УДК 577.156.07

Л.Р. Алиева, А.В. Бакулин, В.П. Варламов, И.А. Евдокимов, Н.В. Гавриленко, Е.М. Червяковский, В.П. Курченко

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ХИТОЗАНОВ С БЕЛКАМИ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ*

Исследования направлены на изучение способности хитозана образовывать устойчивые связи с β-лактоглобулином и оптимизацию процесса селективного выделения сывороточных белков. Основными факторами, определяющими характер и интенсивность комплексообразования в системе белок – хитозан, являются молекулярная масса и концентрация хитозана, pH и ионная сила раствора. Полученные экспериментальные данные позволяют утверждать, что хитозан может быть использован для эффективного выделения β-лактоглобулина из концентрата сывороточных белков в чистом виде.

Сывороточные белки, β-лактоглобулин, хитозан.

Введение

В результате переработки коровьего молока получают ряд ценных пищевых продуктов, одним из которых является молочная сыворотка. Она содержит белки, лактозу, витамины и минеральные элементы [1]. Среди белков сыворотки на β-лактоглобулин приходится наибольшее количество. Поскольку данный белок устойчив к протеолизу, то он способен вызывать аллергические реакции у детей раннего возраста, потребляющих коровье молоко в том или ином виде [2].

Вторым в количественном отношении белком сыворотки является α-лактальбумин. В организме этот белок выступает в качестве кофактора при биосинтезе лактозы, важного источника энергии для новорожденных.

Благодаря особенностям строения бычий сывороточный альбумин в сыворотке связывается со свободными жирными кислотами, липидами и многими другими гидрофобными соединениями [3, 4].

Поскольку сывороточные белки обладают ценными биологическими качествами, их выделение представляется весьма актуальной задачей. Простым реагентом для селективного осаждения индивидуальных белков сыворотки является хитозан и его различные производные. Данный биополимер представляет собой полисахарид, получаемый в результате дезацетилирования хитина [5].

Ввиду 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 использованию в молочной промышленности.

Объекты и методы исследований

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-лактальбумин (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 [6].

Для изучения взаимодействия хитозана с белками 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 ºС, 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.

* Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы», государственный контракт № 12.527.11.0008 от 04.06.2012 г.

RETRACTED 15.03.2022

Полученные образцы белков анализировали с применением неденатурирующего электрофореза в 10 % полиакриламидном геле pH 8,8, pH электродного буфера – 8,3. Количественную обработку электрофореграмм проводили с использованием специализированного программного обеспечения Image-Quant 5.1. Степень связывания сывороточных протеинов оценивали по убыли интенсивности окраски отдельных электрофоретических полос. Концентрацию белка измеряли методом Лоури. 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 их обсуждение

Добавление хитозана в концентрации 0,5 мг/мл к концентрату сывороточных белков при pH 6,2, буфер MES-NaOH 0,05M, 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 образовавшегося комплекса, подтвердил данное предположение. Было обнаружено, что по сравнению с контрольным образцом сыворотка, обработанная хитозаном в концентрациях 0–4 мг/мл, содержала меньшие количества β-лактоглобулина. Количество α-лактальбумина и бычьего сывороточного альбумина осталось практически неизменным.

Следует отметить, что при внесении хитозана в сыворотку в количестве более 1 мг/мл осадок комплекса хитозана с белками сыворотки не образуется. Нерастворимый комплекс образуется только при строго определенном соотношении белок – хитозан.

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

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 реакционную смесь (рис. 1).

Максимальное связывание β-лактоглобулина с хитозаном наблюдается при содержании полисахарида в реакционной среде от 0,2 до 1 мг/мл. При последующем увеличении содержания хитозана количество связанного белка в осадке падает. Аналогичная картина имеет место и для α-лактальбумина, однако данный компонент связывается с хитозаном значительно хуже, чем β-лактоглобулин.

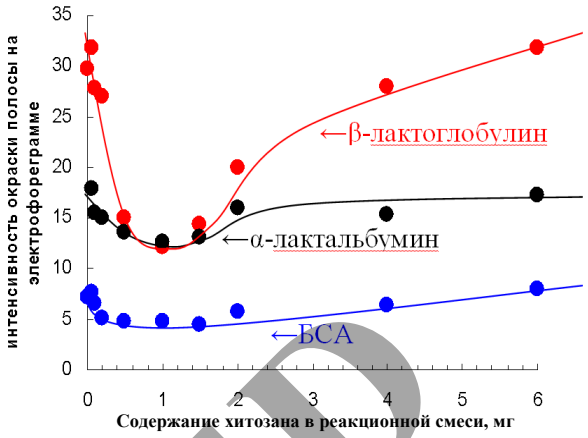

Рис. 1. Зависимость относительного содержания сывороточных белков в супернатантах от содержания хитозана в реакционной смеси

В результате математической обработки экспериментальных данных установлено, что наиболее эффективное связывание β-лактоглобулина молочной сыворотки хитозаном происходит, когда на одну молекулу белка приходится 100 звеньев 2-амино-2-дезоксиглюкопиранозы.

