

Отчет внс дхн М.М. Воробьева за 2007-2009 г.

Показатели результативности научной деятельности (ПРНД): 74 (2007), 102 (2008) и 76 (2009).

Проекты: Грант РФФИ 07-03-00131 «Количественное изучение гидратации ферментоподобных сополимеров с цвиттерионными группировками» (Р); грант РФФИ 07-04-01138 (И).

Направления исследований:

- Количественное изучение гидратации полимеров методом миллиметровой спектроскопии;
 - Изучение кинетики гидролиза эфирных субстратов полимерными катализаторами;
 - Изучение гидратации и реологии казеиновых гелей;
 - Изучение кинетики гидролиза пептидов.

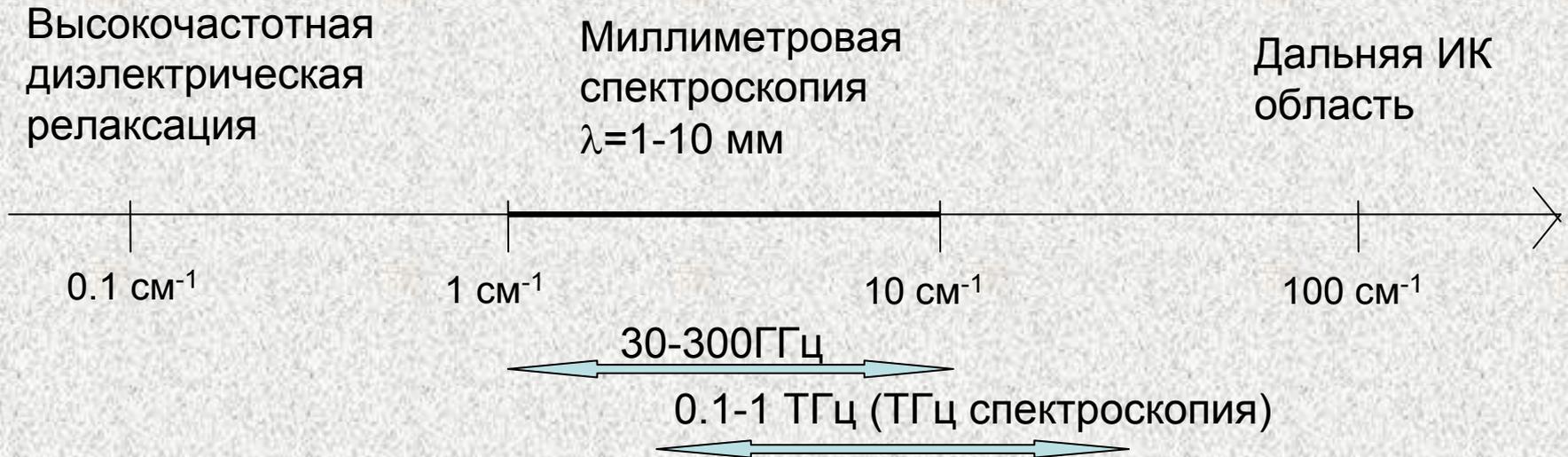
Статьи с импакт-фактором >2:

- Vorob'ev M.M. Monitoring of water ordering in aqueous protein systems // Food Hydrocolloids. – 2007. - V. 21. - P. 309-312.
- Vorob'ev M., Churochkina N., Khokhlov A., Stepnova E. Hydration characterization of hydrophobically modified polymers by dielectric measurements in the millimeter range // Macromol. Bioscience. – 2007. - V.7. - P. 475-481.
- Vorob'ev M.M. Kinetics of peptide bond demasking in enzymatic hydrolysis of casein substrates // J. Mol. Catal.:B. – 2009. - V.58. – P. 146-152.
- N G. Faleev, K. V. Alferov, M. A. Tsvetkova, E. A. Morozova, S. V. Revtovitch, E. N. Khurs, M. M. Vorob'ev, R. S. Phillips, T. V. Demidkina, and R. M. Khomutov Methionine g-lyase: Mechanistic deductions from the kinetic pH-effects. The role of the ionic state of a substrate in the enzymatic activity // Biochem. Biophys. Acta. - 2009. – V. 1794, №10. – P. 1414-1420.
- M.M. Vorob'ev, T.V. Burova, N.V. Grinberg, A.S. Dubovik, N.G. Faleev, V.I. Lozinskiy Hydration characterization of N-vinylcaprolactam polymers by millimeter-wave measurements // Colloid Polym. Sci. – 2010. – V288. –P.11234. –P. 1457-1464.

Устные доклады на международных конференциях:

- Vorob'ev M.M. Quantitative comparison of the hydration of proteins with protein-like synthetic polymers by millimeter-wave spectroscopy // 12th European conference on the spectroscopy of biological molecules, 1-6 September, 2007. - Bobigny, France, 2007. - P. 139.
- Vorob'ev M.M. Microwave hydration measurements in aqueous systems of proteins and synthetic polymers // XXIX European congress on molecular spectroscopy, 31 August- 5 September, 2008. - Opatija, Croatia, 2008. – P. 187.
- Vorob'ev M.M., Microwave hydration measurements of the unfolding in aqueous systems of proteins and synthetic proteinlike polymers // XIII European conference on the spectroscopy of biological molecules. Book of abstracts. August 28- September 2, 2009. - Palermo, Italy. - P. 96.

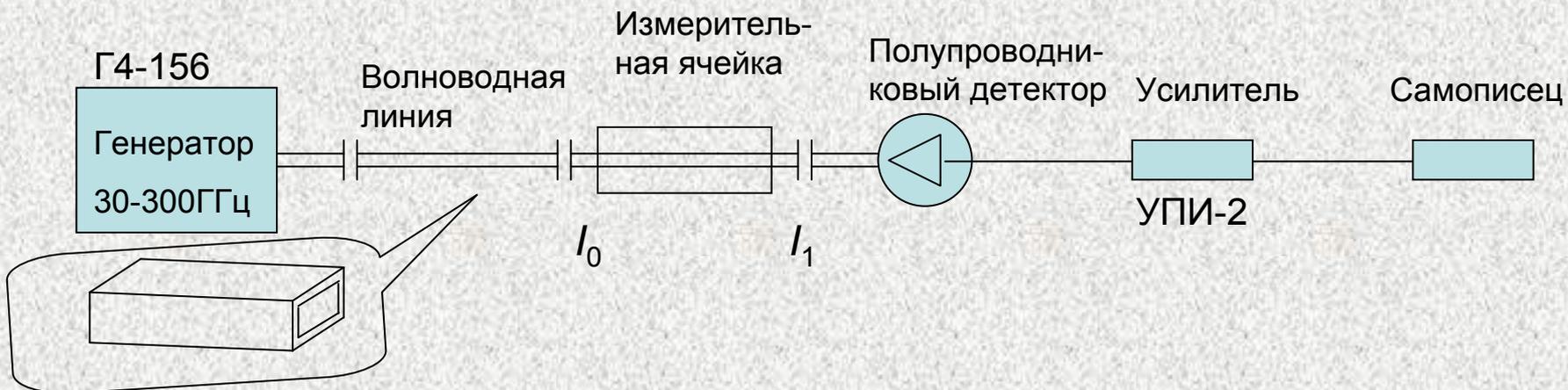
Частотный диапазон миллиметровой спектроскопии



Yu.I. Khurgin, V.A. Kudryashova, V.A. Zavizion, O.V. Betski. Millimeter Absorption Spectroscopy of Aqueous Systems, in *Adv. Chem. Phys. Series*, W. Coffey, Ed., vol. 87, J. Wiley & Sons, New York 1994, p. 483.

Vorob'ev M.M. Water mobility around kosmotropic and chaotropic solutes: Absorption spectroscopy in the millimeter range, in *Water science for food, health, agriculture and environment*. Z. Berk, R.B. Leslie, P.J. Lillford, & S. Mizrahi (Eds.) Lancaster & Basel: Technomic Publishing, 2001, p. 59-72.

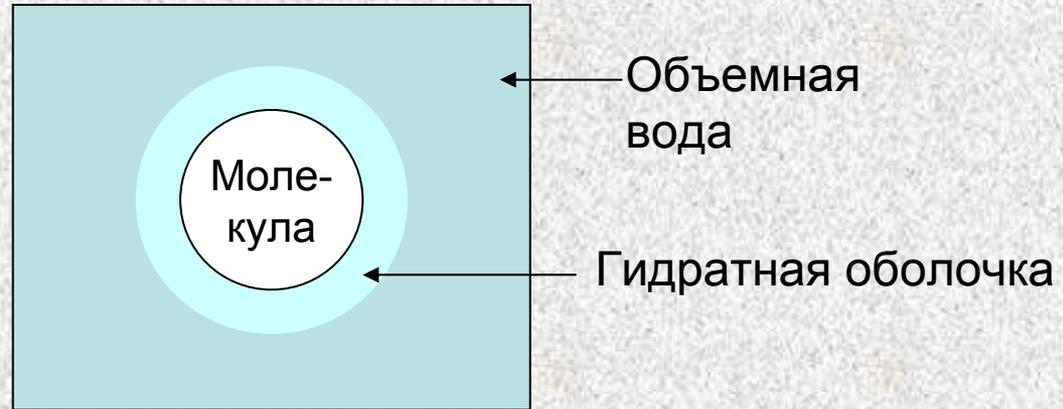
Схема экспериментальной установки



- Используется волноводная техника

- Нетепловой эффект миллиметрового излучения (1-20 мВт/см²)

