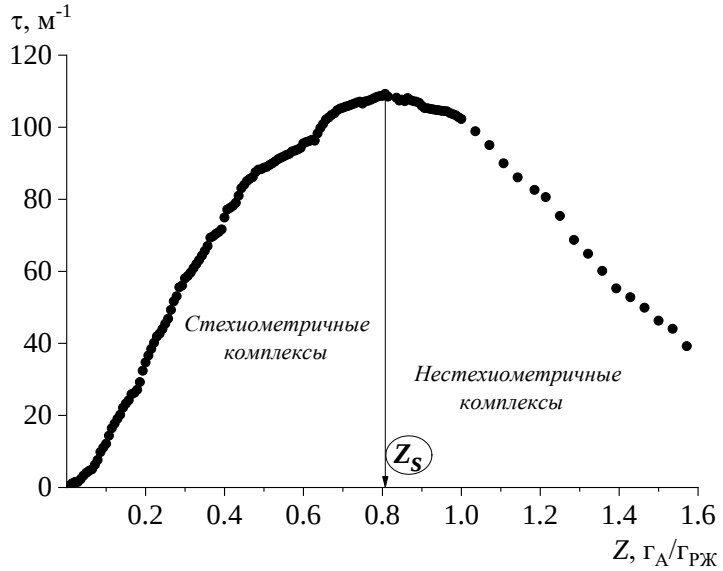


Рисунок 15 – Зависимость мутности τ водной дисперсии комплексов агар–рыбный желатин от массового соотношения биополимеров Z при титровании раствора желатина раствором агара; $C_{РЖ}$ = 0.2%, $V_{РЖ}$ = 14.0 $см^3$, C_A = 0.2%, λ = 500 нм, l = 0.03 м, 23°С

На начальном этапе введение небольших количеств агара (увеличение Z в условиях избытка макромолекул рыбного желатина) сопровождается формированием стехиометричных комплексов агар–рыбный желатин, сосуществующих в объёме водной фазы с несвязанными макромолекулами желатина. Низкая растворимость комплексов приводит к увеличению τ вплоть до $Z_S \approx 0.8$ $г_A/г_{РЖ}$, соответствующего верхней границе формирования стехиометричных комплексов. В точке максимальной мутности наблюдается взаимная нейтрализация зарядов, которые несут на себе все макромолекулы биополимеров в системе. Дальнейшему росту концентрации агара (увеличение Z в условиях избытка макромолекул агара) сопутствует взаимное отталкивание нескомпенсированных зарядов его сульфогрупп. В результате растворимость образующихся при Z>0.8 $г_A/г_{РЖ}$

нестехиометричных комплексов увеличивается, а мутность системы, напротив, – уменьшается.

С учётом полученного значения $Z_S \approx 0.8$ $г_А/г_{РЖ}$ и молекулярных масс биополимеров определённых по данным капиллярной вискозиметрии (рыбный желатин 133 kDa, агар 240 kDa), рассчитано, что в процессе супрамолекулярного комплексообразования соотношение между количеством связывающихся макромолекул составляет 1 мол.$_А$/2 мол.$_{РЖ}$.

Дзета потенциал частиц комплексов

Данные турбидиметрического титрования были дополнены результатами определения ζ-потенциала частиц дисперсной фазы исследуемых систем: водных дисперсий агара в диапазоне концентраций $C_А$ = 0.01–0.1%, рыбного желатина и смесей агар–рыбный желатин в диапазоне массовых соотношений Z = 0.1–1.0 $г_А/г_{РЖ}$ при постоянной концентрации рыбного желатина $C_{РЖ}$ = 0.1% (Рисунок 16), полученных методом квазиупругого лазерного рассеяния (КУЛС). Использовали анализатор размеров частиц и ζ-потенциала Photocor Complex-Z (Photocor Corp., Россия) с термостабилизированным полупроводниковым лазером с длиной волны λ = 636.8 нм и мощностью 25 мВт в качестве источника излучения. Угол светорассеяния в режиме определения R составлял θ = 90°, в режиме определения их ζ-потенциала – θ = 20°.

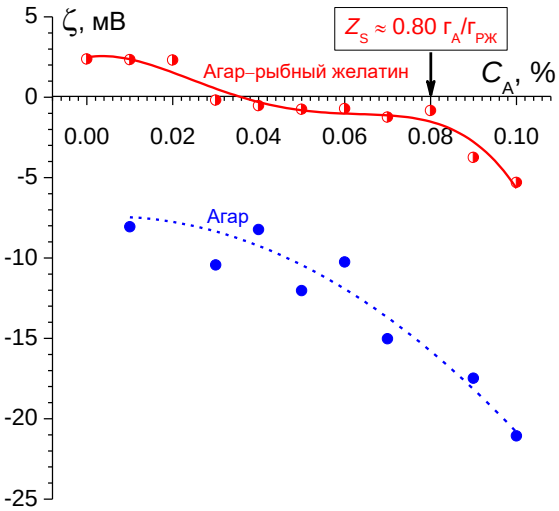


Рисунок 16 – Зависимость ζ-потенциала частиц агара, рыбного желатина и смесей агар–рыбный желатин в водных дисперсиях от концентрации агара $C_А$; $C_{РЖ}$ = 0.1%, 23 ºС

На исследованном интервале концентраций агара (массовых соотношений биополимеров) ζ-потенциал частиц монотонно уменьшается с –8.1 до –21.1 мВ в дисперсиях агара. Характер падения потенциала в смесях агар–рыбный желатин более сложен. Небольшая величина потенциала (ζ < 30 мВ) характеризует исследуемые коллоидные биополимерные системы как потенциально склонные к неустойчивости [24], причём эта склонность уменьшается с ростом концентрации агара как для систем, содержащих индивидуальный полисахарид, так и для биополимерных смесей.

Значения ζ-потенциала комплексных частиц агар–рыбный желатин лежат между таковыми для «чистых» рыбного желатина (2.4 мВ) и агара соответствующей концентрации, в процессе добавления полисахарида изменяя первоначальный знак на противоположный.

Зависимость начинается с платообразного участка, поскольку при низких C_A (и соответственно Z) в смеси имеется избыток несвязанного рыбного желатина. С возрастанием концентрации агара в смесях противоположные по заряду макромолекулы биополимеров вступают в электростатические взаимодействия с образованием супрамолекулярных комплексов, в результате чего при C_A = 0.03% (Z = 0.3 $г_A/г_{РЖ}$) достигается нулевой потенциал. Помимо увеличения количества частиц дисперсной фазы за счёт комплексообразования между вновь добавляемыми макромолекулами агара и имеющимися – желатина, такие частицы могут интенсивно агрегировать – мутность системы продолжает возрастать, что отражено на Рисунке 15. Начиная с C_A = 0.03% (Z = 0.3 $г_A/г_{РЖ}$) и вплоть до C_A = 0.08% (Z_S = 0.8 $г_A/г_{РЖ}$) ζ-потенциал комплексных частиц остаётся практически неизменным (около –0.8 мВ), пока не достигнута верхняя граница образования стехиометрических комплексов и каждая новая макромолекула агара в системе оказывается связанной с желатином. Увеличение концентрации агара выше границы стехиометричности Z_S = 0.8 $г_A/г_{РЖ}$ приводит к падению потенциала далее в отрицательную область.

Электростатические взаимодействия в супрамолекулярных комплексах полисахарид–белок (и в частности, агар–рыбный желатин) находятся под сильным влиянием pH водной фазы. Зависимость среднего радиуса R и ζ-потенциала частиц в точке верхней границы формирования стехиометричных комплексов агар–рыбный желатин $Z_S \approx$ 0.8 $г_A/г_{РЖ}$ от pH среды определяли методом КУЛС в диапазоне от константы ионизации сульфогруппы агара ($pK_a \approx 2$) до изоэлектрической точки рыбного желатина ($pI_{РЖ} \approx 8$). Кроме того, были получены зависимости R и ζ-потенциала частиц от pH для водных дисперсий «чистых» биополимерных компонентов комплексов – рыбного желатина и агара (Рисунок 17).

Показано, что в изоэлектрической точке частицы рыбного желатина имеют максимальный размер (1200 нм) и ζ-потенциала, равный нулю. Частицы агара имеют максимальный размер (350 нм) при «естественном» значении pH ($pH_{nat} \approx 7$). ζ-Потенциал агара лежит в отрицательной области и уменьшается при увеличении pH в кислой области, однако при переходе в щелочную область начинает несколько возрастать, что может быть связано с экранированием ионами Na^+ отрицательно заряженных сульфогрупп агара.

Что касается влияния pH на размеры частиц комплексов агар–рыбный желатин, то обнаружено, что при смещении pH в кислую область, R возрастает от 1300 нм (при «естественном» pH_{nat}) до 10700 нм (при $pH \approx pK_a$). Таким образом, в кислой области можно говорить об образовании седиментационно-неустойчивой системы агар–рыбный желатин, приводящем к разделению фаз. Формированию крупных комплексов агар–рыбный желатин в сильнокислой области, по-видимому, способствует экранирование ионами H^+ отрицательных зарядов *Asp* и *Glu* на макромолекулах желатина, что нейтрализует заряд комплексов, уменьшает их взаимное электростатическое отталкивание и, соответственно, усиливает агрегацию.

