

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
"Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Институт физики

Кафедра радиоэлектроники


Направление: 03.04.03 – Радиофизика

Магистерская программа: - «Радиофизические методы по областям применения»

Магистерская диссертация


**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛАТИНА И
κ -КАРРАГИНАНА МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО
МОДЕЛИРОВАНИЯ, ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ И ИК-
СПЕКТРОСКОПИИ**

Студентка 2 курса группы 06-629

«__» _____ 2018 г.  _____ (Гордеева А.М.)

Научный руководитель:

с.н.с., к.б.н.

«__» _____ 2018 г.  _____ (Макшакова О.Н.)


Научный консультант:

д.к., к.ф.-м.н.

«__» _____ 2018 г.  _____ (Лунев И.В.)

Заведующий кафедрой

д.ф.-м.н., доцент

«__» _____ 2018 г.  _____ (Овчинников М.Н.)

Казань — 2018

Оглавление

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| 1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ..... | 7 |
| 1.1 Структура желатина и к-каррагинана | 7 |
| 1.2 Гелеобразование | 10 |
| 1.3 Структура смешанных гелей | 12 |
| 1.3.1 Структура каждого компонента бинарных гелей в присутствии солей..... | 14 |
| 1.3.2 Температура плавления смешанных гелей | 15 |
| 1.4 Физико-химические методы анализа | 16 |
| 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 20 |
| 2.1 Объекты и методы исследования..... | 20 |
| 2.1.1 ИК спектроскопия..... | 21 |
| 2.1.1.1 Спектроскопия в широком температурном диапазоне..... | 21 |
| 2.1.1.2 Спектроскопия неполного внутреннего отражения (НПВО) на тонких пленках..... | 21 |
| 2.1.2 Метод молекулярного докинга..... | 22 |
| 2.1.3 Метод диэлектрической спектроскопии..... | 24 |
| 2.2. Результаты | 27 |
| 2.2.1. По данным молекулярного докинга..... | 27 |
| 2.2.1.1 Расчет комплексов желатина с каррабиозной единицей..... | 27 |
| 2.2.1.2 Расчет комплексов тройных спиралей желатина с одиночными спиральями к-каррагинана..... | 28 |
| 2.2.1.3 Расчет комплексов двойных спиралей к-каррагинана с одиночной спиралью желатина | 32 |
| 2.2.1.4 Расчет комплексов суперспиралей к-каррагинана и желатина .. | 33 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2 Структурный базис гелей желатина в присутствии κ-каррагинана по данным ИК спектроскопии | 34 |
| 2.2.2.1 Определение спектральных детерминант для вторичных структур κ-каррагинана..... | 34 |
| 2.2.2.2 Особенности гелеобразования бинарных гелей при различных концентрациях κ-каррагинана | 39 |
| 2.2.2.3 Гель-золь переход в смешанных гелях..... | 42 |
| 2.2.2.4 Водородный показатель для систем различных концентраций.. | 45 |
| 2.2.2.5. Температурное смещение полосы деформационных колебаний воды..... | 47 |
| 2.2.3. По данным диэлектрической спектроскопии | 49 |
| ВЫВОДЫ..... | 54 |
| Список использованной литературы..... | 55 |
| Приложение | 59 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Желатин представляет собой денатурированный белок коллагена животного происхождения, полученный гидролитической деградацией. [1] Хорошо известный своими желеобразующими свойствами, он находит широкое практическое применение в пищевой промышленности, фармацевтике, 3D печати и других областях [2].

Для улучшения свойств гелей используют второй разлагаемый биополимер – κ-каррагинан. Каррагинан широко используется в пищевых продуктах в качестве эмульгатора, стабилизатора и загустителя. Результаты исследований на животных [3] показали, что каррагинан не является генотоксичным, канцерогенным и не оказывает вредного воздействия на иммунную систему. Поэтому изучение закономерностей структурообразования двухкомпонентных гидрогелей и понимание межмолекулярного взаимодействия желатина с полисахаридом представляет интерес и с научной, и с практической точки зрения.

Учитывая вышеизложенное можно выделить несколько аспектов актуальности данной работы. Во-первых, нередко для практических целей требуются гели с заданными вкусовыми, вязкоупругими, текучими и прочими свойствами. Во-вторых, интерес представляет электростатические взаимодействия белка и полисахарида в водной среде. При этом полисахарид играет роль лиофилизирующего полиэлектролита (комплексообразователя), а белок – блокирующего полиэлектролита (лиганда). И, в-третьих, фундаментальный аспект, связанный с определением микроскопических характеристик гелей.

Центральным вопросом является установление механизмов формирования гелей на молекулярном уровне с последующим построением молекулярных моделей, объясняющих эти взаимодействия. Рассмотрение этого вопроса является основной **целью** при постановке настоящей работы.

Исходя из указанной цели, можно выделить **задачи**, решаемые в данной работе. Необходимо:

1) Методом ИК-спектроскопии охарактеризовать химические группы, участвующие при взаимодействии желатин-к-каррагинан.

2) Методом ИК-спектроскопии изучить изменения во вторичной структуре белка и полисахарида при взаимодействии с полисахаридом различных концентраций в широком диапазоне температур.

3) Методом диэлектрической спектроскопии оценить энергии активации гидратной воды биополимеров и их комплексов и сопоставить с данными ИК-спектроскопии.

4) Рассчитать геометрии и энергии взаимодействия белок-полисахарид и визуализировать энергетически наиболее выгодные комплексы с использованием программ AutoDock и Maestro программного пакета Schrodinger.

Научная новизна работы заключается в детальном описании особенностей микроструктуры исследуемых комплексов, также в определении спектральных детерминант для вторичных структур к-каррагинана.

Практическая значимость. Полученные в данной работе результаты позволяют характеризовать механизмы прочности гидрогелей при варьируемом соотношении к-каррагинана и желатина. Понимание молекулярного базиса взаимодействия желатина с полисахаридами может дать ключ к рациональному дизайну новых материалов с заданными

свойствами. Практически результаты данной работы могут быть применены в инкапсулировании лекарственных препаратов и биологически активных веществ.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1.1 Структура желатина и κ-каррагинана

Желатин – это бесцветный или имеющий желтоватый оттенок протеиновый материал, полученный путем денатурации фибриллярного белка коллагена – основного структурного компонента кожи, костей, сухожилий, хрящей и других элементов соединительной ткани животных.

Молекула белка представляет собой полипептидную цепь, состоящую из статистически распределенного набора аминокислотных остатков с разнообразными боковыми цепями. При растворении в воде желатин молекула желатина приобретает форму α-цепи, у которой в сторону полярного растворителя повернуты гидрофильные группы, а внутрь спирали – гидрофобные [4]. α-цепь коллагена представляет собой трипептид, с общей формулой глицин-х-у, где глицин, х, у – аминокислоты, представленные в таблице 1 [5]. Глицин составляет примерно 35% всех аминокислотных остатков в молекуле желатина.

| Аминокислоты, аббревиатура | Классификация R-групп | Гр на 100гр чистого протеина |
|----------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Аспарагиновая кислота, Asp | Отрицательно заряженные | 6,7 |
| Глутаминовая кислота, Glu | Отрицательно заряженные | 11,6 |
| Аланин, Ala | Неполярные | 11,3 |
| Аргинин, Arg | Положительно заряженные | 9,0 |
| Валин, Val | Неполярные | 2,8 |
| Гистидин, His | Положительно заряженные | 0,7 |
| Глицин, Gly | Неполярные | 27,2 |
| Изолейцин, Ile | Неполярные | 1,6 |
| Лейцин, Leu | Неполярные | 3,5 |
| Лизин, Lys | Положительно заряженные | 4,4 |
| Метионин, Met | Полярные, незаряженные | 0,6 |
| Пролин, Pro | Неполярные | 15,5 |
| Серин, Ser | Полярные, незаряженные | 3,7 |
| Тирозин, Tyr | Ароматические | 0,2 |
| Треонин, Thr | Полярные, незаряженные | 2,4 |
| Фенилаланин, Phe | Ароматические | 2,5 |
| Цистеин, Cys | Полярные, незаряженные | 1,3 |

Табл.1. Аминокислотный состав желатина

В молекуле желатина может содержаться тысячи или десятки тысяч аминокислотных остатков, поэтому в данной работе рассматривается только часть аминокислотной последовательности, которую формально можно представить в виде девяти желатиновых фрагментов, представленных таблице 2.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|
| 1. | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly* | Gly |
| 2. | Glu | Glu | Leu | Glu | Pro | Pro | Val | Ala | Pro |
| 3. | Hyp | Ala | Hyp | Hyp | Hyp | Hyp | Arg | Lys | Ser |
| 4. | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly |
| 5. | Glu | Lys | Met | Ser | Ser | Phe | Glu | Ala* | Ala |
| 6. | Pro | Pro | Hyl | Hyp | Ala | Hyp | Hyp | Asn* | Hyp |
| 7. | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly |
| 8. | Ala | Arg | His | Glu | Ala | Ala | Pro | Ala* | Pro |
| 9. | Ser | Hyp | Arg* | Asp | Arg | Ala | Hyp* | Hyp | Lys |
| 10. | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly |
| 11. | Pro | Gln* | Phe | Ala | Asp | Ala | Pro | Ile | Asn |
| 12. | Met | Arg* | Ser* | Hyp | Asp | Lys* | Ala* | Ala | Ser |
| 13. | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly |
| 14. | Pro | Pro | Leu | Gln | Ala | Glu | Ala | Ala | Glu |
| 15. | Arg* | Hyp | Asp | Met | Val | Ala | Ala | Hyl | Hyp |
| 16. | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly* | Gly | Gly | Gly | Gly |
| 17. | Pro | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Phe | Ala |
| 18. | Hyp | Gln | Lys | Arg | Ala | Gln | Ala | Hyl | Hyp |
| 19. | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly |
| 20. | Pro | Ala | Asn | Leu | Pro | Ala | Asn | Ala | Asn |
| 21. | Hyp | Arg | Thr | Hyp | Hyp | Arg | Hyp | Arg | Lys* |
| 22. | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly |
| 23. | Lys* | Leu | Pro | Glu | Pro | Ser | Ala | Pro | Asp |
| 24. | Asn* | Hyp | Ala | Arg | Thr | Glu | Asp | Ser | Thr* |
| 25. | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly |
| 26. | Asp | Thr | Pro | Arg | Pro | Pro | Gln | Pro | Ala |
| 27. | Asp | Ala | Lys | Hyp | Thr | Gln | Hyp | Gln | Lys* |

Табл. 2. Часть аминокислотной последовательности. Остатки, образующие электростатическое взаимодействие, отмечены звездочкой.

Эта последовательность называется первичной структурой белка.

Уровни организации белковой структуры представлены на рисунке 1.1.1.

Первичная ...-Gly-Val-Tyr-Gln-Ser-Ala-Ile-Asn-Lys-Ala-...

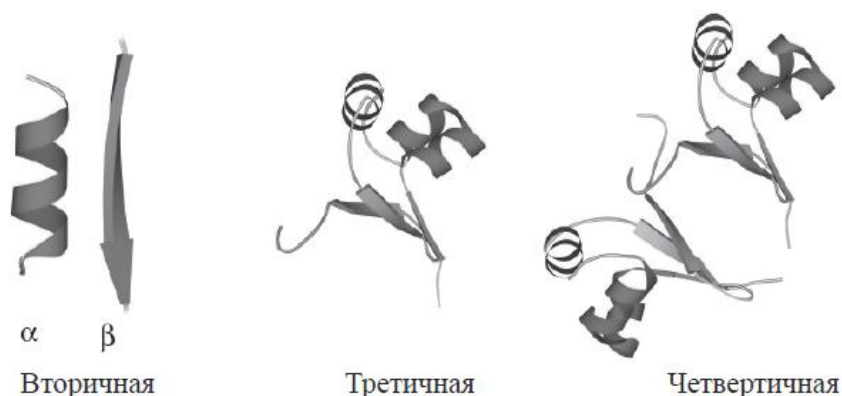


Рис. 1.1.1. Первичная структура (аминокислотная последовательность); вторичная структура (показаны: α -спираль и один тяж β -структуры); третичная структура глобулы, сложенной одной цепью; и четвертичная структура олигомерного, сложенного из нескольких цепей белка. [11]

Каррагинан является родовым названием семейства природных водорастворимых сульфатированных полисахаридов, полученных из разных видов *Rhodophyceae* (красные водоросли) с чередующейся основой, состоящей из α (1-4) -3,6-ангидро-D-галактозы и β (1-3) -D-галактозы. В зависимости от степени полимеризации препараты каррагинанов классифицируются на 3 группы: сильные, твердые гели (к-каррагинан), мягкие гели (i-каррагинан) и гели, формирующиеся смеси с белками, а не водой (λ -каррагинан). [6] В данной работе рассматривается к-каррагинан (полученный из *Carrahyucus alvarezii*). К-каррагинан имеет одну сульфатную группу на две молекулы галактозы с 25% содержанием сульфата со структурной формулой, представленной на рисунке 1.1.2.

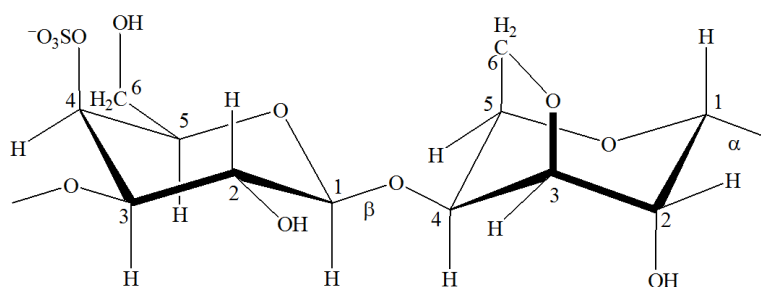


Рис.1.1.2. Структурная формула каррабиозной единицы к-каррагинана

Внутримолекулярные взаимодействия κ-каррагинана осуществляются за счет построения солевых мостиков, которые возникают, во-первых, из-за ионной связи между ионом K^+ (или Rb^+ и Cs^+) и сульфатной группой одного D-галактозного остатка, а во-вторых, из-за электростатического взаимодействия между K^+ и ангидро-О-3,6 кольцом другой D-галактозы. Катионы препятствуют электростатическому отталкиванию сульфатных групп, которое затрудняет жесткое связывание молекул и агрегацию спиралей. [7]

1.2 Гелеобразование

Выше температуры гелеобразования, как правило, около $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, смесь желатина присутствует в качестве золя. При достаточно высоких температурах (примерно выше $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) диспергированные частицы представляют собой мономеры желатина. По мере понижения температуры мономеры желатина агрегируются посредством водородной связи в олигомеры, которые существуют в виде случайных катушек. При более низкой температуре возрастающая роль водородного связывания внутризольного слоя индуцирует переход от неупорядоченных катушек к упорядоченным одиночным спиральям. Наконец, происходит золь-гель переход, обусловленный переходом от одиночных к тройным спиральям. Тройные спирали реорганизуются со временем, образуя равновесную бесконечную гелевую сеть способом, согласующимся с теорией перколяции. Наконец, образуется гигантская взаимосвязанная макромолекулярная сеть, в которой тройные спирали образуют узлы, которые связывают гелевую сеть и обеспечивают ее прочность и эластичность. Отметим, что тройная спираль (или суперспираль) желатина образована тремя коллагеноподобными левосторонними α -цепями. Поскольку связи, которые осуществляют этот переход, являются физическими (водородные и ван-дер-ваальсовы связи), процесс гелеобразования является термообратимым. В самом деле,

необходимы относительно низкие энергии для разрыва связей, образованных гелем желатина.

Заметим, что при этом тройная спираль коллагена полностью не восстанавливается. Спирализация происходит частично – при сближении трёх молекул желатины отдельными локальными участками. Эти небольшие участки трёх молекул желатины, соединённые в коллагеноподобную тройную спираль являются, по сути, узлом, связывающим три молекулы желатины (рис.1.2, а). При этом значительная часть каждой макромолекулы желатины остаётся неспирализованной.

