

На правах рукописи

Зеликина Дарья Викторовна

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РОЛИ СТРУКТУРЫ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЛИПИДОВ И БИОПОЛИМЕРОВ
В ФОРМИРОВАНИИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ИХ КОМПЛЕКСОВ**

02.00.04 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Научный руководитель: доктор химических наук
Семёнова Мария Германовна
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, заведующая лабораторией функциональных свойств биополимеров

Официальные оппоненты: доктор химических наук, доцент
Шилова Светлана Владимировна
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», профессор кафедры физической и коллоидной химии

кандидат химических наук, доцент
Богданова Юлия Геннадиевна
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», старший научный сотрудник кафедры коллоидной химии, заместитель заведующего кафедрой по научно-исследовательской работе

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Защита состоится "_____" февраля 2020 г. в _____ час. на заседании диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН) по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский пр-т, 38 и на сайте:
https://ibcp.chph.ras.ru/docs/Dissertacia_Zelikina%20D.V.pdf

Автореферат разослан "_____" _____ 2019 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 002.039.01
Кандидат химических наук

Мазалецкая Л.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Согласно данным доказательной медицины и нутрициологии, а также всемирной организации здравоохранения (Международная сеть органов по безопасности пищевых продуктов (ИНФОСАН)) и государственной политике в области здорового питания населения Российской Федерации, одним из основных перспективных направлений развития пищевой промышленности является разработка новых составов пищевых добавок с целью восполнения дефицита, повышения растворимости, улучшения усвоения и биодоступности физиологически значимых питательных веществ. Общепринято, что такие пищевые добавки могут быть отнесены к категории физиологически функциональных ингредиентов (ФФИ) при содержании 15–50 % от суточной потребности активного вещества в одной порции функционального пищевого продукта или напитка. Предполагается, что их регулярное употребление могло бы обеспечить решение острой проблемы микронутриентной недостаточности и за счёт этого существенно снизить количество связанных с ней алиментарно-зависимых неинфекционных заболеваний.

К важному классу физиологически значимых питательных веществ относятся биологически активные липиды, и, в частности, омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), дефицит питания по которым наблюдается у большей части взрослого и детского населения России (до 80 % по данным НИИ Питания РАМН). Установлено, что ПНЖК не синтезируются в организме человека, однако обладают широчайшим спектром клинико-фармакологических эффектов (в т.ч. нормализация липидного обмена, регуляция сердечно-сосудистых нарушений, участие в противовоспалительных реакциях, антираковая профилактика), поэтому увеличение их поступления с питанием является крайне желательным. При обогащении пищевых продуктов этими биологически активными веществами должна быть учтена, прежде всего, их высокая склонность к окислению и деградации под действием высокой температуры, кислорода и света, обусловленная высоким содержанием в них ненасыщенных углеродных связей. Это может приводить к накоплению токсичных продуктов их перекисного окисления в процессах производства и хранения продуктов питания и ухудшать органолептические свойства. Кроме того, гидрофобная природа ПНЖК и, следовательно, их низкая растворимость в водной среде затрудняет их прямое введение в широко востребованные сегодня продукты питания и напитки с низким содержанием жира.

Пищевые биополимеры, такие как белки и полисахариды, могут являться перспективной основой ФФИ. Так, согласно их недавно обнаруженным инкапсулирующим свойствам по отношению к различным гидрофобным и гидрофильным биологически активным веществам, можно предположить, что пищевые биополимеры могут обеспечить возможность полного отказа от широко используемых в комплексных добавках синтетических поверхностно-активных веществ. Кроме того, для этих целей особый интерес представляют соевые фосфолипиды, которые, с одной

стороны, обладают высокими эмульгирующими свойствами, а с другой – хорошо зарекомендовали себя в фармацевтической практике как эффективные липосомальные и мицеллярные наноконтейнеры для доставки лекарственных веществ. Важным преимуществом фосфолипидов является также то, что они являются ценными физиологически активными веществами, могут проявлять геро- и гепатопротекторную функцию (фосфатидилхолин (ФХ)) или способствовать увеличению биодоступности активных веществ (лизофосфатидилхолин (ЛФХ)). Таким образом, актуальным является выявление возможности и эффективности совместного использования пищевых биополимеров и фосфолипидов как наноконтейнеров для доставки биологически активных веществ, в частности, адекватного количества ω -3 ПНЖК, через пищевые системы с низким содержанием жира или в его отсутствие. Всё это требует более глубоко понимания физико-химических основ их взаимовлияния и взаимодействий как в водных растворах, так и в условиях переваривания в желудочно-кишечном тракте.

Цель исследования состояла в изучении влияния структуры биологически активных липидов (липосом ФХ, мицелл ЛФХ и их комбинаций с альфа-линоленовой жирной кислотой (АЛК) или триглицеридами льняного масла (ЛМ)) и биополимеров (мальтодекстринов и их ковалентных конъюгатов с казеинатом натрия) на общую и локальную структуру, а также термодинамические параметры и функциональность их супрамолекулярных комплексов в водных растворах.

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Оработать оптимальную методику получения в водной среде наноразмерных липосом ФХ и мицелл ЛФХ:

- исходных (то есть однокомпонентных);
- обогащённых с помощью индивидуальной АЛК (> 99 % АЛК) или триглицеридов ЛМ (около 55 % АЛК) (далее – *обогащённых*). При обогащении комбинировать липиды с учётом весового отношения ω -3 : ω -6 ПНЖК = 1 : 1;
- в присутствии растительного антиоксиданта – эфирного масла гвоздики (ЭМГ) (на примере исходных и *обогащённых* липосом ФХ).

Охарактеризовать структурное состояние полученных липосом ФХ и мицелл ЛФХ.

2. Оработать оптимальную методику получения водорастворимых супрамолекулярных комплексов между ковалентными конъюгатами, объединяющими казеинат натрия и мальтодекстрины (далее – конъюгатами), и наноразмерными липосомами ФХ и мицеллами ЛФХ, перечисленными в пункте 1. Охарактеризовать:

- функциональные свойства (инкапсулирующую способность конъюгатов по отношению к липидам; растворимость в водной среде; защитные способности по отношению к окислению и деградации инкапсулированных липидов);
- структурные (молярная масса, размеры, плотность, архитектура, заряд) и термодинамические (термодинамическое сродство супрамолекулярных частиц друг к другу и к растворителю) параметры в водной среде;

- структурно-динамическое и фазовое состояние липидных слоёв инкапсулированных липосом ФХ и мицелл ЛФХ.

3. Установить влияние структуры липидов, биополимеров и эфирного масла гвоздики на структурные параметры и функциональные свойства супрамолекулярных комплексов.

4. Охарактеризовать биодоступность липидов из комплексных частиц в условиях модельного переваривания в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) (ротовая полость, желудок, тонкий кишечник), для этого:

- оценить способность инкапсулированных липидов к высвобождению;
- оценить структурные и термодинамические параметры комплексов в процессе ферментативного гидролиза комплексов *in vitro*.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Ковалентные конъюгаты казеината натрия и мальтодекстринов показывают высокую степень инкапсулирования (> 95 %) биологически активных липидов (липосом ФХ и мицелл ЛФХ, в том числе, обогащённых индивидуальной АЛК или триглицеридами льняного масла, в отсутствие и в присутствии ЭМГ). При этом самопроизвольно формируются водорастворимые и наноразмерные супрамолекулярные комплексы, обладающие высоким термодинамическим сродством к водной среде, и тем самым обеспечивающие растворимость липидам.

2. Липосомы ФХ и мицеллы ЛФХ (исходные и *обогащённые*) являются эффективными внутри- и межмолекулярным сшивающими (с помощью нековалентных связей) агентами для частиц конъюгатов в водной среде, что приводит к значительно более высокой плотности их супрамолекулярных комплексов по сравнению с частицами конъюгатов.

3. Мицеллы ЛФХ (исходные и *обогащённые*) по сравнению с липосомами ФХ (исходными и *обогащёнными*) приводят к более выраженному росту молярной массы и/или плотности и заряда комплексных частиц, а также изменению их архитектуры, что наиболее вероятно связано с изменением начальной мицеллярной организации ЛФХ в интерьере комплексов и формированием новых липидных кластеров, приводящих к увеличению числа межмолекулярных контактов.

4. В случае *обогащённых* липосом ФХ рост молярной массы и плотности их супрамолекулярных комплексных частиц с конъюгатом вызван уменьшением размеров липосом ФХ в результате добавления АЛК или триглицеридов льняного масла, и, как следствие, возрастанием их контактирующей поверхности.

5. В защите от окисления и деградации липосом ФХ и мицелл ЛФХ (исходных и *обогащённых*), инкапсулированных конъюгатами, определяющая роль принадлежит как высокой плотности частиц супрамолекулярных комплексов в целом, так и повышенной микровязкости липидных слоёв инкапсулированных липосом ФХ и мицелл ЛФХ.

6. Эфирное масло гвоздики, в дополнение к антиоксидантной роли, вызывает уменьшение размеров липосом ФХ (исходных и *обогащённых*), что, в свою очередь, приводит к возрастанию их сшивающей способности (возрастанию площади

контактирующей поверхности) и тем самым – к увеличению плотности и защитной способности их супрамолекулярных комплексов с ковалентным конъюгатом.

7. Ключевыми структурными параметрами для эффективного высвобождения липидов из их комплексов с ковалентным конъюгатом в условиях переваривания *in vitro* являются: последовательное понижение как плотности комплексных частиц, так и степени их ассоциации, а также более открытая архитектура.

Научная новизна работы.

1. Впервые изучено влияние индивидуальной АЛК или триглицеридов льняного масла на общую и локальную структуру липосом ФХ и мицелл ЛФХ в водной среде, в том числе, в присутствии эфирного масла гвоздики. Рассмотрено влияние белок-полисахаридных конъюгатов на структуру липидных слоёв липосом ФХ и мицелл ЛФХ (исходных и *обогащённых*) в их супрамолекулярных комплексах.

2. Впервые изучено влияние структуры липосом ФХ и мицелл ЛФХ (исходных и *обогащённых* индивидуальной АЛК или триглицеридами льняного масла) на структурные и термодинамические параметры их супрамолекулярных комплексов с ковалентными конъюгатами казеината натрия и мальтодекстринов. Исследована роль степени полимеризации мальтодекстринов (декстрозного эквивалента) в структуре и свойствах ковалентных конъюгатов и их супрамолекулярных комплексов с биологически активными липидами.

3. Впервые исследованы взаимосвязи в следующем ряду: структура молекул биологически активных липидов и биополимеров – структурная организация биологически активных липидов и биополимеров в водной среде – структура и термодинамические параметры супрамолекулярных комплексов (липид + биополимер) в водной среде – функциональные свойства супрамолекулярных комплексов (липид + биополимер) в водной среде.

4. Впервые установлена роль эфирного масла гвоздики в формировании структуры и свойств липосом ФХ (исходных и *обогащённых*) и их супрамолекулярных комплексов с белок-полисахаридным конъюгатом.

