

МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХИТОЗАНА С БЕЛКАМИ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

В.П. Курченко, Л.Р. Алиева*, Т.В. Буткевич, Н.В. Гавриленко

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

**Северо-Кавказский государственный технический университет, Ставрополь, РФ*

e-mail: kurchenko@tut.by

Молочная промышленность развивается по пути увеличения доли производства сыра и творога. В связи с этим увеличивается и объем получаемой молочной сыворотки. По данным Международной молочной ассоциации объем сыворотки, получаемой в мире как побочного продукта переработки, достиг 140 млн. т/год. В настоящее время Республика Беларусь занимает 5 место в мире по экспорту молочной продукции, основную долю которой составляют сыры. Увеличение его производства приводит к росту количества сыворотки, остающейся в пределах республики. Дальнейшее ее использование составляет незначительную часть [1]. Потери и сброс сыворотки в отходы ведут к снижению эффективности переработки молока, а также наносят экономический и экологический ущерб. Таким образом, проблема утилизации отходов переработки молока неразрывно связана с проблемой охраны окружающей среды.

Актуальной задачей является разработка технологий полного и рационального использования молочной сыворотки, которая обладает высокой пищевой и биологической ценностью, содержит около 50% сухих веществ молока. Важным компонентом молочной сыворотки являются белки, которые оптимально сбалансированы по аминокислотному составу [2]. Анализ подходов глубокой переработки молочной сыворотки показал, что наиболее перспективные технологии основаны на выделении белка с использованием анионных и катионных полисахаридов [3].

В связи с этим большой теоретический и практический интерес представляют физико-химические явления и закономерности взаимодействия белков с анионными и катионными полисахаридами. Такие процессы должны быть пригодны для переработки различных белков, т.е. быть «универсальными» и одновременно должны отличаться простотой и технологичностью. К общим для белков физико-химическим явлениям относятся неравновесное комплексообразование белков сыворотки с анионными и катионными полисахаридами, образование анизотропных гелей из двухфазных систем, концентрирование растворов белков при установлении фазового равновесия между растворами белков и полисахаридов и др. [4].

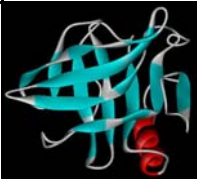

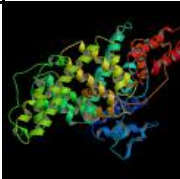
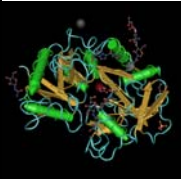
Необходимо отметить, что в современных технологиях переработки молочной сыворотки широко используется метод обогащения традиционных пищевых продуктов пищевыми волокнами. Данный подход находится в рамках концепции о функциональном питании, которая предусматривает разработку и выпуск продукции, обладающей не только высокой питательной ценностью, но и являющейся полезной для здоровья человека. В связи с этим широкое применение в молочной промышленности нашли пищевые добавки полисахаридной природы, которые используются в качестве загустителей и гелеобразователей. Они классифицируются в зависимости от источника происхождения, строения полимерной цепи, природы мономерных остатков, заряда. В зависимости от заряда полисахариды подразделяются на: нейтральные – производные целлюлозы, амилопектины, галактоманнаны; анионные (кислотные) – альгинаты, каррагинаны, пектины, ксантаны, камеди карайи, гхатти и трагаканта, гуммиарабик, фурцеллеран, геллановая камедь; катионные (основные) – хитозан [5].

В последние годы ведутся интенсивные исследования по оценке возможности использования хитозана в области производства продуктов питания. Хитозан является безвредной для здоровья пищевой добавкой [6]. Он обладает рядом уникальных химических,

физических и биологических свойств, что обуславливает его применение при производстве различных молочных продуктов [7, 8, 10]. Важным свойством этого полисахарида является его способность взаимодействовать с белками, образовывать эмульсии, гели, выступать в качестве стабилизатора и антиоксиданта [3].

