

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМ. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Зеликина Дарья Викторовна

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

Специальность 02.00.04 – физическая химия

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
Семёнова Мария Германовна

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Дефицит эссенциальных биологически активных липидов и возможные пути его ликвидации	13
1.1.1 Историко-эволюционный аспект несбалансированного употребления полиненасыщенных жирных кислот.....	13
1.1.2 Физиологическая роль полиненасыщенных жирных кислот.....	14
1.1.3 Функциональные пищевые ингредиенты для восполнения дефицита омега-3 полиненасыщенных жирных кислот.....	17
1.2 Системы доставки нутрицевтиков через пищевые системы: общие принципы их создания	18
1.2.1 Биологически активные вещества гидрофобной природы как нутрицевтики	18
1.2.2 Фосфолипиды: структура и функциональность	25
1.2.3 Пищевые биополимеры как перспективные материалы для создания систем доставки нутрицевтиков.....	32
1.2.4 Молекулярные взаимодействия и функциональные свойства систем доставки нутрицевтиков	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1 Материалы	46
2.1.1 Биологически активные липиды и модельный фосфолипид	46
2.1.2 Биополимеры	48
2.1.3 Растительный антиоксидант.....	50
2.1.4 Пищеварительные ферменты и их ингибиторы.....	51
2.1.5 Наборы реактивов медицинского назначения	51
2.1.6 Химические реагенты	53
2.2 Методы приготовления исследуемых образцов	53
2.2.1 Растворы фосфолипидов в исследованиях бинарных систем.....	53
2.2.2 Растворы и дисперсии бинарных смесей липидов в исследованиях тройных систем.....	54

2.2.3 Растворы биополимеров	55
2.2.4 Растворы супрамолекулярных комплексов, содержащих биологически активные липиды и биополимеры.....	56
2.3 Методы оценки структурных и термодинамических параметров биополимеров, биологически активных липидов и их комплексов.....	58
2.3.1 Оценка степени ковалентного связывания белка и мальтодекстринов в ковалентных конъюгатах	58
2.3.2 Определение структурных и термодинамических параметров изучаемых образцов комбинацией методов статического и динамического многоуглового лазерного светорассеяния.....	59
2.3.3 Вискозиметрия разбавленных растворов биополимеров и их комплексов с биологически активными липидами.....	64
2.3.4 Измерение ζ - потенциала биологически активных липидов, биополимеров и их комплексов в фосфатном буфере	64
2.3.5 Определение термодинамических параметров и функций фазового перехода в бислое модельных липосом ДПФХ методом дифференциальной сканирующей калориметрии	65
2.3.6 Изучение структурного состояния бислоев липосом ФХ и мицелл ЛФХ методом электронно-парамагнитного резонанса	65
2.3.7 Оценка размеров липосом ФХ методом атомно-силовой микроскопии	66
2.4 Методы оценки функциональных свойств биополимеров, биологически активных липидов и их комплексов.....	67
2.4.1 Оценка степени инкапсулирования липидов биополимерами.....	67
2.4.2 Оценка перекисного окисления липидов с помощью спектрофотометрии.....	68
2.4.3 Оценка биодоступности биологически активных липидов из их комплексов с биополимерами в модельных условиях желудочно-кишечного тракта	71
2.5 Статистический анализ	75
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.	76
БИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ: ФОСФОЛИПИД–БИОПОЛИМЕР	76

3.1 Влияние структуры фосфолипидов на формирование и функциональные свойства их супрамолекулярных комплексов с ковалентными конъюгатами, объединяющими казеинат натрия и мальтодекстрины.....	76
3.1.1 Физико-химические свойства ковалентных конъюгатов в водной среде.....	76
3.1.2 Способность ковалентных конъюгатов инкапсулировать липосомы ФХ и мицеллы ЛФХ.....	79
3.1.3 Сравнение структурных и термодинамических параметров комплексных частиц, содержащих ковалентные конъюгаты и липосомы ФХ или мицеллы ЛФХ.....	82
3.1.4 Оценка фазового состояния бислоёв ДПФХ в комплексах с ковалентными конъюгатами методом дифференциальной сканирующей калориметрии.....	85
3.1.5 Оценка микровязкости липидных слоев липосом ФХ и мицелл ЛФХ в комплексах с ковалентными конъюгатами методом электронного парамагнитного резонанса.....	87
3.1.6 Оценка перекисного окисления фосфолипидов в составе их супрамолекулярных комплексов с ковалентными конъюгатами.....	89
3.2 Последовательные превращения комплексных частиц и высвобождение из них фосфатидилхолина под действием ферментативного гидролиза в условиях, моделирующих желудочно-кишечный тракт <i>in vitro</i>.....	91
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ.....	99
ТРОЙНЫЕ СИСТЕМЫ: БИОПОЛИМЕР – БИНАРНЫЕ СМЕСИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЛИПИДОВ.....	99
4.1 Структура и функциональные свойства комплексов ковалентного конъюгата с бинарными смесями биологически активных липидов.....	99
4.1.1 Способность ковалентного конъюгата инкапсулировать бинарные смеси биологически активных липидов.....	100
4.1.2 Сравнение структурных и термодинамических параметров комплексных частиц, содержащих ковалентный конъюгат и бинарные смеси липидов.....	100
4.1.3 Оценка структурно-динамического состояния липидных слоёв фосфолипидов методом электронного парамагнитного резонанса.....	110
4.1.4 Оценка фазового состояния бислоёв липосом ДПФХ методом дифференциальной сканирующей калориметрии.....	111
4.1.5 Оценка размеров липосом ФХ методом атомно-силовой микроскопии.....	113

4.1.6 Оценка влияния ковалентных конъюгатов и растительного антиоксиданта на перекисное окисление биологически активных липидов	115
4.2 Последовательные преобразования структурных и термодинамических параметров комплексных частиц, содержащих бинарные смеси липидов и ковалентный конъюгат, в модельных условиях желудочно-кишечного тракта	121
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	127
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	131
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Характеристика некоторых полисахаридов, используемых в пищевой промышленности	149
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Химический состав образца фосфатидилхолина, используемого в работе	152
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Хроматограмма льняного масла, используемого в работе	153
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Образцы растворов и их обозначения, используемые в работе	154
БЛАГОДАРНОСТИ	156

ВВЕДЕНИЕ

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. Отработать 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. Отработать 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 деградациии 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 молодежной 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-Cracow», (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; Кон_S – ковалентный конъюгат казеината натрия с мальтодекстрином SA2 (ДЭ = 2); Кон_M – ковалентный конъюгат казеината натрия с мальтодекстрином MD10 (ДЭ = 10); ЭМГ – эфирное масло гвоздики.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В результате многочисленных исследований в областях нутрициологии, генетики, антропологии, молекулярной биологии к настоящему моменту удалось установить факторы в структуре питания современного человека, оказывающие влияние на развитие широко распространённых алиментарно-зависимых неинфекционных заболеваний, таких как атеросклероз, эссенциальная гипертензия, ожирение, диабет. К таким основным нарушениям в питании населения индустриальных стран относятся [1, 2]:

- превышение калорийности рациона над энергозатратами;
- избыточное потребление животных жиров и добавленного сахара;
- дефицит полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), отдельных витаминов, минеральных веществ, микроэлементов, пищевых волокон.

Рассмотрим подробнее аспекты проблемы, связанной с несбалансированным употреблением полиненасыщенных жирных кислот, и возможные пути ее решения.

1.1 Дефицит эссенциальных биологически активных липидов и возможные пути его ликвидации

1.1.1 Историко-эволюционный аспект несбалансированного употребления полиненасыщенных жирных кислот

Считается, что одним из ранних значимых этапов, оказавших влияние на изменение рациона питания человека стал переход к Аграрной революции, который привёл к замене потребления широкого разнообразия дикорастущих растений (в том числе, зеленых листовых овощей, содержащих ω -3 ПНЖК) на злаковые культуры (пшенице, рису, кукурузе, содержащих высокое количество ω -6 ПНЖК, но бедных ω -3 ПНЖК и антиоксидантами) [1].

Следующий этап резкого увеличения потребления ω -6 ПНЖК связан с развитием технологий получения растительных масел в течение последних 100 лет. Так, в этот период был создан экспеллер (пресс для получения масел из жмыха); разработана технология дезодорирования сухим горячим паром, которая привела к получению растительных масел в промышленных масштабах; метод экстракции масленичных семян растворителями; метод гидрогенизации для получения твердых жиров из масел. Здесь важно отметить, что частичная гидрогенизация соевого масла привела к снижению содержания ω -3 α -линоленовой жирной кислоты [1].

Исследования липидов как биологических объектов в середине XX века также оказали большое влияние на характер их массового потребления. В 1929-1930 г. Ж.О. Бюрр (G.O. Burr) и М.М. Бюрр (M.M. Burr) впервые показали значимую роль линолевой (18:2 ω -6) и альфа-линоленовой (18:3 ω -3) кислот в восстановлении здоровья на примере животных, истощенных обезжиренной диетой [3,4], и ввели термин «эссенциальные жирные кислоты». В 1954 г. Э. Аренс (E. Ahrens) [5] и А. Кейс (A. Keys) с коллегами [6] установили взаимосвязь между ω -6 жирными кислотами и сердечно-сосудистыми заболеваниями. В 1963 г. А. Хансен (A. Hansen) с соавторами [7] впервые показали, что человеку необходимо употреблять определенные жирные кислоты (ПНЖК), которые не могут синтезироваться в организме человека. В целом, можно отметить, что с начала 1950-х годов, исследования, посвященные роли ω -6 ПНЖК в снижении концентраций холестерина доминировали над исследованиями о роли ПНЖК в метаболизме и это, наряду с разработкой технологий для производства растительных масел, привело к увеличению как общей доли жиров в рационе, так и большему употреблению растительных масел, богатых ω -6 жирными кислотами.

Развитие агробизнеса способствовало дальнейшему уменьшению содержания ω -3 ПНЖК в составе мясопродуктов. Так, например, согласно исследованию [8, 9] мясо домашнего скота и птицы (кормление которых осуществляется за счет зерновых, богатых ω -6 ПНЖК и бедных ω -3 ПНЖК) содержит в пять раз ниже количество ПНЖК, чем мясо диких животных и птиц (питающихся в основном дикими растениями). При этом общая доля жиров в последних составляет всего около 3,9 % [9], 4 % из которых составляет эйкозапентаеновая ПНЖК (ЭПК). Аналогично, снижение доли ω -3 ПНЖК наблюдали в составе таких продуктов, как зеленые листовые овощи (например, дикий портулак содержит в 10 – 30 раз больше АЛК, чем культивируемые шпинат, салат маслянистый или листовая горчица [10]), рыба [11] и яйца [12, 13].

Дальнейшие результаты исследований привели к более глубокому пониманию роли ω -3 и ω -6 ПНЖК в метаболизме. Установление связи между присутствием данных жирных кислот в рационе и различными заболеваниями (такими как диабет, ожирение, сердечно-сосудистые, раковые заболевания, астма, воспаление кишечника, болезни двигательного аппарата, нервной системы и мозга [14 – 35]) привело к пониманию необходимости увеличения их дополнительного поступления с пищей.

1.1.2 Физиологическая роль полиненасыщенных жирных кислот

К настоящему моменту достоверно установлено, что ПНЖК выполняют следующие физиолого-биохимические функции в организме человека [35]:

- обеспечение энергетических потребностей организма;
- необходимы для нормального роста и развития;
- линолевая кислота (ЛК) и альфа-линоленовая кислота (АЛК) – биохимические предшественники частично незаменимых длинноцепочечных ПНЖК с 20-22 атомами углерода (арахидоновой, АРК (20:4 ω -6); эйкозапентаеновой, ЭПК (20:5 ω -3); докозагексаеновой, ДГК (22:6 ω -3), синтезируемых в организме человека с помощью элонгаз и десатураз. При этом биотрансформация АЛК в одну из наиболее ценных для организма ДГК напрямую зависит от весового соотношения ЛК и АЛК в пищевом рационе, поскольку в случае преобладания ЛК, из-за конкуренции между ЛК и АЛК за одни и те же ферменты (Рисунок 1) этот процесс может практически полностью ингибироваться [32, 35, 36, 37];

- входят в состав фосфолипидов клеточных мембран. При этом замечено, что чем сложнее функция органа, тем больше длинноцепочечных ПНЖК содержится в клетках тканей;

- АРК и ЭПК – биохимические предшественники синтеза эндогормонов эйкозаноидов. При этом эндогормоны, синтезируемые из АРК (простагландины и тромбоксаны второй серии (т.е. имеющие две двойные связи), лейкотриены четвертой серии) при избыточном количестве вызывают агрегацию (слипание тромбоцитов), приводящую к сужению кровеносных сосудов и повышению артериального давления. Эндогормоны, синтезируемые из ЭПК (простагландины и тромбоксаны третьей серии (т.е. с тремя двойными связями), лейкотриены пятой серии) напротив, препятствуют слипанию тромбоцитов и поэтому снижают артериальное давление. Важно отметить, что в обоих синтезах и из АРК, и из ЭПК обеспечивается одними и теми же ферментами (фосфолипазой А₂, циклооксигеназы), поэтому важно, чтобы в фосфолипидах содержалось достаточное количество ЭПК, конкурирующего с АРК за эти ферменты;

- ДГК – предшественник эндогормона нейротектина D, оказывающего защиту нервных клеток от повреждения;

- участвуют в регуляции сердечно-сосудистой системы. Так, исследования показали, что повышенное потребление ω -3 ПНЖК оказывает как профилактическое, так и терапевтическое действие в отношении сердечно-сосудистых заболеваний, обеспечивая эффективное проведение сигналов в нервных клетках, препятствуя аритмии и спазмам сердца и сосудов за счет ДГК [33, 38]. Это может быть также связано, например, с повышением синтеза эйкозаноидов, расширяющих сосуды, снижающих тромбообразование и артериальное давление, а также воспаление.

Установлено, что ПНЖК не синтезируются в организме человека, а могут поступать только с пищей. Это связано с тем, что формирование двойных связей в углеводородных цепочках жирных кислот происходит за счёт десатураз, присутствие которых у разных видов

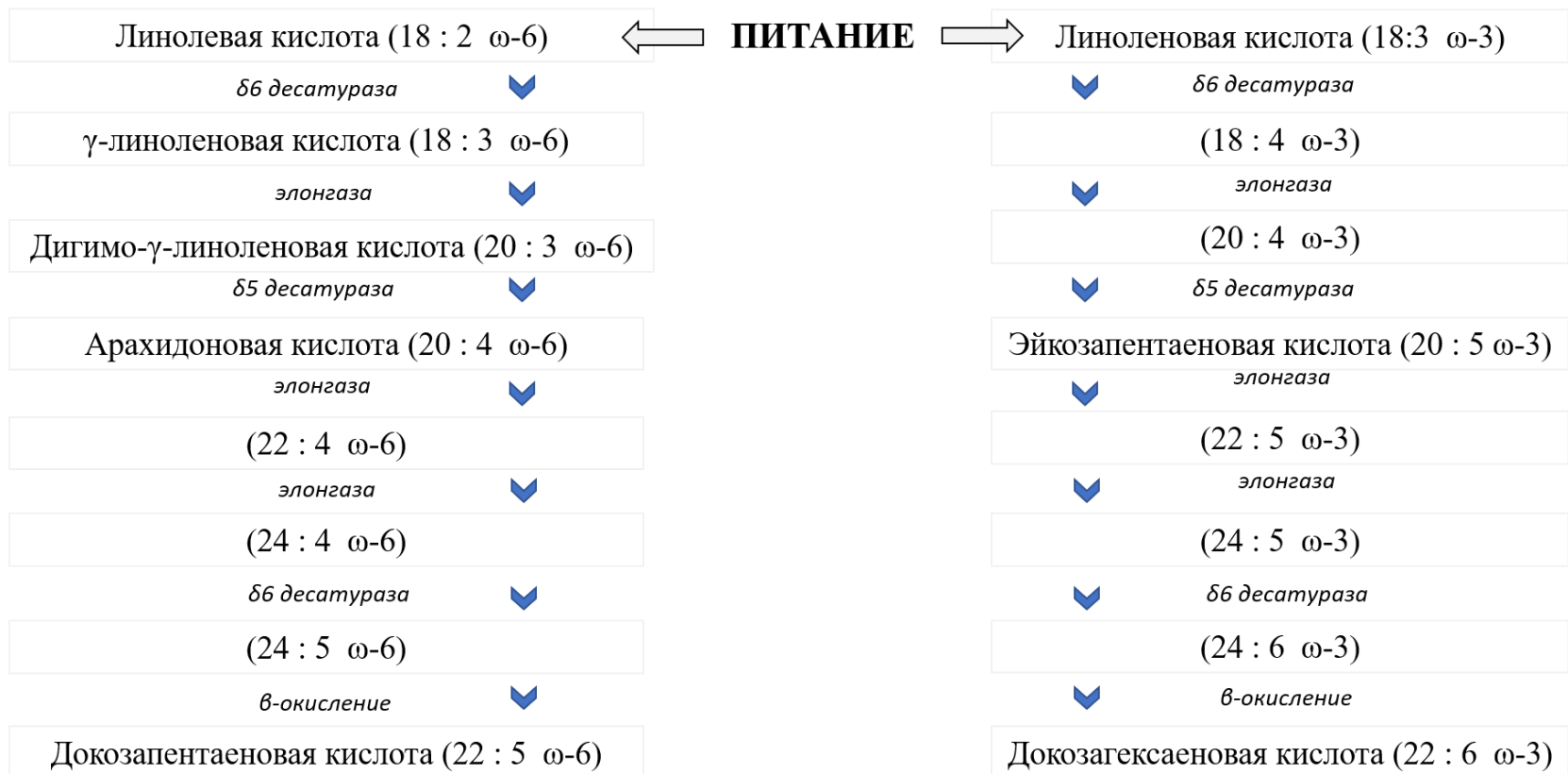


Рисунок 1 – Схема биохимических превращений незаменимых ω-6 линолевой кислоты (ЛК) в докозапентаеновую кислоту (ДПК) через арахидоновую кислоту (АРК) и ω-3 α-линоленовой кислоты (АЛК) в докозагексаеновую кислоту (ДГК) через эйкозапентаеновую (ЭПК) кислоту в организме человека

организмов строго определяется генотипом. Так, например, синтез жирных кислот с двойными связями в положении ω -6 и ω -3 может быть осуществлен высшими растениями и водорослями, в то время как большинство видов беспозвоночных и все позвоночные (в том числе, человек) не имеют генов, кодирующих соответствующие десатуразы [35, 38, 41–45]. Такие микронутриенты, имеющие важное физиологическое значение, но не синтезируемые в организме человека относят к незаменимым [35].

На основе данных клинических исследований разработаны рекомендации по суточному потреблению эссенциальных ПНЖК, в частности, средняя суточная потребность ω -3 ПНЖК составляет 3 – 9 г [46]. Рекомендуемые соотношения ω -3 : ω -6 ПНЖК (для профилактического или терапевтического эффекта) составляют, по разным данным от 1 : 1 – 1 : 4 [1, 47–50]. По данным НИИ Питания РАМН дефицит потребления ω -3 ПНЖК у большей части детского и взрослого населения России составляет около 80 % [51]. Таким образом, включение дополнительного количества ω -3 ПНЖК в рацион питания в профилактических целях наряду с общим снижением насыщенных жиров может быть рекомендовано для большинства населения.

1.1.3 Функциональные пищевые ингредиенты для восполнения дефицита омега-3 полиненасыщенных жирных кислот

Одним из современных подходов к коррекции микронутриентного статуса населения является создание продуктов функционального и специализированного назначения [52–64]. К функциональным относят пищевые продукты систематического употребления, которые, благодаря наличию функциональных ингредиентов способны снизить число алиментарно-зависимых неинфекционных заболеваний. В соответствии с мировой практикой, продукт считается функциональным, если регламентированное содержание микронутриентов в нем достаточно для удовлетворения (при обычном уровне потребления) 25 – 50 % от среднесуточной потребности в компонентах [54, 59].

Однако серьезными сдерживающими факторами в разработке продуктов и напитков с дополнительным содержанием многих физиологически значимых питательных веществ, в частности, ω -3 ПНЖК, является их высокая чувствительность к окислению и деградации под действием повышенных температур и света. Это может, с одной стороны, приводить к накоплению токсичных продуктов их перекисного окисления в процессах производства и хранения пищевых продуктов и, с другой стороны, оказывать нежелательное воздействие на органолептические свойства. Кроме того, низкая растворимость в водной среде часто не позволяет прямо вводить гидрофобные вещества в состав продуктов и напитков с низким содержанием жиров.

В этой связи, одним из основных перспективных направлений развития пищевой промышленности в мире является разработка новых составов пищевых добавок с улучшенными функционально-технологическими характеристиками, такими как восполнение дефицита, повышение растворимости и окислительной стабильности физиологически значимых питательных веществ [56, 59]. Одним из основных подходов к работе в этой области является разработка носителей и материалов, размеры которых исчисляются нанометрами, что также способствует улучшению усвоения и биодоступности этих питательных веществ [59].

Недавний положительный опыт разработки и производства функциональных продуктов для восполнения ω -3 ПНЖК показал высокую перспективность этого направления [61–99]. Однако практически нерешённой остаётся задача получения наноразмерной водорастворимой и стабильной к окислению формы ω -3 ПНЖК без использования синтетических поверхностно-активных веществ. Для того, чтобы подойти ближе к решению данной задачи, рассмотрим общие принципы конструирования систем доставки нутрицевтиков.

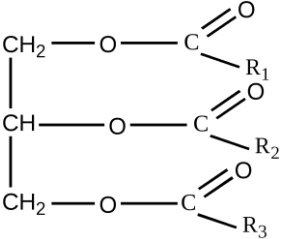
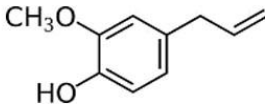
1.2 Системы доставки нутрицевтиков через пищевые системы: общие принципы их создания

1.2.1 Биологически активные вещества гидрофобной природы как нутрицевтики

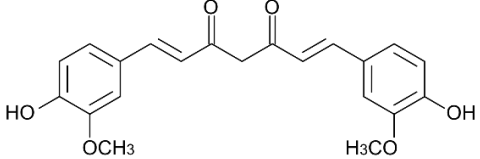
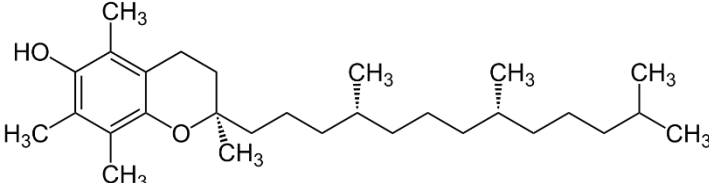
Множество гидрофобных нутрицевтиков, т.е. веществ, обладающих как питательной, так и фармацевтической ценностью, представляют большой интерес для введения в состав пищевых продуктов (Таблица 1) [100, 101]. Так, наряду с главной целью ликвидации дефицита по незаменимым для здоровья биологически активным веществам (нутрицевтикам), важной их ролью в производстве пищевых продуктов может быть продление срока годности пищевых продуктов (натуральные антиоксиданты, антимикробные агенты), а также улучшение их органолептических свойств (натуральные красители, ароматизаторы). Однако, прямое введение таких гидрофобных веществ в пищевую систему может привести к следующим сложностям:

- низкая растворимость в воде затрудняет их использование в продуктах с низким содержанием жира и напитках на водной основе;
- кристаллическая структура при комнатной температуре некоторых веществ (каротиноиды и фитостеролы) может приводить к необходимости повышения температуры в процессе производства и ухудшению органолептических свойств продуктов;
- нежелательная мутность (например, для прозрачных напитков);

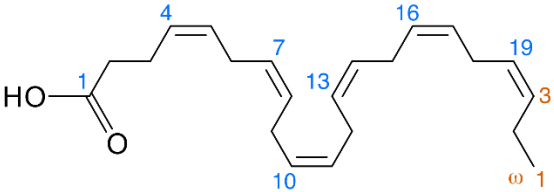
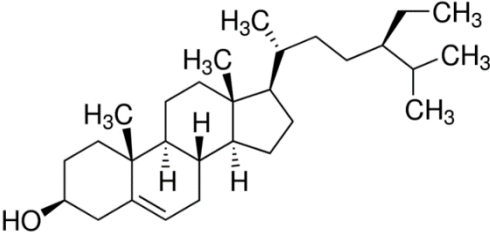
Таблица 1 – Биологически активные вещества гидрофобной природы, перспективные для использования в составе пищевых продуктов для здорового питания

<i>Представители</i>	<i>Назначение</i>	<i>Сложности использования в пищевых продуктах и примеры систем их доставки</i>	<i>Литература</i>
<u>Нейтральные масла</u>			
<p>Триглицериды растительных масел (канолы, льна, чиа, (испанского шалфея), кукурузы, рапса, оливы, подсолнечника, шафрана; морских водорослей)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Улучшение органолептических свойств (улучшение консистенции, вязкости, вкуса); ➤ Для доставки пигментов, консервантов, витаминов и нутрицевтиков. 	<p><i>Низкая растворимость в водной среде, склонность к перекисному окислению</i></p>	<p>[101, 102, 105]</p>
 <p style="text-align: center;">(триглицерид)</p>		<p style="text-align: center;"><u>Системы доставки:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Эмульсии (масло-в-воде): <ul style="list-style-type: none"> ✓ Микроэмульсии ✓ Наноэмульсии ✓ Многослойные эмульсии ✓ Множественные эмульсии - Твердые липидные частицы 	
<u>Эфирные масла</u>			
<p>Эфирные масла (гвоздики, чабреца, имбиря, цитрусовых и т.д.)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ароматизация; ➤ Антиоксидантное; ➤ Нутрицевтическое ➤ Антимикробное 	<p><i>Частичная растворимость в воде, летучесть, химическая нестабильность</i></p>	<p>[102,103, 104, 105]</p>
		<p style="text-align: center;"><u>Системы доставки:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Эмульсии (масло-в-воде): <ul style="list-style-type: none"> ✓ Микроэмульсии ✓ Наноэмульсии ✓ Многослойные эмульсии ✓ Множественные эмульсии 	
<p>эвгенол</p>			

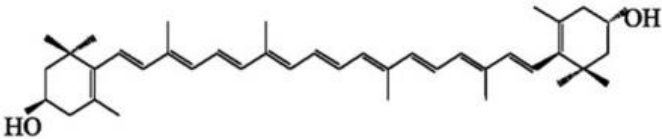
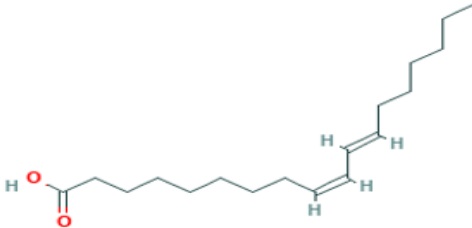
Продолжение таблицы 1.

Представители	Назначение	Сложности использования в пищевых продуктах и примеры систем их доставки	Литература
<u>Натуральные жирорастворимые красители</u>			
Биксин, паприка, куркумин, ликопин, β-каротин	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Замена искусственных красителей на натуральные; ➤ Нутрицевтическое 	<p><i>Низкая растворимость в воде; кристаллическая структура; химическая нестабильность</i></p> <p><u>Системы доставки:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Липосомы ✓ Мицеллы ✓ Эмульсии 	[105–112]
 <p style="text-align: center;">(куркумин)</p>			
<u>Липофильные нутрицевтики</u>			
Жирорастворимые витамины (витамины А, D, E)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Антиоксидантное (например, по отношению к ПНЖК, каротиноидам и т.д.); ➤ Нутрицевтическое 	<p><i>Низкая растворимость в водной среде, неудобное дозирование, низкая стабильность (к высокой температуре, кислороду, свету) высокие температуры плавления, часто низкая биодоступность.</i></p> <p><u>Системы доставки:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Микроэмульсии ✓ Наноэмульсии ✓ Эмульсии 	[107, 113–122]
 <p style="text-align: center;">(Витамин E = альфа-токоферол)</p>			

Продолжение таблицы 1.

Представители	Назначение	Сложности использования в пищевых продуктах и примеры систем их доставки	Литература
<u>Липофильные нутрицевтики</u>			
<p>Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) (ω-3 ПНЖК: АЛК, ЭПК, ДГК; в составе моно-, ди- и триацилглицеридов или фосфолипидов)</p>  <p>(ДГК)</p>	<p>➤ Нутрицевтическое</p>	<p><i>Крайне склонны к перекисному окислению, низкая растворимость в водной среде.</i></p> <p><u>Системы доставки:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Многослойные эмульсии ✓ Множественные эмульсии ✓ Наполненные гелевые частицы 	<p>[102, 123–131]</p>
<p>Фосфолипиды (фосфатидилхолин и др.)</p>			
<p>Фитостеролы (β-ситостерол, кампестерол, стигмастерол)</p>  <p>(β-ситостерол)</p>	<p>➤ Нутрицевтическое</p>	<p><i>Низкая растворимость в воде, в жире, высокая температура плавления, плохая химическая стабильность</i></p> <p><u>Системы доставки:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Коллоидные системы на водной основе (различные эмульсии масло-в-воде) 	<p>[132–136]</p>

Продолжение таблицы 1.

<i>Представители</i>	<i>Назначение</i>	<i>Сложности использования в пищевых продуктах и примеры систем их доставки</i>	<i>Литература</i>
<p>Каротиноиды (каротины- лютеин, зеаксантин, ксантофилы- ликопин, β-каротин)</p>  <p>(лютеин)</p>	<p>➤ Нутрицевтическое</p>	<p><i>Низкая растворимость в водной среде, жирах, высокая температура плавления, химическая нестабильность, часто низкая биодоступность</i></p> <p><u>Системы доставки:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Наноэмульсии ✓ Липосомы ✓ Хитосомы (хитозан, липосомы) 	<p>[106, 113, 137 –142].</p>
<p>Конъюгированная линолевая кислота (КЛК) (содержится в малых количествах в молоке, сыре, мясе жвачных животных)</p> 	<p>➤ Нутрицевтическое</p>	<p><i>Низкая растворимость в воде и склонность к окислению</i></p> <p><u>Системы доставки:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Наноконплексы (с амилозой) ✓ Наноэмульсии ✓ Эмульсии (в т.ч., с использованием растительных белков) 	<p>[143–150]</p>

- специфический вкус некоторых биологически активных веществ может приводить к нежелательным органолептическим качествам продукта (например, посторонний вкус при обогащении напитков рыбьим жиром);

- высокая чувствительность к химической деградации (например, масел, богатых ω -3 ПНЖК, конъюгированной линолевой кислоты, каротиноидов, витамина Е, некоторых ароматобразующих масел);

- нежелательные биохимические изменения после приема пищи (например, изменяется биологическая активность БАВ, в результате химического или ферментативного гидролиза кислотами или ферментами в процессе прохождения через ЖКТ);

- низкая биодоступность в ротовой полости и ЖКТ.

Таким образом, можно выделить следующие основные требования, предъявляемые к функциональным пищевым ингредиентам, доставляющим биологически активные вещества [100,101]:

- сохранение физической и химической стабильности биоактивного компонента в условиях производства и хранения пищевого продукта (например, в результате воздействия кислорода, температуры, ферментов, солей и т.д.), и, как следствие, сохранение физиологической активности компонента и отсутствие нежелательных побочных эффектов, токсичности (например, при окислении липидов);
- высокая растворимость биоактивного вещества в пищевой системе;
- высокий уровень биологической доступности активного вещества в составе пищевого продукта и его контролируемый и адресный выпуск из системы доставки в условиях ЖКТ (в нужном месте и в нужное время);
- ограниченное использование или полное отсутствие синтетических поверхностно-активных веществ в составе пищевых ингредиентов.

С технологической точки зрения, существенными являются:

- возможность удобного и строгого дозирования биоактивного вещества в условиях технологических процессов и достижения его адекватного уровня в порции продукта в соответствии с рекомендуемыми нормами;
- получение привлекательных органолептических свойств пищевого продукта, в том числе, сохранение или улучшение структуры и вкусо-ароматических характеристик при введении биоактивного вещества.

Предполагается, что эти требования могут быть удовлетворены при получении инкапсулированной формы гидрофобных биологически активных веществ, то есть подбора подходящей системы доставки (наноэмульсии, микроэмульсии, липосомы (Таблица 1),

которая будет являться основой функционального пищевого ингредиента в эмульсионном или порошкообразном виде. В зависимости от природы включённых веществ, механизма формирования и заданных функциональных свойств может быть составлено множество различных типов таких композиционных частиц микро- и наноразмеров (Рисунок 2), которые можно условно можно разделить на следующие типы [100, 101, 151]:

- На основе *ПАВ*: мицеллярные растворы, микроэмульсии, липосомы;
- На основе *эмульсий*: традиционные эмульсии, наноэмульсии, множественные эмульсии, послойные эмульсии, твёрдые липидные наночастицы, микрокластеры;
- На основе *биополимеров*: гидрогелевые частицы, покрытые гидрогелевые частицы, биополимерные наночастицы/микрочастицы;
- *Гибридные системы*: Нагруженные гидрогелевые частицы, нагруженные гидрогелевые частицы, послойные липосомы, коллоидосомы.

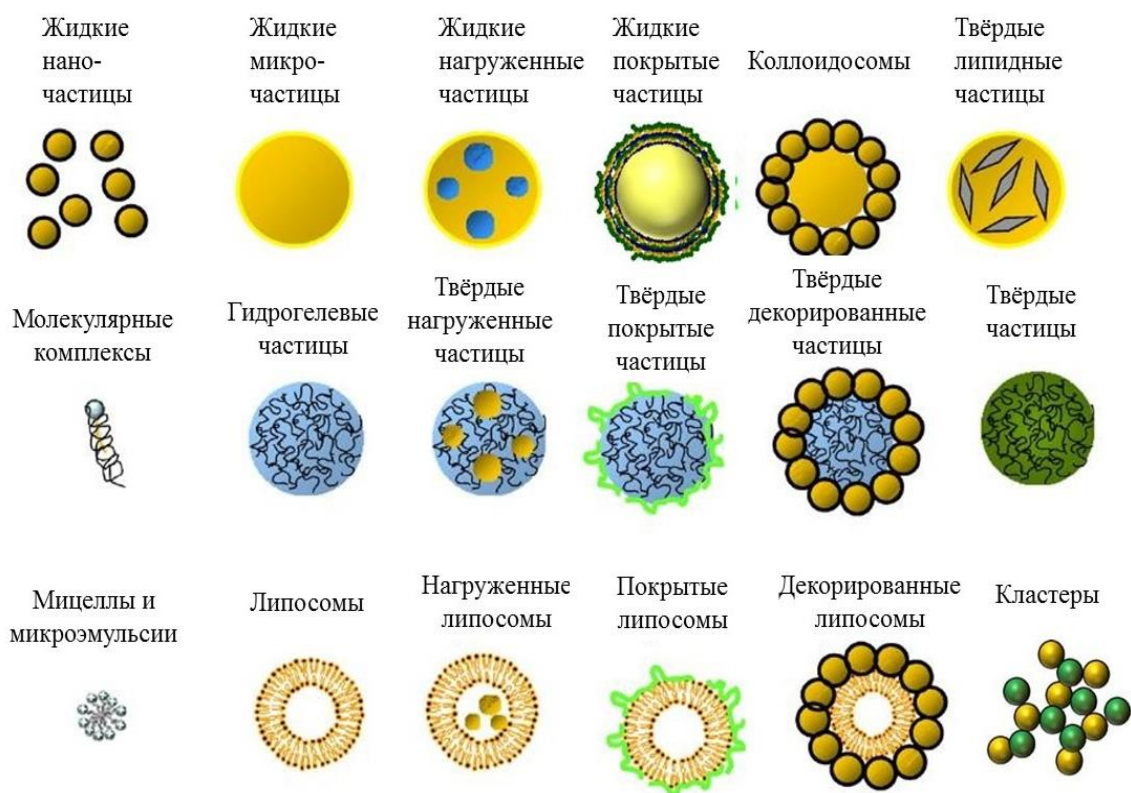


Рисунок 2 – Примеры различных типов микро- и нано коллоидных частиц для доставки пищевых БАВ [151]

Одним из наиболее перспективных, на наш взгляд, типов композиционных частицы коллоидного типа для доставки БАВ гидрофобной природы, которые могли мы удовлетворить практически всем вышеупомянутым требованиям, могут быть комплексные частицы на основе пищевых биополимеров и фосфолипидов. Для приготовления таких комплексных частиц используют два основных подхода (или их комбинацию): «сверху-вниз» («top-down»), т.е. от более сложной структурной организации к более простой, или, наоборот, «снизу-вверх» («bottom-up»), т.е. от более простой структурной организации к более сложной [100,101].

Первый подход («сверху-вниз» («top-down»)), объединяющий *высокоэнергетические методы*, используют, как правило, для получения наноэмульсий с применением специального оборудования, позволяющего получить частицы с малым размером (не более 500 нм) [151]. При этом на конечный размер частиц влияют такие параметры как: (1) режим обработки (например, ультразвуковая, механическая гомогенизация, экструзия, высокое давление), (2) концентрация эмульгаторов и стабилизаторов, (3) доля дисперсной фазы (как правило, 5 – 20 % объём/объём), (4) заряд капель эмульсии, (5) свойства и структура адсорбционных слоев биополимеров и (6) характер взаимодействий между каплями эмульсии и неадсорбированными частицами биополимеров [100,152].

Второй подход («снизу-вверх» («bottom-up»)) основан на применении низкоэнергетических методов. Так, например, к одному из наиболее перспективных методов для пищевой технологии можно отнести процесс самопроизвольной ассоциации частиц биополимеров и липидов, в результате которой происходит формирование термодинамически стабильных супрамолекулярных комплексов [100,152,153]. Этот метод предполагает тщательный контроль параметров окружающей среды, таких как температура, рН, ионная сила, присутствие специфических ионов (например Ca^{2+}), главным образом оказывающих влияние на размеры, структуру и свойства получаемых комплексных частиц.

Рассмотрим подробнее роль биополимеров и фосфолипидов в конструировании систем доставки биологически активных веществ.

1.2.2 Фосфолипиды: структура и функциональность

Исследованию фосфолипидов посвящено огромное количество работ и связано это, прежде всего, с их мембранообразующей функцией в клетках. Известно, что из более 100 разных типов липидных молекул, входящих в состав различных мембран, основным их компонентом является фосфатидилхолин [154]. Высокие антиоксидантные свойства, а также способность формировать бислойные структуры фосфолипидов (прежде всего, фосфатидилхолина), широко используются в фармакологии (гепатопротекторная и геропротекторная функции), косметологии, а также

находят все большее практическое применение в пищевой промышленности (лецитин). Наконец, доказанная физиологическая роль фосфолипидов, как биологически важных нутриентов, объясняет их широкое использование в составе биологически активных добавок. Рассмотрим более подробно особенности структуры и свойств этих уникальных природных объектов, акцентируя внимание на тех из них, которые могли бы быть важны при создании физиологически функциональных ингредиентов.

Структура.

Фосфолипиды – наиболее важная и разнообразная группа сложных липидов, структурными компонентами которых являются фосфорная кислота, остатки насыщенных или ненасыщенных жирных кислот, а также спирты, альдегиды, азотистые основания (холин, этаноламин), аминокислоты, связанные между собой сложной или простой эфирной/амидной связью. В случае лизофосфолипидов, в *sn*-2-положении глицерола находится гидроксильная группа, таким образом они содержат только одну ацильную цепь. Фосфатная группа, как правило, находится в *sn*-3-положении глицерола, и в большинстве фосфолипидов связана с другой функциональной группой, например, холиновой с образованием фосфатидилхолина. Как и в случае большинства других мембранных липидов, насыщенная *sn*-1 углеводородная цепь фосфатидилхолина находится в транс-конфигурации, а ненасыщенная углеводородная цепь *sn*-2-положения в цис-конфигурации, обуславливающей ее изгиб [154].

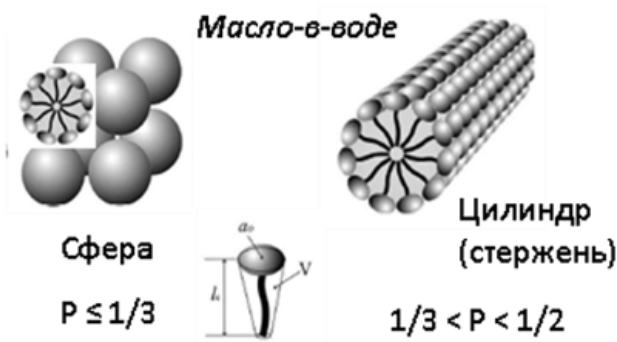
Общие свойства фосфолипидов.

Ярко выраженная гидрофобность углеводородных радикалов («хвостов»), с одной стороны, и гидрофильность «полярной головы» за счёт присутствия различных заряженных и полярных функциональных групп, содержащих атомы кислорода (гидроксильные и карбоксильные группы, эфирные связи) и азота (аминогруппы, холин), с другой стороны, обуславливают (i) *амфифильный характер* фосфолипидов и (ii) *выраженный структурный полиморфизм*. Так, экспонирование гидрофильной части в воду и агрегация длинных углеводородных цепей за счёт гидрофобных взаимодействий способствуют формированию различных липидных структур, среди которых хорошо известны мицеллы, липосомы, мембранный бислой, кубические и гексагональные жидкие кристаллы [155].