5. Впервые охарактеризовано изменение структурных и термодинамических параметров супрамолекулярных комплексов (липид + биополимер) в условиях последовательного переваривания (ферментативного гидролиза) в ЖКТ (ротовая полость, желудок, тонкий кишечник) *in vitro*, с помощью комбинации статического, динамического и электрофоретического лазерного светорассеяния.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные данные о структурных и термодинамических параметрах, а также функциональных свойствах супрамолекулярных частиц, включающих биополимеры и биологически активные липиды, являются физико-химической основой для проведения дальнейших фундаментальных исследований, связанных с молекулярным дизайном стимул-чувствительных биополимерных наноконтейнеров пищевого и фармацевтического назначения.

Так, объединение инкапсулирующих свойств фосфолипидов сои и ковалентных конъюгатов казеината натрия с мальтодекстринами позволило получить водорастворимую и стабильную к окислению форму системы доставки ω -3 ПНЖК без использования синтетических ПАВ. Впервые показана возможность целенаправленного регулирования молярной массы, размеров, плотности и термодинамических параметров биополимерных систем доставки с помощью эфирного масла гвоздики. Впервые предложенная в работе совокупность методов лазерного светорассеяния (статического, динамического и электрофоретического) позволяет получить принципиально новые сведения о характере превращений наноразмерных частиц в процессе переваривания в ЖКТ *in vitro*, значимые для исследований в области контроля и регулирования биодоступности и биоусвоения профилактических и лекарственных веществ.

Личный вклад диссертанта. Автор принимал активное участие в постановке задач исследования, самостоятельно проводил поиск и анализ литературных данных, непосредственно участвовал в выполнении экспериментальной работы, обработке полученных результатов и подготовке их к публикации. Материалы диссертации доложены автором в виде устных и стендовых докладов на российских и международных научных конференциях, форумах и конгрессах. Исследования, полученные на приборах коллективного пользования ИБХФ РАН (электронный парамагнитный резонанс, электрофоретическое лазерное светорассеяние, атомно-силовая микроскопия) выполнялись в соавторстве с д.б.н. проф. Пальминой Н.П., к.б.н. Богдановой Н.Г., к.х.н. Каспаровым В.В, к.х.н. Плащиной И.Г., к.б.н. Бинюковым В.И. Отдельные этапы исследований выполнялись в соавторстве с сотрудниками лаборатории функциональных свойств биополимеров ИБХФ РАН к.х.н. Антиповой А.С., к.х.н. Мартиросовой Е. И., к.х.н. Григорович Н.В.

Достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных выводов обеспечивалась использованием современных и общепринятых физико-химических методов исследования биополимеров, липидов и их супрамолекулярных комплексов. Эта достоверность также основывалась на статистической оценке погрешности измерений и согласованности полученных результатов как между различными методами исследования, так и с литературными данными. В работе использовалось современное оборудование ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН.

Апробация результатов исследования. Результаты проведенных исследований были представлены в виде устных и стендовых докладов на следующих научных конференциях: XI Всероссийской научно-практической конференции «Производство и потребление пищевых лецитинов: ожидания следующего десятилетия» (Санкт-Петербург, 2010 г.); Международной конференции «3th ILPS Lecithin Short Course» (Гент (Бельгия), 2010 г.); Международной конференции «BerlinFOOD 2010 PhD Conference» (Берлин (Германия), 2010 г.); VIII Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2010 г.); Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011, 2013-2019 гг.); IV Международной конференции «Delivery of Functionality in Complex Food Systems

Physically-Inspired Approaches from the Nanoscale to the Microscale» (Гуэлф (Канада), 2011 г.); Международной конференции «Phospholipids in Pharmaceutical Research» (Гейдельберг (Германия), 2011 г.); Международной конференции «10th ILPS Phospholipid Congress» (г. Роттердам (Нидерланды), 2011 г.), Первом международном конгрессе «Экологическая, продовольственная и медицинская безопасность человечества» (г. Москва, 2011 г.); Ежегодной Международной молодёжной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2011, 2012, 2017 гг.); XIV Всероссийском конгрессе диетологов и нутрициологов с международным участием «Питание и Здоровье» (г. Москва, 2011, 2013 гг.); Международной конференции «Food structure, digestion & health», Палмерстон Норт (Новая Зеландия), 2012 г.); Международной конференции «Food Colloids 2012: Creation and Breakdown of Structure», (г. Копенгаген (Дания), 2012 г.); Международной конференции «XIX International starch convention Moscow-Stasow», (г. Москва, 2012 г.); XII Научно-практической конференции с международным участием «Современные тенденции в науке, производстве и использовании фосфолипидов» (г. Санкт-Петербург, 2012 г.); Международной конференции «2nd International Conference on Food Digestion» (г. Мадрид (Испания) 2013 г.); Международной конференции «Gums & Stabilisers for the Food Industry Conference. The changing face of food manufacture; the role of hydrocolloids». (г. Рексхем (Великобритания) 2013, 2015 гг., г. Берлин (Германия), 2017 г.); Международной конференции «Food Structure and Functionality Conference – 15 years later» (г. Старе-Яблонки (Польша), 2013 г.); Международной конференции «IV International Conference on colloid chemistry and physicochemical mechanics» (г. Москва, 2013 г.); Международной конференции «1st UK Hydrocolloids Symposium» (г. Хаддерсфилд (Великобритания), 2013 г.); Международной конференции «International Symposium on Delivery of Functionality in Complex Food Systems «Physically-Inspired Approaches from the Nanoscale to the Microscale» (г. Хайфа (Израиль), 2013 г.); г. Париж (Франция), 2015 г.); Международной конференция «15th Food Colloids Conference», (г. Карлсруэ (Германия), 2014 г.); Международной конференции «28th EFFoST International Conference: Innovations in attractive and sustainable food for health» (г. Уппсала, Швеция, 2014 г.).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ номер 14-16-00102 и гранта РФФИ по конкурсу «мол_а» номер 18-316-00111.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 62 печатные работы, из них – 6 статей (3 публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и 3 публикации в книгах, индексируемых в базах Scopus и WoS); 56 тезисов в сборниках трудов научных конференций.

Структура и объём работы. Работа изложена на 156 страницах, содержит 39 рисунков, 23 таблицы и 4 приложения. Список литературы включает 321 источник. Диссертация состоит из введения; главы литературного обзора; главы, описывающей материалы и методы; двух глав, включающих результаты экспериментов и их обсуждение, каждая из которых состоит из двух частей; заключения; списка сокращений и условных обозначений; списка литературы; приложений.

Основные сокращения, принятые в работе. ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ФФИ – физиологически функциональный ингредиент; ФХ – фосфатидилхолин; ЛФХ – лизофосфатидилхолин; АЛК – альфа-линоленовая ПНЖК; ЛК – линолевая ПНЖК; ЛМ – льняное масло; ФХ–АЛК и ФХ–ЛМ – *обогащённые* липосомы ФХ; ЛФХ–АЛК и ЛФХ–ЛМ – *обогащённые* мицеллы ЛФХ; ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин; ДЭ – декстрозный эквивалент; Ко_{NS} – ковалентный конъюгат казеината натрия с мальтодекстрином SA2 (ДЭ = 2); Ко_М – ковалентный конъюгат казеината натрия с мальтодекстрином MD10 (ДЭ = 10); ЭМГ – эфирное масло гвоздики.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследования.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Рассмотрены аспекты проблемы несбалансированного употребления жиров и возможные способы ее решения. Обобщены литературные данные, охватывающие принципы создания систем доставки биологически активных веществ через пищевые системы с использованием липидов и пищевых биополимеров.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Описаны основные объекты и методы исследования, а также материалы, используемые в работе.

Основными объектами исследования явились полиненасыщенные биологически активные липиды с различной структурой:

- индивидуальные ПНЖК: (1) ω -3 альфа-линоленовая ПНЖК (АЛК) (> 99 % АЛК (Sigma L 2376, США)); (2) ω -6 линолевая ПНЖК (ЛК) (> 99 % ЛК (Sigma L 1376, США));

- фосфолипиды сои: (3) фосфатидилхолин (ФХ) (7 % АЛК, 59 % ЛК (Lipoid S100 GmbH, Германия)); (4) лизофосфатидилхолин (ЛФХ) (6 % АЛК, 48 % ЛК (Lipoid LPC80 GmbH, Германия));

- (5) триглицериды льняного масла (ЛМ) (55 % АЛК, 18 % ЛК (СоцСервис Агро, Россия)).

Выбранные фосфолипиды представляли особый интерес для создания ФФИ, поскольку они хорошо зарекомендовали себя в фармацевтической практике, с одной стороны, как липосомальные и мицеллярные наноконтейнеры для доставки лекарственных веществ и, с другой стороны, либо как эффективные геро- и гепатопротекторы (ФХ), либо как агенты, увеличивающие биодоступность лекарств (ЛФХ).

Для обеспечения как растворимости выбранных липидов в водной среде, так и их защиты от окисления и деградации использовали их самопроизвольное комплексообразование с пищевыми биополимерами (осуществляемое с помощью механического перемешивания в шейкере (GFL 3032, Германия) при 40 °С, 1 час). В качестве биополимерной основы были выбраны казеинат натрия (натриевая форма основного белка молока – казеина (Sigma C8654, Новая Зеландия)) и мальтодекстрины (продукты ферментативного гидролиза картофельного крахмала с ДЭ = 2 (Paselli SA2,

Avebe Group, Нидерланды) или ДЭ = 10 (Paselli MD10, Avebe Group, Нидерланды)), объединённые ковалентной связью в конъюгаты (Кон_S или Кон_M, соответственно). Такие белок-полисахаридные конъюгаты получали с помощью лиофилизации биополимерной смеси (весовое соотношение белок : мальтодекстрин = 1 : 2) и последующего прогрева в течение 72 ч (температура 60 °С, влажность 79 %), инициируя начальную стадию реакции Майяра.

Для дополнительной стабилизации ПНЖК от окисления и деградации использовали эфирное масло гвоздики (ЭМГ) (Plant Lipids Ltd., Индия) (4 % к общему весу липидов).

Все исследуемые растворы готовились в условиях: фосфатный буфер; pH = 7,0; ионная сила I = 0,001 М. При необходимости готовые растворы комплексов подвергали равновесному диализу (Visking Dialysis Tubing (Type 36/32), Serva) для удаления остаточных количеств этанола, который использовали в небольших количествах для растворения биологически активных липидов (ФХ, АЛК, ЛК) и растительного антиоксиданта (ЭМГ).

Методы получения липосом ФХ, ДПФХ/мицелл ЛФХ (исходных/обогащённых) включали последовательно механическую (Heidolph, Германия) и ультразвуковую (VCX-130, Sonics & Materials, США) гомогенизации (во льду), с последующей экструзией (Avanti Polar Lipid Extruder, США) через мембранный фильтр с размером пор 100 нм.