Механизм комплексообразования белков сыворотки молока с хитозаном определяется физико-химическими свойствами этих биополимеров. Основными сывороточными белками являются α -лактоальбумин, β -лактоглобулин, бычий сывороточный альбумин (БСА), лактоферрин, которые обладают рядом свойств. Среди белков сыворотки наибольшее количество приходится на β -лактоглобулин. Поскольку β -лактоглобулин устойчив к протеолизу, то он способен вызывать аллергические реакции у детей раннего возраста, потребляющих коровье молоко. Вторым в количественном отношении белком сыворотки является α -лактоальбумин. В организме этот белок выступает в качестве кофактора при биосинтезе лактозы, важного источника энергии для новорожденных. Бычий сывороточный альбумин, благодаря особенностям строения, в сыворотке связывается со свободными жирными кислотами, липидами и многими другими гидрофобными соединениями. Лактоферрин выполняет несколько функций: обладает сильным антибиотическим действием против широкого спектра бактерий, грибов, вирусов и паразитов, противовоспалительной и противораковой активностью, а также играет существенную роль в регуляции гомеостаза ионов железа. Физико-химические свойства основных белков сыворотки молока представлены в таблице 1 [2].

Таблица 1 – Физико-химические свойства основных сывороточных белков молока

Белки молочной сыворотки	β -лактоглобулин	α -лактальбумин	бычий сывороточный альбумин	лактоферрин
% от общего белка молочной сыворотки	65	20	7	4
изоэлектрическая точка (pI)	4,9–5,4	4,6	4,8	8,0–8,8
Молекулярная масса, кДа	18,3	14,2	66	~80
Количество аминокислот	178	142	607	708
Вторичная структура Наличие -S-S- -SH	43% β -слои, 10% α -спирали, 2 -S-S-, 1 -SH	2 β -слоя и петлеподобные цепи, 4 -S-S-	α -спирали, 17-S-S-, 1 -SH	α -спирали
Количество дикарбоновых аминокислот	27	20	99	76
Третичная структура				

Свойства представленные в таблице 1 определяют способность белков взаимодействовать с различными полисахаридами, в том числе и с хитозаном. По химическому строению он представляет собой полисахарид с неразветвленной цепью β -1-4 соединенных 2-амино-2-дезоксид- D -глюкозных остатков (рисунок 1).

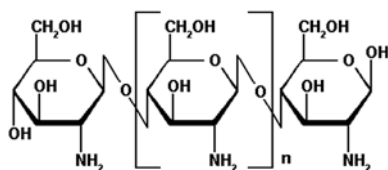


Рисунок 1 – Фрагмент хитозана

Хитозан – это катионный водорастворимый полиэлектролит у которого при значениях pH ниже $pK_a < 6,5$ аминогруппы протонизированы [3].

Благодаря своей химической природе он способен к различным видам взаимодействия, с образованием 4 основных типов связей: ионных, водородных, гидрофобных, связей по типу комплексообразования, в котором хитозан выступает в роли ядра комплекса.

Ионные взаимодействия происходят за счет аминной группы. Поликатионный характер данного полисахарида открывает широкие перспективы его использования. Поэтому, когда хитозан в катионной форме добавляется к молочной сыворотке в зависимости от его концентрации может происходить либо флокуляция, либо стабилизация частиц в водной среде.

На основании вышеописанных свойств белков сыворотки молока и хитозана была выдвинута рабочая гипотеза, в основе которой лежит предположение о том, что разделение молочного сырья на белковую и безбелковую фракции возможно путем введения коллоидного раствора хитозана в качестве активного комплексообразователя с белками молочной сыворотки. При исследовании условий образования комплексов хитозана с белками сыворотки молока были изучены зависимости их взаимодействия от концентраций хитозана имеющих различные молекулярные массы, pH, ионной силы, температуры и других факторов.

Изучение процесса взаимодействия хитозана с белками молочной сыворотки проводили путем добавления раствора хитозана к 1% раствору деминерализованной сыворотки при pH 6,2. Хитозан, связываясь с белками, образовывал нерастворимый белково-полисахаридный комплекс, при этом в течение 30 мин происходило увеличение оптической плотности при λ 580 нм. С целью отделения образовавшихся нерастворимых частиц, раствор сывороточных белков, смешанный с хитозаном, был подвергнут центрифугированию в течение 10 мин при 9000 г. Проводился электрофоретический анализ белков сыворотки молока, входящих в состав нерастворимого комплекса с полисахаридом [7, 8].