При этом наиболее вероятная форма липидных ассоциатов может быть рассчитана, например, на основе *геометрических параметров* молекул липида (длина (l_c) и объём (v) алкильной цепи, площадь поперечного сечения полярных голов (a_0)) и выражена через критический параметр упаковки ($P = v / a_0 l_c$) (Рисунок 3) [154, 155, 156]. Как показано ниже, при $P < 1/2$ формируются сферические, глобулярные или цилиндрические мицеллы (мицеллярная фаза), что характерно для липидов с одной углеводородной цепью (лизофосфолипидов, моноглицеридов, синтетических ПАВ). Наличие двух длинных цепей (например, для

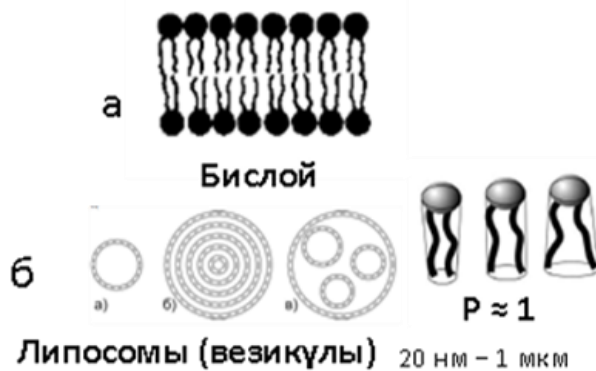
Мицеллярная фаза

5 нм – 100 нм



- ⇒ Лизофосфолипиды
- ⇒ Моноглицериды жирных кислот
- ⇒ Синтетические ПАВ (Твин 80)

Ламеллярная жидкокристаллическая фаза

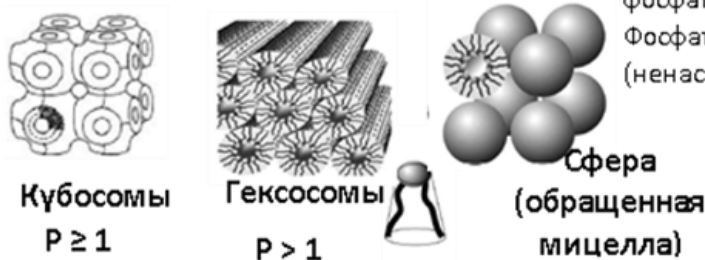


- ⇒ Фосфолипиды (фосфатидилхолин, Фосфатидилинозитол, Фосфатидилсерин)

Инвертированные структуры

100 нм – 1 мкм

Вода-в-масле



- ⇒ Липофильные моноглицериды
- ⇒ Фосфолипиды (фосфатидилсерин, рН < 4; фосфатидная кислота, рН < 3; Фосфатидилэтаноламин (ненасыщенный))

Рисунок 3 – Структурированные липидные наносистемы, перспективные для доставки биологически активных веществ через пищевые продукты, и примеры поверхностно активных веществ, их формирующие [по материалам 122, 155]

диацильных фосфолипидов) увеличивает объём углеводородных цепочек (при этом $\frac{1}{2} < P < 1$), что приводит к формированию стабильного бислоя (ламеллярной фазы). При диспергировании (с помощью ультразвуковой гомогенизации, экструзии) можно получить липосомы (или иначе, везикулы) различных типов: моноламеллярные, мультиламеллярные и олиголамеллярные везикулы [154, 155] (Рисунок 3). При значительном превышении объёма углеводородных цепочек над объемом полярной головки ($P > 1$) происходит формирование обращенных (инвертных) структур: обращенных кубической, гексагональной фаз, мицелл (наблюдается для липофильных ПАВ или некоторых фосфолипидов) [155].

Параметры окружающей среды (температура, ионная сила, рН, давление, природа и количество растворителя) также оказывают большое влияние на характер образования таких липидных структур, а их изменение индуцирует *(iii) фазовые переходы* [155]. Так, например, установлено, что относительно большой размер полярных голов фосфолипидов (по сравнению с поперечным сечением ацильных цепей) является причиной наклонного расположения углеводородных хвостов (Рисунок 4, гелевая фаза L_{β}'), в то время как повышение температуры приводит к менее упорядоченному направлению углеводородных хвостов (переход транс- или цис- конфигурации в гош-форму), при котором меняется соотношение площадей полярной и неполярной областей молекул липидов, и расположение углеводородных хвостов постепенно становится перпендикулярным поверхности бислоя (Рисунок 4, жидкокристаллическая фаза, L_{α}).

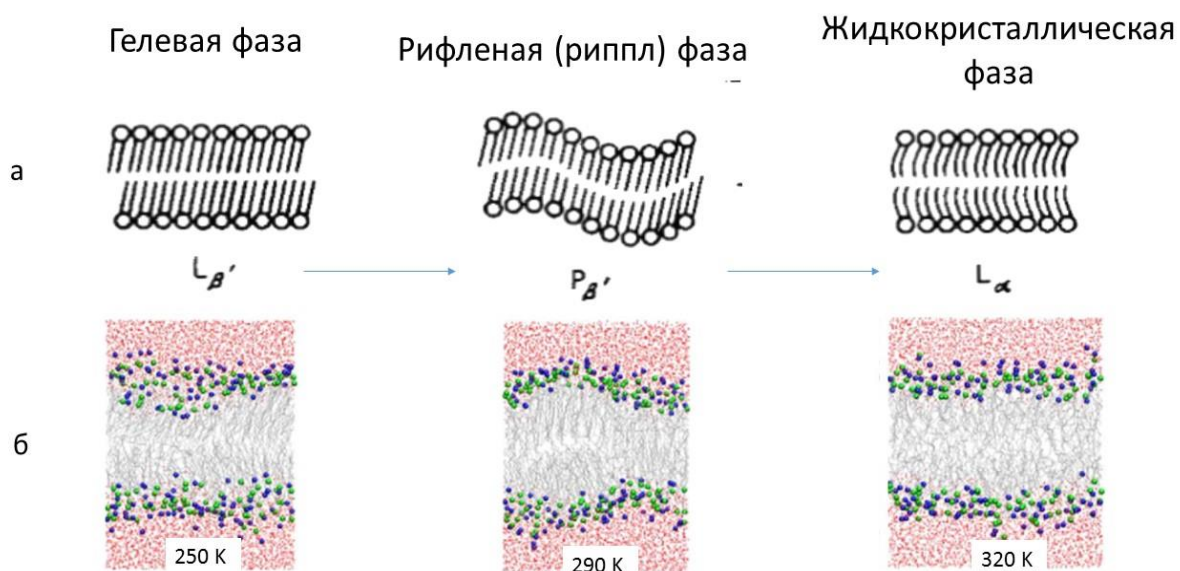


Рисунок 4 – Зависимость молекулярной организации фосфатидилхолина (ФХ) от температуры: а) схематическое расположение молекул ФХ в бислое [154]; б) микрофотографии бислоев ДПФХ [158]

Для фосфолипидов с объёмистой полярной головкой (ФХ, ДПФХ) характерно наличие промежуточной «риплл» фазы P_{β}' (соответствующей температурному интервалу между предпереходом и точкой плавления липида), в которой углеводородные цепи липида сохраняют транс-конфигурацию, но бислои отличаются специфической волнистостью (Рисунок 4, рифленая фаза, P_{β}') [154, 155, 156, 157, 158].

Биологическая активность фосфолипидов.

К фосфолипидам, поступающим с пищей, как правило, относят лецитины, представляющие собой смесь преимущественно холин-содержащих фосфолипидов [159, 160]. К основным биохимическим свойствам природных фосфолипидов, поступающих экзогенно, можно отнести:

- Характерную *высокую физиологическую толерантность и метаболизм*. Ферментативный гидролиз фосфолипидов происходит в тонком кишечнике [160], где они находятся в составе смешанных мицелл с холестерином и солями желчных кислот [161]. Затем под действием фосфолипазы A_2 происходит гидролиз до 1-ацил-лизолфосфатидилхолина с отщеплением одного остатка жирной кислоты [162]. Далее около 50 % образованного ЛФХ подвергается обратному ацетилированию в полиненасыщенный фосфатидилхолин в клетках слизистой оболочки, остальная часть гидролизуется с образованием глицеро-3-фосфорилхолина и водорастворимых комплексов [160, 163]. Освобожденная жирная кислота используется для синтеза триглицеридов, а глицеро-3-фосфорилхолин и полиненасыщенный ФХ (главным образом, связанный с липопротеинами высокой плотности) поступают в печень [160, 164].

Следует отметить, что несмотря на то, что лизолецитин присутствует в небольшом количестве во многих тканях (0,5 – 2 %), а также с точки зрения гастроэнтерологии является естественным компонентом дуоденального содержимого, его повышенное количество в тканях или присутствие в других отделах ЖКТ может провоцировать цитотоксическое действие за счет изменения проницаемости и текучести мембран клеток [165]. Такое повышение концентрации может быть связано либо с понижением содержания основных фосфолипидов (ФХ и др.), либо с повышением активности фосфолипазы A_2 , что характерно при воспалительных процессах;

- *Главный источник экзогенно поступающего холина* (обеспечение до 90 % за счёт ФХ). Необходимость дополнительного поступления холина с пищей обусловлена его повышенным расходом в определенных условиях (нервное напряжение, интенсивная умственная нагрузка, психологический стресс, старение, потребление алкоголя) для поддержания функций сердечно-сосудистой, гепатобилиарной, нервной систем и др. [160, 166];

- *Эффективны при нарушении функции нервной системы, печени, развития и прогрессирования атеросклероза*. Так, например, показано, что потребление ФХ способствует повышению уровня липопротеинов высокой плотности, что, в свою очередь, снижает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [160, 161, 167];

- Компонент *неферментативной антиоксидантной защиты природных липидов*.

Так, показано, что фосфолипиды усиливают антиоксидантную активность альфа-токоферола, кверцетина, убихинона, каротиноидов, бета-каротина, витамина А и других соединений [160].

Фосфолипиды в доставке биологически активных веществ.

Как было отмечено выше, внутреннее пространство, образованное липидными структурами, может быть использовано для доставки различных биологически активных веществ. Основные характеристики липидных структур, которые могли бы быть использованы в качестве наноконтейнеров для пищевых систем, а также примеры их применения представлены ниже (Таблица 2). Очевидно, что наиболее перспективными из них для обогащения продуктов с низким общим содержанием жира являются структуры, которые могут формироваться в прямых эмульсиях («масло-в-воде»), то есть формирующие прямые мицеллярные или липосомальные структуры. При этом выбор поверхностно-активных веществ (ПАВ), приемлемых для использования в пищевой технологии, остается достаточно ограниченным, что связано с такими факторами, как невысокая загрузочная емкость, высокая стоимость ингредиентов и технологий и др. Среди соединений несинтетического происхождения можно выделить фосфолипиды, преимущественно фосфатидилхолин, и его лизоформу – лизофосфатидилхолин. Так, например, липосомы фосфатидилхолина могут быть применены для доставки ароматических веществ, красителей, нутрицевтиков (витаминов, ПНЖК и др.) [101, 122, 152, 168]. Наибольший опыт разработки липосомальных и мицеллярных композиций, накопленный к настоящему моменту, относится к косметической и фармацевтической промышленности [155].

Отдельно стоит добавить, что изменение проницаемости липидных мембран за счет содержания в них лизофосфолипидов может иметь важное практическое значение. Так, например, наличие в их составе лизофосфолипидов может позволить ускорить высвобождение инкапсулированных лекарств [155, 176]. Увеличивая проникновение активных веществ (таких как витамины А, D, F, В₁, В₆, РР) в кожу, лизолецитин является важным составляющим косметических средств. В других исследованиях было показано, что включение лизофосфолипидов в рацион животных и птиц приводило к улучшению всасывания в ЖКТ различных нутриентов: насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, жирорастворимых витаминов А и Е, каротиноидов и др. С одной стороны, это объясняется уменьшением размеров и, следовательно, увеличением площади контактирующей в ЖКТ поверхности жирорастворимых веществ за счет эффективного эмульгирования с помощью мицелл лизофосфолипидов. С другой стороны, это может быть связано с увеличением проницаемости липидных мембран клеток организма [177, 178, 179, 180]. При этом наблюдались такие эффекты как ускоренный рост массы тела животных на начальных стадиях [177], уменьшение содержания жира в печени, что может свидетельствовать о более эффективном переваривании жиров и также способствовать

получению более постного мяса птиц [180]. Отмечено, что введение лизофосфолипидов в рацион не влияло на итоговый вес, мышечный каркас и уровень смертности птиц [181].

Таблица 2 – Некоторые характерные положительные и отрицательные черты структурированных липидных наносистем и примеры их практического использования в пищевых системах.

Мицеллы	<ul style="list-style-type: none"> + растворение липофильных молекул + повышение биодоступности биоактивных молекул + позволяет сохранить прозрачный вид (важно для напитков) – требуется значительное количество ПАВ – возможен посторонний привкус – возможно ускорение деградации биоактивных молекул – многие ПАВ имеют синтетическую природу <p>Использование на практике:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Доставка β-каротина, ликопина, лютеина, фитостеролов, витамина E [122, 168, 169, 170]
Липосомы	<ul style="list-style-type: none"> + растворение липофильных и гидрофильных молекул + пролонгированный выпуск биоактивных молекул – высокая стоимость (ингредиентов и технологических процессов) – невысокая загрузочная емкость <p>Использование на практике:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Доставка красителей, вкусоароматических веществ, жирорастворимых антиоксидантов, глазирующих агентов, ферментов и др. [171, 172]
Обратные мицеллы	<ul style="list-style-type: none"> + растворение липофильных и гидрофильных молекул + пролонгированный выпуск – может требоваться большое количества ПАВ – возможен посторонний привкус – высокая вязкость (кубическая фаза) <p>Использование на практике:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Контролируемая доставка ароматических веществ [173, 174, 175]

Фосфолипиды как пищевая добавка с эмульгирующими свойствами.

Использование фосфолипидов в пищевой промышленности регулируется нормативными документами, предназначенными для лецитина – пищевой добавки (Е 322), представляющей собой фосфолипидную смесь с сопутствующими веществами растительного (семян подсолнечника, сои, зародышей семян кукурузы и др.) или животного (яйца) происхождения, используемую, в основном, в качестве эмульгатора [182, 183]. Так, в состав лецитина входят: фосфатидилхолин (7,7 – 22,2 %); фосфатидилинозитол (6,2 – 17,3 %), фосфатидилэтанолламин (3,5 – 13,7 %), фосфатидная кислота (2,1 – 8,6 %) [159]. В гидролизованных лецитинах содержатся лизоформы этих фосфолипидов (7 – 10 %), наибольшую долю из которых составляет лизофосфатидилхолин (до 4,6 %) [159]. Основные технологические функции лецитинов в пищевых продуктах включают: диспергирование жиров, замедление ретроградации крахмала, улучшение объёма хлебобулочных изделий, изменение вязкости, модификация кристаллов, смачивание и смазывание [183]. Оптимальное содержание фосфолипидов в ежедневном рационе, согласно национальным методическим рекомендациям, должно составлять 5 – 7 г [48].

Резюме: фосфолипиды как компоненты многофункциональных пищевых ингредиентов.

Способность пищевых фосфолипидов встраиваться в биомембраны клеток и липопротеины крови, их высокая биологическая активность, а также способность к формированию структурированных липидных структур уже нашли широкое практическое применение в использовании в качестве БАД к пище, в качестве эффективных эмульгаторов различных пищевых продуктов, в составе липосомальных препаратов фармацевтического назначения. В последнее время все больше появляется разработок, где фосфолипиды используются в качестве носителей липофильных пищевых добавок (красителей, ароматизаторов), пробиотиков, ферментов. Получение лизоформ фосфолипидов с помощью ферментативного гидролиза, с одной стороны, дает новые широкие возможности к созданию более стабильных эмульсий с низким содержанием жиров, возможности повышения усвояемости липофильных биологически активных веществ, перспективы для получения термочувствительных липосом. С другой стороны, должно быть дополнительно исследовано и учтено влияние лизофосфолипидов на проницаемость и текучесть мембран при существенном увеличении поступления их с пищей.

1.2.3 Пищевые биополимеры как перспективные материалы для создания систем доставки нутрицевтиков

На протяжении последних 30 лет пищевые биополимеры представляют особенный интерес у исследователей в связи с их налаженным промышленным производством из возобновляемого

природного сырья и появившейся, в связи с этим, возможности их использования в качестве основы многофункциональных пищевых ингредиентов. Прежде всего, среди важнейших «традиционных» функций пищевых биополимеров следует выделить *структурообразующую* функцию (гелеобразование, стабилизация эмульсий и пен и т.д.), которая крайне важна, например, для решения таких задач, как поиск новых природных эмульгаторов и пенообразователей, а также снижение доли жиров при сохранении реологических параметров пищевых систем [100]. При этом возможный синергетический эффект от использования биополимеров в различных комбинациях значительно расширяет возможности их использования [100,184]. Также в последние годы усилилась тенденция к исследованию биологической активности пищевых биополимеров [100, 185, 186, 187]. Более короткую историю имеют исследования *инкапсулирующих и защитных* (от окисления и деградации) свойств пищевых биополимеров по отношению к нутрицевтикам, а также *контролируемой доставки* и *регулируемого выпуска* инкапсулированных ими веществ [109, 122, 170, 184, 188–194].

К числу свойств биополимеров, наиболее важных для их эффективного применения в качестве стимул-чувствительных наноконтейнеров для доставки биологически активных веществ липидной природы, можно отнести следующие [100, 102, 107, 195–200]:

(1) Амфифильную природу их макромолекул, а именно содержание полярных и неполярных функциональных групп, участвующих во множестве различных типов взаимодействий (электростатических, гидрофобных и формирования водородных связей) с молекулами различной природы (как гидрофильными, так и липофильными) в объеме и на поверхности раздела фаз пищевых систем. Благодаря амфифильной природе, биополимеры, как правило, хорошо растворяются в водной среде, а также имеют высокую поверхностную активность на границе раздела фаз масло–вода/воздух–вода. Также амфифильная природа биополимеров лежит в основе их высокой склонности к самоассоциации и ассоциации с молекулами различной природы;

(2) Широкое разнообразие как конформаций биополимерных макромолекул, так и архитектуры биополимерных ассоциатов и комплексов (глобулярных, клубкообразных, спиралевидных, стержнеобразных и др.), обуславливающее их высокую инкапсулирующую способность (включение, абсорбцию, захват и т.д.) по отношению к молекулам различных биологически активных веществ;

(3) Высокую чувствительность к изменению условий окружающей среды (рН, ионная сила, температура, высокое давление, специфические ионы, ферменты);

(4) Размеры порядка нанометров, характерные для отдельных макромолекул биополимеров, а также их ассоциатов и комплексов, что способствует повышению биодоступности биоактивных веществ за счёт более эффективной диффузии и массопереноса

наноразмерных частиц через биологические барьеры, что приводит к увеличению абсорбции клетками [151, 201–203]. Таким образом, размеры биополимерных систем доставки порядка нанометров способствуют повышению: (а) степени растворимости инкапсулированных в них биологически активных веществ; (б) уровня массопереноса; (в) прямого захвата слизистыми, покрывающими эпителий кишечника, и продолжительности по времени этого захвата; (г) уровня высвобождения из них (высокая поверхностная площадь) биологически активных веществ;

(5) Возможные антиоксидантные свойства остатков аминокислот (тирозин и метионин) и функциональных групп (сульфгидрильные группы) белков;

(6) Возможную способность к инактивации ионов металлов и свободных радикалов.

Ниже мы подробнее рассмотрим структуру и функциональные свойства некоторых биополимеров, перспективных для доставки нутрицевтиков.

1.2.2.1 Белки

Пищевые белки широко используются в пищевой технологии благодаря своим функциональным свойствам, под которыми понимаются физико-химические характеристики, определяющие их поведение при переработке в пищевые продукты, а также обеспечивающие желаемые структурные, технологические и потребительские свойства готовых пищевых продуктов. К основным из них относятся растворимость в водной среде и структурообразующие свойства (способность к набуханию; эмульгирующие, гелеобразующие и пенообразующие способности; адгезионные и др. свойства) [204]. В последнее время все больше внимания уделяется *инкапсулирующим* способностям белков.

Установлено, что число и последовательность аминокислотных остатков различных пищевых белков, т.е. их первичная структура, лежат в основе широкого разнообразия их молекулярных параметров (таких как молекулярный вес, конформация, изоэлектрическая точка, гидрофильность и т.д.), важных при создании биополимерных наноконтейнеров. Кроме того, на формирование третичной и четвертичной пространственной структуры белков огромное значение оказывают условия окружающей среды, такие как pH, температура, ионная композиция и др. Здесь важно отметить, что потеря белками растворимости в области изоэлектрической точки (Таблица 3) может являться критическим фактором, ограничивающим их использование в различных пищевых системах. Рассмотрим подробнее структуру и функциональность молочного белка – казеина.

Казеины: структура и функциональность.

Казеины, как пищевые ингредиенты, используются в производстве широкого ассортимента различной пищевой продукции (мясной, молочной, специализированной, напитков, хлебобулочных изделий). Они имеют высокую питательную ценность благодаря полному набору

незаменимых аминокислот. Их легко можно выделить из воспроизводимого природного сырья – молока животных. Казеины также эффективны как структурообразующие пищевые ингредиенты благодаря своим высоким эмульгирующим, гелеобразующим и пенообразующим способностям [205; 206]. Недавно была установлена высокая инкапсулирующая способность казеинов по отношению в таким веществам, как полифенолы [207 – 210], пробиотики [211 – 213], лекарственные препараты [189, 210, 214].

Таблица 3 – Молекулярные параметры некоторых пищевых белков, перспективных для доставки нутрицевтиков [101]

Пищевой белок	Основной тип пространственной структуры макромолекул	<i>pI</i>
Молочные белки		
Казеины (α_{S1} , α_{S2} , β , κ)	Клубкообразные	~ 4,6
β - лактоглобулин	Глобулярный	~ 4,8
α -лактальбумин	Глобулярный	~ 4,8
Бычий сывороточный альбумин	Глобулярный	~ 4,8
Лактоферрин	Глобулярный	~ 8,0
Яичные белки		
Овальбумин	Глобулярный	~ 4,6
Лизоцим	Глобулярный	~11,0
Фосвитин	Глобулярный	~ 4,0
Белки мяса животных и рыбы		
Желатина (мясо)	Клубкообразные, способные формировать спирали	~ 5
Желатина (рыба)	Клубкообразные, способные формировать спирали	~ 8
Растительные белки		
Соевый глицинин	Глобулярный	~ 5,0
Зеин	Глобулярный	~ 6,0

В основе высокой функциональности этих белков лежат следующие физико-химические факторы (Рисунок 5) [215]:

(1). Как и все белки, казеины содержат высокое количество полярных и неполярных участков, определяющих их *амфифильный характер* и способность к различного рода *взаимодействиям* (гидрофобному притяжению, формированию водородных связей, электростатическому притяжению) с множеством молекул различной природы. При этом высокое содержание *неполярных аминокислотных остатков* и пролина обеспечивает специфический изгиб белковой полипептидной цепи, что, с одной стороны, препятствует формированию её плотноупакованных упорядоченных вторичных структур, а именно β -складчатых и α -спиральных, и, с другой стороны, способствует самоассоциации белковых полипептидных цепей в водной среде благодаря гидрофобному притяжению между ними [216 – 220].

(2). Высокое содержание пролина в полипептидных цепях казеинов лежит в основе их достаточно открытой *конформации*, способствующей высокой реакционной способности различных функциональных групп.

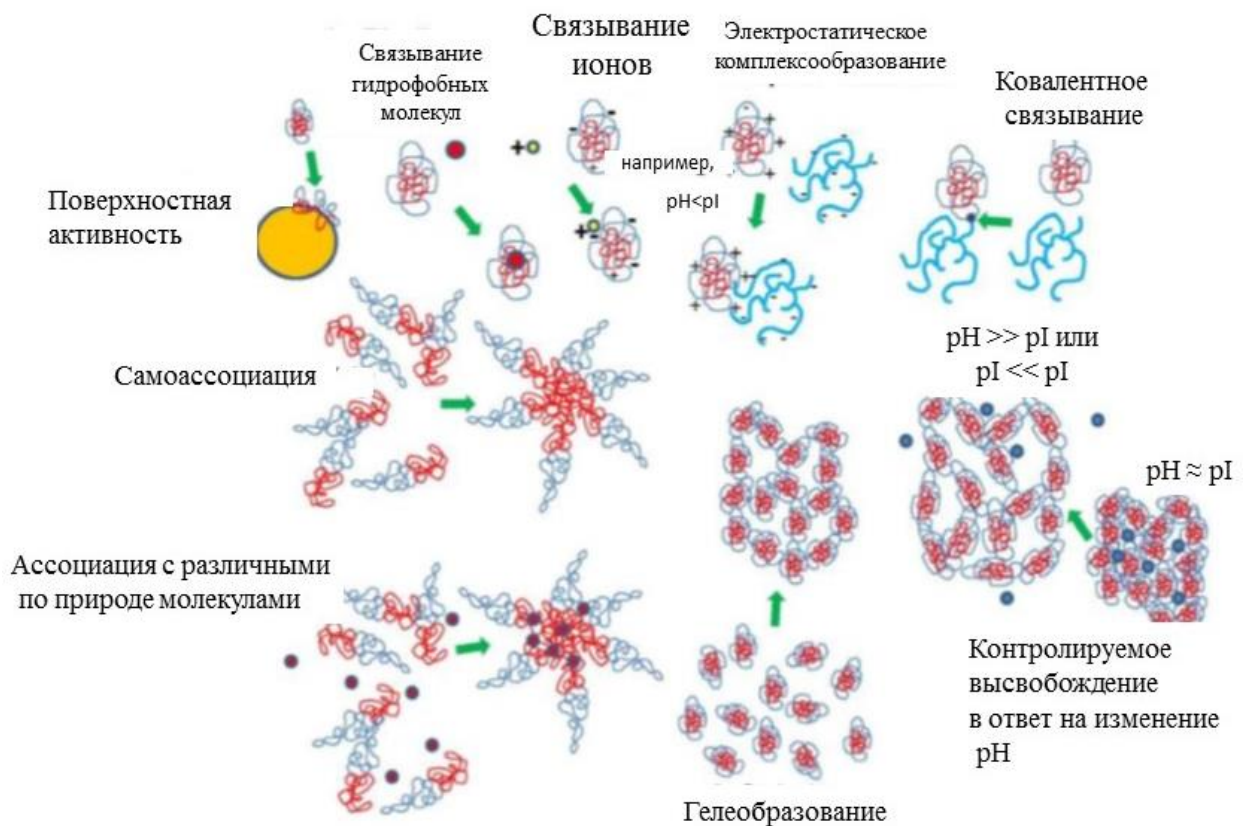


Рисунок 5 – Иллюстрация некоторых функциональных свойств молочных белков, важных при их использовании в доставке биологически активных веществ [195].

(3). Следует также отметить *полиморфизм* казеинов, так как их молекулярная структура во многом определяется условиями окружающей среды (например, pH раствора или концентрацией ионов кальция), что позволяет регулировать их свойства с помощью различных технологических методов [100, 216–226].

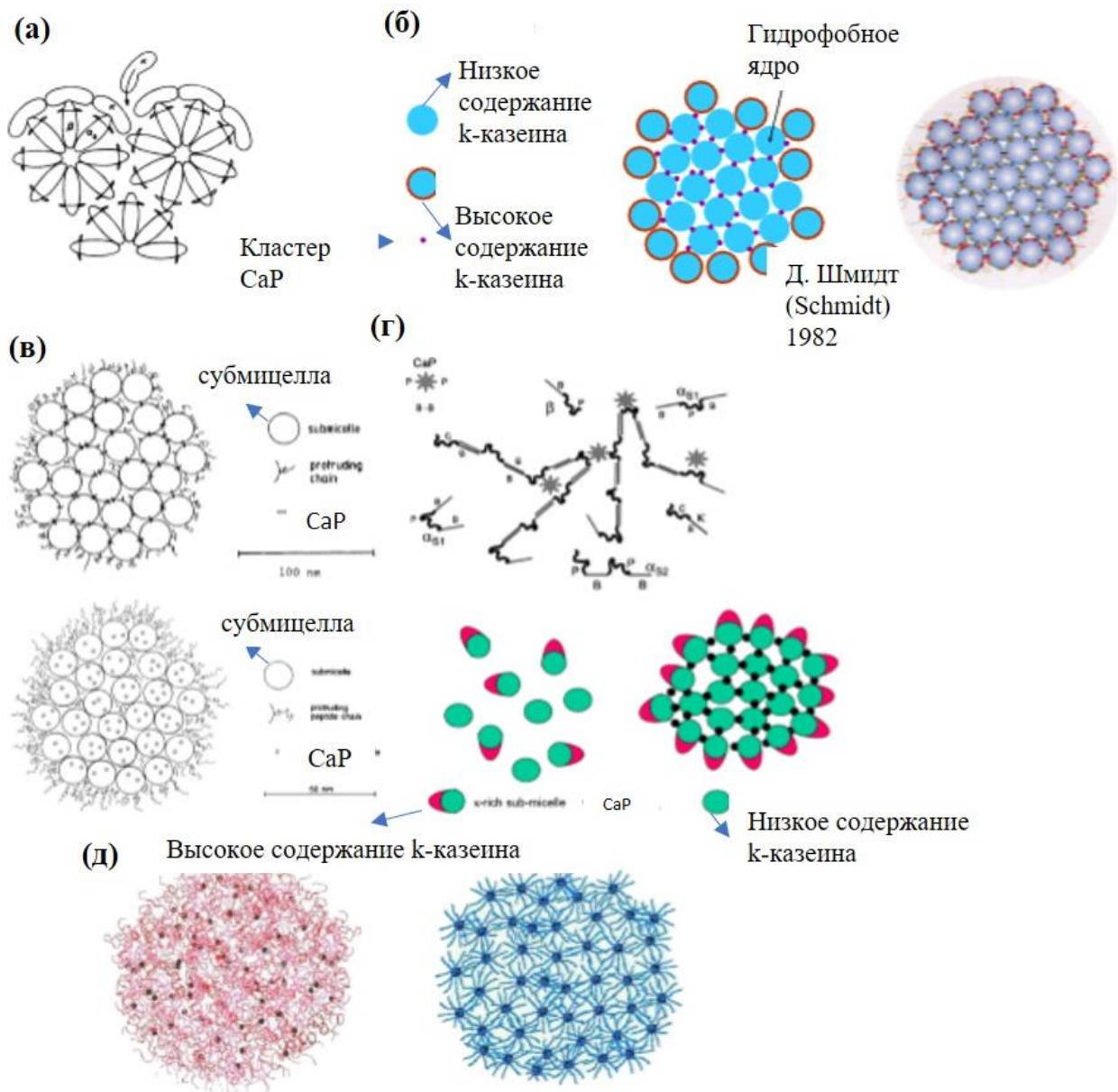


Рисунок 6 – Различные модели казеиновых мицелл, которые предложили: (а) Д. Вог (D.F. Waugh) в 1958 г. [227]; (б) Д. Шмидт (D.G. Schmidt) в 1982 г. [153]; (в) П. Вулстра (P. Walstra) в 1990 г. [228] и в 1999 г. [229]; (г) Д. Хорн в 2003 г. [230] (модель двух основных типов ассоциативных взаимодействий между молекулами отдельных казеинов (гидрофобного притяжения и связывания двухвалентными ионами кальция) и интерпретация модели Шмидта 2005 г [231]); д) Холт (C. Holt) [232; 233]. По данным [232; 234]

(4). Огромное значение для функциональности казеинов имеет их высокая склонность к самоассоциации, как в объёме водных растворов, так и на границе раздела фаз масло–вода в прямых эмульсиях или воздух–вода – в пенах. Это может быть связано с высокой концентрацией неполярных остатков аминокислот на поверхности клубкообразных молекул казеинов, которые, не участвуя во внутримолекулярных взаимодействиях, склонны к межмолекулярным гидрофобным взаимодействиям. На основе данных об ассоциативных взаимодействиях индивидуальных молекул казеинов (α_1 , α_2 -, β - и κ -) были предложены различные модели казеиновых мицелл (Рисунок 6).

(5). Кроме того, небольшие размеры молекул и ассоциатов этих белков (менее 500 нм) могут быть дополнительным преимуществом для повышения биодоступности инкапсулированных в них нутрицевтиков, в том числе, плохо растворимых в воде биологически активных веществ [151].

Все вышеперечисленные факторы могут лежать в основе перспективного использования казеината натрия в качестве материала для стимул-чувствительных нано-контейнеров, с помощью которых можно доставить биологически активные вещества в организм человека, в том числе, через продукты питания. Однако следует отметить, что потеря растворимости этого белка в области около его изоэлектрической точки ($\text{pH} \sim 4,8$) может значительно ограничить его использование в пищевой продукции как наноконтейнера для нутрицевтиков. В качестве возможного способа сохранения растворимой формы белка в широком диапазоне pH предлагается его ковалентное связывание с полисахаридами на начальной стадии реакции Майяра, то есть получение хорошо растворимых в водной среде гликопротеинов или, иначе, белок-полисахаридных ковалентных конъюгатов.

1.2.2.2 Полисахариды

Среди основных причин широкого использования полисахаридов в составе пищевых продуктов можно выделить:

- 1) высокую энергетическую ценность перевариваемых (усваиваемых) полисахаридов (4 ккал на 1 г, как у крахмала и его производных, подверженных ферментативному гидролизу до глюкозы в ЖКТ);
- 2) функцию пищевых волокон, свойственную большинству полисахаридов, резистентных к перевариванию в ЖКТ, а именно очищение ЖКТ, связывание тяжёлых металлов, питание микробиоты толстого кишечника;
- 3) способность изменять цвет продукта или напитка (неферментативное покоричневение в результате взаимодействия с белками по реакции Майяра);
- 4) придание сладости;

5) изменение активности воды;

6) гелеобразующую, эмульгирующую и пенообразующую способности, позволяющие с их помощью создать определённую структуру пищевых продуктов [101].

Относительно недавно найдены новые нетрадиционные для полисахаридов свойства, такие как антимикробная активность и мукоадгезивность (например, у хитозана, альгинатов и пектинов), а также инкапсулирующая способность (например, у мальтодекстринов, амилозы, амилопектина и альгината), которые представляют большой интерес для при создании функциональных и специализированных продуктов питания [101, 235, 236]. Примеры некоторых полисахаридов, перспективных для создания физиологически функциональных ингредиентов, представлены в Приложении А.

Мальтодекстрины: структура и функциональность.

Мальтодекстрины (МД) представляют собой продукты ферментативного гидролиза крахмала (например, картофельного или кукурузного). Мальтодекстрины, полученные на разной стадии гидролиза, отличаются по числу глюкозных остатков, т. е. молекулярному весу, и характеризуются декстрозным эквивалентом (ДЭ (варьируется от 2 до 19) – восстанавливающей способности сахаров относительно глюкозы (на 100 г сухого вещества)).

Основные функциональные свойства мальтодекстринов:

- хорошая растворимость в воде;
- формирование прозрачных растворов с низкой вязкостью;
- влагоудерживающие свойства;
- структурообразующие свойства: возможность получения гелей в широком диапазоне рН (для МД с низким ДЭ = 2, при высокой концентрации (> 25 % вес/объём), рН от 3 до 7 [237]);
- нейтральный вкус и аромат;
- антикристаллизационная способность, т. е. снижение температуры замерзания водных растворов;
- лёгкая усваиваемость в ЖКТ или способность оказывать благоприятное влияние на микробиоту кишечника.

Примеры использования мальтодекстрина в пищевой и фармакологической промышленности:

- как заменитель жира (сохранение текстуры, снижение калорийности, интенсификатор вкуса);


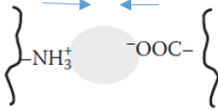
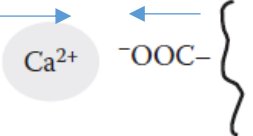
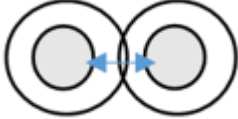
- в качестве вспомогательного вещества для более удобного дозирования небольших количеств пищевых добавок (красителей, ароматизаторов), биологически активных веществ (пробиотиков, витаминов) и др.;
- как структурообразователь в продуктах (для получения кремовой консистенции в сухих смесях, супах, соусах; мучных изделиях; начинке для выпечки; десертах; замороженных продуктах, сухих батончиках и др.);
- в составе препаратов для улучшения микрофлоры кишечника.

Здесь следует отметить, что низкая стоимость, нетоксичность, нейтральные органолептические показатели свидетельствуют об универсальности использования мальтодекстринов в составе многофункциональных пищевых ингредиентов. Кроме того, в некоторых исследованиях были показаны защитные свойства мальтодекстринов по отношению к биологически активным веществам [238]. При этом низкие инкапсулирующая и эмульгирующая способности мальтодекстринов, сдерживающие их эффективное использование в качестве наноконтейнеров, могут быть улучшены, например, с помощью совместного использования с другими поверхностно-активными веществами: гуммиарабиком [239, 240], модифицированными крахмалами [239], белками [193, 241].

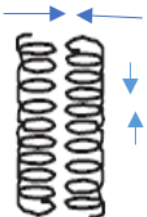
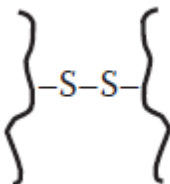
1.2.4 Молекулярные взаимодействия и функциональные свойства систем доставки нутрицевтиков

В основе формирования функциональных свойств белков и полисахаридов значительная роль принадлежит характеру их внутри- и межмолекулярных взаимодействий. В основе таких взаимодействий может лежать формирование как физических связей (*Ван-дер-Ваальсовых, электростатических, гидрофобных, водородных*), так и более прочных химических связей, как, например, в случае с белок-полисахаридными ковалентными конъюгатами (*ковалентные взаимодействия*) (Таблица 4). Понимание природы нековалентных взаимодействий между всеми компонентами в растворе очень важно, поскольку оно может обеспечить контроль их *структурных параметров* (такие как молярный вес, размер, форма, плотность, заряд) и *функциональных свойств* (растворимости, инкапсулирующих свойств, защитных способностей по отношению к окислению биологически активных веществ, биодоступность в определённый отдел ЖКТ) в том числе, с помощью изменений условий окружающей среды (рН, ионная сила, температура) [100]. Так, например, *электростатические взаимодействия* лежат в основе формирования комплексов биополимер – биологически активное вещество (БАВ) и биополимер–биополимер, в том числе, при послойной адсорбции, что является одним из основных подходов к формированию многослойных биополимерных покрытий для БАВ [101, 151, 242–244].

Таблица 4 – Краткая характеристика и примеры основных типов взаимодействий между биополимерами в пищевых системах

Тип и энергия взаимодействия	Природа	Участие в основных процессах формирования структуры пищевой системы	Влияние условий окружающей среды	Литература
Ван-дер-Ваальсовы силы  <p>0,4–2 кДж/моль при $d^* = 2 - 3$ нм d^*– дистанция</p>	Электромагнитные силы, между диполями; «+» ; «-»	Все виды межатомных и межмолекулярных взаимодействий: пространственная структура макромолекул	Мало изучено	[242 – 248]
Электростатические силы  <p>до ≈ 440 кДж/моль при $d = 0,3$ нм</p>	Кулоновские силы между заряженными функциональными группами (NH_3^+ ; COO^- ; OH^- ; SO_3^- и др.) «+» ; «-»	Самоассоциация/ комплексообразование; Внутримолекулярные: раскрытие/сжатие, гибкость, структура макромолекул; агрегация	Экзотермический характер. Уменьшение силы при повышении температуры (t), ионной силы (I), pH .	[13, 242, 247, 249, 250].
Ионное связывание 	Кулоновские силы, между поливалентными катионами (Ca^{2+} ; Fe^{2+} ; Cu^{2+}) и анионным функциональным группам биополимеров	Самоассоциация; Флоккуляция капель эмульсии (по мостничному механизму)	Экзотермический характер. Уменьшение силы при повышении температуры (t), ионной силы (I), pH .	[100, 242]
Исключённый объём («стерические») 	Отталкивание при энергетически неблагоприятном перекрывании электронных облаков	Термодинамическая несовместимость биополимеров, фазовое расслоение, растворимость, вытеснительная флоккуляция капель эмульсии	Концентрация и структурные параметры (радиус инерции, конформация, гибкость, архитектура) макромолекул и их ассоциатов. Влияние t , качества растворителя, а также pH и I , если частицы заряжены.	[100, 245, 251]

Продолжение таблицы 4.

Тип и энергия взаимодействия	Природа	Участие в основных процессах формирования структуры пищевой системы	Влияние условий окружающей среды	Литература
<p>Водородные связи</p>  <p>10–40 кДж/моль</p>	<p>Двойственный характер: электростатические и ковалентные. $-O-H^{\delta+} \Rightarrow \delta^-O<H$, $-N-H^{\delta+} \Rightarrow \delta^-O<H$, $-N-H^{\delta+} \Rightarrow \delta^-N<H$.</p>	<p>Комплексообразование между заряженными и нейтральными биополимерами или парой нейтральных биополимеров (желатин, целлюлоза, крахмал); Внутримолекулярные: раскрытие/сжатие, конформация, стабилизация структуры (например, спиральной или складчатой)</p>	<p>Экзотермический характер, Уменьшение силы при повышении температуры, t. Незначительное влияние pH, I. Влияние качества растворителя.</p>	<p>[14, 100, 242, 247, 249, 250, 252]</p>
<p>Гидрофобные</p>  <p>5 – 40 кДж/моль, действуют на больших расстояниях</p>	<p>Притяжение между неполярными группами (H, R) в водной среде</p>	<p>Самоассоциация/ комплексообразование; флоккуляция, Адсорбция амфифильных биополимеров на поверхности масло-вода и вода-масло Внутримолекулярные: раскрытие/сжатие, конформация макромолекул.</p>	<p>Эндотермический характер (до 60°C). Энтропийный характер. Усиление до 60°C. Незначительное влияние pH, I. Влияние качества растворителя.</p>	<p>[14, 100, 242, 247, 250]</p>
<p>Ковалентное связывание</p>  <p>Очень прочные</p>	<p>Химическая, между непарными электронами атомов (окисление, восстановление, этерификация, амидирование, реакции Майара)</p>	<p>Получение конъюгатов биополимеров с улучшенными функциональными свойствами</p>	<p>Влияние всех условий: pH, t, времени воздействия, относительной влажности, активности ферментов, давления, механических воздействий и т.д.).</p>	<p>[100, 101, 242, 253]</p>

Примером могут быть электростатические комплексы изолята пшеничного белка с ксантановой камедью, используемые для покрытия двойной эмульсии и контролируемого выпуска витамина В₁, заключённого во внутреннюю водную фазу [242].

Водородные связи также играют важную роль в формировании различных комплексов, процессах ассоциации биополимеров с БАВ и самоассоциации частиц биополимеров. Например, формирование спиральной структуры за счёт образования водородных связей при охлаждении агара и каррагинана позволяет получить гидрогелевые частицы, которые являются перспективными микроконтейнерами для инкапсулирования БАВ и их доставки через пищевые системы [254].

Перспективным направлением исследований является изучение возможности использования пищевых биополимеров в качестве стимул-чувствительных наноконтейнеров для контролируемой доставки БАВ, т.е. с целенаправленным регулированием как скорости их ферментативного гидролиза под действием пищеварительных ферментов в ЖКТ, так и адресной доставки БАВ в определённые отделы ЖКТ с заданной степенью их высвобождения [100,164, 183, 242, 255]. Так, например, было обнаружено, что многие полисахариды (декстран, химически модифицированный крахмал, альгинаты, пектины, каррагинаны, ксантаны и т.д.) устойчивы к действию сред (протеолитических ферментов, рН) желудка и кишечника, и их специфический гидролиз происходит только с помощью кишечных бактерий. Такие свойства полисахаридов могут быть использованы при создании биополимерных наноконтейнеров для целенаправленной доставки БАВ в толстый кишечник [256, 257].