Основные **методы** анализа структуры и функциональных свойств супрамолекулярных комплексов и их отдельных компонентов включали:

- многоугловое лазерное (633 нм; He-Ne-лазер) светорассеяние в статическом и динамическом режимах (ЛС-01 ЗАО Научные приборы, Санкт-Петербург): определение/расчёт структурных (*гидродинамического радиуса (R_h); радиуса инерции (R_G); структурно-чувствительного параметра, характеризующего форму ($\rho = R_G/R_h$); средневесовой молярной массы (M_w); плотности (d)*) и термодинамических (*вторых вириальных коэффициентов (A_2 , весовая шкала, и A_2^* , молярная шкала), характеризующих термодинамическое сродство к растворителю*) параметров исходных биополимеров, их белок-полисахаридных конъюгатов и комплексов этих конъюгатов с липидами (в статическом и динамическом режимах), а также размеров (R_h) липосом ФХ и мицелл ЛФХ (исходных/обогащённых) (в динамическом режиме);

- вискозиметрию разбавленных растворов (капиллярный вискозиметр Убеллоде, Россия): измерения характеристической вязкости ($[\eta]$) биополимеров и их комплексов с липидами;

- дифференциально-сканирующую калориметрию (ДСК) (ДАСМ-4М, Пущино, Россия): изучение влияния АЛК, ЛМ и ЭМГ, а также формирования супрамолекулярных комплексов с конъюгатом на термодинамические параметры и функции фазового перехода в бислоях липосом модельного фосфолипида дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) (Sigma, США) из их гелеподобного в жидко-кристаллическое состояние;

- спектрофотометрию (Beckman DU-70, США и СФ-2000, ОКБ Спектр, Россия): определение концентраций липидов; оценка степени связывания белка и мальтодекстринов в ковалентных конъюгатах; оценка инкапсулирующих свойств конъюгатов по

отношению к липидам; оценка продуктов окисления липидов; оценка биодоступности липидов из их комплексов с конъюгатами в модельных условиях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ);

- дифференциальную рефрактометрию (633 нм) (Shimadzu, Япония): определение значений инкрементов показателя преломления и концентраций казеината натрия, полисахаридов (мальтодекстринов), ковалентных конъюгатов, а также их комплексов с липидами;

- электрофоретическое светорассеяние: измерение ζ - потенциала (Zetasizer Nano ZS Malvern, Великобритания): ζ - потенциал липосом ФХ и мицелл ЛФХ (исходных/обогащённых), конъюгатов и их комплексов;

- электронный парамагнитный резонанс (Bruker EMX, Германия): определение микровязкости липидных слоёв липосом ФХ и мицелл ЛФХ (исходных/обогащённых) в свободном состоянии и в составе комплексов с конъюгатами, по времени вращательной корреляции спинового зонда (τ_c) (16-доксилстеариновой кислоты (16-ДСК) (Avanti Polar Lipids, США);

- атомно-силовую микроскопию (SOLVER P47, SMENA, NT-MDT, Россия): исследование рельефа поверхности липосом ФХ (исходных/обогащённых) и их комплексов с биополимерами.

Все представленные в работе численные данные являются средними значениями, полученными как минимум из двух повторов экспериментов, стандартное отклонение полученных величин от среднего не превышало ± 2 %. Статистический анализ экспериментально полученных величин проводили с использованием OriginPro 8 (ANOVA) при статистической значимости различий в измеренных величинах $p < 0,05$.

Главы 3 и 4 включают полученные РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ и их ОБСУЖДЕНИЕ.

Глава 3. БИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ: ФОСФОЛИПИД – БИОПОЛИМЕР

Влияние структуры фосфолипидов на формирование и функциональные свойства их комплексов с ковалентными конъюгатами, объединяющими казеинат натрия и мальтодекстрины

В этой части работы основными объектами исследований явились супрамолекулярные комплексы, включающие либо липосомы ФХ (1×10^{-3} М), либо мицеллы ЛФХ (1×10^{-3} М) и один из двух типов белок-полисахаридных конъюгатов (3 вес/объём %), а именно Кон_S с мальтодекстрином SA2 (ДЭ = 2) или Кон_M с мальтодекстрином MD10 (ДЭ = 10).

Прежде всего, были получены и охарактеризованы конъюгаты Кон_S и Кон_M (Таблица 1). Найдено, что в результате ковалентного связывания белка с длинноцепочечным мальтодекстрином SA2 (ДЭ = 2) и короткоцепочечным мальтодекстрином MD10 (ДЭ = 10) было задействовано 30 % и 45 % аминокислотных остатков лизина соответственно.

Таблица 1 – Расчёт количества молекул мальтодекстринов, ковалентно присоединённых к белку при формировании конъюгатов Кон_М и Кон_С

	% потери аминокислот лизина казеината натрия в конъюгате, т.е. связанных с мальтодекстрином	R_m^1	Количество молекул мальтодекстрина, ковалентно присоединённых к усреднённой молекуле казеина	Количество молекул мальтодекстрина, не связанных ковалентно с белком
Кон _М	45 ± 4,0	27	6	21
Кон _С	30 ± 3,0	5	4	1

R_m^1 – молярное соотношение мальтодекстринов : белок, рассчитанное на основе данных молярных масс индивидуальных молекул мальтодекстринов (9 кДа для мальтодекстрина SA2 и 1,8 кДа для мальтодекстрина MD10) и усреднённой молекулы казеинов ($\alpha_1, \alpha_2, \beta$ и κ) составляющих казеината натрия (~ 24 кДа).

На основе этих данных, а также молярных масс индивидуальных молекул мальтодекстринов, казеинов ($\alpha_{s1}, \alpha_{s2}, \beta$ и κ) и аминокислотного состава последних было установлено, что около 6 молекул мальтодекстрина MD10 и 4 молекул мальтодекстрина SA2 было присоединено к усреднённой (как по молярной массе (~ 24 кДа), так и по содержанию аминокислотных остатков лизина (12,53)) молекуле казеина при формировании конъюгатов. Супрамолекулярные частицы конъюгатов по сравнению с белком обладали более низкой молярной массой (M_w). Они характеризовались наноразмерами (R_G), сферической архитектурой, высоким термодинамическим сродством к воде ($A_2 > 0$; $A_2^* > 0$) в изученных условиях (pH = 7,0; I = 0,001 М (Таблица 2). При формировании комплексных частиц ковалентных конъюгатов с липосомами ФХ и мицеллами ЛФХ были установлены их высокие инкапсулирующие свойства (> 95 % по отношению к обоим фосфолипидам). При этом полученные комплексные частицы характеризовались высокой растворимостью в водной среде, оптической прозрачностью и наноразмерами, отличались меньшей полидисперсностью по сравнению с частицами конъюгатов (в качестве примера на Рисунке 1 приведено распределение размеров липосом ФХ/мицелл ЛФХ, частиц ковалентных конъюгатов и их комплексов). Сравним подробнее влияние липосом ФХ и мицелл ЛФХ на структурные и термодинамические параметры, а также свойства их супрамолекулярных комплексов с полученными конъюгатами.

(1) Эффективное инкапсулирование фосфолипидов конъюгатами приводило к значительно *большой плотности* d частиц их супрамолекулярных комплексов по сравнению с конъюгатами (в 1,5–2,4 раза) за счёт ассоциации (рост молярной массы, M_w , более выраженной в случае Кон_М–ЛФХ и Кон_С–ЛФХ) и/или некоторого уменьшения размера комплексов (более низкие значения R_G , как в случае Кон_М–ФХ, Кон_С–ФХ, Кон_С–ЛФХ) по сравнению с размером конъюгатов.

Таблица 2 – Структурные и термодинамические параметры, а также схематичное представление (основанное на этих параметрах) супрамолекулярных частиц комплексов ковалентных конъюгатов Кон_S/Кон_M с фосфолипидами: липосомами фосфатидилхолина (ФХ) или мицеллами лизофосфатидилхолина (ЛФХ) (рН 7,0; ионная сила I = 0,001 М; 25 °С)

Образец	Кон _M -ЛФХ					Кон _M -ФХ					Кон _S -ЛФХ					Кон _S -ФХ				
	$M_w \times 10^{-6}$ (Да)	$A_2 \times 10^5$ (м ³ моль кг ⁻²)	A_2^* (м ³ моль ⁻¹)	$A_{2\text{искл}}$ (м ³ моль ⁻¹)	$A_{2\text{эл}} + A_{2\text{вод}} + A_{2\text{гидр}}$ (м ³ моль ⁻¹)	R_G (нм)	$\rho = R_G/R_h$	d (нм)	$1/[\eta]$ (мл/г)	ζ -потенциал (мВ)										
Белок	11,9 ± 1,2	4,4 ± 0,4	12,4 ± 1,2	23,6 ± 2,3	-11,2 ± 1,1	159 ± 8,0	1,5 ± 0,04	1,2 ± 0,06	69 ± 7	-31,0 ± 1,6										
Кон _M	4,7 ± 0,5	3,1 ± 0,2	1,4 ± 0,14	20,8 ± 2,1	-19,2 ± 1,8	140 ± 7,0	1,4 ± 0,04	0,7 ± 0,03	77 ± 8	-27,0 ± 1,4										
Кон _M -ФХ	5,9 ± 0,6	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,1	3,9 ± 0,4	-2,8 ± 0,3	114 ± 5,7	2,0 ± 0,05	1,6 ± 0,07	83 ± 8	-25,6 ± 1,3										
Кон _M -ЛФХ	15,0 ± 1,2	4,9 ± 0,5	22,0 ± 2,2	15,9 ± 1,6	6,2 ± 0,6	157 ± 7,9	1,7 ± 0,04	1,5 ± 0,07	248 ± 25	-26,4 ± 1,3										
Кон _S	6,0 ± 0,5	3,8 ± 0,3	2,8 ± 0,2	7,4 ± 0,7	-4,6 ± 0,4	125 ± 6,3	1,8 ± 0,05	1,2 ± 0,06	44 ± 4	-22,0 ± 1,1										
Кон _S -ФХ	6,8 ± 0,5	2,6 ± 0,3	2,4 ± 0,24	3,5 ± 0,35	-1,1 ± 0,1	112 ± 5,6	2,0 ± 0,05	1,9 ± 0,08	60 ± 6	-22,8 ± 1,1										
Кон _S -ЛФХ	9,4 ± 0,9	2,4 ± 0,2	4,3 ± 0,4	3,3 ± 0,3	1,0 ± 0,1	109 ± 5,5	2,0 ± 0,05	2,9 ± 0,15	86 ± 9	-23,4 ± 1,2										

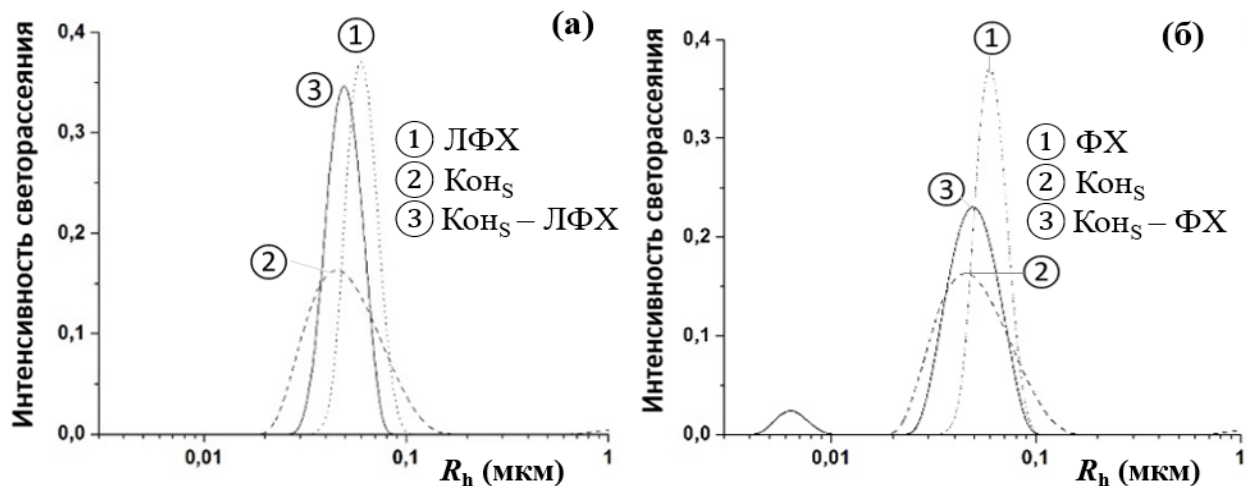


Рисунок 1 – Распределения по размеру мицелл ЛФХ (а) или липосом ФХ (б), частиц чистого конъюгата Кон_С (а, б) и комплексных частиц (Кон_С–ЛФХ (а)/Кон_С–ФХ (б)) в водном буферном растворе (рН 7,0; ионная сила $I = 0,001$ М; 25 °С) (экспериментальная ошибка измерения $R_h \leq 10$ %).