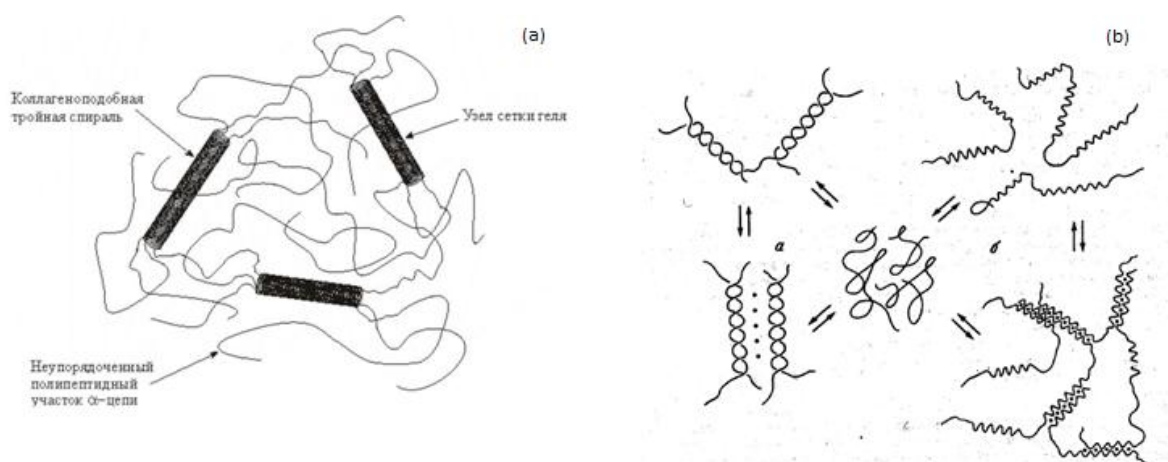


Рис.1.2. (а) Схема агрегата α -цепей желатины, связанных участками коллагеноподобных тройных спиралей. (б) Схема образования геля при переходе молекул полисахарида из конформации хаотического клубка в частично упорядоченные структуры.

При увеличении концентрации желатины и понижении температуры тройных узлов становится всё больше, при этом каждая макромолекула желатины будет включена в несколько таких локальных участков тройных спиралей с другими макромолекулами. В конце концов, в объёме раствора желатина образуется единая пространственная сеть из макромолекул желатина, соединённых узлами тройных коллагеноподобных спиралей.

В образовании и стабилизации трёхмерной сетки желатинового геля участвуют связи различных типов: водородные связи и электростатические

взаимодействии между полярными группами, гидрофобные взаимодействия между неполярными остатками аминокислот [8,9].

Необходимым условием для проявления гелеобразующих свойств полисахаридов является высокое содержание остатков 3,6-ангидрогалактозы и высокая степень регулярности строения. При этом в полисахаридах группы агара наиболее прочные гели дает несulfатированная агароза, а увеличение степени sulfатирования обычно снижает гелеобразующие свойства вплоть до их полного исчезновения. Напротив, для образования гелей в каррагинанах требуется вполне определенное расположение sulfатных групп, но в этом случае гели формируются только в присутствии специфических катионов. У к-каррагинана одна sulfатная группа, поэтому твердый гидрогель образуется а) при охлаждении горячих водный растворов, б) при повышении концентрации полимера, в) при увеличении добавленной соли в водном растворе. Фактически в водных растворах к-каррагинан имеет конформацию случайной катушки, а при охлаждении ниже температуры плавления происходит конформационный переход в частично упорядоченные структуры, в узлах находятся двойные спирали (суперспираль к-каррагинана) с sulfатными группами, направленными наружу (рис.1.2, б). [10]

1.3 Структура смешанных гелей

В водном растворе желатина и к-каррагинан ассоциация молекул происходит за счет гидрофобного взаимодействия, водородного связывания и электростатического взаимодействия. Все три вида взаимодействий устанавливаются одновременно в местах сочленения молекул. Дальнейшей усложнение модели проявляется в том, что исследуемые комплексы подвергаются конформационным переходам, предшествующим гелеобразованию. Активация определенных функциональных групп на

полимерных цепях, сопровождаемая соответствующим трехмерным конформационным изменениям, является необходимым условием для межцепочечных сшивок. То есть при уменьшении температуры раствора каждая компонента раствора изменяется конформацию от статистического клубка (для желатина) или случайной катушки (для к-каррагинана) до спирального и частично суперспирального состояния, образуя трехмерную сеть с зонами сочленения молекул. Двухкомпонентный гель является термообративным. [12]

Учитывая, что температуры плавления и гелеобразования для для к-каррагинана и желатина различны, предложенная модель а) не объясняет последовательность конформационных гель-золь и золь-гель переходов каждой компоненты, б) не учитывает возможность агрегации спиралей, в) не предлагает вариаций зон сочленения различными участками цепей, рассматривая только крайние состояния фазовые состояния.

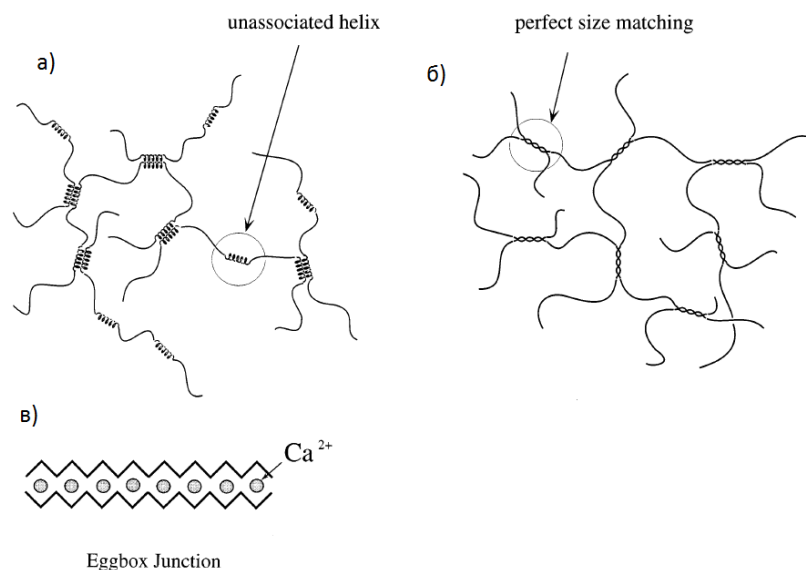


Рис. 1.3. 1) Зоны сочленения образованные: а) суперспиралями, б) спиралями, в) карманами.

Учитывая, что в растворе к-каррагинан и желатин представляют собой полиэлектролиты, возможно большое разнообразие полиэлектролитных комплексов в золях, которые при формировании геля будут образовывать

зоны сочленения различных типов. Возможные три примера зон сочленения к-каррагинана и желатина приведены в работе [12]: образование двойных спиралей молекулами одного или разного типа, ассоциация суперспиралей, образование карманов «egg-box junction» по типу захвата катионов участками цепей (рис.1.3).

1.3.1 Структура каждого компонента бинарных гелей в присутствии солей

В работе [25] показано, что добавление солей NaCl и CrCl₃ в раствор желатина затрудняет гелеобразование с увеличением концентрации соли, в то время как добавление CaCl₂ облегчает конформационный переход спираль-клубок с увеличением концентрации, т.е. добавление низкой концентрации катионов способствует образованию тройных спиралей, тогда как высокие концентрации приводит к уменьшению спиральности.

Многовалентные ионы, такие как Ca₂⁺ и Cr₃⁺ могут связываться с карбоксильными группами на цепях желатина. При низких концентрациях катионов это связывание происходит внутри цепи, что способствует образованию ядра, состоящего из двух вместе закрученных спиралей. Затем это ядро обматывается другим сегментом клубка, образуя тройную спираль, т.е. суперспираль. [26] Напротив, при высоких концентрациях катионов дестабилизируют тройные спирали из-за chaotropic effect according to the Hofmeisterseries. [27]

Известно, что специфические анионы, такие как ион иодида, связываются и стабилизируют к-каррагинановые спирали, но предотвращают агрегацию спиралей. В работе [28] было показано, что агрегация спиралей каррагинана не обязательна, чтобы слабый гель к-каррагинана действительно являлся гелем с точки зрения реологии. Однако неагрегационные спиральные цепи к-каррагинана достаточно жестки, чтобы их зацепления проявляли

гелеобразную вязкоупругость, даже без формирования постоянной сетевой структуры. Такие гели отличаются от обычных гелей к-каррагинана в двух отношениях: низкой величиной модуля накопления и отсутствием теплового гистерезиса в золь-гелевом переходе.

Традиционно считается, что сеть полисахаридных гелей состоит из неупорядоченных гибких полимерных цепей, образующих зоны сочленения [29]. Модель, основанная на атомно-силовых микроскопических наблюдениях гелей, что указывает на то, что структура сети к-каррагинна формируется с помощью волокнистых агрегатных соединений. Хотя переход катушка-спираль для к-каррагинана является достаточно кооперативным, в реальной ситуации гелеобразования возможно, что случайная полимерная цепь участвует в двух различных зонах сочленения, образованных путем агрегации спиралей. Поэтому вполне вероятно, что не только суперспиральные сети состоящие из волокнистых агрегированных спиралей, а также сети, состоящие из упорядоченных зон сочленения, соединенных неупорядоченными гибкими полимерными цепями, которые не могут наблюдаться даже атомно-силовыми микроскопами из-за их броуновских движений, существуют в реальном геле полисахарида. Представляется разумным предположить, что в эластичных свойствах обычных к-каррагинановых гелей преобладают вклады из волокнистых агрегатов спиралей. [30,31]

1.3.2 Температура плавления смешанных гелей

При высоких температурах системы к-каррагинан-желатин представляют собой золи, т.е. по своему реологическому поведению они являются жидкостями при малых напряжениях сдвига. Однако при понижении температуры происходит золь-гель переход. Зависимость температуры плавления от соотношения компонентов показана на рисунке 1.3.2.

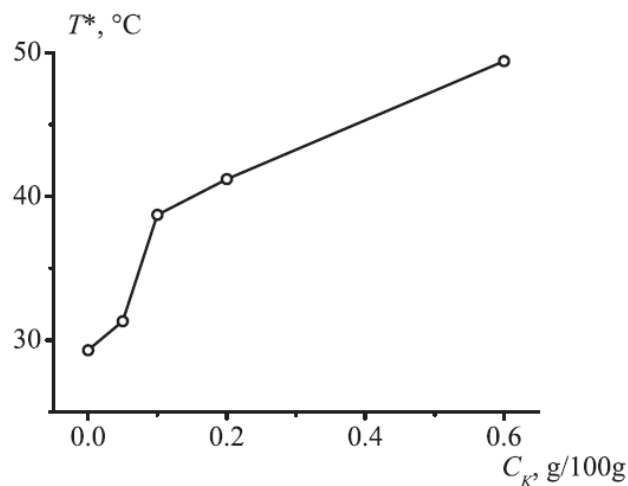


Рис. 1.3.2. Зависимость температуры плавления от концентрации к-каррагинана в гидрогелях к-каррагинан-желатин при концентрациях желатина $C_{\text{ж}}=1,0\%$. [17]

Данная зависимость не является линейной и резкое увеличение температуры золь-гель перехода происходит при концентрации к-каррагинана $0,1 \text{ г} / 100 \text{ г}$ или при соотношении желатин : к-каррагинан $Z=0,1$. Таким образом в работе [17] показано, что добавление к-каррагинана сильно влияет на термостабильность желатиновых систем. Разумно предположить, что основной причиной этого эффекта является образование полиэлектролитных комплексов и трансформация надмолекулярной структуры исследуемых материалов в зависимости от их состава.

1.4 Физико-химические методы анализа

Оптические методы основаны на способности вещества поглощать определенную часть электромагнитного спектра или, наоборот, излучать энергию под воздействием различных факторов, а также рассеивать, преломлять свет, вращать плоскость поляризации света и т.п.

Спектры, обусловленные поглощением электромагнитного излучения при переходах электронов с основного на выше лежащие уровни, называется электронным спектром поглощения.

В возбужденном состоянии атом может находиться доли секунды, а затем электрон возвращается на свой основной уровень. При этом происходит испускание кванта света строго определенной энергии. Спектр, обусловленный испусканием квантов электромагнитного излучения при переходе электронов с верхних энергетических уровней на основной, называются электронными спектрами испускания. Спектры поглощения и спектры испускания являются аналитическим сигналом. Длина волны, поглощаемая или испускаемая веществом – это качественная характеристика, а интенсивность полосы поглощения или испускания – это количественная характеристика.

В основе количественного анализа в оптических методах лежит основной закон светопоглощения – закон Бугера – Ламберта – Бера¹. Этот закон утверждает, что десятичный логарифм отношения интенсивности светового потока, падающего на раствор, к интенсивности светового потока, прошедшего через раствор, прямо пропорционален концентрации вещества, поглощающего это излучение, и толщине слоя раствора.

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l}, \text{ или } \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (1)$$

где ε – молярный коэффициент светопоглощения, зависит от природы растворенного вещества;

c – молярная концентрация растворенного вещества;

l – толщина поглощающего слоя, выраженная в см;

I_0 – интенсивность потока электромагнитного излучения, падающего на раствор;

I – интенсивность потока электромагнитного излучения, прошедшего через раствор.

¹ http://ru.wikipedia.org/wiki/Закон_Бугера_—_Ламберта_—_Бера

Таким образом, растворы одного и того же окрашенного вещества при одинаковой его концентрации и толщине слоя, а также при прочих равных условиях, поглощают одну и ту же долю падающего на них света.

Величину $\lg \frac{I_0}{I} = D$ (или A) называют оптической плотностью раствора.

Оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации окрашенного вещества и толщине слоя раствора.

Величину $\frac{I}{I_0} = T = 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l}$ называют пропусканием раствора. $D = -\lg T$

Иногда T выражают в %, тогда $D = -\lg T \cdot 100 = 2 - \lg T$.

Большое число процессов, интенсивность которых имеет резкую (типа экспоненциальной) зависимость от температуры, объединяется общим названием «релаксационные». К ним относятся диффузия, испарение, вязкое течение, пластическое деформирование, разрушение и много другое.

Важной характеристикой этих процессов является энергия активации. Феноменологический смысл этой величины состоит в том, что она определяет температурную зависимость интенсивности процессов. Поэтому данная величина используется для описания прогнозирования температурных зависимостей кинетики процессов.

В то же время, поскольку релаксационные процессы представляют собой последовательность элементарных актов за счет локальных флуктуаций тепловой энергии (в классической области), энергия активации имеет смысл барьера, величина которого контролирует вероятность элементарных актов.

В экспериментах при изучении кинетики процессов измеряются зависимости от температуры (T) различных характеристик Φ_i (скорости,

частоты, продолжительности, концентрации). При обработке температурных зависимостей распространенным является представление $\Phi_i(T)$ в аррениусовой форме

$$\Phi_i(T) = A_i \exp(\pm U_i/kT). \quad (2)$$

При сравнительно небольшом температурном интервале измерений (1-2 десятичных порядка) зависимость $\ln \Phi_i(1/T)$ оказывается близкой к линейной. Это трактуется как свидетельство справедливости применения выражения (2) к анализу экспериментальных результатов, и из наклона $\ln \Phi_i(1/T)$ определяется значение U_i , которое и называют энергией активации. [36]

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объекты и методы исследования

Использовали желатин Type B (из бычьей кожи) 225 Bloom и к-каррагинан (из красных водорослей) производства Sigma-Aldrich (USA). Изоэлектрическая точка для использованных желатины $pH_{ж} = 4,9$ и к-каррагинана $pH_{к}=7$. Средневязкостная молекулярная масса желатины $Mv_{ж} = 96$ кДа, к-каррагинана - $Mv_{к} = 4.3$ кДа. Использовали соли NaI и KCl.

Первоначально образцы заданного веса набухали в дистиллированной воде при $20^{\circ}C$ в течение одного часа. Водные (H_2O , D_2O) смеси желатина-к-каррагинан получались путем смешивания исходных растворов при $40^{\circ}C$ в соответствии с желаемым массовым соотношением биополимеров (г / г) Z ($C_{ж}/C_{к}$). Затем они растворялись при повышении температуры до $50^{\circ}C$ и $80^{\circ}C$ соответственно, а затем охлаждались до комнатной температуры. Этот протокол позволяет получить гомогенные коллоидные растворы (золи) обоих компонентов в заданном массовом соотношении (Табл. 3.).

| Z | желатин | к-каррагинан | вода | образец |
|------|---------|--------------|-------|---------|
| 0 | 50 мл | - | 50 мл | 100 мл |
| 0,02 | 100 | 2 мл | 98 мл | 200 мл |
| 0,05 | 100 | 5 мл | 95 мл | 200 мл |
| 0,1 | 100 | 10 мл | 90 мл | 200 мл |
| 0,2 | 100 | 20 мл | 80 мл | 200 мл |
| 0,4 | 100 мл | 40 мл | 60 мл | 200 мл |
| 0,6 | 100 мл | 60 мл | 40 мл | 200 мл |
| 0,8 | 100 мл | 80 мл | 20 мл | 200 мл |
| 1 | 100 мл | 100 мл | - | 200 мл |

Табл. 3. Приготовление растворов 2% желатина и 2% к-каррагинана при различных массовых соотношениях компонент Z (г / г).

