

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ С ХИТОЗАНОМ

А.В. Бакулин¹, Н.В. Гавриленко², Е. М. Червяковский², В.П. Курченко²

¹Центр «Биоинженерия РАН», Москва, РФ

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Введение

В результате переработки коровьего молока получают ряд ценных пищевых продуктов, одним из которых является молочная сыворотка. Сыворотка содержит растворенные белки, лактозу, витамины и минеральные элементы [1]. На протяжении многих лет сывороточные белки являлись объектом интенсивных исследований, в результате которых было установлено их физико-химические свойства, строение и некоторые биологические активности [2, 3].

Среди всех белков сыворотки наибольшее количество приходится на β -лактоглобулин. Его содержание колеблется в районе 58% (в/в). По своей структуре β -лактоглобулин – глобулярный белок, состоящий из 162 аминокислотных остатков. В молоке коров данный белок присутствует в виде двух изоформ, отличающихся по своим физико-химическим свойствам. Биологическая функция β -лактоглобулина до сих пор однозначно не установлена. Полагают, что данный белок участвует в регуляции обмена фосфора в молочной железе [4]. Поскольку β -лактоглобулин устойчив к протеолитическому воздействию, то он способен вызывать аллергические реакции у детей раннего возраста, потребляющих коровье молоко в том или ином виде [5].

Вторым в количественном отношении белком сыворотки является α -лактоальбумин (20% (в/в)). Он также имеет глобулярную структуру, стабилизированную четырьмя дисульфидными связями, и состоит из 123 аминокислотных остатков. В организме α -лактоальбумин выступает в качестве кофактора при биосинтезе лактозы, важного источника энергии для новорожденных. Среди других известных биологических активностей следует отметить антипролиферативное действие α -лактоальбумина в культурах клеток млекопитающих [6]. Употребление данного белка в пищу при заторможенности, вызванной хроническими стрессовыми реакциями, приводит к нормализации процессов умственной деятельности [7].

Бычий сывороточный альбумин состоит из 582 аминокислотных остатков и несет 17 внутримолекулярных дисульфидных мостиков. Благодаря своему размеру и особенностям строения БСА связывается со свободными жирными кислотами, липидами и многими другими гидрофобными соединениями. Данный белок подавляет рост раковых клеток молочной железы, путем изменения активности аутокринных регуляторных факторов, а также предохраняет связанные с ним липиды от окислительной модификации [8, 9].

Поскольку сывороточные белки обладают ценными биологическими качествами, их выделение и очистка представляется весьма актуальной задачей. Для ее достижения, как правило, используют разнообразные хроматографические методы и методы ультрафильтрации, что позволяет получить белковые препараты с высокой степенью чистоты. Однако процесс хроматографии, как правило, требует больших временных затрат и наличия специального оборудования. Более простыми являются методы селективного осаждения индивидуальных белков с использованием специфических реагентов. К подобным реагентам относится хитозан и его различные производные. Данное вещество представляет собой природный полисахарид, получаемый в результате N-деацетилирования хитина. Благодаря своему полимерному строению, наличию большого числа свободных гидроксильных и аминогрупп хитозан эффективно связывает различные органические и неорганические соединения [10].

В виду того, что сывороточные белки отличаются по своему строению и свойствам, они могут обладать различным сродством к хитозану. Исходя из этого, целью данной работы было исследование эффективности связывания хитозана с различными сывороточными белками, что позволит разработать новые подходы к их выделению и очистке.

Методы исследования

В работе использовали: концентрат сывороточных белков, полученный методом ультрафильтрации (КСБ-УФ-70, ОАО «Щучинский маслосырзавод», ТУ РБ 100377914.550-2008) с массовой долей белка 72,8%; бычий сывороточный альбумин (БСА), β -лактоглобулин (ЛГ), α -лактоальбумин (ЛА) («Sigma», США). Образцы хитозана различной молекулярной массы со степенью дезацетилирования (СД) 86% получали в результате ферментативного гидролиза высокомолекулярного хитозана 200 кДа, СД 86% («Нерре», Германия) ферментным препаратом Целловиридин Г20х [11].

Для изучения взаимодействия хитозана с белками молочной сыворотки использовали 2% раствор КСБ в 0,1 М буфере MES-NaOH pH 6,2, в который вносили различные количества хитозана в том же буфере (0,05–10 мг). Конечный объем реакционной смеси составлял 1,2 мл. Смесь инкубировали в течение 2 часов при температуре 30°C, а затем центрифугировали 10 мин при 9000 g. Супернатант отделяли и сохраняли. Осадок ресуспендировали в 0,3 М ацетате натрия и центрифугировали 10 мин при 9000 g.