При смещении pH в щелочную область, R, напротив, уменьшается от 1300 нм до 700 нм (при $pH \approx pI_{РЖ}$). Это можно объяснить экранированием ионами OH^- положительных зарядов на макромолекулах желатина. Таким образом, комплексы оказываются в целом отрицательно заряженными за счёт зарядов сульфогрупп агара и карбоксильных групп *Asp* и *Glu* желатина. Электростатическое отталкивание усиливается, агрегация уменьшается.

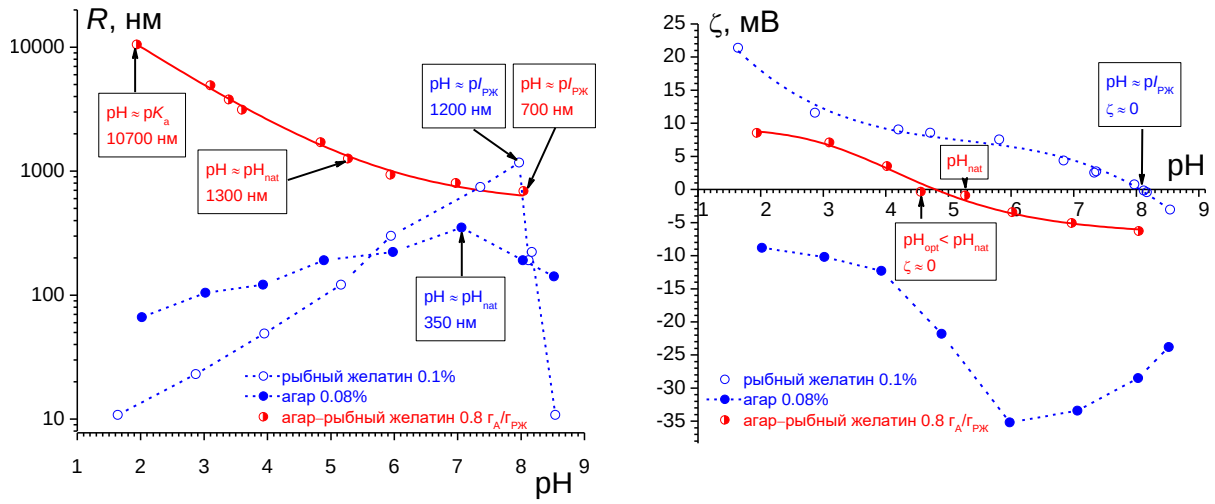


Рисунок 17 – Зависимость среднего радиуса *R* и ζ-потенциала частиц агара, рыбного желатина и смесей агар–рыбный желатин в водных дисперсиях от pH среды, 23 ºС

ζ-Потенциал частиц комплексов агар–рыбный желатин во всей исследованной области pH лежит между значениями ζ-потенциалов частиц рыбного желатина (положительные вплоть до p$I_{РЖ}$) и частиц и агара (отрицательные). В сильнокислой области ζ-потенциал системы> 0, что при условии предполагаемой электронейтральности крупных частиц комплексов можно объяснить избытком ионов H^+. Полная электронейтральность системы наблюдается при pH_{opt} 4.5, что несколько меньше «естественного» значения pH (pH_{nat} 5.3). При дальнейшем повышении pH вплоть до p$I_{РЖ}$ наблюдается уменьшение отрицательного значения ζ-потенциала, что объясняется увеличением отрицательного заряда на поверхности частиц комплексов.

Водные дисперсии комплексов – прекурсоры гидрогелей

Водные дисперсии биополимерных смесей, в объёме которых формируются супрамолекулярные комплексы агар–рыбный желатин, являются своеобразными «прекурсорами», при охлаждении которых образуются термотропные гидрогели. Следовательно, состав и коллоидно-химические свойства указанных комплексов оказывают прямое влияние на процесс гелеобразования и реологические характеристики сформированных в объёме дисперсии гидрогелей.

Свойства комплексов по данным ИК спектроскопии

Межмолекулярные взаимодействия в системе агар–рыбный желатин изучены методом ИК Фурье спектроскопии. Получены ИК-спектры пропускания агар и смесей агар–рыбный желатин при трёх массовых соотношениях биополимеров *Z*: 0.02, 0.06 и 0.10 $г_А/г_{РЖ}$ (Рисунок 18).

Полосы пропускания в ИК-спектре агара были отнесены к колебаниям соответствующих связей определённых групп по данным, опубликованным в [25, 26] (Таблица. 17).

Таблица 17. Полосы пропускания определённых функциональных групп агара

Положение полосы пропускания, $см^{-1}$	Связь в определённой группе
890	Валентные колебания эфирной связи C–O–S сульфогрупп в позиции 4 β-D-галактопиранозного остатков
930	Валентные колебания связи C–O 3,6-ангидро- остатков
1080	
1155	Валентные колебания эфирной связи C–O–S сульфогрупп
1250	Валентные колебания связи S=O сульфогрупп
1640 (Амид I)	Валентные колебания связи C–O агара (а также остатков белка в образце агара)

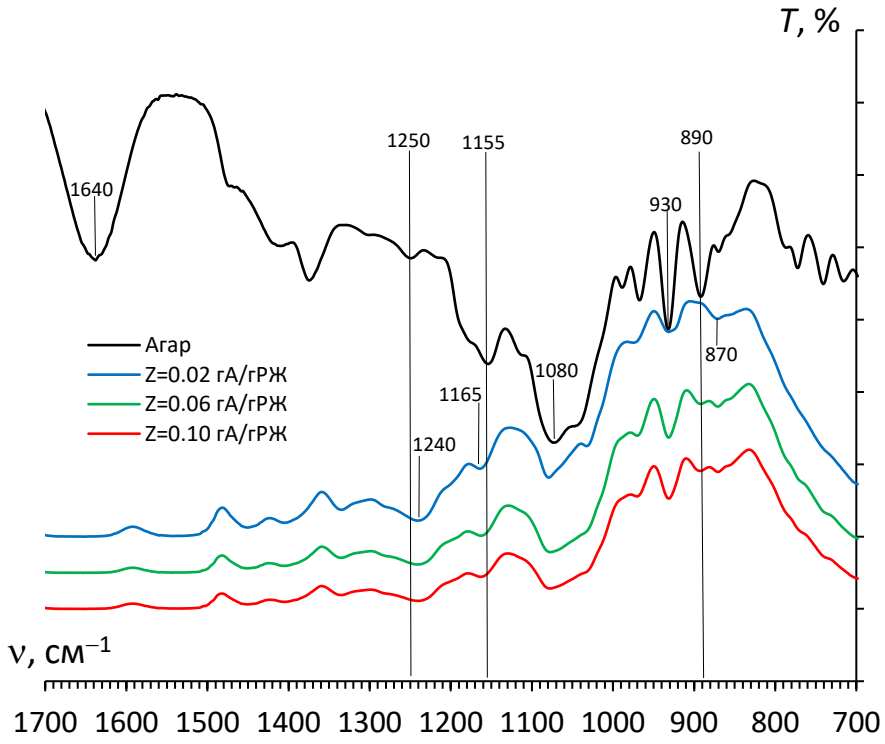


Рисунок 18 – ИК-спектры пропускания агара и смесей агар–рыбный желатин

Как видно из Рис.1, в спектрах смесей агар–рыбный желатин относительно спектра агара происходят значительные низкочастотные сдвиги полос пропускания при 890 $см^{-1}$ (на 20 $см^{-1}$) и при 1250 $см^{-1}$ (на 10 $см^{-1}$). Также происходит высокочастотный сдвиг относительно полосы агара при 1155 $см^{-1}$ (на 10 $см^{-1}$). При этом величина сдвига не зависит от массового соотношения биополимеров в системе.

Указанные полосы в спектре агара соотносятся с колебаниями связей при сульфогруппах (см. Таблицу 17). Следовательно, обнаруженные сдвиги могут говорить об электростатических взаимодействиях отрицательных сульфогрупп агара и положительных аминокислотных остатков *His*, *Arg* и *Lys* желатина.

5.2. Реологические свойства гидрогелей комплексов агар–рыбный желатин

Изменение свойств гидрогеля рыбного желатина в результате введения добавок агара исследовали методом 3D-реометрии в условиях сдвиговой деформации, включая режим установившегося течения и динамический механический анализ. Все исследованные гидрогели были сформированы при охлаждении соответствующих водных дисперсий – «прекурсоров» до 4 °С), и выдержки при данной температуре в течение 24 ч. Методика формирования гидрогелей детально описана в Приложении 1.

Вязкость при течении

На Рисунке 19 представлены кривые течения водных систем, содержащих агар ($C_А$ = 0.2–1.0%), рыбный желатин и их смеси в диапазоне массовых соотношений Z = 0.02–0.10 $г_А/г_{РЖ}$, т. е. в области значительно ниже верхней границы формирования стехиометричных комплексов (см. Рисунок 15), при постоянной концентрации рыбного желатина $C_{РЖ}$ = 10%, в виде зависимостей η = f(σ) (Рис. 6.а) и σ = f($\dot{\gamma}$) (Рисунок 19б).