Здесь интересно отметить, что увеличение плотности комплексных частиц по сравнению с частицами конъюгатов хорошо коррелирует с обнаруженной аналогичной тенденцией к росту величин обратной характеристической вязкости $1/[\eta]$ для всех комплексов (Таблица 2). Особенно высокое значение $1/[\eta]$, найденное для Кон_М–ЛФХ, по всей видимости, обусловлено наибольшим термодинамическим сродством этого комплекса к водной среде ($A_2^* = 22,0$ м³моль⁻¹).

(2) Для всех комплексных частиц были найдены *положительные значения* вторых вириальных коэффициентов A_2 (весовая шкала концентраций) и A_2^* (молярная шкала концентраций), указывающие на термодинамически хорошее сродство комплексных частиц к водной среде, что согласовывалось с найденной высокой степенью растворимости комплексов. При этом положительные значения второго вириального коэффициента A_2^* обеспечивались, преимущественно, вкладом исключённого объема $A_2^{\text{искл}}$. Здесь стоит отметить, что в соответствии с ростом ζ - потенциалов (заряда) комплексных частиц прослеживалась тенденция роста вклада в величину A_2^* электростатического отталкивания между частицами (переход от отрицательных к положительным величинам суммарного параметра $A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вод}} + A_2^{\text{гидр}}$) (Таблица 2).

(3) Более низкие значения ζ - потенциалов комплексов (Таблица 2) по сравнению с суммарными величинами ζ - потенциалов их компонентов (ФХ (-21,7 мВ) + Кон_М (-27 мВ) = -48,7 мВ; ФХ (-21,7 мВ) + Кон_С (-22 мВ) = -43,7 мВ; ЛФХ (-24 мВ) + Кон_М (-27 мВ) = -51 мВ; ЛФХ (-24 мВ) + Кон_С (-22 мВ) = -46 мВ) указывают на участие *электростатического притяжения* противоположно заряженных полярных групп белка и фосфолипидов в формировании комплексов, приводящее к частичной нейтрализации их зарядов.

(4) Все комплексные частицы имели *архитектуру* случайного клубка ($1 < \rho \leq 2$) (Таблица 2).

(5) Фосфолипиды в комплексах обладали высокой стабильностью к перекисному окислению, на что указывали низкие концентрации малонового диальдегида в условиях ускоренного автоокисления в присутствии ионов Cu^{2+} . Этот эффект мог быть связан с увеличением микровязкости фосфолипидных слоёв в комплексах (Таблица 3), достаточно высокой плотностью комплексных частиц в целом, а также с их компактной архитектурой, ρ (Рисунок 2).

Таблица 3 – Влияние ковалентных конъюгатов Кон_S и Кон_M ($C_{\text{кон}} = 1$ вес/объём %) на время τ_c вращательной корреляции парамагнитного зонда 16-ДСК в липидных слоях (20–22 Å) липосом ФХ и мицелл ЛФХ ($C_{\text{ФХ/ЛФХ}} = 2 \times 10^{-3}$ М)

Образец	$\tau_c \times 10^{10}$ (сек)	\pm	%*	Образец	$\tau_c \times 10^{10}$ (сек)	\pm	%*
ФХ контроль	10,10	0,20	0,0	ЛФХ (контроль)	13,4	0,14	0,0
Кон_S -ФХ	13,8	0,03	+36,6	Кон_S -ЛФХ	16,0	0,14	+19,4
Кон_M -ФХ	12,9	0,50	+27,7	Кон_M -ЛФХ	15,2	0,48	+13,4

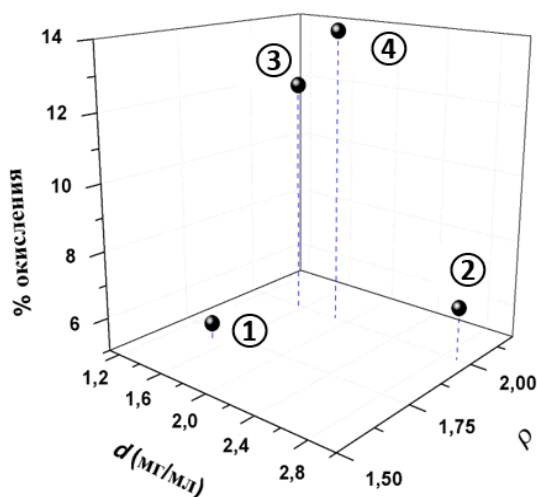


Рисунок 2 – Зависимость степени окисления* (%) липосом ФХ и мицелл ЛФХ в их комплексах с ковалентными конъюгатами от плотности, d , и архитектуры комплексных частиц, выраженной с помощью значения ρ

- ① Кон_M -ЛФХ ③ Кон_M -ФХ
 ② Кон_S -ЛФХ ④ Кон_S -ФХ

*За 100 % окисления принималась количество МДА в водных растворах (рН 7,0; ионная сила $I = 0,001$ М) ФХ/ЛФХ после 14 суток хранения исследуемых образцов при комнатной температуре и в присутствии низкой концентрации (10^{-5} М) ионов Cu^{2+} (ошибка измерения МДА ≤ 15 %).

На основании полученных данных можно предположить, что и липосомы ФХ, и мицеллы ЛФХ ведут себя как внутри- и межмолекулярные сшивающие агенты по отношению к ковалентным конъюгатам, во взаимодействии с которым большое значение имеют электростатические силы. При этом более выраженная сшивающая способность ЛФХ (увеличение ассоциации конъюгата, как в случае с Кон_M и/или его плотности, как в случае с Кон_S) может быть связана с менее стабильной организацией мицеллярных агрегатов ЛФХ и их возможным перестраиванием при комплексообразовании с конъюгатом (благодаря которому могло происходить увеличение числа внутри- и межмолекулярных контактов), в отличие от липосом ФХ, целостность которых внутри комплекса подтверждалась данными ДСК (Таблица 4, Рисунок 3).

Таблица 4 – Термодинамические параметры фазового перехода от гелеподобного к жидкокристаллическому состоянию бислоя липосом ДПФХ ($0,5 \times 10^{-3}$ М) в их свободной форме и в комплексах с ковалентными конъюгатами (0,5 вес/объем) (рН 7,0; I = 0,001 М; 25 °С)

Образец	$t_{переход}$ (°С)	Δt (°С)	$h_{пик}$ (Дж/г К)	$\Delta H_{переход}$ (Дж/г)
ДПФХ	$41,2 \pm 0,01$	1,3	$10,4 \pm 0,5$	$25,6 \pm 1,3$
Кон _S -ДПФХ	$41,2 \pm 0,01$	1,4	$15,6 \pm 0,8$	$39,9 \pm 2,0$
Кон _M -ДПФХ	$41,6 \pm 0,01$	1,7	$12,3 \pm 0,6$	$37,5 \pm 1,9$

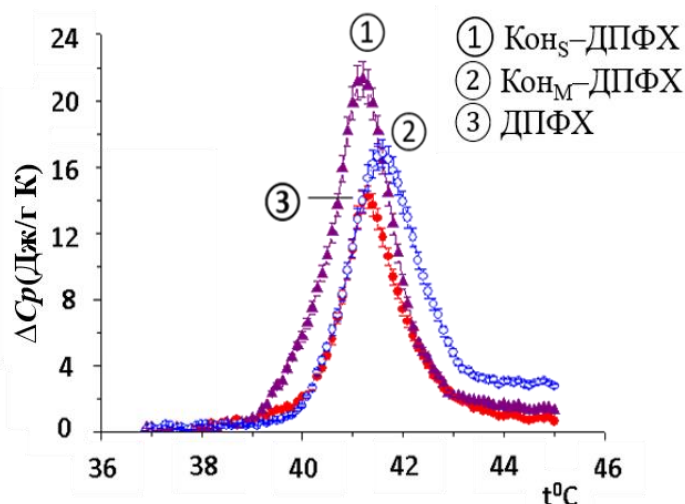


Рисунок 3 – Термограммы фазового перехода от гелеподобного состояния к жидкокристаллическому в бислоях липосом ДПФХ ($0,5 \times 10^{-3}$ М) в их свободной форме и в комплексах с ковалентными конъюгатами Кон_S и Кон_M (0,5 вес/объем %).

Кроме того, на основании полученных данных необходимо отметить, что более длинноцепочечный мальтодекстрин SA2 (ДЭ = 2) по сравнению с мальтодекстрином MD10 (ДЭ = 10) приводил к формированию более плотных частиц: (1) конъюгата Кон_S по сравнению с Кон_M; (2) комплексов Кон_S-ФХ / Кон_S-ЛФХ по сравнению с Кон_M-ФХ / Кон_M-ЛФХ (Таблица 2) в изученных условиях. Более того, микровязкость (и, следовательно, упорядоченность (плотность упаковки)) глубоколежащих фосфолипидных слоёв оказалась выше при комплексообразовании фосфолипидов с Кон_S по сравнению с Кон_M, что следует как из данных ЭПР (более высокие значения времени τ_c вращательной корреляции 16-ДСК в случае Кон_S-ФХ и Кон_S-ЛФХ по сравнению с Кон_M-ФХ и Кон_M-ЛФХ, Таблица 3), так и термодинамических параметров фазового перехода модельного фосфолипида ДПФХ (бóльшая высота и площадь эндотермического пика в случае Кон_S-ДПФХ по сравнению с Кон_M-ДПФХ (Рисунок 3, Таблица 4)).

Глава 4. ТРОЙНЫЕ СИСТЕМЫ: БИОПОЛИМЕР – БИНАРНЫЕ СМЕСИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЛИПИДОВ

В этой главе рассмотрены результаты исследований структуры и функциональных свойств комплексов, включающих различные комбинации биологически активных липидов с ковалентным конъюгатом Кон_S. В качестве бинарных смесей липидов использовали следующие пары, подобранные в соответствии с равным весовым соотношением ω -3 к ω -6 ПНЖК: ФХ-АЛК, ЛФХ-АЛК, ЛК-АЛК, ФХ-ЛМ, ЛФХ-ЛМ.

4.1 Структура и функциональные свойства комплексов ковалентного конъюгата с бинарными смесями биологически активных липидов

Рассмотрим структурные и термодинамические параметры, а также функциональные свойства комплексов, сформированных при соотношении липид : биополимер = 1 : 10.