Полученные образцы белков анализировали с использованием неденатурирующего электрофореза в 10% полиакриламидном геле pH 8,8, pH электродного буфера – 8,3 [12]. Количественную обработку электрофореграмм проводили с использованием специализированного программного обеспечения ImageQuant 5.1. Степень связывания сывороточных протеинов оценивали по убыли интенсивности окраски отдельных электрофоретических полос. Концентрацию белка измеряли методом Лоури [13]. Соответствие электрофоретических полос индивидуальным протеинам подтверждали с использованием стандартных белковых препаратов фирмы «Sigma».

Скорость образования нерастворимого комплекса белок-хитозан регистрировали по нарастанию мутности в кювете с использованием спектрофотометра СФ-106 и Shimadzu 1601PC при длине волны 580 нм.

Результаты и обсуждение

Одним из основных методов исследования белкового состава молочной сыворотки является электрофорез в полиакриламидном геле. Его использование позволяет разделить белковые соединения за счет разницы в их зарядах и молекулярных массах. Результат электрофоретического анализа β -лактоглобулина представлен на рисунке 1, дорожка 12. Оказалось, что данный белок обладает наибольшей подвижностью в условиях неденатурирующего электрофореза. Поскольку β -лактоглобулин существует в двух вариантах, различающихся по физико-химическим свойствам, то на электрофорезе он выявляется в виде двух отдельных полос (рисунок 1, дорожки 1 и 12). Лактальбумин и бычий сывороточный альбумин обладают более низкой электрофоретической подвижностью по сравнению с лактоглобулином и присутствуют на электрофореграммах в виде одиночных полос (Рисунок 1, дорожки 1 и 11).

Добавление хитозана в концентрации 0,5 мг/мл к раствору сывороточных белков в 0,05М MES-NaOH буфер pH, 6,2, приводит к образованию хорошо заметного осадка белого цвета. Этот факт может объясняться связыванием одного или нескольких сывороточных белков с полисахаридом, что ведет к образованию нерастворимого комплекса. Электрофоретический анализ сыворотки, полученной после отделения нерастворимых веществ, подтвердил данное предположение. Было обнаружено, что по сравнению с контрольным образцом, сыворотка, обработанная хитозаном (0-4 мг), содержала меньшие количества β -лактоглобулина (рисунок 1). Количество α -лактальбумина и бычьего сывороточного альбумина осталось практически неизменным.

Следует отметить еще один интересный факт. При внесении хитозана в сыворотку количестве более 1 мг наблюдается обратный процесс растворения осадка. Этот феномен

достаточно трудно объяснить, опираясь только на данные электрофореза. Вероятно, нерастворимый комплекс образуется только при строго определенном соотношении белок-хитозан.