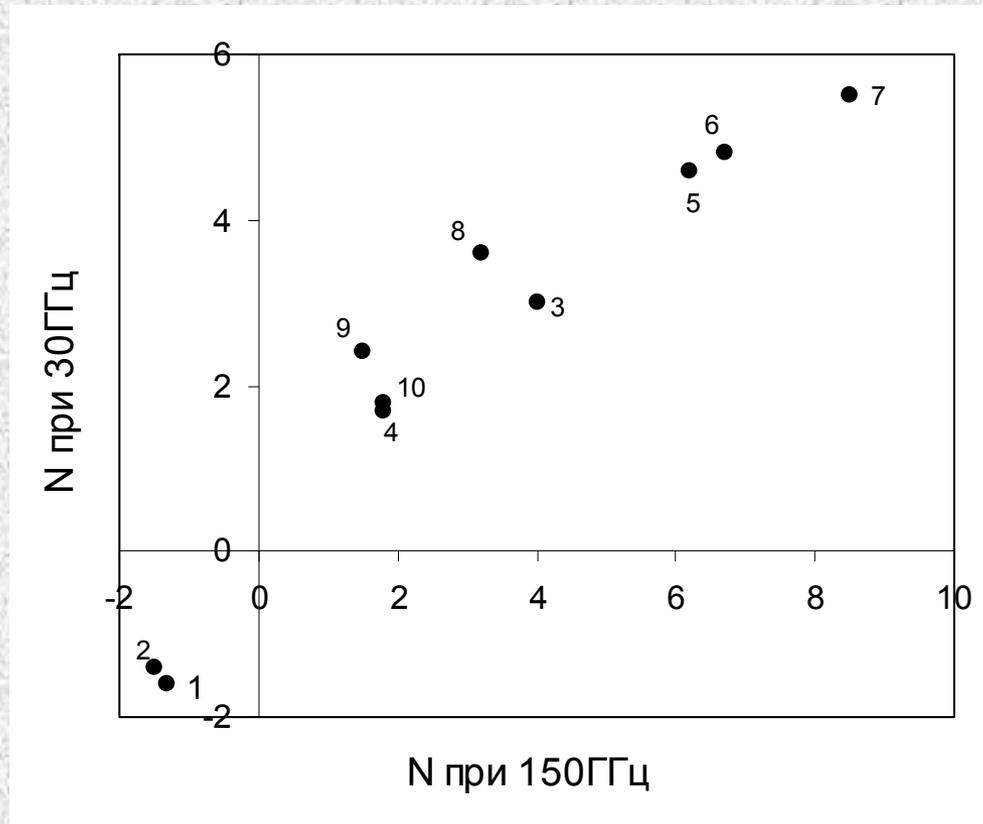
Количественное выражение гидратации



Число гидратации:
$$N = \frac{\delta C_1}{C_2} = \frac{\alpha_{H_2O} - \alpha_{\text{exp}}}{k_1 C_2}$$

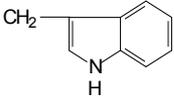
где α_{exp} измеренное поглощение раствора $-\log(I_1/I_0)$,
 α_{H_2O} вклад водной компоненты $k_1 C_1$,
 C_1 и C_2 молярные концентрации воды и растворенного соединения,
 k_1 коэффициент поглощения излучения чистой водой.

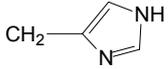
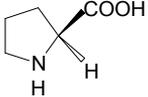
Корреляция чисел гидратации, измеренных при различных частотах



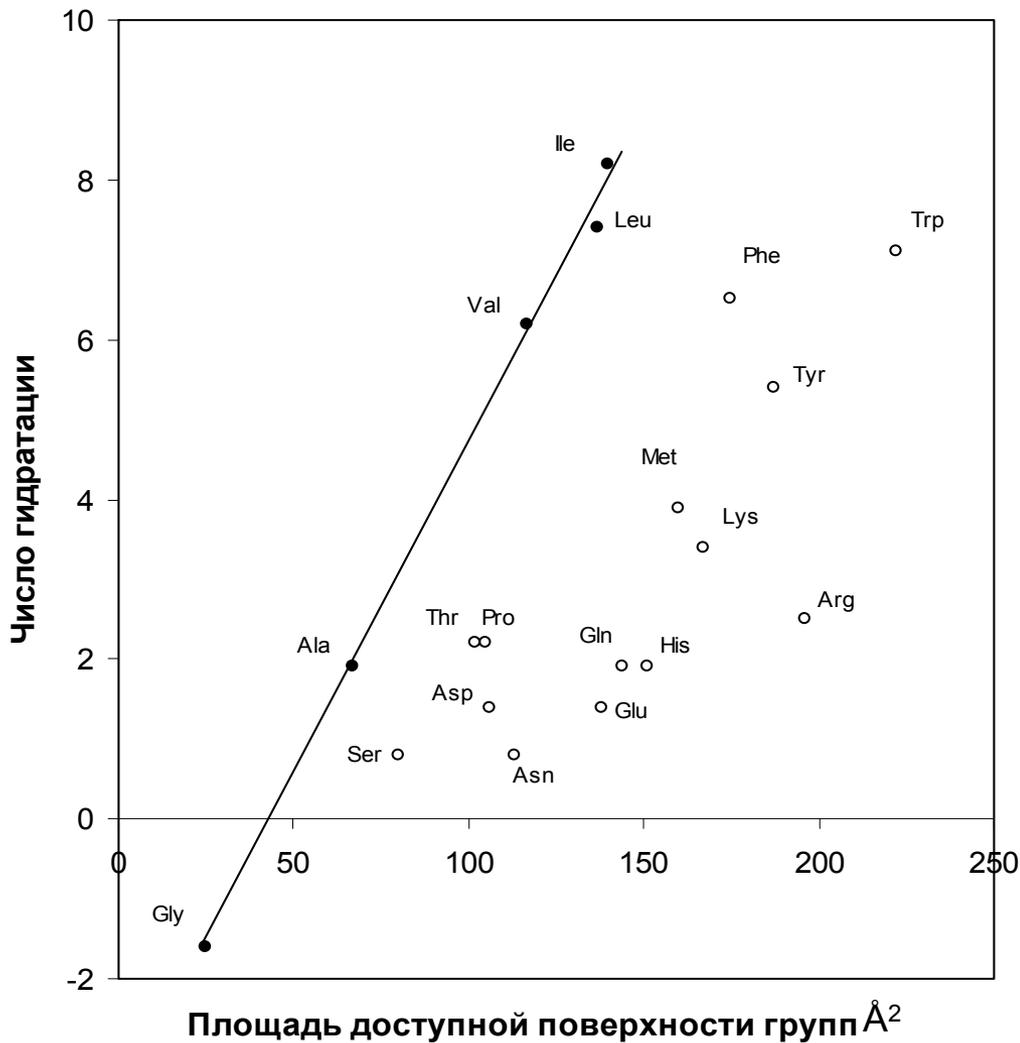
Анализируемые вещества: Gly (1), мочеви́на (2), EtOH (3), MeOH (4), *n*-PrOH (5), *i*-PrOH (6), *n*-BuOH (7), D-глюкоза (8), ПЭГ ($M_w=4.3 \times 10^4$) (9), БСА ($M=66500$, 583 аминокислотных остатков) (10).

Числа гидратации природных аминокислот $\text{H}_3\text{N}^+\text{CHR}\text{COO}^-$

Аминокис- лота	Боковой радикал (R)	<i>N</i>
Gly	H	-1.3±0.1
Ala	Me	1.9±0.1
Val	CH(Me) ₂	6.2±0.2
Leu	CH ₂ CH(Me) ₂	7.4±0.2
Ile	CH(Me)Et	8.2±0.2
Phe	CH ₂ Ph	6.5±0.2
Tyr	CH ₂ C ₆ H ₄ OH- <i>p</i>	5.4±0.1
Trp		7.1±0.2
Met	CH ₂ CH ₂ SMe	3.9±0.1

Аминокис- лота	Боковой радикал (R)	<i>N</i>
Asp	CH ₂ COOH	1.4±0.1
Glu	CH ₂ CH ₂ COOH	1.4±0.1
Asn	CH ₂ CONH ₂	0.8±0.1
Gln	CH ₂ CH ₂ CONH ₂	1.9±0.1
Arg	(CH ₂) ₃ NHC(=NH)NH ₂	2.5±0.1
Lys	(CH ₂) ₄ NH ₂	3.4±0.2
His		1.9±0.1
Ser	CH ₂ OH	0.8±0.1
Thr	CH(OH)CH ₃	2.2±0.1
Pro		2.2±0.1

Зависимость чисел гидратации от общей площади доступной поверхности полярных и неполярных групп



Аминокислоты в
цвиттерионной форме:



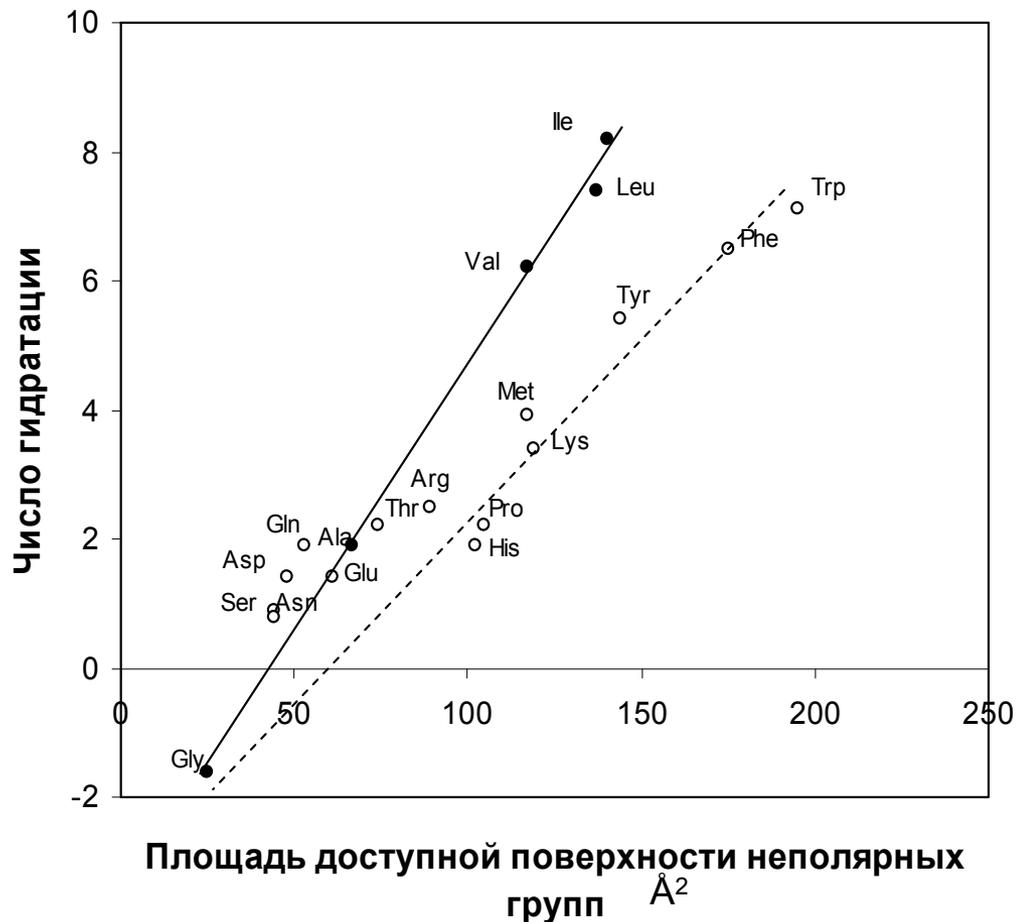
Алифатические
аминокислоты (прямая
линия):