Ковалентное связывание белков с полисахаридами без использования вредных химических реагентов занимает важное место в моделировании биополимерных частиц с новыми улучшенными свойствами. В частности, реакция Майяра [258] (Рисунок 7) на начальной стадии позволяет получить водорастворимые белок - углеводные ковалентные конъюгаты с высокими инкапсулирующими, защитными и/или эмульгирующими свойствами (первым этапом меланоидинообразования является взаимодействие сахаров и аминокислот с образованием N-гликозидов (вещество I). В процессе нагревания или длительного хранения N-гликозид самопроизвольно претерпевает перегруппировку Амадори (изомеризация N-замещенных альдозиламинов в 1-амино-1-дезоксид-2-кетозы), в результате которой образуется двойная, т.е. ковалентная связь между первым и вторым атомами углерода и возникает енольная форма 1-амино-1-дезоксид-2-кетозы (вещество II)). Такие ковалентные конъюгаты были получены между яичным белком и пектином [259], казеинатом и декстраном [260], казеином и глюкозой [261], казеином и декстраном [262, 263] и др. Широкое разнообразие пищевых белков и полисахаридов, выделенных из природных источников, и щадящие условия реакции их

ковалентного связывания (высушивание при невысокой температуре в условиях постоянной влажности) позволяют получить множество безопасных, нейтральных по вкусу и аромату пищевых ингредиентов с высокой питательной ценностью, что делает их перспективными для использования в доставке БАВ в питании. Так, наши предварительные исследования показали, что при определённом соотношении белка и мальтодекстрина конъюгаты, во-первых, могут проявлять высокие инкапсулирующие и защитные способности по отношению к соевому фосфатидилхолину [264, 265] и, во-вторых, обладают высокой растворимостью в водной среде, включая изоэлектрическую точку белка ($pI \sim 4,6$), что делает их перспективными материалами для использования в пищевых продуктах с низким содержанием жира в широком диапазоне pH.

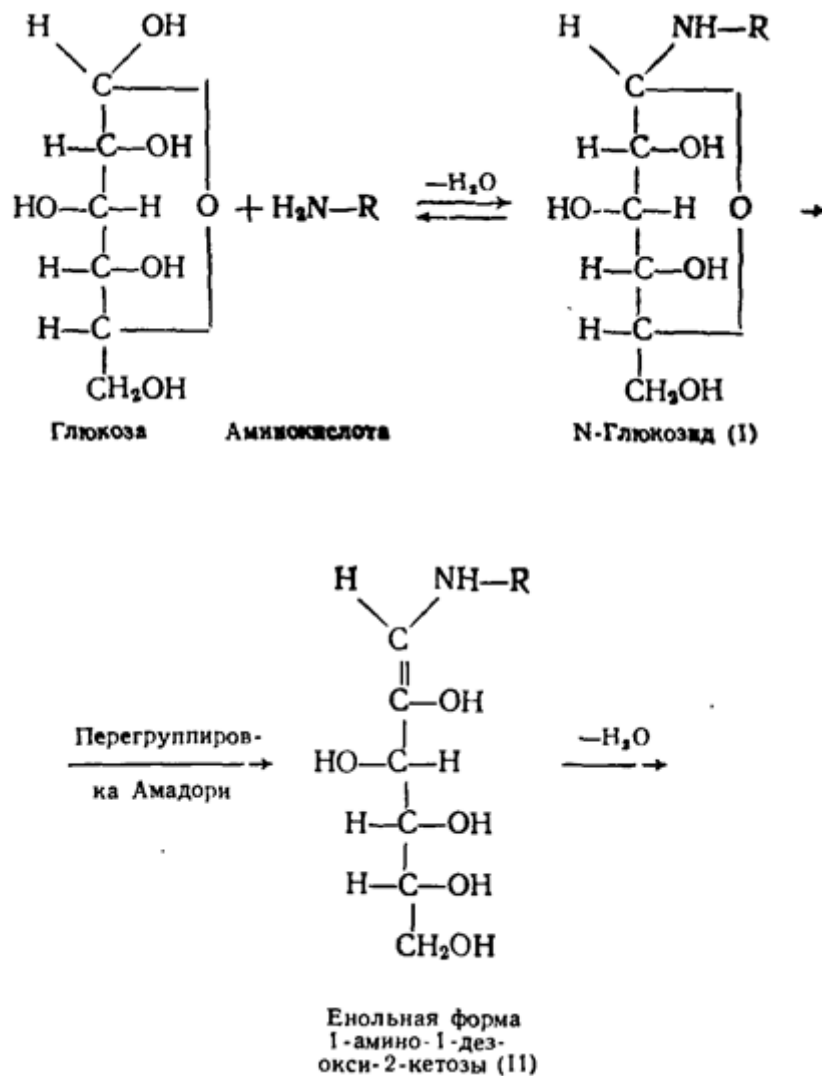


Рисунок 7 – Схема реакций получения белок-углеводных комплексов на начальной стадии реакции Майяра.

Наши предварительные исследования показали, что при определённом соотношении белка и мальтодекстрина конъюгаты, во-первых, могут проявлять высокие инкапсулирующие и защитные способности по отношению к соевому фосфатидилхолину [264, 265] и, во-вторых, обладают высокой растворимостью в водной среде, включая изоэлектрическую точку белка ($pI \sim 4,6$), что делает их перспективными материалами для использования в пищевых продуктах с низким содержанием жира в широком диапазоне pH.

На основании обзора литературы можно сделать вывод о том, что инкапсулирующие свойства природных фосфолипидов, склонных к формированию липосомальных и мицеллярных молекулярных агрегатов, являются объектом широкого внимания в доставке биологически активных веществ через пищевые системы. В свою очередь, пищевые биополимеры, в частности, ковалентные конъюгаты казеината натрия с мальтодекстринами, могут проявлять высокие инкапсулирующие и защитные свойства по отношению к липофильным нутрицевтикам. Таким образом, актуальным является выявление возможности и эффективности совместного использования пищевых биополимеров и фосфолипидов как наноконтейнеров для доставки биологически активных веществ, в особенности, адекватного количества ω -3 ПНЖК, через пищевые системы с низким содержанием жира. Всё это требует более глубокого понимания физико-химических основ их взаимовлияния и взаимодействий как в водных растворах, так и в условиях переваривания в желудочно-кишечном тракте.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Биологически активные липиды и модельный фосфолипид

Основными объектами исследования явились полиненасыщенные биологически активные липиды с различной структурой (Рисунок 8):

- 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 LPC 80 GmbH, Германия));

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

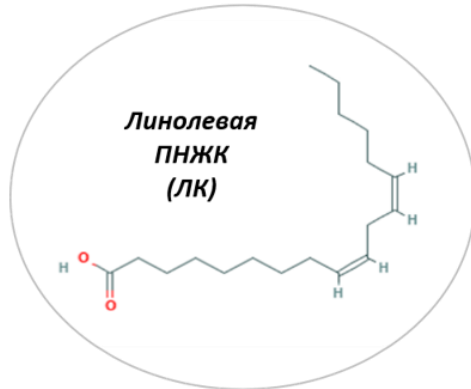
Выбранные фосфолипиды представляли особый интерес для создания физиологически функциональных ингредиентов, поскольку они хорошо зарекомендовали себя в фармацевтической практике, с одной стороны, как липосомальные и мицеллярные наноконтейнеры для доставки лекарственных веществ, а с другой стороны, либо как эффективные геро- и гепатопротекторы (как в случае ФХ), либо как агенты, увеличивающие биодоступность лекарств (как в случае ЛФХ). Развёрнутый химический состав образцов фосфатидилхолина представлен в Приложении Б.

Льняное масло дополнительно очищали от низкомолекулярных ПАВ с помощью многократного (5 – 7 раз) пропускания через флорисил (Sigma, F5754; 30-60 mesh) согласно методу, описанному в работе [266], с использованием делительной воронки (4 г флорисила на 50 г. масла). Развернутая характеристика жирнокислотного состава масла льна, полученная с помощью газожидкостной хроматографии (Кристалл, 2000М, Россия), приведена в Приложении В.

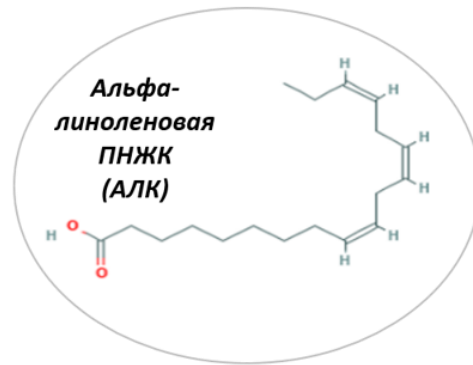
DL- α -дипальмитоил фосфатидилхолин (ДПФХ) (Sigma P-5911, США, 99 % чистоты) был использован в качестве модельного фосфолипида для измерений методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

Все липиды, используемые в работе, после вскрытия хранили в морозильной камере (-22°C) в плотно закрытой упаковке.

Индивидуальные жирные кислоты

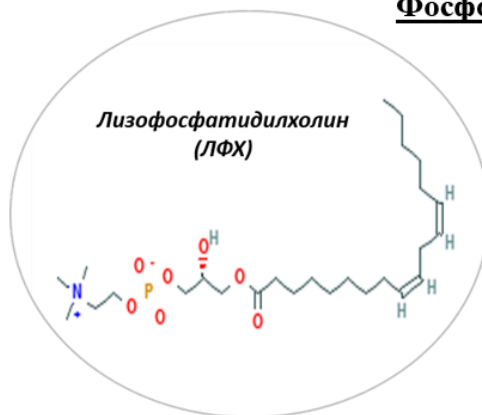


Линолевая (ω -6): >99 (%)

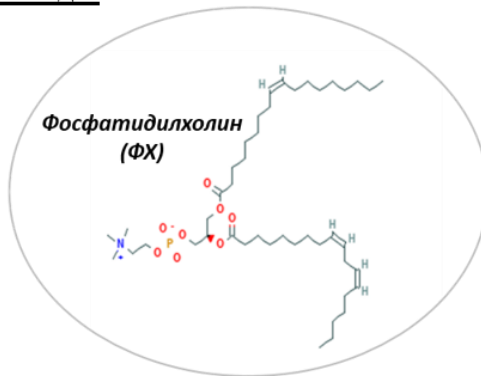


α -линоленовая (ω -3): >99 (%)

Фосфолипиды

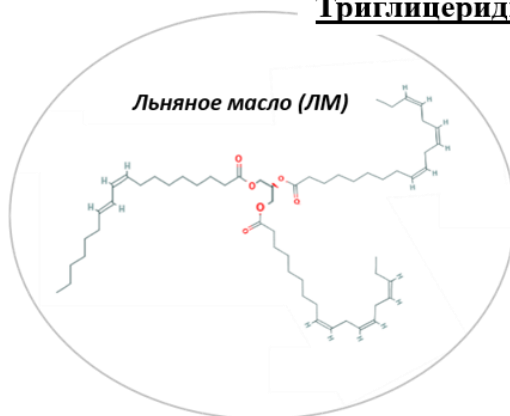


α -линоленовая (ω -3): 4 - 6 (%)
 Линолевая (ω -6): 44 - 48 (%)
 Олеиновая (ω -9): 7 - 9 (%)
 Пальмитиновая: 20 - 27 (%)
 Стеариновая: 5 - 8 (%)



α -линоленовая (ω -3): 3 - 7 (%)
 Линолевая (ω -6): 59 - 70 (%)
 Олеиновая (ω -9): 11 - 15 (%)
 Пальмитиновая: 12 - 17 (%)
 Стеариновая: 2 - 5 (%)

Триглицериды льняного масла



α -линоленовая (ω -3): 54,6 (%)
 Линолевая (ω -6): 18,3 (%)
 Олеиновая (ω -9): 15,8 (%)
 Пальмитиновая: 3,8 (%)
 Стеариновая: 2,5 (%)

Рисунок 8 – Характеристика (структурная формула и жирнокислотный состав (в % от общего количества жирных кислот)) биологически активных липидов, используемых в работе

2.1.2 Биополимеры

2.1.2.1 Молочный белок

Казеинат натрия (Б) - натриевая форма основного белка молока, казеина (Sigma C8654, Новая Зеландия). Согласно данным производителя, образец казеината натрия содержал азот (13,5 – 16 %), натрий (≤ 3 %). Характеристика физико-химических свойств индивидуальных молекул казеина и его структурная модель представлены ниже (Таблица 5, Рисунок 9).

Таблица 5 – Характеристика физико-химических свойств индивидуальных молекул казеина молока (согласно данным производителя)

Компонент	M_w (кДа)	pI	Фосфаты/ моль	$E^{1\%}$ (280 нм)
α_{s1} – казеин	22 – 23,7	4,2 – 4,7	8 – 10	10,0 – 10,1
α_{s2} – казеин	25	–	10 – 13	–
β – казеин	24	4,6 – 5,1	4 – 5	4,5 – 4,7
κ – казеин	19	4,1 – 5,8	1	10,5

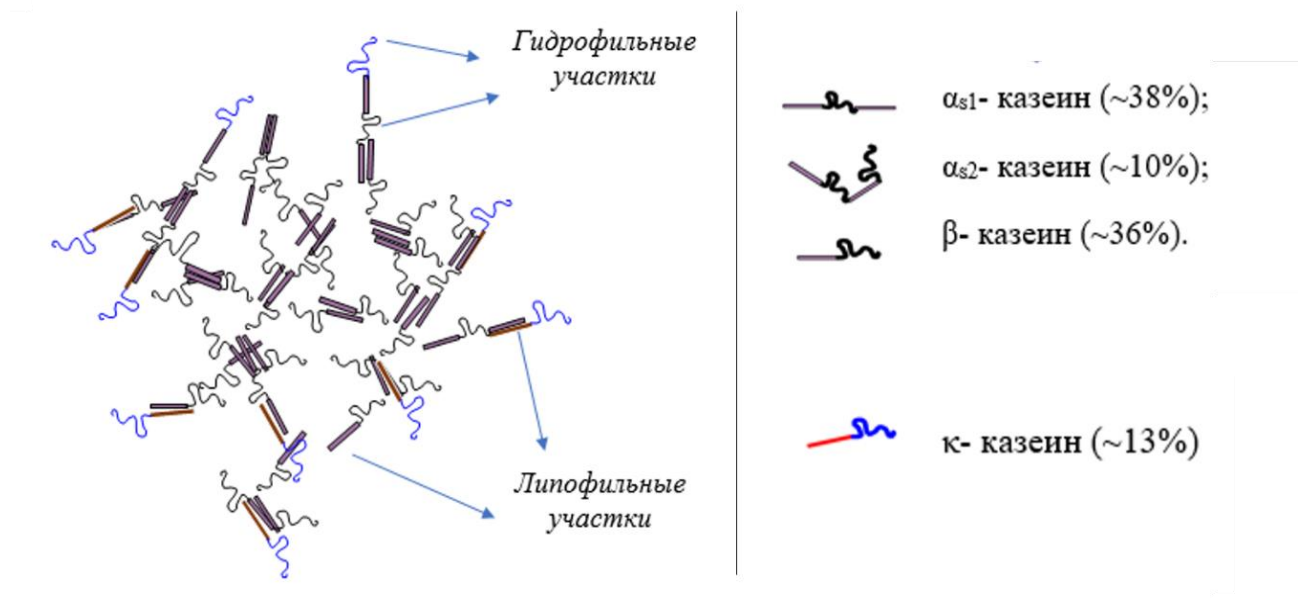


Рисунок 9 – Структурная модель казеината натрия, согласно модели Э. Дикинсона и Хорна [230]

2.1.2.2 Полисахариды

Мальтодекстрины (AVEBE GROUP, Нидерланды) - продукты частичного ферментативного гидролиза картофельного крахмала с декстрозным эквивалентом (ДЭ): ДЭ = 2 (Paselli SA2) или ДЭ = 10 (Paselli MD10) (Рисунок 10). Молекулярная масса индивидуальных молекул мальтодекстринов SA2 и MD10 составила 9,0 кДа и 1,8 кДа соответственно [267].

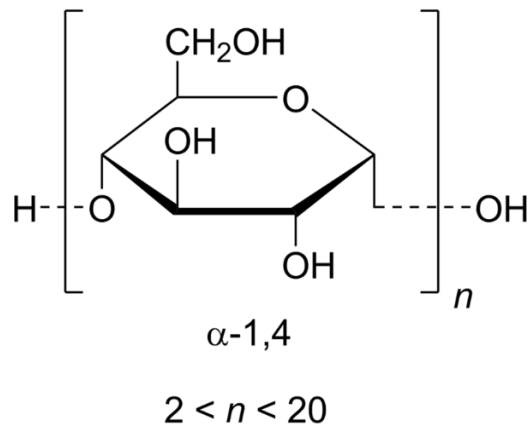


Рисунок 10 – Структурная формула мальтодекстринов

Декстран сульфат (ДС) (Sigma) - декстран (разветвленный полимер глюкозы бактериального происхождения), в остатках глюкозы которого часть гидроксильных групп замещены на сульфатные группы $[-OSO_3^-]$ (2-3 сульфатные группы на 1 остаток глюкозы). Молекулярная масса индивидуальных молекул декстран сульфата составила 500 кДа. Структурная формула декстран сульфата представлена ниже (Рисунок 11).

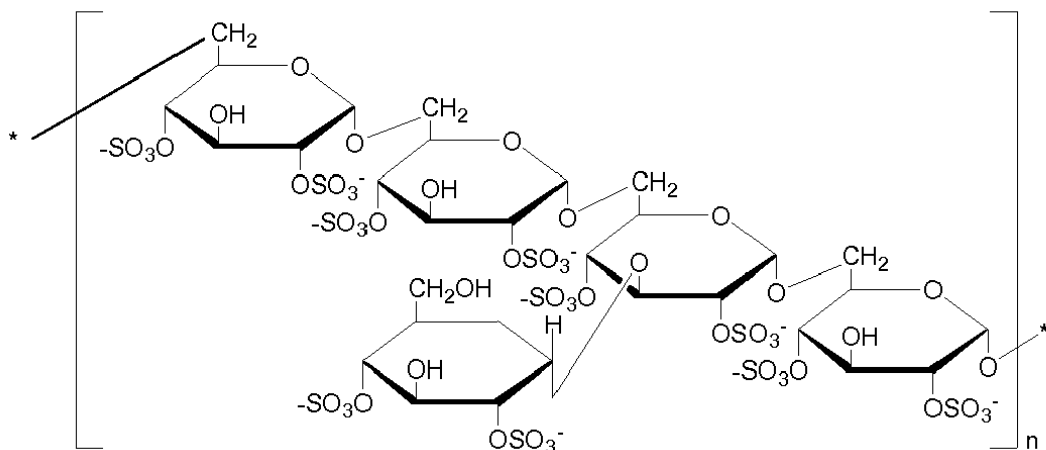


Рисунок 11 – Структурная формула декстран сульфата

Ковалентные конъюгаты, включающие казеинат натрия и мальтодекстрин SA2 (*Конс*) или казеинат натрия и мальтодекстрин MD10 (*Конм*) были сформированы по методу, описанному в работах [265, 268]. Для этого смешанный водный раствор казеината натрия и мальтодекстринов SA2 или MD10 (весовое отношение белок : мальтодекстрин = 1 : 2) лиофильно высушивали, а затем полученный лиофилизат прогревали в течение 72 часов в условиях высокой влажности (79 %) и температуры (60 °С). Как ранее было показано, такие белок-полисахаридные ковалентные конъюгаты обладают улучшенными по сравнению с индивидуальными биополимерами функциональными свойствами (инкапсулирующей способностью по отношению к липофильным соединениям и растворимостью в водной среде в широком диапазоне pH) [265, 268].

Полученные ковалентные конъюгаты характеризовали по степени ковалентного связывания белка и мальтодекстринов (согласно п. 2.3.1), а также проводили оценку их физико-химических параметров в водных растворах (согласно п. 2.3.2–2.3.5).

2.1.3 Растительный антиоксидант

Эфирное масло бутонов гвоздики (ЭМГ) (99,9 % чистоты, *Eugenia caryophyllata* Thunb («Plant Lipids Ltd.», Индия)) было использовано для дополнительной стабилизации ПНЖК от окисления и деградации (4 % вес/объем к общему количеству липидов). Ниже представлена структурная формула эвгенола – основного компонента ЭМГ (Рисунок 12).

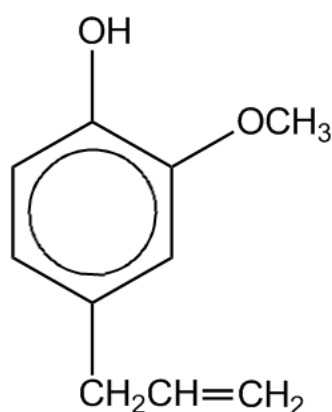


Рисунок 12 – Структурная формула эвгенола

ЭМГ было выбрано согласно результатами предварительных исследований, в которых была обнаружена его высокая эффективность в защите от окислительной деградации α-линоленовой (ω-3) и линолевой (ω-6) ПНЖК, входящих в состав льняного масла [269]. Так, методом газо-

жидкостной хроматографии было найдено, что после 50 дней хранения льняного масла на свету при комнатной температуре и в присутствии ЭМГ в нём сохранялось до 88 % линоленовой кислоты и до 96 % линолевой кислоты (в процентах относительно их содержания в свежем образце льняного масла), в то время как в контрольном образце льняного масла оставалось только 60 % и 78 % соответствующих ПНЖК [269]. Высокая антиоксидантная активность эфирного масла гвоздики была обусловлена присутствием производных соединений фенола, таких как эвгенол, тимол или карвакрол [269]. При этом, как правило, антиоксидантная активность эфирных масел оказывается выше, чем их индивидуальных компонентов благодаря их многокомпонентному составу [269, 270, 271].

2.1.4 Пищеварительные ферменты и их ингибиторы

Следующие пищеварительные ферменты и их ингибиторы использовали для моделирования условий переваривания комплексных частиц *in vitro*:

- α – амилаза (Тип VI-B, ≥ 10 единиц/мг тв. в-ва, A3176),
- Амилоглюкозидаза (≥ 300 единиц/мл, A7095);
- Пепсин (≥ 2500 единиц/мг, P7012);
- Ингибитор пепсина ($A \geq 100,000$ единиц/мг; 77170);
- α - химотрипсин (Тип II, ≥ 40 единиц/мг; C4129);

ингибитор трипсина и химотрипсина (1мг белка ингибирует $\geq 0,5$ мг трипсина с активностью $\sim 10,000$ ВАЕЕ единиц/мг или $\geq 1,0$ мг химотрипсина с активностью ~ 40 единиц/мг; T9777).

2.1.5 Наборы реактивов медицинского назначения

Следующие наборы реактивов медицинского назначения использовали для определения концентрации фосфолипидов, триглицеридов, глюкозы в растворах супрамолекулярных комплексов.

- *Phospholipids 17320* (Sentinel Diagnostics, Италия) - ферментативный колориметрический метод определения концентрации фосфолипидов (> 99 % чистоты).

Принцип метода (Рисунок 13): в присутствии фосфолипазы D происходит гидролиз фосфолипидов до холина и фосфатидной кислоты. Затем с помощью холиноксидазы холин окисляется до бетаина с одновременным получением перекиси водорода, которая, в свою очередь, под действием пероксидазы гидролизуется до хинонеминового красителя. Концентрацию ФХ или ЛФХ рассчитывали по интенсивности окрашенного соединения

(измеренной спектрофотометрически при 520 нм), используя в качестве контроля заранее подготовленный раствор соответствующего фосфолипида с известной концентрацией.

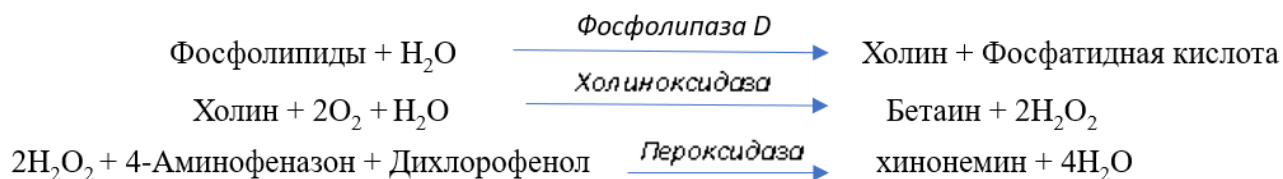


Рисунок 13 – Схема реакций ферментативного колориметрического метода определения фосфолипидов в водно-липидных дисперсиях.

- *Глюкоза-Ново В-8054* («Вектор-Бест», Россия) - ферментативный колориметрический метод определения концентрации глюкозы (> 99 % чистоты). Принцип метода аналогичен (Рисунок 14). Концентрацию глюкозы рассчитывали по интенсивности окрашенного соединения (измеренной спектрофотометрически при 510 нм), используя в качестве контроля образец калибратора по глюкозе из данного набора реагентов.

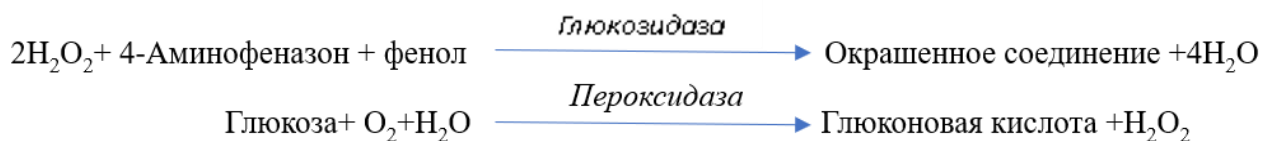


Рисунок 14 – Схема реакций ферментативного колориметрического метода определения глюкозы в водно-липидных дисперсиях.

- *Триглицериды-Ново В-8323* («Вектор-Бест», Россия) - ферментативный колориметрический метод определения концентрации триглицеридов (> 99 % чистоты). Принцип метода аналогичен (Рисунок 15). Концентрацию триглицеридов рассчитывали по интенсивности окрашенного соединения (измеренной спектрофотометрически в области 496-546 нм), используя в качестве контроля образец калибратора, содержащий глицерин, из данного набора реагентов.

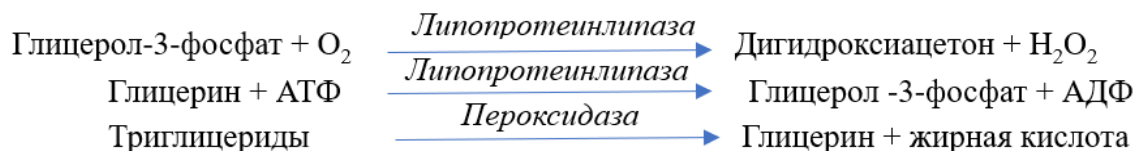


Рисунок 15 – Схема реакций ферментативного колориметрического метода определения триглицеридов в водно-липидных дисперсиях.

2.1.6 Химические реагенты

В исследованиях методом ЭПР использовали в качестве зонда 16-доксилстеариновую кислоту (810604P, Avanti Polar Lipids) (Рисунок 16).

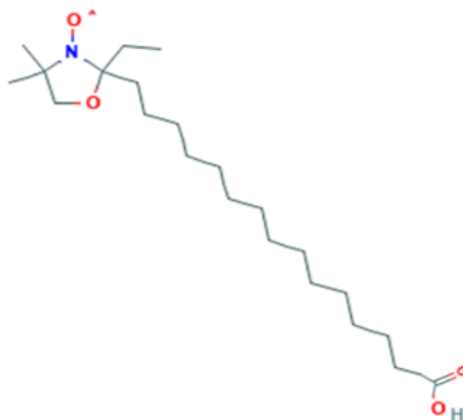


Рисунок 16 – Химическая структура 16-доксилстеариновой кислоты

Все используемые химические реагенты: Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , CuSO_4 , HCl , NaOH , этанол, диэтиловый эфир, азид натрия, тринитробензол сульфонат, лизин, додецил сульфат натрия, трихлоруксусная кислота, тиобарбитуровая кислота (ТБК) («Реахим», «Лаверна», Россия) характеризовались аналитической чистотой ($> 99\%$).

При приготовления всех водных растворов использовали бидистиллированную воду.

2.2 Методы приготовления исследуемых образцов

2.2.1 Растворы фосфолипидов в исследованиях бинарных систем

2.2.1.1 Водные растворы исходных липосом ФХ/ДПФХ (в присутствии этанола).

Необходимое количество ФХ растворяли в чистом этаноле.

Водные растворы ФХ (10^{-3} М; 0,078 вес/объем %; содержание 10 об/об % спирта) готовили путем смешивания спиртового раствора ФХ и чистого буфера (фосфатный буфер; рН 7,0 или 6,0; ионная сила $I = 0,001$ М) с использованием магнитной мешалки в течение одного часа.

Удаление спирта из растворов ФХ проводили с помощью равновесного диализа (диализная трубка Visking Dialysis Tubing (Тип 36/32) Serva) до достижения равновесия (через 24 часа, соотношение объемов растворов во внешнем сосуде и в диализной трубке (гидромодуль) = 20). Предварительный анализ показал отсутствие пропускания молекул ФХ через используемые

диализные трубки. Остаточное количество спирта в растворах ФХ соответствовало не более 0,5 об/об %.

2.2.1.2 Водные растворы исходных мицелл ЛФХ.

Для приготовления водных растворов исходных мицелл ЛФХ (10^{-3} М; 0,051 вес/объем %) расчётное количество ЛФХ смешивали с соответствующим буферным раствором (фосфатный буфер; рН 7,0; $I = 0,001$ М) на магнитной мешалке. Согласно литературным данным, эта концентрация находится выше области ККМ для ЛФХ, поэтому при $C = 10^{-3}$ М формируются мицеллы или мицеллярные агрегаты ЛФХ [272, 273].

2.2.2 Растворы и дисперсии бинарных смесей липидов в исследованиях тройных систем

2.2.2.1 Растворы исходных липосом ФХ/ДПФХ или мицелл ЛФХ (без этанола).

Расчётное количество ФХ, ДПФХ или ЛФХ смешивали с соответствующим буферным раствором (фосфатный буфер; рН 7,0; $I = 0,001$ М) на магнитной мешалке. Полученную фосфолипидную дисперсию подвергали механической гомогенизации при 22,000 об/мин (Heidolph, Германия) в течение 2 минут и далее обрабатывали ультразвуком (VCX-130, Sonics & Materials, США) во льду (3 раза по 5 минут (в режиме 30 сек обработка/30 сек перерыв)). Подготовленные таким образом растворы фосфолипидов пропускали через мембранные фильтры (с размером пор 100 нм), используя экструдер Avanti Polar Lipid Extruder, США.

Для получения липосом ФХ/ДПФХ с добавлением эфирного масла гвоздики (ЭМГ) (4 вес/вес % к количеству ФХ/ДПФХ) необходимое количество ЭМГ растворяли в 25 мкл этилового спирта и затем смешивали этот раствор с водной дисперсией ФХ/ДПФХ, подготовленной для гомогенизаций и экструзии через мембранный фильтр.

2.2.2.2 Растворы *обогащённых* липосом ФХ/ДПФХ или мицелл ЛФХ (в присутствии этанола).

Необходимое количество липидов (в отсутствие или с добавлением ЭМГ в количестве 4 вес/вес % к общему количеству липидов), комбинации которых были подобраны в соответствии с эквивалентным содержанием $\omega-6 : \omega-3$ ПНЖК (ФХ–АЛК, ФХ–ЛМ, ФХ–АЛК–ЭМГ, ФХ–ЛМ–ЭМГ, ЛФХ–АЛК, ЛФХ–ЛМ, ДПФХ–АЛК, ДПФХ–ЛМ, ДПФХ–АЛК–ЭМГ, ДПФХ–ЛМ–ЭМГ), растворяли в этаноле или непосредственно в буфере (как в случае фосфолипидов ЛФХ/ДПФХ), и затем смешивали с фосфатным буфером (рН = 7,0; $I = 0,001$ М). Конечная концентрация этанола в растворах составляла 50 объём/объём %. Затем эти растворы подвергали механической гомогенизации при 22,000 об/мин (Heidolph, Германия) в течение 2 минут и далее обрабатывали ультразвуком (VCX-130, Sonics & Materials, США) во

льду (3 раза по 5 минут (в режиме 30 сек обработка/30 сек перерыв)). Далее подготовленные водно-спиртовые растворы пропускали через мембранный фильтр (с размером пор 100 нм), используя экструдер Avanti Polar Lipid Extruder, США. Затем из полученных водно-спиртовых растворов *обогащённых* мицелл ФХ удаляли этанол с помощью равновесного диализа (Visking Dialysis Tubing (Type 36/32), Serva). Для этого исследуемые растворы помещали в диализную трубку и выдерживали в течение 24 часов против 20-кратного объёма чистого фосфатного буфера (рН = 7,0; I = 0,001 М).

2.2.2.3 Водно-липидная дисперсия индивидуальных жирных кислот АЛК–ЛК (в присутствии этанола).

Необходимое равное количество АЛК и ЛК растворяли в чистом этаноле. Водную дисперсию смеси липидов АЛК–ЛК (10^{-3} М, содержание 10 об/об % спирта) готовили путем разведения спиртового раствора АЛК–ЛК с фосфатным буфером (рН 7,0; ионная сила I = 0,001 М) с использованием магнитной мешалки в течение одного часа. Удаление спирта из водно-липидной дисперсии АЛК–ЛК проводили с помощью равновесного диализа (диализная трубка Visking Dialysis Tubing (Тип 36/32) Serva) до достижения равновесия (через 24 часа, соотношение объёмов растворов во внешнем сосуде и в диализной трубке (гидромодуль) = 20. Предварительный анализ показал отсутствие пропускания молекул АЛК и ЛК через используемые диализные трубки. Остаточное количество спирта в растворах ФХ не превышало 0,5 объём/объём %.

2.2.3 Растворы биополимеров

Расчётное количество порошков белка (Б), мальтодекстринов (как SA2, так и MD10), декстран сульфата (ДС) или ковалентных конъюгатов (Кон_М, Кон_С) растворяли в фосфатном буфере (рН = 7,0; I = 0,001 М).

Растворы мальтодекстринов и конъюгатов дополнительно прогревали при 85 °С в течение 5 мин для полного растворения образцов и затем охлаждали до комнатной температуры.

Для достижения полного растворения биополимеров их растворы оставляли на ночь. Небольшую нерастворимую часть в образцах биополимеров удаляли при помощи центрифугирования (1800 g = 4000 об/мин, 30 мин, 20 °С). После этого контролировали концентрацию белка, мальтодекстринов и ковалентных конъюгатов в супернатанте, используя дифференциальный рефрактометр (Shimadzu, Япония), на основании ранее определённых для них значений инкрементов показателя преломления $\nu = 0,20 \times 10^{-3}$ м³/кг, $0,15 \times 10^{-3}$ м³/кг, и $0,17 \times 10^{-3}$ м³/кг, соответственно.

Кроме этого, концентрацию биополимеров в растворах дополнительно контролировали по методу определения сухого остатка после высушивания растворов биополимеров при 105 °С до постоянного веса (в расчётах учитывался вклад буфера).

Дополнительно, для определения концентрации белка использовали *метод Биурета* (реакция на пептидную связь; сине-фиолетовое окрашивание в растворе белка при добавлении реактива) [274]. Для приготовления реактива Биурета к 50 мл 30 % вес/объём раствора NaOH (охлаждённого в холодильнике) при интенсивном перемешивании добавили 0,7 мл 20 % раствора CuSO₄. Проведение измерений: 0,5 мл раствора образца разбавляли 2,5 мл буфера и смешивали с 1,5 мл биуретового реактива. Через 15 минут измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре (СФ 2000, ОКБ Спектр, Россия) при длине волны $\lambda = 310$ нм против раствора сравнения – 1 мл буфера с добавлением 0,5 мл биуретового реактива.

Готовые растворы белка хранили в холодильной камере при температуре 8 °С, а растворы мальтодекстринов и ковалентных конъюгатов – при комнатной температуре.

2.2.4 Растворы супрамолекулярных комплексов, содержащих биологически активные липиды и биополимеры

2.2.4.1 Супрамолекулярные комплексы, содержащие биологически активные липиды (фосфолипиды или бинарные смеси липидов) и ковалентные конъюгаты.

Подготовленные растворы фосфолипидов или водно-липидные дисперсии (а именно: ФХ, ЛФХ, ФХ–АЛК, ЛФХ–АЛК, ФХ–ЛМ, ЛФХ–ЛМ, ФХ–АЛК–ЭМГ, ФХ–ЛМ–ЭМГ, АЛК–ЛК, ДПФХ–АЛК, ДПФХ–ЛМ, ДПФХ–АЛК–ЭМГ, ДПФХ–ЛМ–ЭМГ) в выбранных комбинациях («Методы», часть 2.2.1, 2.2.2) смешивали с растворами изучаемых биополимеров (Кон_М, Кон_С) («Методы», часть 2.2.3) и перемешивали в шейкере (GFL 3032, Германия) при 40 °С в течение 1 часа, инициируя самопроизвольное комплексообразование. Пример получения комплексов, включающих бинарные смеси биологически активных липидов и ковалентные конъюгаты, представлен на Рисунке 17.

Концентрации компонентов в исходных образцах двойных систем (Главы 3.1, 3.2) в общем случае соответствовали: $C_{ФХ} = 1 \times 10^{-3}$ М (0,078 вес/объём %), $C_{ЛФХ} = 1 \times 10^{-3}$ М (0,051 вес/объём %), $C_{КонС} = 3$ вес/ объём %, $C_{КонМ} = 3$ вес/ объём %.

В исследованиях тройных систем (Глава 4.1) концентрации компонентов подбирались исходя из весового соотношения липиды : конъюгат = 1 : 10. В исследованиях биодоступности тройных систем (Глава 4.2) весовое соотношение липиды : конъюгат составило 1 : 5.

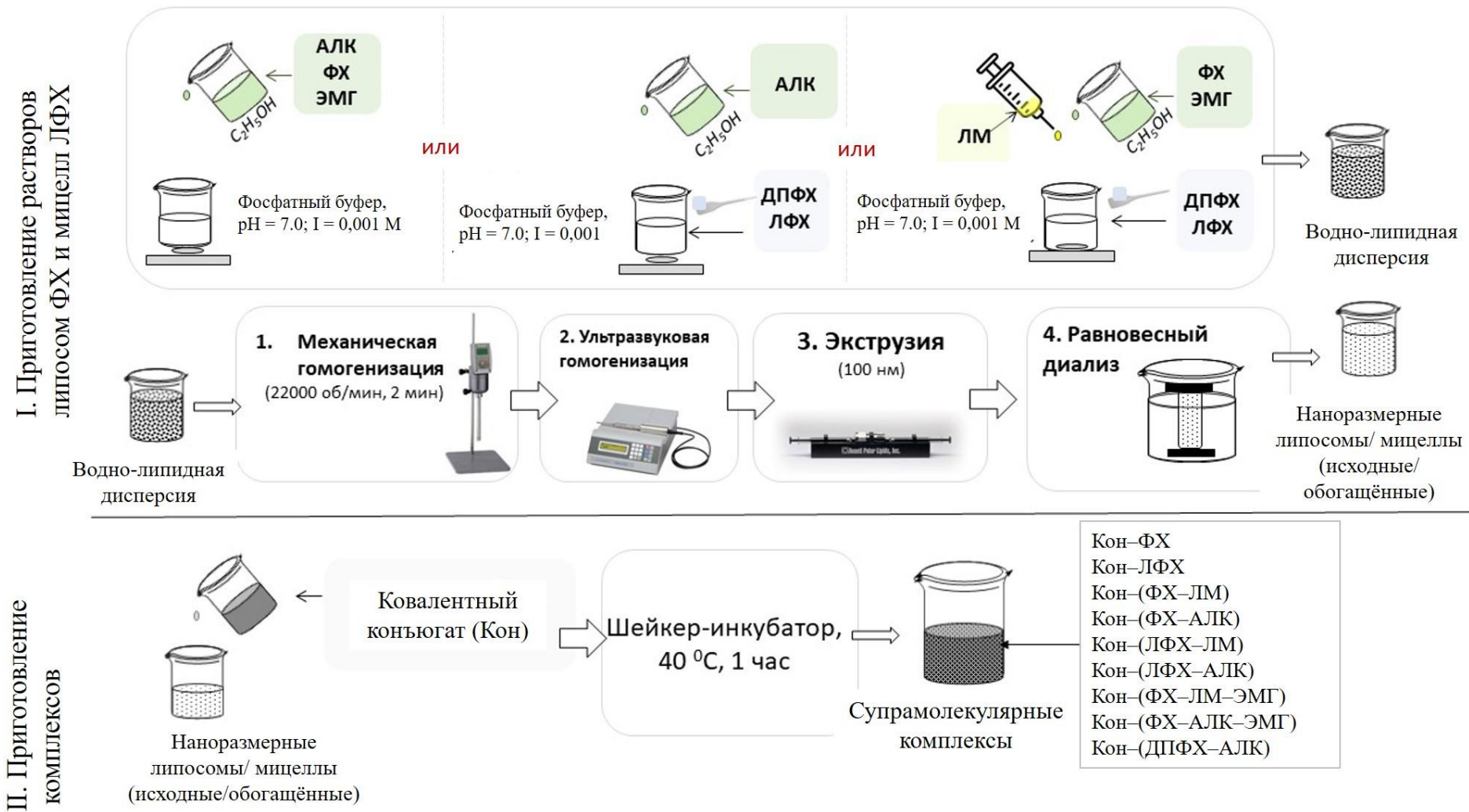


Рисунок 17 – Схема приготовления супрамолекулярных комплексов, включающих биологически активные липиды (фосфолипиды или бинарные смеси липидов) и ковалентные конъюгаты

При этом соотношение $\omega-3 : \omega-6$ ПНЖК = 1 : 1 сохранялось для всех случаев *обогащённых* липосом ФХ или мицелл ЛФХ, бинарной смеси АЛК–ЛК и их комплексов с конъюгатом КонS (Главы 4.1; 4.2).

В исследованиях ДСК (п. 3.1.4, п. 4.1.4) концентрация конъюгата составляла $C_{\text{конS}} = 0,5$ вес/вес % (при этом весовые соотношения липидов в комбинациях ДПФХ – АЛК, ДПФХ – ЛМ были аналогичны соотношениям для комбинаций ФХ – АЛК, ФХ – ЛМ).

Растворителем для всех исходных исследуемых образцов был фосфатный буфер (pH = 7,0; I = 0,001 M). Во всех случаях в качестве антимикробного агента использовали азид натрия (1 %).

2.2.4.2 Приготовление супрамолекулярного комплекса, содержащего липосомы ФХ, казеинат натрия и декстран сульфат (ДС).