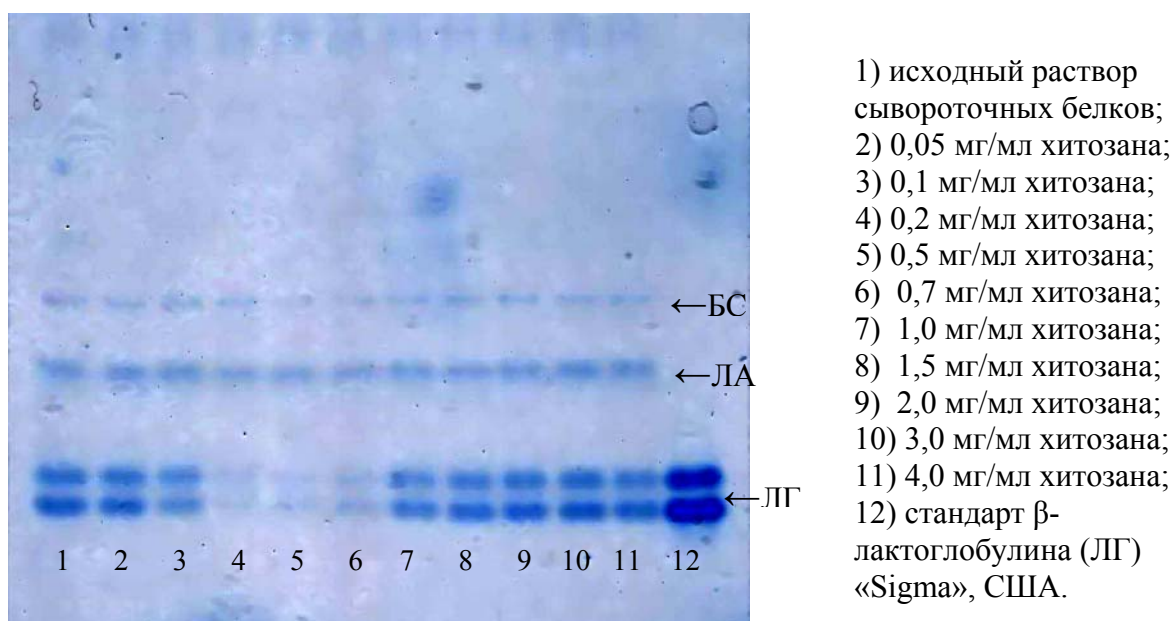


Рисунок 1 – Электрофореграмма раствора сывороточных белков после его обработки хитозаном

Для подтверждения факта избирательного связывания β -лактоглобулина хитозаном проводился электрофоретический анализ осадка, образовавшегося в результате взаимодействия полисахарида с белковыми компонентами молочной сыворотки. Результаты анализа представлены на рисунке 2.

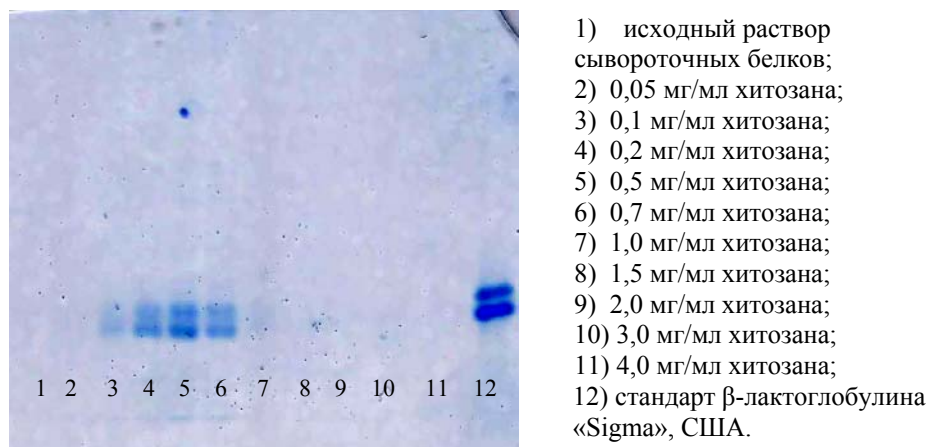


Рисунок 2 – Электрофореграмма белков, извлеченных из комплекса с хитозаном

Из полученных данных следует, что основным белком связанным с полисахаридом является β -лактоглобулин, остальные белки присутствуют в относительно небольших количествах. Денситометрическая характеристика белковых полос с использованием цифровой техники позволила установить зависимость связывания основных белков сыворотки от количества хитозана, внесенного в реакцию смесь (рисунок 3). Видно, что максимальное связывание β -лактоглобулина (50% от общего количества) с хитозаном наблюдается при содержании полисахарида в реакционной среде от 0,2 до 1 мг/мл.

При последующем увеличении содержания хитозана количество связанного белка падает. Аналогичная картина имеет место и для α -лактальбумина, однако, данный компонент связывается с хитозаном значительно хуже, чем β -лактоглобулин (24%).

Проведение теоретических расчетов показало, что оптимальное связывание протеинов молочной сыворотки с пищевым низкомолекулярным хитозаном происходит,

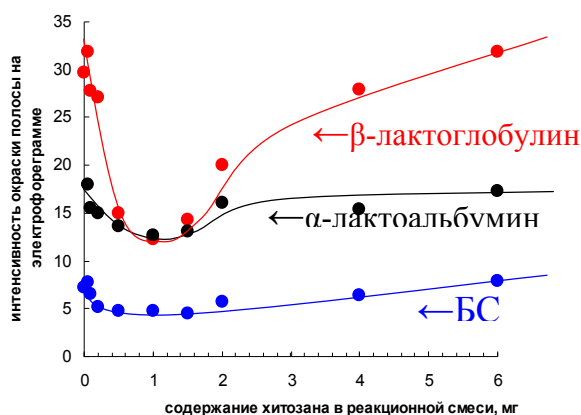


Рисунок 3 – Зависимость относительного содержания сывороточных белков в супернатантах от содержания хитозана в реакционной смеси.