Gly, Ala, Val, Leu, Ile

Ароматические и
гетероциклические:

Phe, Tyr, Trp, His

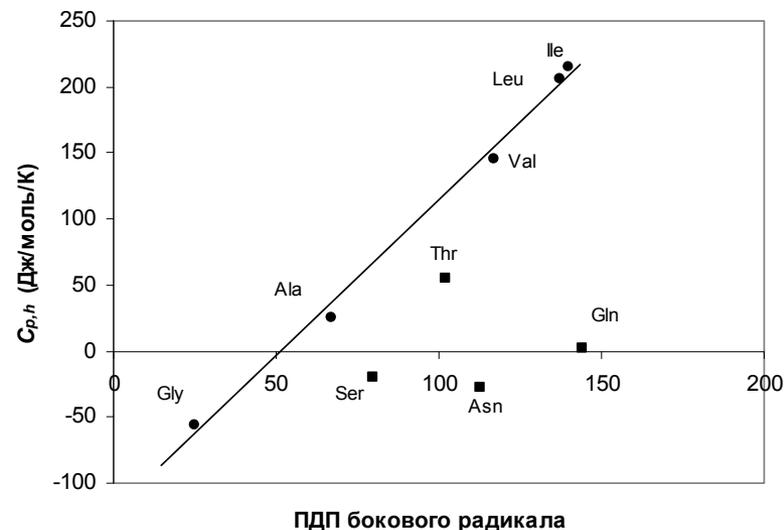
Шкала гидрофобности аминокислот по данным миллиметровой спектроскопии



Ile(8.2) > Leu(7.4) > Trp(7.1) > Phe(6.5) > Val(6.2) > Tyr(5.4) > Met(3.9) > Lys(3.4) > Arg(2.5) > Thr(2.2) > Pro(2.2) > Ala(1.9) > Gln(1.9) > His(1.9) > Asp(1.4) > Glu(1.4) > Ser(0.8) > Asn(0.8) > Gly(-1.3).

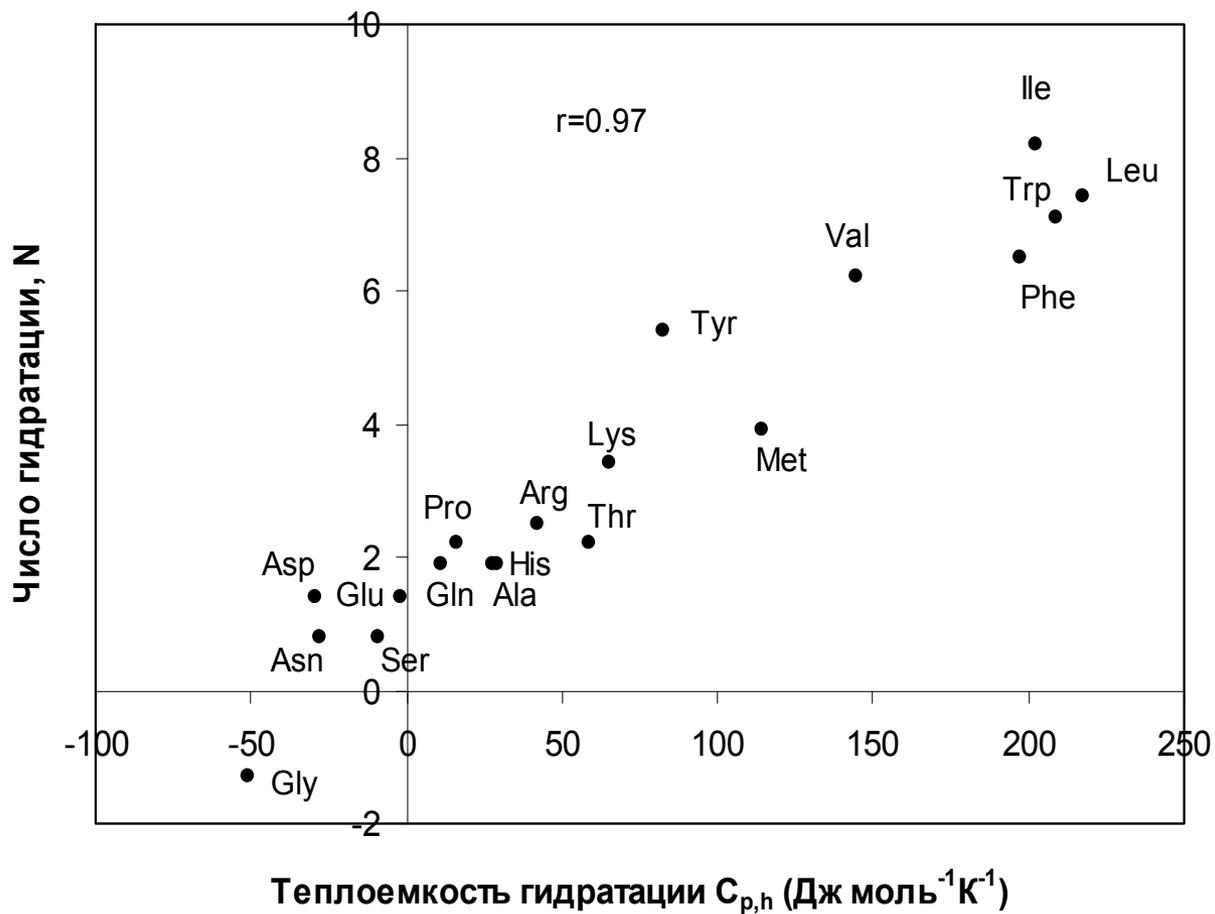
Определение теплоемкостей гидратации методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК)

Аминокислота	R $\text{NH}_3^+\text{CH}(\text{R})\text{COO}^-$	$C_{p,2}$ Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	$C_{p,h} = C_{p,2} - C_p^0$ Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹
Gly	H	35.9	-56.0±8.5
Ala	Me	138.3	25.7±5.5
Abu	CH ₂ Me	225.9	90.2 ±9.0
Val	CHMe ₂	303.3	145.7±8.5
Leu	CH ₂ CHMe ₂	387.1	206.5±12.0
Ile	CHMeCH ₂ Me	395.6	215.0±18.5
Ser	CH ₂ OH	106.1	-19.6±13.5
Thr	CHOHMe	205.5	54.6±5.5
Asn	CH ₂ CONH ₂	128.3	-27.9±12.5
Gln	CH ₂ CH ₂ CONH ₂	181.6	2.4±8.0



Воробьев М.М., Даниленко А.Н. Оценка гидратации полярных групп α -аминокислот методом дифференциальной сканирующей калориметрии // Изв. АН, Сер. хим. - 1996. - №9. - С. 2237-2242.

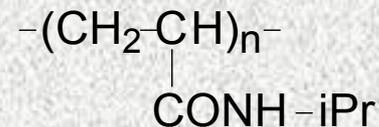
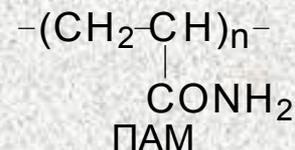
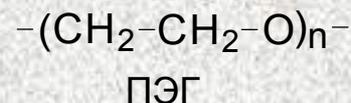
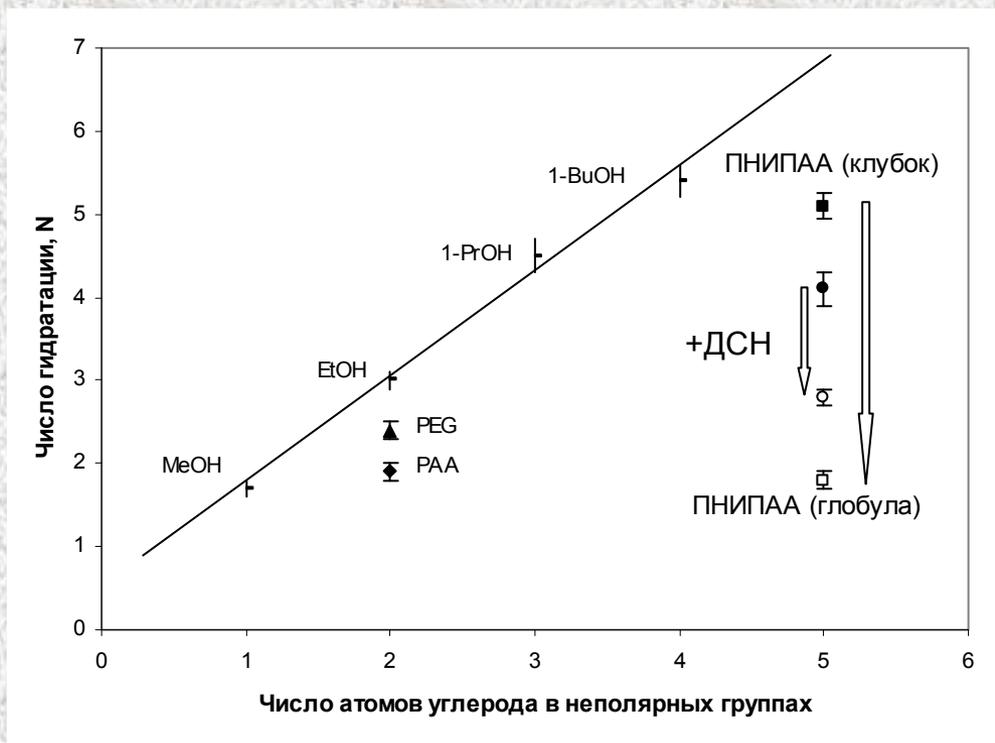
Корреляция чисел гидратации и теплоемкостей гидратации для природных аминокислот



Вклады в гидратацию неполярных и полярных групп по данным миллиметровой спектроскопии и ДСК

Тип гидратации	Группа	Вклад в гидратацию			
		Миллиметровая спектроскопия		ДСК	
		ΔN	$\Delta N/\Delta N(\text{CH}_2)$	$\Delta C_{p,h}$	$\Delta C_{p,h}/\Delta C_{p,h}(\text{CH}_2)$
		Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹			
Гидрофобная гидратация	CH ₂	2.6±0.2	1	75±4	1
Гидрофильная гидратация (не ионная)	ОН CONH ₂ COOH	0.05±0.4	0.02±0.2	-6.5±12	-.09±.1
Гидрофильная гидратация (ионная)	CH(N ⁺ H ₃)CO O ⁻	-3.4±1.2	-1.3±0.5	-119±11	-1.6±.2