Результаты исследований показали, что основными белками, связанными с хитозаном, являются β -лактоглобулин, α -лактальбумин, БСА. Лактоферрин и некоторые минорные белки участия в образовании комплекса не принимают. Было установлено количество полисахарида, необходимого для наиболее полного извлечения основных белков из сыворотки молока. Для этого хитозан с молекулярной массой 200 кДа добавляли к раствору сывороточных белков при pH 6,2, после чего был проведен электрофоретический анализ осадка.

Полученные данные свидетельствуют о том, что максимальное связывание β -лактоглобулина и других сывороточных белков с хитозаном наблюдается при содержании полисахарида в реакционной среде 0,5 мг/мл. При этом в осадок переводится более 90% белка сыворотки. Из нее удаляется 100% β -лактоглобулина, 20% α -лактальбумина и 10% БСА. При последующем увеличении содержания хитозана в растворе количество образовавшегося осадка значительно снижается (рисунок 2).

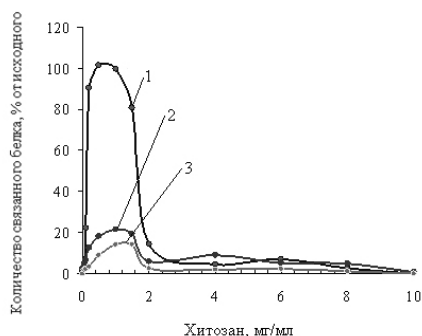


Рисунок 2 – Зависимость относительного содержания сывороточных белков в осадке от содержания хитозана в сыворотке молока [7]

Таким образом, хитозан взаимодействует с сывороточными белками при pH выше их изоэлектрических точек, образуя нерастворимый комплекс (таблица 1). Взаимодействие двух биополимеров: «молочный белок – хитозан» происходит под воздействием разноименных зарядов в этой области pH при определенном соотношении реагентов. В системе наблюдается явление полной коацервации, т.е. распада на две фазы, в одной из которых сосредоточены коацерваты хитозана и белков сыворотки молока, представляющие комплекс «белок+хитозан». Вторая фаза системы – равновесная жидкость содержащая: лактозу, остатки сывороточных белков и др.

На молекулярном уровне процесс образования электростатических комплексов можно рассматривать как последовательное присоединение лигандов – макроионов белков сыворотки молока к ядру комплекса – макроиону хитозана. Белок можно считать лигандом на том основании, что в комплексе на один макроион полисахарида может приходиться большое число меньших по размеру макроионов белка. Заряд полиионитного комплекса снижается по мере присоединения каждого последующего лиганда. В итоге происходит образование электронейтрального комплекса хитозана с белками сыворотки. Агрегация электронейтральных комплексов приводит к их выделению в виде концентрированной фазы комплексного коацервата. Состав фазы комплексного коацервата определяется стехиометрией нерастворимого электронейтрального комплекса и зависит от соотношения зарядов белков сыворотки молока. Агрегация частиц комплекса, по-видимому, обусловлена их гидрофобным взаимодействием и образованием водородных связей. Нерастворимые комплексы глобулярных белков сыворотки молока с хитозаном содержат относительный избыток белка.

В случае, когда количество хитозана в 1% растворе сывороточных белков превышает 3 мг/мл, нерастворимый хитозан-белковый комплекс не образуется. При избытке полисахарида не все функциональные группы хитозана участвуют в процессе взаимодействия с белками, поэтому такой комплекс теряет способность к седиментации. Водорастворимые комплексы глобулярных белков с хитозаном далеки от насыщения белком и представлены равновесной жидкостью. Образование комплексов сывороточных белков с хитозаном может сопровождаться изменением их вторичной структуры. На связывание белков сыворотки молока с хитозаном могут оказать влияние ряд факторов.

Одним из таких факторов является молекулярная масса хитозана, в зависимости от которой может изменяться эффективность образования нерастворимого хитозан-белкового комплекса. Установлено, что, независимо от молекулярной массы используемого хитозана, наиболее полное выделение β -лактоглобулина происходит, когда содержание полисахарида в реакционной смеси составляла 0,5 мг/мл.