(1) Степень инкапсулирования смесей липидов, как и в случае с чистыми фосфолипидами, составила не менее 95 % в изученных условиях (рН = 7,0; фосфатный буфер, $I = 0,001$ М; 25°C). Все диаграммы распределения частиц (а именно, *обогащённых* липосом ФХ или мицелл ЛФХ (ФХ–АЛК, ЛФХ–АЛК, ФХ–ЛМ, ЛФХ–ЛМ) по размерам и их комплексов с конъюгатами), согласно данным динамического светорассеяния, характеризовались появлением новых пиков комплексов (пример которых представлен на Рисунке 4). Здесь важно также отметить более низкую полидисперсность комплексов по сравнению с конъюгатом, о чём свидетельствовали значительно более узкие распределения частиц комплексов по размерам;

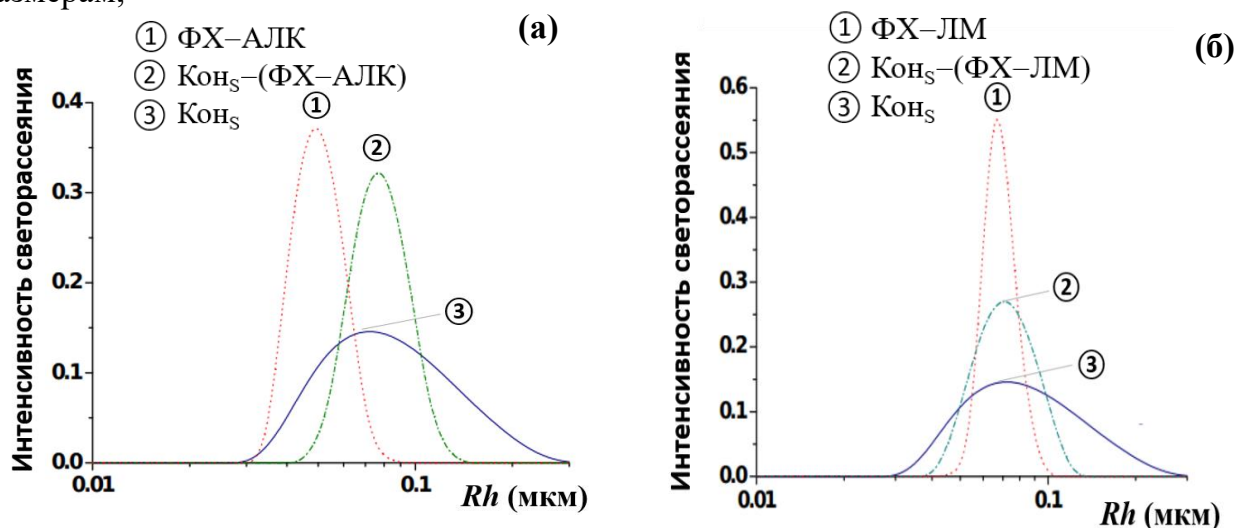


Рисунок 4 – Распределение по размерам частиц *обогащённых* липосом ФХ–АЛК (а), ФХ–ЛМ (б), чистого конъюгата КоnS (а, б) и их комплексов (КоnS–(ФХ–АЛК) (а)/КоnS–(ФХ–ЛМ) (б)) в водном буферном растворе (рН 7,0; ионная сила $I = 0,001$ М; 25°C) (экспериментальная ошибка измерений $R_h \leq 10\%$)

(2) Все полученные супрамолекулярные комплексы обладали высокой степенью растворимости в заданных условиях и характеризовались оптической прозрачностью. В основе этого лежало хорошее термодинамическое сродство комплексных частиц к растворителю, на которое указывали положительные значения второго вириального коэффициента A_2 ($A_2 = 1,7 - 4,4 \times 10^{-5}$ (м³моль кг⁻²)) (Таблица 5);

(3) Комплексообразование частиц конъюгата с *обогащёнными* липосомами ФХ и мицеллами ЛФХ приводило к ярко выраженной их ассоциации (возрастание значений M_w (Таблица 5), за исключением случая КоnS–(ЛФХ–АЛК). При этом незначительное увеличение размеров ($R_G = 129-325$ нм для комплексов по сравнению с $R_G = 125$ нм для конъюгата на фоне более высокого роста молярной массы (M_w) и изменения архитектуры от сферической к анизотропной ($\rho > 1,8$) приводило к значительному

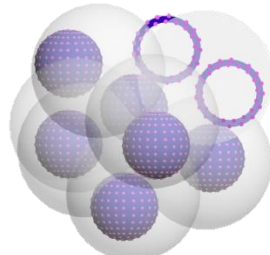
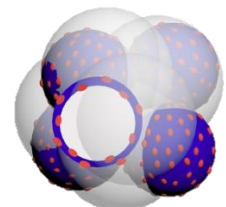
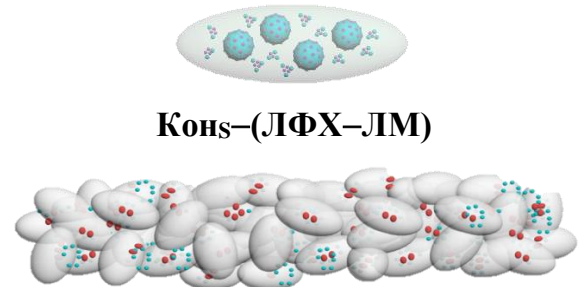
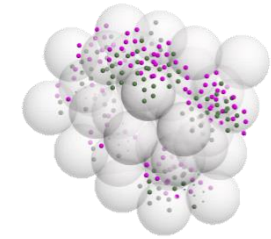
возрастанию плотности комплексных частиц ($d = 2,5 - 156,0$ мг/мл для комплексов по сравнению с $d = 1,2$ мг/мл для конъюгата). Важно отметить, что такой рост плотности был более ярко выраженным при комплексообразовании конъюгата с *обогащёнными* мицеллами ЛФХ ($d = 6,8$ мг/мл для ЛФХ–АЛК, $d = 156,0$ мг/мл для ЛФХ–ЛМ), чем с *обогащёнными* липосомами ФХ ($d = 2,5$ мг/мл для ФХ–АЛК, $d = 5,6$ мг/мл для ФХ–ЛМ) (как было отмечено выше, аналогичная тенденция наблюдалась при комплексообразовании конъюгата с чистыми липосомами ФХ ($d = 1,9$ мг/мл) и мицеллами ЛФХ ($d = 2,9$ мг/мл) (Таблица 2)). С другой стороны, обогащение фосфолипидов триглицеридами ЛМ в обоих случаях приводило к большему росту плотности комплексных частиц по сравнению с включением индивидуальной АЛК (Таблица 5);

(4) Включение эфирного масла гвоздики в состав липосом ФХ способствовало еще более выраженной ассоциации конъюгата в комплексах (Таблица 5). При этом тенденция влияния липидного состава липосом ФХ на рост значений молярной массы комплексных частиц строго повторялась, а именно, соответствовала величинам M_w в ряду для $(K_{онс} < K_{онс}-(ФХ-ЭМГ)) < K_{онс}-(ФХ-ЛМ-ЭМГ) < K_{онс}-(ФХ-АЛК-ЭМГ)$ (т.е. аналогично $K_{онс}-ФХ < K_{онс}-(ФХ-ЛМ) < K_{онс}-(ФХ-АЛК)$) (Таблица 4);

(5) Важной отличительной чертой комплексных частиц, полученных в результате взаимодействия ковалентного конъюгата с *обогащёнными* мицеллами ЛФХ, является их анизотропная архитектура ($\rho = 3,0$ для $K_{онс}-(ЛФХ-АЛК)$ и $\rho = 5,6$ для $K_{онс}-(ЛФХ-ЛМ)$, по сравнению с формой, близкой к случайному клубку ($\rho = 2,3$ для $K_{онс}-(ФХ-АЛК)$) ($\rho = 1,7$ для $K_{онс}-(ФХ-ЛМ)$), характерной для конъюгата ($\rho = 1,7$). Здесь интересно отметить, что комплексные частицы $K_{онс}-(АЛК-ЛК)$, сформированные индивидуальными ПНЖК, отличались гелеподобной архитектурой ($\rho = 0,4$). Наиболее анизотропная форма, характерная для $K_{онс}-(ЛФХ-ЛМ)$, по всей видимости, является следствием электростатических взаимодействий (а именно, отталкивания) между близко расположенными отрицательно заряженными функциональными группами комплекса, что хорошо коррелирует, с одной стороны, с наибольшей абсолютной величиной отрицательного значения ζ -потенциала ($-51,5$ мВ), а с другой стороны, с исключительно высоким положительным электростатическим вкладом ($A_2^{эл} + A_2^{год} + A_2^{гидр} = 13861$ м³моль⁻¹) в величину молярного второго вириального коэффициента A_2^* ;

(6) Меньшие значения экспериментальных ζ -потенциалов комплексов $K_{онс}-(ФХ-АЛК)$ ($-42,0$ мВ) и $K_{онс}-(ЛФХ-АЛК)$ ($-30,0$ мВ) (Таблица 5) по сравнению с суммарными величинами конъюгата $K_{онс}$ ($-22,0$ мВ) и обогащенных липосом ФХ–АЛК ($-44,0$ мВ) или мицелл ЛФХ–АЛК ($-37,0$ мВ) указывали на существенный вклад электростатического притяжения между противоположно заряженными группами. В случае с липосомами ФХ–ЛМ ($-19,1$ мВ) и мицеллами ЛФХ–ЛМ ($-27,1$ мВ), напротив, отмечалось близкое соответствие между экспериментальными и

Таблица 5 – Структурные и термодинамические параметры, а также схематичное представление (основанное на этих параметрах) супрамолекулярных комплексов ковалентного конъюгата (Кон_S) с ФХ и бинарными смесями биологически активных липидов: ФХ–АЛК, ЛФХ–АЛК, ЛК–АЛК, ФХ–ЛМ, ЛФХ–ЛМ в отсутствие и в присутствии эфирного масла гвоздики (ЭМГ) (рН 7,0; I = 0, 001 М; 25 °С)