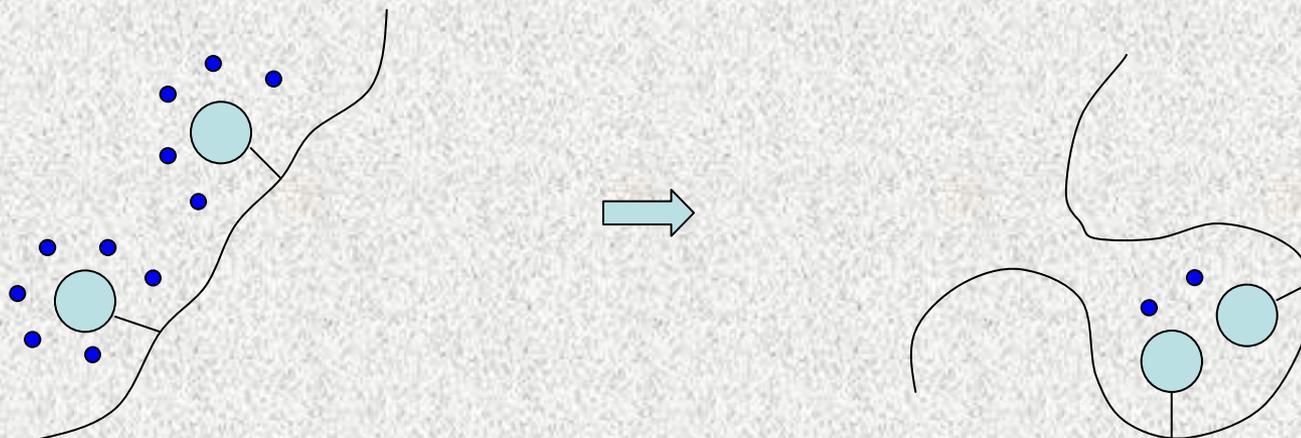
Гидратация водорастворимых полимеров



Поли(N-
изопропилакриламид)
ПНИПАА

Зависимость числа гидратации от количества атомов углерода в неполярных группах (на звено) для ПЭГ (▲), ПАМ (◆), ПНИПАА в воде (■ 30°C, □ 43°C), и ПНИПАА с додецилсульфатом натрия (ДСН) (● 30°C, ○ 43°C). Прямая линия соответствует алифатическим спиртам. Стрелки соответствуют переходу клубок → глобула.

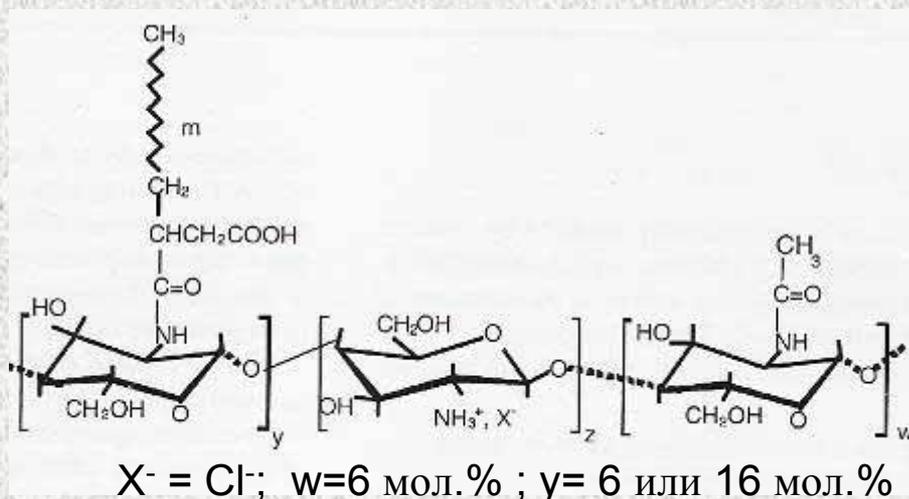
Изменение количества гидратированной воды при переходах клубок – глобула в полимерах



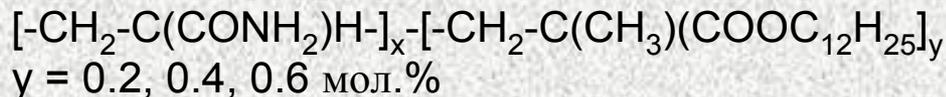
- Молекулы воды на границе с неполярными группами

Гидрофобно-модифицированные полимеры

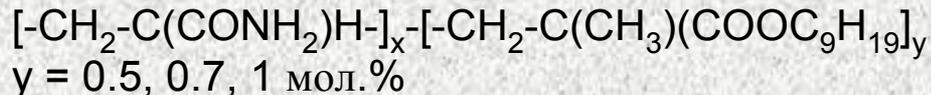
1. Гидрофобно-модифицированный хитозан (ГМХ) DDC-N-(2-carboxyethyl) chitosan



2. Сополимер акриламида и додецилметакрилата (АМ/ДДМК)



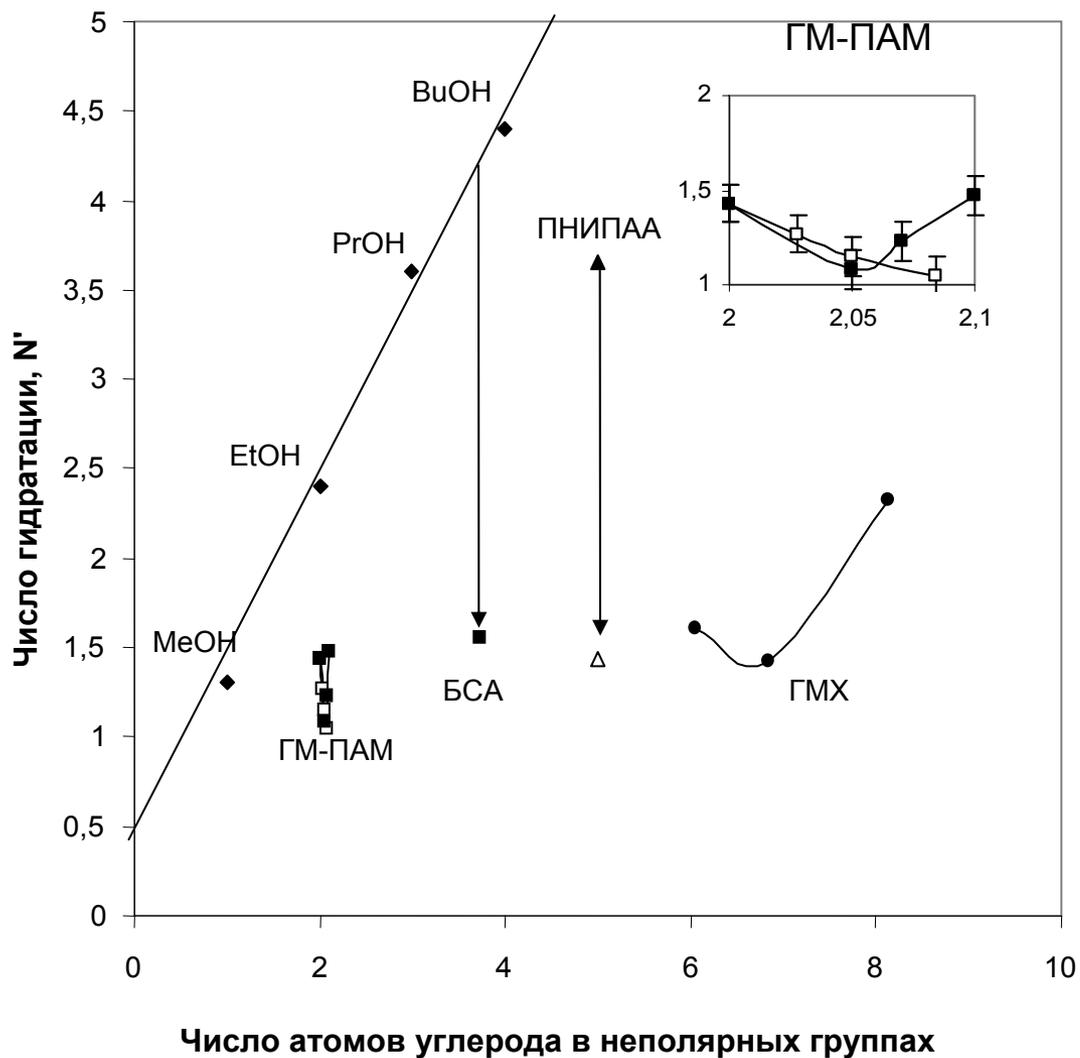
3. Сополимер акриламида и нонилметакрилата (АМ/НМК)



Babak V.G., Desbrieres J., Tikhonov V.E. // Colloids Surf. A. – 2005. –V.255. – P. 119.

Shashkina Y.A., Zaroslov Y.D., Smirnov V.A., Philipova O.E., Khokhlov A.R., Pryakhina T.A., Churochkina N.A. // Polymer. - 2003. – V.44. – P.2289.