2.1.1 ИК спектроскопия

2.1.1.1 Спектроскопия в широком температурном диапазоне

Спектры регистрируются на ИК-спектрометре Affinity-1 (Shimadzu) на просвет стекол CaF₂. Спектры записывались в диапазоне 4000 – 800 см⁻¹ с разрешением 8 см⁻¹ и накоплением 256 сканов. К спектрометру был подключен термостат.

Образцы: а) к-каррагинан 2% + 0,2 Моль/л KCl, к-каррагинан 2% + 0.2 Моль/л NaI в H₂O; б) к-каррагинан 2% в H₂O, к-каррагинан 2% в D₂O, смешанные гели желатин 2% + к-каррагинан 2% в H₂O (Z=1), желатин 2% + к-каррагинан 2% в D₂O (Z=1).

Предварительно нагретый образец в виде горячего помещался в кювету CaF₂ при 60 °С. Образец нагревался до 80-90 °С и охлаждался до 15 °С с ходом в 5 °С, каждая температура выдерживалась по 7 минут перед записью ИК спектра, чтобы образец успел уравновеситься. После такого хода нагрев - охлаждение, происходил нагрев до исходной температуры. В спектрах поглощения компенсировали водяной пар, спектр пропускания стекол CaF₂ и спектры H₂O/D₂O для дальнейшего анализа также использовались вторые производные полученных спектров.

В случаях, когда добавлялись соли NaI и KCl раствор к-каррагинана проходил процедуру очистки от собственных солей методом центрифугирования.

2.1.1.2 Спектроскопия неполного внутреннего отражения (НПВО) на тонких пленках

Спектры регистрируются на ИК-спектрометре Affinity-1 (Shimadzu) с НПВО и с кристаллом ZnSe. Спектры записываются в диапазоне 4000 – 800 см⁻¹ с разрешением 8 см⁻¹ и накоплением 256 сканов.

Образцы: желатин 2%, желатин 2% с добавлением различных концентраций к-каррагинана 2% ($Z=0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1$).

Для того чтобы избежать водопоглощение, которое маскирует чувствительную к конформации область Амида I, гели сушат на чувствительном элементе спектрометра при комнатной влажности и над P_2O_5 . Для получения эталонных спектров как растворов желатина, так и к-каррагинана водные растворы помещали на чувствительный элемент спектрометра при $80^\circ C$, охлаждают до $15^\circ C$, затем нагревали до первоначальной температуры (ход $5^\circ C$) и регистрировали спектры. В спектрах поглощения компенсировали водяной пар, для дальнейшего анализа также использовались вторые производные полученных спектров.

2.1.2 Метод молекулярного докинга

Докинг осуществлялся в программе Autodock4.2 [13]. Поиск конфигураций комплексов белок – лиганд с минимальной свободной энергией осуществлялся с помощью Lamarckian genetic algorithm. Лиганды рассматриваются как набор атомов и пробных зарядов, а энергия зарядового взаимодействия вычисляется с использованием методов молекулярной механики и сохраняется в базе данных AutoGrid (рис. 2.1.2).

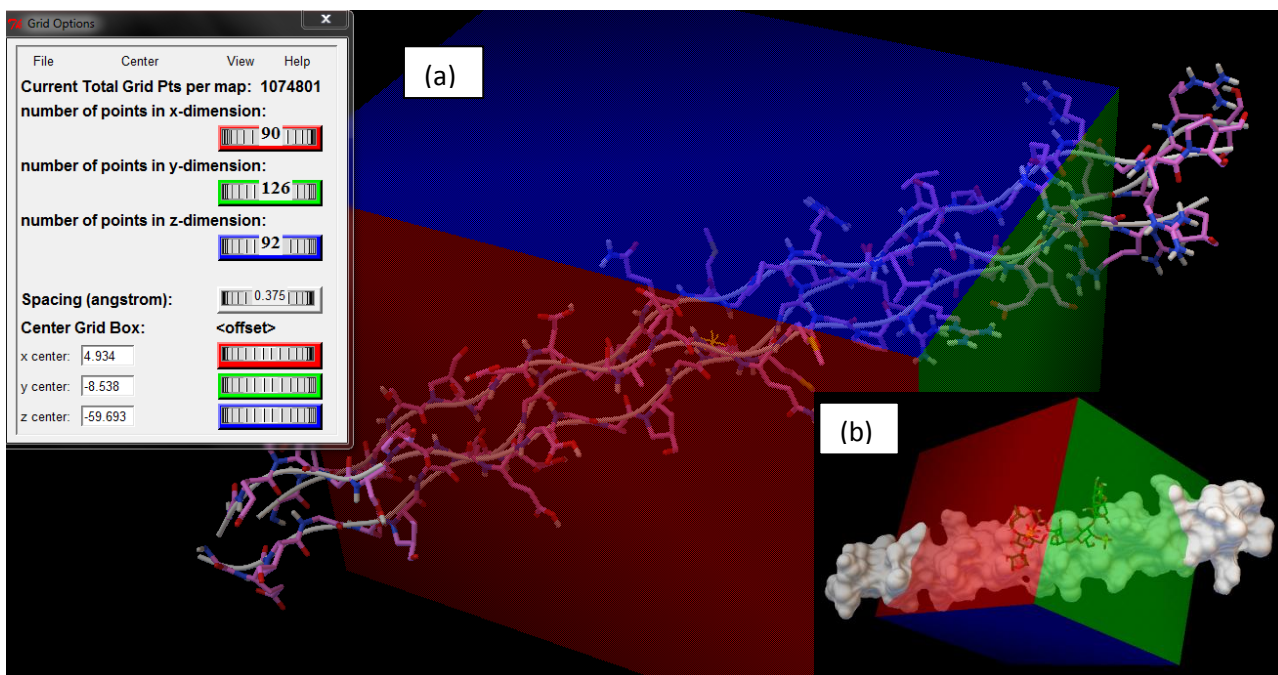


Рис. 2.1.2. Модель взаимодействия молекулы желатина с лигандом для расчета энергии взаимодействия (b), с предварительным ограничением поверхности молекулы сеткой для оптимизации расчетов (a).

Расчеты проводились на жесткой структуре белка, тогда как в лиганде разрешалось вращение вокруг одинарных связей. В случае полимерного лиганда вращение разрешалось только вокруг гликозидной связи. Решетка строилась на всей молекуле белка, позволяя лиганду взаимодействовать с любым остатком.

Расчет свободной энергии связывания осуществлялся с учетом электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей, эффекта сольватации и торсионной свободной энергии:

$$\Delta G = \Delta G \text{ vdw} + \Delta G \text{ hbond} + \Delta G \text{ elec} + \Delta G \text{ tor} + \Delta G \text{ sol}, \quad (3)$$

где $\Delta G \text{ vdw}$ – энергия ванн-дер-ваальсовых взаимодействий, $\Delta G \text{ hbond}$ – энергия водородных связей, $\Delta G \text{ elec}$ – электростатическое взаимодействие, $\Delta G \text{ sol}$ – энергия сольватации, $\Delta G \text{ tor}$ – торсионная свободная энергия.

Для более полного охвата конформационного состояния желатина в гелях, расчеты проводились как на тройной спирали белка, так и на

одинарной молекуле желатина. Аминокислотная последовательность белка базировалась на первичной последовательности коллагена типа I. Длина нитей желатина была ограничена 27 остатками для оптимального использования машинного времени. Пространственная структура строилась с помощью онлайн сервиса gencollagen.² Чтобы получить обобщенную картину, было построено 9 моделей одинарной спирали и соответствующие тройные спирали с разным электростатическим потенциалом (Табл.2.).

В качестве лиганда использовались две молекулы: 1) каррабиозная единица (рис. 1.2); 2) участок к-каррагинана длиной в 8 моносахаридов. Исходные пространственные структуры лигандов строились и оптимизировались в программе Maestro Schrodinger suite [14].

2.1.3 Метод диэлектрической спектроскопии

Для определения диэлектрической проницаемости материалов методом стимул-отклик в режиме свипирования в диапазоне от 50 МГц до 65 ГГц был использован измерительный прибор векторный анализатор цепей (Agilent Technologies PNA-X Network Analyzer (N5247A)) [32].

В результате эксперимента были получены спектры диэлектрической проницаемости для 10 образцов, растворенных в воде: желатин 2%, к-каррагинан 2%, желатин 2% с добавлением различных концентраций к-каррагинана 2% (массовое соотношение полимеров $Z=0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 1$). Измерения проводились с помощью коаксиального пробника, который опускался непосредственно в образец, в широком температурном диапазоне от 10 до 50 °С. Термостатирование производилось с шагом в 3 °С.

Для предотвращения различной степени желирования образцов, перед проведением экспериментом все образцы нагревались до температуры выше 80 °С и одновременно охлаждались до 10 °С.

² <http://www.cgl.ucsf.edu/cgi-bin/gencollagen.py>

В результате для каждого образца были получены спектры реальной и мнимой части диэлектрической проводимости от температуры (рис. 2.1.3). Для достоверности каждый эксперимент был трехкратно повторен.

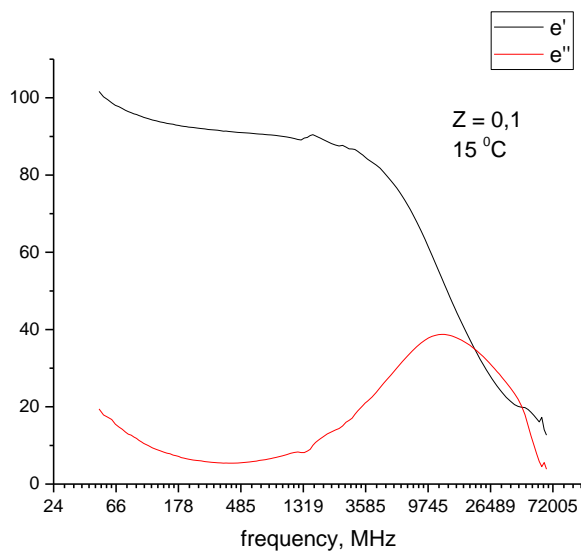


Рис.2.1.3 (а). Зависимости действительной части (ϵ') и мнимой части (ϵ'') комплексной диэлектрической проницаемости от частоты для образца с массовым содержанием желатин:к-каррагинан $Z = 0,1$ г / г при 15 °С.

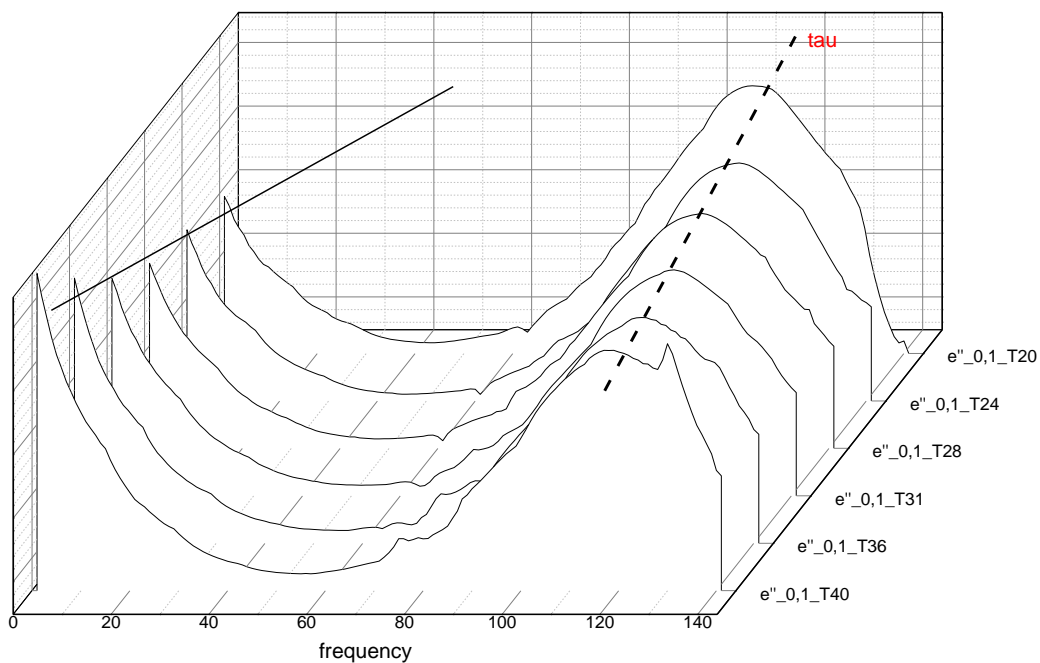


Рис.2.1.3 (б). Зависимость мнимой части (ϵ'') комплексной диэлектрической проницаемости от частоты для образца с массовым содержанием желатин:к-каррагинан Z = 0,1 г / г при вариации температур от 20 до 40 °С.

Для расчета диэлектрических параметров полученные спектры дебаевского типа аппроксимировались функцией Гаврильяка-Негами и добавкой Джоншера с учетом сквозной проводимости :

$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon'(\omega) - i\epsilon''(\omega) = \epsilon_{\infty} + \frac{\Delta\epsilon}{1 + (i\omega\tau)^{\alpha}} + B(i\omega)^{n-1} + \frac{\sigma_0}{i\omega\epsilon_0}, \quad (4)$$

где $\epsilon'(\omega)$ и $\epsilon''(\omega)$ реальная и мнимая часть комплексной диэлектрической проницаемости; i – мнимая единица; ϵ_{∞} - высокочастотный предел диэлектрической проницаемости; ω – циклическая частота, $\Delta\epsilon$, τ , α амплитуда диэлектрической дисперсии, время релаксации, параметр уширения диэлектрического спектра, соответственно; B – амплитуда поправки Джоншера; $0 < n \leq 1$ степенной параметр Джоншера; σ_0 – сквозная проводимость; $\epsilon_0 = 8.85 \cdot 10^{-12}$ Ф/м – диэлектрическая проницаемость вакуума.
[33,34]

2.2. Результаты

2.2.1. По данным молекулярного докинга

2.2.1.1 Расчет комплексов желатина с каррабиозной единицей

Докинг каррабиозной единицы с девятью фрагментами тройной, и одиночной спиралями желатина происходит с формированием контактов между заряженными сульфатными группами SO^{3-} и хотя бы одним остатком аргинина (ARG) или лизина (LYS). Такие комплексы стабилизируются водородными связями и образовавшимися ван-дер-ваальсовыми контактами с поверхностными группами спирали желатина. В комплексах со суперспиралями желатина максимально реализуются электростатические взаимодействия за счет пространственной близости боковых цепей. Комплексы с одиночной спиралью желатина стабилизированы главным образом ван-дер-ваальсовыми контактами и водородными связями. Геометрия получившихся комплексов варьируется в зависимости от топологии связующей поверхности. Пример наиболее энергетически выгодных комплексов приведен на рисунке 2.2.1.1