Эффективность образования нерастворимого комплекса хитозан- β -лактоглобулин увеличивается с ростом молекулярной массы хитозана от 15 до 200 кДа [7]. Это объясняется тем, что в случае использования хитозана с большей молекулярной массой, способность к седиментации образующегося комплекса выше за счет формирования агрегатов большего размера, нежели при использовании низкомолекулярного полисахарида. Таким образом, высокомолекулярный хитозан наиболее эффективно связывает β -лактоглобулин и другие белки сыворотки молока. Несмотря на это, применение хитозана с молекулярной массой выше 200 кДа затруднено, т.к. с ростом молекулярной массы его растворимость при pH 6,2 уменьшается (рисунок 3).

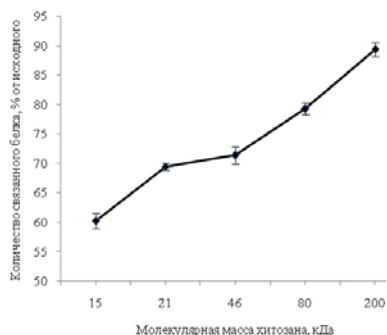


Рисунок 3 – Эффективность связывания β -лактоглобулина в зависимости от молекулярной массы используемого хитозана [7]

Фактор pH имеет большое значение для реализации многих межмолекулярных взаимодействий, поскольку влияет на ионизацию некоторых функциональных групп полимерных соединений. Изучение процесса взаимодействия хитозана с молекулярной массой 200 кДа, СД 86% и β -лактоглобулина проводили в диапазоне pH от 5,2 до 6,2, что связано с низкой растворимостью полисахарида в нейтральных и щелочных средах. Результаты эксперимента представлены на рисунке 4.

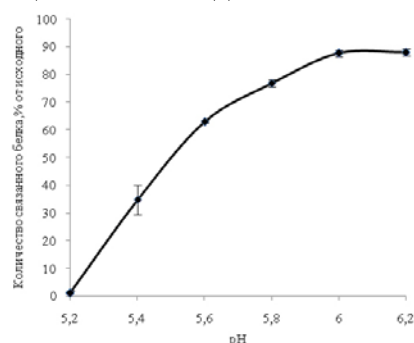


Рисунок 4 – Влияние pH среды на эффективность связывания β -лактоглобулина хитозаном [7, 8]

При pH 5,2 не происходит образование осадка, указывающего на формирование комплекса между белком и хитозаном. Наиболее эффективно образование комплекса протекает при pH 6,2. Последнее значение близко к pH подсырной сыворотки, получаемой путем ферментативной обработки коровьего молока. Следует отметить, что в изученном диапазоне pH хитозан находится в протонированной форме ($pK_a=6,5$) [10]. При pH 5,2 β -лактоглобулин не взаимодействует с хитозаном так как такое значение pH близко к изоэлектрической точке белка. С увеличением pH выше изоэлектрической точки белок приобретает отрицательный заряд, что способствует эффективному взаимодействию с хитозаном [11]. Полученные данные свидетельствуют о важной роли ионогенных групп во взаимодействии β -лактоглобулина с хитозаном. Кроме того, они указывают на невозможность выделения белка из «кислой сыворотки», полученной путем изоэлектрической коагуляции казеинов. Однако, несмотря на важную роль электростатических взаимодействий, нельзя исключать существование других типов связей, возникающих при образовании белково-полисахаридного комплекса.

Участие ионогенных групп в формировании нерастворимого комплекса хитозан- β -лактоглобулин можно подтвердить, путем изменения ионной силы раствора. Для этого реакцию проводили в буфере MES-NaOH при pH 6,2 с концентрацией соли от 0,01 М до 0,2 М.

Установлено, что лучше всего хитозан связывается с белком, когда ионная сила раствора минимальна, в то время как при концентрации NaCl 0,2 М взаимодействия не происходит (рисунок 5). Полученные данные подтверждают электростатическое взаимодействие в образовании нерастворимого комплекса между хитозаном и β -лактоглобулином.

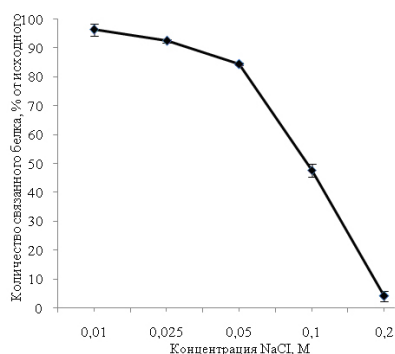


Рисунок 5 – Влияние ионной силы раствора на процесс образования нерастворимого хитозан-белкового комплекса [7, 8]

Молочная сыворотка содержит в своем составе ионы различных металлов, в том числе кальций, который является одним из основных минеральных компонентов сыворотки. Исследовано влияние концентрации ионов кальция в деминерализованной молочной сыворотке на образование нерастворимого комплекса белков с хитозаном (рисунок 6).