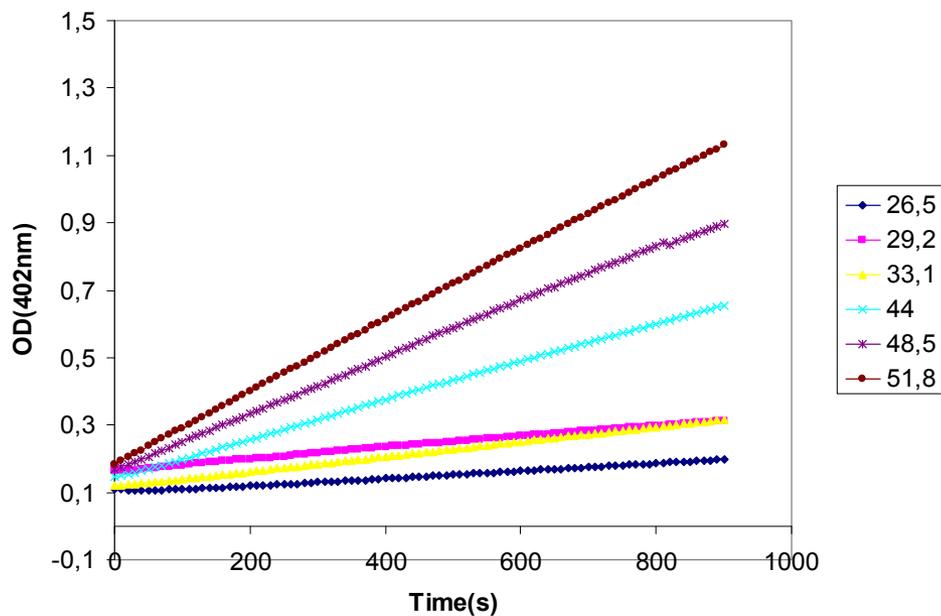
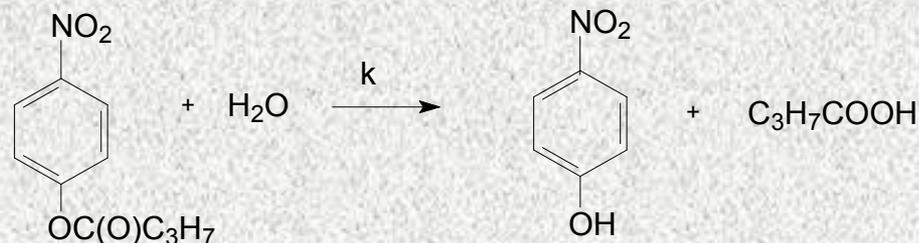
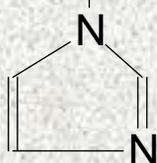
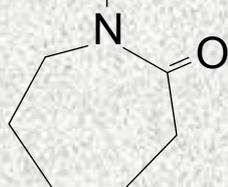
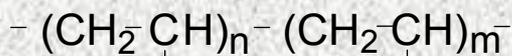
Гидратация гидрофобно-модифицированных полимеров



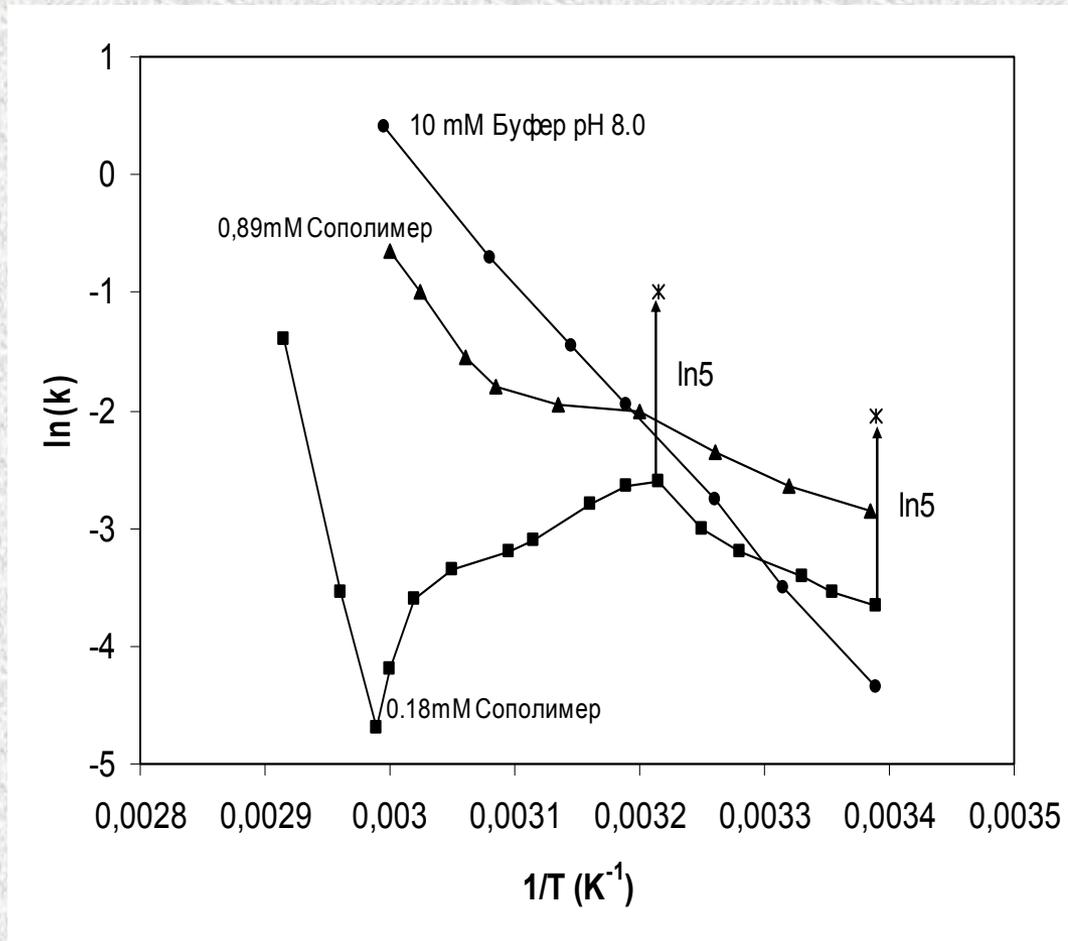
Зависимость относительного числа гидратации N' от числа атомов углерода в неполярных группах в расчете на одно звено. ПАМ и гидрофобно-модифицированный ПАМ: АМ/НМК - ■, АМ/ДДМК - □; БСА - ○; хитозан и гидрофобно-модифицированный хитозан - ●; ПНИПAA (клубок) - ▲; ПНИПAA (глобула) - Δ. Прямая линия соответствует алифатическим спиртам (◆).

Гидролиз эфирных субстратов сополимерами НВКЛ/НВИА

Сополимеры N-винилкапролактама и N-винилимидазола

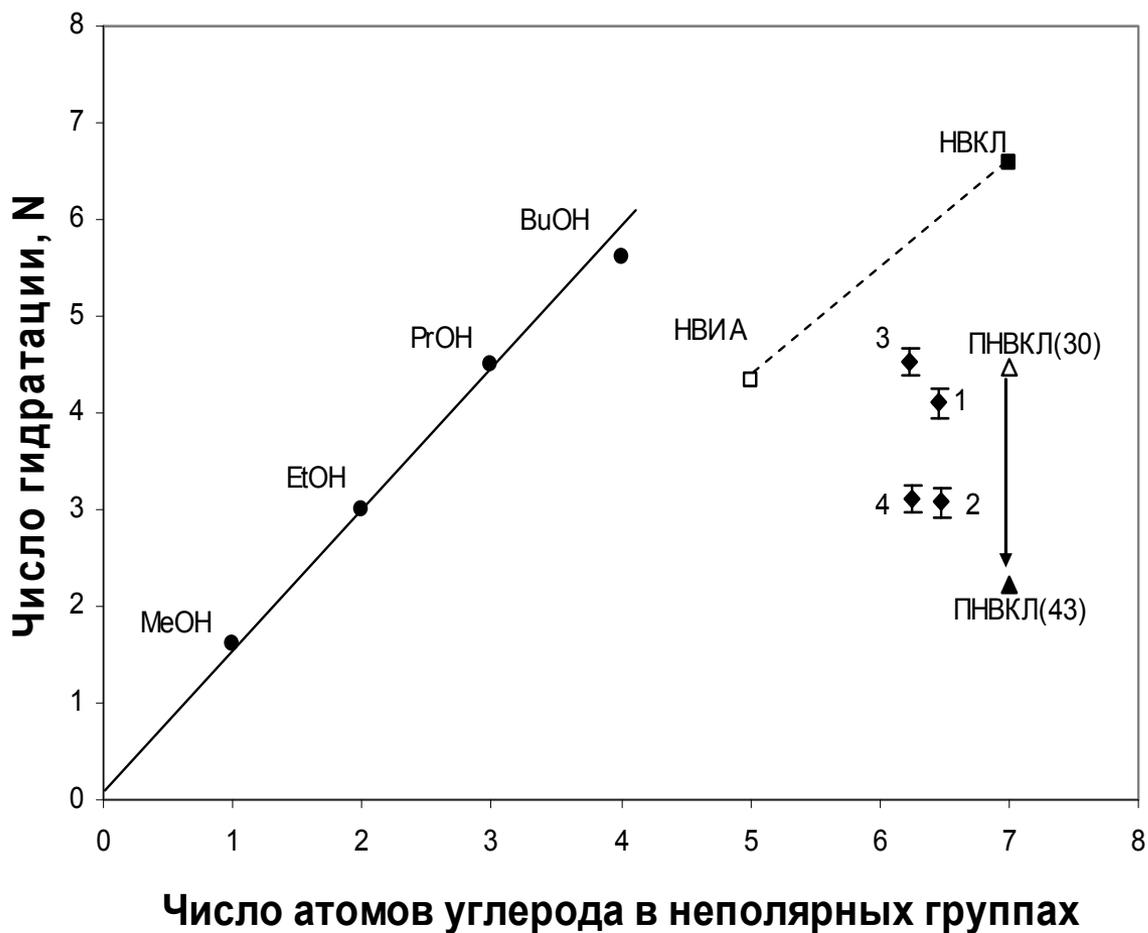


Отступление от линейной зависимости Аррениуса при гидролизе сополимером НВКЛ/НВИА(65)-Р