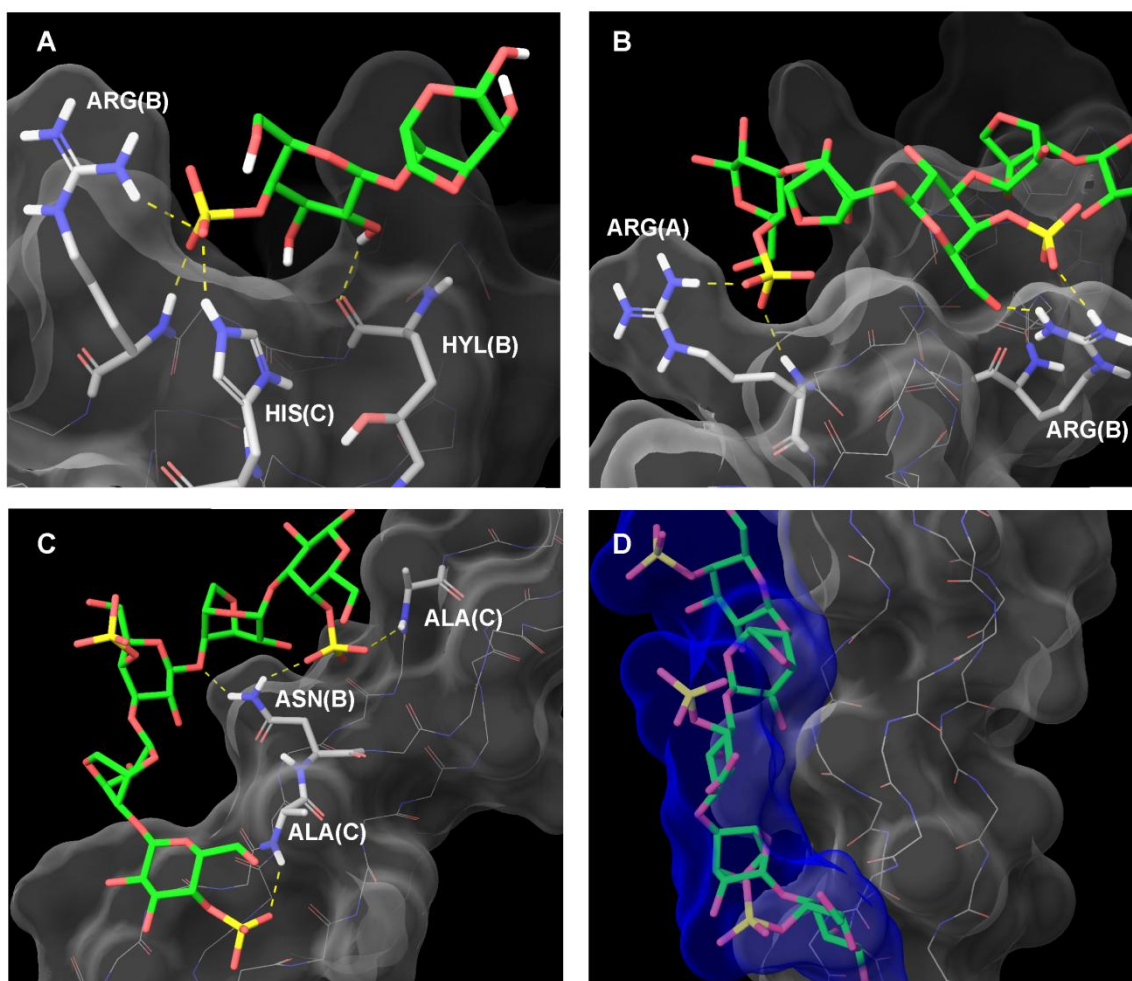


Рис. 2.2.1.1. Комплекс каррабиозной единицы (зеленым) с тройной спиралью желатина (A). Комплексы олигосахаридной части к-каррагинана (зеленым) с тройной спиралью желатина (B, C, D). Взаимодействующие остатки желатина выделены жирной линией, водородные связи показаны пунктирной линией. Поверхность молекулы желатина представлена в прозрачном сером виде, а поверхность молекулы к-каррагинана в прозрачном синем.

2.2.1.2 Расчет комплексов тройных спиралей желатина с одиночными спиральями к-каррагинана

При взаимодействии олигомерного фрагмента цепи к-каррагинана с суперспиралью желатина геометрия и энергия взаимодействия комплексов также определяются поверхностной топологией и распределением заряда. Фрагмент к-каррагинана взаимодействуя с молекулой желатина, образует

максимальное число возможных контактов с противоположно заряженными группами, но нерегулярное распределение остатков аргинина и лизина по поверхности желатина затрудняет формирование всех возможных контактов и приводит к уменьшению вклада электростатических взаимодействий в энергию связывания комплексов (рис.2.2.1.1, В и С). Гибкая цепь к-каррагинан, взаимодействующая с поверхностью молекулы желатина, реализует максимальное количество ван-дер-ваальсовых контактов и водородных связей, поэтому их энергия достигает значений, близких к значениям, рассчитанным при докинге каррабиозной единицы (2.2.1.1). Если цепь к-каррагинан взаимодействует с нейтральной или отрицательно заряжено частью тройной спирали желатина, то сульфатные SO^{-3} группы ориентируются на растворитель или, другими словами, от поверхности желатина (рис. 2.2.1.1, D).

В рассматриваемых комплексах геометрия цепи к-каррагинана определяется углами поворота гликозидной связи, позволяющая гидрофобным группам формировать тесные контакты с поверхностью молекулы желатина и достигать комплиментарного соответствия связывающей области («кармана») рецептора с лигандом. В комплексах значения торсионных углов к-каррагинана гликозидной связи соответствуют локальным минимумам потенциальной энергии на поверхности молекулы желатина (рис. 2.2.1.2).

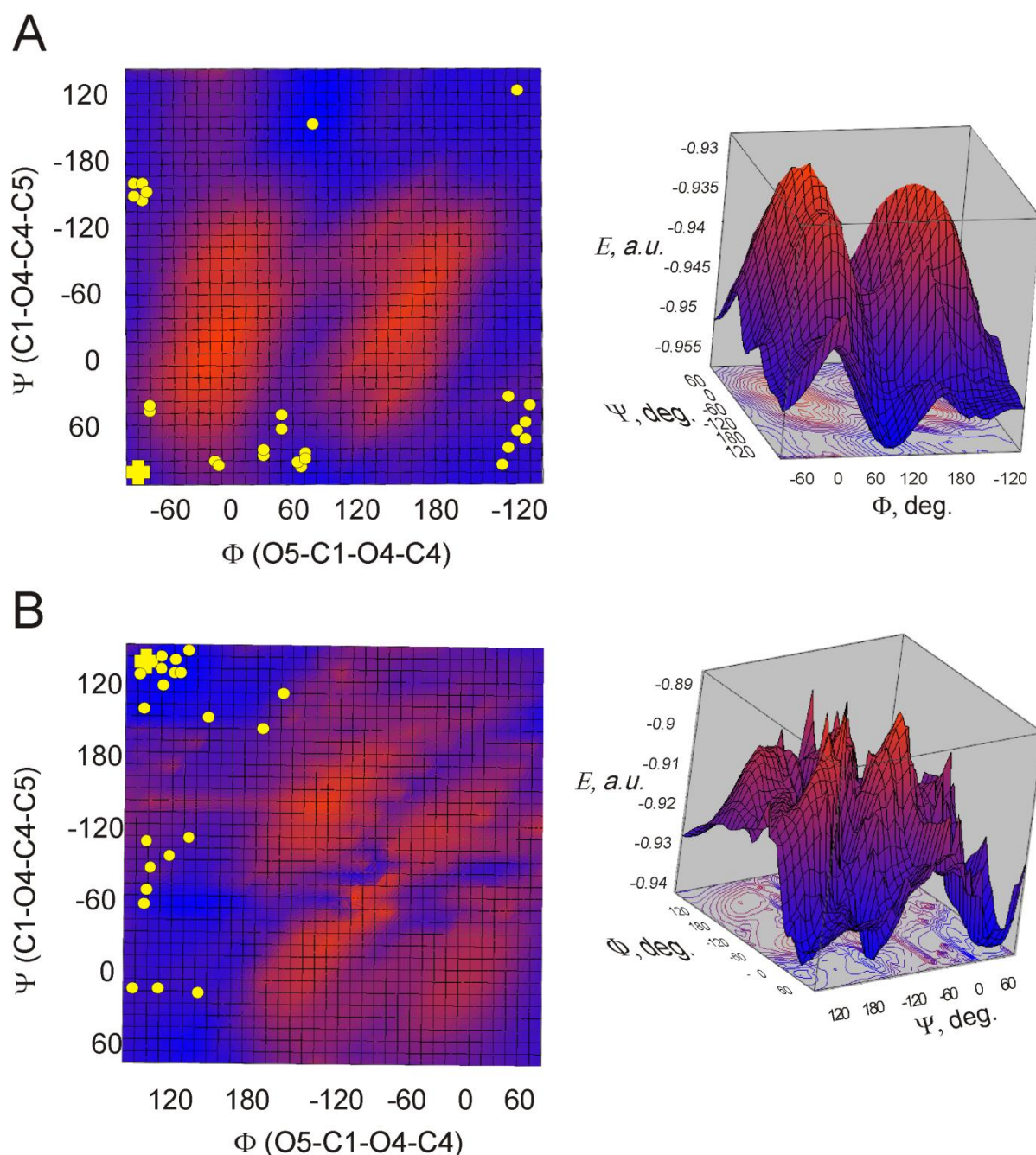


Рис. 2.2.1.2 Потенциальная энергия 2D и 3D поверхности для β -D-галактоза-4-сульфата $1 \rightarrow 4$ - α -D-ангидрогалактозы (A) и α -D-ангидрогалактозы $-1 \rightarrow 3$ - β -D-галактоза-4-сульфата (B) гликозидные связи. Торсионные углы для некоторых комплексов показаны желтыми кругами. Торсионные углы в двойной спирали к-каррагинана показаны желтым крестом.

Энергия межмолекулярных взаимодействий между суперспиралями желатина и частью цепи к-каррагинан уменьшается по сравнению с энергией, рассчитанной для комплексов в 2.2.1.1 (рис. 2.2.1.3). Несмотря на то, что для некоторых фрагментов суперспиралей желатина наблюдается высокая

локальная концентрация положительно заряженных групп, позволяющая реализовать несколько контактов с к-каррагинаном посредством солевых мостиков (рис. 2.2.1.1, В), электростатическая составляющая по крайней мере в три раза меньше, чем в комплексах 2.2.1.1. В то же время вклад ван-дер-ваальсовых контактов и водородных связей близок к комплексам в 2.2.1.1. При рассмотрении девяти различных фрагментов желатина, различающихся по аминокислотной последовательности, происходит существенное изменение электростатического вклада из-за индивидуальных построений солевых мостиков между участками молекул. В то же время вклад ван-дер-ваальсовых и водородных взаимодействий остается близким к их максимуму во всех комплекса (рис 2.2.1.3).

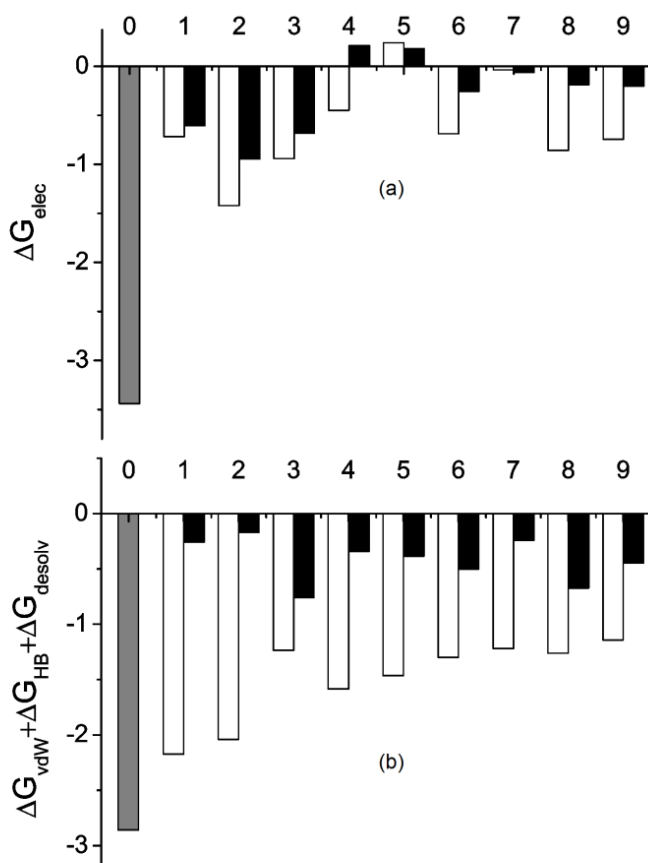


Рис. 2.2.1. Рассчитанные компоненты энергии взаимодействия ΔG_{elec} (верхний) и ($\Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{sol}$) (нижний) в ккал / моль в комплексах фрагмента каррагинана с девятью желатиновыми фрагментами: тройная спираль желатина с гибким каррагинаном (пустые столбцы) и тройная спираль желатина с двойной спиралью каррагинана (черные

полосы). Серая полоса нулевой отметки соответствует значениям взаимодействия между суперспиралью желатина и каррабиозной единицей.

2.2.1.3 Расчет комплексов двойных спиралей к-каррагинана с одиночной спиралью желатина

На рисунке 2.2.1.3, А приведена геометрия типичного комплекса двойной спирали к-каррагина с одиночной спиралью желатина. Докинг спиральных участков желатина к двойной спирали каррагинана позволил выявить энергетически наиболее вероятные комплексы, где лиганд обвивает стержнеподобный рецептор. Геометрия двойной спирали к-каррагинана обеспечивает равномерное распределение сульфатных групп, образующих три ребра вдоль оси стрежня, расположенных друг относительно друга под углом в 120° . Такая геометрия предполагает, что молекула двойной спирали к-каррагинана может связывать до трех молекул желатина. Заряженные боковые цепи молекулы желатина ориентируются на суперспираль к-каррагинана и образуют солевые мостики с сульфатными группами (рис. 2.2.1.4).

Несмотря на то, что процент отрицательно заряженных групп на единицу поверхности суперспирали к-каррагинана выше по сравнению с одиночной цепью, электростатическая энергия образования комплексов в среднем вдвое уменьшается по сравнению с комплексами суперспирали желатина и одной цепью к-каррагинана (2.2.1.2).

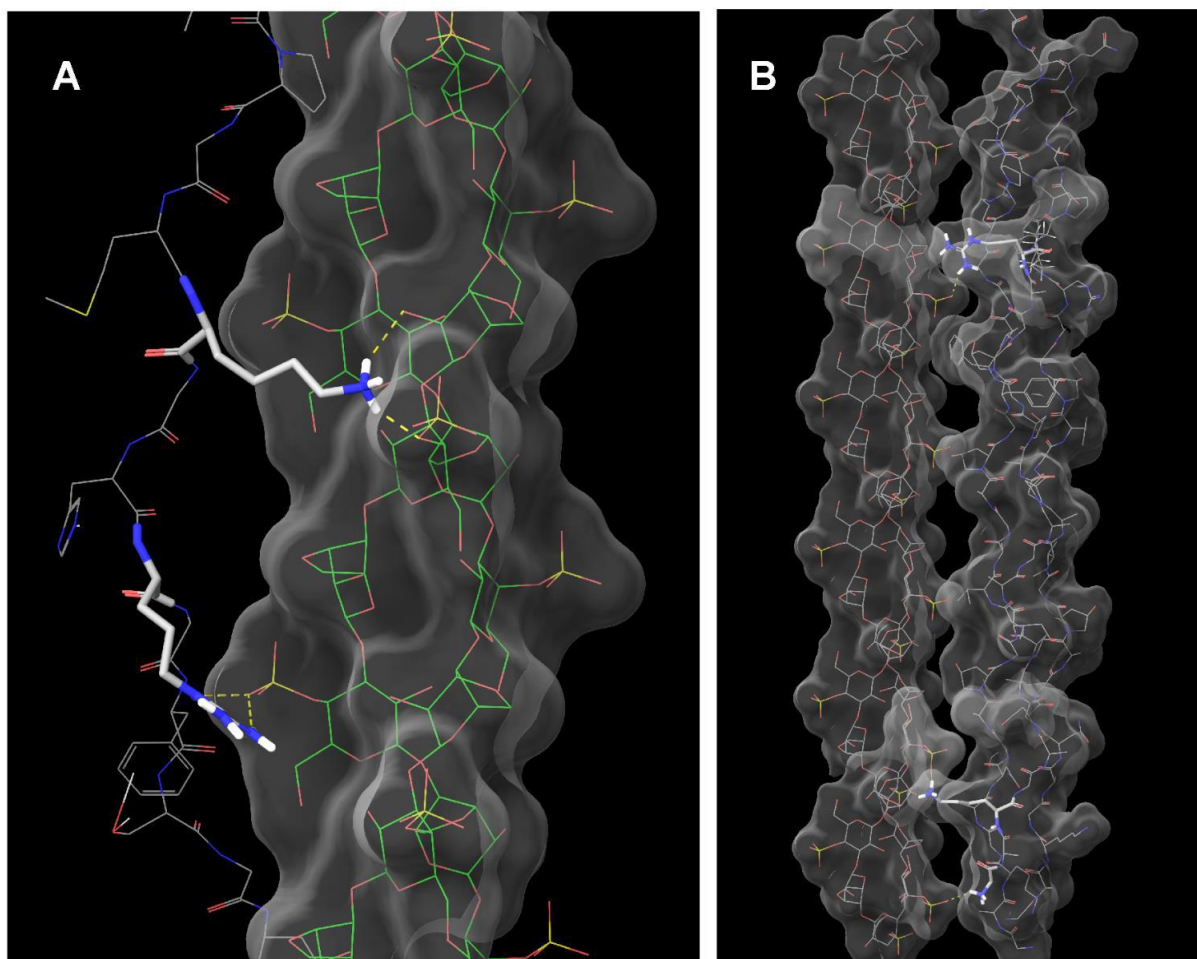


Рис. 2.2.1.3. Наиболее благоприятные комплексы суперспирали к-каррагинана с одиночными (А) и тройными (В) спиралями желатина. Молекулярная поверхность показана прозрачно-серой. Взаимодействующие остатки желатина показаны жирной линией. Водородные связи показаны пунктирными линиями.