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

На связывание белков с хитозаном может оказать влияние ряд факторов. 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 рис. 2.

Из полученных данных следует, что хитозаны различной молекулярной массы преимущественно связываются с β-лактоглобулином, однако количество связанного белка существенно отличается (см. рис. 1). После обработки сыворотки хитозаном со средневязкостной молекулярной массой (M_v) 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 позволяет более эффективно удалять из сыворотки β-лактоглобулин. Аналогичная картина имеет место и для α-лактальбумина, однако данный компонент связывается с хитозаном значительно хуже, чем β-лактоглобулин.

RETRACTED 15.03.2022

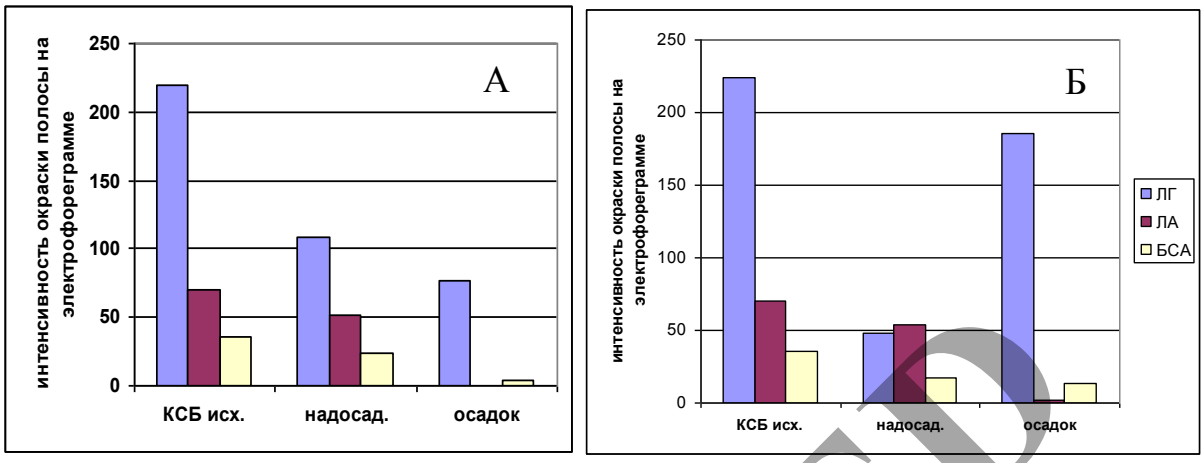

Рис. 2. Эффективность связывания сывороточных белков хитозаном в концентрации 0,7 мг/мл с M_v:
А – 18 кДа; Б – 200 кДа; ЛГ – β-лактоглобулин; ЛА – α-лактальбумин; БСА – бычий сывороточный альбумин

Фактор pH имеет большое значение для реализации многих межмолекулярных взаимодействий. Изучение эффективности взаимодействия хитозана M_v 200 кДа, СД 86 % и очищенного β-лактоглобулина проводили в диапазоне pH от 5,2 до 6,2. Количество образовавшегося комплекса оценивали по нарастанию оптической плотности при 580 нм, связанной с увеличением мутности реакционной среды. Результаты эксперимента представлены на рис. 3.

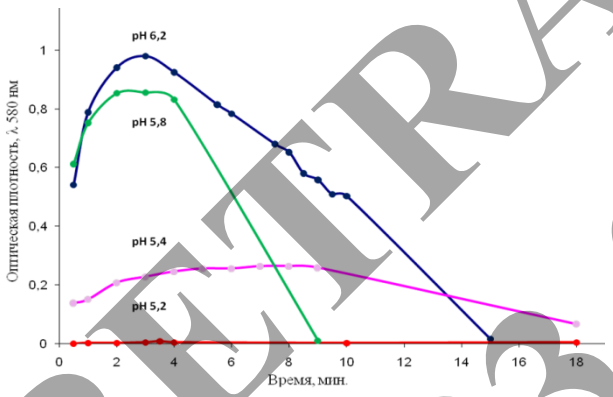

Рис. 3. Зависимости связывания β-лактоглобулина с хитозаном при различных pH среды от времени

При pH 5,2 не происходит образование осадка, указывающего на формирование комплекса между белком и хитозаном. При небольшом 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.