Для формирования комплекса [Б–ФХ]–ДС, стабилизированного электростатическими взаимодействиями, сначала готовили супрамолекулярный комплекс, включающий фосфатидилхолин и казеинат натрия (по методу, описанному в п. 2.2.4.1), а затем полученный раствор смешивали с раствором ДС и дополнительно выдерживали в шейкере при 40⁰ C в течение 1 часа (pH = 6,0; I = 0,001 M). При необходимости готовые растворы комплексов подвергали равновесному диализу (Visking Dialysis Tubing (Type 36/32), Serva) для удаления остаточных количеств этанола, который мог присутствовать в растворах биологически активных липидов. Конечные концентрации компонентов в исследуемом образце составили: $C_{\text{ФХ}} = 10^{-3}$ M (0,156 вес/объём %), $C_{\text{Б}} = 1$ вес/ объём %, $C_{\text{ДС}} = 2$ вес/ объём %.

Условные обозначения, используемые для описания исследуемых образцов растворов, дополнительно приведены в Приложении Г.

2.3 Методы оценки структурных и термодинамических параметров биополимеров, биологически активных липидов и их комплексов

2.3.1 Оценка степени ковалентного связывания белка и мальтодекстринов в ковалентных конъюгатах

Степень ковалентного связывания белка и мальтодекстринов в ковалентных конъюгатах оценивали по количеству доступных аминогрупп лизина в белке [268]. Для этого к исследуемому образцу раствора ковалентного конъюгата (2 мл; гидрокарбонатный буфер; pH = 8,5) добавляли тринитробензол сульфонат (1 мл, 0,02 %) и выдерживали на водяной бане ($t = 40$ °C, 2 часа). Затем для остановки реакции добавляли додецилсульфат натрия (1 мл; 1 % вес/объем) и соляную кислоту (0,5 мл; 0,1 M). Концентрацию трифенил лизина определяли по интенсивности приобретенной желтой окраски исследуемых образцов (спектрофотометр Beckman DU-70,

поглощение при 340 нм). Количество доступных групп лизина рассчитывали по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций лизина в растворе.

Процентные изменения в концентрации доступных аминокрупп белка в конъюгатах относительно казеината натрия (100 % доступных аминокрупп) были рассчитаны с учётом концентрации белка в конъюгате (определённой методом Биурета). Далее проводили расчёт среднего числа недоступных групп лизина на усреднённую молекулу казеина (24 кДа) [100; 216]. При этом принимали во внимание как первичную последовательность аминокислот в индивидуальных казеинах (13 остатков лизина (Lys) в α_{S1} -казеине; 21 Lys в α_{S2} -казеине; 12 Lys в β -казеине; и 9 Lys в κ -казеине) [216, 274], так и количественное соотношение индивидуальных казеинов в казеинате натрия (38 % α_{S1} -casein, 10 % α_{S2} -casein, 36 % β -casein and 13 % κ -casein) [274]: $0,38 (13) + 0,10 (21) + 0,36 (12) + 0,13 (9) = 12,53$.

2.3.2 Определение структурных и термодинамических параметров изучаемых образцов комбинацией методов статического и динамического многоугольного лазерного светорассеяния

Средневесовая молярная масса, M_w ($M_w = \sum_i w_i M_i$, где w_i – весовая доля i – фракции полимера, а M_i – молярная масса i – фракции полимера [251], **радиус инерции, R_G** ($R_G^2 = 1/N \sum_i r_i^2$, где r_i – расстояние от всех мономерных единиц полимерной молекулы до центра масс молекулы, а N – число мономерных единиц в полимерной молекуле) [251, 275] и **второй вириальный коэффициент, A_2** , для биополимеров и их комплексов с биологически активными липидами были определены в их обеспыленных водных растворах (как минимум 5 – 8 точек по концентрации) с помощью статического многоугольного лазерного светорассеяния. Отношение Релея, R_θ , ($R_\theta = (I_\theta/I_0) r^2$, где I_θ и I_0 – интенсивность света, рассеянного под углом θ , и падающего света, соответственно; r^2 – это расстояние от центра рассеивающего объёма до детектора) для каждой концентрации исследуемых образцов было измерено с использованием вертикально поляризованного света (633 нм; He-Ne-лазер) при различных углах светорассеяния в диапазоне от 40° до 140° (13 углов) с использованием прибора лазерного многоугольного светорассеяния «ЗАО Научные приборы» ЛС-01 (Санкт-Петербург, Россия), откалиброванного по обеспыленному бензолу ($R_{90} = 11,84 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$).

При приготовлении концентрационной серии растворов образцов для измерений использовали буфер, обеспыленный через мембранный фильтр («Millipore», США) с размером пор 0,22 мкм. Далее исследуемые образцы обеспыливали с помощью мембран (Millipore) с размером пор 0,8 μm . При этом проверка концентрации исследуемых образцов в растворах до и после фильтрования (используя известные инкременты показателей преломления исследуемых образцов) показала, что потери вещества не превышали 5 %.

Все измерения проводили в термостатируемой ячейке при $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

Измеренные величины R_θ были использованы для графического построения зависимостей $(HC/\Delta R_\theta)^{1/2}$ от угла рассеяния (θ) и от концентрации (C) согласно методу Берри [100;275]:

$$\left(\frac{HC}{\Delta R_\theta}\right)^{1/2} = \left(\frac{1}{M_w}\right)^{1/2} \times \left[1 + \frac{1}{6}(R_G q)^2\right] + A_2 M_w^{1/2} C, \quad (1)$$

где H – оптическая константа, $H = 4\pi^2 n^2 v^2 / N_A \lambda_0^4$, где n – показатель преломления растворителя, v – инкремент показателя преломления биополимеров и их комплексов с липидами, N_A – число Авогадро, λ_0 – длина волны падающего света в вакууме;

C – это концентрация биополимеров или их комплексов с липидами (г/мл);

ΔR_θ – избыточное рассеянием света раствором биополимеров или комплексов, по отношению к светорассеянию чистым растворителем при угле измерения θ ;

M_w – средневесовая молярная масса;

R_G – радиус инерции;

q – волновой вектор рассеяния, $q = (4\pi/\lambda_0)\sin(\theta/2)$, где θ – угол рассеяния;

A_2 – второй вириальный коэффициент (весовая шкала).

Здесь следует отметить, что значения инкрементов показателя преломления, для комплексных частиц, сформированных при выбранных концентрациях биополимеров и биологически активных липидов/эфирного масла гвоздики, в пределах ошибки опыта ($\pm 10\%$), не отличались от значений, полученных для исходных биополимеров ($v_{\text{белка}} = 0,20 \times 10^{-3} \text{ м}^3/\text{кг}$; $v_{\text{кониюгата}} = 0,17 \times 10^{-3} \text{ м}^3/\text{кг}$).

Значения средневесовой молярной массы (M_w) были определены как средние величины, рассчитанные в точках пересечения с осью ординат концентрационных зависимостей $(HC/\Delta R_\theta)^{1/2}$ при $\theta \rightarrow 0$ (экстраполяция проведена по 13 углам) и угловых зависимостей $(HC/\Delta R_\theta)^{1/2}$ при $C \rightarrow 0$ (экстраполяция проведена по 5–8 концентрациям) для каждой изученной системы. Значения радиуса инерции (R_G) определялись из тангенса угла наклона угловой зависимости $(HC/\Delta R_\theta)^{1/2}$ при $C \rightarrow 0$. Значения второго вириального коэффициента (A_2) определялись из тангенса угла наклона концентрационных зависимостей $(HC/\Delta R_\theta)^{1/2}$ при $\theta \rightarrow 0$.

Здесь важно уточнить, что второй вириальный коэффициент в разложении химических потенциалов биополимерных частиц и растворителя по концентрациям [251, 276, 277] характеризует термодинамическое сродство молекул полимеров к друг другу и к растворителю (в нашем случае – к буферному раствору) (Уравнения 2, 3).

$$\mu_1 = \mu_1^0 - (RT/m_1) \times (m_2 + \frac{1}{2} A_2^* m_2^2), \quad (2)$$

$$\mu_2 = \mu_2^0 + RT [\ln(m_2/m^0) + A_2^* m_2], \quad (3)$$

где μ_i^0 и m_i – стандартный химический потенциал и концентрация (моляльная) i -компонента ($i = 1$ для растворителя, $i = 2$ для биополимера);

A_2^* – молярный второй вириальный коэффициент (моляльная шкала, $\text{м}^3/\text{моль}^{-1}$);

m^0 – моляльность биополимера в стандартном состоянии. Так, если $A_2 < 0$, то взаимодействия полимер-полимер более термодинамически благоприятны по сравнению с взаимодействиями полимер-растворитель, и таким образом растворитель является термодинамически плохим. И, напротив, если $A_2 > 0$, то взаимодействия полимер-полимер термодинамически менее благоприятны, чем взаимодействия полимер-растворитель, и растворитель – термодинамически хороший, если $A_2 = 0$, то растворитель является термодинамически идеальным (т.е. все виды парных взаимодействий в растворе являются термодинамически идентичными) [251, 276, 277].

Таким образом, при проведении измерений в водной среде величина второго вириального коэффициента косвенным образом даёт нам представление о гидрофобности/гидрофильности поверхности молекулы биополимера.

Значения M_w , A_2 и R_G , приводимые в данной работе, являются средними значениями по крайней мере двух повторов каждого эксперимента. Ошибка метода при определении M_w и A_2 составляет $\pm 10\%$. Ошибка метода в определении R_G составляет $\pm 5\%$.

Значения **гидродинамического радиуса, R_h** , для исходных и *обогащённых* липосом ФХ и мицелл ЛФХ, а также биополимеров и их комплексов с биологически активными липидами в отсутствие и в присутствии эфирного масла гвоздики были получены в водных буферных растворах методом динамического лазерного светорассеяния при $25\text{ }^\circ\text{C}$. Временная корреляционная функция интенсивности светорассеяния от изучаемых образцов, зависящая от их коэффициента диффузии (D) в водной среде, была измерена при $\theta = 90^\circ$, используя аппарат ЛС-01 (вертикально поляризованный свет, $\lambda = 633\text{ нм}$) (ЗАО Научные приборы, Санкт-Петербург, Россия). Здесь важно отметить, что коэффициент диффузии, D , связан с гидродинамическим радиусом, R_h , в соответствии с формулой Эйнштейна-Стокса [251, 275]:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}, \quad (4)$$

где k – постоянная Больцмана;

T – температура (К);

η – вязкость среды.

Для определения гидродинамического радиуса из временной корреляционной функции использовали специальную программу (DYNALS Release 1.5, все права защищены А. Голдинг (A. Golding) и Н. Сидоренко (N. Sidorenko)). Ошибка измерений при определении гидродинамического радиуса R_h (на основании не менее 10 повторений) не превышала 10 %.

При помощи комбинации методов статического и динамического лазерного светорассеяния были дополнительно оценены:

(1) *архитектура частиц, ρ* исходных биополимеров и их комплексов с биологически активными липидами. Об определённой архитектуре изучаемых частиц свидетельствовали значения структурно-чувствительного параметра $\rho = R_G/R_h$. Большое число экспериментальных работ успешно использовали данный параметр для достоверной, т.е. подтверждённой другими методами, характеристики архитектуры индивидуальных макромолекул и их агрегатов [275, 278- 281].

(2) *плотность, d* , изучаемых частиц, которая была рассчитана по следующему уравнению [282]:

$$d = M_w/(N_A V), \quad (5)$$

где M_w – средневесовая молярная масса частицы;

N_A – число Авогадро;

V – объем частицы. Если архитектура частиц может быть аппроксимирована сферой, то в этом случае $V = 4/3\pi R_G^3$, где R_G – это радиус инерции частицы.

В случае, если архитектура частиц аппроксимирована стержнем, то $V = 2\pi R_h^2 R_G$, где R_G – это радиус инерции частицы, R_h – гидродинамический радиус.

(3) *молярный второй вириальный коэффициент, A_2^* ($\text{м}^3\text{моль}^{-1}$)*, рассчитанный из весового, A_2 ($\text{м}^3\text{моль}^{-1}\text{кг}^{-2}$) по уравнению [27]:

$$A_2^* = 2 A_2 M_w^2/1000, \quad (6)$$

где M_w – средневесовая молярная масса частицы.

Здесь важно отметить, что преимуществом метода светорассеяния перед другими методами определения второго вириального коэффициента является возможность одновременного определения в одном эксперименте A_2 и структурных параметров изучаемых частиц (M_w , R_G , ρ). Знание структурных параметров позволяет оценить вклад эффектов исключенного объема в

величину второго вириального коэффициента, $A_2^{\text{искл}}$, а значит и в интенсивность парных взаимодействий между изучаемыми полимерными частицами в водной среде [100, 277, 282].

(4) *эффекты исключённого объёма*, $A_2^{\text{искл}}$, сопровождающиеся взаимным отталкиванием частиц, связаны с невозможностью пребывания двух разных полимерных частиц в одном и том же объёме из-за термодинамически неблагоприятного перекрытия электронных облаков атомов, составляющих их молекулы [100]. Например, в случае сферических полимерных частиц ($1 < \rho < 2$) можно использовать простой случай парных взаимодействий твердых сфер и рассчитать $A_2^{\text{искл}}$ по следующим уравнениям [251]:

$$A_2^{\text{искл}} = 10^{-3} 4\pi N_A / 3 (2 R_h)^3, \quad (7)$$

где R_h - радиус эквивалентной твердой сферы, представляющей собой частицу полимера, выраженный через гидродинамический радиус. Эквивалентная твердая сфера – это пространство, заполняемое частицей полимера в растворе, которое оказывается абсолютно недоступным, как для других частиц биополимера, так и для молекул растворителя;

$$A_2^{\text{искл}} = 10^{-3} \pi N_A (2R_h)^2 L, \quad (8)$$

где L – длина частицы, представляющая собой цилиндры/твёрдые стержни (при значениях структурно-чувствительного параметра биополимерных частиц $\rho \gg 2$), при этом $L = 2R_G$;

R_h – радиус основания цилиндра, за который принимают гидродинамический радиус [283].

(5) **общий вклад всех других типов взаимодействий** в величину A_2^* (иными словами, характер и интенсивность парных взаимодействий полимерных частиц) рассчитывали по разнице между полученными A_2^* и $A_2^{\text{искл}}$:

$$A_2^* - A_2^{\text{искл}} = A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вод}} + A_2^{\text{гидр}}, \quad (9)$$

где $A_2^{\text{эл}}$ - электростатическое отталкивание;

$A_2^{\text{вод}}$ - формирование водородных связей;

$A_2^{\text{гидр}}$ - гидрофобное притяжение.

2.3.3 Вискозиметрия разбавленных растворов биополимеров и их комплексов с биологически активными липидами

Измерения характеристической вязкости, $[\eta]$, исходных биополимеров и их комплексов с биологически активными липидами проводили при $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$, используя капиллярный вискозиметр Убеллоде с диаметром капилляра = 0,54 мм. Серию исследуемых растворов определенной концентрации (не более 0,5 % по биополимеру) разбавляли соответствующим буфером.

Значения характеристической вязкости $[\eta]$ рассчитывали из интерсепта концентрационной зависимости приведённой вязкости $\eta_{\text{уд}}/c$ при $c_{\text{образца}} \rightarrow 0$, по уравнению Хаггинса:

$$\frac{\eta_{\text{уд}}}{c} = [\eta] + \lambda_l [\eta]^2 c, \quad (10)$$

где $\eta_{\text{уд}}$ – удельная вязкость, которая определяется, как $\eta_{\text{уд}} = (\eta_r - 1)$, где, η_r – относительная вязкость биополимеров в растворе,

$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_s}$, η – вязкость раствора полимера и η_s – вязкость чистого буферного раствора (т.е. растворителя),

λ_l – константа Хаггинса. При проведении измерений величины η и η_s аппроксимируют временами протекания растворов: $t_{\text{раствор}} \cong \eta$ и $t_{\text{растворитель}} \cong \eta_s$.

Ошибка измерений, при условии не менее двух повторов, не превышала 15 %.

2.3.4 Измерение ζ - потенциала биологически активных липидов, биополимеров и их комплексов в фосфатном буфере

Определение электрофоретической подвижности образцов биологически активных липидов, биополимеров и их комплексов проводили с помощью прибора Zetasizer Nano ZS Malvern (UK), откалиброванного по стандартной латексной дисперсии. Ошибка опыта при измерениях ζ - потенциала (не менее 10 повторов) не превышала 10 %.

2.3.5 Определение термодинамических параметров и функций фазового перехода в бислое модельных липосом ДПФХ методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Измерение термодинамических параметров и функций фазового перехода в бислое липосом ДПФХ проводили с помощью высокочувствительного дифференциального калориметра (ДСК) ДАСМ-4 М (Пушино, Россия). Измерения проводили в диапазоне температуры от 20 до 60 °С при постоянном давлении 2,5 атм. Скорость нагрева соответствовала 0,5 °С/мин для всех измерений. Точность измерений составила ~10 % от значения измеряемой теплоемкости. Тепловой поток измерялся с точностью $\pm 0,1$ Дж/с. Термограммы для исследованных образцов были получены путем вычитания соответствующей термограммы буфера из термограммы образца, используя программное обеспечение от производителя (WSCAL (разработчик А. Сенин, г. Пушино)). В качестве температуры фазового перехода от гелевой структуры к жидкокристаллической, $t_{\text{переход}}$, в бислоях липосом ДПФХ принималась температура максимума на тепловом пике термограммы, отражающей зависимость кажущейся теплоемкости, ΔC_p , от температуры.

Термодинамические параметры ($t_{\text{переход}}$, $\Delta t_{1/2}$ (ширина калориметрического перехода на половине высоты теплового пика), $h_{\text{пик}}$ (высота пика)) и энтальпия ($\Delta H_{\text{переход}}$) фазового перехода были найдены, используя программное обеспечение Origin-Pro8. Ошибка опыта при определении этих величин, основанных на не менее чем на 2 повторных измерениях, не превышала 5 %.

2.3.6 Изучение структурного состояния бислоев липосом ФХ и мицелл ЛФХ методом электронно-парамагнитного резонанса

Структурное состояние бислоев липосом ФХ и мицелл ЛФХ (исходных/обогащённых в свободном состоянии и в составе комплексов с ковалентным конъюгатом) было изучено методом электронно-парамагнитного резонанса ЭПР с использованием спинового зонда 16-доксилстеариновой кислоты (16-ДСА), локализующегося в гидрофобных областях на глубине липидного бислоя примерно 20 Å⁰. Измерения проводили на радиоспектрометре Bruker EMX (Германия).

Микровязкость липидов оценивалась по времени *вращательной корреляции*, τ_c , зонда 16-ДСА по формуле для быстровращающихся зондов:

$$\tau_c = 6,65 \cdot \Delta H_+ \left(\sqrt{\frac{I_+}{I_-}} - 1 \right) \cdot 10^{-10} \quad (11)$$

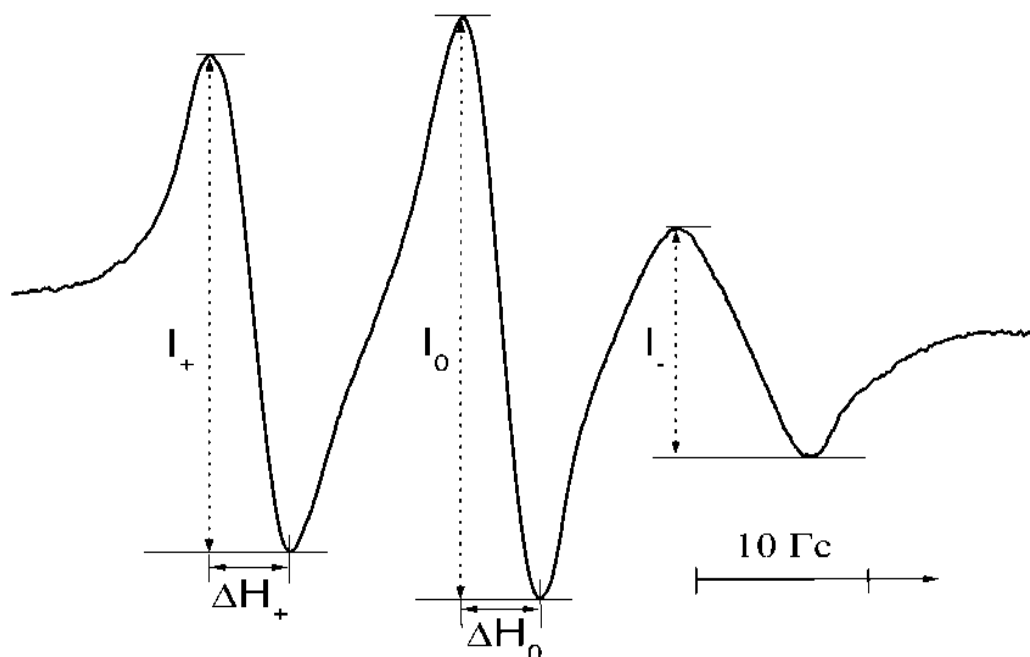


Рисунок 18 – Типичный спектр ЭПР зонда 16-ДСА в изученных образцах

Ошибка измерений методом спинового зонда составляет $\pm 2\%$. Расчет параметров и коррекция спектров ЭПР производились по компьютерной программе Bruker WIN-EPR с использованием подпрограммы SYMFONIA.

2.3.7 Оценка размеров липосом ФХ методом атомно-силовой микроскопии

С помощью метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) был определен рельеф поверхности (и далее рассчитаны размеры (площадь сечения (S), объём (V) и высота (Z)), а также визуализирована форма частиц) липосом ФХ (исходных/обогащённых).

Принцип работы атомно-силового микроскопа основан на регистрации силового взаимодействия между поверхностью образца и зондом. В качестве зонда используется наноразмерное остриё, располагающееся на конце упругой консоли, называемой кантилевером. Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли. Появление возвышенностей или впадин под остриём приводит к изменению силы, действующей на зонд, а значит, и к изменению величины изгиба кантилевера. Таким образом, регистрируя величину изгиба кантилевера, можно сделать вывод о рельефе поверхности. Для регистрации изменения величины изгиба кантилевера на его внешнюю поверхность направляется луч лазера, который после отражения попадает в фотодетектор.

Для исследования образцов с малой механической жесткостью, таких как биологические объекты, в АСМ используется полуконтактный режим [284]. Кантилевер колеблется с

определенной частотой, при этом зонд касается образца только в нижнем полупериоде колебаний. Сила, действующая со стороны поверхности, приводит к сдвигу амплитудно-частотной и фазово-частотной характеристик колебаний зонда, что позволяет анализировать поверхность, не повреждая ее.

В АСМ-изображения изучаемых образцов были получены с помощью атомно-силового микроскопа SOLVER P47 (SMENA, NT-MDT, Россия), в полуконтактном режиме на частоте колебаний 150 кгц, с использованием кантилевера NSG 11. Измерения производили с использованием воздушно высушенных пленок образцов, которые готовили следующим образом: (1) изучаемые образцы перед измерением подвергали равновесному диализу (Visking Dialysis Tubing (Type 36/32), Serva) против бидистиллированной воды (рН 7,0); (2) затем тонкие слои водной суспензии образцов наносили на подложку из полированного кремния и высушивали на воздухе; (3) после воздушной сушки при комнатной температуре поверхность образца на подложке кратковременно промывали бидистиллированной водой и снова высушивали. Размер сканируемой области составлял 5×5 мкм. Для того чтобы увеличить статистическую точность общую площадь сканирования увеличивали до 15×15 мкм. Полученные АСМ-изображения обрабатывали с помощью программы NT-MDT Image Analysis V.2.2.0, позволяющей количественно оценивать размеры и форму частиц.

2.4 Методы оценки функциональных свойств биополимеров, биологически активных липидов и их комплексов

2.4.1 Оценка степени инкапсулирования липидов биополимерами

Количество связанных и свободных липидов (ФХ, АЛК, ЛК, ЛМ или их комбинаций) в комплексе с биополимерами определяли спектрофотометрически (Beckman (DU-70, США) и СФ- 2000 (ОКБ Спектр, Россия)) по поглощению света (по величине оптической плотности D_λ) при 215 нм в слое диэтилового эфира, экстрагирующего липиды из водных растворов или дисперсий. Для этого к 5 мл образцов водно-липидных дисперсий (исходных/обогащённых липосом ФХ, мицелл ЛФХ или смеси АЛК–ЛК) или приготовленных на их основе комплексов липидов с биополимерами добавляли 3 мл диэтилового эфира, медленно перемешивали, оставляли при комнатной температуре (в течение не менее 30 минут) и далее помещали в холодильную камеру на сутки при 7–8 °С. За 100 % «свободных» липидов было принято количество липидов, экстрагированное диэтиловым эфиром из неинкапсулированных дисперсий

липидов с заданной концентрацией и поглощающее определённое количество света (величина оптической плотности D_λ) при 215 нм.

Результаты, представленные в данной работе, являются усредненными значениями как минимум трех независимых экспериментов. Ошибка эксперимента не превышала 10 %.

В свою очередь, для определения количества ЛФХ, связанного с белок-содержащими биополимерами (белком и ковалентными конъюгатами, которые также поглощали свет в ультрафиолетовой области спектра, а именно, при 215 нм), предварительно было проведено высаливание комплексов таких биополимеров с ЛФХ с помощью сульфата аммония (4 М) и отделение получившегося осадка с помощью центрифугирования (4000 об/мин, 30 мин, и 20 °С). После этого в супернатанте определяли количество свободного ЛФХ по поглощению света при 215 нм спектрофотометрически (Beckman (DU-70, США) и СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия)). За 100 % «свободного» ЛФХ было принято заданное количество ЛФХ, поглощающее определённое количество света (величина D_λ) при 215 нм из раствора ЛФХ, но в отсутствие биополимеров. Результаты, представленные в данной работе, являются усредненными значениями как минимум трех независимых экспериментов. Ошибка эксперимента не превышала 5 %.

В дополнение к этому, количество связанных и свободных липидов (ФХ, ЛФХ, триглицеридов) в исследуемых растворах определяли ферментативным калориметрическим методом с использованием наборов медицинского назначения (*Phospholipids 17320* (Sentinel, Италия, для определения количества фосфолипидов) или *Триглицериды-Ново В-8323* (Вектор-Бест, Россия, для определения количества триглицеридов льняного масла (описание дано в части 2.1.5)). Для этого в исследуемые образцы добавляли реагент, в состав которого входила фосфолипаза или липопротеинлипаза, и выдерживали при 10 мин при $t = 37^\circ\text{C}$. Концентрацию фосфолипидов/триглицеридов рассчитывали по оптической плотности при 520 нм (Beckman (DU-70, США) и СФ-2000 (УКБ Спектр, Россия)) с учётом предварительно построенной калибровочной кривой по известным концентрациям растворов липосом ФХ, мицелл ЛФХ или водно-липидной дисперсии триглицеридов ЛМ.

2.4.2 Оценка перекисного окисления липидов с помощью спектрофотометрии

Оценку уровня перекисного окисления биологически активных липидов в исследуемых образцах проводили с помощью измерений количества первичных (гидроперекисей, кетодиенов) и вторичных (малонового диальдегида (МДА) продуктов перекисного окисления липидов [285, 286] (последовательность реакций при перекисном окислении липидов на примере α -линолевой кислоты представлена на Рисунке 19).

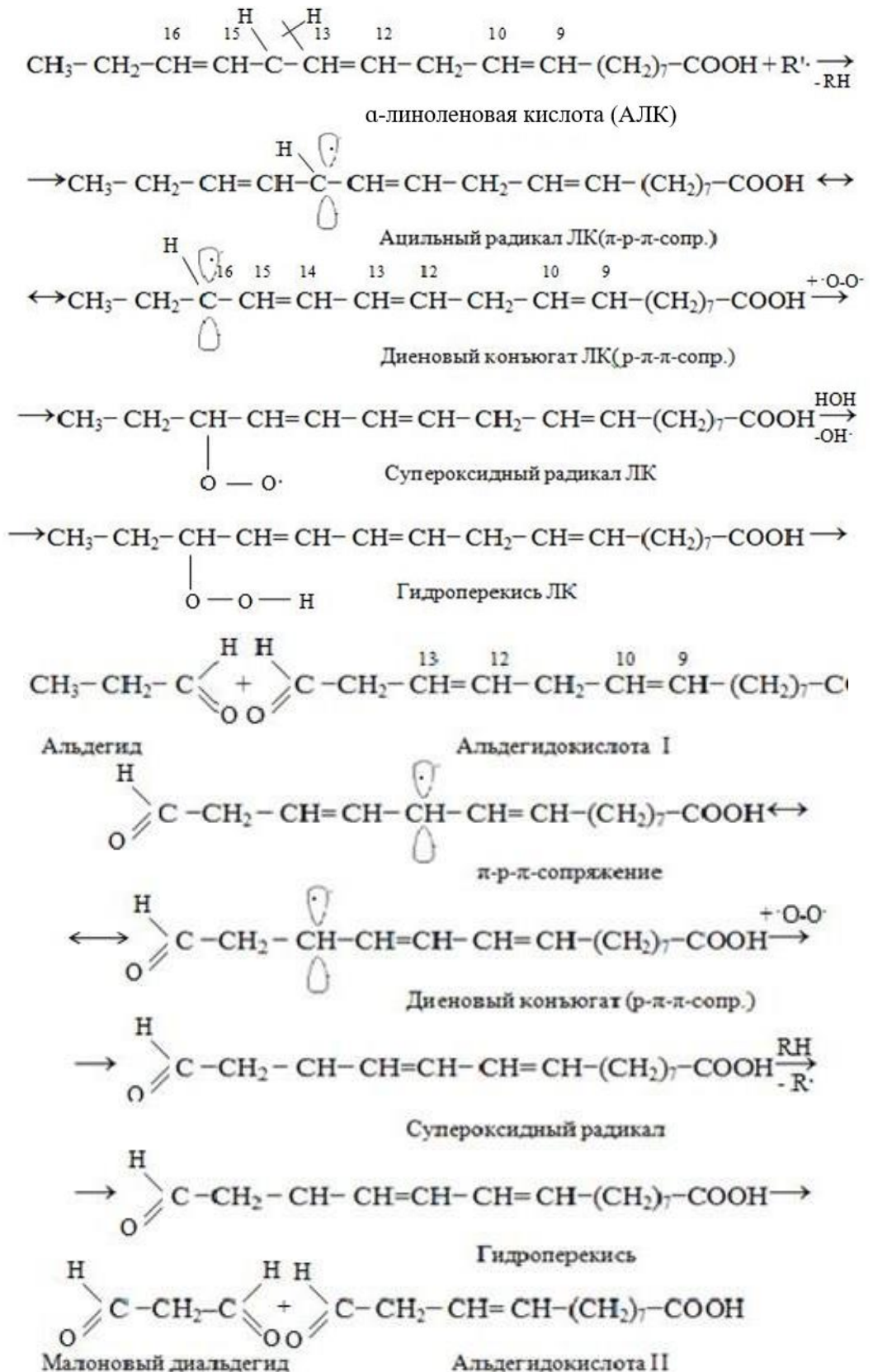


Рисунок 19 – Последовательность химических реакций при перекисном окислении липидов на примере α-линоленовой кислоты

В отдельных экспериментах (п. 3.1.6), чтобы ускорить процесс окисления и сократить продолжительность эксперимента к изучаемым образцам были добавлены ионы двухвалентной меди Cu^{+2} в низкой концентрации (10^{-5} М $CuSO_4$). Предварительные исследования показали, что такая концентрация ионов Cu^{+2} не оказывает влияния на свойства исследуемых образцов, однако приводит к значительному ускорению окисления ФХ и ЛФХ. В остальных экспериментах, с участием комбинаций различных по природе биологически активных липидов, для ускорения окисления исследуемые образцы прогревали при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа (имитируя процесс пастеризации, используемый в пищевой промышленности).

2.4.2.1 Оценка первичных продуктов перекисного окисления липидов.

Оценку первичных гидроперекисей и кетодиенов проводили спектрофотометрически (Beckman (DU-70, США) и СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия)) по поглощению ими света (по величине оптической плотности D_{λ} при длине волны 232 нм и 270 нм в слое диэтилового эфира). Для этого к 5 мл растворов подготовленных образцов добавляли 3 мл диэтилового эфира, медленно перемешивали, оставляли при комнатной температуре (в течение не менее 30 минут) и далее помещали в холодильную камеру на сутки при $7-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Далее из верхней органической фазы отбирали 1,5 мл и фотометрировали в УФ области против эфира. При построении УФ-спектра учитывался вклад в оптическую плотность соответствующего буфера, экстрагированного в тех же условиях диэтиловым эфиром. Полученные данные позволяют рассчитать индекс окисленности, который отражает накопление продуктов перекисного окисления жирнокислотных остатков липидов. Данный параметр может быть выражен, например, через D_{232} , (при $\lambda = 230 - 236$ нм, для которых установлено максимальное поглощение диеновых гидроперекисей), или, например, через отношение D_{232}/D_{215} ($\lambda = 206 - 215$ нм соответствует абсорбции липидов) [287]. Оценка накопления кетодиенов (более глубокое окисление) может быть проведена, например, с помощью параметра D_{272} (при $\lambda = 260 - 272$ нм установлено максимальное поглощение кетодиенов) или D_{272}/D_{215} .

2.4.2.2 Оценка вторичных продуктов перекисного окисления липидов.

Количественное определение МДА осуществляли, используя метод ТБК (по реакции МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) в присутствии трихлоруксусной кислоты (ТХУ)) [288–290]. Для этого исследуемые образцы (0,5 мл) смешивали со смесью ТХУ + ТБК (3,0 мл; смесь готовили из расчета: 15 г ТХУ и 0,67 г ТБК на 100 мл H_2O), тщательно закрывали для предотвращения потерь МДА и прогревали на водяной бане в течение 30 мин.

Данный метод основан на том, что молекула МДА связывается с двумя молекулами ТБК в кислой среде (ТХУ), образуя окрашенный в розовый цвет комплекс (хромоген), по степени окраски которого судят о степени окисления липида. Степень окраски измерялась спектрофотометрически (спектрофотометры Beckman (Du-70, США) и СФ-2000 (ОКБ Спектр,

Россия)) при двух длинах волн (для того, чтобы предотвратить дополнительный вклад мутности в оптическую плотность), а именно при $\lambda = 532$ нм (максимальная абсорбция ТБК-продуктов) [286, 288, 290] и $\lambda = 580$ нм (минимальная абсорбция ТБК-продуктов) [285].

Концентрацию малонового диальдегида в образце рассчитывали по следующей формуле:

$$C_{\text{МДА}} = (D_{532} - D_{580}) \times 7 \times 1000 / 155, \quad (12)$$

где D_{532} и D_{580} – оптические плотности растворов образца с реагентом;

$C_{\text{МДА}}$ – концентрация малонового диальдегида (МДА), нмоль/мл;

155 – коэффициент экстинкции МДА при длине кюветы $l = 1$ см и $\lambda = 532$ нм;

1000 – коэффициент пересчёта от размерности в литрах к мл;

7 – коэффициент разбавления пробы образца реагентом (ТХУ + ТБК).

Экспериментальная ошибка при не менее 3-х повторных измерениях с помощью данного метода составляла 15 %.

2.4.3 Оценка биодоступности биологически активных липидов из их комплексов с биополимерами в модельных условиях желудочно-кишечного тракта

2.4.3.1 Моделирование условий переваривания *in vitro* для бинарных систем.

Следующие условия [291] были подобраны для оценки способности фосфатидилхолина к высвобождению из биополимерных комплексов различной природы (Кон_S-ФХ, [Б-ФХ]-ДС) в различных отделах ЖКТ:

(1) «Ротовая полость»: добавление ферментов (α -амилаза (≥ 10 единиц/мг)); рН = 7,0; I = 0,001 М; выдерживание 5 минут при 37 °С;

(2) «Желудок»: добавление ферментов (пепсин (≥ 2500 единиц/мг)); рН = 2,0; ионная сила I = 0,1 М; выдерживание 2 часа при 37 °С;

(3) «Тонкий кишечник»: добавление ферментов (α -амилаза (≥ 10 единиц/мг) + трипсин + α -химотрипсин (≥ 40 единиц/мг)); рН = 8,0; I = 0,15 М; выдерживание 2 часа при 37 °С.

Соотношение фермент: субстрат = 1 : 1000. Степень (%) высвобождения рассчитывали относительно связанного ФХ.

2.4.3.2. Моделирование условий переваривания *in vitro* для тройных систем.

Следующие условия были подобраны для оценки способности липидов к высвобождению из комплекса Кон_S-(ФХ-ЛМ-ЭМГ) (в соответствии с установленным протоколом Infogest [292]):

(1) «Ротовая полость»: добавление растворов солей до рекомендованной концентрации ионов (Таблица 6) ферментов (α -амилаза (≥ 10 единиц/мг), амилогликозидаза (добавление амилогликозидазы было предложено в работе [293])); рН = 7,0; I = 0,001 М; выдерживание в шейкер-инкубаторе (GFL 3032, Германия) (100 раз в минуту) 2 минуты при 37 °С.

Таблица 6 – Рекомендуемые концентрации ионов в модельных пищеварительных жидких средах: слюне (СЛ), желудочном соке (ЖС) и в кишечном соке (КС) [292]

Ионы электролитов	«Ротовая полость», ммоль/л	«Желудок», ммоль/л	Концентрация КС, ммоль/л
K ⁺	18,8	7,8	7,6
Na ⁺	13,6	72,2	123,4
Cl ⁻	19,5	70,2	55,5
H ₂ PO ₄ ⁻	3,7	0,9	0,8
HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	13,7	25,5	85
Mg ²⁺	0,15	0,1	0,33
NH ₄ ⁺	0,12	1,0	–
Ca ²⁺	1,5	0,15	0,6

(2). «Желудок»: титрование до рН = 2,0; добавление раствора солей для имитации желудочного сока (Таблица 6), ферментов (пепсин (≥ 2500 единиц/мг)); выдерживание в шейкер-инкубаторе (GFL 3032, Германия) (100 раз в минуту) 2 часа при 37 °С;

(3). «Тонкий кишечник»: титрование до рН = 8,0; добавление раствора солей для имитации кишечного сока (Таблица 6), ферментов (α -амилаза (≥ 10 единиц/мг), трипсин, α -химотрипсин (≥ 40 единиц/мг), амилогликозидаза); рН = 8,0; I = 0,15 М; выдерживание в шейкер-инкубаторе (GFL 3032, Германия) (100 раз в минуту) 2 часа при 37 °С.

Соотношение фермент : субстрат = 1 : 1000 (для α -химотрипсина, пепсина, α -амилазы) и 1 : 2000 (для амилогликозидазы). Степень (%) высвобождения рассчитывали относительно связанного ФХ.

Как описано выше, для каждой стадии (в п. 2.4.2.2, в отличие от п.2.4.2.1) переваривания готовили соответствующие растворы, имитирующие жидкие среды в определённом отделе ЖКТ: слюну, желудочный или кишечный сок, в состав которых входили различные типы ионов (K^+ , Na^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$, HCO_3^- , Mg^{2+} , Ca^{2+}) (Таблица 6).

Ca^{2+} в виде $CaCl_2(H_2O)_2$ не добавлялся к растворам солей из-за возможности возникновения осадков, его вводили в конечную смесь моделируемой жидкости и изучаемого образца.

2.4.3.3 Физико-химическая характеристика супрамолекулярных комплексов в условиях переваривания *in vitro*.

После проведённого на каждой стадии переваривания ферментативного гидролиза раствор изучаемого образца делили на 2 части: одну часть использовали для следующей стадии переваривания *in vitro*, а в другую часть добавляли соответствующие ингибиторы ферментов (в подобранных для остановки процесса гидролиза концентрациях (Таблица 7) для дальнейших исследований по определению:

(1). **степени (%) гидролиза белковой составляющей** изучаемых образцов (по три параллели для каждого образца) – по количеству (%) оставшихся после гидролиза пептидных связей в белке. Для этого использовали метод Биурета (реакция на пептидную связь; синевато-фиолетовое окрашивание в растворе белка при добавлении реактива) [294]: к 1,5 мл реактива Биурета ($NaOH + CuSO_4$) добавляли 3 мл образца (при необходимости в разбавленном виде) или раствора сравнения (моделируемая на каждой стадии переваривания среда). Через 20 мин с помощью спектрофотометра СФ2000 (ОКБ Спектр, Россия) измеряли оптическую плотность (D_{310}) растворов образцов при 310 нм. По калибровочной кривой определяли % уменьшения числа пептидных связей в белке в результате гидролиза. При этом за 100 % пептидных связей в белке принимали величину D_{310} измеренную для исходного образца, содержащего белок в соответствующей концентрации;

(2). **степени (%) гидролиза мальтодекстринов** – по определению количества образовавшейся глюкозы в изучаемых образцах (по три параллели для каждого образца), согласно стандартному протоколу набора реагентов «Глюкоза-Ново» (п. 2.1.5, наборы реактивов медицинского назначения). Для проведения исследования готовили опытную (75 мкл образца) и калибровочную (75 мкл калибратора) пробы, к которым добавляли 1,5 мл реагента. Образец, реагент и калибратор были прогреты до одинаковой температуры (37 °С). Пробы перемешали в шейкер-инкубаторе (GFL 3032, Германия) и выдержали 10 мин при $t = 37^\circ C$. Далее измеряли оптическую плотность образца (при 510 нм), используя спектрофотометр СФ2000 (ОКБ Спектр, Россия). При этом за 100 %-ю степень гидролиза принимали расчётное количество глюкозы в мальтодекстрине, входящем в исходный образец;

Таблица 7 – Оптимальное количество ингибиторов для эффективного ингибирования пищеварительных ферментов

Ингибитор пепсина (пепстатин), $C = 0,002 \%$		
$V_{\text{белка}}$, МЛ	$V_{\text{пепсина}} (C = 0,08 \%)$, МКЛ	$V_{\text{ингибитора}}$, МКЛ
3	5,6	15
Ингибитор трипсина и α -химотрипсина, $C = 0,12 \%$		
$V_{\text{белка}}$, МЛ	$V_{\text{трипсина и } \alpha\text{-химотрипсина}} (C = 0,04 \%)$, МКЛ	$V_{\text{ингибитора}}$, МКЛ
3	7,5	15
Ингибитор α -амилазы, $C = 0,1\%$		
$V_{\text{мальтодекстрина}}$, МЛ	$V_{\alpha\text{-амилазы}} (C = 7 \%)$, МКЛ	$V_{\text{ингибитора}}$, МКЛ
1	125	30

(3). **степени (%) высвобождения (биодоступности)** липидов (из инкапсулированных ковалентным конъюгатом липосом ФХ, обогащённых триглицеридами ЛМ) (по три параллели для каждого образца) с помощью экстракции ФХ из водных растворов диэтиловым эфиром. Для этого в пробирку с образцом исследуемого раствора (5 мл) добавляли диэтиловый эфир (3 мл), затем ее аккуратно встряхивали и выдерживали в течение 24 часов при 7°C . Полученную фракцию диэтилового эфира исследовали спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при $\lambda = 215$ нм (спектрофотометр СФ 2000, ОКБ Спектр, Россия), и определяли концентрацию высвободившегося в процессе ферментативного гидролиза липидов, используя предварительно построенную калибровочную кривую;

(4). **ζ - потенциала** гидролизованных комплексных частиц в модельных условиях ЖКТ (согласно п. 2.3.4);

(5). **структурных и термодинамических параметров** гидролизованных комплексных частиц в модельных условиях ЖКТ с помощью многоугольного лазерного светорассеяния (согласно п. 2.3.2);

(6) Параллельно, используя прибор многоугольного лазерного светорассеяния ЛС-01 («ЗАО Научные приборы» Санкт-Петербург, Россия) в статическом режиме измерений, проводили определение начальной скорости гидролиза (V_0) изучаемых комплексов в модельных условиях переваривания в ЖКТ. При этом приготовленные образцы растворов комплексов с

добавленными к ним ферментами были помещены для измерений в кювету прибора лазерного светорассеяния, которую термостатировали при $37 \pm 0,1$ °С. Интенсивность светорассеяния образцов растворов во время ферментативного гидролиза, I_{θ} , была измерена при угле рассеяния $\theta = 90^{\circ}$. Начальная скорость ферментативного гидролиза ($V_0 = \Delta I / \Delta t$) соответствовала тангенсу угла начального наклона полученных кинетических кривых, где ΔI - это уменьшение интенсивности рассеяния света частицами комплекса за период времени Δt . Ошибка эксперимента при определении V_0 составила ± 5 %.