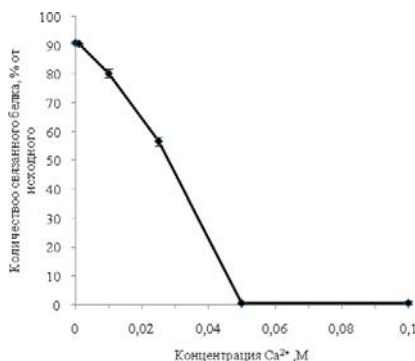


Рисунок 6 – Влияние концентрации ионов кальция на процесс образования нерастворимого хитозан-белкового комплекса [7, 8]

При достижении концентрации ионов кальция 0,05 М практически прекращается образование нерастворимого комплекса.

Таким образом, использование раствора хитозана в оптимальных условиях позволяет выделять 90% белка из деминерализованной молочной сыворотки. Полученный белок, после удаления хитозана, возможно использовать в пищевых и других целях. Кроме того, комплекс

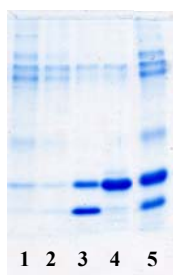
хитозана с белками сыворотки молока может быть использован в качестве корма для рыб и других животных.

Полученные закономерности взаимодействия белков сыворотки молока с раствором хитозана создали предпосылки разработки сорбента на основе этого полисахарида. Такой сорбент должен был обладать высокой сорбционной емкостью белков сыворотки молока и отличаться возможностью использования в колоночной хроматографии. Для этого была разработана технология получения криогелей хитозана [9].

Наличие реакционноспособной аминогруппы в ангидропиранозном мономерном звене хитозана позволяет использовать этот биополимер для получения ковалентно сшитых гидрогелей, способных удерживать до 10000% воды [3, 9]. Известно, что процессы гелеобразования в системах растворитель – полимер – сшивающий агент возможны не только при положительных значениях температуры, но и в неглубоко замороженной среде вплоть до нескольких десятков градусов ниже точки кристаллизации чистого растворителя. В таких условиях замороженный препарат, хотя и выглядит как макроскопически твердое тело, на микроскопическом уровне гетерогенен, поскольку состоит из поликристаллов вымороженного растворителя и так называемой незамерзшей жидкой микрофазы. В этой микрофазе концентрируются компоненты исходного раствора и продукты реакции, т.е. химические процессы, протекающие в ней, по своей природе являются жидкофазными. Благодаря эффектам такого криоконцентрирования наблюдается кажущееся снижение критической концентрации гелеобразования, когда полимерный гель, так называемый криогель [11], может сформироваться при существенно меньших исходных концентрациях предшественников, чем при температуре выше точки замерзания системы.

На основе этих представлений был синтезирован криогель хитозана. Его получали с использованием высокомолекулярного хитозана при соотношении амминные группы хитозана / альдегидные группы глутарового диальдегида 5 / 1 по ранее описанной методике [9, 10]. Выход гель-фракции хитозана составил 95%, а скорость протекания воды через колонку достигала 150 мл/ч. Для выделения белков через колонку с криогелем пропускали молочную сыворотку, после чего сорбент промывали дистиллированной водой и элюировали связавшиеся с криогелем белки с использованием различных приемов: изменением ионной силы раствора и градиентами ионов кальция или pH.

На рисунке 7 представлена электрофореграмма белков сыворотки молока элюированных с криогелей хитозана растворами с различными концентрациями NaCl.



1. Концентрат сывороточных белков после хроматографии
2. Элюция 0,05 М NaCl
3. Элюция 0,1 М NaCl
4. Элюция 0,5 М NaCl
5. Концентрат сывороточных белков (контроль)

Рисунок 7 – Электрофореграмма белков сыворотки, элюированных с криогелей хитозана

Выход белка составил 80%. Фракции белков сыворотки молока не связавшихся с криогелем хитозана содержала минорные белки, каппа казеин и следы β-лактоглобулина. При элюировании с криогеля белков сыворотки молока градиентом кальция 0,05–0,5 М β-лактоглобулин выделялся при концентрациях хлористого кальция 0,18 М с выходом 85% (рисунок 8).