2.2.1.4 Расчет комплексов суперспиралей к-каррагинана и желатина

Тройная спираль желатина и двойная спираль к-каррагинана образуют ван-дер-ваальсовы контакты и солевые мостики между остатками ARG и LYS с сульфатными группами. Количество солевых мостиков определяет взаимную ориентацию спиралей. При наличии двух или более солевых мостиков стержнеобразные молекулы плотно прилегают друг к другу и ориентируются практически соосно (рис. 2.2.1.3, В). То есть отсутствие заряженных групп приводит к образованию углами между осями молекул к-каррагинана и желатина. Параллельная ориентация является энергетически наиболее выгодной.

Общая энергия взаимодействия суперспиралей (рис. 2.2.1) демонстрирует линейную зависимость от числа положительно заряженных остатков желатина. Таким образом, несмотря на довольно ограниченное количество солевых мостиков (рис. 2.2.1.4), обнаружено, что электростатические взаимодействия являются определяющими при комплексообразовании.

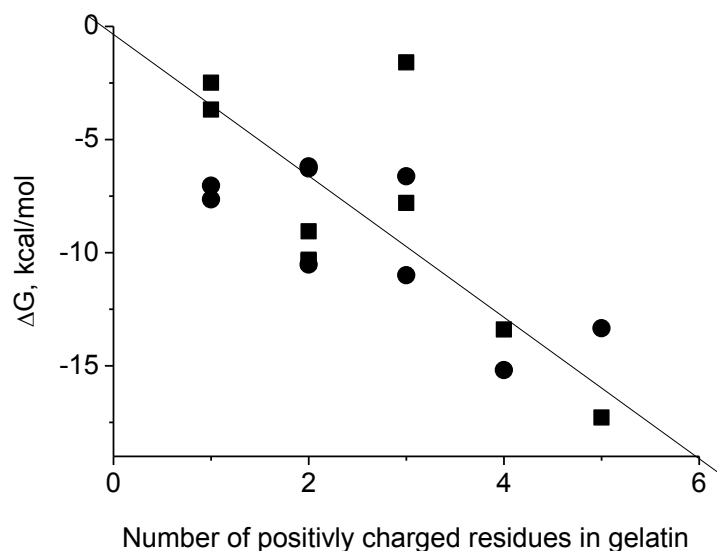


Рис. 2.2.1.4. График энергии взаимодействия комплексов между суперспиралью к-каррагинана с одиночной спиралью (обозначено кругами) и тройными спиральями (обозначено квадратами) желатина в сравнении с количеством положительно заряженных групп в аминокислотной последовательности желатина

2.2.2 Структурный базис гелей желатина в присутствии к-каррагинана по данным ИК спектроскопии

2.2.2.1 Определение спектральных детерминант для вторичных структур к-каррагинана

На рисунке 2.3.1 представлен типичный спектр геля к-каррагинана и подписаны его основные полосы поглощения [18]. В спектрах к-каррагина полосы в области $1300-1200\text{ см}^{-1}$ и $1100-1000\text{ см}^{-1}$ объясняются

растягивающими колебаниями сульфатных групп и связными колебаниями ν C-C, ν C-O и δ СОН пиранозного кольца соответственно.

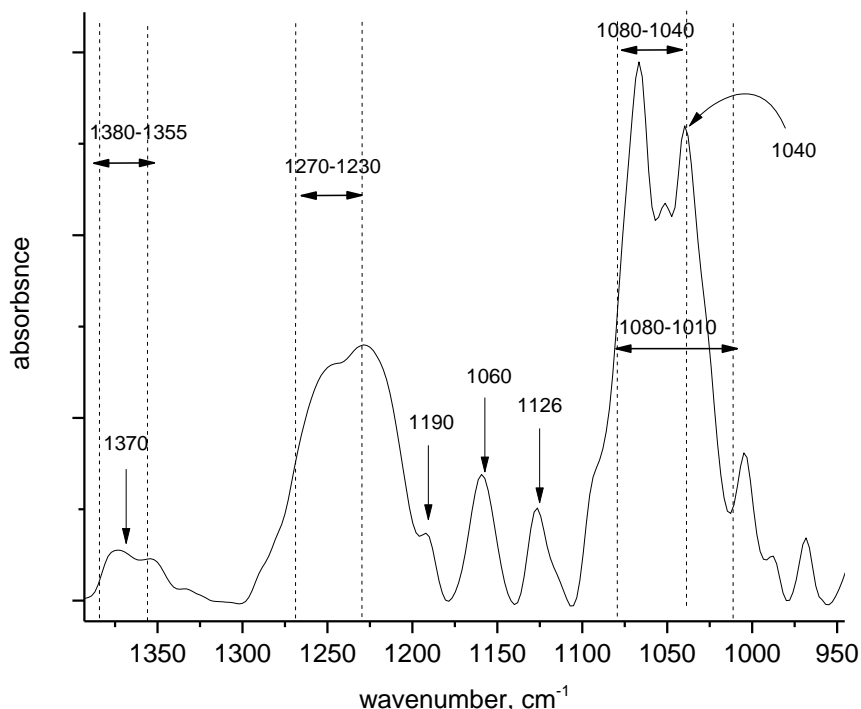


Рис.2.3.1. Основные полосы поглощения κ -каррагинана при комнатной температуре. 1380-1355 – сульфаты (растяжение), 1370 – метиленовая группа (загибание), 1270-1230 – O=S=O (асимметричное растяжение), 1190 – S=O (асимметричное растяжение), 1060 – C-O-C (асимметричное растяжение), 1080-1040 – комбинация C-O и C-OH полос, 1040 – C-OH и S=O, 1080-1010 – гликозидные связи.

Для полисахаридов нет соотношения полос ИК спектров, свидетельствующих о спиральности κ -каррагинана. При золь-гель переходе в области «отпечатков пальцев» основные колебания κ -каррагинана приходятся на 1100-1000 см⁻¹ и ниже. При этом для κ -каррагинана характерны коллективные колебания, то есть вся молекулярная структура колеблется одновременно.

На рисунке 2.3.2. (а, с) представлены спектры поглощения κ -каррагинана с солью NaI в области «отпечатков пальцев» при гель-золь

переходе (гель - синим, золь – красным, переходное состояние - зеленым). При добавлении соли NaI конформационный переход клубок-спираль в системе золь-гель происходит без агрегации суперспиралей к-каррагинана. Такой гель является термообративным, поэтому особенно наглядно выглядит разница между гелем и золем на спектрах вторых производных (рис. 2.3.2 б, d).

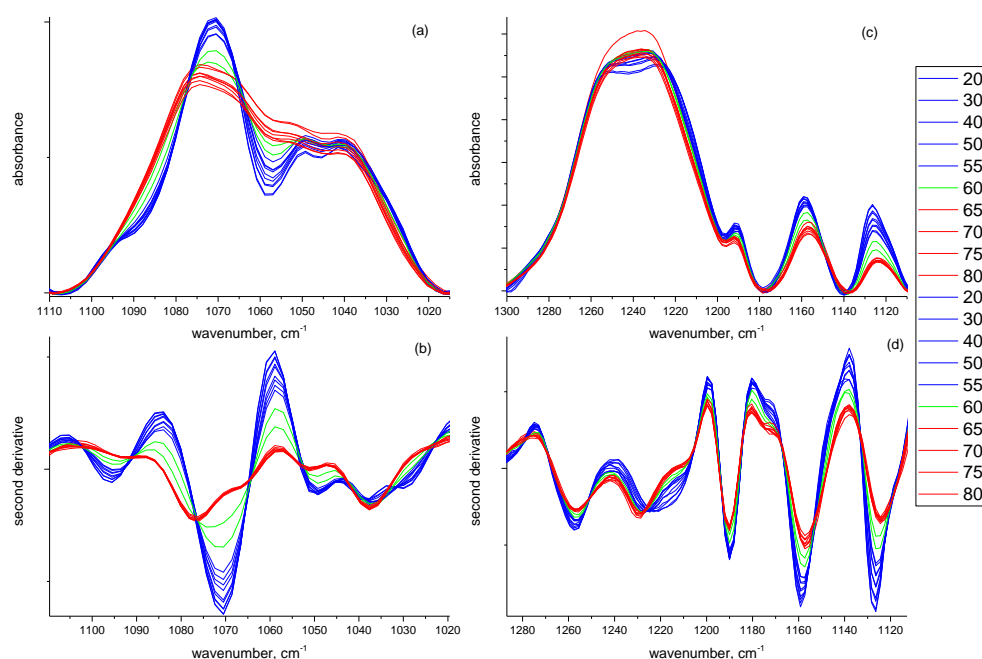


Рис.2.3.2. Спектры оптической плотности (а), (с) и второй производной (б), (d) pure_Car2%+0.2NaI_h2o для частотных диапазонов 1110-1120 см⁻¹ и 1280-1100 см⁻¹.

Гель – синим цветом, золь – красными.

При добавлении в раствор к-каррагинана соли KCl приводит к индуцированной агрегации спиралей к-каррагинан. На рисунке 2.3.3 представлены спектры в области «отпечатков пальцев» при охлаждении и нагреве к-каррагинана в присутствии KCl (а, с) и спектры вторых производных (б, d).

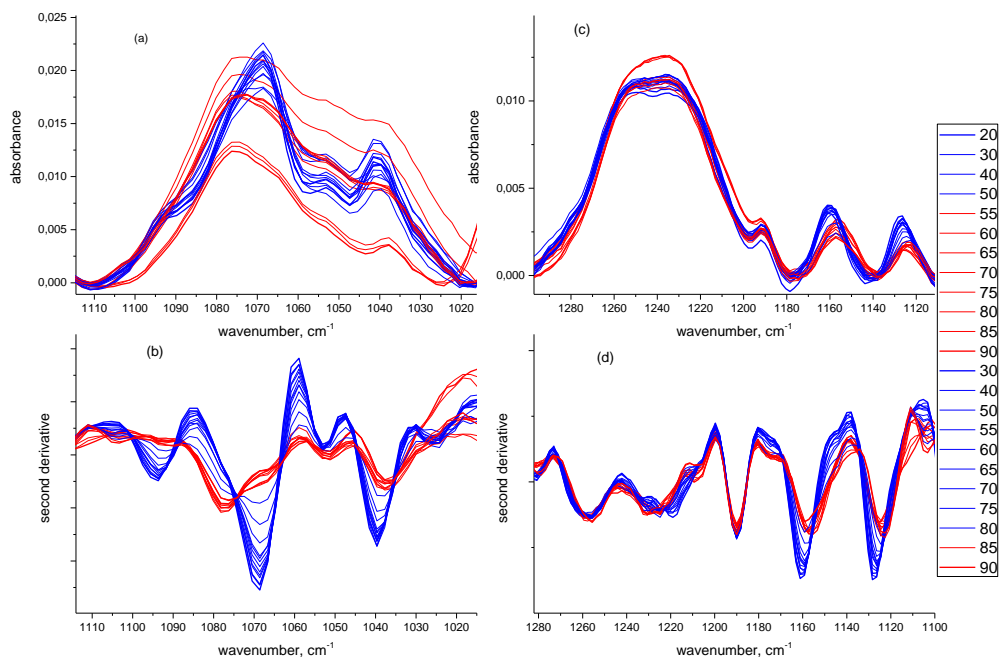


Рис. 2.3.3. Спектры оптической плотности (а), (с) и второй производной (b), (d) Car2%+KCl_h2o для частотных диапазонов 1110-1120 cm^{-1} и 1280-1100 cm^{-1} . Гель – синим цветом, золь – красными.

Метод ИК спектроскопии чувствителен к изменениям вторичной структуры геля. Следовательно, наличие или отсутствие агрегации суперспиралей к-каррагинана является основным маркером для соотнесения спектральных линий при изменении вторичной структуры полисахарида.

На рисунке 2.3.4 представлены характерные полосы к-каррагинана в присутствии соли KCl (а) и NaI (b) от температур. Появление температурного гистерезиса полосы (рис. 2.3.4, а) 1078 cm^{-1} объясняется агрегацией суперспиралей к-каррагинана.

При рассмотрении полос других функциональных групп, можно выделить такие, у которых наблюдаются температурные гистерезисы при добавлении KCl, а при добавлении NaI температурных гистерезисов нет. Одним таким примером служит полоса при 1215 cm^{-1} , которая удовлетворяет двум условиям формирования гелей, но не подходит для дальнейшего

анализа, потому что форма температурных зависимостей не соотносится с формой зависимостей реологических характеристик от температуры, предложенных в работе [19].

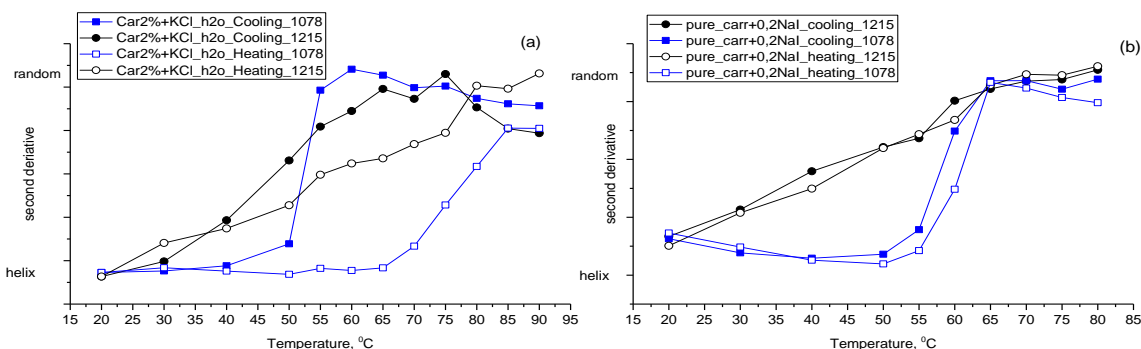


Рис.2.3.4. Зависимость изменения интенсивности спектра второй производной на частоте 1078 см^{-1} (квадраты) (а) и 1260 см^{-1} (круги) (б) от температуры образцов Car2%+NaI и Car2%+KCl (Cooling – solid symbols, Heating – open symbols).

Форма графика температурной зависимости полосы при 1078 см^{-1} , представленная на рис. 2.3.4 (а) согласуется с литературными данными [20] – при охлаждении раствора (закрашенные круги) наблюдается резкий перепад интенсивности второй производной при 50⁰ С, а при нагреве плавный ход характерен для рассматриваемой концентрации к-каррагинана (2%). Наблюдаемый гистерезис составляет 35⁰ С и определяется следующими факторами:

- 1) Гель-золь переход (закрашенные круги) происходит при нагреве образца до определенной температуры. То есть упорядоченная структура, сформированная суперспиралями и агрегатами из суперспиралей, разрушается при температуре 50⁰ С, и к-каррагинан принимает форму случайной катушки.
- 2) При золь-гель переходе формирование геля происходит с температурной задержкой в 20⁰ С, то есть переход от неупорядоченной структуры (катушек) к упорядоченной (суперспиралям). Это объясняется набором прочности геля за счет агрегации суперспиралей к-каррагинана в “стопочки” до восьми

штук. При дальнейшем уменьшении температуры структура сетки геля не видоизменяется.

На рисунке 2.3.4 (b) показано изменение интенсивности полосы второй производной к-каррагинан с NaI при 1078 см^{-1} как абсолютное значение от температуры. Гистерезиса не наблюдается, что согласуется с литературными данными [19], так как не происходит агрегация спиралей:

- 1) Гель-золь переход происходит при нагреве образца с 55 до $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (в этом диапазоне происходит переход из упорядоченной структуры (двойные спирали) в неупорядоченную (статистический клубок)), гистерезис не наблюдается.
- 2) Гели к-каррагинана, в которых не происходит агрегация спиралей, но происходит переход в жесткую (упорядоченную) структуру, называют “слабыми” гелями. Сети “слабых” гелей к-каррагинана не способны удерживать суспензии в течение длительного периода времени из-за возникающего синерезиса.