2.4.3.4 Методика подбора необходимой и достаточной концентрации ингибиторов пищеварительных ферментов.

Были приготовлены растворы казеината натрия ($C = 0,1$ вес/объем %) при рН 2,0 и 7,0 и мальтодекстрина ($C = 0,2$ вес/объем %) при рН = 7,0 с концентрациями, соответствующими их концентрациям в составе ковалентного конъюгата. Для подбора концентрации ингибитора пепсина (пепстатина) раствор казеината натрия (рН = 2,0) был разделен на 2 параллели, в одну из которых добавили раствор пепсина, а в другую – растворы пепсина и пепстатина в рассчитанных заранее концентрациях. Пробы помещали в шейкер-инкубатор (GFL 3032, Германия) (скорость встряхивания 100 раз в минуту) при 37 °С на 2 часа. Количество пептидных связей в белке было измерено биуретовым методом (по 2 пробы \times 2 мл) через 1 час и через 2 часа. По полученным данным проводилась оценка эффективности действия ингибитора в выбранной концентрации. Аналогично подбирались концентрации ингибиторов трипсина и α -химотрипсина для белка и α -амилазы для мальтодекстрина.

2.5 Статистический анализ

Все представленные в работе численные данные являются средними значениями, полученными как минимум из двух повторов экспериментов, стандартное отклонение полученных величин в которых от среднего не превышало ± 2 %. Экспериментально полученные зависимости измеренных величин были проанализированы с использованием статистического анализа (ANOVA), OriginPro 8 при статистической значимости различий в измеренных величинах $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

БИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ: ФОСФОЛИПИД–БИОПОЛИМЕР

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

Целью данной части работы являлось изучение общности и различий во влиянии специфической структуры липосом фосфатидилхолина (ФХ) и мицелл лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования их комплексов с ковалентными конъюгатами казеината натрия (Б) и мальтодекстринов (Paselli SA2 (ДЭ = 2) и Paselli MD10 (ДЭ = 10)), а также на физико-химические свойства таких комплексов. Кроме этого, ставилась задача изучения влияния степени полимеризации мальтодекстринов (выраженной с помощью декстрозного эквивалента (ДЭ)), присоединённых к белку, на формирование и физико-химические свойства комплексов.

3.1.1 Физико-химические свойства ковалентных конъюгатов в водной среде

Для достижения поставленных целей и задач, в первую очередь, была проведена оценка степени ковалентного связывания белка и мальтодекстринов (Таблица 8), охарактеризованы структурные (средневесовая молярная масса, M_w ; радиус инерции, R_G ; гидродинамический радиус, R_h ; структурно-чувствительный параметр, $\rho = R_G/R_h$; плотность, d) и термодинамические (второй вириальный коэффициент, выраженный в двух размерных единицах, а именно по весовой и молярной шкалам: A_2 и A_2^*) параметры чистого белка и изучаемых ковалентных конъюгатов в водной среде. Основные результаты исследований по данной части опубликованы в работах [295, 296, 297].

По содержанию аминокислот лизина было установлено, что в результате ковалентного связывания белка с более длинноцепочечным мальтодекстрином SA2 было задействовано 30 % аминокислотных остатков лизина, а в случае с короткоцепочечным мальтодекстрином MD10 это количество составило 45 % (Таблица 8).

Учитывая эти данные, а также молярные массы индивидуальных молекул мальтодекстринов ($M_w \sim 9$ кДа для мальтодекстрина SA2, $M_w \sim 1,8$ кДа для мальтодекстрина

Таблица 8 – Расчёт количества молекул мальтодекстринов, ковалентно присоединённых к белку при формировании конъюгатов Кон_S и Кон_M, а также свободных (несвязанных) молекул мальтодекстринов

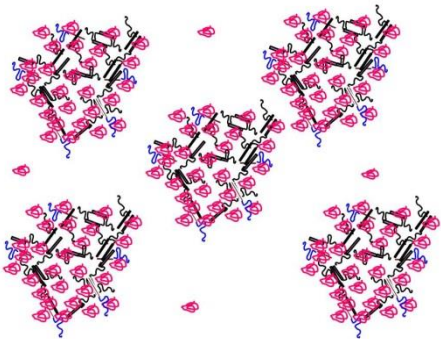
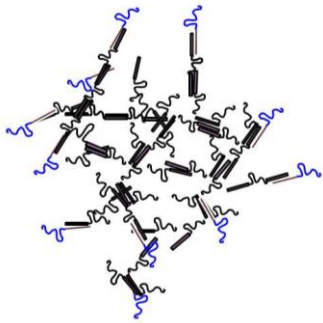
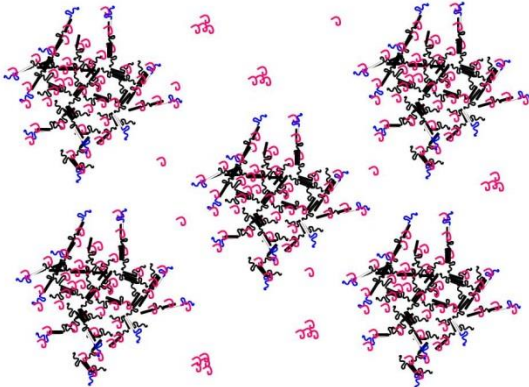
Образец	R_w	% потерянных аминокислотных групп лизина казеината натрия, т.е. связанных с мальтодекстрином	R_m^I	Количество молекул мальтодекстрина, ковалентно присоединённых к белку	Количество молекул мальтодекстрина, не связанных ковалентно
<i>Кон_S</i>	2	30	5	4	1
<i>Кон_M</i>	2	45	27	6	21

R_m^I - молярное соотношение белок : мальтодекстрин, рассчитанное на основе данных молярных масс индивидуальных молекул мальтодекстринов (9 кДа для мальтодекстрина SA2 и 1,8 кДа для мальтодекстрина MD10 [266]) и индивидуальных казеинов (~ 24 кДа [216])

MD10 [266]), и казеинов, входящих в состав казеината натрия (α_{s1} , α_{s2} , β и κ), а также аминокислотный состав последних, было найдено, что около 4 молекул мальтодекстрина SA2 и 6 молекул мальтодекстрина MD10 было присоединено ковалентно к усреднённой (по молярной массе (~ 24 кДа) [216], или по содержанию аминокислотных остатков лизина (12,53)) молекуле казеина при формировании конъюгатов, что составило 80 % и 22 % от их общего количества, соответственно.

Сравнивая молекулярные параметры конъюгатов и чистого белка (Таблица 9), следует отметить, прежде всего, диссоциацию частиц казеината натрия ($M_w = 11,9 \times 10^6$ Да) при присоединении обоих мальтодекстринов, что следует из более низких значений средневесовой молярной массы, M_w . Этот эффект от ковалентного присоединения мальтодекстринов был несколько более выражен в случае конъюгата Кон_M ($M_w = 4,7 \times 10^6$ Да), по сравнению с Кон_S ($M_w = 6,0 \times 10^6$ Да), что может быть связано с большим числом образованных ковалентных связей между молекулами казеинов и мальтодекстрина MD10, ослабляющих внутри- и межмолекулярные силы притяжения (гидрофобные, водородные, электростатические) между молекулами казеинов, составляющих казеинат натрия. При этом найденное уменьшение плотности частиц в случае конъюгата Кон_M ($d = 0,7$ мг/мл по сравнению с $d = 1,2$ мг/мл для чистого белка) может быть связано с более глубоким проникновением короткоцепочечного мальтодекстрина MD10 (ДЭ = 10, около 10 глюкозных остатков) в интерьер белковой молекулы и последующим снижением внутримолекулярного притяжения, в то время как отсутствие

Таблица 9 – Структурные и термодинамические параметры, а также схематичное представление супрамолекулярных частиц комплексов ковалентных конъюгатов Ко_{нс}/Ко_{нм} с фосфолипидами: липосомами фосфатидилхолина (ФХ) или мицеллами лизофосфатидилхолина (ЛФХ) в водной среде (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М; температура 25 °С), а также визуализация их пространственного строения на основании измеренных параметров

Конъюгат (Ко _{нс})		Казеинат натрия (Б)					Конъюгат (Ко _{нм})				
											
Система	$M_w \times 10^{-6}$ (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 (мг/мл)	$1/[\eta]$ (мг/мл)	ζ - потенциал (мВ)	
Казеинат натрия	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	
Ко _{нс}	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	
Ко _{нм}	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	

изменения плотности для конъюгата Кон_S могло быть связано с его преимущественным расположением на поверхности белка из-за стерических ограничений, возникающих в случае длинноцепочечного мальтодекстрина SA2 (ДЭ = 2, около 50 глюкозных остатков). Более высокие значения характеристической вязкости (и напротив, более низкие значения величины обратной характеристической вязкости, $1/[\eta]$, Таблица 9) для этого конъюгата также свидетельствуют в пользу данного предположения. Здесь также стоит отметить менее отрицательные значения ζ - потенциала у обоих конъюгатов по сравнению с белком. Это может быть связано с частичным экранированием заряда белка мальтодекстринами, расположенными на поверхности конъюгатов, что было наиболее выраженным в случае мальтодекстрина SA2 ($(-22,0 \text{ мВ})_{\text{КонS}} < (-27,0 \text{ мВ})_{\text{КонM}}$) и согласуется с предыдущими данными.

Положительные значения вторых вириальных коэффициентов ($A_2 > 0$, $A_2^* > 0$) указывали на хорошее термодинамическое сродство конъюгатов к растворителю (в соответствии с уравнениями 2, 3), что объясняет их высокую растворимость в водной среде. При этом сравнение величин, характеризующих вклад исключённого объёма ($A_2^{\text{искл}}$), и суммарный вклад других сил ($A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вод}} + A_2^{\text{дип}}$) в парные взаимодействия частиц конъюгатов даёт основание утверждать, что именно вклад исключённого объёма является преобладающим в найденных положительных значениях A_2^* ($A_2^{\text{искл}} = 20,8 \text{ м}^3 \text{моль}^{-1}$ в случае Кон_M, $A_2^{\text{искл}} = 7,4 \text{ м}^3 \text{моль}^{-1}$ в случае Кон_S). Здесь также важно отметить достаточно высокую отрицательную величину ($A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вод}} + A_2^{\text{дип}}$) в случае Кон_M ($-19,2 \text{ м}^3 \text{моль}^{-1}$), что указывает на существенное межмолекулярное притяжение между частицами Кон_M (гидрофобное и за счёт формирования водородных связей).

В дополнение к этому важно отметить, что, как видно из Таблицы 9, сформировавшиеся конъюгаты обладали либо меньшим ($R_G = 125 \text{ нм}$ для Кон_S), либо близким ($R_G = 140 \text{ нм}$ для Кон_M) размером по сравнению с белком ($R_G = 159 \text{ нм}$), и сохраняли при этом характерную для казеината натрия форму случайного клубка ($1 < \rho < 2$).

На основе модели супрамолекулярной частицы казеината натрия, предложенной Хорном [231], и измеренных структурных и термодинамических параметров супрамолекулярных частиц конъюгатов было разработано их схематичное изображение (Таблица 9).

3.1.2 Способность ковалентных конъюгатов инкапсулировать липосомы ФХ и мицеллы ЛФХ

Выбранные концентрации конъюгатов и фосфолипидов (1 вес/объём % Кон_S/Кон_M + ФХ (10^{-3} М ; 0,078 вес/объём %)/ ЛФХ (10^{-3} М ; 0,051 вес/объём %) позволили достичь высокой степени ($> 95 \%$) инкапсулирования липосом ФХ и мицелл ЛФХ конъюгатами в водной среде (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М; температура 40 °С). Здесь важно отметить, что появление новых пиков в распределении по размерам изучаемых частиц, отличных от пиков,

характерных для исходных липосом ФХ, мицелл ЛФХ и ковалентных конъюгатов, подтверждает формирование комплексных частиц между конъюгатами и фосфолипидами (Рисунки 20 и 21).

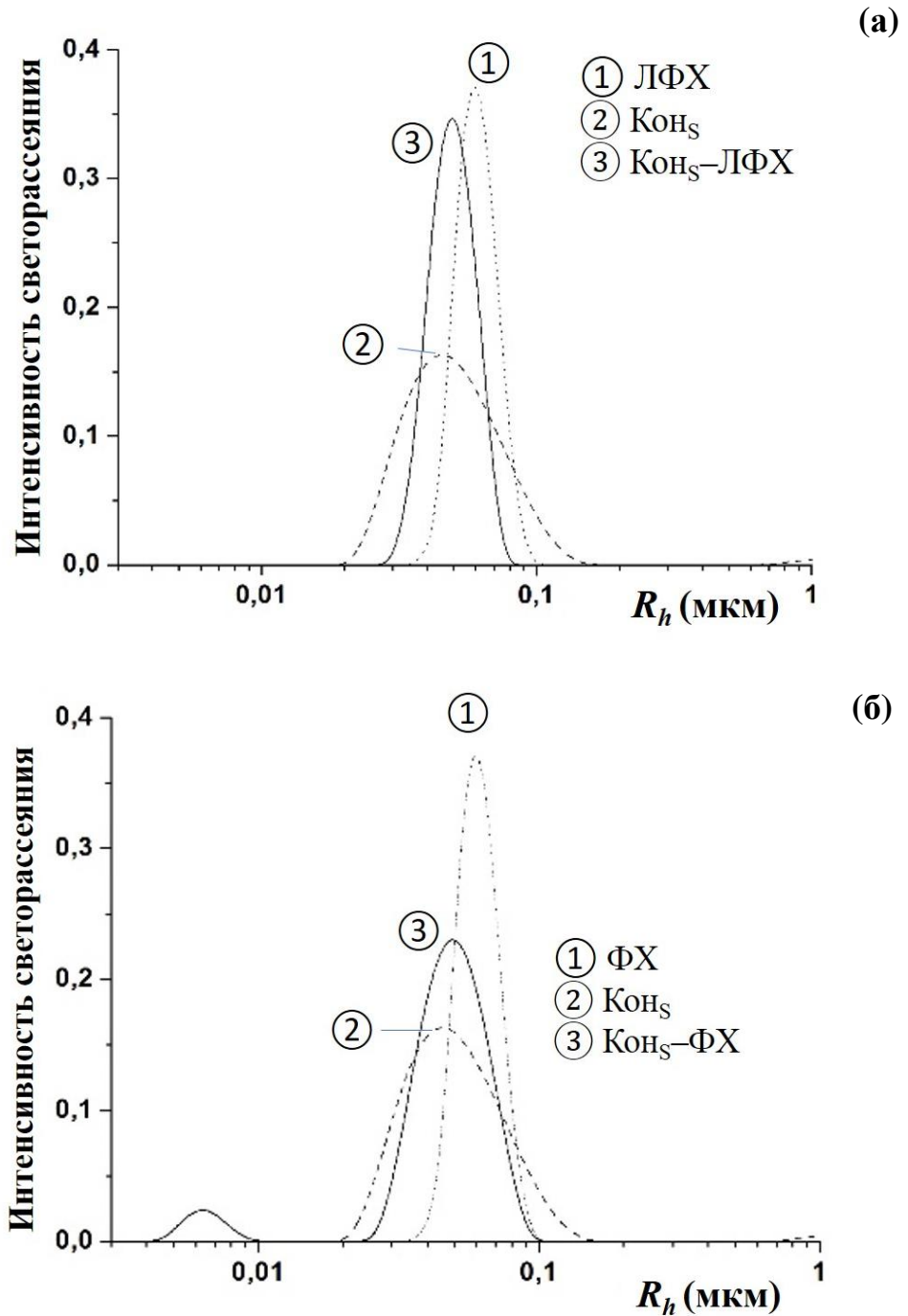


Рисунок 20 – Распределение по размеру мицелл ЛФХ (а)/липосом ФХ (б), частиц конъюгата KOH_5 и их комплексов в водном буферном растворе ($pH = 7,0$; ионная сила фосфатного буфера $I = 0,001 M$; температура $25 ^\circ C$)

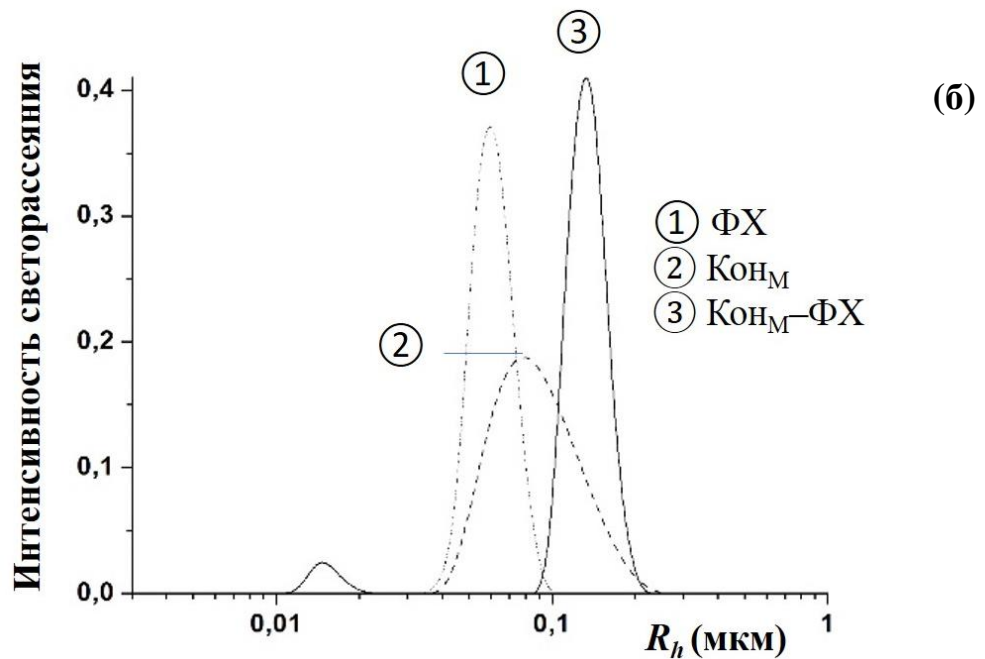
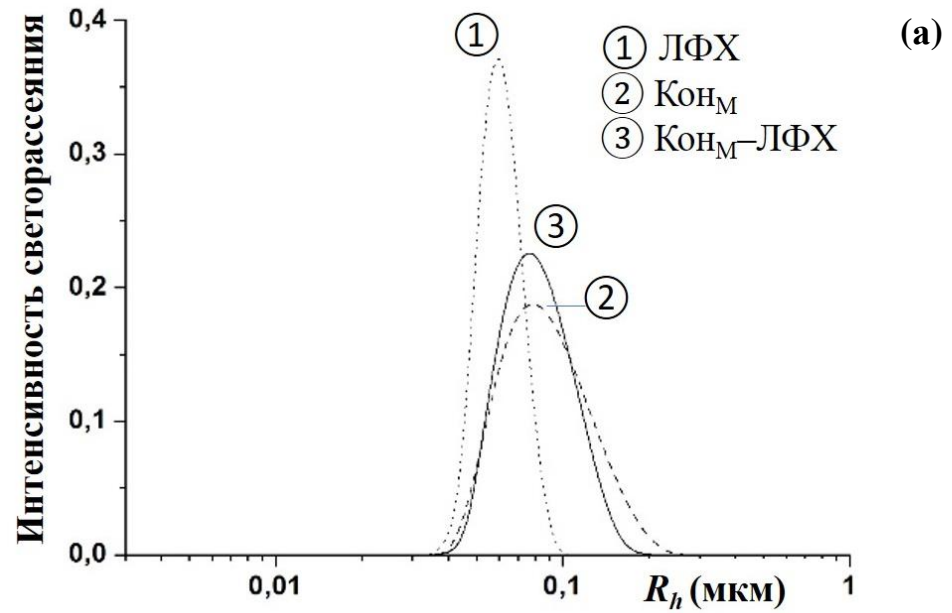


Рисунок 21 – Распределение по размеру мицелл ЛФХ (а)/липосом ФХ (б), частиц конъюгата К_{оНМ} и их комплексов в водном буферном растворе (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М; температура 25 °С)

Кроме того, более узкий пик распределения по размерам, найденный для комплексных частиц, указывает на их меньшую полидисперсность по сравнению с конъюгатами (Рисунки 20 и 21). На основании литературных [200, 246, 298, 299, 302] и полученных нами ранее экспериментальных данных [215, 303-306] можно предположить, что процесс комплексообразования между фосфолипидами и конъюгатами происходил при участии различных типов взаимодействий, а

именно, электростатического притяжения между противоположными зарядами, формирования водородных связей и гидрофобного притяжения между неполярными участками их молекул. При этом важно отметить, что сформировавшиеся комплексы имели наноразмеры и сохраняли такой же высокий уровень растворимости в водной среде, как и ковалентные конъюгаты.

3.1.3 Сравнение структурных и термодинамических параметров комплексных частиц, содержащих ковалентные конъюгаты и липосомы ФХ или мицеллы ЛФХ

В Таблицах 10 и 11 представлено сравнение структурных и термодинамических параметров комплексных частиц, сформировавшихся между конъюгатами (Кон_S/Кон_M) и липосомами ФХ или мицеллами ЛФХ. Выделим общие сходства и различия во влиянии структурной организации фосфолипидов (липосом ФХ и мицелл ЛФХ) на свойства этих комплексных частиц.

Во-первых, эффективное инкапсулирование фосфолипидов конъюгатами приводило к значительно большей плотности, d , супрамолекулярных комплексов по сравнению с конъюгатами. Так, эти значения составили: $d = 1,5$ мг/мл (Кон_M-ЛФХ) и $d = 1,6$ мг/мл (Кон_M-ФХ) по сравнению с $d = 0,7$ мг/мл для чистого конъюгата Кон_M. Аналогично, тенденция к росту плотности наблюдалась и в случае комплексов с другим конъюгатом ($d = 1,9$ мг/мл для Кон_S-ФХ и $d = 2,9$ мг/мл для Кон_S-ЛФХ по сравнению с $d = 1,2$ мг/мл для Кон_S).

Этот рост плотности проявлялся за счёт ассоциации (рост молярной массы, M_w , более выраженной в случае Кон_M-ЛФХ ($15,0 \times 10^6$ Да) и Кон_S-ЛФХ ($9,4 \times 10^6$ Да)) и/или некоторого уменьшения размера комплексов (более низкие значения R_G , как в случае Кон_M-ФХ (114 нм), Кон_S-ФХ (112 нм), Кон_S-ЛФХ (109 нм) по сравнению с размером конъюгатов.

Найденное по данным многоугольного лазерного светорассеяния 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. Особенно высокое значение $1/[\eta]$, найденные для Кон_M-ЛФХ были обусловлены наибольшим термодинамическим сродством этого комплекса к водной среде ($A_2^* = 22,0$ м³моль⁻¹).

При этом меньшие по сравнению с суммарными величинами (ФХ (-21,7 мВ) + Кон_M (-27 мВ) = -48,7 мВ; ФХ (-21,7 мВ) + Кон_S (-22 мВ) = -43,7 мВ; ЛФХ (-24 мВ) + Кон_M (-27 мВ) = -51 мВ; ЛФХ (-24 мВ) + Кон_S (-22 мВ) = -46 мВ) ζ -потенциалы комплексов указывают на участие электростатического притяжения противоположно заряженных полярных групп белка и фосфолипидов в формировании комплексов, приводящее к частичной нейтрализации их зарядов.

Таблица 10 – Структурные и термодинамические параметры частиц ковалентного конъюгата КоnS и его комплексов с липосомами ФХ или мицеллами ЛФХ в водной среде (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М; температура 25 °С), а также визуализация их пространственного строения на основании измеренных параметров



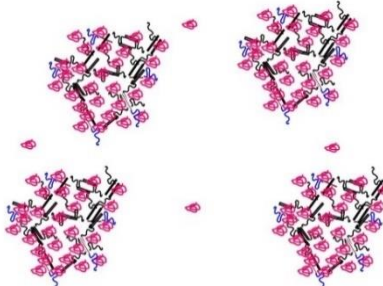

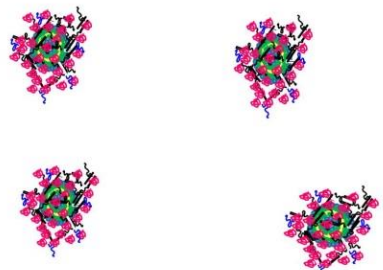
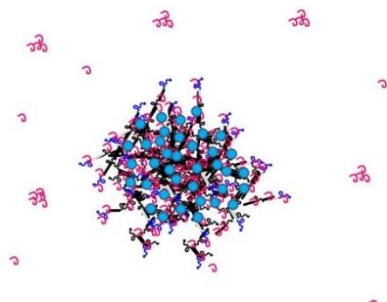

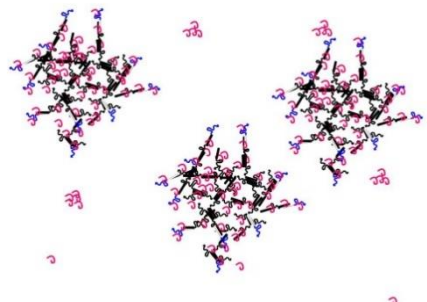

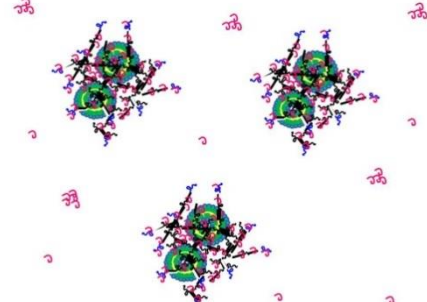
КоnS – ЛФХ		ЛФХ		КоnS			ФХ		КоnS – ФХ		
		$R_h = 64$ (нм) 					$R_h = 65$ (нм) 				
Образец	$M_w \times 10^{-6}$ (Да)	$A_2 \times 10^5$ (м ³ моль кг ⁻²)	A_2^* (м ³ моль ⁻¹)	$A_2^{\text{искл}}$ (м ³ моль ⁻¹)	$A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вол}} + A_2^{\text{гидр}}$ (м ³ моль ⁻¹)	R_G (нм)	$\rho = R_G/R_h$	d (мг/мл)	$1/[\eta]$ (мг/мл)	ζ - потенциал (мВ)	
КоnS	$6,0 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,7$	$- 4,6 \pm 0,4$	$125 \pm 6,3$	$1,8 \pm 0,05$	$1,2 \pm 0,06$	44 ± 4	$- 22,0 \pm 1,1$	
КоnS–ФХ	$6,8 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,24$	$3,5 \pm 0,35$	$- 1,1 \pm 0,1$	$112 \pm 5,6$	$2,0 \pm 0,05$	$1,9 \pm 0,08$	60 ± 6	$-22,8 \pm 1,1$	
КоnS–ЛФХ	$9,4 \pm 0,9$	$2,4 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$	$109 \pm 5,5$	$2,0 \pm 0,05$	$2,9 \pm 0,15$	86 ± 9	$-23,4 \pm 1,2$	

Таблица 11 – Структурные и термодинамические параметры частиц ковалентного конъюгата Ко_{НМ} и его комплексов с липосомами ФХ или мицеллами ЛФХ в водной среде (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М; температура 25 °С), а также визуализация их пространственного строения на основании измеренных параметров

Ко _{НМ} – ЛФХ		ЛФХ		Ко _{НМ}			ФХ	Ко _{НМ} – ФХ		
		$R_h = 64$ (нм) 					$R_h = 65$ (нм) 			
Образец	$M_w \times 10^{-6}$ (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 (мг/мл)	$1/[\eta]$ (мг/мл)	ζ - потенциал (мВ)
Ко _{НМ}	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
Ко _{НМ} -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
Ко _{НМ} -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

Во-вторых, 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 в соответствии с ростом ζ - потенциалов (заряда) комплексных частиц наблюдался рост вклада электростатического отталкивания между ними в величину A_2^* (переход от отрицательных к положительным величинам суммарного вклада в парные взаимодействия электростатического отталкивания, гидрофобного притяжения и формирования водородных связей ($A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вод}} + A_2^{\text{гидр}}$). Это было более выражено в случае комплексов с ЛФХ по сравнению с комплексами с ФХ (положительные значения ($A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вод}} + A_2^{\text{гидр}}$) для Кон_S-ЛФХ ($1,0 \text{ м}^3\text{моль}^{-1}$) и Кон_M-ЛФХ ($6,2 \text{ м}^3\text{моль}^{-1}$) по сравнению с отрицательными значениями ($A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вод}} + A_2^{\text{гидр}}$) для Кон_S-ФХ ($-1,1 \text{ м}^3\text{моль}^{-1}$) и Кон_M-ФХ ($-2,8 \text{ м}^3\text{моль}^{-1}$). При этом, важно отметить, что основной вклад в положительные значения второго вириального коэффициента A_2^* обеспечивал эффект исключённого объёма $A_2^{\text{искл}}$ для всех комплексных частиц (аналогично, как и в случае исходных биополимеров).

В-третьих, все комплексные частицы имели *архитектуру* случайного клубка ($1 < \rho \leq 2$) (Таблицы 10, 11).

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что как липосомы ФХ, так и мицеллы ЛФХ являются эффективным внутри- и межмолекулярным сшивающими агентами для частиц конъюгатов в водной среде. Сравнение измеренных структурных и термодинамических параметров комплексных частиц с параметрами конъюгатов позволяет визуализировать их с помощью схематичного изображения, основанного на модели супрамолекулярной частицы казеината натрия, предложенной Хорном [307] (Таблица 10, Таблица 11).

3.1.4 Оценка фазового состояния бислоёв ДПФХ в комплексах с ковалентными конъюгатами методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Для того, чтобы проверить наше предположение относительно сохранения целостности липосом ФХ в составе комплексных частиц, мы, во-первых, провели исследование фазового состояния бислоёв ФХ в комплексе с изучаемыми конъюгатами, используя дифференциально сканирующую калориметрию (ДСК). В данном эксперименте мы использовали модельный фосфолипид с насыщенными углеводородными цепочками в молекуле, а именно дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ). Выбор ДПФХ был продиктован тем, что в доступном

для измерения температурном диапазоне ($> 0^{\circ}\text{C}$) дифференциального сканирующего калориметра (ДАСМ-4) бислоем липосом ДПФХ претерпевает фазовый переход из гелеподобного в жидкокристаллическое состояние в области температур около 40°C (Рисунок 22, Таблица 12), в то время как бислоем липосом ФХ при положительных температурах ($> 0^{\circ}\text{C}$) уже находится в жидкокристаллическом состоянии [299].

Здесь также следует отметить, что при температуре, используемой при комплексообразовании липосом ФХ/ДПФХ и конъюгатов, то есть 40°C , модельный бислоем липосом ДПФХ, по-видимому, максимально приближается к жидкокристаллическому фазовому состоянию реального бислоя липосом ФХ, что свидетельствует о целесообразности использования ДПФХ в качестве модельного фосфолипида. Полученные термограммы, представленные ниже, свидетельствуют, во-первых, о том, что бислои липосом ДПФХ не разрушаются при формировании супрамолекулярных комплексных частиц с конъюгатами.

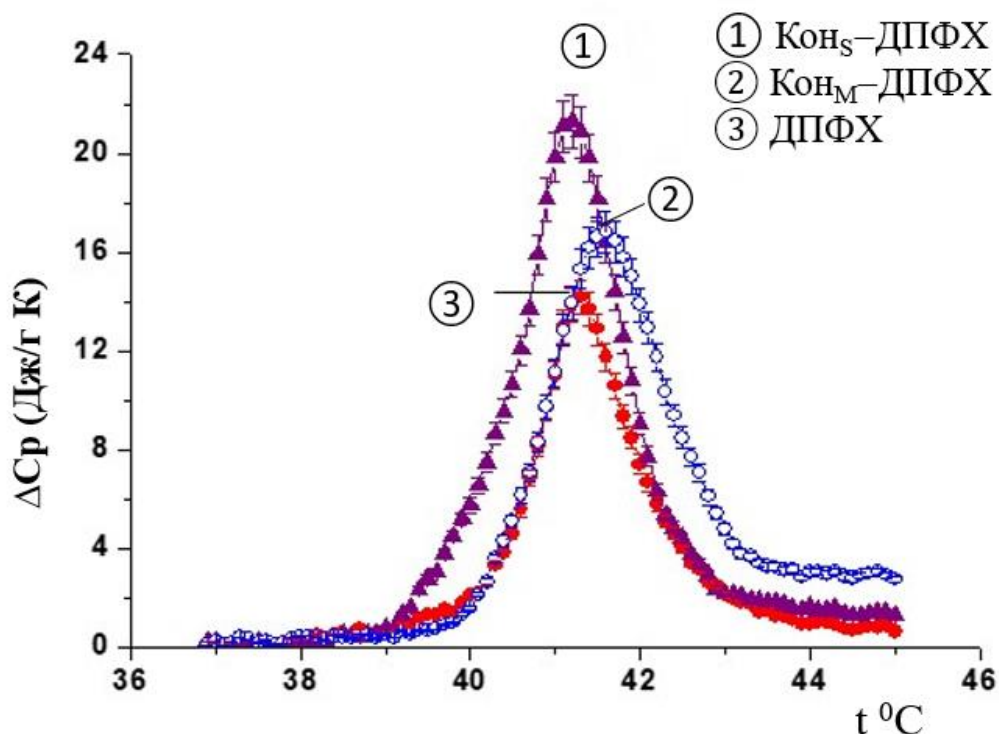


Рисунок 22 – Термограммы фазового перехода от гелеподобного состояния к жидкокристаллическому в бислоях липосом ДПФХ ($0,5 \times 10^{-3}\text{M}$) в их чистой форме и в комплексах с ковалентными конъюгатами Kon_S и Kon_M (0,5 вес/объем %) в водном растворе фосфатного буфера ($\text{pH} = 7,0$; ионная сила $I = 0,001\text{M}$)

Таблица 12 – Термодинамические параметры фазового перехода от гелеподобного к жидкокристаллическому состоянию бислоя липосом ДПФХ ($0,5 \times 10^{-3}$ М) в их чистой форме и в комплексах с ковалентными конъюгатами (0,5 вес/объем %) в водном растворе фосфатного буфера (рН = 7,0; ионная сила I = 0,001 М)

Образец	$t_{переход}$ ($^{\circ}$ С)	Δt ($^{\circ}$ 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	$12,3 \pm 0,6$	$37,5 \pm 1,9$

Во-вторых, они отражают тот факт, что термодинамическая стабильность бислоев ДПФХ в комплексных частицах оказывается даже более высокой [298, 299, 300]. Это проявляется как в большей высоте ($h_{пик}$), так и в бóльшей площади эндотермического пика на термограмме, что в свою очередь отражает большее значение молярной энтальпии фазового перехода, $\Delta H_{переход}$ (Таблица 12). В дополнение к этому, фазовый переход, как правило, становился менее кооперативным, что проявлялось в более высоких значениях ширины эндотермического пика (Δt) на его полувысоте. Найденное влияние комплексообразования между липосомами ДПФХ и частицами конъюгатов на термодинамическую стабильность бислоев ДПФХ может быть вызвано, с одной стороны, частичной нейтрализацией нескомпенсированного заряда полярных групп ДПФХ в результате их взаимодействия с противоположно заряженным функциональным группам белка [309] и, с другой стороны, усилением гидрофобного притяжения между углеводородными цепочками молекул ДПФХ в бислое в результате его компактизации, вызванной включением гидрофобных участков молекул белка в бислою липосом ДПФХ [154, 310].

3.1.5 Оценка микровязкости липидных слоев липосом ФХ и мицелл ЛФХ в комплексах с ковалентными конъюгатами методом электронного парамагнитного резонанса

Данные спектроскопии электронного парамагнитного резонанса указывают на увеличение времени вращательной корреляции (τ_c) зонда 16-доксилстеариновой кислоты (16-ДСА) в липидных слоях липосом ФХ и мицелл ЛФХ в результате их инкапсулирования частицами

ковалентных конъюгатов (Таблица 13). Однако в случае инкапсулированных мицелл ЛФХ влияние (эффект в %) конъюгатов был несколько ниже по сравнению с их влиянием на бислои липосом ФХ.

Таблица 13 – Влияние конъюгатов на время вращательной корреляции зонда 16-ДСА в липидных слоях инкапсулированных липосом ФХ и мицелл ЛФХ

Образец	$\tau_c \times 10^{10}$ сек	\pm	Эффект (%)*	\pm
ФХ (контроль)	10,1	0,20	0,0	0,0
Кон _S -ФХ	13,8	0,03	+36,6	0,1
Кон _M -ФХ	12,9	0,50	+27,7	4,8
ЛФХ (контроль)	13,4	0,14	0,0	0,0
Кон _S -ЛФХ	16,0	0,14	+19,4	0,9
Кон _M -ЛФХ	15,2	0,48	+13,4	3,5

$$*\text{эффект (\%)} = \left[\left(\tau_c^{\text{комплекс}} - \tau_c^{\text{контроль}} \right) / \tau_c^{\text{контроль}} \right] \times 100$$

Опираясь на литературные данные, мы можем предположить, что увеличение τ_c отражает увеличение микровязкости липидных слоёв ФХ и ЛФХ, инкапсулированных конъюгатами. В случае ФХ это может быть связано с усилением сил гидрофобного притяжения между углеводородными цепочками молекул ФХ в результате компактизации бислоя, вызванной проникновением гидрофобных групп белка в липидные слои [311]. Данные результаты хорошо согласуются с данными ДСК.

В случае мицелл ЛФХ их возможная реорганизация в комплексных частицах с конъюгатами может сопровождаться формированием новых липидных кластеров в интерьере таких частиц, в которых также могут усиливаться силы притяжения между углеводородными цепочками молекул ЛФХ [100, 151, 311, 313].

3.1.6 Оценка перекисного окисления фосфолипидов в составе их супрамолекулярных комплексов с ковалентными конъюгатами

Степень окисления и деградации липосом ФХ и мицелл ЛФХ в их свободном состоянии и в комплексах с ковалентными конъюгатами оценивали по количеству образовавшегося малонового диальдегида (МДА), который относят ко вторичным продуктам перекисного окисления липидов (ПОЛ) [286]. За 100 % окисления принимали количество МДА, найденное в растворах липосом ФХ и мицелл ЛФХ в их чистом состоянии. Самый низкий уровень окисления (Рисунок 23) был найден для мицелл ЛФХ, инкапсулированных обоими ковалентными конъюгатами $\text{Кон}_S/\text{Кон}_M$.

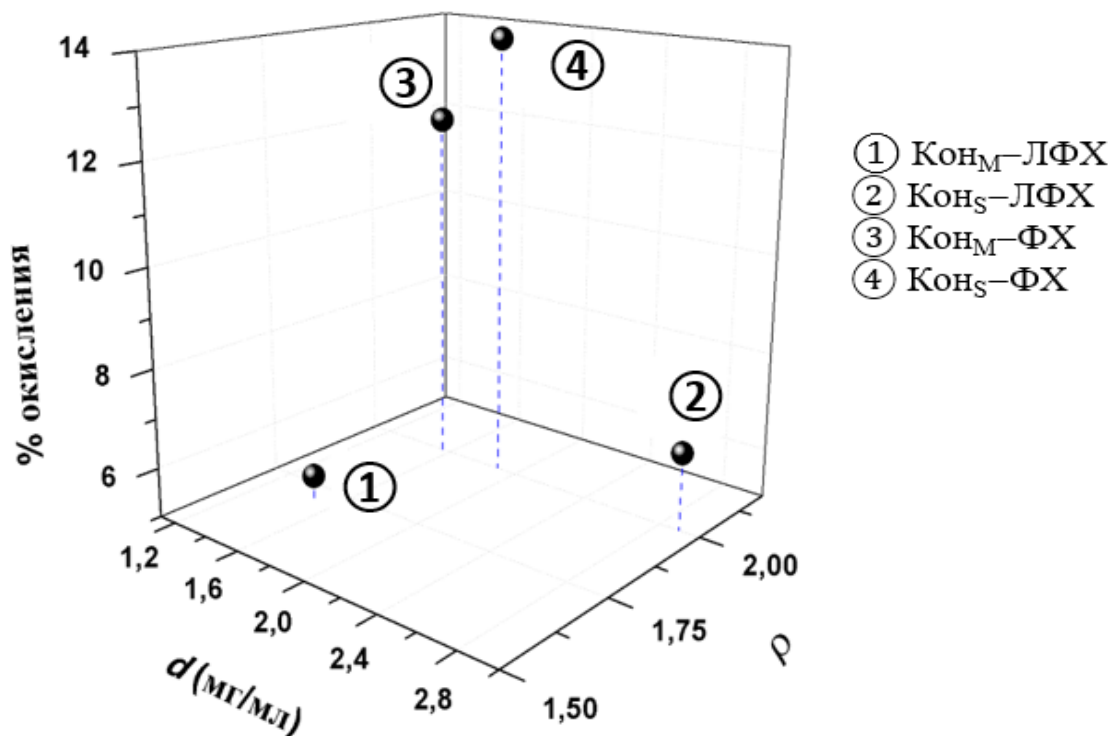


Рисунок 23 – Зависимость степени окисления* (%) липосом ФХ и мицелл ЛФХ в их комплексах с ковалентными конъюгатами от плотности, d , и архитектуры комплексных частиц, выраженной с помощью значения ρ

*За 100 % окисления принималась количество МДА в водных дисперсиях ($\text{pH} = 7,0$; ионная сила фосфатного буфера $I = 0,001 \text{ M}$) ФХ/ЛФХ после 14 суток хранения исследуемых образцов при комнатной температуре и в присутствии низкой концентрации (10^{-5} M) ионов Cu^{2+} , ускоряющих процессы окисления изученных фосфолипидов

При этом этим комплексным частицам соответствовали наибольшие плотность и уровень ассоциации биополимеров (выраженный увеличением молярной массы, M_w , комплексов по

сравнению с M_w конъюгатов) (Таблицы 19, 20). Кроме того, более компактная архитектура случайного клубка ($\rho = 1,7$) для комплексных частиц Кон_М-ЛФХ по сравнению с его более открытой архитектурой ($\rho = 2,0$) для комплексных частиц Кон_S-ЛФХ, по-видимому, также способствовала защите ЛФХ от окисления. Изученные конъюгаты обеспечивали также достаточно высокий уровень защиты от окисления и для инкапсулированных липосом ФХ: степень окисления ФХ в комплексах, содержащих конъюгаты Кон_М и Кон_S, рассчитанная по концентрации МДА, составляла лишь 12 и 14 % соответственно (Рисунок 23). Высокие защитные свойства конъюгатов по отношению к окислению липидов в комплексах можно объяснить тем, что их относительно высокие плотность и уровень ассоциации макромолекул препятствуют диффузии молекул кислорода к ненасыщенным углеводородным цепочкам ФХ и ЛФХ, расположенным в интерьере комплексных частиц. Определяющая роль этих структурных параметров в защитной способности комплексных частиц по отношению к окислению инкапсулированных ими фосфолипидов подтверждается ранее полученными экспериментальными данными, а именно для комплексных частиц, сформированных в водной среде липосомами соевого ФХ с такими белками, как казеинат натрия, β -казеин и α_S -казеин, а также с комплексами казеината натрия и полисахаридов (декстран сульфата и мальтодекстрина SA2) [168]. Более высокая микровязкость липидных слоёв фосфолипидов при встраивании в них гидрофобных участков белка также могли способствовать повышению окислительной стабильности инкапсулированных фосфолипидов.