когда соотношение общий белок : полисахарид составляет 19 : 1.

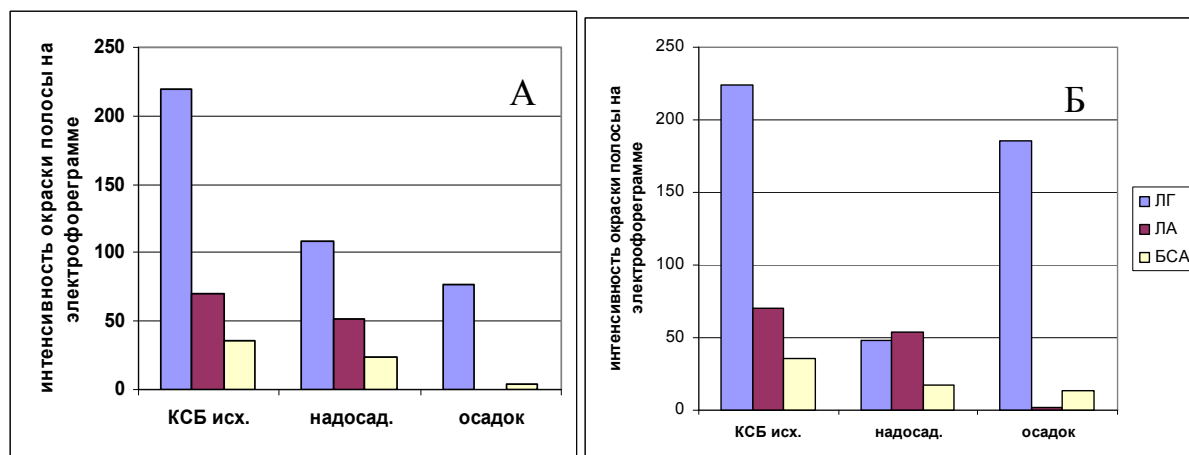
Таким образом, использование хитозана позволяет добиться селективного удаления β -лактоглобулина из сыворотки коровьего молока.

На связывание белков с хитозаном могут оказать влияние ряд факторов. Их изучение представляет интерес не только с точки зрения понимания фундаментальных механизмов, лежащих в основе взаимодействия макромолекул, но и с практической точки зрения – подбора оптимальных условий для получения белковых препаратов. Одним из таких факторов является молекулярная масса хитозана, в зависимости от которой может изменяться эффективность связывания белковых соединений.

Степень связывания сывороточных протеинов полисахаридом с различной молекулярной массой (18 и 200 кДа, СД 86%) была изучена методом электрофореза. Анализу подвергали образовавшийся в ходе реакции осадок и надосадочную жидкость. Результаты эксперимента представлены на рисунке 4. Из полученных данных следует, что хитозаны различной молекулярной массы преимущественно связываются с β -лактоглобулином, однако, количество связанного белка существенно отличается (рисунок 3). Так, после обработки сыворотки хитозаном со средневязкостной молекулярной массой (Мв) 18 кДа из нее удаляется до 50 % β -лактоглобулина, а после обработки хитозаном молекулярной массы 200 кДа – до 80%.

Вероятно, это объясняется тем, что в случае использования хитозана с большей молекулярной массой, способность к седиментации образующегося комплекса выше за счет большего количества центров связывания в молекуле хитозана, нежели при использовании низкомолекулярного полисахарида. Таким образом, использование высокомолекулярного хитозана позволит более эффективно удалять β -лактоглобулин из сыворотки. Несмотря на это, применение хитозана с молекулярной массой выше 200 кДа нецелесообразно, т.к. с ростом молекулярной массы его растворимость при pH 6,2 уменьшается.