Образец	M _w × 10 ⁻⁶ (Да)	A ₂ × 10 ⁵ (м ³ моль кг ⁻²)	A ₂ [*] (м ³ моль ⁻¹)	A ₂ ^{искл} (м ³ моль ⁻¹)	A ₂ ^{эл} + A ₂ ^{вод+} A ₂ ^{гидр} (м ³ моль ⁻¹)	R _G (нм)	ρ = R _G /R _h	d (мг/мл)	ζ- потенциал (мВ)	Схематичное представление	
										Кон _S –(ФХ–АЛК)	Кон _S –(ФХ–ЛМ)
Кон _S	6,0 ± 0,5	3,8 ± 0,4	2,8 ± 0,25	7,4 ± 0,7	– 4,6 ± 0,4	125 ± 6,5	1,8 ± 0,05	1,2 ± 0,06	– 22,0 ± 2,2		
Кон _S –ФХ	19,0 ± 2,0	2,4 ± 0,2	17,2 ± 1,5	8,2 ± 0,8	9,0 ± 0,9	163 ± 8,5	2,2 ± 0,05	1,7 ± 0,08	– 22,8 ± 1,2		
Кон _S –(ФХ–АЛК)	46,3 ± 4,6	2,4 ± 0,2	104,6 ± 9,5	12,0 ± 1,2	92,0 ± 8,1	193 ± 9,5	2,3 ± 0,04	2,5 ± 0,12	– 42,0 ± 4,2		
Кон _S –(ФХ–ЛМ)	30,7 ± 3,0	2,0 ± 0,2	37,7 ± 3,5	8,8 ± 0,8	28,9 ± 2,5	129 ± 6,5	1,7 ± 0,04	5,6 ± 0,28	– 42,0 ± 4,2		
Кон _S –(ЛФХ–АЛК)	6,3 ± 0,6	4,4 ± 0,4	3,5 ± 0,35	3,7 ± 0,3	– 0,2 ± 0,01	129 ± 6,5	3,0 ± 0,07	6,8 ± 0,31	– 30,0 ± 3,0		
Кон _S –(ЛФХ–ЛМ)	648,5 ± 65	1,7 ± 0,2	13872,2 ± 1380	16,6 ± 1,5	13861 ± 1380	325 ± 16	5,6 ± 0,12	156,0 ± 7,4	– 51,5 ± 5,1		
Кон _S –ФХ–ЭМГ	33,2 ± 3,3	2,2 ± 0,2	48,5 ± 4,8	6,7 ± 0,6	41,8 ± 4,1	141 ± 7,0	2,0 ± 0,04	4,7 ± 0, 25	– 19,3 ± 2,0		
Кон _S –(ФХ–АЛК–ЭМГ)	71,0 ± 7,1	2,4 ± 0,2	240,7 ± 24	24,1 ± 0,2	216,6 ± 21,5	249 ± 12	3,0 ± 0,05	10,8 ± 0,51	– 34,0 ± 3,4		
Кон _S –(ФХ–ЛМ–ЭМГ)	47,0 ± 4,7	1,9 ± 0,2	83,9 ± 8,1	13,9 ± 1,3	70,1 ± 7,0	150 ± 7,5	1,7 ± 0,03	5,5 ± 0,28	– 42,0 ± 4,2		
Кон _S –(АЛК–ЛК)	324,9 ± 32	1,7 ± 0,2	3589 ± 355	1063,1 ± 105	2525,2 ± 152	165 ± 8,5	0,4 ± 0,01	28,7 ± 0,14	– 35,0 ± 3,5		

расчётными (суммарными) значениями ζ -потенциала для соответствующих комплексов с конъюгатом (Кон_S–(ФХ–ЛМ) (– 42,0 мВ); Кон_S–(ЛФХ–ЛМ) (– 51,5 мВ)), что указывало на существенный вклад в комплексообразование сил другой природы, наиболее вероятно – гидрофобного притяжения между неполярными участками молекул. При этом большее число неполярных групп оказывалось скрытыми в интерьере частиц, в то время как большее число заряженных участков (как белка, так и фосфолипидов) было экспонировано в водную среду. Такой определяющий вклад гидрофобных взаимодействий при комплексообразовании может объяснять более высокие значения плотности Кон_S–(ФХ–ЛМ) и Кон_S–(ЛФХ–ЛМ) по сравнению с плотностью комплексов Кон_S–(ФХ–АЛК) и Кон_S–(ЛФХ–АЛК).

(7) Для более глубокого понимания влияния АЛК, триглицеридов ЛМ и ЭМГ на локальную структуру липосом ФХ и мицелл ЛФХ была проведена оценка микровязкости липидных слоёв фосфолипидов с помощью ЭПР (Таблица 6). Так, обогащение липосом ФХ и мицелл ЛФХ как триглицеридами ЛМ, так и индивидуальной АЛК, приводило к значительному уменьшению микровязкости их липидных слоёв, о чём свидетельствовало снижение времени вращательной корреляции, τ_c , зонда 16-ДСК. Этот результат может быть обусловлен увеличением доли ненасыщенных углеводородных цепочек АЛК в составе липидных слоёв липосом ФХ и мицелл ЛФХ, что может являться одним из доказательств встраивания в них молекул триглицеридов ЛМ и АЛК. Присутствие эфирного масла гвоздики приводило лишь к небольшому повышению микровязкости липидных слоёв (Таблица 6). При этом данные ДСК, полученные на модельном фосфолипиде, свидетельствовали о жидкокристаллическом фазовом состоянии липосом ДПФХ, обогащённых АЛК или триглицеридами ЛМ (как свободных, так и в комплексе), на что указывало исчезновение ярко выраженного эндотермического пика на термограммах (Таблица 7, Рисунок 5). Этот результат, наряду с данными ЭПР, также указывал на встраивание

Таблица 6– Влияние триглицеридов льняного масла (ЛМ), α -линоленовой кислоты (АЛК), эфирного масла гвоздики (ЭМГ) и ковалентного конъюгата (Кон_S) (1 вес/объём %) на время τ_c вращательной корреляции парамагнитного зонда 16-ДСК в липидных слоях (20–22 Å) липосом ФХ и мицелл ЛФХ

Образец	$\tau_c \times 10^{10}$ (сек)	±	%*	Образец	$\tau_c \times 10^{10}$ (сек)	±	%*
ФХ контроль	10,10	0,20	100	Кон _S –ФХ	13,8	0,03	137
ФХ–ЛМ	9,27	0,15	92	Кон _S –(ФХ–ЛМ)	14,12	0,30	140
ФХ–ЛМ–ЭМГ	9,74	0,10	95	Кон _S –(ФХ–ЛМ–ЭМГ)	14,25	0,10	141
ФХ–АЛК	7,66	0,40	82	Кон _S –(ФХ–АЛК)	16,03	0,82	158
ФХ–АЛК–ЭМГ	7,99	0,01	86	Кон _S –(ФХ–АЛК–ЭМГ)	14,30	0,05	141
ЛФХ контроль	13,4	0,14	100	Кон _S –ЛФХ	16,0	0,14	119
ЛФХ–ЛМ	10,9	0,47	81	Кон _S –(ЛФХ–ЛМ)	11,6	0,11	86
ЛФХ–АЛК	8,6	0,94	64	Кон _S –(ЛФХ–АЛК)	14,8	0,81	111

$$*\text{эффект (\%)} = [(\tau_c^{\text{образец}}/\tau_c^{\text{контроль}})] \times 100$$

Таблица 7 – Термодинамические параметры фазового перехода от гелеподобного к жидкокристаллическому состоянию бислоя липосом ДПФХ (исходных/ *обогащённых*)

Образец	$t_{переход}$ ($^{\circ}\text{C}$)	Δt ($^{\circ}\text{C}$)	$h_{лик}$ (условные единицы)	$\Delta H_{переход}$ (Дж/г дпфх)
ДПФХ	$41,2 \pm 0,01$	1,3	$10,4 \pm 0,5$	$25,6 \pm 1,3$
ДПФХ–ЛМ	$39-42 \pm 0,01$	3,5	$3,1 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,6$
ДПФХ–АЛК	$42,1 \pm 0,01$	0,3	$1,0 \pm 0,05$	$2,45 \pm 0,1$

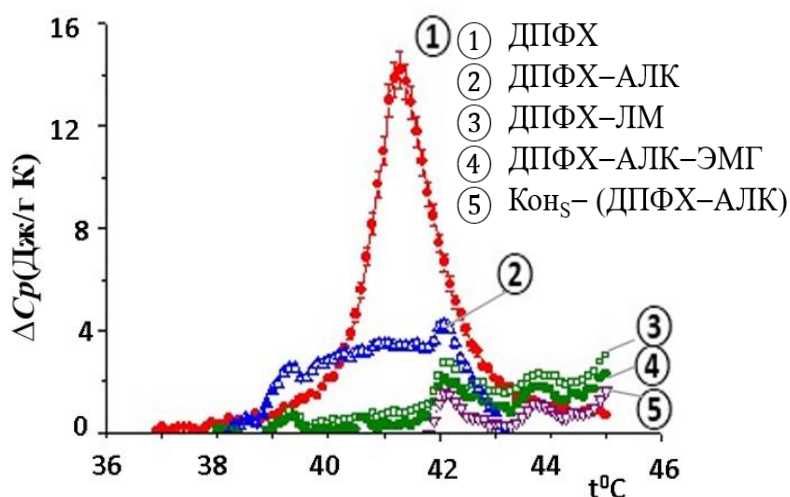


Рисунок 5 – Термограммы фазового перехода бислоя липосом ДПФХ в присутствии α -линоленовой кислоты (АЛК), триглицеридов льняного масла (ЛМ), эфирного масла гвоздики (ЭМГ), ковалентного конъюгата (Кон_S) ($C_{кон} = 0,5$ вес/объем %) в водном растворе фосфатного буфера

полиненасыщенных углеводородных цепочек ЛМ или АЛК в бислои липосом ФХ.

(8) Инкапсулирование конъюгатом липосом ФХ и мицелл ЛФХ (как исходных, так и *обогащённых*) сопровождалось существенным увеличением времени вращательной корреляции, τ_c , зонда 16-ДСК, а значит и микровязкости их липидных слоёв, что, по всей вероятности, было связано со встраиванием гидрофобных участков конъюгата в липидные слои, вызывающим упорядочивание в них гидрофобных цепочек липидов (Таблица 6). Здесь важно отметить, что в случае комплексов, содержащих липосомы ФХ, эффект увеличения микровязкости был более выраженным, чем в случае мицелл ЛФХ. Этот результат, а также рассмотренные выше тенденции к росту ассоциации и плотности, более выраженные при комплексообразовании с ЛФХ (особенно для случая Кон_S–(ЛФХ–ЛМ)), дают основание предположить о реорганизации мицелл ЛФХ и формировании новых кластеров внутри комплексных частиц, сопровождающимся значительным ростом внутри- и межмолекулярных контактов. В случае липосом ФХ бислои может сохранять высокую упорядоченность и, следовательно, свою целостность.

(9) В исследованиях АСМ (Таблица 8, Рисунок 6) полученные данные указывали на уменьшение размеров (площади поперечного сечения, S , и объема, V) *обогащённых* липосом (ФХ–АЛК, ФХ–ЛМ) по сравнению с исходными липосомами ФХ. Этот эффект был более ярко выражен в присутствии ЭМГ. По-видимому, этот результат может быть

Таблица 8 – Площадь поперечного сечения (S), объём (V) и высота (Z) липосом ФХ (исходных/ *обогащённых*), в отсутствие и в присутствии эфирного масла гвоздики (ЭМГ)

Образец	N	S (мкм) ²	V × 10 ³ (мкм) ³	Z (нм)
ФХ	269	0,079 ± 0,011	1,03 ± 0,15	11,90 ± 0,23
ФХ–ЭМГ	645	0,029 ± 0,002	0,44 ± 0,04	13,27 ± 0,19
ФХ–ЛМ	158	0,008 ± 0,00004	0,11 ± 0,006	12,45 ± 0,08
ФХ–ЛМ–ЭМГ	1838	0,0066 ± 0,0002	0,11 ± 0,006	14,89 ± 0,22
ФХ–АЛК	524	0,016 ± 0,002	0,17 ± 0,01	13,02 ± 0,18
ФХ–АЛК–ЭМГ	2469	0,009 ± 0,0003	0,07 ± 0,002	6,65 ± 0,05