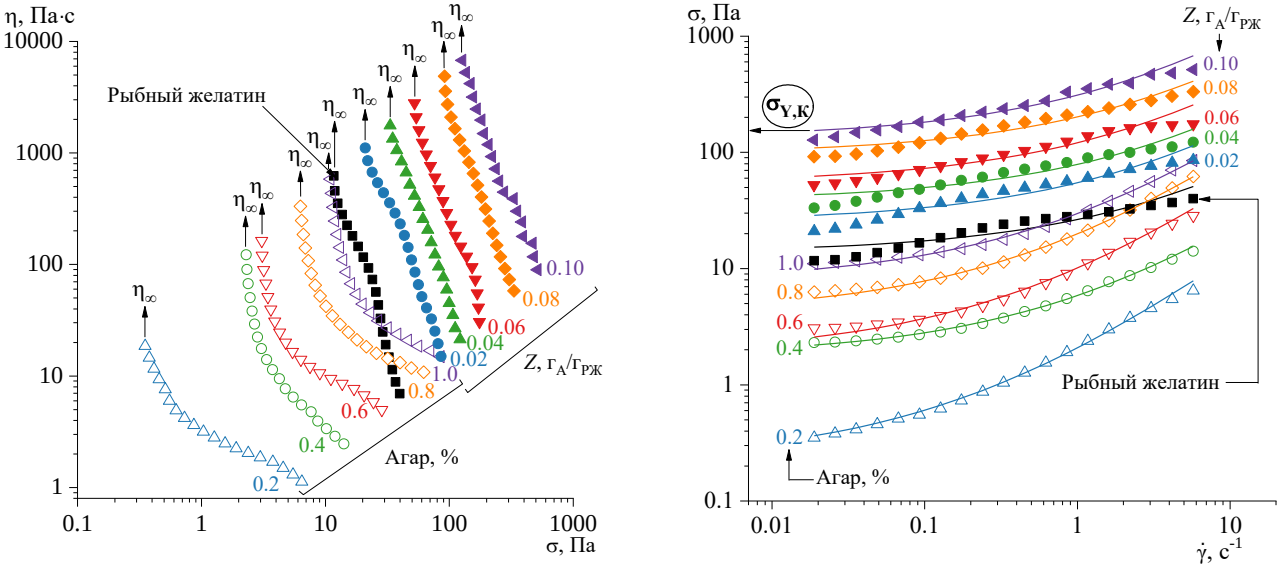


Рисунок 19 – Кривые течения η = f(σ) **(а)** и σ = f($\dot{\gamma}$) **(б)** для систем, содержащих агар, рыбный желатин и смеси агар–рыбный желатин; $C_{РЖ}$ = 10%, 4.00 ºС. Кривые течения **(б)** аппроксимированы моделью Кэссона

Все исследованные системы в условиях эксперимента демонстрируют ярко выраженное неньютоновское поведение. Полученные кривые лежат в диапазоне напряжений, не достигающих значений, соответствующих минимальной ньютоновской вязкости.

Для всех исследованных систем увеличение напряжения сдвига σ в исследованном диапазоне приводит к уменьшению вязкости η на 2 десятичных порядка, а повышение $C_А$ в системах, содержащих как «чистый» агар, так и его смесь с рыбным желатином, сопровождается увеличением η при данном σ. Следствием добавления агара к системам, содержащим рыбный желатин, является неаддитивный рост их η и по сравнению с «чистым» рыбным желатином при одинаковых значениях σ (см. Рисунок 19а).

Значения σ как функции скорости сдвига $\dot{\gamma}$ систем, содержащих только агар, в исследованном диапазоне концентраций преимущественно ниже, чем для рыбного желатина при эквивалентных значениях $\dot{\gamma}$, однако повышаются с возрастанием C_A. При введении в систему, содержащую рыбный желатин, агара наблюдается скачок σ в пределах одного десятичного порядка относительно напряжения сдвига индивидуального рыбного желатина; величина скачка растёт по мере увеличения массового соотношения между биополимерами Z (см. Рисунок 19б).

Течение всех исследованных систем отвечает закономерностям, выявленным для реологического поведения твёрдообразных материалов при напряжениях сдвига выше предела текучести σ_Y. Таким образом, рассмотренные системы с реологической точки зрения могут быть отнесены именно к гидрогелям. Интересно, что зависимости $\sigma = f(\dot{\gamma})$, полученные для других анионных полисахаридов из морских водорослей (κ-каррагинана, альгината натрия), а также катионного полисахарида из панцирей ракообразных хитозана, в идентичных условиях позволяют отнести эти системы к классическим ньютоновским жидкостям, для которых справедливо уравнение Ньютона–Стокса (9), либо к системам с незначительными отклонениями от ньютоновского идеально вязкого поведения. Как правило, ярко выраженный предел текучести начинает фигурировать на кривых течения таких систем только в присутствии желатина [27].

Для зависимостей напряжения от скорости сдвига, фигурирующих на Рисунок 19б, была выполнена аппроксимация моделью Кэссона, вычислены величины предела текучести по Кэссону $\sigma_{Y,C}$ и пластической вязкости η_p [28]:

$$\left(\sqrt{\sigma} - \sqrt{\sigma_{Y,C}}\right)^2 = \eta_p \dot{\gamma}\,. \qquad (7)$$

Вязкоупругие свойства

Данные, полученные при анализе кривых течения, дополнили результатами исследований реологического поведения гидрогелей биополимеров и их смесей в режиме периодических колебаний (осцилляционные исследования). Так, на Рисунке 20 представлены амплитудные зависимости компонент модуля упругости G^* гидрогелей агара (C_A = 0.2–1.0%) (Рисунок 20а), рыбного желатина и их смесей в диапазоне массовых соотношений Z = 0.02–0.10 $г_А/г_{РЖ}$ (Рисунок 20б) при постоянной концентрации рыбного желатина $C_{РЖ}$ = 10%.

Как гидрогели агара, так и смесей агар–рыбный желатин в диапазоне исследованных концентраций C_A проявляют твёрдообразные свойства, выражающиеся в превышении модуля накопления G' над модулем потерь G'' вплоть до критической амплитуды деформации γ^* на величину около 1 десятичного порядка, несколько возрастающую по мере роста C_A. Следует обратить внимание, что гидрогели агара являются твёрдообразными материалами уже при довольно небольшой концентрации полисахарида C_A = 0.2%. Область линейного вязкоупругого поведения (плато постоянных значений G') у гидрогелей биополимерных смесей проявляется в более узком интервале, чем у гидрогелей рыбного желатина, но в более широком по сравнению с гидрогелями агара. На сменяющем область плато нелинейном участке наблюдается падение G' (уменьшается количество энергии, запасаемой и высвобождаемой в осцилляционном цикле) и рост G'' (увеличивается диссипация энергии в тепло).

В точке пересечения амплитудных зависимостей G' и G'' определили значения критической амплитуды деформации γ^* [29].

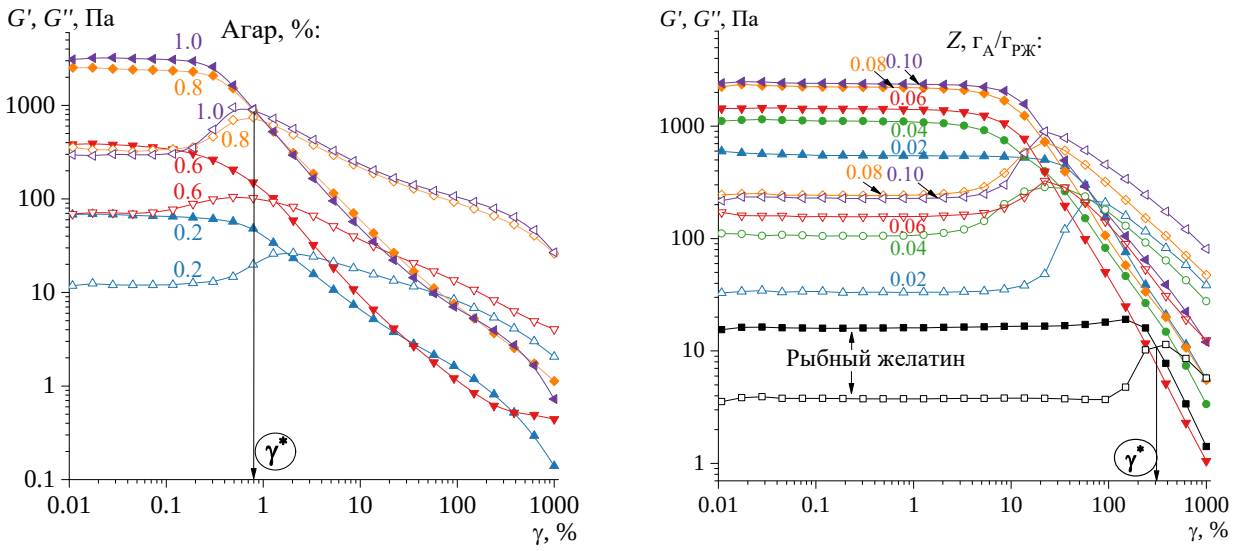


Рисунок 20 – Зависимости модуля накопления G' (закрашенные символы) и модуля потерь G'' (пустые символы) от амплитуды деформации γ для гидрогелей агара **(а)**, рыбного желатина и смесей агар–рыбный желатин **(б)**; $C_{РЖ}$ = 10%, f = 1 Гц, 4.00 ºС

Преобразовав амплитудные зависимости (Рисунок 20) к виду, отображённому на Рисунок 21, т. е. перейдя к зависимостям G' от напряжения сдвига σ по формуле, определили значения предела текучести по результатам динамических испытаний $\sigma_{Y,\gamma}$ [30].