Следует отметить, что в изученном диапазоне pH хитозан находится в протонированной форме (p*K*a = 6,5) [7]. Напротив, β-лактоглобулин имеет отрицательный заряд (p*I* = 4,9–5,4 для разных форм) [8, 9]. 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.

Участие ионогенных групп во взаимодействии между хитозаном и β-лактоглобулином можно подтвердить изменением ионной силы раствора. Реакция проводилась в 0,05–0,2 М 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. 4). В 0,2 М буфере взаимодействия не происходит. Полученные данные свидетельствуют об участии электростатических связей в образовании комплекса между хитозаном и β-лактоглобулином.

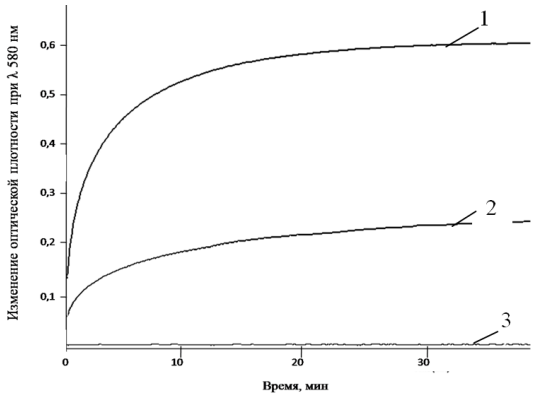

Рис. 4. Эффективность связывания β-лактоглобулина с хитозаном M_v 200 кДа при различной ионной силе раствора: 1 – 0,05 М; 2 – 0,1 М; 3 – 0,2 М

RETRACTED 15.03.2022

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 (p*I* = 4–5) и теоретически должен эффективнее присоединяться к хитозану. Отсутствие связывания может объясняться тем, что ионогенные группы α-лактальбумина уже находятся в комплексе с катионами металлов. 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. Химия и физика молока: учеб. пособие / О.В. Богатова, Н.Г. Догарева. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004. – 137 с.

2. Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides / I. Selo [et al.] // Clin. Exp. Allergy. – 1999. – Vol. 29. – № 8. – P. 1055–1063.

3. Laursen, I. Serum albumin as a modulator of the human breast cancer cell line MCF-7 / I. Laursen, P. Briand, A.E. Lykkesfeldt // Anticanc. Res. – 1999. – Vol. 10. – P. 343–352.

4. 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.

5. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / В.П. Варламов [и др.]; под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М.: Наука, 2002. – 368 с.

6. Ильина, А.В. Деполимеризация высокомолекулярного хитозана ферментным препаратом Целловиридин Г20х / А.В. Ильина, Ю.В. Ткачева, В.П. Варламов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 37.

7. Sawyer, L. The core lipocalin, bovine β-lactoglobulin / L. Sawyer, G. Kontopidis // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1482. – P. 136–148.

8. Permyakova, E.A. α-Lactalbumin: structure and function / E.A. Permyakova, L.J. Berliner // FEBS Lett. – 2000. – Vol. 473. – P. 269–274.

9. Markus, C.R. Whey protein rich in a-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.

ФГБОУ ВПО «Северо-Кавказский государственный технический университет»,
355028, Россия, г. Ставрополь, пр. Кулакова, 2.
Тел./факс: (8652) 95-68-08
e-mail: info@ncstu.ru

RETRACTED 15.03.2022

SUMMARY

L.R. Alieva, A.V. Bakulin, V.P. Varlamov, I.A. Evdokimov, N.V. Gavrilenko, E.M. Chervyakovsky, V.P. Kurchenko

INTERACTION OF CHITOSAN WITH WHEY PROTEINS

Investigation is focused on the ability of chitosan to bind β-lactoglobulin and optimization of technological parameters of selective extraction of whey proteins. The character and intensity of chitosan-protein interaction are determined by molecular weight and concentration of chitosan, pH and ionic strength of solution. The obtained experimental results show that chitosan can be effectively used for isolation of β-lactoglobulin from whey protein concentrate.

Whey proteins, β-lactoglobulin, chitosan.

North-Caucasus State Technical University
Kulakov avenue, 2
Stavropol, 355028, Russia
Phone/Fax: (8652) 95-68-08
e-mail: info@ncstu.ru