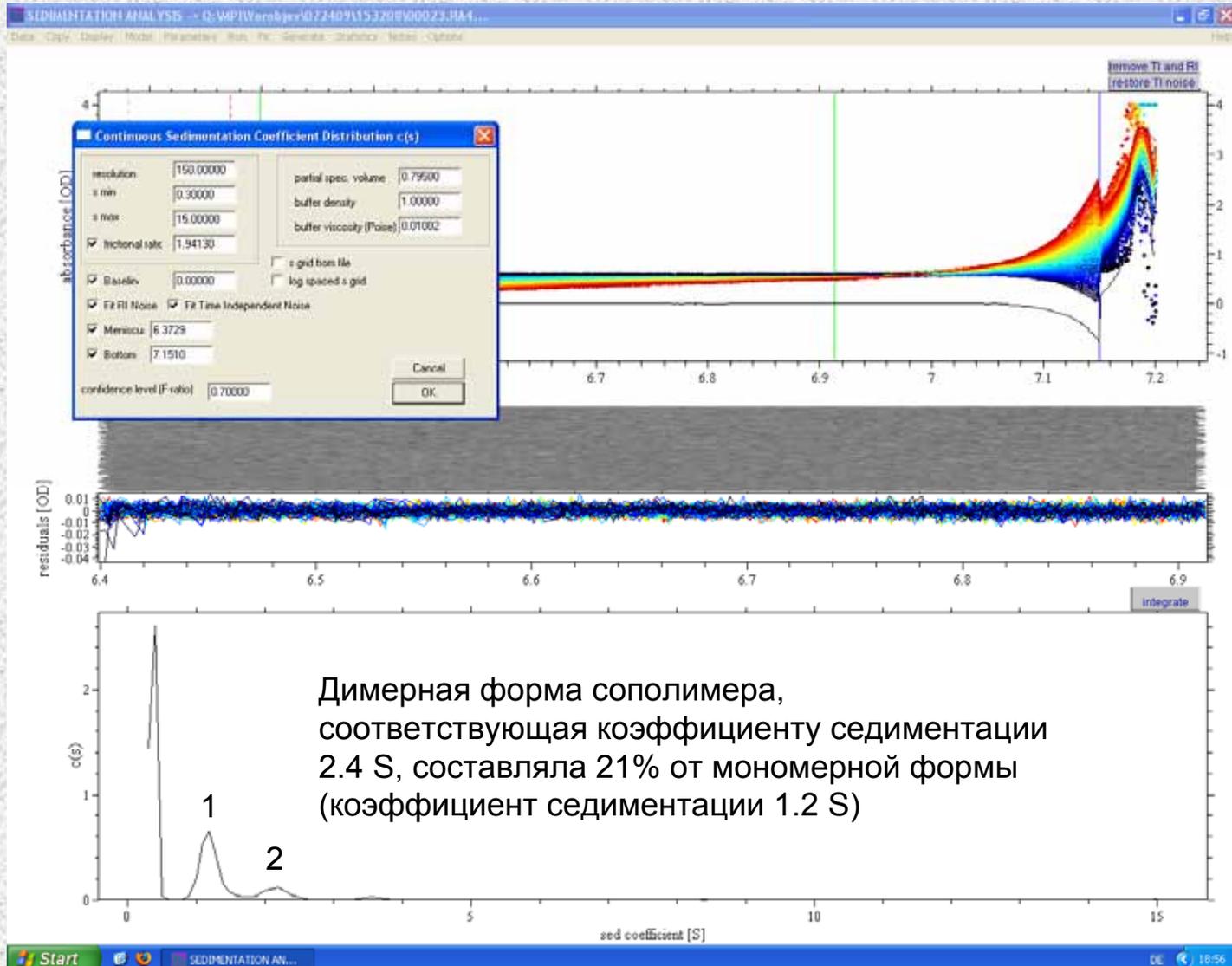
Кинетические данные свидетельствуют об ассоциации сополимеров

Гидратация НВКЛ/НВИА сополимеров

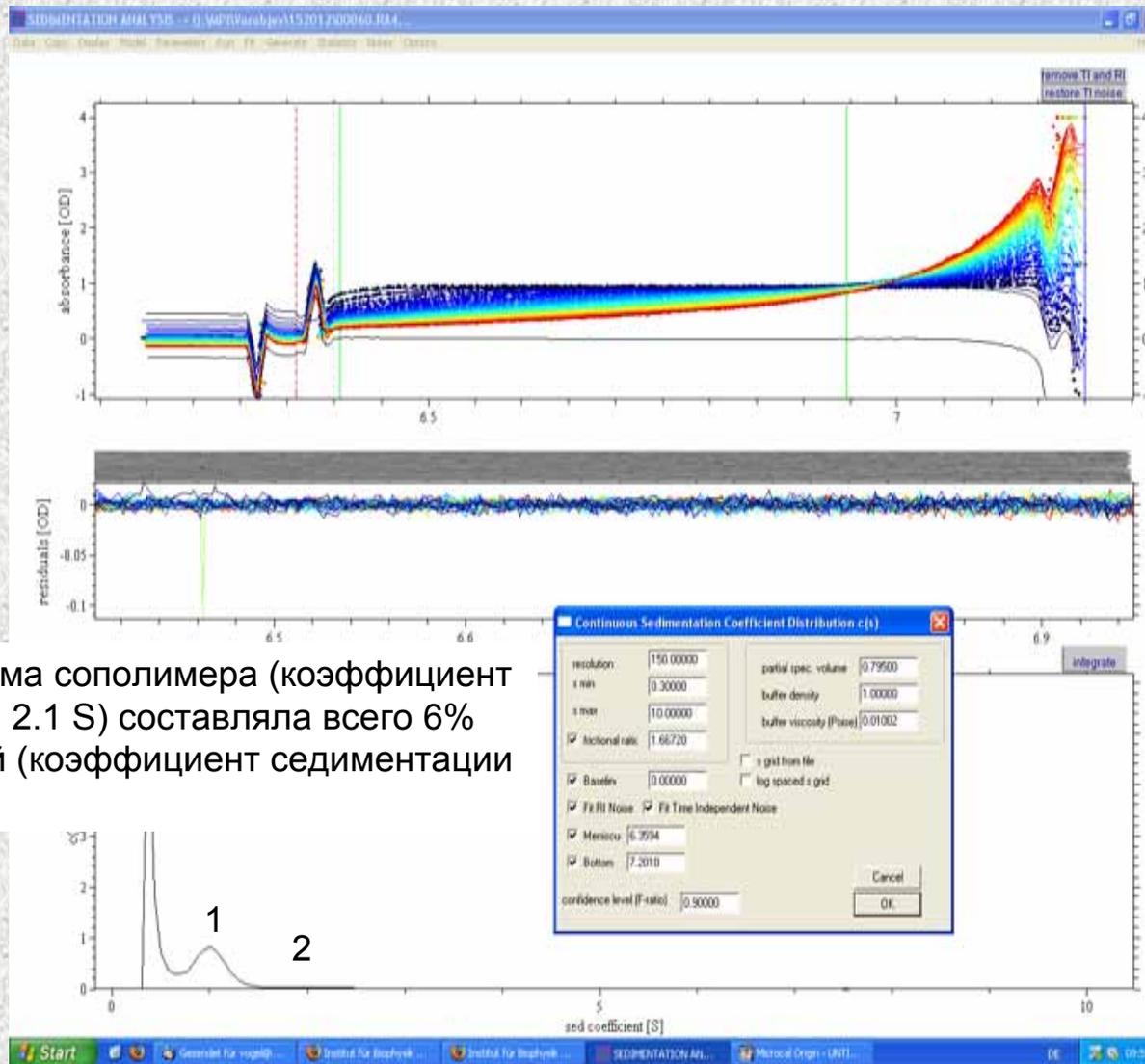


Зависимость числа гидратации N от числа атомов углерода в неполярных группах в расчете на одно звено. Мономеры N -винилимидазола (\square) и N -винилкапролактама (\blacksquare); полимеры ПНВКЛ при 28°C (Δ) и при 43°C (\blacktriangle); сополимеры НВКЛ/НВИА (\blacklozenge) 1 - НВКЛ/НВИА(65)-Р, 2 - НВКЛ/НВИА(65)-НР, 3 - НВКЛ/НВИА(25)-Р, 4 - НВКЛ/НВИА (25)-НР. Стрелка соответствует переходу клубок \rightarrow глобула для ПНВКЛ. Растворимые (Р) и нерастворимые (НР) фракции при 65°C.

Ультрацентрифугирование НВКЛ/НВИА сополимеров



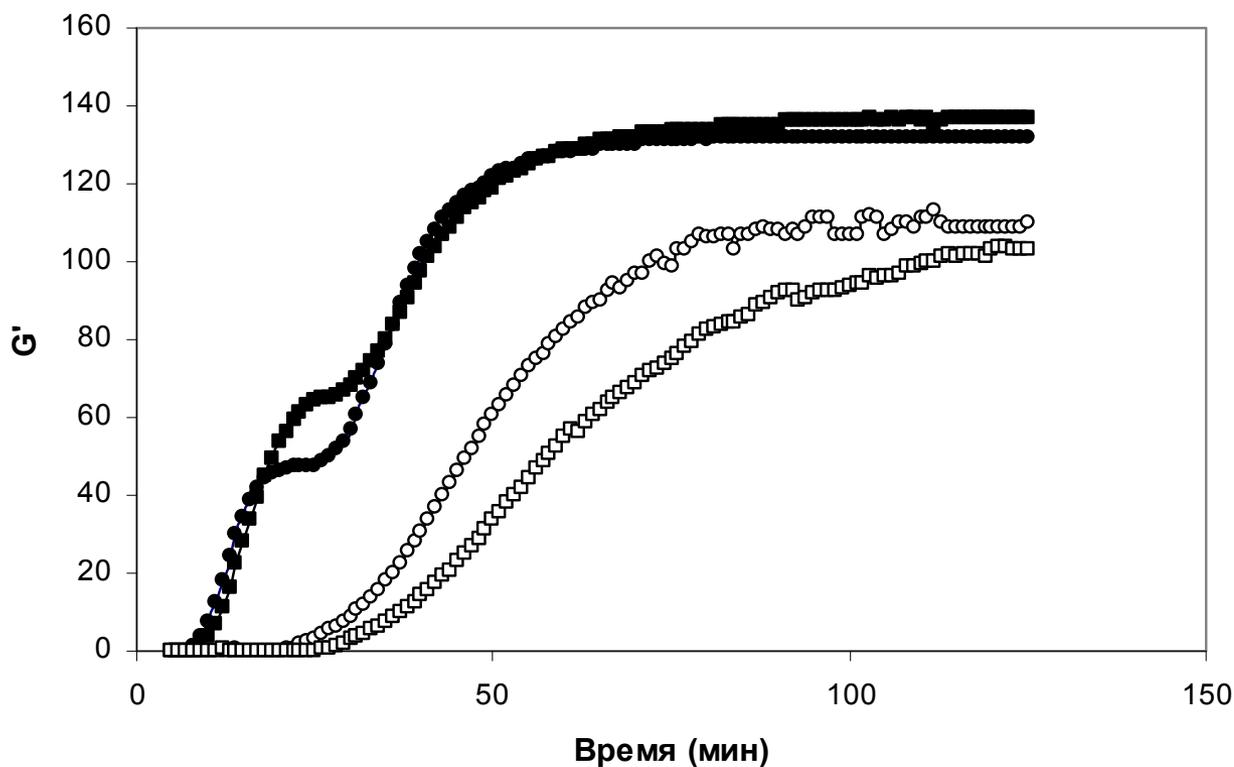
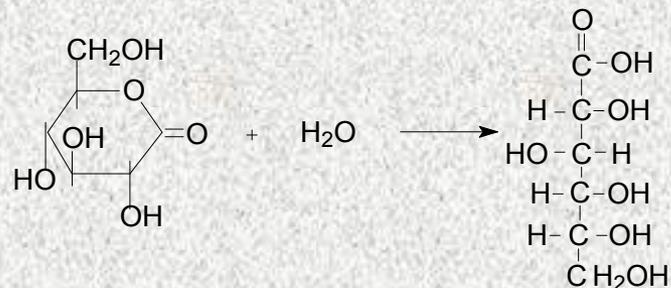
Ультрацентрифугирование НВКЛ/НВИА сополимеров



Димерная форма сополимера (коэффициент седиментации 2.1 S) составляла всего 6% от мономерной (коэффициент седиментации 1.05 S).