Таким образом, полосы в области «отпечатков пальцев» чувствительны к структурным переходам спираль-клубок. Полосы при 1070 , 1040 и 1090 см^{-1} могут быть использованы для анализа вторичных структур полисахарида. Полоса $1070\text{-}1080 \text{ см}^{-1}$ соответствует образованию суперспиралей к-каррагинана.

2.2.2.2 Особенности гелеобразования бинарных гелей при различных концентрациях к-каррагинана

Принципиальное значение имеет ответ на вопрос, какие конформационные изменения желатина и к-каррагинана и какие именно связи ответственны за образование двухкомпонентного геля. Спектральные

изменения объясняются возникновением электростатических взаимодействий противоположно заряженных функциональных групп макромолекул биополимеров при формировании полиэлектролитных комплексов в водных системах (2.2.1).

Анализ работ [15, 16] по ИК Фурье спектроскопии показывает, что комплексообразование с полисахаридом приводит к конформационным изменениям макромолекул желатина, сопровождающимся увеличением доли упорядоченных структур.

На рисунке 2.2.1 приведены спектры поглощения и спектры второй производной желатина при температурах выше и ниже температуры плавления. Амид I состоит из пяти компонент при 1630, 1645, 1660, 1683 и 1692 cm^{-1} . Основная компонента при 1630 cm^{-1} относится к полосе водородных связей и β -листам. Компонента при 1660 cm^{-1} является результатом поглощения α -спиралей. Полоса при 1645 cm^{-1} приписывается к случайным катушкам, полосы при 1683 и 1692 cm^{-1} обусловлены поглощением β -витка. При охлаждении 1% желатина в спектрах наблюдается уменьшение полосы поглощения случайной катушки и β -поворота при 1645 и 1683 cm^{-1} соответственно, и увеличение доли α -спиралей при полосе 1660 cm^{-1} . Наблюдаемые спектральные изменения при гелеобразовании соответствуют ранее сообщенным данным о коллагене и с общепринятой теорией.

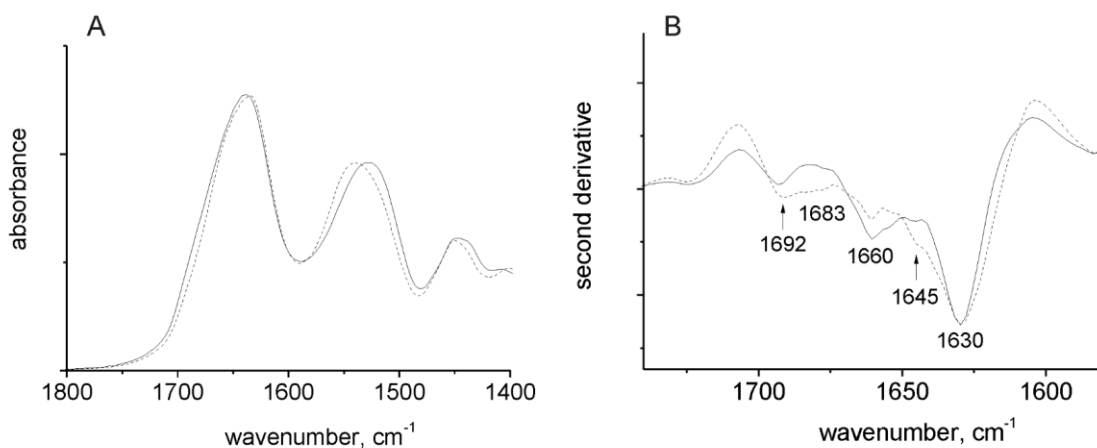


Рис. 2.2.1. Спектры поглощения (А) и спектры второй производной (В) желатиновых пленок ($C_G=1\%$), полученные из раствора при 52°C (пунктирная линия) и гель при 22°C (сплошная линия).

В комплексных гелях желатин-к-каррагинан, максимум Амида I смещается по сравнению со спектром чистого геля желатина (рис. 2.2.2).

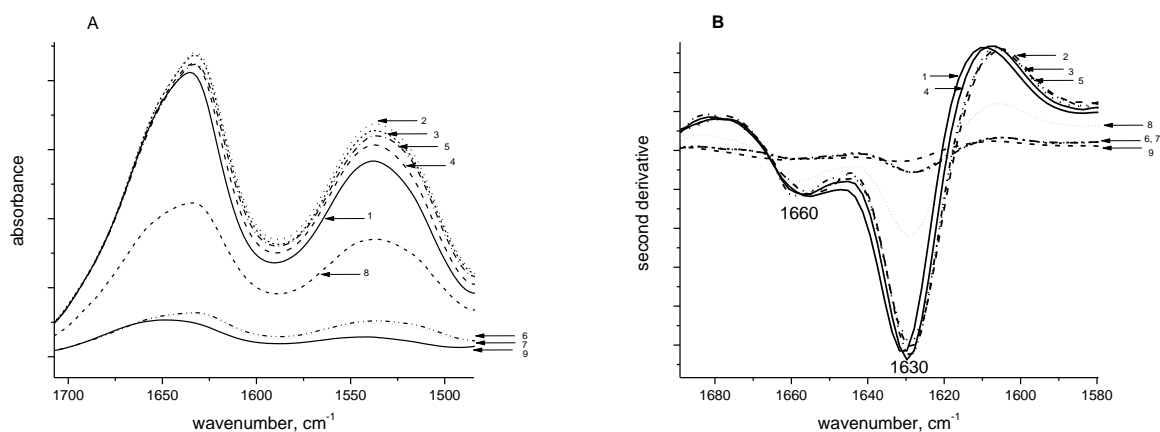


Рис. 2.2.2. Спектры поглощения (А) и спектры второй производной (В) пленок, полученных путем сушки 2% геля желатина – линия 1, и спектры желатина и к-каррагинана, с компонентным соотношением $Z=0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1$, отмеченные соответственно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.

На рисунке 2.2.3 показано, что значительный прирост доли тройных спиралей желатина в растворе происходит при концентрациях к-каррагинана выше $Z = 0.1$. Такое поведение свидетельствует о двух различных механизмах гелеобразования при $Z < 0.1$ и $Z > 0.1$.

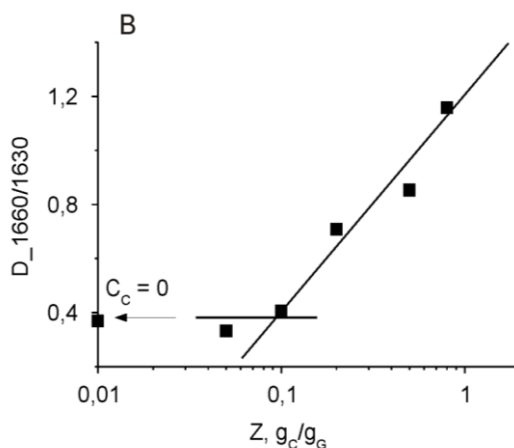


Рис.2.2.3. Отношение интенсивностей второй производной спектров смешанных гелей при 1660 и 1630 см^{-1} .

На рисунке 2.2.4 показано, что прирост двойных спиралей к-каррагинан происходит симбатно приросту тройных спиралей желатина.

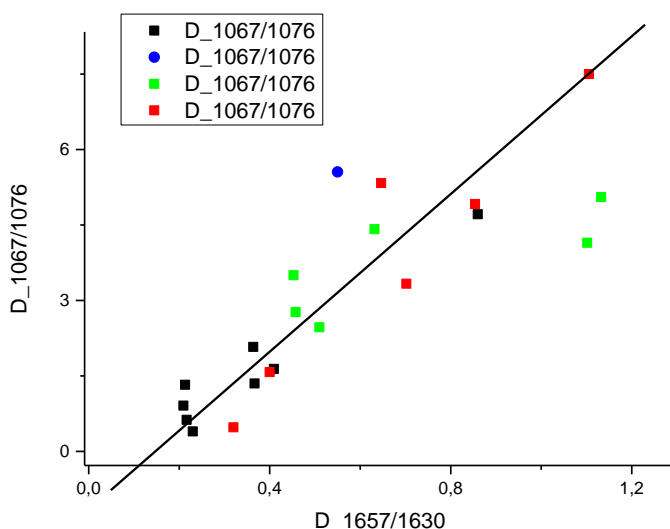


Рис. 2.2.4. Отношение интенсивностей спектров второй производной смешанных гелей при 1067/1076 от 1660/1630 см^{-1} (разными цветами обозначена серия экспериментов).

При концентрациях $Z \leq 0,1$ вторичная структура геля желатина совпадает со структурой чистого 2 % геля, а при концентрациях $Z > 0,1$ происходят некие структурные изменения в сетки геля желатина. При $Z < 0,1$ в водной смеси формируются полиэлектролитные комплексы к-каррагинан – желатин, находящиеся в равновесии с несвязными макромолекулами желатина. В области $Z \geq 0,1$ концентрация полиэлектролитных комплексов растет и они проявляют способность к агрегации.

2.2.2.3 Гель-золь переход в смешанных гелях

Для определения влияния к-каррагинана в бинарных гелях, будем анализировать область, характерную для желатина (2.4.1 а, с) по ИК

спектрам геля, приготовленного в тяжелой воде D₂O при вариации температуры от 15 до 80 °С. Для анализа области ИК спектров, характерной для κ-каррагинана (2.4.2 а, с), рассмотрим гель желатин-κ-каррагинана, приготовленной в H₂O в широком температурном диапазоне от 15 до 80 °С.

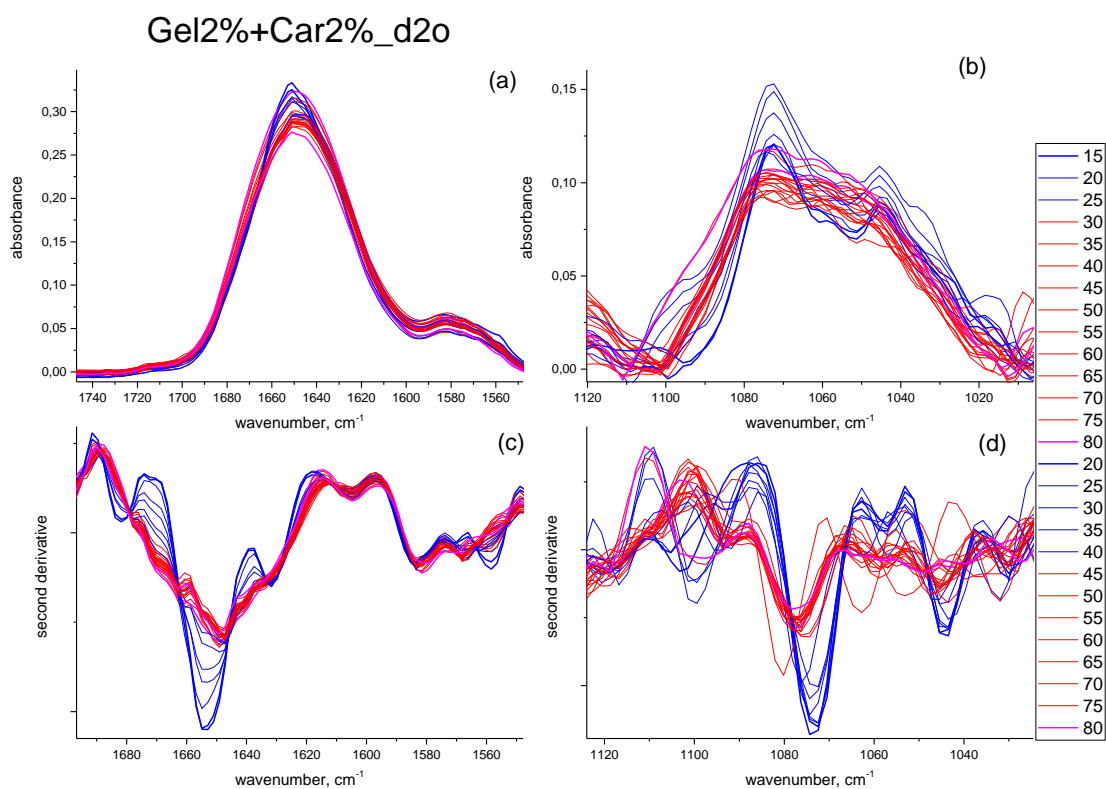


Рис.2.4.1. Спектры смешанных H₂O гелей (а, б) и вторые производные ИК спектров (с, д) смешанных гелей для диапазонов 1700 – 1500 см⁻¹ (а, с – желатин) и 1120 – 1000 см⁻¹ (б, д – κ-каррагинан).

Необходимость прописывать ИК спектры гелей, приготовленных в лёгкой воде и тяжелой воде, возникает из-за того, что D₂O не видны структурные изменения κ-каррагинана (рис. 2.4.1, б, д), а в H₂O структурные изменения желатина (рис. 2.4.2, б, д).

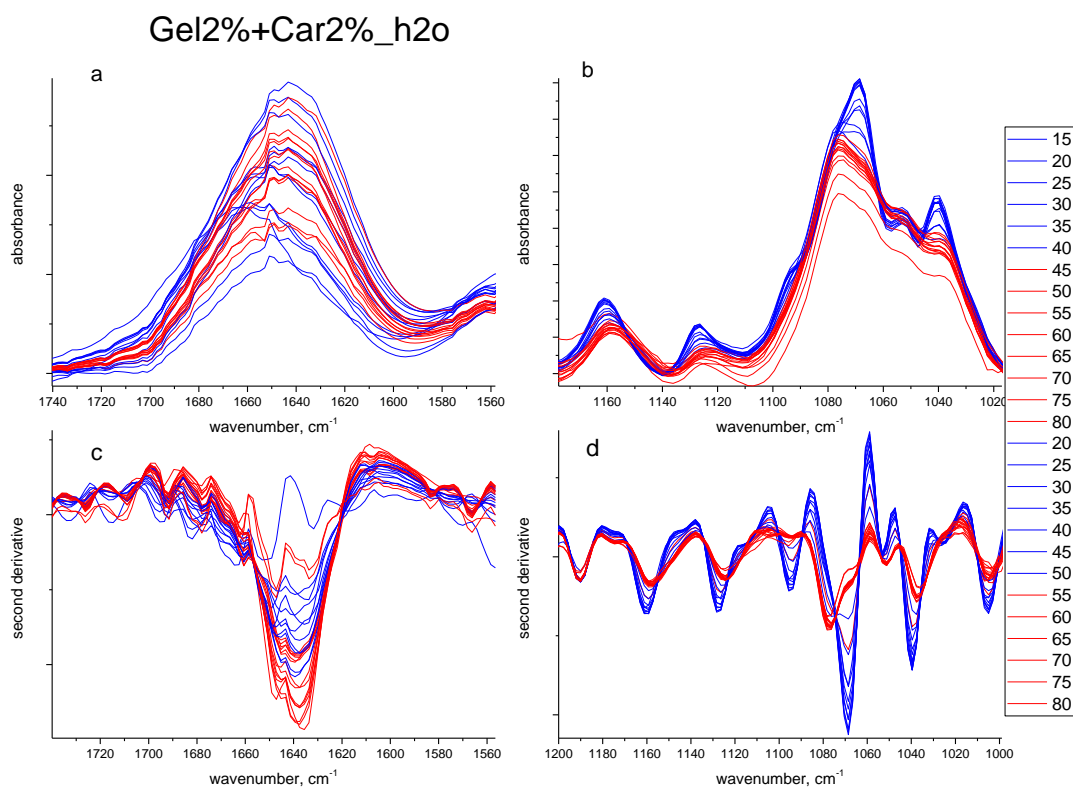


Рис. 2.4.2. Спектры смешанных D₂O гелей (a, b) и вторые производные ИК спектров (c, d) смешанных гелей для диапазонов 1700 – 1500 см⁻¹ (a, c – желатин) и 1120 – 1000 см⁻¹ (b, d – к-каррагинан).

Рассмотрим область «отпечатков пальцев» при гель-золь-гель переходе для к-каррагинана и для смешанного геля. На рис. 2.3.4, а) представлено изменение интенсивности второй производной полосы 1078 см⁻¹, которая соответствует образованию двойных спиралей к-каррагинана, для чистого к-каррагинана и смеси к-каррагинан-желатин в водном растворе.