На основании рассмотренных данных необходимо отметить, что было найдено гораздо больше сходств, чем различий во влиянии структурной организации липосом ФХ и мицелл ЛФХ на формирование и физико-химические свойства их комплексов с ковалентными конъюгатами казеината натрия и мальтодекстринов. Так, все полученные комплексы обладали наноразмерами и характеризовались высокой растворимостью в водной среде, что хорошо согласовывалось с высокой степенью инкапсулирования (>95 %) липосом ФХ и мицелл ЛФХ конъюгатами. При этом комплексообразование фосфолипидов с конъюгатами во всех случаях приводило к увеличению плотности комплексных частиц по сравнению с частицами конъюгатов, что, наряду с более высокой микровязкостью глубоколежащих липидных слоев инкапсулированных ФХ и ЛФХ, способствовало повышению их стабильности к окислению.

В то же время, главным отличием в формировании комплексов ковалентных конъюгатов с фосфолипидами различной структуры и молекулярной организацией можно считать более ярко выраженное влияние мицелл ЛФХ на изменение структурных и термодинамических параметров

комплексных частиц относительно конъюгатов. Этот результат, предположительно, мог быть связан с изменением молекулярной организации индивидуальных мицелл ЛФХ при их комплексообразовании с конъюгатами, сопровождаемым как единовременным высвобождением большого числа отдельных молекул из гидрофобного ядра мицелл, так и их последующей новой кластеризацией в интерьере комплексных частиц. Эти процессы могут приводить к увеличению контактов между молекулами биополимеров, входящими в состав конъюгатов, и молекулами ЛФХ и, как следствие, к увеличению степени ассоциации и плотности комплексных частиц, но, однако, к менее выраженному увеличению микровязкости липидных слоев при встраивании в них гидрофобных участков белка. В случае с липосомами ФХ, на основании полученных данных, в том числе, ДСК и ЭПР, напротив, можно ожидать сохранение целостности их бислоидной структуры в составе супрамолекулярных комплексов с изученными биополимерами.

Тип мальтодекстрина, входящего в состав ковалентного конъюгата, не оказывал значимого влияния на тенденцию изменения таких молекулярных параметров и функциональных свойств конъюгатов при взаимодействии с фосфолипидами, как рост молярной массы, увеличение плотности, растворимость, защиту от окисления.

3.2 Последовательные превращения комплексных частиц и высвобождение из них фосфатидилхолина под действием ферментативного гидролиза в условиях, моделирующих желудочно-кишечный тракт *in vitro*

Цель данной части работы заключалась в характеристике последовательных структурных превращений белок-полисахаридных комплексных частиц с фосфатидилхолином под действием ферментов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в условиях, моделирующих ЖКТ *in-vitro*, и в выяснении ключевых структурных факторов комплексных частиц, ответственных за высвобождение из них фосфатидилхолина (ФХ) [314]. В качестве биополимерной основы были выбраны два типа белок-полисахаридных пар, стабилизированных электростатическими (казеинат натрия (Б) – декстран сульфат (ДС)) или ковалентными ((казеинат натрия (Б) – мальтодекстрин SA-2 = Коn₅) взаимодействиями, с равным весовым отношением белок : полисахарид = 1 : 2.

Ферментативный гидролиз комплексных частиц [Б–ФХ]–ДС и Коn₅–ФХ проводили в условиях переваривания в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) *in-vitro*. Моделирование переваривания включало три стадии: «ротовая полость», «желудок», «тонкий кишечник» (подробные условия проведения эксперимента описаны в п. 2.4.3.1).

Рассмотрим изменения структурных и термодинамических параметров комплексных частиц в процессе их «переваривания» *in vitro* (Рисунок 24, Рисунок 25). Согласно диаграмме распределения по размеру комплексных частиц [Б–ФХ]–ДС (Рисунок 24), полученной с помощью лазерного светорассеяния, на первом этапе переваривания, «во рту», изменений практически не наблюдались («до гидролиза»: R_h изменялся в диапазоне от 191 нм до 271 нм, R_h в максимуме пика распределения по размеру был равен 227 нм. «Переваривание во рту»: R_h изменялся в диапазоне от 160 нм до 271, R_h в максимуме пика распределения по размеру был также равен 227 нм).

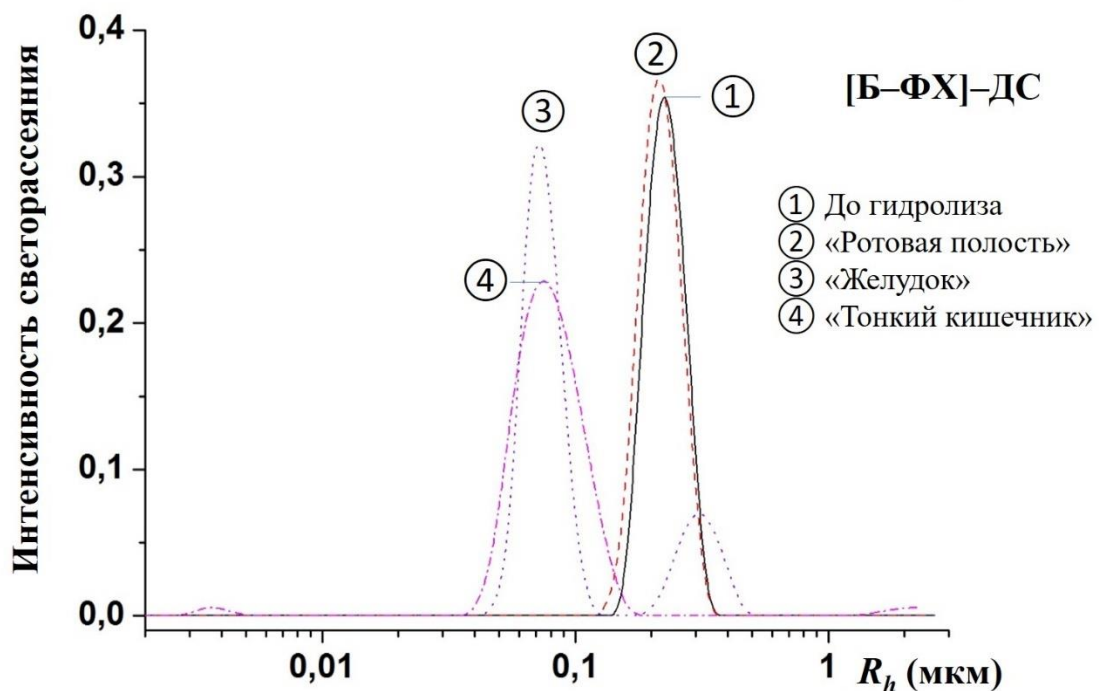


Рисунок 24 – Распределение по размеру комплексных частиц [Б–ФХ]–ДС на разных стадиях их «переваривания» в модельных условиях* ЖКТ

*Условия эксперимента на каждой стадии переваривания указаны в п. 2.4.3.1

В свою очередь, на этапе «желудок» наблюдались существенные изменения: произошло образование новых частиц меньшего и бóльшего размеров (по сравнению с этапами «до гидролиза» и «ротовая полость»). Таким образом, образец в целом стал более полидисперсным (после «переваривания в желудке»: первый пик R_h изменялся в диапазоне от 56 нм до 95 нм, R_h в максимуме пика распределения по размеру был равен 67 нм; второй пик: R_h изменялся в

диапазоне от 227 нм до 384 нм, R_h в максимуме пика распределения по размеру был равен 323 нм). На данной стадии, кроме действия пищеварительных ферментов, добавлялось действие рН, которое, очевидно, приводило к изменению знака заряда белка от отрицательного к положительному при снижении рН среды из области выше ($pH = 7,0$) изоэлектрической точки белка ($pI = 4,6$) до области ниже pI ($pH = 2,0$). В соответствии с литературными данными [315] ожидается, что при рН 2.0 декстран сульфат, по-видимому, был либо слабо-отрицательно заряжен, либо нейтрален. Липосомы ФХ также теряли свой остаточный отрицательный заряд, что в целом могло способствовать комплексообразованию между ферментативно модифицированным белком, ДС и ФХ за счёт ослабления сил электростатического отталкивания между ними, и могло сопровождаться появлением частиц бóльшего размера (по сравнению с этапом «до гидролиза»). В то же время, появление частиц с меньшим размером могло быть следствием протеолиза комплексных частиц под действием пепсина.

На следующем этапе переваривания, в «тонком кишечнике», наблюдалось уменьшение среднего размера частиц (после «переваривания в тонком кишечнике» R_h изменялся в диапазоне от 48 нм до 136 нм, R_h в максимуме пика распределения по размеру был равен 81 нм). Этот результат может быть связан с дальнейшим протеолизом комплексных частиц и одновременным разрывом электростатических контактов между казеинатом натрия и декстран сульфатом, главным образом, в связи с увеличением рН до 8,0 и возрастанием ионной силы до 0,15 М [316].

Для комплексных частиц Кон_S-ФХ (Рисунок 25) на первом этапе переваривания, «ротовая полость», наблюдались также небольшие изменения, что проявлялось в малых смещениях пиков к бóльшим по размеру частицам («до гидролиза»: первый пик: R_h изменялся в диапазоне от 7 нм до 12 нм, R_h в максимуме пика распределения по размеру был равен 8 нм; второй пик: R_h изменялся в диапазоне от 79 нм до 191 нм, R_h в максимуме пика распределения по размеру был равен 113 нм. После «ротовой полости»: первый пик: R_h изменялся в диапазоне от 16 нм до 20 нм, R_h в максимуме пика распределения по размеру был равен 16,5 нм; второй пик: R_h изменялся в диапазоне от 113 нм до 191 нм, R_h в максимуме пика распределения по размеру был равен 134 нм).

На второй стадии переваривания, в «желудке», произошло образование частиц значительно бóльшего размера (после переваривания «в желудке»: первый пик: R_h изменялся в диапазоне от 33 нм до 39,5 нм, R_h в максимуме пика распределения по размеру был равен 33 нм; второй пик: R_h изменялся в диапазоне от 227 нм до 458 нм, R_h в максимуме пика распределения по размеру был равен 323 нм). Этот результат может быть связан с гидрофобной ассоциацией модифицированных протеолизом комплексных частиц.

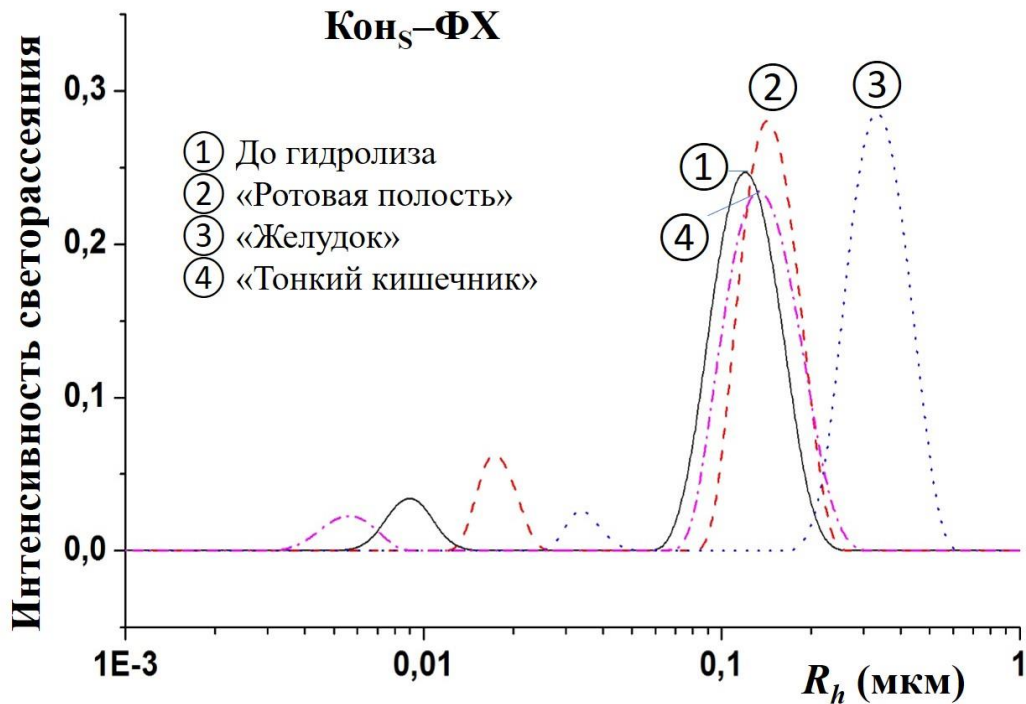


Рисунок 25 – Распределение по размеру комплексных частиц Коn₅-ФХ на разных стадиях их «переваривания» в модельных условиях* ЖКТ

*Условия эксперимента на каждой стадии переваривания указаны в п. 2.4.3.1

На следующей стадии переваривания, в «тонком кишечнике», распределение комплексных частиц по размеру показало уменьшение размера частиц (после переваривания «в тонком кишечнике»): первый пик: R_h изменялся в диапазоне от 4 нм до 7 нм, в максимуме пика распределения по размеру был равен 5,7 нм; второй пик: R_h изменялся в диапазоне от 79,5 нм до 227 нм, в максимуме пика распределения по размеру был равен 134 нм), что свидетельствовало о дальнейшем гидролизе комплексных частиц.

В соответствии с найденным характером изменения размеров комплексных частиц (Рисунок 24 и Рисунок 25), была найдена аналогичная тенденция изменения в термодинамическом средстве комплексных частиц к водной среде в процессе их последовательного «переваривания» в ЖКТ *in-vitro*, что наиболее чётко было выражено при достаточно высоких ионных силах на стадиях «желудка» (0,1 М) и «тонкого кишечника» (0,15 М) (Рисунок 26). Такой результат отражает определяющий вклад эффектов исключённого объёма в парные взаимодействия (т.е. в найденную положительную величину A_2^*) комплексных частиц на стадиях «желудок» и «тонкий

кишечник» в условиях достаточно высоких ионных сил (т.е. экранирования заряда на комплексных частицах противоионами).

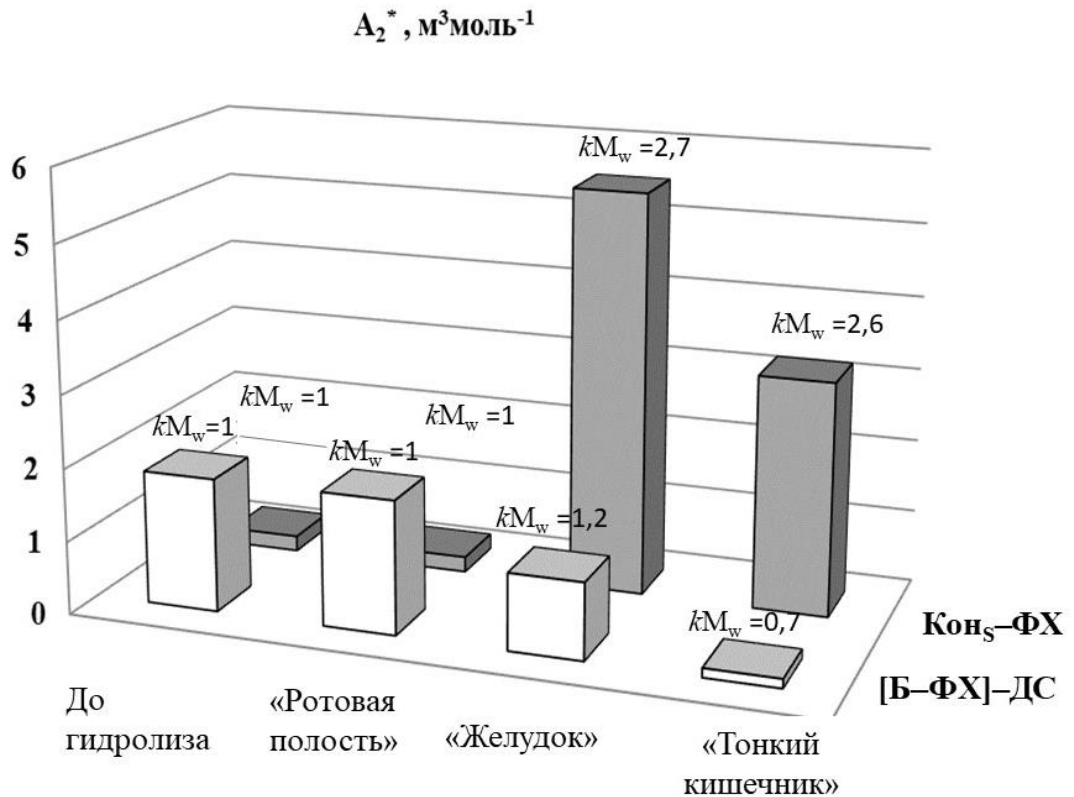


Рисунок 26 – Изменение термодинамического сродства комплексных частиц к водной среде (молярный второй вириальный коэффициент, A_2^*), а также степень их ассоциации (kM_w ¹) на разных стадиях их последовательного «переваривания»² в ЖКТ *in-vitro*

¹ kM_w – это степень ассоциации комплексных частиц, определяемая как отношение средневесовых молярных масс комплексных частиц в модельных условиях ЖКТ *in-vitro* и частиц «до гидролиза».

²Условия эксперимента на каждой стадии переваривания указаны в п. 2.4.3.1

Так, в случае комплексных частиц [Б-ФХ]-ДС, в соответствии с уменьшением их размеров (Рисунок 24) наблюдалось и ярко-выраженное уменьшение положительных значений термодинамического сродства к водной среде, A_2^* (Рисунок 26) на стадиях «желудок» и «тонкий кишечник». Аналогично, для комплексных частиц Конс-ФХ в соответствии с характером изменения их размера (Рисунок 24), наблюдалось и изменение положительных значений A_2^* (Рисунок 26) на стадиях «желудок» и «тонкий кишечник». На стадиях «желудок» и «тонкий кишечник» также наблюдались значительные изменения в архитектуре комплексных частиц (Рисунок 27). Так, для комплексных частиц [Б-ФХ]-ДС их архитектура изменилась от

гелеподобной на первой стадии переваривания во «рту» к архитектуре твёрдой сферы на стадиях «желудок» и «тонкий кишечник». Это может быть, главным образом, связано с возможной нейтрализацией комплексных частиц и их сжатием при $pH = 2,0$ на стадии «желудок» и разрывом электростатических контактов между казеинатом натрия и декстран сульфатом при повышении ионной силы ($I = 0,15 M$) и $pH (8,0)$ на стадии «тонкий кишечник». Напротив, архитектура комплексных частиц на основе ковалентных конъюгатов изменилась от архитектуры твёрдых сфер на первой стадии переваривания в «ротовой полости», к гелеподобной – на стадии «желудок» и далее к достаточно открытой архитектуре случайного клубка на стадии «тонкий кишечник».

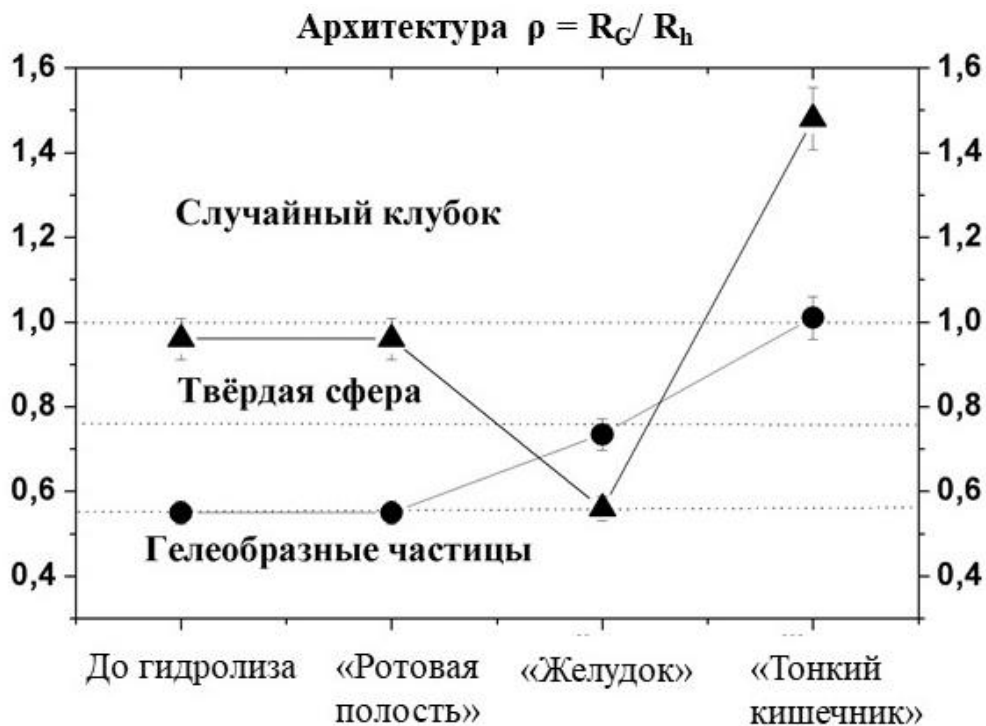


Рисунок 27 – Изменение структурно-чувствительного параметра ρ комплексных частиц на разных стадиях их последовательного «переваривания» в модельных условиях* ЖКТ *in-vitro* [Б–ФХ]–ДС (●); Конс–ФХ (▲)

*Условия эксперимента на каждой стадии переваривания указаны в п. 2.4.3.1

Наблюдаемые изменения размеров (Рисунок 24), молярных масс (k_{Mw}) (Рисунок 26) и архитектуры (Рисунок 27) комплексных частиц привели к значительным изменениям их плотности, d , в модельных условиях ЖКТ *in vitro* (Рисунок 28), а именно к значительному увеличению плотности для комплексных частиц [Б–ФХ]–ДС и, напротив, уменьшению

плотности комплексных частиц Кон_S-ФХ. Однако, несмотря на различное изменение структурных параметров комплексных частиц на каждой стадии их «переваривания» в модельных условиях ЖКТ наблюдалась практически одинаковая степень (около 20 %) высвобождения ФХ из них и только на стадии «тонкий кишечник» (Рисунок 29), т.е. когда частицы имели более открытую архитектуру (Рисунок 27). Найденная невысокая степень высвобождения ФХ из комплексных частиц [Б-ФХ]-ДС и Кон_S-ФХ кардинально отличала их от белковых частиц, инкапсулирующих ФХ, из которых уже на стадии «желудок» высвобождалось практически 100 % ФХ [265]. Такой результат может быть, главным образом, обусловлен существованием в белок-полисахаридных комплексных частицах стерических препятствий для прямого доступа протеаз к молекулам белка из-за присоединённых к последним молекул полисахаридов.

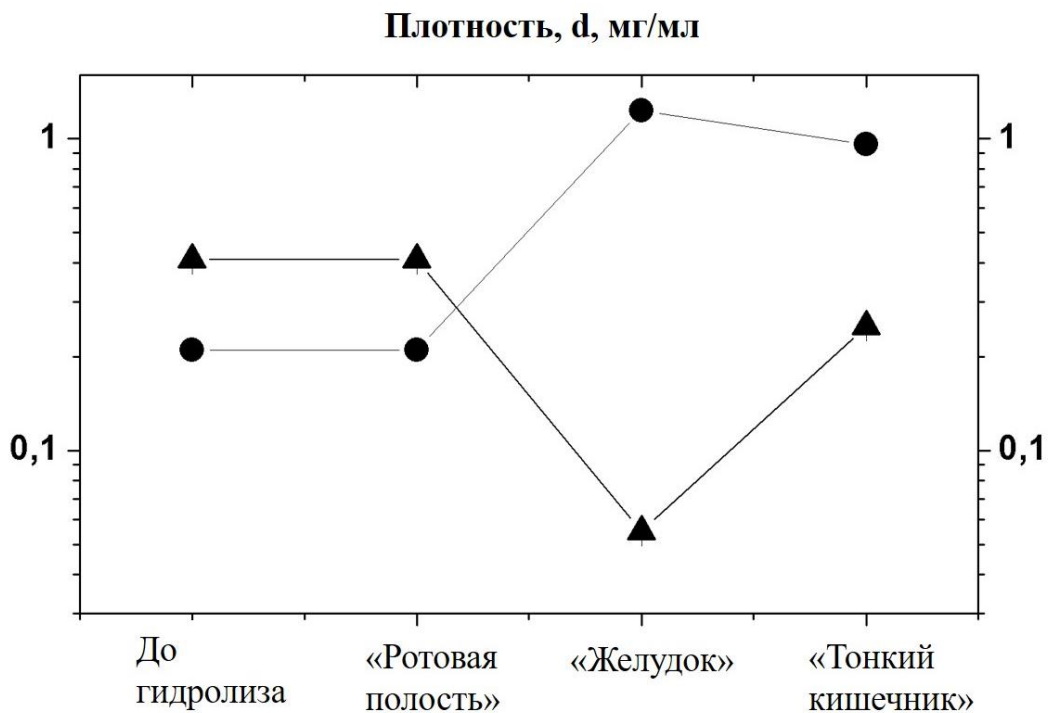


Рисунок 28 – Изменение плотности комплексных частиц на разных стадиях их последовательного «переваривания» в модельных условиях* ЖКТ *in-vitro* [Б-ФХ]-ДС (●); Кон_S-ФХ (▲)

*Условия эксперимента на каждой стадии переваривания указаны в п. 2.4.3.1

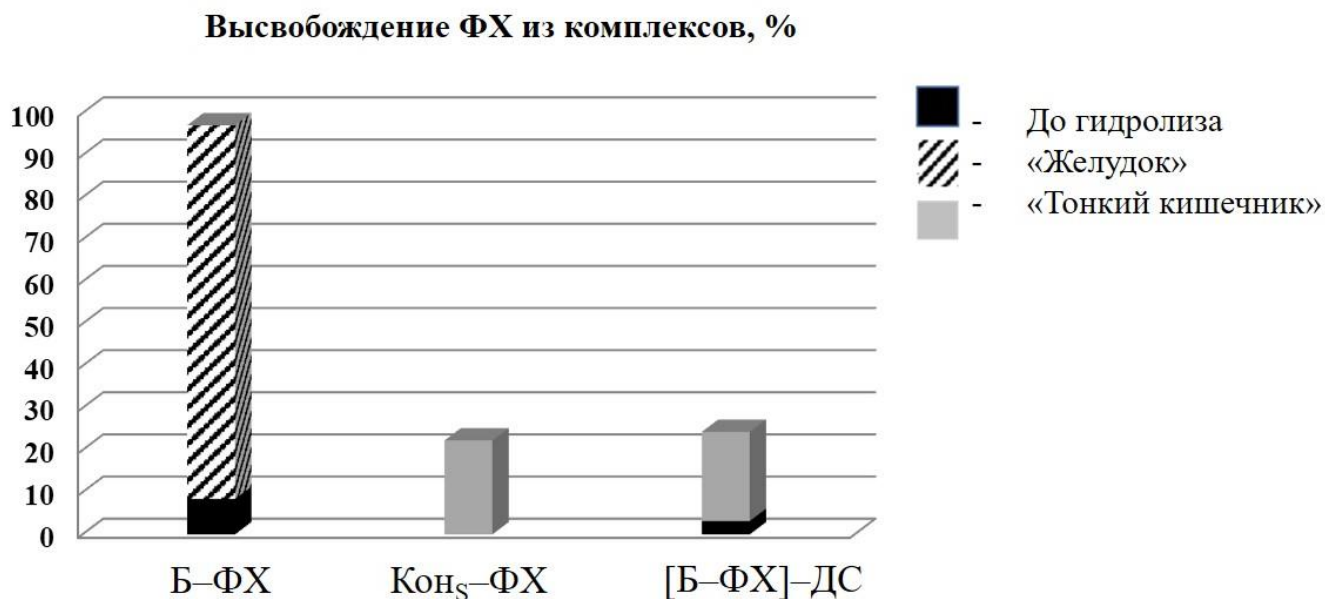


Рисунок 29 – Высвобождение ФХ (%) из белковых (Б-ФХ) и белок-полисахаридных комплексных частиц (Кон_S-ФХ)/[Б-ФХ]-ДС на разных стадиях их последовательного «переваривания» в модельных условиях* ЖКТ *in-vitro*

*Условия эксперимента на каждой стадии переваривания указаны в п. 2.4.3.1

Таким образом, в условиях переваривания желудочно-кишечного тракта *in vitro* происходили значительные изменения структурных и термодинамических параметров комплексных частиц. Вне зависимости от типа стабилизации белок-полисахаридной матрицы и природы полисахаридов эти изменения происходили после стадии «ротовая полость», а именно после воздействия протеаз, кислой среды и увеличения концентрации ионов солей (стадия «желудок»). При этом высвобождение ФХ наблюдалось только на стадии «тонкий кишечник» и в обоих случаях сопровождалось последовательным уменьшением молярной массы частиц.

В то же время наблюдаемые компенсационные эффекты при изменении плотностей и молярных масс комплексных частиц на стадии «желудок» и «тонкий кишечник» (при их сравнении с параметрами «до гидролиза»), связанные, в том числе, с различной чувствительностью биополимерных частиц к ионному окружению, позволяют предположить возможность подбора белок-полисахаридных пар со специфическим характером взаимодействий для создания систем с регулируемой доставкой биологически активных липидов в определённый отдел желудочно-кишечного тракта.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

ТРОЙНЫЕ СИСТЕМЫ: БИОПОЛИМЕР – БИНАРНЫЕ СМЕСИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЛИПИДОВ

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

Как уже было отмечено ранее, α -линоленовая (АЛК) и линолевая (ЛК) полиненасыщенные жирные кислоты относятся к группе эссенциальных (незаменимых) жирных кислот, поскольку не могут быть синтезированы в организме человека и должны поступать с пищей. При этом синтезированные в растениях и затем поступающие с пищей ЛК и АЛК могут превращаться в организме человека в докозапентаеновую (ДПК) и докозагексаеновую (ДГК) кислоты, соответственно, под действием ферментов (десатураз и элонгаз) (п. 1.1.2) [32, 39]. В частности, биотрансформация АЛК в одну из наиболее ценных для организма ДГК напрямую зависит от весового соотношения ЛК и АЛК в пищевом рационе, поскольку, в случае преобладания ЛК, из-за конкуренции между ЛК и АЛК за одни и те же ферменты этот процесс может практически полностью ингибироваться [32, 39, 277]. Более того, высокое весовое соотношение ω -6 : ω -3 (15–20 : 1) ПНЖК, характерное для рациона современного европейского человека, может способствовать развитию различных заболеваний (в том числе, сердечно-сосудистых, нервно дегенеративных, воспалительных и аутоимунных), в то время как увеличение уровня ω -3 ПНЖК, а именно, снижение весового соотношения ω -6 : ω -3 ПНЖК в рационе до уровня 1–1 : 4–1, приводит к обратному эффекту [34, 39]. Поэтому в данных исследованиях мы выбрали такие комбинации биологически активных липидов, которые могли бы обеспечить эквивалентное соотношение ω -6 : ω -3 ПНЖК в пищевом ингредиенте.

Для достижения соотношения ω -6 : ω -3 ПНЖК = 1 : 1 и получения более глубокого понимания влияния структуры липидов на структуру и функциональность их комплексов с ковалентным конъюгатом Кон₅ были выбраны пять комбинаций липидов:

- (1) липосомы соевого ФХ (59 % ЛК, 3 % АЛК) и триглицериды льняного масла (7 % ЛК, 55 % АЛК) → (ФХ–ЛМ);
- (2) мицеллы ЛФХ (44 – 48 % ЛК, 1% АЛК) и триглицериды льняного масла (7 % ЛК, 55 % АЛК) → (ЛФХ–ЛМ);
- (3) смесь индивидуальных жирных кислот АЛК и ЛК → (АЛК–ЛК);
- (4) липосомы соевого ФХ (59 % ЛК, 3 % АЛК) и АЛК → (ФХ–АЛК);

(5) мицеллы ЛФХ (44 – 48 % ЛК, 1% АЛК) и АЛК → (ЛФХ–АЛК).

Дополнительно, на примере липосом ФХ, было исследовано влияние эфирного масла гвоздики (ЭМГ) (добавление 4 % вес/вес к общему содержанию липидов в композициях) на структуру и функциональность их комплексов с ковалентным конъюгатом.

В качестве сравнения в этой части работы также приведены данные для комплекса с ФХ, а именно Конс–ФХ, и Конс–ФХ–ЭМГ в соответствии с соотношением липиды : биополимер = 1 : 10. Основные результаты исследований, полученные в данной главе, опубликованы в работах [317; 318; 319].

4.1.1 Способность ковалентного конъюгата инкапсулировать бинарные смеси биологически активных липидов

Для всех изученных комбинаций липидов (ФХ–АЛК, ФХ–ЛМ, ЛФХ–АЛК, ЛФХ–ЛМ, ЛК–АЛК) был найден высокий уровень (> 95 %) их инкапсулирования ковалентным конъюгатом (Конс) в водной среде в изученных условиях (нейтральный рН = 7,0; ионная сила I = 0,001 М, весовое соотношение биополимер : липиды = 10 : 1). Диаграммы распределения частиц по размеру (а именно, распределение *обогащённых* липосом ФХ (ФХ–АЛК; ФХ–ЛМ) и мицелл ЛФХ (ЛФХ–АЛК, ЛФХ–ЛМ), а также их комплексов с ковалентным конъюгатом), согласно данным динамического светорассеяния, характеризовались появлением новых пиков (Рисунок 30, Рисунок 31) и указывали на формирование наноразмерных частиц. Для комплексных частиц была характерна более низкая полидисперсность по сравнению с конъюгатом, о чём свидетельствуют значительно более узкие распределения комплексных частиц по размерам. Также, как и в случае с фосфолипидами (п. 3.1.2), можно ожидать вклад различных типов внутри- и межмолекулярных взаимодействий (электростатических, водородных связей, гидрофобного притяжения) в формирование комплексов с бинарными смесями липидов [200, 299, 303].

4.1.2 Сравнение структурных и термодинамических параметров комплексных частиц, содержащих ковалентный конъюгат и бинарные смеси липидов

Термодинамические параметры, величины ζ -потенциалов и структурные параметры исследуемых образцов представлены в Таблицах 14–16. Все полученные супрамолекулярные комплексы обладали высокой растворимостью в водной среде в заданных условиях, т.е. все исследуемые растворы комплексов, вне зависимости от состава входящих в них липидов, характеризовались оптической прозрачностью. В основе этого лежало термодинамически

благоприятное сродство комплексных частиц к растворителю, на которое указывали положительные значения второго вириального коэффициента A_2 ($A_2 = 1,65-4,4$) (Таблица 14).