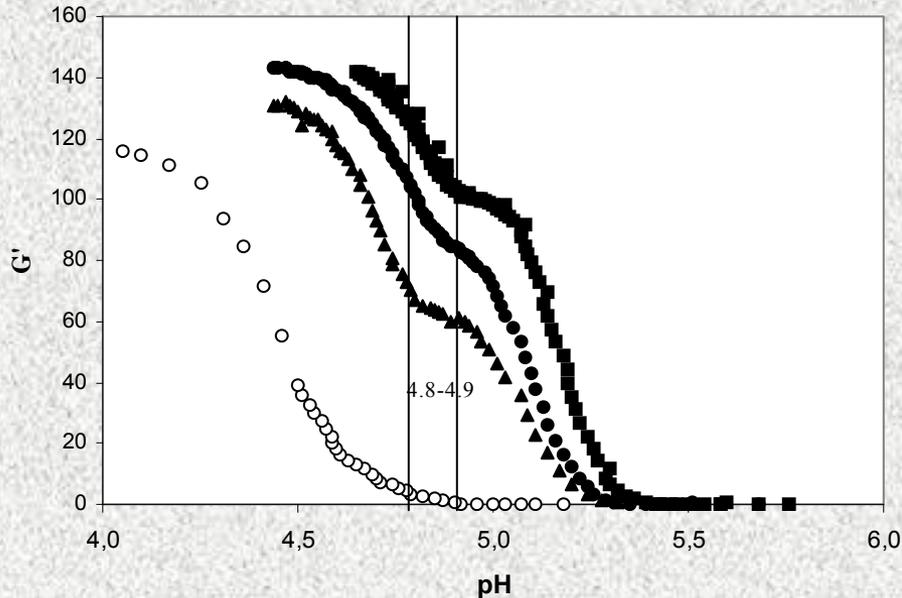
НВКЛ/НВИА(65)-P

Реология и гидратация гелей, образованных агрегатами казеиновых мицелл

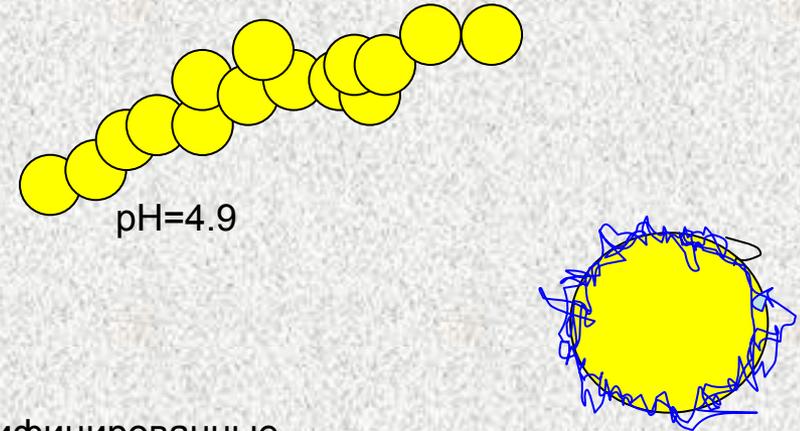


Кинетика образования геля. Концентрация δ-глюконолактона 3%. Концентрация немодифицированных мицелл (НКМ) 14% (○) и 16% (□), концентрация модифицированных мицелл (МКМ) – 14% (●) и 16% (■).

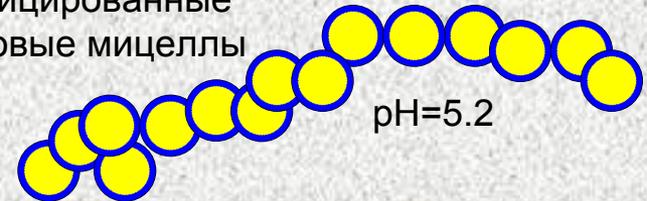
рН-зависимости гелеобразования



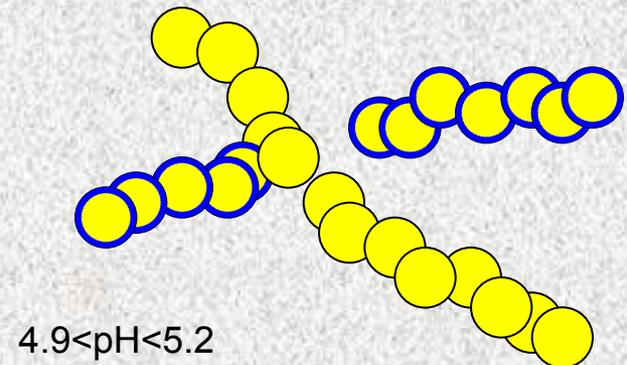
Немодифицированные казеиновые мицеллы



Модифицированные казеиновые мицеллы

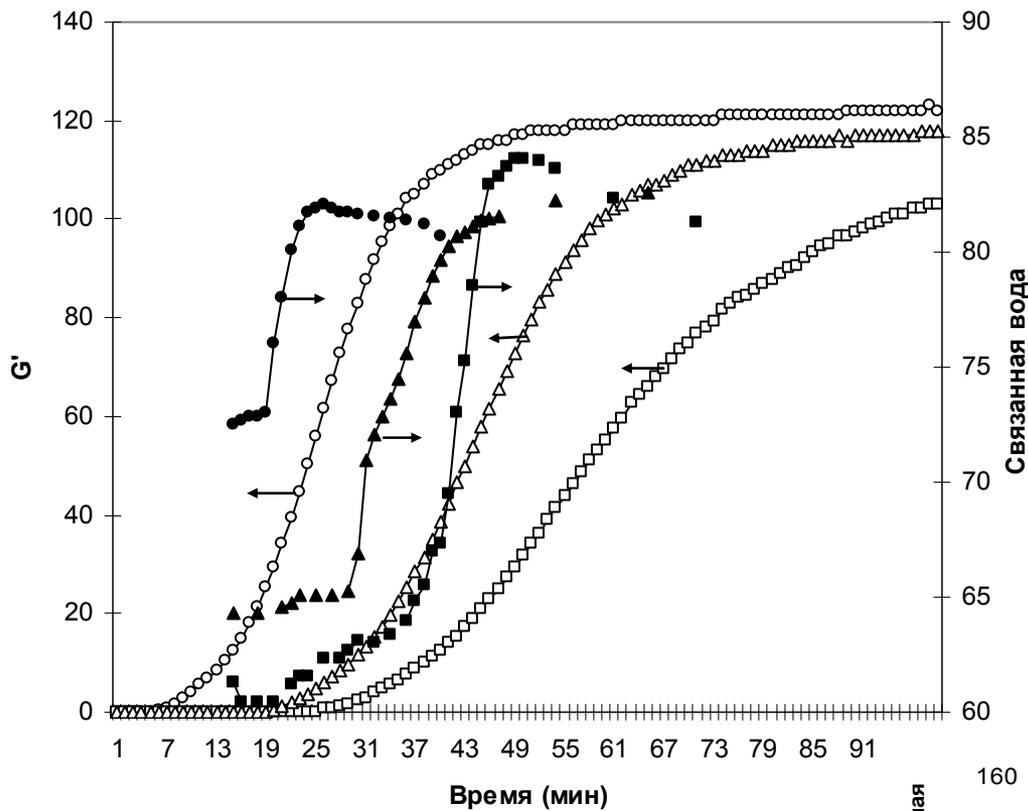


Изменение модуля упругости в зависимости от величины рН. Препарат НКМ 16% (○) образовывал гель при концентрации δ -глюконолактона 3%. МКМ (16%) образовывали гели при концентрациях δ -глюконолактона 3% (▲), 2.4% (●), 1.8% (■).



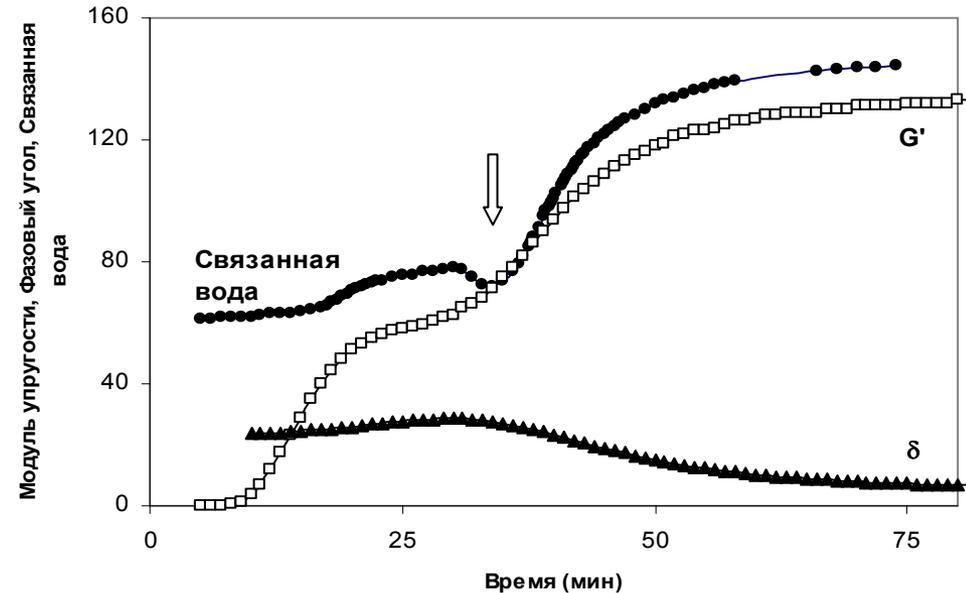
4.9 < pH < 5.2

Связь гидратации и реологии для казеиновых гелей

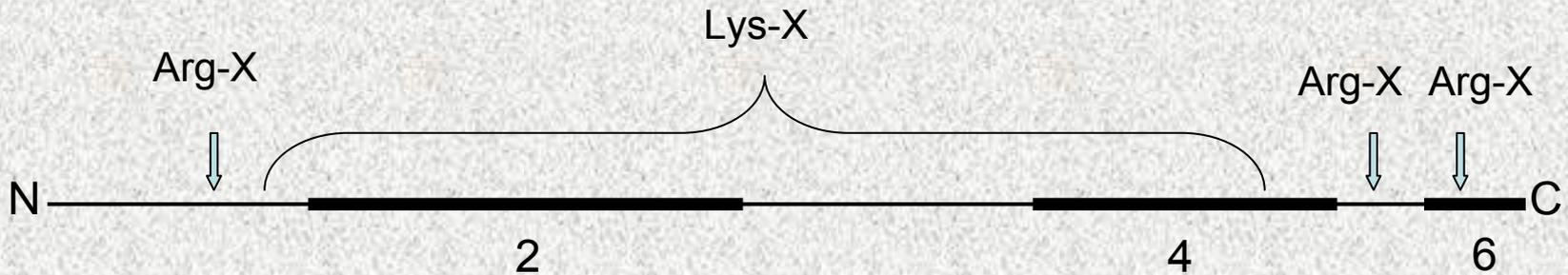


Временные изменения реологических и гидратационных свойств в ходе образования гелей из МКМ (16%) при концентрации δ -глюконолактона 3%. Модуль упругости G' (□), фазовый угол δ (○), связанная вода (г H₂O/г препарата · 100%).