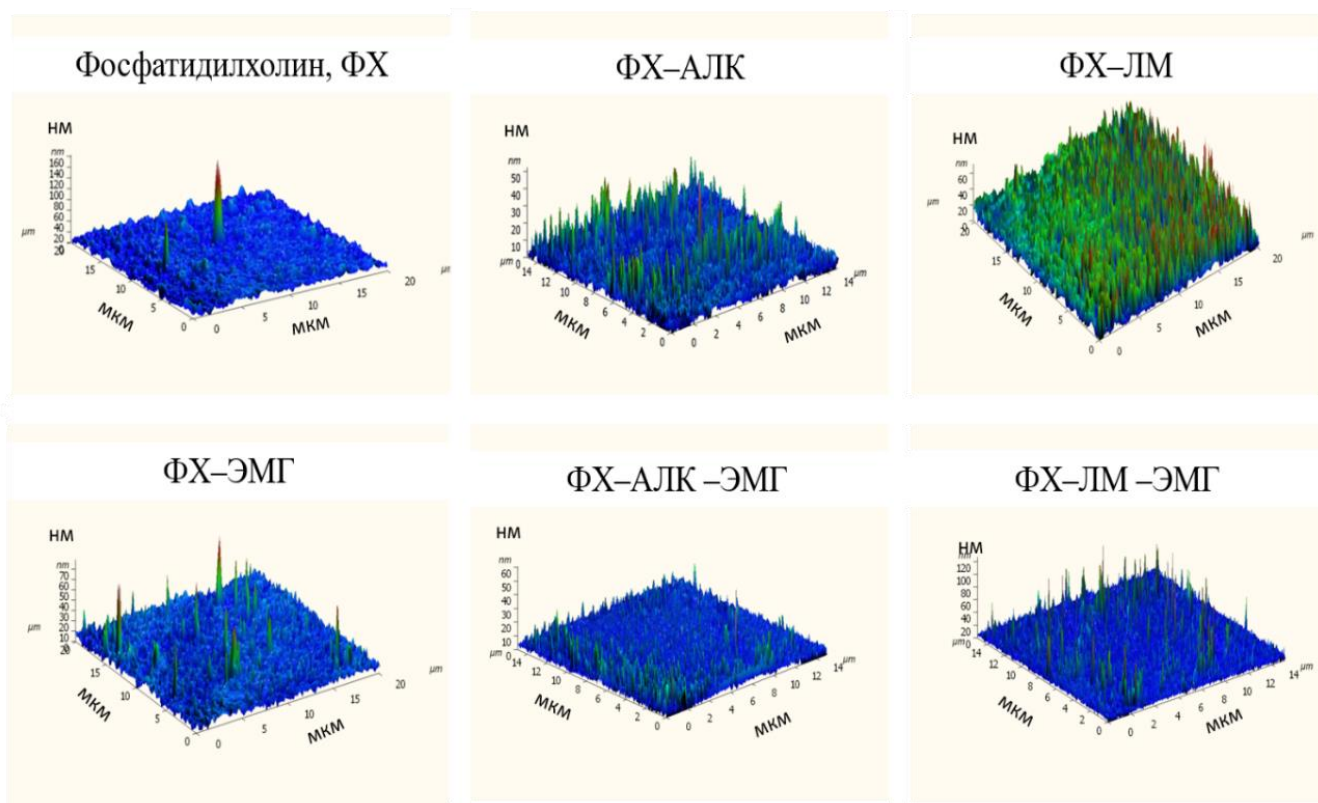


Рисунок 6 – Трёхмерные имидж-модели липосом ФХ (исходных/ *обогащённых*) в отсутствие и в присутствии эфирного масла гвоздики (ЭМГ), согласно данным атомно-силовой микроскопии

следствием уменьшения микровязкости липидных слоёв таких липосом, что способствовало большей степени их диспергируемости в процессе гомогенизации и экструзии. Здесь также важно отметить прямую взаимосвязь уменьшения размеров липосом в присутствии эфирного масла гвоздики и последующее увеличение плотности комплексных частиц, сопровождаемое большей нейтрализацией зарядов функциональных групп белка и фосфатидилхолина, найденные для Кон_S–ФХ–ЭМГ и Кон_S–(ФХ–АЛК–ЭМГ). Этот эффект может быть связан с ростом общей площади контактов между меньшими по размеру липосомами и конъюгатом.

(10) Оценка перекисного автоокисления *обогащённых* липосом ФХ и мицелл ЛФХ показала их высокую склонность к окислительной деградаци в водных растворах (Таблица 9). Однако, при инкапсулировании липидов в белково-полисахаридный конъюгат их стабильность к окислению значительно возростала, что проявлялось в существенно более низких значениях как индекса окисленности (D_{232}/D_{215}), отражающего присутствие первичных продуктов перекисного окисления (конъюгированных диеновых гидроперекисей), так и концентрации малонового диальдегида (МДА). Эфирное масло гвоздики усиливало эффект защиты от окисления. Такое значительное повышение окислительной устойчивости липидов в комплексах могло быть связано с ростом микровязкости липидных слоёв и высокой плотностью комплексных частиц в целом, препятствующих проникновению и диффузии кислорода к ненасыщенным связям инкапсулированных углеводородных цепочек липидов (при инкапсулировании конъюгатом, добавлении ЭМГ). Кроме того, в комплексах $Кон_S-(ФХ-ЛМ-ЭМГ)$ и $Кон_S-(ФХ-АЛК-ЭМГ)$ можно предполагать проявление антиоксидантных свойств ЭМГ.

Таблица 9 – Период времени (в сутках) достижения *максимальной концентрации* первичных (гидроперекисей) (D_{232}/D_{215}) и вторичных (МДА) продуктов перекисного окисления липидов в процессе хранения образцов в течение 21 суток при комнатной температуре на свету

Образец	Сутки	D_{232}/D_{215}	Сутки	$C_{МДА}$ (нмоль/мл)
ФХ–ЛМ	3	1,18 ± 0,12	3	34,3 ± 5,1
$Кон_S-(ФХ-ЛМ)$	3	0,21 ± 0,02	17	20,9 ± 3,1
$Кон_S-(ФХ-ЛМ-ЭМГ)$	3–21	(0,74 – 0,83) ± 0,08	21	3,7 ± 0,6
ФХ–АЛК	14	0,76 ± 0,08	14	21,0 ± 3,2
$Кон_S-(ФХ-АЛК)$	14	0,54 ± 0,05	21	3,5 ± 0,5
$Кон_S-(ФХ-АЛК-ЭМГ)$	14	0,34 ± 0,03	21	2,5 ± 0,4
		Сутки		$C_{МДА}$ (нмоль/мл)
ЛФХ–ЛМ		20		58,9 ± 8,8
$Кон_S-(ЛФХ-ЛМ)$		20		5,2 ± 0,8
ЛФХ–АЛК		21		26,0 ± 3,9
$Кон_S-(ЛФХ-АЛК)$		21		1,7 ± 0,3

4.2 Последовательные преобразования структурных и термодинамических параметров комплексных частиц, содержащих бинарные смеси липидов и ковалентный конъюгат, в модельных условиях желудочно-кишечного тракта

В Таблице 10 представлены результаты модельного переваривания супрамолекулярного комплекса $Кон_S-(ФХ-ЛМ-ЭМГ)$ (весовое соотношение липиды : конъюгат = 1 : 5) *in vitro*. Так, было найдено, что высвобождение липидов (т.е. возрастание концентрации свободных липидов, *клитиды*) из конъюгата происходило на стадиях переваривания комплекса в «желудке» и «кишечнике». В то же время

наблюдалось увеличение содержания свободной глюкозы, $k_{\text{глюкоза}}$, а также (%) гидролизованных пептидных связей в исследуемых образцах по сравнению с комплексом на стадии «до гидролиза». Анализ изменения структурных и термодинамических параметров изученного супрамолекулярного комплекса, а также бинарных систем (не показано) на различных стадиях модельного переваривания позволяет выделить такие факторы, способствующие высвобождению липидов, как более открытая архитектура комплексных частиц (рост величины структурно-чувствительного параметра, ρ), уменьшение их молярной массы, M_w , а также уменьшение их плотности, d .

Таблица 10 – Характеристика молекулярных параметров комплексных частиц КонС-(ФХ-ЛМ-ЭМГ) в процессе переваривания в ЖКТ *in vitro**

	До гидролиза	«Ротовая полость»	«Желудок»	«Тонкий кишечник»
$M_w \times 10^{-6}$ (Да)	42 ± 4,2	26 ± 2,5	20 ± 2,0	91 ± 9,1
$\rho = R_G/R_h$	1,6 ± 0,04	1,4 ± 0,03	1,5 ± 0,03	3,3 ± 0,07
d , мг/мл	9,7 ± 0,5	6,2 ± 0,3	3,3 ± 0,2	0,9 ± 0,05
Коэффициент увеличения концентрации свободных липидов $k_{\text{липиды}} = C_{\text{после гидролиза}}/C_{\text{до гидролиза}}$	1 ± 0,1	1 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,5 ± 0,15
Коэффициент увеличения концентрации глюкозы $k_{\text{глюкоза}} = C_{\text{после гидролиза}}/C_{\text{до гидролиза}}$	1 ± 0,1	1 ± 0,1	3,5 ± 0,4	4,8 ± 0,5
% гидролизованных пептидных связей	0	0	15 ± 1,5	14 ± 1,5

*Условия моделирования переваривания *in vitro*. «Ротовая полость»: α -амилаза + амилоглюкозидаза, pH = 7,0; 2 минуты. «Желудок»: пепсин, pH = 2,0; 2 часа. «Тонкий кишечник»: α -амилаза + амилоглюкозидаза, α -химотрипсин + трипсин; pH = 8,0; 2 часа. Соотношение (весовое фермент : субстрат = 1 : 1000 (для α -химотрипсина, пепсина, α -амилазы) и 1 : 2000 (для амилоглюкозидазы), $t = 37$ °C.

Основные результаты и выводы

1. Включение полиненасыщенных углеводородных цепочек альфа-линоленовой жирной кислоты или триглицеридов льняного масла приводит к разупорядоченности глубоколежащих липидных слоёв ФХ, ДПФХ и мицелл ЛФХ.

2. Выявлены следующие функциональные свойства комплексных частиц и их связь со структурными и термодинамическими параметрами:

(А) Высокая степень (> 95 %) инкапсулирования всех липидов конъюгатами, обусловленная участием нековалентных (электростатических, водородных, гидрофобных) взаимодействий за счёт наличия различных по природе функциональных групп в биополимерах и липидах;

(Б) Высокая растворимость в водной среде, обусловленная ростом вклада электростатического отталкивания в парные взаимодействия между комплексами, что,

наряду с вкладом исключённого объёма, обеспечивало им высокое термодинамическое сродство к растворителю;

(В) Высокая защитная способность по отношению к окислению липидов, обусловленная высокой плотностью комплексных частиц в целом за счёт сшивающего (нековалентными связями) действия липидов и увеличения микровязкости липидных слоев фосфолипидов в комплексах, замедляющих диффузию кислорода воздуха.

3. Установлена следующая роль структуры компонентов комплексных частиц в формировании комплексов:

(А) Мицеллы ЛФХ (исходные и *обогащённые*) по сравнению с липосомами ФХ (исходными и *обогащёнными*) приводят к более выраженному росту плотности и изменению других структурных параметров (молярной массы, архитектуры, заряда) частиц конъюгата. Наиболее вероятно, это связано с изменением начальной мицеллярной организации ЛФХ в интерьере комплексов и формированием новых липидных кластеров, приводящих к увеличению числа межмолекулярных контактов. В случае обогащенных липосом ФХ рост молярной массы и плотности их супрамолекулярных частиц с конъюгатом вызван уменьшением размеров липосом ФХ и, как следствие, возрастанием их контактирующей поверхности.