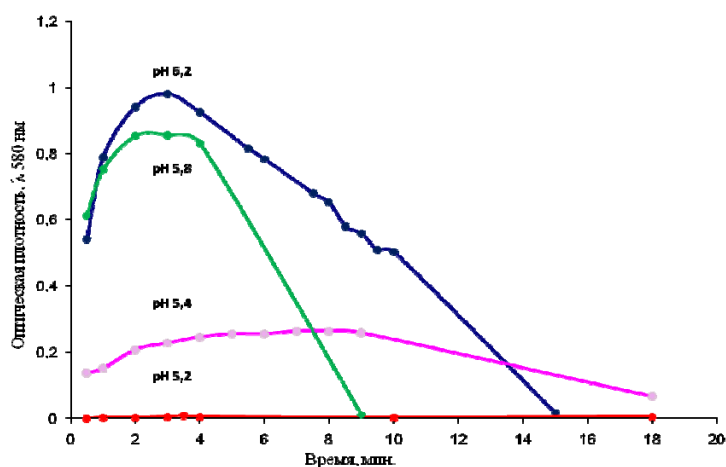
Фактор pH имеет большое значение для реализации многих межмолекулярных



Концентрация хитозана 0,7 мг/мл в 0,05М MES-NaOH буфере, pH 6,2. ЛГ – β -лактоглобулин; ЛА – α -лактальбумин; БСА – бычий сывороточный альбумин.

Рисунок 4 – Эффективность связывания сывороточных белков хитозаном M_v , А – 18 кДа; Б – 200 кДа.

взаимодействий, поскольку влияет на ионизацию некоторых функциональных групп полимерных соединений. Изучение эффективности взаимодействия хитозана M_v 200 кДа, СД 86% и очищенного β -лактоглобулина проводили в диапазоне pH от 5,2 до 6,2, что связано с низкой растворимостью полисахарида в нейтральных и щелочных средах. Количество образовавшегося комплекса оценивали по нарастанию оптической плотности при 580 нм, связанной с увеличением мутности реакционной среды. Результаты эксперимента представлены на рисунке 5.



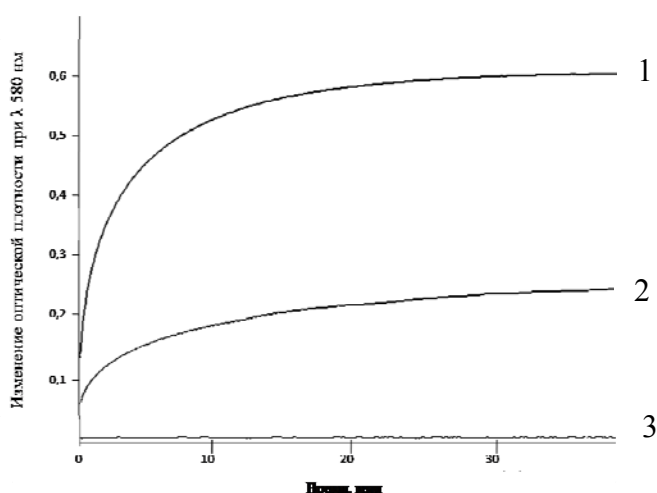
Хитозн M_v 200кДа в концентрации 20 мкг/мл, 0,05М MES-NaOH буфер, концентрация белка 200 мкг/мл.

Рисунок 5 – Эффективность связывания β -лактоглобулина хитозаном в зависимости от pH буфера

При pH 5,2 не происходит образование осадка, указывающего на формирование комплекса между белком и хитозаном. При незначительном увеличении pH до 5,4 в среде, содержащей хитозан и β -лактоглобулин, наблюдается рост оптической плотности, через определенный промежуток времени достигающей своего максимума. Затем оптическая плотность падает, что, вероятно, связано с агрегацией нерастворимых частиц и их осаждением на дно кюветы. Наиболее эффективно образование комплекса протекает при pH 6,2. Последнее значение близко к pH подсырной сыворотки, получаемой путем ферментативной обработки коровьего молока [1]. Следует отметить, что в изученном диапазоне pH хитозан находится в протонированной форме ($pK_a=6,5$) [14]. Напротив, β -

лактоглобулин имеет отрицательный заряд ($pI=4,9-5,4$, для разных форм) [15]. При снижении pH происходит нейтрализация отрицательно заряженных групп на поверхности белка, что понижает эффективность образования комплекса. 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. Несмотря на это, другие виды взаимодействий, вероятно, также участвуют в образовании нерастворимого комплекса.

Участие ионогенных групп во взаимодействии между хитозаном и β -лактоглобулином можно подтвердить изменением ионной силы раствора. Реакция проводилась в 0,05-0,2М буфере MES-NaOH при pH 6,2. Изменения ионной силы раствора добивались с помощью внесения в реакционную смесь различного количества NaCl. Об образовании комплекса судили по нарастанию оптической плотности при 580 нм. Оказалось, что лучше всего хитозан связывается с белком, когда ионная сила раствора минимальна (рис. 6). В 0,2 М буфере взаимодействия не происходит. Полученные данные подтверждают факт участия электростатических связей при образовании комплекса между хитозаном и β -лактоглобулином.