Изменение модуля упругости и связанной воды (г H₂O/г препарата · 100%) от времени гелеобразования НКМ для процессов, протекающих при различных скоростях уменьшения pH (различных концентрациях δ -глюконолактона). Концентрации δ -глюконолактона: 3.4% (○, ●); 3% (Δ, ▲); 2.7% (□, ■). Температура 43°C.

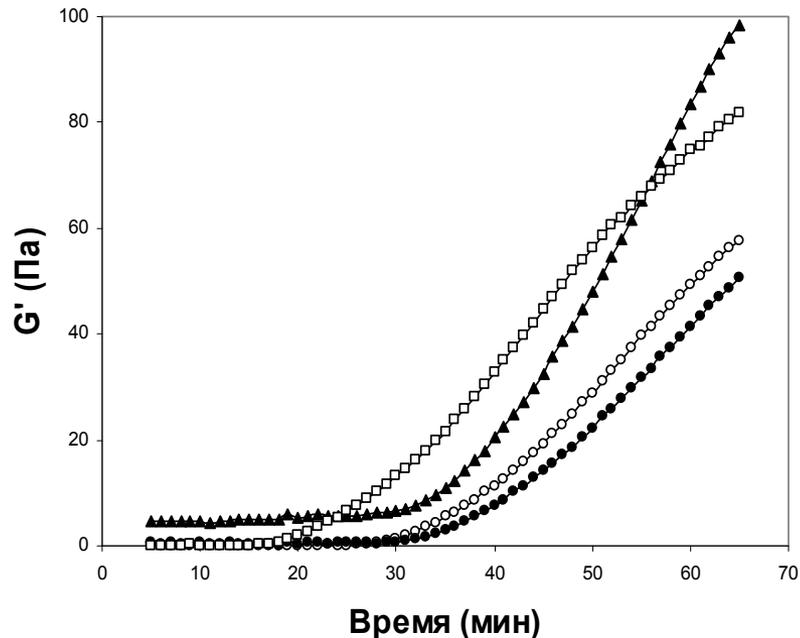
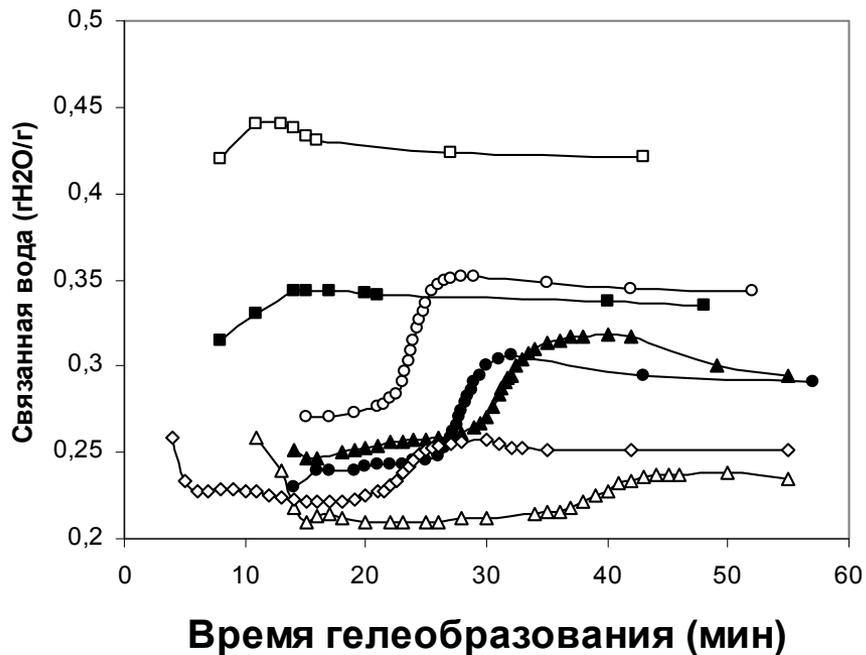


Гидрофобные участки в полипептидной цепи β -казеина



Номер сегмента	Номера аминокислотных остатков в сегменте	Гидрофобность сегментов по данным миллиметровой спектроскопии
1	1-43	2.90
2	44-92	3.53
3	93-135	3.13
4	136-178	3.61
5	179-189	3.06
6	190-209	4.20

Гелеобразование казеиновых частиц при добавлении полипептидов

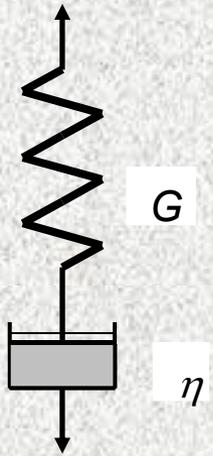


Изменение количества связанной воды (вес связанной воды на сухой вес всех растворенных веществ) в ходе образования гелей из немодифицированных казеиновых мицелл с добавлением полипептидов. Массовая доля полипептидов: 0% (●, ○), 2,2% (▲), 4,5% (◇), 6,5% (△), 7,6% (■), 9,4% (□). Концентрация δ -глюконолактона 3% (●, ▲, ◇, △, ■, □), 3,2% (○). Препарат – НКМ.

Кинетика гелеобразования при добавлении к НКМ смеси полипептидов. Массовая доля полипептидов: 0 (□), 3,6% (○), 7,8% (●) и 10,4% (▲). Концентрация δ -глюконолактона 3%. 26

Анализ задачи в рамках модели Максвелла

Модель Максвелла

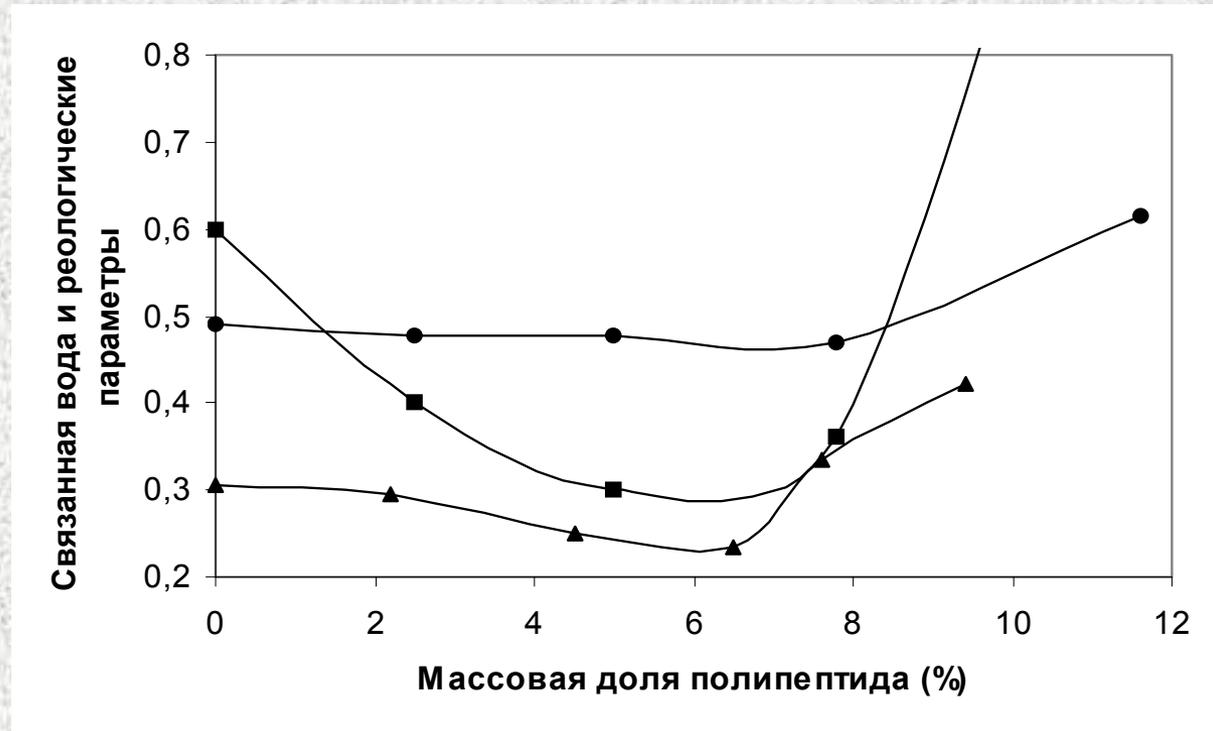


$$G'(\omega) = \sum_{i=1} G_i^0 \left[\frac{(\omega\tau_i)^2}{1 + (\omega\tau_i)^2} \right]$$
$$G''(\omega) = \sum_{i=1} G_i^0 \left[\frac{(\omega\tau_i)}{1 + (\omega\tau_i)^2} \right]$$

Для модели Максвелла

$$\tau = \eta / G$$

где η - коэффициент вязкости жидкости в поршне, G - модуль упругости пружины.



Зависимости реологических параметров $10^{-2} \cdot G_s$ (Па) (●) и $10^{-3} \cdot \eta_s$ (Па·с) (■), а также зависимость количества связанной воды в конце выбранного временного интервала гелеобразования (▲) от концентрации добавленных полипептидов (вес полипептидов/ общий вес·100%).

Дальнейшие планы:

- Изучение гидратации сополимеров и связи их гидратации с каталитической активностью;
- Изучение гидратации казеиновых полипептидов в комплексе с хитозанами;
- Изучение гидратации амфифильных соединений на примере полиаминов.