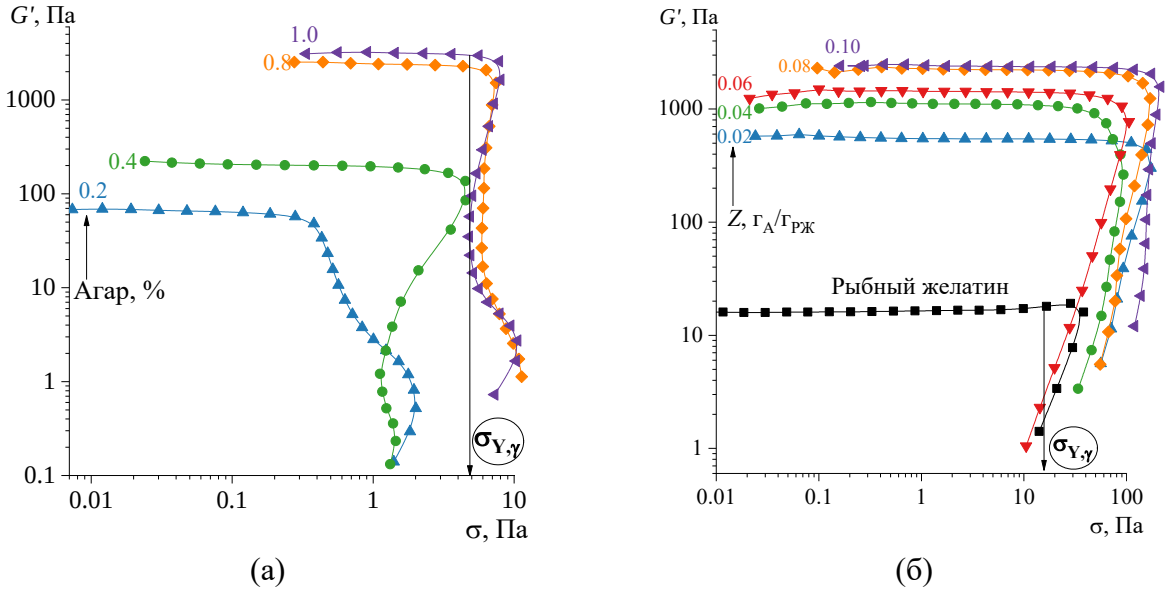
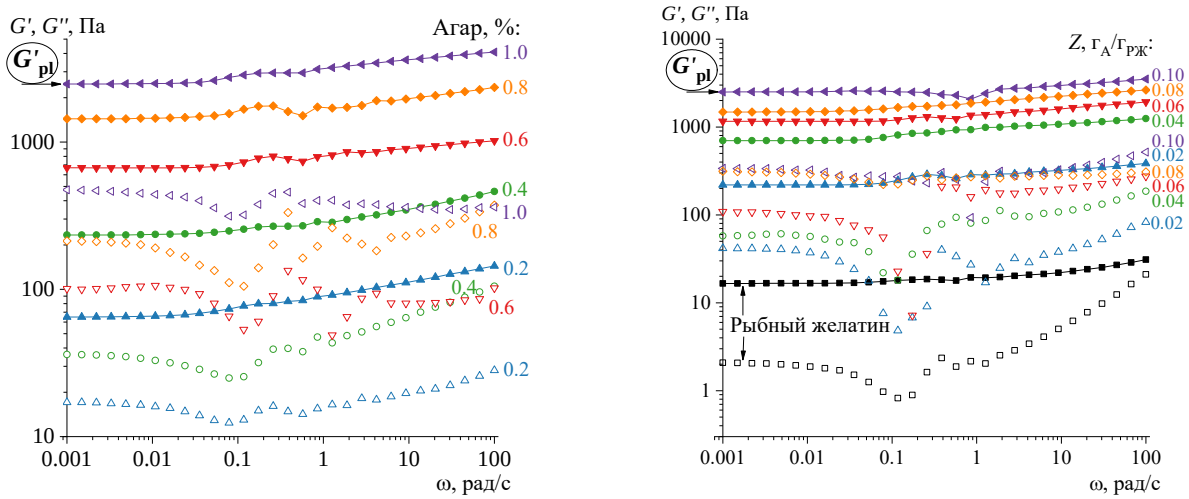


Рисунок 21 – Зависимости модуля накопления G' от напряжения сдвига σ для гидрогелей агара **(а)**, рыбного желатина и смесей агар–рыбный желатин **(б)**; $C_{РЖ}$ = 10%, f = 1 Гц, 4.00 ºС

Для оценки влияния частоты осцилляционных колебаний на модуль упругости в области линейной вязкоупругости выбрали значение амплитуды деформации γ = 0.1 Гц, которое поддерживали постоянным в ходе эксперимента. Частотные зависимости

компонент модуля упругости G^* гидрогелей агара (C_A = 0.2–1.0%) при постоянной концентрации рыбного желатина $C_{РЖ}$ = 10% представлены на Рисунке 22а, рыбного желатина и их смесей в диапазоне массовых соотношений Z = 0.02–0.10 $г_A/г_{РЖ}$ – на Рисунке 22б.



(а) (б)

Рисунок 22 – Зависимости модуля сохранения G' (закрашенные символы) и модуля потерь G'' (пустые символы) от круговой частоты ω для гидрогелей агара **(а)**, рыбного желатина и смесей агар–рыбный желатин **(б)**; $C_{РЖ}$ = 10%, γ = 0.1%, 4.00 ºС

На частотных зависимостях для всех систем сохраняется соотношение $G' < G''$ (различие около одного десятичного порядка): при выбранных условиях измерений гидрогели агара, рыбного желатина и смесей агар–рыбный желатин ведут себя как твёрдые материалы. При этом в начале исследованного диапазона частот (10^{-3}–10^{-2} рад/с) модуль сохранения имеет постоянную величину, затем участок плато сменяется постепенным ростом G'. Порядок значений обеих компонент комплексного модуля гидрогелей смесей агар–рыбный желатин при одних и тех же значениях ω выше, чем у гидрогеля рыбного желатина без добавок полисахарида, а также гидрогелей агара соответствующей концентрации. Кроме того, значения G' и G'' гидрогелей смесей неаддитивны относительно значений тех же величин для гидрогелей индивидуальных биополимеров.

Для всех исследованных систем определили величины квазиравновесного модуля на плато G'_{pl}, соответствующие постоянным значениям, принимаемым модулем сохранения при малых частотах колебаний [31–33]. Результирующие данные в форме зависимостей реологических параметров, связанных с прочностью, хрупкостью и упругостью биополимерных гидрогелей от концентрации в них агара представлены на Рисунке 23.

Сопоставляя результаты определения пределов текучести по модели Кэссона и по данным динамического механического анализа, важно отметить сходимость значений σ_Y, полученных двумя различными методами, для всех исследованных систем.

Для «чистого» агара концентрационные зависимости σ_Y и G'_{pl} являются возрастающими; γ^*, напротив, убывает по мере увеличения концентрации полисахарида C_A. Иначе говоря, более концентрированные дисперсии агара формируют при охлаждении более упругие и прочные, но и более хрупкие гидрогели с большим количеством зон соединения между двойными макромолекулярными спиралями.

Для смесей биополимеров в пределах исследованных массовых соотношений увеличение концентрации агара вплоть до C_A = 1.0% при постоянной концентрации рыбного желатина $C_{РЖ}$ = 10% сопряжено с увеличением предела текучести σ_Y (характеристика прочности гидрогелей) на 1 десятичный порядок, модуля на плато G'_{pl} (характеристика упругости) – на 2 порядка и, кроме того, уменьшением критической амплитуды их деформации γ^* (характеристика хрупкости) – также на 2 порядка. Связывая количественные характеристики с качественной оценкой поведения гидрогелей, можно сказать, что добавление агара к гидрогелям рыбного желатина увеличивает их прочность и упругость, одновременно делая и более хрупкими.