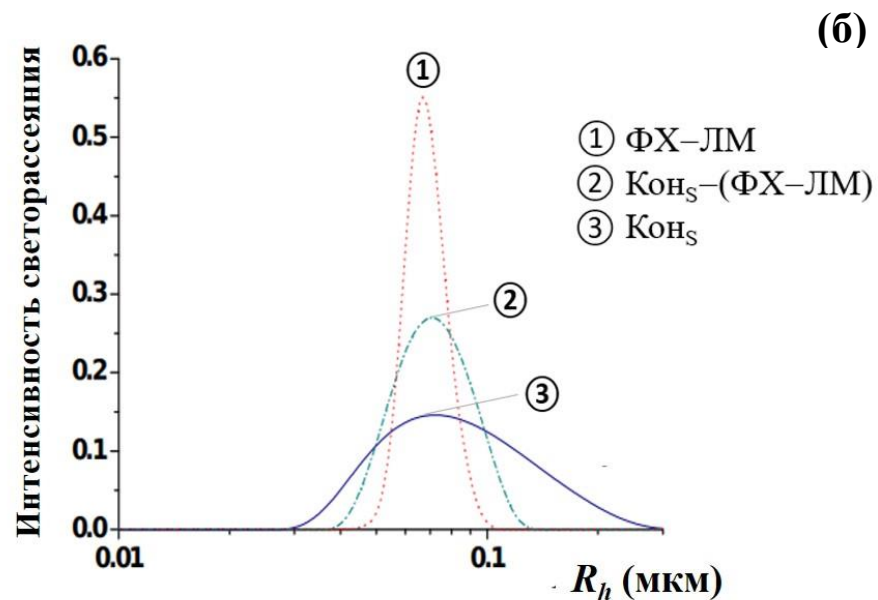
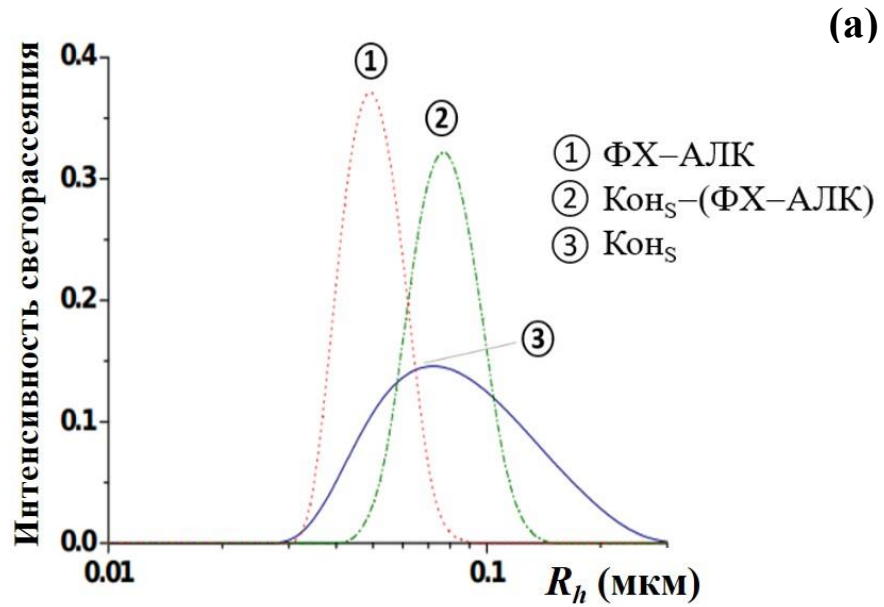
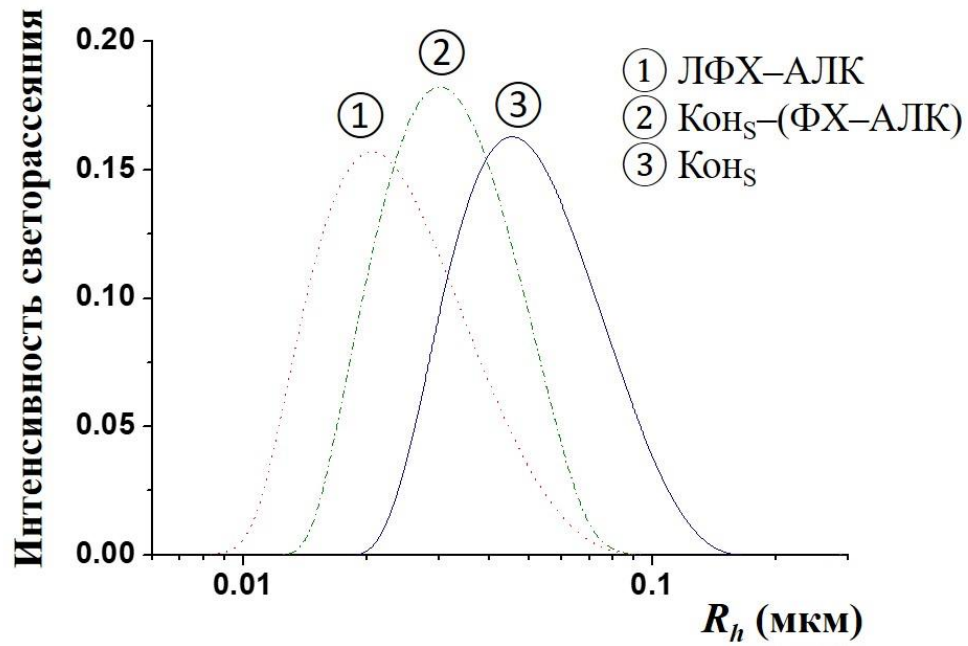


Рисунок 30 – Распределение по размеру липосом ФХ, обогащённых с помощью индивидуальной альфа-линоленовой ПНЖК (ФХ-АЛК) (а) или триглицеридов льняного масла (ФХ-ЛМ) (б), конъюгата Кон_S и их комплексов в водном буферном растворе (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера $I = 0,001$ М; 25 °С)

(a)



(б)

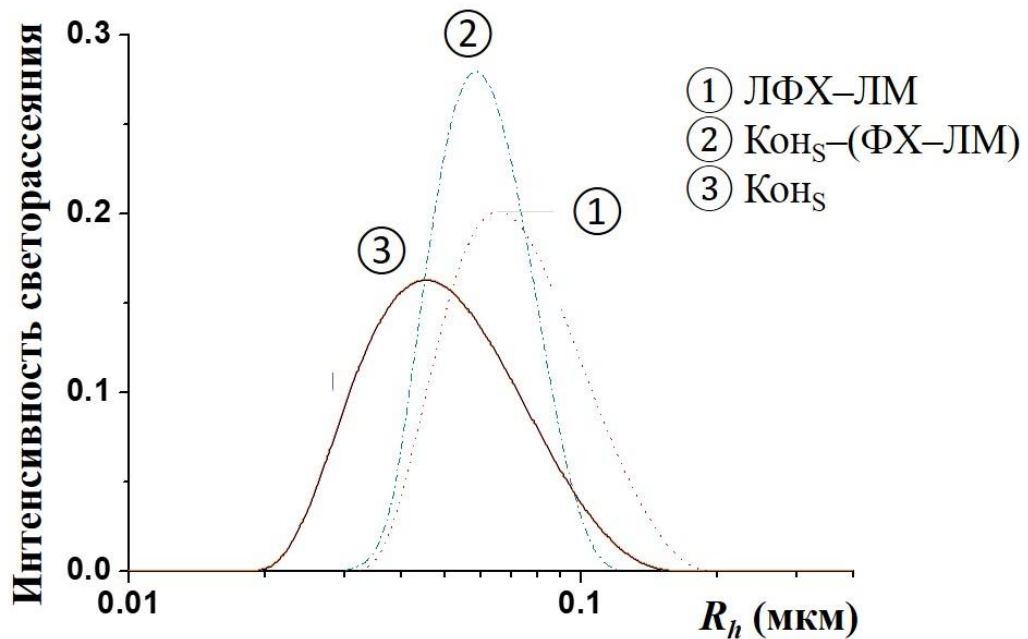


Рисунок 31–Распределение по размеру мицелл ЛФХ, обогащённых с помощью индивидуальной альфа-линоленовой ПНЖК (ЛФХ–АЛК) (а) или триглицеридов льняного масла (ЛФХ–ЛМ) (б), конъюгата KOH_5 и их комплексов в водном буферном растворе ($\text{pH} = 7,0$; ионная сила фосфатного буфера $I = 0,001 \text{ M}$; 25°C)

Также на возрастающее термодинамическое сродство комплексных частиц к водной среде также прямо указывает общая тенденция изменения термодинамического параметра A_2^* (молярного второго вириального коэффициента, A_2^* ($\text{м}^3\text{моль}^{-1}$), рассчитанного из весового (Уравнение 6)), в сторону более положительных значений при формировании комплексов конъюгата с липидами. При этом наблюдается, как правило, преобладающий вклад электростатического отталкивания (положительный вклад $A_2^{\text{эл}}$) над вкладом эффектов исключённого объёма (положительный вклад $A_2^{\text{искл}}$) в положительную величину A_2^* , характеризующую термодинамически неблагоприятные парные взаимодействия комплексных частиц между собой и, напротив, термодинамически благоприятные парные взаимодействия

Таблица 14 – Термодинамические параметры супрамолекулярных комплексов ковалентного конъюгата (Кон_S) с бинарными смесями биологически активных липидов (в отсутствие и в присутствии эфирного масла гвоздики) в водном растворе (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М; 25 °С)

	$A_2 \times 10^5$ ($\text{м}^3\text{моль кг}^{-2}$)	A_2^* ($\text{м}^3\text{моль}^{-1}$)	$A_2^{\text{искл}}$ ($\text{м}^3\text{моль}^{-1}$)	$A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вод}} + A_2^{\text{гидр}}$ ($\text{м}^3\text{моль}^{-1}$)
Кон _S	3,8 ± 0,4	2,8 ± 0,25	7,4 ± 0,7	-4,6 ± 0,4
Кон _S -ФХ	2,4 ± 0,2	17,2 ± 1,5	8,2 ± 0,8	9,0 ± 0,9
Кон _S -(ФХ-АЛК)	2,4 ± 0,2	104,6 ± 9,5	12,0 ± 1,2	92,0 ± 8,1
Кон _S -(ФХ-ЛМ)	2,0 ± 0,2	37,7 ± 3,5	8,8 ± 0,8	28,9 ± 2,5
Кон _S -(ЛФХ-АЛК)	4,4 ± 0,4	3,5 ± 0,35	3,7 ± 0,3	-0,2 ± 0,01
Кон _S -(ЛФХ-ЛМ)	1,7 ± 0,2	13872,2 ± 1380	16,6 ± 1,5	13861 ± 1380
Кон _S -(АЛК-ЛК)	1,7 ± 0,2	3589 ± 355	1063,1 ± 105	2525,2 ± 152
Кон _S -ФХ-ЭМГ	2,2 ± 0,2	48,5 ± 4,8	6,7 ± 0,6	41,8 ± 4,1
Кон _S -(ФХ-АЛК-ЭМГ)	2,4 ± 0,2	240,7 ± 24	24,1 ± 0,2	216,6 ± 21,5
Кон _S -(ФХ-ЛМ-ЭМГ)	1,9 ± 0,2	83,9 ± 8,1	13,9 ± 1,3	70,1 ± 7,0

Таблица 15 – Значения ζ - потенциала липосом ФХ и мицелл ЛФХ (исходных/обогащённых) и их комплексов с ковалентным конъюгатом Кон_S в водном растворе (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М; 25 °С)

Образец	ζ - потенциал		Образец	ζ - потенциал
	Эксперимент (мВ)	Расчёт (мВ)		
Кон _S	- 22,0 ± 2,2			
Кон _S -ФХ	- 22,8 ± 1,2	- 43,7		
Кон _S -(ФХ-АЛК)	- 42,0 ± 4,2	- 66,0	ФХ-АЛК	- 44,0 ± 2,1
Кон _S -(ФХ-ЛМ)	- 42,0 ± 4,2	- 41,1	ФХ-ЛМ	- 19,1 ± 1,3
Кон _S -(ЛФХ-АЛК)	- 30,0 ± 3,0	- 59,0	ЛФХ-АЛК	- 37,0 ± 1,8
Кон _S -(ЛФХ-ЛМ)	- 51,5 ± 5,1	- 49,1	ЛФХ-ЛМ	- 27,1 ± 1,1
Кон _S -(АЛК-ЛК)	- 19,3 ± 2,0		ФХ	- 21,0 ± 1,2
Кон _S -ФХ-ЭМГ	- 34,0 ± 3,4		ЛФХ	- 23,6 ± 1,1
Кон _S -(ФХ-АЛК-ЭМГ)	- 42,0 ± 4,2			
Кон _S -(ФХ-ЛМ-ЭМГ)	- 35,0 ± 3,5			

комплексных частиц с растворителем, что хорошо согласуется с их более высоким ζ - потенциалом (от -30,0 В до -51,5 В) по сравнению с частицами чистого конъюгата (- 22,0 В) (Таблица 15).

В свою очередь, отрицательную величину ($A_2^{эл} + A_2^{вод} + A_2^{гидр}$), обнаруженную для комплексных частиц Кон_S-(ЛФХ-АЛК), по-видимому, можно объяснить возможно большей доступностью гидрофобных участков, полярных групп и противоположных зарядов для межмолекулярного притяжения этих комплексных частиц в водной среде, связанную с их более открытой архитектурой ($\rho = 3,0$) (Таблица 16). Рассмотрим подробнее влияние бинарных смесей биологически активных липидов на структурные параметры конъюгата Кон_S, сравнивая его со структурными параметрами полученных комплексов (Таблица 16).

Таблица 16 – Структурные параметры супрамолекулярных комплексов ковалентного конъюгата (Кон_S) с бинарными смесями биологически активных липидов в отсутствие и в присутствии эфирного масла гвоздики (ЭМГ), а также размеры *обогащённых* липосом ФХ и мицелл ЛФХ, в водном растворе (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М; 25 °С)

	$M_w \times 10^{-6}$ (Да)	R_G (нм)	R_h (нм)	$\rho =$ R_G/R_h	d (мг/мл)
Кон _S	6,0 ± 0,5	125 ± 6,5	70 ± 3,5	1,8 ± 0,05	1,2 ± 0,06
Кон _S -ФХ	19,0 ± 2,0	163 ± 8,5	74 ± 3,6	2,2 ± 0,05	1,7 ± 0,08
Кон _S -(ФХ-АЛК)	46,3 ± 4,6	193 ± 9,5	84 ± 4,2	2,3 ± 0,04	2,5 ± 0,12
Кон _S -(ФХ-ЛМ)	30,7 ± 3,0	129 ± 6,5	76 ± 3,8	1,7 ± 0,04	5,6 ± 0,28
Кон _S -(ЛФХ-АЛК)	6,3 ± 0,6	129 ± 6,5	43 ± 2,1	3,0 ± 0,07	6,8 ± 0,31
Кон _S -(ЛФХ-ЛМ)	648,5 ± 65	325 ± 16	60 ± 3,0	5,6 ± 0,12	156,0 ± 7,4
Кон _S -ФХ-ЭМГ	33,2 ± 3,3	141 ± 7,0	70 ± 3,5	2,0 ± 0,04	4,7 ± 0,25
Кон _S -(ФХ-АЛК-ЭМГ)	71,0 ± 7,1	249 ± 12	83 ± 4,1	3,0 ± 0,05	10,8 ± 0,51
Кон _S -(ФХ-ЛМ-ЭМГ)	47,0 ± 4,7	150 ± 7,5	88 ± 4,2	1,7 ± 0,03	5,5 ± 0,28
Кон _S -(АЛК-ЛК)	324,9 ± 32	165 ± 8,5	375 ± 15,8	0,4 ± 0,01	28,7 ± 0,14
ФХ-АЛК	—	—	50	—	—
ФХ-ЛМ	—	—	65	—	—
ЛФХ-АЛК	—	—	20	—	—
ЛФХ-ЛМ	—	—	60	—	—

(1) Из полученных данных следует, что комплексообразование *обогащённых* липосом ФХ (ФХ-АЛК, ФХ-ЛМ), *обогащённых* мицелл ЛФХ (ЛФХ-АЛК, ЛФХ-ЛМ) и индивидуальных жирных кислот (АЛК-ЛК) приводило к *ещё более ярко выраженной ассоциации* частиц конъюгата (возрастание значений M_w , Таблица 16), что указывает на действие изучаемых липидов как эффективных межмолекулярных сшивающих агентов. При этом наиболее значительная ассоциация проявлялась для мицелл ЛФХ, *обогащённых* триглицеридами ЛМ ($M_w = 648,5 \times 10^6$ Да), а также для эквимассовой смеси АЛК и ЛК ($M_w = 324,9 \times 10^6$ Да).

(2) Важно отметить, что незначительное увеличение размеров комплексных частиц ($R_G = 141-325$ нм для комплексов по сравнению с $R_G = 125$ нм для конъюгата) на фоне высокого

роста молярной массы ($M_w = 6,3-648,5 \times 10^6$ Да для комплексов по сравнению с $M_w = 6,0 \times 10^6$ Да для конъюгата) 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 наиболее значительный 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, аналогичный эффект наблюдался при комплексообразовании конъюгата с исходными липосомами ФХ ($d = 1,9$ мг/мл) и мицеллами ЛФХ ($d = 2,9$ мг/мл) (Таблица 10). С другой стороны, обогащение фосфолипидов триглицеридами ЛМ в обоих случаях приводило к большему росту плотности комплексных частиц по сравнению с включением АЛК (Таблица 16). В целом важно отметить, что проявляемый рост плотности частиц конъюгата указывает на действие изучаемых липидов как эффективных внутримолекулярных сшивающих агентов.

(3) Включение эфирного масла гвоздики в состав липосом ФХ (исходных/*обогащённых*) способствовало *еще более выраженной ассоциации* конъюгата (Таблица 16). При этом тенденция влияния липидного состава липосом ФХ на значения молярной массы (M_w) комплексных частиц строго повторялась, а именно, соответствовала ряду $\text{Кон}_S-(\text{ФХ}-\text{ЭМГ}) < \text{Кон}_S-(\text{ФХ}-\text{ЛМ}-\text{ЭМГ}) < \text{Кон}_S-(\text{ФХ}-\text{АЛК}-\text{ЭМГ})$ (т.е. аналогично $\text{Кон}_S-\text{ФХ} < \text{Кон}_S-(\text{ФХ}-\text{ЛМ}) < \text{Кон}_S-(\text{ФХ}-\text{АЛК})$).

(4) Важной отличительной чертой комплексных частиц, полученных в результате взаимодействия ковалентного конъюгата с *обогащёнными* мицеллами ЛФХ, является их анизотропная архитектура ($\rho = 3,0$ для $\text{Кон}_S-(\text{ЛФХ}-\text{АЛК})$ и $\rho = 5,6$ для $\text{Кон}_S-(\text{ЛФХ}-\text{ЛМ})$), по сравнению с формой, близкой к случайному клубку ($\rho = 2,3$ для $\text{Кон}_S-(\text{ФХ}-\text{АЛК})$) ($\rho = 1,7$ для $\text{Кон}-(\text{ФХ}-\text{ЛМ})$), характерной для конъюгата ($\rho = 1,7$) (Таблица 16). Наиболее анизотропная форма, присущая $\text{Кон}_S-(\text{ЛФХ}-\text{ЛМ})$, по всей видимости, является следствием электростатических взаимодействий (а именно отталкивания) между близко расположенными отрицательно заряженными функциональными группами комплекса. Этот результат хорошо коррелирует, с одной стороны, с наибольшей абсолютной величиной отрицательного значения ζ -потенциала ($-51,5$ мВ) (Таблица 15), а с другой – с исключительно высоким положительным электростатическим вкладом ($A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вод}} + A_2^{\text{водр}} = 13861 \text{ м}^3 \text{ моль}^{-1}$) в величину молярного второго вириального коэффициента A_2^* (Таблица 14).

(5) Здесь также важно отметить, что меньшие значения экспериментальных ζ -потенциалов комплексов по сравнению с расчётными (суммарными) значениями конъюгата и липидов

(Таблица 15), найденные при обогащении липосом ФХ и мицелл ЛФХ с помощью индивидуальной АЛК, свидетельствуют о существенном вкладе электростатического притяжения между противоположно заряженными группами липосом ФХ–АЛК/ЛФХ–АЛК и конъюгата при формировании комплексов. При этом, сравнивая абсолютные значения ζ -потенциала обогащённых липосом ФХ–АЛК (– 44,0 мВ) и мицелл ЛФХ–АЛК (– 37,0 мВ) со значениями для исходных липосом ФХ (– 21,0 мВ) и мицелл (– 23,6 мВ) (Таблица 15), можно сделать вывод о том, что такой рост величин ζ -потенциалов связан с встраиванием гидрофобных углеводородных цепочек молекул АЛК (обладающих дополнительным отрицательным зарядом) в бислои ФХ или липидный слой ЛФХ с одновременным экспонированием заряженных карбоксильных групп АЛК в водную среду.

В случае с обогащением липосом ФХ и мицелл ЛФХ триглицеридами ЛМ, напротив, не наблюдалось значительных изменений величины ζ -потенциала (–19,1 мВт для ФХ–ЛМ и – 27,1 мВт для ЛФХ–ЛМ). При этом отмечалось соответствие между экспериментальными и расчётными значениями ζ -потенциала для соответствующих комплексов с конъюгатом, что свидетельствует о существенном вкладе сил другой природы, скорее всего гидрофобного притяжения между неполярными участками молекул, в формирование комплексов.

(6) В случае с Ко_нС–(АЛК–ЛК) была установлена интересная особенность, а именно формирование гелеобразной архитектуры комплексной частицы ($\rho = 0,44$ (Таблица 14)), с переплетающимися молекулярными цепочками отдельных компонентов [275].

Рассмотрим этот случай подробнее.

Известно, что механизм формирования ассоциатов любой природы может быть охарактеризован по степенной зависимости молекулярной массы, M_w , ассоциата от его размеров, (радиуса, R) [275]:

$$M_w = KR^{d^*}, \quad (13)$$

где показатель степени d^* означает размерность фрактала – геометрической фигуры, обладающей свойством самоподобия, то есть составленной из нескольких частей, каждая из которых подобна всей фигуре целиком. Такой фрактал используется для описания пространственной структуры сформированных ассоциатов при помощи легко задаваемых геометрических моделей [275];

К - это предэкспоненциальный множитель, который увеличивается с ростом плотности элементарной единицы ассоциата [320].

На основании Уравнения (13), используя определённую размерность фрактала, d^* , можно охарактеризовать механизм формирования супрамолекулярных комплексных частиц [100]:

$$k_{M_w} = k_R^{d^*}, \quad (14),$$

где k_{M_w} - степень увеличения размера комплексных частиц по сравнению с размером конъюгата ($k_{M_w} = M_w^{\text{комплекс}} / M_w^{\text{конъюгат}}$, где $M_w^{\text{комплекс}}$ - средневесовая молярная масса комплекса, $M_w^{\text{конъюгат}}$ - средневесовая молярная масса конъюгата);

k_R - степень ассоциации частиц конъюгата в комплексную частицу с липидами ($k_R = R^{\text{комплекс}} / R^{\text{конъюгат}}$, где $R^{\text{комплекс}}$ - радиус инерции комплекса, $R^{\text{конъюгат}}$ - радиус инерции конъюгата).

Найденное, согласно Уравнению (14), близкое соответствие между значениями k_{M_w} и k_{R_h} при $d^* = 3,5$ (Таблица 17) указывает на сжатие частиц конъюгата в процессе формирования их супрамолекулярных комплексов с молекулами жирных кислот (АЛК и ЛК). Такое сжатие было, по всей вероятности, обусловлено образованием многочисленных нековалентных связей (множественных внутренних сшивок) в интерьере молекул конъюгата при взаимодействии молекул конъюгата с АЛК и ЛК.

Таблица 17– Теоретическая оценка механизма ассоциации частиц ковалентного конъюгата Кон_S при формировании их супрамолекулярных комплексов с эквивалентной смесью АЛК– ЛК в водной среде (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М, 25⁰С)

$k_{M_w}^1$	$k_{R_h}^{d^*}$			
	Линейная ассоциация	Случайная ассоциация	Ассоциация с формированием более плотной оболочки вокруг ядра ассоциата	Сжатие полимерных частиц при их ассоциации
	$d^* = 1$	$d^* = 2,5$	$d^* = 3,0$	$d^* = 3,5$
51	3	15	27	46

¹ $k_{M_w} = M_w^{\text{комплекс}} / M_w^{\text{конъюгат}}$, где k_{M_w} - степень ассоциации частиц конъюгата;

$M_w^{\text{комплекс}}$ - средневесовая молярная масса комплекса (Кон_S-(АЛК-ЛК));

$M_w^{\text{конъюгат}}$ - средневесовая молярная масса конъюгата (Кон_S).

На основе данных о структурных параметрах комплексных частиц, включающих бинарные смеси липидов и ковалентного конъюгата, которые были получены с помощью лазерного статического и динамического светорассеяния (а именно данных о средневесовой молярной массе M_w ; плотности d ; архитектуре ρ ; размерах R_G и R_h), мы предположили и визуализировали пространственное строение образованных комплексных частиц (Рисунок 32).

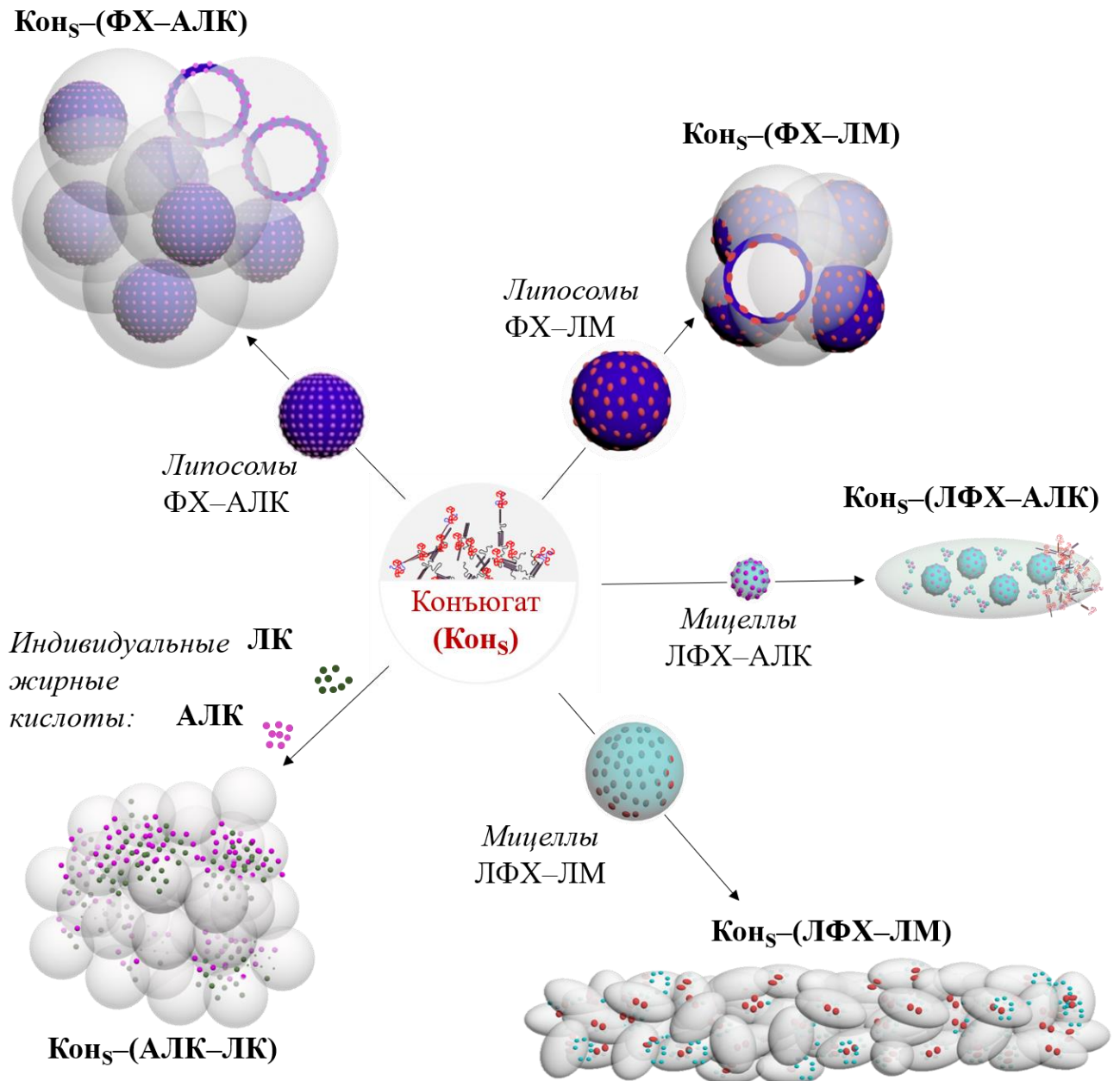


Рисунок 32 – Схематичное представление пространственного строения комплексных частиц между бинарными смесями биологически активных липидов и ковалентным конъюгатом, согласно данным статического и динамического лазерного светорассеяния

4.1.3 Оценка структурно-динамического состояния липидных слоёв фосфолипидов методом электронного парамагнитного резонанса

Для более глубокого понимания влияния АЛК, ЛМ и ЭМГ на локальную структуру липосом ФХ и мицелл ЛФХ была проведена оценка микровязкости липидных слоёв фосфолипидов при помощи измеренных времён вращательной корреляции, τ_c , 16- доксилстеаринового зонда (16- ДСК) методом ЭПР [284]. Согласно полученным данным (Таблица 18), обогащение липосом ФХ и мицелл ЛФХ как триглицеридами ЛМ, так и АЛК приводило к значительному уменьшению микровязкости их липидных слоёв, о чём свидетельствует снижение времени вращательной корреляции, τ_c , зонда 16-ДСА. При этом наиболее выраженное уменьшение микровязкости было отмечено в случае с липосомами ФХ, обогащёнными с помощью индивидуальной АЛК. Этот результат обусловлен увеличением доли ненасыщенных углеводородных цепочек АЛК/триглицеридов ЛМ в составе липидных слоёв липосом ФХ и мицелл ЛФХ, что может являться дополнительным доказательством встраивания в них липидов.

Таблица 18– 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)	\pm	%*	Образец	$\tau_c \times 10^{10}$ (сек)	\pm	%*
ФХ контроль	10,10	0,20	100				
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				
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

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

Присутствие эфирного масла гвоздики приводило лишь к небольшому повышению микровязкости липидных слоёв (Таблица 18). Инкапсулирование *обогащённых* липосом ФХ и мицелл ЛФХ, напротив, сопровождалось существенным увеличением времени вращательной корреляции, τ_c , зонда 16-ДСК, а значит и микровязкости их липидных слоёв, что, по всей вероятности, было связано с встраиванием гидрофобных участков конъюгата в липидные слои, вызывающим уплотнение, и потому упорядочивание в них гидрофобных цепочек липидов [311].

Полученные результаты находятся в хорошем соответствии с литературными данными, согласно которым увеличение уровня общей ненасыщенности липидных бислоев приводит, в целом, к уменьшению их микровязкости, в то время как добавление белков – напротив, к её увеличению [311]. В то же время, менее выраженное влияние формирования комплексов на микровязкость липидных слоёв мицелл ЛФХ может быть связано с их возможной реорганизацией в интерьере комплексных частиц в новые кластеры с менее плотной упаковкой [100, 151, 312].

4.1.4 Оценка фазового состояния бислоев липосом ДПФХ методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Влияние увеличения доли полиненасыщенных алкильных цепей на структурное состояние бислоев фосфолипидов также проявлялось в исследованиях ДСК. Так, во-первых, было отмечено уменьшение энтальпии фазового перехода при включении ЛМ/АЛК в липосомы ДПФХ, о чём свидетельствует уменьшение площади под эндотермическим пиком (Рисунок 33), особенно выраженное для липосом, обогащённых АЛК (т.е. ДПФХ–АЛК). Во-вторых, наблюдалось уменьшение кооперативности фазового перехода, проявляющееся, в частности, в гораздо более широком температурном интервале фазового перехода, инициируемого при более низкой температуре ($t_{\text{переход}} = 39\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Рисунок 33, Таблица 19) и сопровождаемого появлением дополнительного эндотермического пика для обогащённых липосом с триглицеридами льняного масла (ДПФХ–ЛМ), что, согласно литературным данным, характерно для смесей неоднородных липидов [154]. Таким образом, сопоставление данных ЭПР и ДСК, а именно значительное уменьшение микровязкости фосфолипидных слоёв в присутствии АЛК/ЛМ, и исчезновение ярко выраженного эндотермического пика даёт нам основание однозначно утверждать об изменении жирнокислотного состава обогащённых липосом ФХ и мицелл ЛФХ в сторону увеличения полиненасыщенных алкильных цепей и, как следствие, переходу фосфолипидных «хвостов» к

менее упорядоченному жидкокристаллическому состоянию как в присутствии, так и отсутствие ЭМГ.

Таблица 19 – Термодинамические параметры фазового перехода от гелеподобного к жидкокристаллическому состоянию бислоя липосом ДПФХ (исходных/обогащённых) в водной среде (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 M)

Образец	$t_{переход}$ ($^{\circ}\text{C}$)	Δt ($^{\circ}\text{C}$)	$h_{пик}$ (условные единицы)	$\Delta H_{переход}$ (Дж/г)
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	$1,0 \pm 0,05$	$2,45 \pm 0,1$

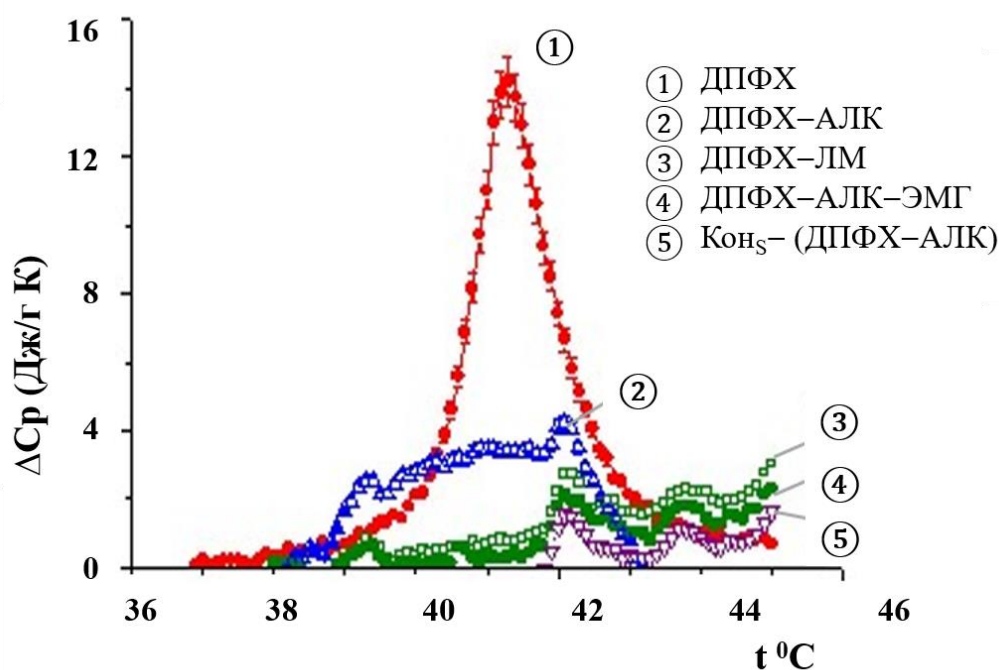


Рисунок 33 – Термограммы фазового перехода бислоя липосом дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) в присутствии α -линоленовой кислоты (АЛК), триглицеридов льняного масла (ЛМ), эфирного масла гвоздики (ЭМГ), ковалентного конъюгата (КонS) (0,5 вес/объем %) в водном растворе фосфатного буфера (рН = 7,0; ионная сила I = 0,001 M)

Здесь также важно отметить, что инкапсулирование ковалентным конъюгатом не оказывало влияние на термодинамические параметры фазового перехода. При этом отсутствие ярко выраженного эндотермического пика, по всей видимости, свидетельствует о сохранении жидкокристаллического состояния бислоёв *обогащённых* липосом (как инкапсулированных, так и неинкапсулированных) уже при комнатной температуре.

4.1.5 Оценка размеров липосом ФХ методом атомно-силовой микроскопии

Влияние различных компонентов на размеры исходных липосом фосфатидилхолина было дополнительно оценено методом атомно-силовой микроскопии (Таблица 20, Рисунок 34). Так, полученные результаты указывали на значительное уменьшение размеров (площади поперечного сечения, S , и объема, V) *обогащённых* липосом (ФХ–АЛК ($0,016 \text{ мкм}^2$), ФХ–ЛМ ($0,008 \text{ мкм}^2$)) по сравнению с исходными липосомами ФХ ($0,079 \text{ мкм}^2$). Такое уменьшение размеров липосом при обогащении полиненасыщенными липидами могло быть следствием уменьшения микровязкости липидных слоёв таких липосом, что способствовало бóльшей степени (по сравнению с исходными липосомами ФХ) их диспергируемости в процессе гомогенизации и экструзии (п. 2.2.1). Интересно отметить, что эффект уменьшения размеров липосом был более ярко выражен в присутствии ЭМГ (ФХ–ЭМГ ($S = 0,029 \text{ мкм}^2$), ФХ–(АЛК–ЭМГ) ($S = 0,009 \text{ мкм}^2$)).

Таблица 20 – 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

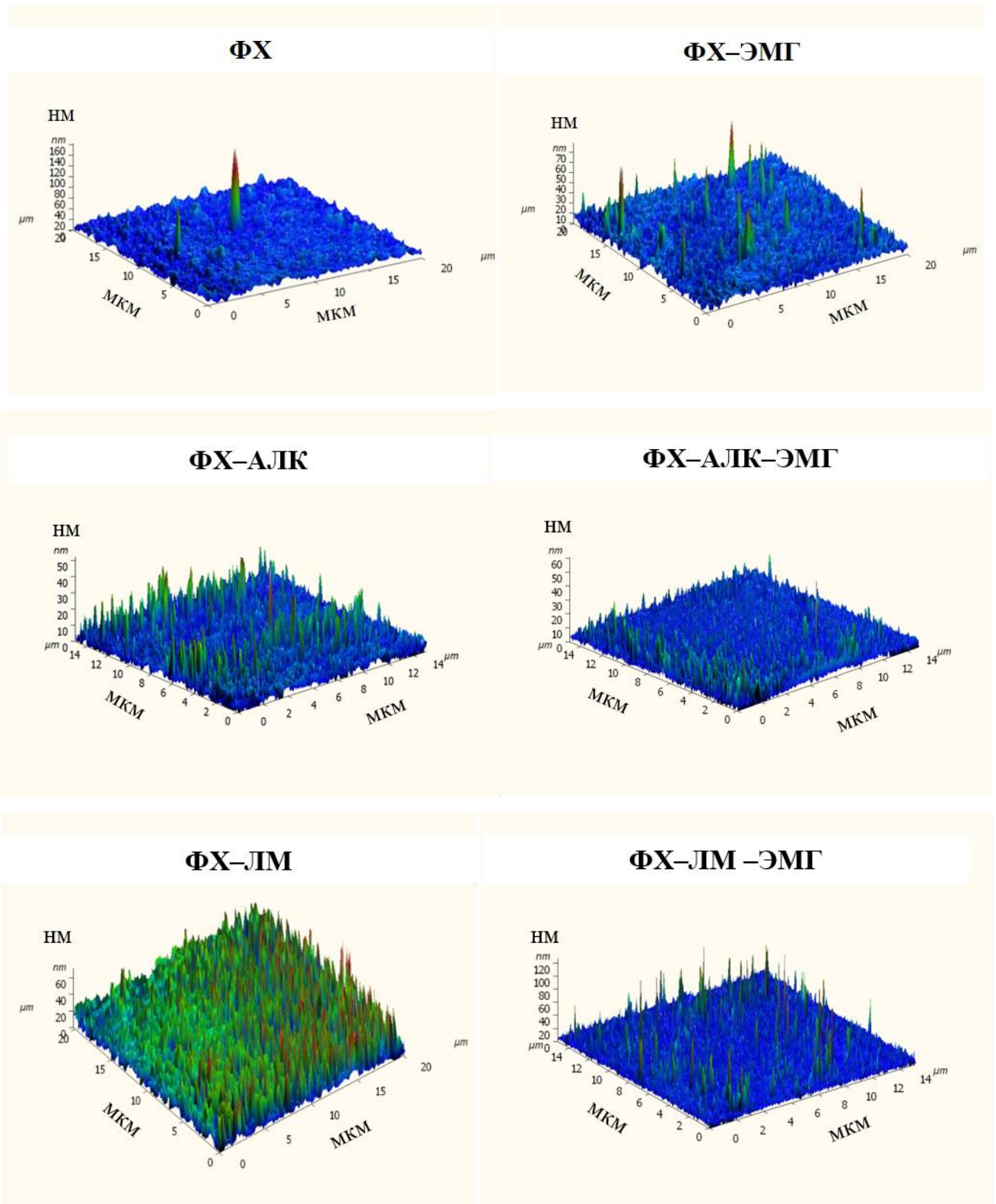


Рисунок 34 – Трёхмерные имидж-модели липосом фосфатидилхолина (ФХ) (исходных/обогащённых) в отсутствие и в присутствии эфирного масла гвоздики (ЭМГ), согласно данным атомно-силовой микроскопии

4.1.6 Оценка влияния ковалентных конъюгатов и растительного антиоксиданта на перекисное окисление биологически активных липидов

В данной части представлены данные, отражающие накопление первичных (диеновых гидроперекисей) и вторичных (малонового диальдегида) продуктов перекисного окисления бинарных смесей биологически активных липидов в неинкапсулированном виде, а также в составе супрамолекулярных комплексов с ковалентным конъюгатом Ко_{НС}.

Согласно полученным результатам, наиболее высокое содержание МДА было найдено в растворах фосфолипидов, содержащих льняное масло (Таблица 21). Так, например, уже на третьи сутки хранения уровень МДА в образцах неинкапсулированных липосом ФХ–ЛМ достиг максимальной концентрации за изученный период и составил 34,3 нмоль/мл (Таблица 21).

Одновременно с высоким уровнем МДА, об интенсивном процессе ПОЛ в данных образцах также свидетельствуют относительно высокие значения индекса окисленности D_{232}/D_{215} для экстракта ФХ–ЛМ в диэтиловом эфире ($D_{232}/D_{215} = 1,18$ на 3-и сутки) (Таблица 21), отражающие накопление относительно неустойчивых диеновых гидроперекисей. В случае с остальными неинкапсулированными липидами (а именно, комбинациями ЛФХ–ЛМ, ЛФХ–АЛК, ФХ–АЛК, АЛК–ЛК) также наблюдался высокий уровень концентрации МДА ($C_{МДА} = 26,0 - 58,9$ нмоль/мл)

Таблица 21 – 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 водной среде (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М) в течение 21 суток при комнатной температуре на свету

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

(Таблица 21). При этом интересно отметить, что в целом, в случае *обогащённых* мицелл (ЛФХ–ЛМ, ЛФХ–АЛК) количество образующегося МДА постепенно росло (Таблица 21, Рисунок 35), в то время как для *обогащённых* липосом (ФХ–ЛМ, ФХ–АЛК) к окончанию исследуемого периода хранения наблюдался спад концентрации МДА. На примере ФХ–АЛК нам также удалось выявить аналогичную тенденцию накопления и спада первичных продуктов ПОЛ в процессе хранения (Рисунок 36 а), а именно диеновых гидроперекисей и кетодиенов, выраженные через значения индексов окисленности D_{232}/D_{215} и D_{272}/D_{215} соответственно. Такой характер кривой и диаграммы (а именно ярко выраженные максимумы и дальнейший спад концентрации продуктов ПОЛ), по всей видимости, может свидетельствовать о переходе к дальнейшим, более глубоким процессам перекисного окисления.

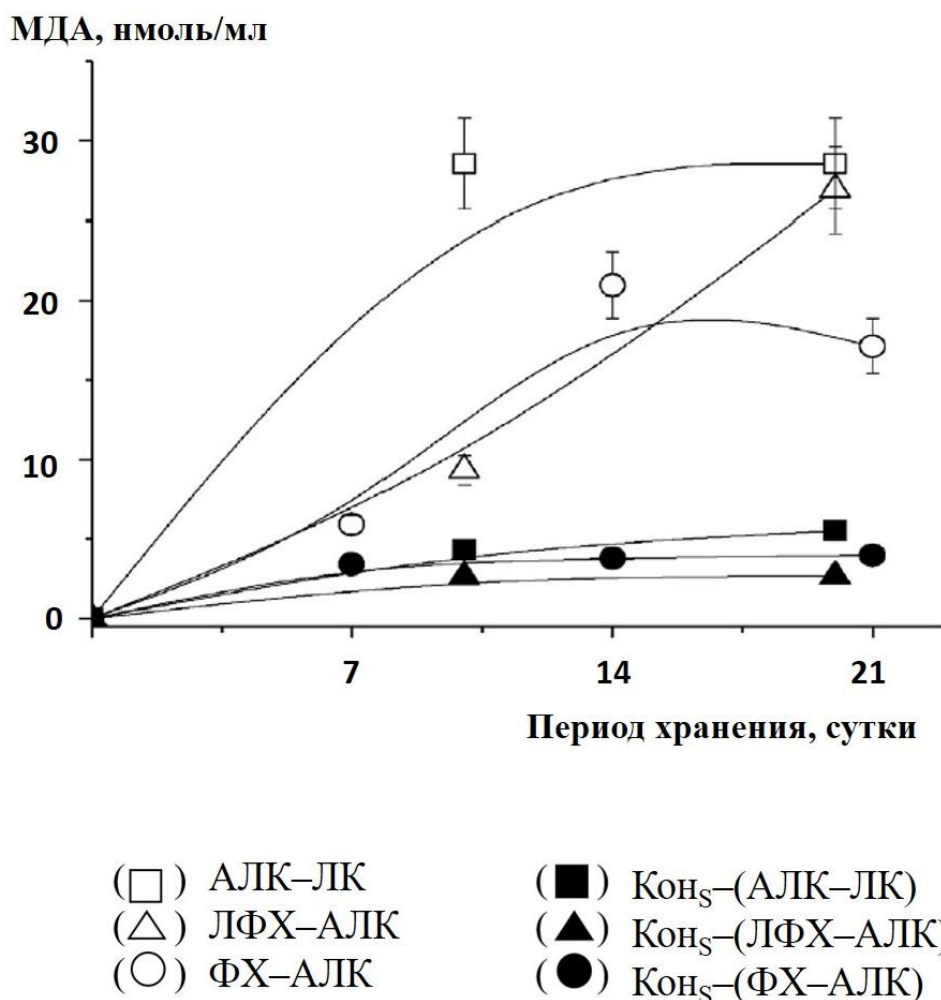


Рисунок 35 – Концентрация малонового диальдегида (МДА), найденная в образцах неинкапсулированных липидов, а также в их комплексах с ковалентным конъюгатом КоH₅ в процессе хранения в водной среде (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М) (при комнатной температуре, на свету)

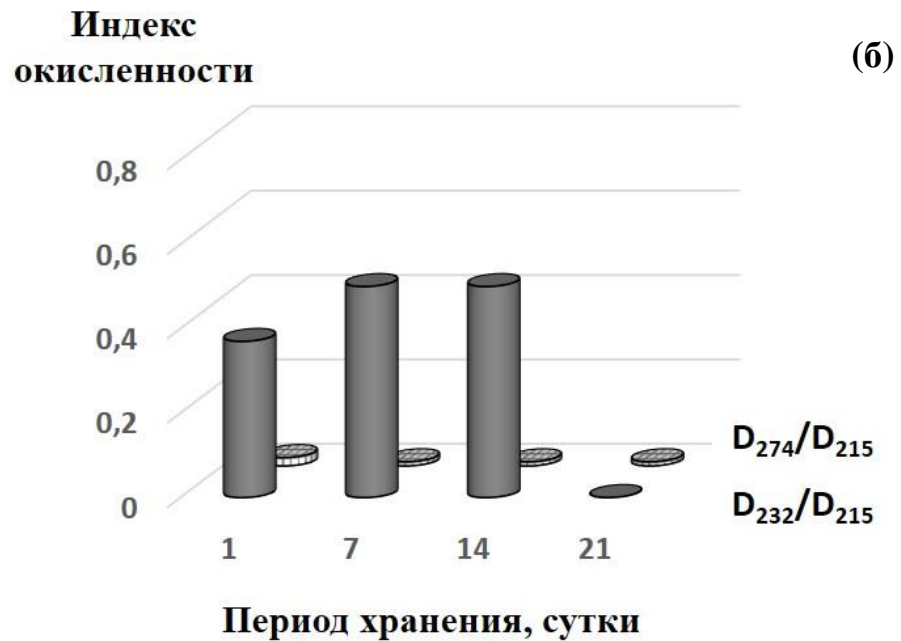
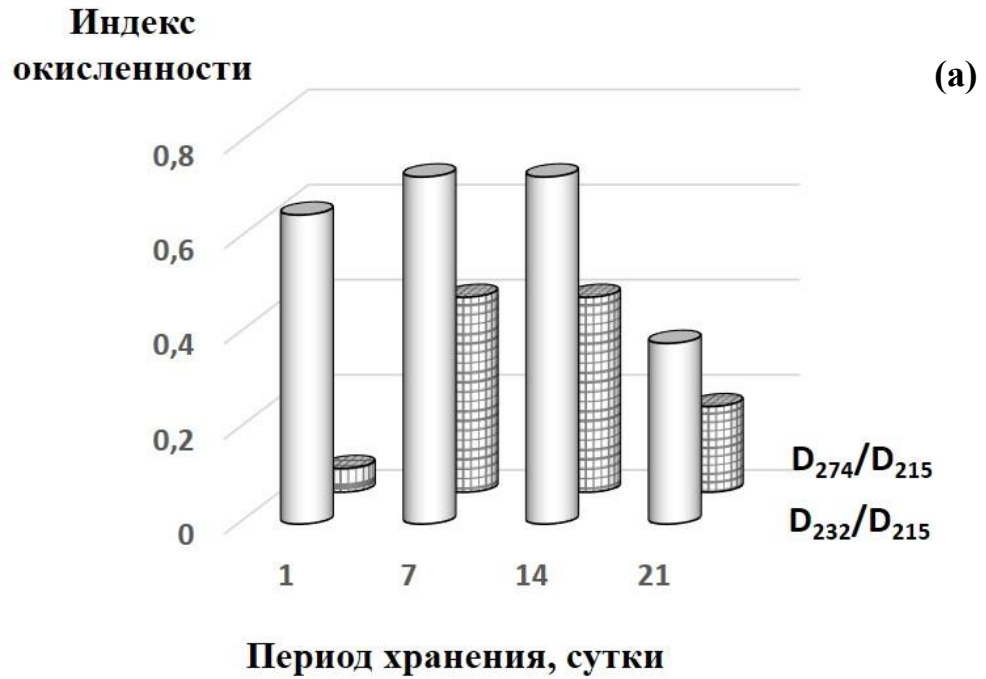


Рисунок 36 – Индексы окисленности, отражающие образование диеновых гидроперекисей (D_{232}/D_{215}) и кетодиенов (D_{274}/D_{215}), рассчитанные для образцов (а) водного раствора ($\text{pH} = 7,0$; ионная сила фосфатного буфера $I = 0,001 \text{ M}$) липосом ФХ–АЛК и (б) их супрамолекулярного комплекса с ковалентным конъюгатом Кон₅ в процессе хранения (при комнатной температуре, на свету)

Комплексообразование бинарных смесей липидов с ковалентным конъюгатом показало как значительное замедление образования, так и уменьшение концентрации первичных продуктов ПОЛ и МДА для всех изученных комплексов (Таблица 21). Так, например, максимальное содержание МДА для $\text{Кон}_S\text{-(ФХ-ЛМ)}$ составило $C_{\text{МДА}} = 20,9$ нмоль/мл (на 17-е сутки хранения), а параметр $D_{232}/D_{215} = 0,2$ (на 3-и сутки хранения). В случае комплекса $\text{Кон}_S\text{-(ФХ-АЛК)}$ концентрация МДА составила не более 3,5 нмоль/мл (Таблица 21) на протяжении 21 суток, при этом образование кетодиенов не было зарегистрировано (Рисунок 36 б).