(Б) Молекулы менее длинноцепочечного мальтодекстрина с ДЭ = 10 (по сравнению с мальтодекстрином с ДЭ = 2) ковалентно связываются с казеинатом натрия в большем количестве за счёт меньших пространственных затруднений. Это приводит к формированию менее плотных частиц ковалентного конъюгата. Эта же причина лежит в основе меньшей плотности комплексных частиц этого конъюгата (т.е. включающего мальтодекстрин с ДЭ = 10) с ФХ/ЛФХ и меньшей микровязкости глубоколежащих липидных слоёв фосфолипидов в этих комплексах.

(В) Эфирное масло гвоздики (ЭМГ), включённое в состав липосом ФХ, приводит к уменьшению размеров липосом; небольшому увеличению микровязкости глубоколежащих слоёв ФХ; дополнительной ассоциации и росту плотности частиц конъюгатов; дополнительной защите от окисления в комплексах. Эти результаты указывают на роль ЭМГ как структурообразующего агента в комплексных частицах.

4. Высвобождение липидов из конъюгатов в условиях *in vitro* происходит на стадиях «желудок» и «тонкий кишечник». Установлены следующие ключевые структурные факторы эффективного высвобождения липидов: низкие величины плотности комплексных частиц и степени их ассоциации, а также более открытая архитектура.

Основные публикации по теме работы:

В рецензируемых научных изданиях, индексируемых в WoS и Scopus

1. Semenova, M. G. Impact of the structure of polyunsaturated soy phospholipids on the structural parameters and functionality of their complexes with covalent conjugates combining sodium caseinate with maltodextrins / M.G. Semenova, **D.V. Zelikina**, A.S. Antipova, E.I. Martirosova, N.V. Grigorovich, R.A. Obushaeva, E.A. Shumilina, N.S. Ozerova, N.P. Palmina, E.L. Maltseva, V.V. Kasparov, N.G. Bogdanova, A.V. Krivandin // Food Hydrocolloids. – 2016. – 52. –P.144-162.

2. Antipova, A.S. Sequential transformation of the structural and thermodynamic parameters of the complex particles, combining covalent conjugates (sodium caseinate + maltodextrin) with polyunsaturated lipids stabilized by a plant antioxidant, in the simulated gastrointestinal conditions in vitro / A.S. Antipova, **D.V. Zelikina**, E.A. Shumilina, K.A. Baeva, M.G. Semenova // Food Res Int. – 2016. –88. – P.173–178.

3. Semenova, M.G. Biopolymer nanovehicles for essential polyunsaturated fatty acids: Structure–functionality relationships / M.G. Semenova, A.S. Antipova, **D.V. Zelikina**, E.I. Martirosova, I.G. Plashchina, N.P. Palmina, V.I. Binyukov, N.G. Bogdanova, V.V. Kasparov, E.A. Shumilina, N.S. Ozerova // Food Res Int. – 2016. –88. – P. 70–78.

4. Semenova, M.G. Role of the covalent conjugate (sodium caseinate + maltodextrin) and a plant antioxidant in the protection against oxidation of the composite food ingredients, containing the equimass amount of ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids / M.G. Semenova, A.S. Antipova, T.A. Misharina, E.S. Alinkina, **D.V. Zelikina**, E.I. Martirosova, N.P. Palmina, V.I. Binyukov, E.L. Maltseva, V.V. Kasparov, N.S. Ozerova, E.A. Shumilina, K.A. Baeva, N.G. Bogdanova // Gums and Stabilisers for the Food Industry 18/ Ed. P.A. Williams, G.O. Phillips. –Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2016. –P. 182-189. –ISBN: 978-1-78262-327-4.

5. Semenova, M.G. Structural and thermodynamic insight into the potentiality of food biopolymers to behave as smart nanovehicles for essential polyunsaturated lipids / M.G. Semenova, A.S. Antipova, M.S. Anokhina, L.E. Belyakova, Yu.N. Polikarpov, **D.V. Zelikina**, E.I. Martirosova, N.P. Palmina, V.I. Binyukov, V.V. Kasparov, N.G. Bogdanova // Encapsulations Nanotechnology in the agri-food industry, Vol. 2/ Ed. A.M. Crumezescu. –Cambridge: Elsevier. –2016. – P. 193-228. –ISBN: 978-0-12804-307-3.

6. Semenova, M.G. Protein-polysaccharide interactions and digestion of the complex particle / M.G. Semenova, **D.V. Moiseenko (Zelikina)**, N.V. Grigorovich, M.S. Anokhina, A.S. Antipova, L.E. Belyakova, Yu.N. Polikarpov, E.N. Tsapkina // Food structure, digestion and health (1st Ed) / Ed. M. Boland, M. Golding, H. Singh. – London, Waltham (USA), San Diego (USA): Elsevier Academic Press, 2014. – P. 169-192. –ISBN: 978-0-12404-610-8.

В сборниках тезисов научных конференций

7. **Зеликина, Д.В.** Физиологически-функциональные пищевые ингредиенты на основе биополимеров и эссенциальных липидов: Структура и свойства / Д.В. Зеликина, А.С. Антипова, Е.И. Мартиросова [и др.] // Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 25 – 27 февраля 2019 г. – М.: Рэд групп, 2019. –С. 580-581. –ISBN: 978-5-9909118-0-2.

8. **Зеликина, Д.В.** Молекулярный дизайн композиционных многофункциональных ингредиентов на основе пищевых биополимеров и биологически активных веществ: общие принципы и возможности / Д.В. Зеликина, А.С. Антипова, М.Г. Семёнова // Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 23-25 мая 2018 г. – М.: Рэд групп, 2018. –С. 633-634. – ISBN: 978-5-9909118-0-2.

9. **Зеликина, Д.В.** Композиционные пищевые ингредиенты на основе биополимеров, биоактивных липидов и растительных антиоксидантов: взаимосвязь структуры и функциональных свойств / Д.В. Зеликина, А.С. Антипова, Т.А. Мишарина [и др.] // Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 20-22 февраля 2017 г. – М.: Рэд групп, 2017. –ч. 2. – С. 220-221. – ISBN: 978-5-9909118-0-2.

10. **Моисеенко (Зеликина), Д.В.** Комплексные системы, содержащие полиненасыщенный лизофосфатидилхолин и природные биополимеры, как основа многофункциональных пищевых ингредиентов / Д.В. Моисеенко, Р.А. Обушаева, Н.В. Григорович [и др.] // Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» 18-20 марта 2014. –М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ имени Д.И. Менделеева, 2014. –С. 347-348. –ISBN: 978-5-9909118-0-2.

11. **Moiseenko (Zelikina), D.V.** Lysophosphatidylcholine + covalent conjugates (sodium caseinate + maltodextrin) complex systems: estimated molecular mechanisms of their formation and

- functionality at different pH / D.V. Moiseenko, R.A. Obushaeva, N.V. Grigorovich [et al.] // Book of abstracts «15th Food Colloids Conference» 13-16 Apr 2014, Karlsruhe (Germany).
- 12. Moiseenko (Zelikina), D.V.** Nanoemulsions involving linseed oil, phospholipids and food biopolymers as natural delivery systems for the composition of PUFA with an adequate level of omega-3/omega-6 / D.V. Moiseenko, N.V. Grigorovich, A.S. Antipova [et al.] // Program & abstract «5th International Symposium on Delivery and Functionality in Complex Food Systems» 30 Sept-3 Oct. 2013, Haifa (Israel). –P. 114
- 13. Moiseenko (Zelikina), D.V.** Covalent conjugates of maltodextrins with sodium caseinate as stabilizers for low-fat functional products with the adequate level and ratio of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids / D.V. Moiseenko, N.V. Grigorovich, A.S. Antipova [et al.] // Abstracts of the masterclass presentations «17th Gums & Stabilisers for the Food Industry Conference» 25-28 June 2013, Wrexham (UK).
- 14. Моисеенко (Зеликина), Д.В.** Пищевые ингредиенты нового поколения на основе пищевых биополимеров и полиненасыщенных биологически активных липидов различной природы / Д.В. Моисеенко, Н.В. Григорович, А.С. Антипова [и др.] // Материалы VII Московского Международного Конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 19-22 марта 2013 г. – М: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2013. –ч. 2. –С. 63. –ISBN 5-7237-0372-2.
- 15. Moiseenko (Zelikina), D.V.** Regularities of the release of the polyunsaturated lipids having different nature from biopolymer capsules under the simulated conditions of the gastro-intestinal tract in-vitro / D.V. Moiseenko, N.V. Grigorovich, A.S. Antipova [et al.] // Book of abstracts «2nd International Conference on Food Digestion» 6-8 March 2013, Madrid (Spain).
- 16. Moiseenko (Zelikina), D.V.** Encapsulation ability of the covalent conjugates of sodium caseinate with maltodextrins relative to the polyunsaturated lipids / D.V. Moiseenko, N.V. Grigorovich, A.S. Antipova [et al.] // Book of abstracts: «14th Food Colloids 2012 Conference: Creation and Breakdown of Structure», 15-18 Apr 2012, Copenhagen (Denmark). –P. 69
- 17. Moiseenko (Zelikina), D.V.** Molecular transformation of the complexes of the covalent conjugates (sodium caseinate + maltodextrins) with lysophosphatidylcholine under the consecutive enzymatic action in the simulated gastro-intestinal conditions in vitro / D.V. Moiseenko, N.V. Grigorovich, A.S. Antipova [et al.] // Conference handbook: «Food structures, digestion & health 2012» 7-9 March 2012, Palmerston North (New Zealand). –P. 106
- 18. Moiseenko (Zelikina), D.V.** Protein-maltodextrin delivery systems for polyunsaturated fatty acids / D.V. Moiseenko, N.V. Grigorovich, A.S. Antipova [et al.] // Материалы докладов Международной конференции «XIX Международная Конференция по крахмалу Москва-Краков», 18-20 сентября 2012 г., Москва. –С. 62
- 19. Моисеенко (Зеликина), Д.В.** Новые системы доставки полиненасыщенных жирных кислот в организм человека через пищевые системы, обеспечивающие их защиту от окисления / Д.В. Моисеенко, Н.В. Григорович, А.С. Антипова [и др.] // Материалы конгресса «Питание и здоровье» 3-5 дек. 2012 г., Москва. –С. 58.
- 20. Моисеенко (Зеликина), Д.В.** Структурные и термодинамические факторы, определяющие функциональность комплексов, сформированных соевыми фосфатидилхолином и лизофосфатидилхолином с конъюгатами казеината натрия и мальтодекстрина / Д.В. Моисеенко, Н.В. Григорович, Л. Маттсон [и др.] // Труды XII Ежегодной Международной молодёжной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. Москва 29-31 окт. 2012. – М.: РУДН, 2012. –С. 119-122. –ISBN 978-5-209-04784-1
- 21. Moiseenko (Zelikina), D.V.** The potentiality of use of the conjugates based on sodium caseinate and maltodextrins as a delivery system for hydrophobic nutraceuticals / D.V. Moiseenko, N.V. Grigorovich, V.L. Pietsch. [et al.] // Труды XI Ежегодной Международной молодёжной конференции ИБХФ РАН – ВУЗы. Москва 09-11 ноября 2011 г. –М.: РУДН, 2012. –С. 307-310. –ISBN 978-5-209-04420-8.