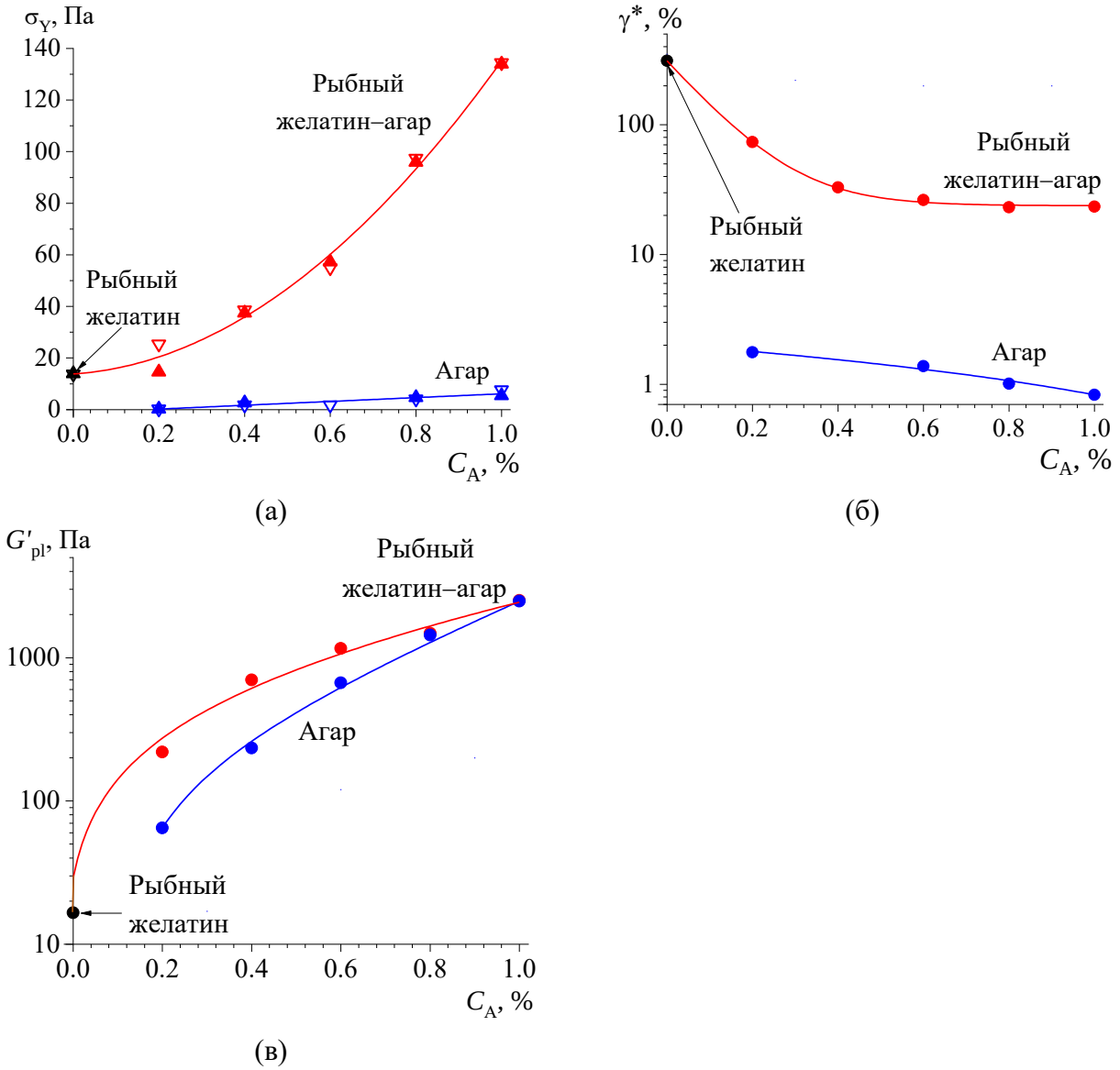


Рисунок 23 – Зависимости предела текучести σ_Y, определённого по модели Кэссона ($\sigma_{Y,C}$, закрашенные символы) и в ходе динамического механического анализа ($\sigma_{Y,\gamma}$, пустые символы) **(а)**, критической амплитуды деформации γ^* **(б)** и модуля на плато G'_{pl} **(в)** гидрогелей рыбного желатина, агара и смесей агар–рыбный желатин от концентрации агара C_A; $C_{РЖ}$ = 10%, 4.00 ºC

Состав комплекса и реологические свойства комплексных гидрогелей

Полученные экспериментальные данные показывают, что увеличение концентрации полисахарида в гидрогелях, образующихся в водных смесях агар–рыбный желатин, оказывает очевидное неаддитивное влияние на реологические характеристики гидрогеля желатина без добавок.

Наблюдаемый синергетический эффект является результатом упрочнения сетки пространственных зацеплений, формирующей каркас гидрогеля, вследствие принятия макромолекулами определённых конформационных форм и нековалентных взаимодействий – в первую очередь электростатических между протонированными аминогруппами *His, Arg* и *Lys* рыбного желатина и отрицательно заряженными сульфогруппами агара в области $pH_{nat}5.2–5.7 < pI_{РЖ}$. Полученные результаты хорошо укладываются в общую картину изменения реологических свойств желатин содержащих систем под влиянием ионных полисахаридов в условиях термодинамической совместимости, в частности, в областях pH, способствующих электростатическим взаимодействиям между ними [34–37]. Например, аналогичные закономерности (неаддитивность вклада биополимеров в смеси в результирующие параметры, взаимное усиление упруго-прочностных характеристик) в реологическом поведении наблюдались на примере систем, содержащих желатин из млекопитающих типа B с добавками к-каррагинана [38], альгината натрия [27] и хитозана [39], а также рыбный желатин с добавками альгината натрия [40] в условиях их комплексообразования – главным образом за счёт электростатических взаимодействий.

Интересно отметить, что по мере движения к верхней границе исследованного концентрационного диапазона агара наблюдается сближение концентрационных зависимостей G'_{pl} гидрогелей индивидуальных агара и смесей агар–рыбный желатин вплоть до совпадения значений G'_{pl} при концентрациях $C_A = 0.8$ и 1.0%. Такой характер изменений упругих свойств может проявляться в случаях, когда внутренняя структура гидрогеля существует в форме сплошной пространственной сетки одного биополимера – например, агара в связи с более предпочтительной в процессе гелеобразования при охлаждении агрегацией цепей полисахарида, в то время как второй биополимер (желатин) заполняет полости образовавшегося каркаса.

6. Подготовка материалов для публикаций в периодической печати по результатам выполненных исследований. Представление результатов проекта на российских и международных конференциях

По результатам выполненных исследований:

Опубликована статья в журнале, индексируемом в Web of Science и Scopus, и относящемуся к первому квартилю (Q1) по цитируемости: Svetlana R. Derkach, Nikolay G. Voron’ko, Yulia A. Kuchina, Daria S. Kolotova, Vladimir A. Grokhovsky, Alena A. Nikiforova, Igor A. Sedov, Dzhigangir A. Faizullin, Yuriy F. Zuev. Rheological Properties of Fish and Mammalian Gelatin Hydrogels as Bases for Potential Practical Formulations. Gels 2024, 10, 486. https://doi.org/10.3390/gels10080486

Подготовлена статья, которая будет опубликована в журнале, индексируемом в РИНЦ, в декабре 2024: Бордиян В.В., Воронько Н.Г., Кучина Ю.А., Колотова Д.С., Деркач С.Р. Реологические свойства гидрогелей рыбного желатина, модифицированных хитозаном. Сборник трудов XXI Международной научной конференции студентов и аспирантов

"Проблемы Арктического региона"

Представлены 3 доклада на конференциях:

IV Научная конференция «Динамические процессы в химии элементоорганических соединений» в рамках Кластера конференций по элементоорганической и супрамолекулярной химии «НАУЧНЫЕ СТРАТЕГИИ БУДУЩЕГО» (с международным участием); Казань 28 октября – 1 ноября 2024 г. Тема доклада: «Супрамолекулярные комплексы желатина с сульфатированными полисахаридами красных морских водорослей», Докладчик: Воронько Н.Г. – 1 устный доклад

XXI международная научная конференция студентов и аспирантов «ПРОБЛЕМЫ АРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА», посвященная 300-летию РАН; Мурманск, 15-16 мая 2024 года. Тема доклада: «Реологические свойства гидрогелей рыбного желатина, модифицированных хитозаном», Докладчик: Бордиян В.В. – 1 устный доклад

VI International Conference on Nutraceuticals and Food Science, (4-th International Webinar on Nutraceuticals and Food Science), November 18-19, 2024, Bangkok, Thailand. Presentation: “Hydrogels based on gelatin-polysaccharide complexes and their role in creating food products”, Speaker: Derkach S.R. – 1 устный доклад онлайн

Заключение

В результате выполненного комплексного исследования морских гидробионтов (белоксодержащего сырья) установлены технологические условия получения изолята рыбного белка (из мышечной ткани атлантической трески – отходов рыбопереработки). Проведен комплекс биохимических исследований с целью оптимизации технологических операций для получения конечного продукта с необходимыми физико-химическими и функциональными свойствами (включая растворимость при разных pH, набухаемость в воде, способность к термотропному гелеобразованию). Изолят рыбного белка является прекрасным пищевым ингредиентов, используемым для повышения биологической ценности продукта и увеличения содержания белка. Разработанные основы получения изолята рыбного белка на следующих стадиях выполнения проекта лягут в основу предложений по его использованию в качестве белкового компонента для производства обогащенных продуктов питания, а также в качестве структурообразователя при создании пищевых гелеобразных композиций.

Установлены технологические условия получения полисахарида – фукоидана из бурых водорослей. Оптимизация технологических режимов в процессе получения фукоидана позволила добиться достаточно высокого выхода конечного продукта (до 20%). Проведена идентификация полученного полисахарида методом инфракрасной спектроскопии. В дальнейшем при выполнении проекта особое внимание будет уделено повышению растворимости и определению функциональных свойств полисахарида, что создаст основу для разработки рекомендаций по использованию полисахарида, обладающего антиоксидантной активностью, в пищевых технологиях.