- 1) Из графика видно, что форма температурных гистерезисов совпадает, т.е. присутствие желатина не влияет на спирализацию к-каррагинана.
- 2) Для обоих образцов справедливо, что при нагреве агрегаты суперспиралей существуют до 30 °С, а гель-золь переход происходит при 40 °С. При охлаждении формирование суперспиралей начинается при 55 °С, а становление сетки твердого геля в присутствии агрегатов к-каррагинана завершается при достижении температур ниже 30 °С.

3) И при индуцированной агрегации спиралей к-каррагинана (2.2.2.2) и в данном случае (car2%_h2o, gel2%+car2%_h2o), температурный гистерезис составляет 35 °С.

Рассмотрим спектральную область, характерную для желатина. На рис. 2.4.3, б) представлено изменение интенсивности спектра второй производной полосы 1653 см⁻¹, которая соответствует образованию тройных спиралей желатина, для чистого желатина и смеси желатин-к-каррагинан в тяжелой воде. Для геля желатина наблюдается температурный гистерезис в 5 °С, что согласуется с литературными данными [21]. А для смеси желатин-к-каррагинан гистерезис увеличивается до 15 °С, это говорит о том, что присутствие к-каррагинана влияет на вторичную структуру желатина. Возможно, это говорит об образовании ассоциаций между суперспиралями желатина. Стоит отметить, что в данном эксперименте соотношение массовых концентраций к-каррагинана и желатина $Z = 1$.

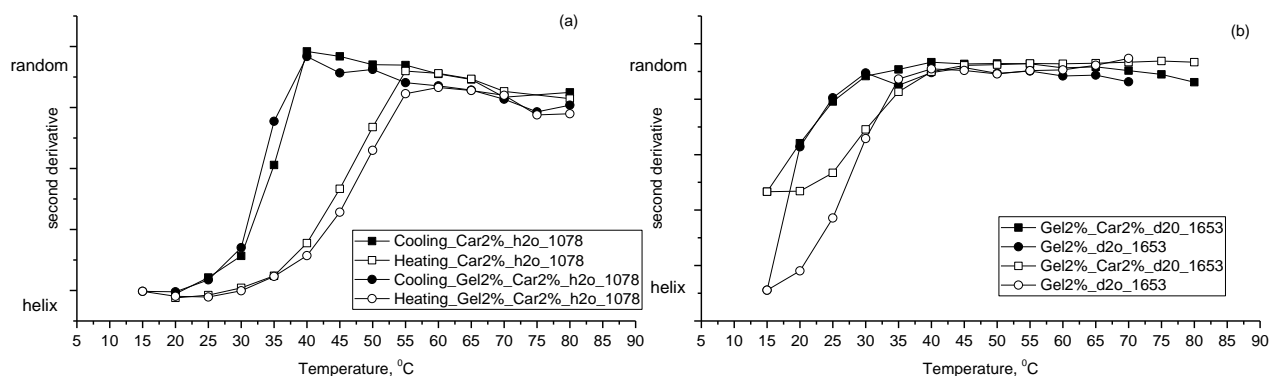


Рис. 2.4.3. Зависимость изменения интенсивности спектра второй производной на частоте 1078 см⁻¹ (квадраты) (а) и 1653 см⁻¹ (круги) (б) от температуры (Cooling – solid symbols, Heating – open symbols).

2.2.2.4 Водородный показатель для систем различных концентраций

Изоэлектрическая точка - кислотность среды (pH), при которой молекула или поверхность не несет электрического заряда. Белки являются

амфотерными молекулами, так как содержат и кислотные, и основные функциональные группы. Общий заряд белка определяется боковыми группами аминокислот, которые могут быть положительно- или отрицательно заряженными, нейтральными или полярными. Общий заряд белка при pH ниже изоэлектрической точки является положительным. Наоборот, при pH выше изоэлектрической точки общий заряд белка – отрицательный. В самой изоэлектрической точке сумма положительных и зарядов на белковой молекуле равна сумме отрицательных, поэтому будучи помещена в электрическое поле такая молекула не двигается.

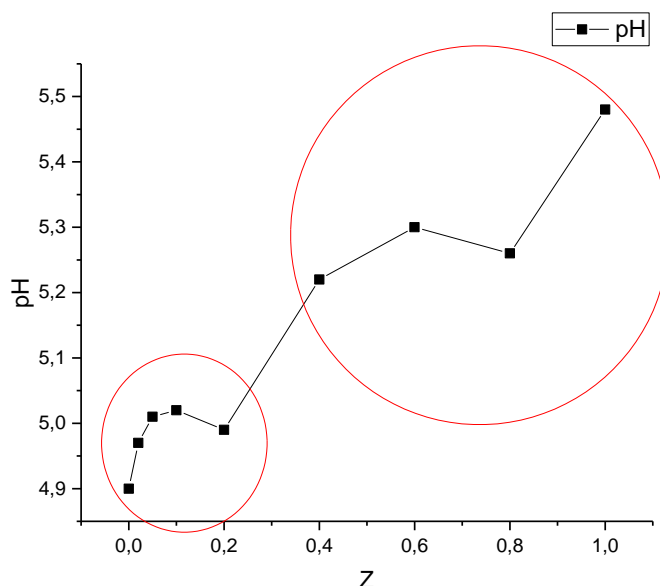


Рис.2.5.1. Зависимость pH от концентрации Z в растворах желатина с к-каррагинаном.

На рисунке 2.5.1. показана зависимость pH раствора желатин-к-каррагинан от концентрации к-каррагинана. Изоэлектрическая точка желатина $pI_{\text{жел}}=4,9$, что согласуется с литературными данными, а к-каррагинана $pI_{\text{кар}}=7$. Данные Деркач [24] показывают, что полиэлектролитный комплекс образуется несмотря на то, что взаимодействие происходит при значениях pH (5–5,5), немного превышающих изоэлектрическую точку желатина, при которых желатина и к-каррагинан заряжены одноименно. Это возможно вследствие особенностей строения

желатины, как слабого полиэлектролита, и не значительного отклонения рН от ее изоэлектрической точки.

к-каррагинан (ММ 430 kDa) является более высокомолекулярным биополимером, чем желатин (ММ 96 kDa), макромолекулярные клубки в растворах к-каррагинана ($R = 35\text{--}39\text{ nm}$) значительно крупнее клубков в растворе желатины ($R = 9\text{ nm}$). Кроме того при $pH > pI_{\text{жел}}$ сульфатной группы к-каррагинана почти полностью ионизированы, а ионизация Lys, Hyl, His и Arg желатины частично подавлена. В связи с этим можно предположить, что с одной макромолекулой к-каррагинана электростатически связывается несколько макромолекул желатины. В образовавшемся комплексе к-каррагинан играет роль лиофилизующего, а желатина – блокирующего полиэлектролита, или соответственно "полиэлектролита–хозяина" и "полиэлектролита–гостя".

Известно, что рН оказывает влияние на комплексную коацервацию белково-полисахаридной смеси. При повышении рН начальная температура увеличения мутности раствора переходит в более низкие температуры. Коацерватная фаза уменьшается с увеличением рН и почти исчезает при $pH > 9.0$. [22] Мы видим, что резкое возрастание значений рН растворов приходится на $Z=0,2$, но этого недостаточно, чтобы говорить о коацерватных состояниях молекулы и о сила связывания гидратной воды желатином и к-каррагинаном.

2.2.2.5. Температурное смещение полосы деформационных колебаний воды

Поглощением в ИК области обладают молекулы, дипольные моменты которых изменяются при возбуждении колебательных движений ядер. К основным молекулярным колебаниям, которые появляются в ИК спектре, как было показано ранее, относятся валентные колебания, деформационные,

торсионные и либрационные. На рисунке 2.6.1. представлен деформационный сдвиг полосы воды H_2O при увеличении температуры с 30 до 60 $^\circ\text{C}$.

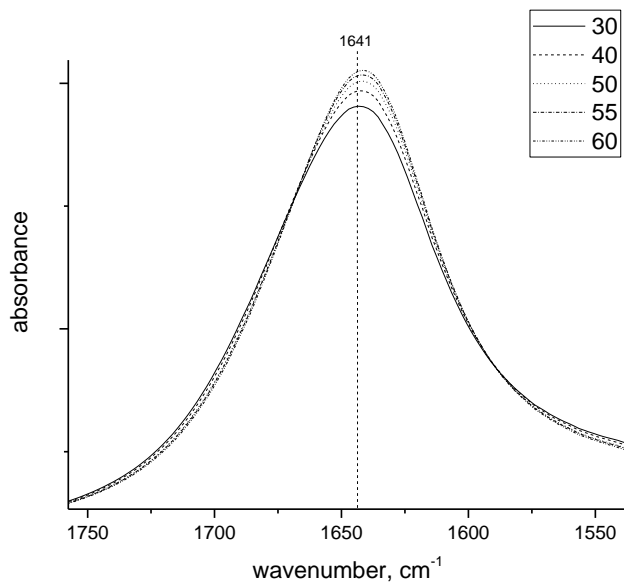


Рис. 2.6.1. Спектры деформационных колебаний воды при различных температурах

Наряду с валентными νOH -колебаниями воды, приводящие к изменению длины связи, представляет интерес проанализировать положение полосы ее деформационных колебаний при 1660 cm^{-1} [23]. Деформационные колебания (δ) подразумевают под собой колебательные движения ядер, приводящие к изменению углов между связями. Деформационные частоты чувствительны к изменению прочности образуемых водой водородных связей.

На рис. 2.6.2 представлены сдвиги деформационных колебаний воды δOH в различных комплексах. На графике видно, что наиболее связанная вода существует в комплексе желатин-к-каррагинан при температурах, ниже температуры плавления. При температурах выше 32 $^\circ\text{C}$ желатин и комплекс к-каррагинан-желатин одинаково связывают (удерживают) воду. Сдвиг деформационных колебаний воды в растворе к-каррагинана не отличается от сдвига деформационных колебаний воды по углу наклона δOH . Таким

образом, можно сказать, что вода связана сильнее с желатином, чем с к-каррагинаном.

Для определения энергетических характеристик связывания воды для растворов желатин-к-каррагинан различных массовых концентраций Z , воспользуемся методом диэлектрической спектроскопии.

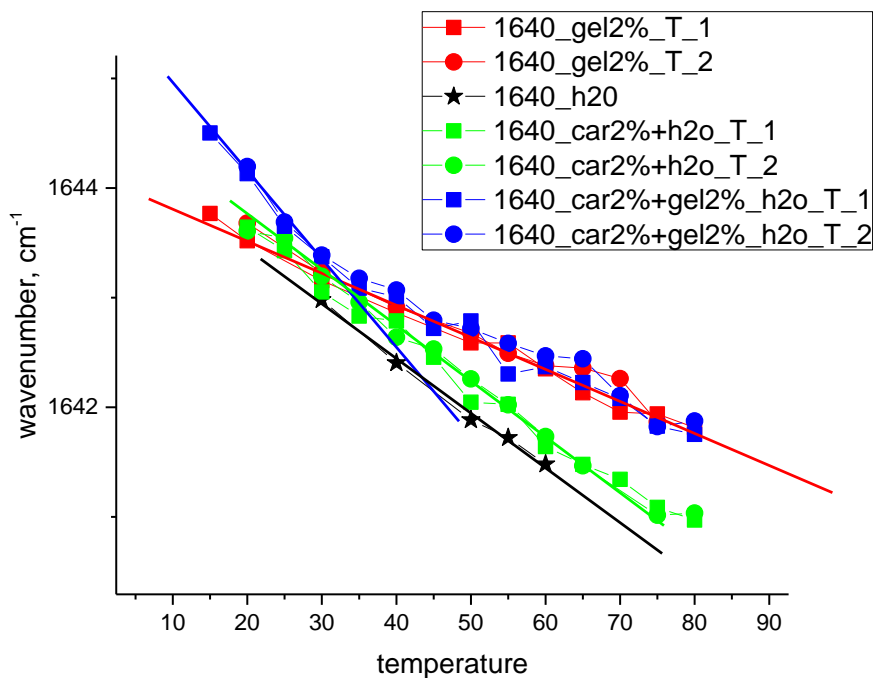


Рис.2.6.2. Сдвиг полосы деформационных колебаний воды для раствора желатина (красным), воды (черным), для раствора к-каррагинана (зеленым) и для раствора к-каррагинан-желатин (синим).

2.2.3. По данным диэлектрической спектроскопии

В результате анализа диэлектрических спектров были рассчитаны времена диэлектрической релаксации и построены температурные зависимости. На рис. 3.1.1 показаны температурные зависимости времени релаксации для образцов различной концентрации Z .

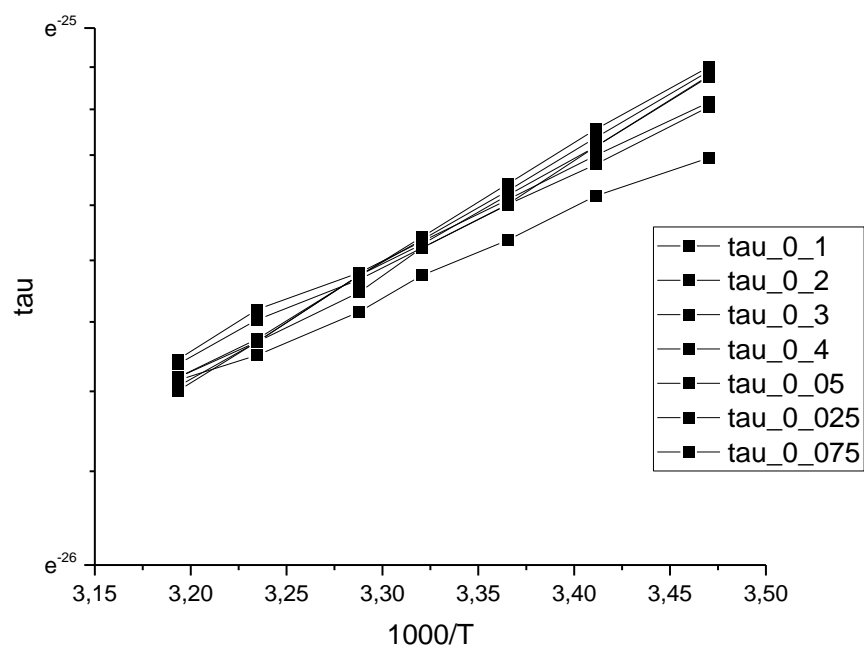


Рис. 3.1.1. Логарифмическая зависимость времени релаксации τ от обратных температур ($1000/T$) в K^{-1} при различных концентрациях Z κ -каррагинана к желатину.

Процесс диэлектрической релаксации представляет собой сочетание вращательных качаний молекул около некоторых временных положений равновесия и последующих быстрых, скачкообразных переориентации, приводящих к переходу молекулы в новое положение равновесия. Таким образом, переориентация молекул имеет характер активированных скачков через потенциальный барьер. Следовательно, процесс диэлектрической релаксации можно обсуждать в понятиях теории абсолютных скоростей реакций. Процесс перехода молекулы из одного положения равновесия в другое требует свободную энергию активации для преодоления энергетического барьера, определяющие эти положения равновесия. Частота такого процесса перехода определяется величиной $1/\tau$, а время релаксации τ связано с изменением свободной энергии активации дипольной релаксации ΔF следующим соотношением [35]:

$$\tau = \frac{hN}{RT} \exp\left[\frac{\Delta F}{RT}\right], \quad (5)$$

где h — постоянная Планка; R — газовая постоянная; N — число Авогадро.

На рис. 3.1.2 приведены рассчитанные энергии активации процесса диэлектрической релаксации (в кДж/моль) для рассматриваемых образцов (пункт 2.1.3). На графике пунктирными линиями обозначены уровни, соответствующие энергии активации воды H_2O и к-каррагинана, синим и оранжевым цветом.