1. Белки после обработки криогелями хитозана
2. Белки после обработки криогелями хитозана
3. Элюция градиентом 0,5 М CaCl₂
4. Элюция градиентом 0,5 М CaCl₂

Рисунок 8 – Электрофореграмма белков, элюированных с криогелей хитозана градиентом CaCl₂

Использование для элюции белков сыворотки молока градиента рН позволило выделить основные белки сыворотки с выходом 90%.

Полученная, с использованием криотехнологий [9], губчатая форма хитозана имела степень набухания геля – 250,5% и удерживала до 3000% сыворотки. Использование криогелей хитозана в качестве сорбента для выделения белков из молочной сыворотки методом колоночной хроматографии позволяет вести хроматографический процесс с высокой скоростью, достигающей 200 мл/час. При этом сорбент проявлял большую емкость по белку.

Таким образом, использование хитозана в предлагаемых методах позволяет выделить β-лактоглобулин из молочной сыворотки с выходом белка 75–85% и чистотой 80–95%. При разработке технологии получения β-лактоглобулинов с использованием хитозана необходимо определить наиболее рациональную форму его использования [10].

Выводы

В растворе сывороточных белков хитозан связывает β-лактоглобулин и другие белки, образуя при этом нерастворимый комплекс. Показано, что основной вклад в процесс формирования нерастворимого комплекса хитозан-белки вносят силы электростатического взаимодействия. Применение криогелей хитозана при переработке молочной сыворотки дает возможность выделить из нее до 90% белка.

Необходимо отметить, что комплексообразование белков с хитозаном как метод регулирования функциональных свойств белка имеет большое практическое значение [4, 7, 8]. Образование комплексов белков молока с хитозаном может сопровождаться как изменением баланса сил, определяющих характер внутри- и межмолекулярных взаимодействий белковых глобул, так и образованием частиц комплексов, различающихся по размерам, форме, заряду, степени гидратации и т.д. Отсюда следуют широкие возможности регулирования функциональных свойств белка при его комплексообразовании с катионными полисахаридами [12]. Полученные нерастворимые комплексы можно использовать для получения пищевых продуктов непосредственно или же после регулирования их функциональных свойств, путем изменения рН, ионной силы, а также нагревания раствора или суспензии комплексов.

Список литературы

1. Храмцов, А.Г. Промышленная переработка вторичного молочного сырья / А.Г. Храмцов, К.К. Полянский, С.В. Василисин, П.Г. Нестеренко. – Воронеж: Изд-во ВГУ. – 1986. – 159 с.
2. Головач, Т.Н. Аллергенность белков молока и пути ее снижения / Т.Н. Головач, В.П. Курченко // Труды БГУ. Сер.: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2010. – Т.5, ч.1. – С.9–55.
3. Варламов, В.П. Хитин и хитозан: природа, получение и применение / В.П. Варламов, С.В. Немцев, В.Е. Тихонов. – Щелково: Изд-во Российского Хитинового Общества, 2010. – 292 с.
4. Толстогузов, В.Б. Новые формы белковой пищи (Технологические проблемы и перспективы производства) / В.Б. Толстогузов. – Москва: Агропромиздат, 1987. – 303 с.
5. Нечаев, А.П. Пищевые добавки / А.П. Нечаев, А.А. Кочеткова, А.Н. Зайцев. – Москва: Колос, Колос-Пресс, 2002. – 256 с.
6. Технический регламент Таможенного союза / Решение Совета Евразийской экономической комиссии №58 от 20 июля 2012.
7. Использование хитозана для выделения β-лактоглобулина из смеси белков молочной сыворотки / А.В. Бакулин [и др.] // Биотехнология. – 2011. – №1. – С. 34–41.
8. Удаление β-лактоглобулина из молочной сыворотки с помощью хитозана / А.В. Бакулин [и др.] // Молочная промышленность. – 2012. – № 11. – С. 62–64.
9. Синтез и свойства криогелей хитозана сшитого глутаровым альдегидом / В.В. Никоноров [и др.] // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2010. – Т. 52, №8. – С.1436–1443.