Выполненное комплексное исследование биополимерных систем, содержащих желатин и полисахарид, с учетом влияния pH системы, концентрации и соотношения компонентов позволяет разрабатывать научные основы формирования супрамолекулярных комплексов желатин–полисахарид. Рассматриваемых научно-обоснованный подход к закономерностям управления физико-химическими свойствами комплексов биополимеров

позволяет целенаправленно обеспечивать требуемые параметры структурообразования в процессах золь→гель перехода, а также требуемые реологические характеристики данных систем, включая гидрогели. Универсальность разработанных научных основ управления свойствами комплексов желатин–полисахарид подтверждается апробированным набором биополимеров: желатин, полученный в результате переработки соединительной ткани рыб, и сульфатированный полисахарид – агар.

Результатом проведенных исследований и создания научных основ управления свойствами супрамолекулярных комплексов желатин–полисахарид в дальнейшем (следующие этапы проекта) будут разработанные условия, закрепленные в патенте и ТИ), получения гидрогелей с заданными физико-химическими свойствами, используемых в пищевых технологиях при создании пищевых эмульсионно-наполненных структурированных продуктов.

План выполнения НИР в 2025 году

1. Изучение структурно-реологических свойств полисахарид-белковых комплексов на основе рыбных белков и полисахаридов: альгината натрия, каппа-каррагинана и хитозана.
2. Выбор оптимального состава супрамолекулярного комплекса полисахарид-белок с высокими гелеобразующими и стабилизирующими свойствами для использования в пищевой промышленности при разработке обогащенных пищевых продуктов (совместно с партнерами из КИББ КазНЦ РАН, Казань).
3. Разработка принципиальной технологической схемы получения эмульсионного и/или гелеобразного пищевого продукта с использованием комплекса полисахарид-белок в качестве стабилизатора и/или структурообразователя.
4. Подготовка материалов для заявки на получение патента.
5. Подготовка публикаций в периодической научной печати по результатам выполненных исследований.

Список использованных источников

1. Kim, S.K. Medicinal Foods from Marine Animals: Current Status and Prospects / S. K. Kim, R. Pallela // Advances in Food and Nutrition Research. – 2012. – Vol. 65. – P. 1–9.
2. Подкорытова А. В. Морские бурые водоросли-перспективный источник БАВ для медицинского, фармацевтического и пищевого применения / А.В. Подкорытова, А.Н. Рощина // Труды ВНИРО. – 2021. – Т. 186. – С. 156-172.
3. Wei, Z. Assembly of Protein−Polysaccharide Complexes for Delivery of Bioactive Ingredients: A Perspective Paper / Z. Wei, Q. Huang //. Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2019. – Vol. 67 № 5. – P. 1344 – 1352. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06063
4. Zhang, T. The development history and recent updates on soy protein-based meat alternatives / T. Zhang, W. Dou, X. Zhang [et al.] // Trends in Food Science & Technology. – 2021. – Vol.109. – P. 702– 710. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.060
5. Otero, D.M. Exploring alternative protein sources: Evidence from patents and articles focusing on food markets / D. M. Otero, G. D. R. L. Mendes, da Lucas Silva [et al.] // Food Chemistry. – 2022. – Vol. 394. – 133486. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133486

6. Deleu, L.J. The impact of alkaline conditions on storage proteins of cereals and pseudo-cereals / L.J. Deleu, M.A. Lambrecht, Van de Vondel, [et al.] // Current opinion in food science. – 2019. – Vol.25. – P. 98–103. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.017
7. Derkach, S.R. Properties of Protein Isolates from Marine Hydrobionts Obtained by Isoelectric solubilisation / precipitation: influence of temperature and processing time / S.R. Derkach, Y.A. Kuchina, D.S. Kolotova [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol.23, № 22. – 14221
8. Межгосударственный стандарт 7636 -85. Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа. – Москва: Стандартинформ, 2010.
9. Yuliana, M. Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: Influence of pH and NaCl on solubility and functional properties / M. Yuliana,C.T. Truong,L.H. Huynh, // LWT-Food Science and Technology. – 2014. – Vol. 55, – P. 621–626. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.022
10. Marmon, S.K. Protein Isolation from Gutted Herring (Clupea harengus) Using PH-Shift Processes / S.K. Marmon, I. Undeland. // Journal of agricultural and food chemistry. – 2010. – Vol. 58. – 10480–10486. https://doi.org/10.1021/jf101057q
11. Адлер, Ю.П. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий / Ю.П. Адлер, Е.В. Маркова; Ю.В. Грановский – Москва: Наука, 1976. – 280 с.
12. Скурихин И.М., Тутельян В.А. Таблицы химического состава и калорийности российских продуктов питания: справочник. − М.: ДеЛипринт, 2007. – 276 с. https://studfile.net/preview/7827539/page:31/
13. Облучинская Е. Д. Технологии лекарственных и лечебно-профилактических средств из бурых водорослей / Е.Д. Облучинская Апатиты: Изд-во КНЦ РАН. 2005. – 164 с.
14. Подкорытова А. В. Санитарно-гигиеническая характеристика бурых водорослей Белого и Баренцева морей / А.В. Подкорытова, Л.Х. Вафина, Е.А. Муравьева и др. // Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. 2009 – Т. № 4. – С. 33–39.
15. Hifney A. F. Industrial optimization of fucoidan extraction from Sargassum sp. and its potential antioxidant and emulsifying activities / A. F. Hifney, M.A. Fawzy, K.M. Abdel-Gawad [et al.] // Food hydrocolloids. – 2016. – Vol. 54. – P. 77-88.
16. Kim K. J. Fucoidan, a sulfated polysaccharide, inhibits adipogenesis through the mitogen-activated protein kinase pathway in 3T3-L1 preadipocytes / K.J. Kim, O.H. Lee, B.H. Lee // Life sciences. – 2010. – Vol. 86, №. 21-22. – P. 791-797.
17. Synytsya A. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed Undaria pinnatifida / A. Synytsya, W.J. Kim, S.M. Kim // Carbohydrate polymers. – 2010. – Vol. 81, №. 1. – P. 41-48.
18. Jiang X. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. / X. Jiang, L. Chen, W. Zhong // Carbohydrate Polymers. – 2003. – Vol. 54. – P. 457 – 463.
19. Kasaai M.R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data / M.R. Kasaai // Carbohydrate Polymers. – 2007. – Vol. 68. – P. 477–488.
20. Рабек, Я. Экспериментальные методы в химии полимеров / Я. Рабек. В 2 ч. Ч. 1. – М. : Мир, 1983. – 384 с.

21. Klenin, V. J. Thermodynamics of systems containing flexible-chain polymers / V. J. Klenin. – Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo : Elsevier, 1999. – 850 p.
22. Voron'ko, N. G. Formation of κ-carrageenan–gelatin polyelectrolyte complexes studied by 1H NMR, UV spectroscopy and kinematic viscosity measurements / N. G. Voron'ko [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2016. – Vol. 151. – P. 1152 – 1161. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.060
23. Derkach, S. R. Interactions between gelatin and sodium alginate: UV and FTIR studies / S. R. Derkach [et al.] // Journal of Dispersion Science and Technology. – 2019. – Vol. 41, № 5. – P. 690 – 698. http://doi.org/10.1080/01932691.2019.1611437
24. Moore J. Particle Light Scattering Methods and Applications / J. Moore, E. Cerasoli // Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry / J. Lindon, J. E. Tranter, D. Koppenaal (Edition). – 3-rd ed. – Elsevier, 2016. – P. 543 – 553.
25. Nishinari, K. Relation between structure and rheological/thermal properties of agar/ A mini-review on the effect of alkali treatment and the role of agaropectin / K. Nishinari, Y. Fang // Food Structure. – 2017. – Vol. 13. – P. 24 – 34. http://dx.doi.org/10.1016/j.foostr.2016.10.003
26. Roy, S. Gelatin/agar-based functional film integrated with Pickering emulsion of clove essential oil stabilized with nanocellulose for active packaging applications / S. Roy, J.-W. Rhim // Colloids and Surfaces A. – 2021. – Vol. 627. – 127220. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127220
27. Derkach, S. R. Polyelectrolyte Polysaccharide–Gelatin Complexes: Rheology and structure / S. R. Derkach [et al.] // Polymers. – 2020. – Vol. 12. – 266. http://doi.org/10.3390/polym12020266
28. Casson, N. A flow equation for pigment-oil suspensions of the printing ink type / N. Casson // Rheology of disperse systems / ed. C. C. Mill. – London : Pergamon Press, 1959. – P. 84 – 107.
29. Clark, A. H. Biopolymer Network Assembly: Measurements and Theory / A. H. Clark, S. B. Ross-Murphy // Modern Biopolymer Science / ed. S. Kasapis, I. T. Norton, J. B. Ubbink. – London : Academic Press, 2009. – P. 1 – 27.
30. Dinkgreve, M. On different ways of measuring "the" yield stress / M. Dinkgreve [et al.] // Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics. – 2016. – Vol. 238. – P. 233 – 241. https://doi.org/10.1016/j.jnnfm.2016.11.001
31. Malkin, A. Ya. Rheology. Concepts, Methods, and Applications / A. Ya. Malkin, A. I. Isayev. – 3nd ed. – Toronto : ChemTec Publishing, 2017. – 485 p.
32. Schramm, G. A Practical Approach to Rheology and Rheometry / G. Schramm. – 2nd ed. – Karlsruhe: Thermo Electron GmbH, 2004. – 259 p.
33. Mezger, T. G. The Rheology Handbook: For users of rotational and oscillatory rheometers / T. G. Mezger. – 5th rev. ed. – Hannover : Vincentz, Network, 2020. – 528 p.
34. Haug, I. Molecular interactions in, and rheological properties of, a mixed biopolymer system undergoing order/disorder transitions / I. Haug [et al] // Food Hydrocolloids. – 2003. – Vol. 14, №4. – P. 439 – 444.
35. Le, X. T. Formation and functional properties of protein–polysaccharide electrostatic hydrogels in comparison to protein or polysaccharide hydrogels / X. T. Le, L.-E. Rioux, S. L. Turgeon // Advances in Colloid and Interface Science. – 2017. – Vol. 239. – P. 127–135. https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.04.006