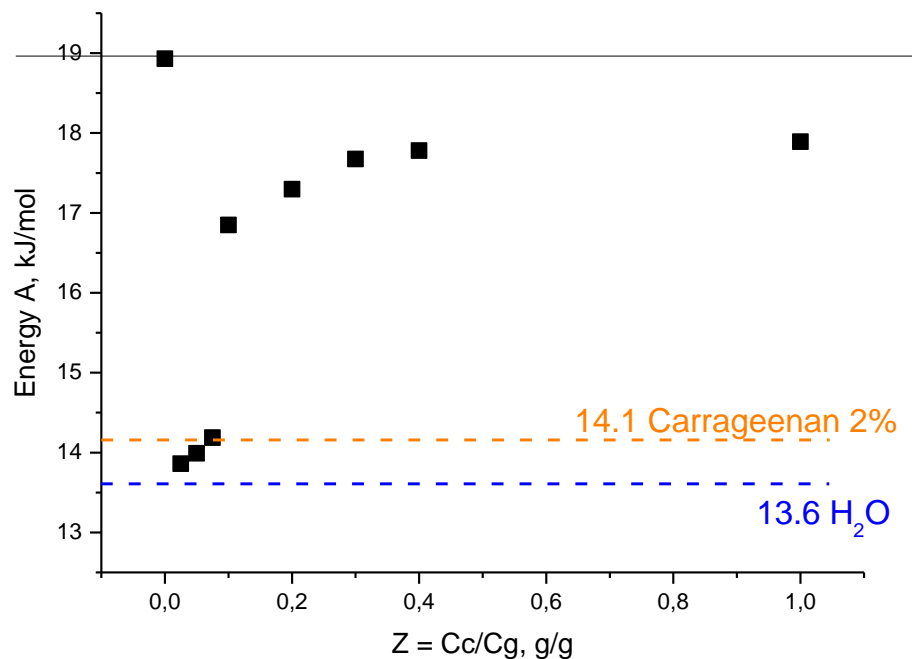


Рис. 3.1.2. Зависимость энергии активации (кДж/моль) от концентрации Z . Синий пунктир соответствует уровню энергии активации воды, оранжевый – уровень к-каррагинана.

На рис.3.1.2 показано, что при низких концентрациях ($Z = 0.025, 0.05, 0.075$) энергия активации комплексов сравнима с энергией активации чистого к-каррагинана. Учитывая, что в смесях желатин-к-каррагинан наблюдается

эффект коацервации (2.2.2.5), предполагаем, что образовавшиеся комплексы нарушают гидратную оболочку желатина, уменьшая "количество" связанной воды.

Увеличение энергии активации при $Z > 0.1$ связано со спирализацией к-каррагинана и образованием слабосвязанных комплексов с "нетронутой" гидратной оболочкой отдельных компонент.

Энергия активации при $Z=1$ ниже, чем в чистом желатине. Значит образование комплексов желатин-к-каррагинан ведет к частичному экранированию гидратных компонент от воды.

Энергия активации чистого к-каррагинана существенно ниже чем энергия активации желатина и энергия активации смеси желатин-к-каррагинан. Энергия связи полисахарида с водой сравним с энергией для самой воды, что согласуется с данными по ИК спектроскопии по деформационным колебаниям воды (2.2.2.6). Для обоих методов спектроскопии справедливо, что вода связана сильнее с желатином, чем с к-каррагинаном.

Для визуализации комплексов с нарушенной и "нетронутой" гидратной оболочкой молекул, воспользуемся результатами молекулярного докинга. В случаях, когда $Z \leq 0.1$ (рис. 3.1.3, а) цепь к-каррагинана не образует двойных спиралей и полностью повторяет геометрию суперспирали желатина. При $Z > 0.1$ суперспирали желатина и к-каррагинана состыкуются, образуя солевые мостики, при этом не нарушая свои гидратные оболочки, как показано на рис. 3.1.3, (б).

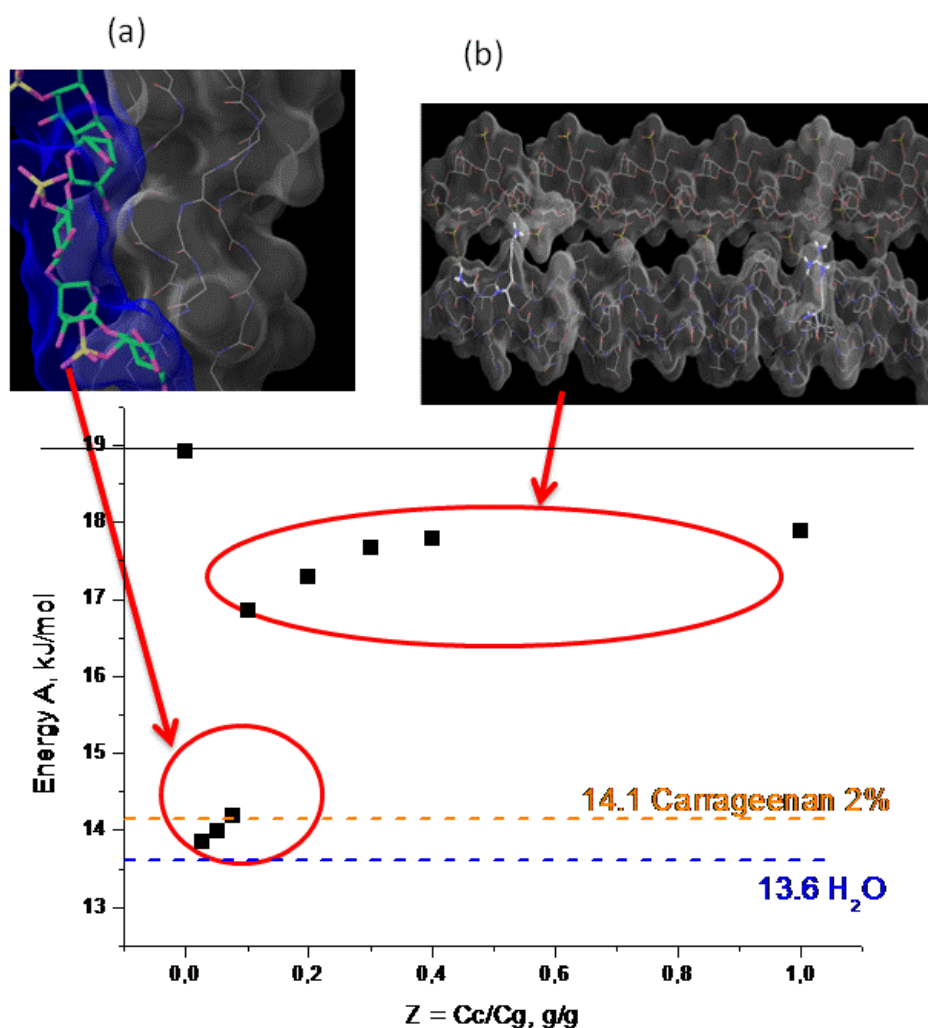


Рис.3.1.3. Сопоставление энергий активации образцов с визуализацией комплексов молекул для $Z \leq 0.1$ (a) и $Z > 0.1$ (b).

Стоит напомнить, что по результатам ИК спектроскопии (2.2.2) при низких концентрациях $Z \leq 0.1$ к-каррагинан не образует суперспиралей, а при $Z > 0.1$ образует, что отлично согласуется с остальными двумя методами, которые описывают взаимодействие белок-полисахарид в данной работе. Соответственно, различия существенные различия в энергии активации при $Z \leq 0.1$ и $Z > 0.1$ обусловлены, в первую очередь, механизмом формирования гелей.

ВЫВОДЫ

- 1) На основании анализа результатов взаимодополняющих методов ИК-спектроскопии, диэлектрической спектроскопии и молекулярного докинга предложена модель взаимодействий молекул желатина и κ-каррагинана в узлах сетки геля.
- 2) Согласно данной модели, при низком значении массового соотношения κ-каррагинана к желатину ($Z < 0.1$ г / г) формируются комплексы тройных спиралей желатина и неупорядоченных цепей κ-каррагинана.
- 3) При высоком значении массового соотношения κ-каррагинана к желатину ($Z > 0.1$ г / г) формируются комплексы преимущественно из тройных спиралей желатина и двойных спиралей κ-каррагинана.

Список использованной литературы

- [1] Johnston-Banks F.A. // Food Gels. Ed. by Harris P. New York: Elsevier, 1990. P. 233.
- [2] Yu Zhao, Yang Li, Shuangshuang Mao, Wei Sun and Rui Yao // The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3D cell printing technology. *Biofabrication*, 7, -2015.
- [3] Myra L. Weiner/ Food additive carrageenan: Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies // Myra L. Weiner. – *Crit Rev Toxicol*, 2014. 44(3), 244–269.
- [4] Вейс, А. Макромолекулярная химия желатина / А. Вейс. – М. : Пищевая промышленность, 1971. – 468 с.
- [5] Р.Блок, Д.Боллинг. Аминокислотный состав белков и пищевых продуктов, М., ИЛ, 1949.
- [6] Rees, D. A., Morris, E. R., Thom, D., & Madden, J. K. // In G. O. Aspinall (Ed.). - *The polysaccharides* (Vol. 1, pp. 192). - Academic Press, -1982.
- [7] Nijenhuis, K. // Thermoreversible networks viscoelastic properties and structure of gels. - *Advances in Polymer Science*, -1997. 130, 203–218.
- [8] Marcelo A. da Silva, Jie Kang, Tam T. T. Bui // Tightening of Gelatin Chemically Crosslinked Networks. - *Polym. Phys.* - 2017. 55, 1850–1858.
- [9] Измайлова В. Н., Ребиндер П. А. Структурообразование в белковых системах. - М.: Наука, 1974. -268 с.
- [10] L. Gasperini, J. F. Mano, Rui L. Reis // Natural polymers for the microencapsulation of cells. - *J. R. Soc. Interface*, - 2014.

- [11] Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка/ Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами // 3-е изд. – М.: КДУ, 2005. – 465 с.
- [12] Fumihiko Tanaka // Thermoreversible Gelation Driven by Coil-to-Helix Transition of Polymers. – *Macromolecules*, - 2003. 36, 5392-5405.
- [13] Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. // *J. Comput. Chem.*, - 2009. (30) 2785.
- [14] Maestro, version 9.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
- [15] Payne, K. J. & Veis, A. // Fourier Transform IR Spectroscopy of Collagen and Gelatin Solutions: Deconvolution of the Amide I Band for Conformational Studies. - *Biopolymers*, - 1988, 27, 1749–1760.
- [16] Prystupa, D. A. & Donald, A. M. // Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states. - *Polymer Gels and Networks*, -1996. 4, 87–110.
- [17] Derkach S.R., Ilyin S. O., Maklakova A.A., Kulichikhin V.G., Malkin A.Y. // The rheology of gelatin hydrogels modified by κ -carrageenan. *LWT - Food Science and Technology*, - 2015. 63, 612-619.
- [18] Murat Sen, Esra Nazan Erboz // Determination of critical gelation conditions of λ -carrageenan by viscosimetric and FT-IR analyses *Food Research International*. – 2010. – 43, 1361–1364.
- [19] S. Ikeda, K. Nishinari // “Weak Gel”-Type Rheological Properties of Aqueous Dispersions of Nonaggregated κ -Carrageenan Helices. -*J. Agric. Food Chem.*, - 2001. - 49, 4436-4441.
- [20] Kara, S., Tamerler, C., Bermek, H., Pekcan, Ö. // Hysteresis during sol-gel and gel-sol phase transitions of κ -carrageenan: A photon transmission study. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, - 2003. - 18(1), с. 33-44.

- [21] Parker, N.G., Povey, M.J.W. // Ultrasonic study of the gelation of gelatin: Phase diagram, hysteresis and kinetics. *Food Hydrocolloids*. – 2012. - 26(1), с. 99-107.
- [22] Wang, L., Cao, Y., Zhang, K., Nishinari, K., Phillips, G.O. // Hydrogen bonding enhances the electrostatic complex coacervation between κ -carrageenan and gelatin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, - 2015. - 482, с. 604-610.
- [23] Г.Е. Бордина, Г.М. Зубарева // Инфракрасная спектроскопия водных систем. – 2004. - 543.3.42.
- [24] С. Р. Деркач, Н. Г. Воронько, А. А. Маклакова, Ю. В. Кондратюк // Реологические свойства гелей желатины с κ -каррагинаном. –Коллоидный журнал, - 2014. том 76, № 2, с. 164–170.
- [25] Qiao, C., Zhang, J., Ma, X., Liu, W., Liu, Q. // Effect of salt on the coil-helix transition of gelatin at early stages: Optical rotation, rheology and DSC studies. - *International Journal of Biological Macromolecules*, - 2018. - 107(PartA), с. 1074-1079.
- [26] Qiao, C., Zhang, J., Kong, A. // Conformations of gelatin in trivalent chromium salt solutions: Viscosity and dynamic light scattering study. *Korea Australia Rheology Journal*, - 2017. - 29(1), с. 59-65.
- [27] P.H. Von Hippel, K.Y. Wong // The collagen gelatin phase transition. II. Shape of the melting curves and effect of chain length. *Biochem 2*, - 1963. 1399–1413.
- [28] Grasdalen, H.; Smidsrød, O. // Iodide-specific formation of κ -carrageenan single helices. NMR spectroscopic evidence for selective site binding of iodide anions in the ordered conformation. *Macromolecules*, - 1981. - 14,1842-1845.

- [29] S. Ikeda, V.J. Morris, K. Nishinari // Microstructure of Aggregated and Nonaggregated K-Carrageenan Helices Visualized by Atomic Force Microscopy. *Biomacromolecules*, - 2001. - 2, 1331-1337.
- [30] M.Djabourov, J. Lechaire, F. Gaill // Structure and rheology and collagen gels. *Biorheology* 30, - 1993. -191-205.
- [31] I. G. Plashchina, I. R. Muratalieva, E. E. Braudo, V. B. Tolstoguzov // Studies of the Gel Formation of K-Carrageenan Above the Coil-Helix Transition Temperature Range. *Carbohydrate Polymers*, -1986. – 6, 15-34.
- [32] Заметки по применению 1287-1, Understanding the Fundamental Principles of Vector Network Analysis (Понимание основ векторного анализа цепей), номер публикации 5965-7707E, - 2000.
- [33] A.K. Jonscher, *J. Phys. D. / Appl. Phys.* 32, 57 (1999).
- [34] А.А Лукичѳв // Универсальная спектральная функция для описания релаксационных спектров типа Гаврильяка-Негами. *Физика и электроника*, - 2013. - 537.226; 621.315.61.
- [35] Ю.А. Гусев // Основы диэлектрической спектроскопии. Учебное пособие Предисловие, - 2008.
- [36] А.И. Слуцкер, Ю.И. Поликарпов, К.В. Васильева // Определение энергии активации сложных процессов. *Физика твердого тела*, т.44, вып. 8, - 2002.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Основные результаты работы доложены на:

- Итоговой научно-образовательной конференции студентов Казанского федерального университета, Казань, 1 марта – 30 апреля, 2016.
- XXIII Конференции «Структура и динамика молекулярных систем», Яльчик, 27 июня – 01 июля, 2016.
- X Всероссийской научной конференции и школы молодых ученых «Химия и технология растительных веществ», Казань, 5 – 9 июня, 2017.
- III Международной школе-семинаре «От эмпирической к предсказательной химии», Казань, 5 – 7 апреля, 2018.

Список тезисов:

1. Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского федерального университета 2016 года: сб. тезисов: в 3 т. / Минво образования и науки; Казанский (Приволжский) федеральный ун-т. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2016. – Т. 1: Институт геологии и нефтегазовых технологий; Институт фундаментальной медицины и биологии; Институт экологии и природопользования; Химический институт им. А.М. Бутлерова; Институт физики; Высшая школа информационных технологий и информационных систем; Институт вычислительной математики и информационных технологий. – 288 с.
2. СТРУКТУРА И ДИНАМИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ. Сборник тезисов докладов и сообщений на XXIII Всероссийской конференции "Структура и динамика молекулярных систем", 14-й Школы молодых ученых "Спектроскопия молекулярных систем" и

симпозиума "Современные подходы к лечению туберкулеза". – Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, - 2016. – 188 с.

3. X Всероссийская научная конференция и школа молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» (Казань, 2017): тезисы докладов. – Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, 2017. – 360 с.
4. Third International School-Seminar "From Empirical to Predictive Chemistry" (April 5–7, 2018, Kazan, Russia): book of abstracts / ed.: T.I. Madzhidov, V.A. Afonina; I.S. Antipin. – Kazan: Kazan University Press, 2018. – 96 p.

Список публикаций:

1. А.М. Никифорова, Д.А. Файзуллин, Ю.Ф.Зуев, Н.И. Соколан, Н.Г. Воронько, С.Р. Деркач, О.Н. Макшакова // Структура комплексов желатина и κ-каррагинана по данным методов молекулярного докинга и ИК спектроскопии. – Биополимеры и биосистемы, – 2016.
2. S.R. Derkach, N.G. Voron'ko, Yu.A. Kuchina, D.S. Kolotova, A.M. Gordeeva, D.A. Faizullin, Yu.A. Gusev, Yu. F. Zuev, O.N. Makshakova // Molecular structure and properties of κ-carrageenan-gelatin. - Carbohydrate Polymers, 197, -p. 66-67.- 2018.