Хитозан M_v 200кДа концентрация хитозана 20 мкг/мл, концентрация белка 200 мкг/мл,
 1- 0,05М буфер MES-NaOH pH 6,2;
 2-0,1М буфер MES-NaOH pH 6,2;
 3- 0,2М буфер MES-NaOH pH 6,2

Рисунок 6 – Эффективность связывания β -лактоглобулина с хитозаном при различной ионной силе раствора.

Как уже упоминалось ранее, в использованном диапазоне pH 5,4-6,2 β -лактоглобулин имеет отрицательный заряд. Однако, в данных условиях α -лактальбумин заряжен еще более отрицательно ($pI=4-5$) и теоретически должен эффективнее присоединяться к хитозану [6]. Отсутствие связывания может объясняться тем, что ионогенные группы α -лактальбумина уже находятся в комплексе с катионами металлов, такими как цинк или кальций, либо тем, что для эффективного взаимодействия с полисахаридом необходимо наличие каких-либо других факторов. В любом случае вопрос о механизме взаимодействия хитозана с белками молочной сыворотки требует проведения дополнительных исследований.

Выводы

В растворе сывороточных белков хитозан селективно связывается с β -лактоглобулином. Оптимальными условиями для образования комплекса являются низкие значения ионной силы среды и pH в районе 6,2. На основании экспериментальных данных полученных в настоящей работе можно утверждать, что хитозан может быть использован для выделения β -лактоглобулина из концентрата сывороточных белков в чистом виде.

Список литературы

1. Богатова О.В., Догарева Н.Г. Химия и физика молока: Учебное пособие. / О.В. Богатова, Н.Г. Догарева. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004. – 137 с.
2. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties / A. R. Madureira [et al.] // *Food Res. Int.* – 2007. – Vol. 40. – P. 1197–1211.
3. Ha, E., Zemel, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: Mechanisms underlying health benefits for active people (review) / E. Ha, M. B. Zemel // *J. Nut. Biochem.* – 2003 – Vol. 14. – P. 251–258.
4. Farrell, H. M., Bede, M. J., Enyeart, J. A. Binding of p-nitrophenyl phosphate and other aromatic compounds by b-LG / H. M. Farrell, M. J. Bede, J. A. Enyeart // *J. Dairy Sci.* – 1987. – Vol. 70 – P. 252–258.
5. Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides / I. Selo [et al.] // *Clin. Exp. Allergy.* – 1999. – Vol. 29, No 8. – P. 1055–1063.
6. Permyakova, E. A. Berliner, L. J. α -Lactalbumin: structure and function / E. A. Permyakova, L. J. Berliner // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 473 – P. 269–274.
7. Markus, C. R., Olivier, B., de Haan, E. H. Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects / C. R. Markus, B. Olivier, E. H. de Haan // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2002. – Vol. 75 – P. 1051–1056.
8. Laursen, I., Briand, P., Lykkesfeldt, A. E. Serum albumin as a modulator of the human breast cancer cell line MCF-7 / I. Laursen, P. Briand, A. E. Lykkesfeldt // *Anticanc. Res.* – 1990. – Vol. 10. – P. 343–352.
9. Tong, L. M. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey / L. M. Tong // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – Vol. 48. – P. 1473–1478.
10. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / В.П. Варламов [и др.]; под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – Москва: Наука, 2002. – 368 с.
11. Ильина А.В., Ткачева Ю.В., Варламов В.П. Демполимеризация высокомолекулярного хитозана ферментным препаратом Целловиридин Г20х / А.В. Ильина, Ю.В. Ткачева, В.П. Варламов // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2002. Т. 37.
12. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). / Л.А. Остерман. – Москва: Наука, 1981. – 288с.
13. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.]// *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
14. Claesson, P. M., Ninham, B. W. pH-dependent interactions between adsorbed chitosan layers / P. M. Claesson, B. W. Ninham // *Langmuir.* – 1992. – Vol. 8. – P. 1406–1412.
15. Sawyer, L. Kontopidis, G. The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin / L. Sawyer, G. Kontopidis // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1482. – P. 136–148.