36. Meka, V. S. Comprehensive review on polyelectrolyte complexes / V. S. Meka [et al.] // Drug Discovery Today. – 2017. – Vol. 22. – P. 1697 – 1706. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.008
37. Sow, L. C. Nanostructural analysis and textural modification of tilapia fish gelatin affected by gellan and calcium chloride addition / L. C. Sow [et al.] // LWT – Food Science and Technology. – 2017. – Vol. 85. –P. 137 – 145.
38. Derkach, S. R. Molecular Structure and Properties of κ-Carrageenan-Gelatin Gels / S. R. Derkach, N.G. Voron'Ko, Y.A. Kuchina [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2018. – Vol. 197. – P. 66 – 74. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.063
39. Derkach, S. The rheology of hydrogels based on chitosan–gelatin (bio)polyelectrolyte complexes / S. Derkach, N. Voron'ko, N. Sokolan // Journal of Dispersion Science and Technology. – 2017. – Vol. 38, №10. – P. 1427 – 1434. http://doi.org/10.1080/01932691.2016.1250218
40. Derkach, S. R. Rheological Properties of Fish Gelatin Modified with Sodium Alginate / S. R. Derkach, D.S. Kolotova, N.G. Voron'ko [et al.] // Polymers. – 2021. – Vol. 13, №5. – 743. http://doi.org/10.3390/polym13050743

Приложение 1. Приготовление комплексных гидрогелей. Методы изучения супрамолекулярных комплексов полисахарид-белок

Приготовление комплексных гидрогелей

Гидрогели образуются при охлаждении смесей агар–рыбный желатин, при фиксированной концентрации рыбного желатина $C_{РЖ}$ = 10% в диапазоне концентраций агара $C_А$ = 0.2–1.0% и массовых соотношений биополимеров Z = 0.02–0.10 $г_А/г_{РЖ}$, а также гидрогели «чистых» биополимеров: РЖ концентрацией $C_{РЖ}$ = 10% и А с концентрацией $C_А$ = 0.2–1.0%.

Водные дисперсии смесей получали путём смешивания исходных дисперсий РЖ и А в пропорциях, соответствующих заданным концентрациям и массовым соотношениям компонентов, при 40 °С с последующим охлаждением до 23 °С. Дисперсии, полученные путём смешивания исходных дисперсий биополимеров, характеризовались диапазоном значений pH_{nat} 5.2–5.7 («естественные» значения pH) – ниже $pI_{РЖ}$. В данной области pH макромолекулы полиамфолита – желатина несут на себе положительный заряд, благоприятствующий электростатическим взаимодействиям с анионным полисахаридом – агаром.

При необходимости различные значения pH в исследуемых дисперсиях устанавливали путём добавления 0.05М раствора HCl и 0.01М раствора KOH с учётом разбавления. Различные значения ионной силы I устанавливали путём введения раствора NaCl. Эти и все другие использованные в работе неорганические вещества имели квалификацию не ниже «химически чистый».

Для получения термотропных гидрогелей водные дисперсии после смешения охлаждали до температуры, приближенной к температуре испытаний (4 °С), и выдерживали в течение 24 ч.

Методы исследования

В соответствии с классификацией методов зондирования биополимерных водных систем использованные в работе методы исследования водных дисперсий и гидрогелей биополимеров можно классифицировать следующим образом:

– молекулярный уровень исследования (10^0–10^1 нм): абсорбционная ультрафиолетовая (УФ) и инфракрасная (ИК) спектроскопия;

– макромолекулярный уровень (10^1–10^4 нм): турбидиметрия, динамическое квазиупругое лазерное светорассеяние (КУЛС);

– супрамолекулярный (надмолекулярный) уровень (>10^4 нм): 3D-реометрия в условиях сдвиговой деформации (ротационная реометрия и динамический механический анализ).

Абсорбционная УФ-спектроскопия

Взаимодействия между макромолекулами РЖ и А в объёме водной дисперсии исследовали методом УФ-спектроскопии. Спектры поглощения (зависимость оптической плотности A от длины волны λ, нм) водных дисперсий биополимеров и их смесей получали методом абсорбционной УФ-спектроскопии в диапазоне λ = 195–275 нм с точностью ±0.1 нм. Использовали спектрометр T70 UV/visible (PG Instruments Ltd., Великобритания), толщина кварцевой кюветы l = 0.01 м.

Инфракрасная Фурье спектроскопия

Для исследования межмолекулярного взаимодействия агар–рыбный желатин использовали метод ИК Фурье спектроскопии[2,3]. Получили ИК-спектры в координатах волновое число ν ($см^{-1}$) – пропускание *T* (%) и ν – поглощение *A* образцов РЖ, А и их смесей. Спектры пропускания образцов регистрировали с использованием инфракрасного спектрометра с Фурье-преобразованием ФСМ 2202 (Инфраспек, Россия) в диапазоне волновых чисел 4000–600 $см^{-1}$. Проводили 50 сканирований с разрешением 4 $см^{-1}$.

Применяли следующий протокол приготовления образца. Исследуемые образцы гидрогелей смешивали с KBr, после чего высушивали в лиофильной сушилке BK-FD10T (Biobase, Китай) при температуре –60 °С и остаточном давлении не более 1 Па в течение 8 ч. Далее смеси высушивали в вакуумном сушильном шкафу VAC-24 (Stegler, Китай) при температуре 60 °С в течение 6 ч для удаления остаточной влаги, после чего готовили таблетки с использованием гидравлического пресса. В качестве образца сравнения использовали таблетки, изготовленные из чистого KBr.

Квазиупругое лазерное светорассеяние

Размер частиц дисперсной фазы *R* (нм) водных дисперсий биополимеров и их смесей определяли с помощью метода динамического квазиупругого лазерного светорассеяния. Метод основан на определении коэффициента диффузии *D* дисперсных частиц в жидкой фазе путём анализа характерного времени флуктуаций t_c рассеянного света. Затем из коэффициента диффузии рассчитывали средний гидродинамический радиус частиц *R* [4].

Информация о коэффициенте диффузии частиц содержится в зависящей от времени τ корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света *G*(τ):

$$G(\tau) = Ae^{\frac{-2\tau}{t_c}} + B\,. \qquad (1)$$

Обратное характерное время флуктуаций в соответствии с уравнением диффузии определяется соотношением:

$$\frac{1}{t_c} = Dq^2\,, \qquad (2)$$

где флуктуация волнового вектора света *q* описывается следующим выражением:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda}\sin\frac{\theta}{2}\,, \qquad (3)$$

где *n* – показатель преломления жидкой дисперсионной среды, в которой взвешены частицы; λ – длина волны лазерного света; θ – угол рассеяния.

Константы t_c, *A*, *B* могут быть найдены путём аппроксимации измеренной корреляционной функции *G*(τ) теоретической экспоненциальной функцией (4).

Если считать форму частиц дисперсной фазы эффективной сферой, радиус частиц *R* может быть рассчитан из коэффициента диффузии *D* с использованием уравнения Стокса–Эйнштейна:

---

[2] Рабек, Я. Экспериментальные методы в химии полимеров / Я. Рабек. В 2 ч. Ч. 1. – М.: Мир, 1983. – 384 с.

[3] Сильверстейн, Р. Спектрометрическая идентификация органических соединений / Р. Сильверстейн, Ф. Вебстер, Д. Кимл. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 557 с.

[4] Moore J. Particle Light Scattering Methods and Applications / J. Moore, E. Cerasoli // Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry / J. Lindon, J. E. Tranter, D. Koppenaal (Edition). – 3-rd ed. – Elsevier, 2016. – P. 543 – 553.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad (4)$$

где k_B – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура; η – сдвиговая вязкость жидкой дисперсионной среды, в которой взвешены частицы радиуса *R*.

ζ-потенциал частиц (мВ) оценивали посредством наложения на исследуемую систему однородного электрического поля с напряженностью *E*, В/м. Наблюдающийся при этом допплеровский сдвиг частоты связан с линейной скоростью их движения u_0. ζ-потенциал рассчитывали по уравнению Гельмгольца-Смолуховского:

$$\zeta = \frac{k\eta_0 u_0}{\varepsilon\varepsilon_0 E}, \quad (5)$$

где *k* – поправка на электрофоретическое торможение, в зависимости от соотношения толщины диффузной части двойного электрического слоя на поверхности частиц и их размера $1 < k < 1.5$; η_0 – вязкость дисперсионной среды; ε – относительная диэлектрическая проницаемость дисперсионной среды (воды); ε_0 – электрическая постоянная.

Использовали анализатор размеров частиц и ζ-потенциала Photocor Complex-Z (Photocor Corp., Россия) с термостабилизированным полупроводниковым лазером с длиной волны λ = 636.8 нм и мощностью 25 мВт в качестве источника излучения. Угол светорассеяния в режиме определения *R* составлял θ = 90°, в режиме определения их ζ-потенциала – θ = 20°.

Турбидиметрия

Эффективный радиус *R* (нм) частиц дисперсной фазы в растворах биополимеров и их смесей определяли методом дисперсии светорассеяния (так называемого «спектра мутности» СМ) [7, 8] в диапазоне длин волн λ от 450 до 550 нм. Экспериментально полученные данные аппроксимировали степенными моделями Ангстрёма[5]:

$$A = K\lambda^{-N}, \quad (6)$$

где *A* – оптическая плотность (*absorbance*); *K* – константа, не зависящая от размера частиц и длины волны падающего света; *N* – волновой экспонент (функция размера частиц, не зависящая от длины волны). Коэффициент Пирсона *r* парной корреляции между λ и *A* лежал в области 0.959 – 0.999.

R частиц находили из рассчитанного по уравнению Ангстрёма (6) волнового экспонента *N*. Волновой экспонент определяется исключительно оптическими свойствами рассеивающих частиц – относительным показателем преломления и размером. По теоретическим зависимостям в соответствии с теорией Густава Ми (1908 г.) находили безразмерный параметр α (при *N* от 1.6 до 4.0) или фазовый сдвиг ρ после прохождения волны по диаметру частицы (при *N* от –0.4 до 2.2)[6].

По найденным значениям α или ρ рассчитывали *R* частиц, используя соотношения:

[5] Klenin, V. J. Thermodynamics of systems containing flexible-chain polymers / V. J. Klenin. – Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo: Elsevier, 1999. – 850 p.

[6] Кленин, В. И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем / В. И. Кленин, С. Ю. Щеголев, В. И. Лаврушин. – Саратов : Изд-во Саратовского университета, 1977. – 177 с.

$$\alpha = \frac{2\pi R}{\lambda_{ср}}, \qquad (7)$$

$$\rho = 2\alpha\left(\frac{n_2}{n_1} - 1\right) = 2\alpha\left(n - 1\right), \qquad (8)$$

где $\lambda_{ср}$ – среднее значение длины волны в выбранном диапазоне $\Delta\lambda$ (500 нм); n_1 – показатель преломления частиц дисперсной фазы; n_2 – показатель преломления дисперсионной среды; n – относительный показатель преломления частиц дисперсной фазы (1.1).

Для определения эффективного гидродинамического радиуса частиц дисперсной фазы R использовали спектрометр T70 UV/visible (PG Instruments Ltd., Великобритания) с толщиной кварцевой кюветы l = 0.01 м.

Для турбидиметрического титрования раствора рыбного желатина раствором агара использовали спектрофотометр Юнико-1200/1201 (United Products & Instruments Inc., США) с толщиной стеклянной кюветы l = 0.03 м при длине волны λ = 500 нм.

Все измерения с использованием оптических методов (абсорбционной УФ-спектроскопии, КУЛС, турбидиметрии) осуществляли при температуре 23.0±0.1°C с предварительным термостатированием образцов в течение 1 ч, поскольку было установлено, что за это время в системах достигаются равновесные значения измеряемых параметров.

Ротационная реометрия

Эффективную вязкость η (Па·с) водных дисперсий и гидрогелей биополимеров и их смесей определяли методом ротационной реометрии (вискозиметрии) в условиях сдвиговой деформации в установленном диапазоне скоростей сдвига $\dot{\gamma}$ ($с^{-1}$) при заданной температуре.

Напряжение сдвига σ (Па) определяется по закону Ньютона–Стокса:

$$\sigma = \eta\dot{\gamma}. \qquad (9)$$

По полученным экспериментальным данным были построены кривые вязкости $\eta = f(\dot{\gamma})$, а также кривые течения $\eta = f(\sigma)$ и $\sigma = f(\dot{\gamma})$.

Динамический механический анализ гидрогелей биополимеров и их смесей проводили в режиме периодического деформирования. Деформация γ изменялась во времени τ по гармоническому закону:

$$\gamma(\tau) = \gamma_0 e^{i\omega\tau}, \qquad (10)$$

где γ_0 – амплитуда гармонических колебаний деформации и ω – круговая частота ($с^{-1}$).

Реакцией исследуемой системы на периодическое изменение деформации являлось возникновение напряжения σ(Па) осциллирующего во времени τ, которое выражается следующим образом:

$$\sigma(\tau) = G_\infty\gamma(\tau) + \sigma_0 e^{i(\omega\tau+\delta)}, \qquad (11)$$

где G_∞ – остаточный модуль упругости (для жидкостей $G_\infty = 0$); σ_0 – амплитуда периодически изменяющегося напряжения, отстающего по фазе от изменения деформации на угол δ.

Основной характеристикой гармонического режима деформации является комплексный модуль упругости при сдвиге G^* (Па):

$$G^* = \frac{\sigma(\tau)}{\gamma(\tau)} = (G_\infty + G') + iG'' = (G_\infty + G^*\cos\delta) + G^*\sin\delta \qquad (12)$$

.

где G' и G''– действительная и мнимая компоненты комплексного модуля упругости G^* соответственно, иначе их называют модуль упругости (накопления, сохранения) и модуль механических потерь соответственно.

Тангенс фазового угла механических потерь tgδ выражается через отношение компонентов комплексного модуля:

$$\mathrm{tg}\delta = \frac{G''}{G'}. \qquad (13)$$

При задании изменяющегося по гармоническому закону напряжения $\sigma(\tau)$ можно следить за изменением скорости деформации $\dot{\gamma}(\tau)$. Тогда в качестве характеристики материала можно использовать комплексную динамическую вязкость η^* (Па·с)[7]:

$$\eta^* = \frac{\sigma(\tau)}{\dot{\gamma}(\tau)} = (\eta_\infty + \eta') - i\eta'' = \left(\eta_\infty + \frac{\sigma_0}{\gamma_0\omega}\sin\delta\right) - i\frac{\sigma_0}{\gamma_0\omega}\cos\delta \qquad (14)$$

.

где η' и η'' – действительная и мнимая компоненты η^* соответственно, их значения определяются выражениями:

$$\eta' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0\omega}\sin\delta = \frac{G''}{\omega}, \qquad (15)$$

$$\eta'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0\omega}\cos\delta = \frac{G'}{\omega}. \qquad (16)$$

Использовали следующие протоколы измерений:

– развёртка по амплитуде деформации γ (%) при постоянной частоте колебаний $f = 1$ Гц, связанной с круговой частотой ω соотношением $f = \omega/2\pi$: т. е. при $\omega = 6.28$ рад/с;

– развёртка по круговой частоте ω при постоянной амплитуде $\gamma = 0.1\%$.

Для реологических измерений использовали модульный компактный реометр Physica MCR302 (Anton Paar GmbH, Австрия), оснащённый системой воспринимающих элементов «конус–плоскость» (диаметр плоскости 50 мм, угол между конусом и плоскостью 1°). Температуру измерений (4.00±0.03) ºС поддерживали постоянной при помощи элемента Пельтье P-PTD200/GL. Перед началом измерений приготовленные образцы выдерживали в течение определённого времени, необходимого для формирования структуры, при температуре опыта в закрытых сосудах (для предотвращения испарения воды). Все измерения в работе были выполнены по меньшей мере в троекратной

[7] Malkin, A. Ya. Rheology. Concepts, Methods, and Applications / A. Ya. Malkin, A. I. Isayev. – 3nd ed. – Toronto : ChemTec Publishing, 2017. – 485 p.

повторности; расхождение между представленными результатами измерений не превышало 10%.

Инфракрасная Фурье спектроскопия

Для исследования межмолекулярного взаимодействия агар–рыбный желатин использовали метод ИК Фурье спектроскопии. Получили ИК-спектры в координатах волновое число ν ($см^{-1}$) – пропускание *T* (%) образцов РЖ, А и их смесей. Спектры пропускания образцов регистрировали с использованием инфракрасного спектрометра с Фурье-преобразованием ФСМ 2202 (Инфраспек, Россия) в диапазоне волновых чисел 4000–600 $см^{-1}$. Проводили 50 сканирований с разрешением 4 $см^{-1}$.

Применяли следующий протокол приготовления образца. Исследуемые образцы гидрогелей смешивали с KBr, после чего высушивали в лиофильной сушилке BK-FD10T (Biobase, Китай) при температуре –60 °C и остаточном давлении не более 1 Па в течение 8 ч. Далее смеси высушивали в вакуумном сушильном шкафу VAC-24 (Stegler, Китай) при температуре 60 °C в течение 6 ч для удаления остаточной влаги, после чего готовили таблетки с использованием гидравлического пресса. В качестве образца сравнения использовали таблетки, изготовленные из чистого KBr.