Присутствие эфирного масла гвоздики оказывало антиоксидантное действие и способствовало значительному ингибированию автоокисления липосом ФХ, что было показано на примере ФХ-ЭМГ ($C_{\text{МДА}} < 1$ нмоль/мл) и ФХ-ЛМ-ЭМГ ($C_{\text{МДА}} < 1,5$ нмоль/мл) (Таблица 22).

Таблица 22 – Характеристика уровня окисленности образцов, выраженная через значения оптической плотности, D_{232} , и концентрации малонового диальдегида (МДА), 3-и сутки хранения образцов в водной среде (рН = 7,0; ионная сила фосфатного буфера I = 0,001 М) при дневном свете и при комнатной температуре

Образец	D_{232}	МДА, нмоль/мл	Образец	D_{232}	МДА, нмоль/мл
ФХ	$0,37 \pm 0,04$	5,1	$\text{Кон}_S\text{-ФХ}$	$< 0,04$	$< 0,5$
ФХ-ЭМГ	$0,32 \pm 0,04$	< 1	$\text{Кон}_S\text{-(ФХ-ЭМГ)}$	$0,21 \pm 0,04$	$< 0,5$
ФХ-ЛМ	$0,98 \pm 0,04$	34,3	$\text{Кон}_S\text{-(ФХ-ЛМ)}$	$< 0,04$	3,2
ФХ-ЛМ-ЭМГ	$0,36 \pm 0,04$	$< 1,5$	$\text{Кон}_S\text{-(ФХ-ЛМ-ЭМГ)}$	$0,24 \pm 0,04$	2,5

Минимальный уровень окисленности *обогащённых* липосом на протяжении всего периода хранения образцов был достигнут в случае совместного защитного действия и ковалентного конъюгата, и растительного антиоксиданта, а именно для образцов $\text{Кон}_S\text{-(ФХ-ЛМ-ЭМГ)}$ и $\text{Кон}_S\text{-(ФХ-АЛК-ЭМГ)}$ (Таблица 21, Таблица 22)

Сопоставление данных о защите инкапсулированной комбинации липидов от окисления со структурными параметрами их супрамолекулярных комплексов с ковалентным конъюгатом Кон_S (Таблица 16) позволяют предположить, что относительно высокие значения плотностей

комплексных частиц, препятствуя диффузии малых молекул кислорода к ненасыщенным углеводородным цепочкам жирных кислот инкапсулированных липидов, обеспечили им найденную высокую защиту от окисления. При этом, по всей видимости, гидрофобные углеводородные цепочки липидных молекул в случае с Кон_S–(ФХ–АЛК) и Кон_S–(ЛФХ–АЛК) оказывались скрытыми в интерьере комплексных частиц, что может следовать из найденных величин ζ -потенциала (а именно, частичной компенсации заряда, выраженной в менее отрицательных экспериментальных величинах по сравнению с расчётными (Таблица 15) и также может способствовать эффекту улучшения окислительной стабильности. Эфирное масло гвоздики также усиливало эффект защиты от окисления, что могло быть связано как с проявлением антиоксидантных свойств, так и с ещё более плотной упаковкой биополимерной матрицы супрамолекулярных комплексов и возросшей степенью ассоциации конъюгата, препятствующих проникновению кислорода к ненасыщенным связям инкапсулированных углеводородных цепочек липидов.

Обобщая полученные результаты в данной главе можно заключить, прежде всего, что обогащение липосом ФХ (как индивидуальной АЛК (> 99 % АЛК), так и триглицеридами льняного масла (55 % АЛК)) с использованием комбинации высокоэнергетических (последовательно проведённые механическая и ультразвуковая гомогенизации (во льду), с последующей экструзией через мембранный фильтр с размером пор 100 нм) и низкоэнергетических методов (самопроизвольное комплексообразование с ковалентным конъюгатом при 40⁰С) позволили получить супрамолекулярные наноразмерные водорастворимые, стабильные к окислению комплексы с равным весовым соотношением ω - 3 : ω - 6 ПНЖК. Исследование физико-химических параметров таких композиционных частиц позволило выявить их более высокие значения плотностей и молярной массы по сравнению с ковалентным конъюгатом, что указывает на действие всех липидов как эффективных внутри- и межмолекулярных сшивающих агентов. Важным наблюдением является то, что ЭМГ усиливало этот эффект.

Результаты изучения структурно-динамического состояния бислоев с помощью ЭПР с использованием 16-доксилстеаринового зонда показали, что добавление льняного масла и альфа-линоленовой кислоты приводит к уменьшению микровязкости липидных слоёв фосфолипидов, что прямо указывает на увеличение доли полиненасыщенных углеводородных цепей в их составе. Эти данные хорошо согласовывались с данными ДСК, согласно которым бислоем липосом модельного фосфолипида ДПФХ, обогащенный АЛК или триглицеридами ЛМ,

характеризовался жидкокристаллическим состоянием уже при комнатной температуре. Таким образом, данные ЭПР и ДСК указывали на встраивание полиненасыщенных углеводородных цепочек ЛМ или АЛК в бислои липосом ФХ.

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. 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 более ярко выраженному росту ассоциации и плотности для всех комплексов с ЛФХ (особенно для случая Кон₅–(ЛФХ–ЛМ)), дают основание предположить о реорганизации мицелл ЛФХ и формировании новых липидных кластеров в интерьере комплексных частиц, сопровождающееся значительным ростом внутри- и межмолекулярных контактов. В то же время бислои липосом ФХ, очевидно, может сохранять высокую упорядоченность и, следовательно, свою целостность.

Данные АСМ 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 в большинстве случаев был более ярко выражен в присутствии ЭМГ). По-видимому, это уменьшение размеров (а значит возрастание контактирующей поверхности) *обогащённых* липосом было связано с уменьшением микровязкости их липидных бислоёв и лежало в основе закономерного роста ассоциации и, как правило, плотности их комплексных частиц с конъюгатом.

Характер изменения ζ -потенциала, а именно частичная компенсация более высокого отрицательного заряда липосом ФХ–АЛК или мицелл ЛФХ–АЛК при их комплексообразовании с ковалентным конъюгатом, а также расчеты вкладов электростатических взаимодействий в величину второго вириального коэффициента дают нам основания полагать, что электростатические взаимодействия играют существенную роль при их комплексообразовании с ковалентным конъюгатом. В то же время, в случае липосом ФХ–ЛМ или мицелл ЛФХ–ЛМ, полученные данные указывали на вклад других сил, по всей видимости, формирования водородных связей и/или гидрофобного притяжения.

Оценка перекисного автоокисления *обогащённых* липосом ФХ и мицелл ЛФХ показала их высокую склонность к окислительной деградации в водных растворах. Однако, при инкапсулировании липидов конъюгатом их стабильность к окислению значительно возросла, 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 улучшение стабильности липидов к окислению могло быть связано с повышением их микровязкости, а также более плотной упаковкой биополимерной матрицы супрамолекулярных комплексов в целом, препятствующих проникновению и диффузии кислорода к ненасыщенным связям инкапсулированных углеводородных цепочек липидов (в случае инкапсулирования конъюгатом, добавления ЭМГ), и, кроме того, проявлением антиоксидантных свойств ЭМГ.

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

Данная часть работы была направлена на решение задачи, связанной с выявлением взаимосвязей между структурными и термодинамическими параметрами комплекса ковалентного конъюгата Кон_S с бинарной смесью биологически активных липидов (с равным содержанием ω -3 : ω -6 ПНЖК), на способность к их высвобождению из супрамолекулярного комплекса в условиях переваривания в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) (ротовая полость, желудок, тонкий кишечник) *in vitro*. В качестве объекта исследования был выбран комплекс Кон_S-(ФХ-ЛМ-ЭМГ) (весовое соотношение липиды : конъюгат = 1 : 5). Условия моделирования переваривания подбирались по международному стандартизированному протоколу [292] (п. 2.4.3.2). Результаты исследований опубликованы в работе [321].

Прежде всего, была охарактеризована степень ферментативного гидролиза ковалентного конъюгата. При этом было установлено количество гидролизованных пептидных связей (за 100 % принималось количество пептидных связей чистого белка в соответствующей концентрации) и коэффициент увеличения доли глюкозы в растворах комплексов на разных стадиях модельного переваривания (Рисунок 37). Также, методом статического и динамического лазерного светорассеяния, было охарактеризовано изменение распределения по размеру комплексных частиц на каждом этапе ферментативного гидролиза *in vitro* (Рисунок 38) и их структурные и термодинамические параметры (Таблица 23).

Полученные данные указывают на то, что процесс гидролиза происходил на всех изученных стадиях модельного переваривания. Так, было найдено изменение количества свободной глюкозы и пептидных связей (Рисунок 37) в комплексах по сравнению их количеством «до гидролиза». При этом протеолиз (увеличение числа свободных пептидных связей) был менее

% гидролизованных
пептидных связей

$$k_{\text{глюкоза}} = C_{\text{после гидролиза}} / C_{\text{до гидролиза}}$$

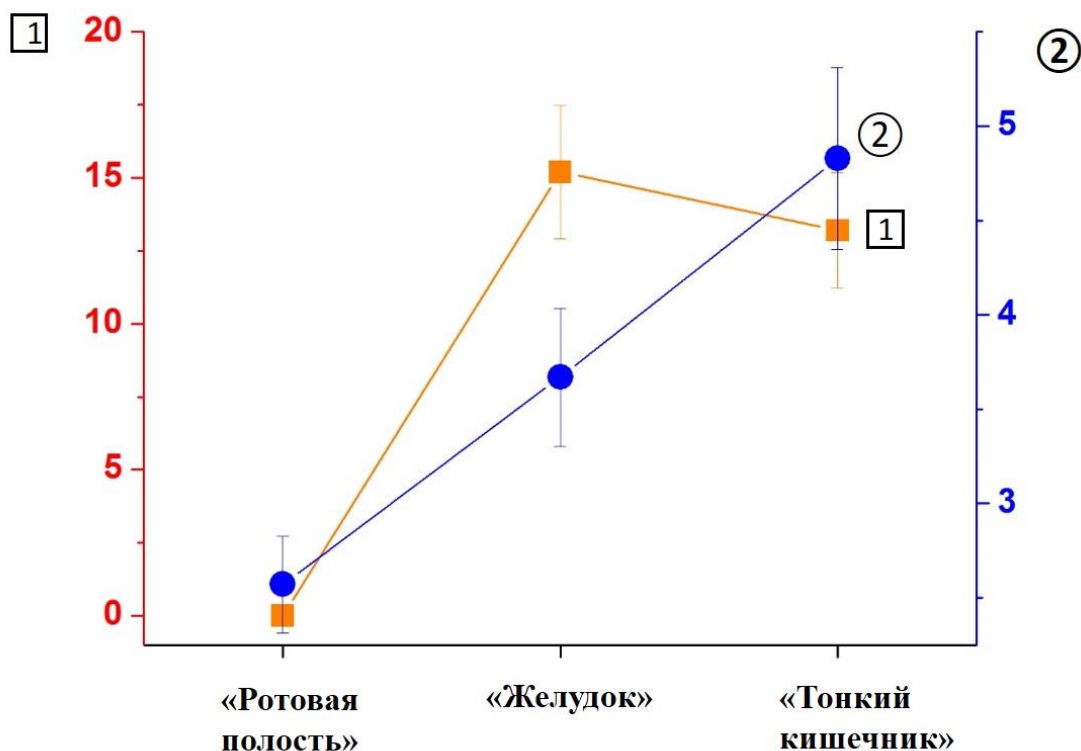


Рисунок 37 – Уровень (%) гидролизованных пептидных связей и коэффициент, отражающий увеличение концентрации глюкозы, найденные при последовательных преобразованиях комплекса Кон_S–(ФХ–ЛМ–ЭМГ) в условиях модельного переваривания¹ в ЖКТ *in vitro*

Таблица 23 – Характеристика супрамолекулярного комплекса Кон_S–(ФХ–ЛМ–ЭМГ) на каждой стадии его последовательного переваривания¹ в ЖКТ *in vitro*

Этап	$M_w \times 10^{-6}$ (Да)	$A_2^* \times 10^{-6}$ (см ³ мол ⁻¹)	$A_2^{\text{искл.}}$ (м ³ моль ⁻¹)	R_G (нм)	R_h (нм)	$\rho = R_G/R_h$	d (г/см ³)	$K_{\text{липиды}}^2$
До гидролиза	42 ± 4,2	46,4 ± 4,6	34,9 ± 3,5	120 ± 6,0	75 ± 3,5	1,6 ± 0,04	9,7 ± 0,5	1 ± 0,1
«Ротовая полость»	26 ± 2,5	29,9 ± 3,0	34 ± 3,4	119 ± 6,0	87 ± 4,3	1,4 ± 0,03	6,2 ± 0,3	1 ± 0,1
«Желудок»	20 ± 2,0	39,5 ± 4,0	48,5 ± 5,0	134 ± 6,5	88 ± 4,2	1,5 ± 0,03	3,3 ± 0,2	1,8 ± 0,2
«Тонкий кишечник»	91 ± 9,1	1075,0 ± 107	800 ± 80	341 ± 16,2	104 ± 5,2	3,3 ± 0,07	0,9 ± 0,05	1,5 ± 0,15

выражен по сравнению с гидролизом мальтодекстринов (увеличение количества свободной глюкозы), что, очевидно, свидетельствует о большей ферментативной доступности карбогидраз к гликозидным связям мальтодекстрина, в то время как доступ протеаз к пептидным связям белка, оказался, в целом, затрудненным, вероятно в связи с ковалентным присоединением молекул мальтодекстринов и включением липидов в комплекс.

Кроме того, процесс интенсивного протекания гидролиза комплексных частиц подтверждается данными диаграммы распределения их размеров (Рисунок 38) для каждой стадии модельного переваривания (а именно, в появлении новых пиков, характерных для частиц меньшего размера, а также в образовании более полидисперсных пиков). Наблюдаемое при этом формирование больших по размеру частиц после стадии «тонкий кишечник» может быть связано с уменьшением гидрофильной оболочки вокруг белка (вследствие гидролиза мальтодекстрина), что, в свою очередь, может быть результатом выпуска гидрофобных участков молекул белка в водную среду, что могло вызывать гидрофобную ассоциацию комплексных частиц.

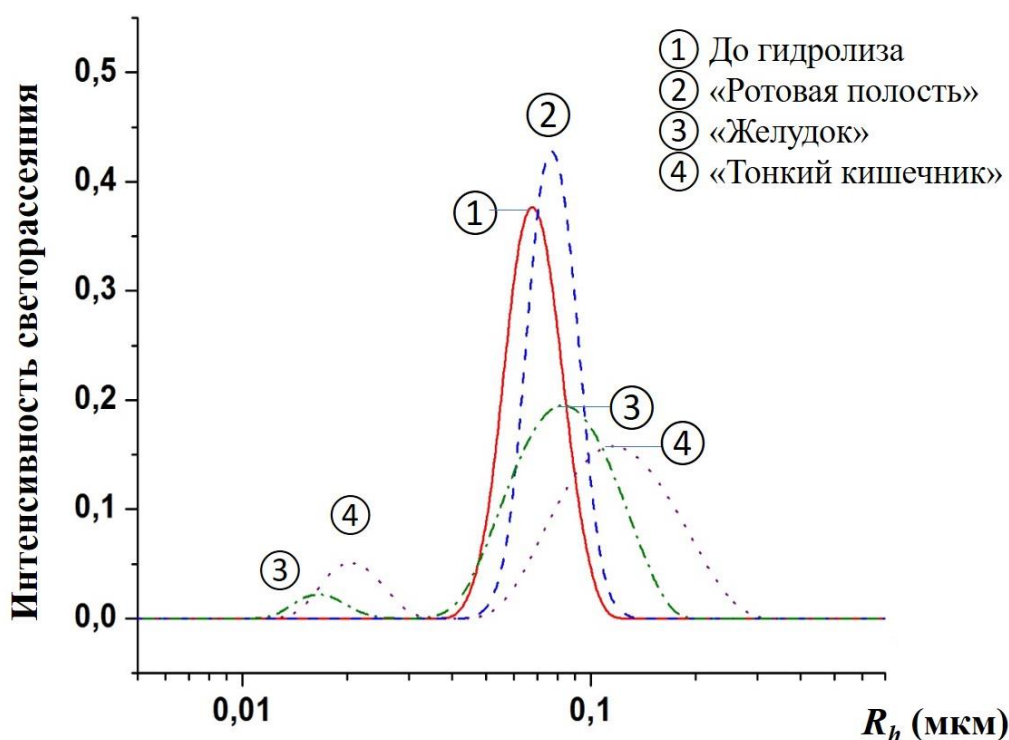


Рисунок 38 – Распределение по размеру частиц комплекса Конс-(ФХ-ЛМ-ЭМГ) при последовательных преобразованиях на разных стадиях модельного переваривания* в ЖКТ *in vitro*

¹Условия эксперимента на каждой стадии переваривания указаны в п. 2.4.3.2

²Коэффициент увеличения концентрации свободных липидов $k_{\text{липиды}} = C_{\text{после гидролиза}} / C_{\text{до гидролиза}}$

Найденное уменьшение M_w в 2 раза в результате первых двух этапов переваривания (Таблица 23) хорошо согласуется с данными, показывающими увеличение количества свободной глюкозы (Рисунок 37).

В свою очередь, наблюдаемое значительное увеличение M_w после стадии «тонкий кишечник» является, по всей видимости, результатом ионной ассоциации гидролизованных комплексных частиц, чему способствует достаточно высокая концентрация ионов Ca^{2+} (присутствующая во всех биологических жидкостях [292]).

Плотность комплексных частиц, d , уменьшалась на каждой стадии переваривания. Это, с одной стороны, обеспечило доступность пищеварительных ферментов к интерьеру частиц и, с другой стороны, способствовало выпуску липидов из комплекса. Кроме того, важно отметить, что при минимальных значениях d (то есть после стадии «тонкий кишечник»), величина структурно-чувствительного параметра ρ составляла более 2 (при этом значения $1 \leq \rho \leq 2$ характерны для частиц сферической архитектуры [275]), что указывало на более открытую и анизотропную архитектуру гидролизованных частиц, что, в свою очередь, может также способствовать их дальнейшему гидролизу и выпуску липидов из комплекса.

В дополнение к найденным изменениям в структуре комплексных частиц в условиях переваривания, следует отметить, что наибольшее количество липидов ($k_{\text{липиды}} = 1,72$, Таблица 23) было выпущено из комплекса на стадии «желудок», где частицы характеризовались наименьшим размером M_w и плотностью d . Так, уровень концентрации свободных липидов после гидролиза по отношению к их концентрации до гидролиза, $k_{\text{липиды}}$ (где $k_{\text{липиды}} = C_{\text{после гидролиза}}/C_{\text{до гидролиза}}$), не изменялся после стадии «ротовая полость» ($k_{\text{липиды}} = 1$, то есть выпуск липидов не наблюдался). В «тонком кишечнике» количество выпущенных липидов было несколько ниже ($k_{\text{липиды}} = 1,45$), что может быть результатом сильной гидрофобной ассоциации гидролизованных частиц, вызывающей обратный захват липидов.

Рассмотрим подробнее полученные величины второго вириального коэффициента A_2^* . Как показано в Таблице 39, положительное значение второго вириального коэффициента (A_2^*) для комплексных частиц уменьшается на стадиях «ротовая полость» и «желудок», и, напротив, значительно увеличивается на стадии «тонкий кишечник». При этом сравнение величин $(A_2^* - A_2^{\text{искл}}) = (A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вод}} + A_2^{\text{гидр}})$ с ζ -потенциалом комплексных частиц (Рисунок 39) позволяет предположить, что найденные изменения A_2^* на стадиях «ротовая полость» и «желудок» происходят, в основном, за счет значительного ослабления (уменьшение абсолютных значений ζ -потенциала) электростатического отталкивания между гидролизованными частицами, вызванного изменениями условий окружающей среды (рН, ионная сила, а также состав ион-содержащих компонентов [292]), к которым, как известно, очень чувствительны и казеинат

натрия, и ФХ [100]. На стадии «тонкого кишечника», значительное увеличение A_2^* , могло быть вызвано, с одной стороны, усилением (по сравнению с предыдущими стадиями) электростатического отталкивания между частицами комплекса (положительные значения суммарного вклада $A_2^{эл} + A_2^{вод} + A_2^{гидр}$), вызванного изменениями условий среды [292], а с другой стороны, сильной ассоциацией частиц, что приводило к увеличению $A_2^{искл}$ (Таблица 23). Анизотропную архитектуру этих сформированных ассоциатов ($\rho > 2$, Таблица 23) можно объяснить, в целом, увеличением сил отталкивания между одноименно заряженными соседними участками гидролизованных комплексных частиц.

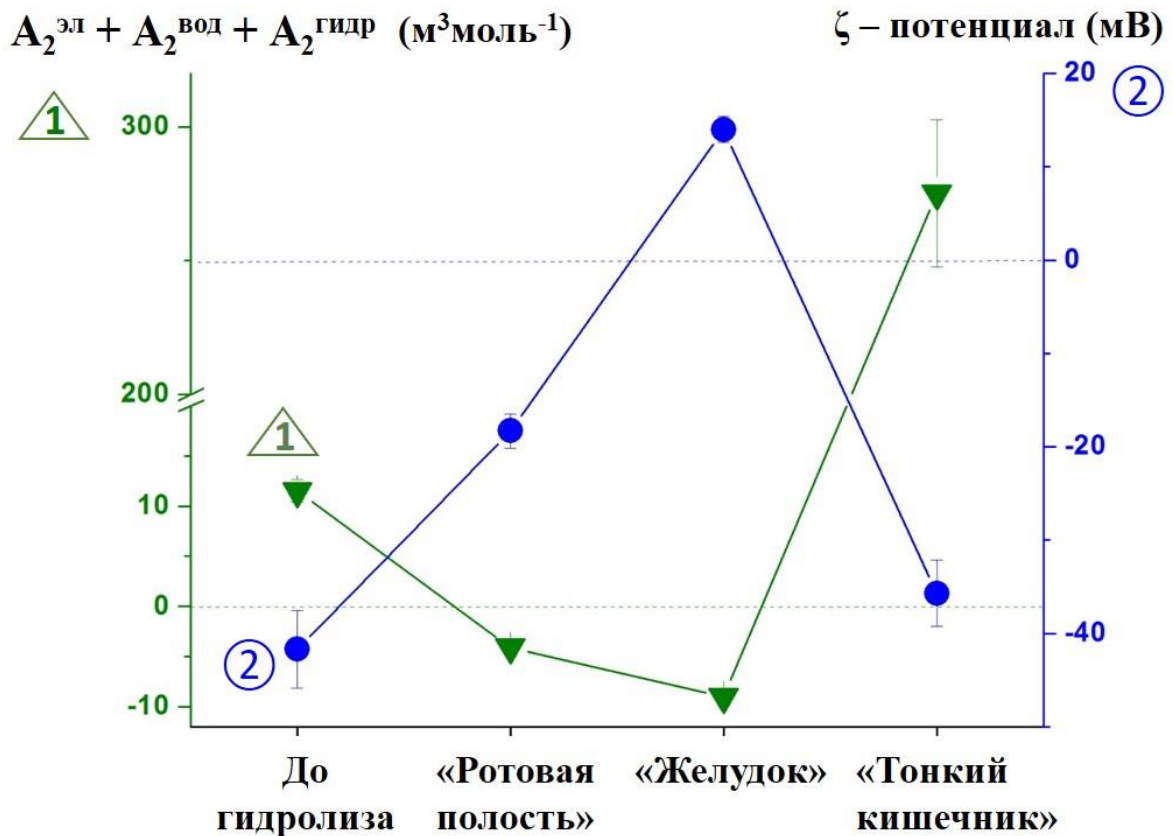


Рисунок 39 – (▲) Вклад различных типов парных взаимодействий (электростатических, $A_2^{эл}$; водородных, $A_2^{вод}$; гидрофобных, $A_2^{гидр}$) в значение второго вириального коэффициента, A_2^* , а также (●) ζ - потенциал комплексных частиц на различных этапах переваривания *in vitro**

*Условия эксперимента на каждой стадии переваривания указаны в п. 2.4.3.2

Таким образом, исследование переваривания *in vitro* на примере комплекса КоnS-(ФХ-ЛМ-ЭМГ) показало, что под действием специфических ферментов, при соответствующих рН, температуре и концентрации ионов солей, происходит высвобождение инкапсулированных липидов из ковалентного конъюгата. При этом возрастание концентрации свободных липидов происходило после действия протеаз, а именно на стадиях «желудок» и «тонкий кишечник». Кроме того, на этих стадиях также было найдено увеличение концентрации глюкозы в растворах комплексов, которое показало более эффективное действие карбогидраз в данных условиях (по сравнению с этапом «ротовая полость»).

Анализ изменения структурных и термодинамических параметров супрамолекулярного комплекса на различных стадиях модельного переваривания позволяет выделить такие факторы, способствующие высвобождению липидов, как: (1) более открытая архитектура комплексных частиц (рост величины структурно-чувствительного параметра, ρ), (2) уменьшение их молярной массы, M_w , а также (3) уменьшение их плотности, d .

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 $DЭ = 10$ (по сравнению с мальтодекстрином с $DЭ = 2$) 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 вязкости глубоколежащих липидных слоёв фосфолипидов в этих комплексах.

(В) Эфирное масло гвоздики (ЭМГ), включённое в состав липосом ФХ, приводит к уменьшению размеров липосом; небольшому увеличению вязкости 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ρ - плотность частиц

$[\eta]$ - характеристическая вязкость

16-ДСА - 16-доксилстеариновая кислота

A_2 – второй вириальный коэффициент (молярная шкала)

A_2^* – второй вириальный коэффициент (весовая шкала)

$A_2^{\text{искл}}$ – вклад эффекта исключённого объёма в значение величины A_2^*

$A_2^{\text{эл}} + A_2^{\text{вод}} + A_2^{\text{гидр}}$ – суммарный вклад электростатических ($A_2^{\text{эл}}$), водородных ($A_2^{\text{вод}}$) и гидрофобных сил ($A_2^{\text{гидр}}$) в значение величины A_2^* , отражающей парные взаимодействия биополимер-биополимер и биополимер-растворитель;

d – плотность частиц, содержащих биополимеры

D – коэффициент диффузии

D_λ – величина оптической плотности при длине волны λ

I – ионная сила буфера

$MD10$ – мальтодекстрин Paselli $MD10$ (ДЭ < 11)

M_w – средневесовая молярная масса

R_G – радиус инерции

R_h – гидродинамический радиус

$SA2$ – мальтодекстрин Paselli $SA2$ с ДЭ < 3

АЛК – альфа-линоленовая кислота

АСМ – атомно-силовая микроскопия

Б – белок (казеинат натрия)

ДПФХ– DL- α - дипальмитоил фосфатидилхолин

ДСК– дифференциальной сканирующая калориметрия

ДЭ – декстрозный эквивалент

ЖКТ– желудочно-кишечный тракт

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

Кон_М – ковалентный конъюгат казеината натрия с мальтодекстрином $MD10$ (ДЭ = 10)

Кон_S – ковалентный конъюгат казеината натрия с мальтодекстрином $SA2$ (ДЭ = 2)

ЛК – линолевая кислота

ЛМ – льняное масло

ЛФХ – лизофосфатидилхолин

МДА – малоновый диальдегид

обогащённые липосомы ФХ или мицеллы ЛФХ– дополнительно содержащие в своём составе индивидуальную АЛК или триглицериды льняного масла

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФХ – фосфатидилхолин

ЭМГ – эфирное масло гвоздики

ЭПР – электронно-парамагнитный резонанс

ФПП – функциональные продукты питания

ФФИ – физиологически функциональный ингредиент

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simopoulos, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids / A.P. Simopoulos // *Biomed Pharmacother.* – 2002. –56. – № 8. – P. 365-379.
2. Государственная политика Российской Федерации в области здорового питания: Доклад. –М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2015.—89 с.
3. Burr, G.O. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet / G.O. Burr, M. M. Burr // *J. Biol. Chem.* – 1929. –82. – №. 2. – P. 345-367.
4. Burr, G.O. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition/ G.O. Burr, M. M. Burr // *J. Biol. Chem.* – 1930. –86. – №. 2. – P. 587-621.
5. Ahrens, E.H. Effect on human serum lipids of substituting plant for animal fat in diet / E.H. Ahrens, D. H. Blankenhorn., T.T. Tsaltas // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1954. –86. – №. 4. – P. 872-878.
6. Keys, A. Serum-cholesterol response to dietary fat/ A. Keys, J.T. Anderson, F. Grande // *The Lancet.* – 1957. –269 (6972). – P. 787.
7. Hansen, A. E. Role of linoleic acid in infant nutrition. Clinical and chemical study of 428 infants fed on milk mixtures varying in kind and amount of fat/ A. E. Hansen, H. F. Wiese, A. N. Boelsche, M. E. Haggard [et al.] // *Pediatrics.* – 1963. –31. – №. 1. – P. 171-192.
8. Crawford, M.A. Linoleic acid and linolenic acid elongation products in muscle tissue of *Syncerus caffer* and other ruminant species/ M.A. Crawford, M.M. Gale, M.H. Woodford// *Biochem. J.* – 1969. – 115. – P. 25-27.
9. Ledger, H. P. Body composition as a basis for a comparative study of some East African mammals// *Symp. Zool. Soc. Lond.* – 1968. –21. – P. 289-310.
10. Simopoulos, A. P. Purslane: a terrestrial source of omega-3 fatty acids // A. P. Simopoulos, Jr N. N Salem // *Engl J Med.* –1986. –315. –P. 833.
11. Van Vliet, T. Lower ratio of n-3 to n-6 fatty acids in cultured than in wild fish / T. Van Vliet, M.B. Katan // *Am J Clin Nutr* –1990. –51.– P. 1–2.
12. Simopoulos, A. P. n-3 fatty acids in eggs from range-fed Greek chickens / A. P. Simopoulos, Jr N. Salem // *N Engl J Med.* – 1989. –321. – № 20. – P. 1412-1412.
13. Simopoulos, A. P. Egg yolk as a source of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant feeding/ A. P. Simopoulos, N. Salem // *Am J Clin Nutr* – 1992. –55. – № 2. – P. 411-414.
14. Cantor, C.R. *Biophysical Chemistry, Part I* / C.R. Cantor, P.R Schimmel. –San Francisco: Freeman, 1980.
15. Dinan, T. The inflammatory phenotype of major depression: focus on cytokines and polyunsaturated fatty acids/ T. Dinan, L. Siggins, P. Scully, O'Brien S. [et al.]// *J Psychiatr Res.* – 2009. – 43. – №. 4. – P. 471-476.
16. Höglström, M. n- 3 Fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men: the NO2 Study/ M. Höglström, P. Nordström, A. Nordström// *Am J Clin Nutr.* – 2007. –85. – №. 3. – P. 803-807.
17. James, M. J. Dietary n-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis/ M. J. James, L.G. Cleland// *Semin Arthritis Rheum.* – WB Saunders, 1997. –27. – №. 2. – P. 85-97.
18. Kiecolt-Glaser, J. K. Depressive symptoms, omega-6: omega-3 fatty acids, and inflammation in older adults/ JK Kiecolt-Glaser, M.A. Belury, K. Porter, D. Beversdorf [et al.]// *Psychosomatic Medicine.* – 2007. –69. – №. 3. – P. 217-224.
19. McNamara, R. K. Deficits in docosahexaenoic acid and associated elevations in the metabolism of arachidonic acid and saturated fatty acids in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with bipolar disorder/ R. K. McNamara, R. Jandacek, T. Rider [et al.]// *Psychiatry Res.* – 2008. –160. – № 3. – P. 285-299.

20. Miyamoto, S. Fat and fish intake and asthma in Japanese women: baseline data from the Osaka Maternal and Child Health Study/ S. Miyamoto, Y. Miyake, S. Sasaki, Tanaka K et al.// *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2007. –11. – №. 1. – P. 103-109.
21. Nielsen, A.A. Omega-3 fatty acids inhibit an increase of proinflammatory cytokines in patients with active Crohn's disease compared with omega-6 fatty acids / A.A. Nielsen, L.G. Jørgensen, J.N. Nielsen [et al.]// *Aliment Pharmacol Ther.* – 2005. –22 – № 11-12. – P. 1121-1128.
22. Oddy, W.H. Ratio of omega - 6 to omega - 3 fatty acids and childhood asthma / W.H. Oddy, N.H. de Klerk, G.E. Kendall. [et al.]// *J Asthma.* – 2004. –41. – № 3. – P. 319-326.
23. Poulsen, R.C. Specific Effects of γ -Linolenic, Eicosapentaenoic, and Docosahexaenoic Ethyl Esters on Bone Post- ovariectomy in Rats/ R.C. Poulsen, E.C. Firth, C.W. Rogers [et al.] // *Calcif Tissue Int.* – 2007. –81. – № 6. – P. 459-471.
24. Russo, G.L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention// *Biochem Pharmacol.* – 2009. –77. – № 6. – P. 937- 946.
25. Sublette, M.E. Omega-3 polyunsaturated essential fatty acid status as a predictor of future suicide risk / M. E. Sublette, J. R. Hibbeln, H. Galfalvy [et al.]// *Am J Psychiatry.* – 2006. –163. – № 6. – P. 1100 – 1102.
26. Watkins, B.A. Dietary ratio of n-6/n-3 PUFAs and docosahexaenoic acid: actions on bone mineral and serum biomarkers in ovariectomized rats/ B.A. Watkins, Y. Li, M.F. Seifert // *J Nutr Biochem.* – 2006. –17. – № 4. – P. 282-289.
27. Weber, P.C. Are we what we eat? Fatty acids in nutrition and in cell membranes: cell functions and disorders induced by dietary conditions / P.C. Weber. *Fish fats and your health.* Norway: Svanoy Foundation. – 1989. –P. 9-18.
28. Weiss, L.A. Ratio of n- 6 to n- 3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study/ L.A. Weiss, E. Barrett-Connor, D. von Mühlen// *Am J Clin Nutr* – 2005. –81. – № 4. – P. 934-938.
29. Whelan, J. (n-6) and (n-3) Polyunsaturated fatty acids and the aging brain: food for thought/ J. Whelan// *J Nutr.* – 2008. – T. 138. – №. 12. – P. 2521-2522.
30. Shannon J. Erythrocyte fatty acids and breast cancer risk: a case-control study in Shanghai, China/ J. Shannon, I.B. King, R. Moshofskky [et al.] // *Am J Clin Nutr.* – 2007. – T. 85. – №. 4. – C. 1090- 1097.
31. Willett W.C. The role of dietary n-6 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease/ W.C. Willett// *J Cardiovasc Med.* – 2007. –8. – P. S42-S45;
32. Harnack, K. Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids/ K. Harnack, G. Andersen, V. Somoza // *Nutrition and Metabolism.* – 2009. –6. – P.8.
33. Phang, M. Diet and thrombosis risk: nutrients for prevention of thrombotic disease/ M. Phang, S. Lazarus, L.G. Wood, M. Garg// *Semin Throm Hemost.* –2011. – 37. – P. 199–208.
34. Simopoulos, A.P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases/ A.P. Simopoulos// *Exp Biol Med.* – 2008. – 233 (6). –P. 674–688.
35. Гладышев, М.И. Незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты и их пищевые источники для человека / М.И. Гладышев // *J Siberian Federal University (Biology).* –2012. –5. – P. 352 – 386.
36. Brenna, J.T. Alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans/ J.T. Brenna, N. Salem, A.J. Sinclair [et al.]// *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* –2009. –80. –P. 85–91.
37. Candela, C.G. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations/ C.G. Candela, L.M Bermejo Lopez., V.L. Kohen// *Nutr. Hosp.* –2011. –26. –P. 323–329.
38. Cohen, Z. Microalgae as a source of ω -3 fatty acids/ Z. Cohen, H.A. Norman, Y.M. Heimer// *World Rev Nutr Diet.* –1995. – 77. – P.1–31.

39. Gómez, C.C. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations/ C.C. Gómez, LM Bermejo López, V. Loria-Kohen // *Nutr Hosp.* – 2011. –26. – № 2. – P. 323-329.
40. Lauritzen, L. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina/ L. Lauritzen, H.S. Hansen, M.H. Jorgensen [et al.] // *Progress in Lipid Res.* –2001.– 40.– P. 1–94.
41. Harwood J.L. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids/ J.L. Harwood // *Biochim Biophys Acta.* –1996. – 1301. – P. 7–56.
42. Heinz, E. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids/ Ed. T.S. Moore// In: *Lipid metabolism in plants.* – FL: CRC, 1993. p. 34–89.
43. Lands, W.E. Human life: caught in the food web/ M.T., Kainz, M.T. Brett, Eds.// In: *Lipids in aquatic ecosystems.* –NY: Springer, 2009. – P. 327-354. –ISBN: 978-0-387-88607-7.
44. Tocher, D.R. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturase/ D.R. Tocher, M.J. Leaver, P.A. Hodson // *Progress in Lipid Research.* –1997. – 37. – P.73–117.
45. Plourde M. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements / M. Plourde, S.C. Cunnane // *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism.* –2007. – 32. – P. 619–634.
46. Гичев, Ю.Ю. Новое руководство по микронутриентологии (биологически активные добавки к пище и здоровье человека)// Ю.Ю. Гичев, Ю.П. Гичев. –М.: Триада-ХБ, 2009. –304 С. –ISBN 5-8249-0043-4.
47. Davis, B.C. Achieving optimal essential fatty acid status in vegetarians: current knowledge and practical implications/ B.C. Davis, P.M. Kris-Etherton // *Am J Clin Nutr.* –2003. – 78(suppl). – P. 640S- 646S.
48. Методические рекомендации МР 2.3.1.1915-04. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ : утвержден и введен в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г.Г. Онищенко от 02.07.2004 г./ Разработаны ГУ НИИ питания РАМП [и др.]. –М., 2004. –36 с.
49. Методические рекомендации МР 2.3.1.2432-08. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации : Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 18 декабря 2008 г / Разработаны ГУ НИИ питания РАМН [и др.]. –М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. - 38 С.
50. Candela C.G. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations/ C.G. Candela, L.M. Bermejo Lopez, V.L. Kohen // *Nutr. Hosp.* –2011. –26. – P. 323-329.
51. Серов В.Н. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты в практике врача акушера-гинеколога : методические рекомендации для врачей акушеров-гинекологов а врачей общей практики [электронный ресурс] URL: https://www.unipharm.ru/assets/files/stat-pdf/omega_a5_2.pdf (дата обращения: 07.07.2019).
52. ГОСТ Р 52349-2005. Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 31 мая 2005 г. N 138-ст : введен впервые : дата введения 2006-07-01/ Разработан ГОУ ВПО МГУПП. –М.: Стандартинформ, 2005.
53. ГОСТ Р 54059-2010. Продукты пищевые функциональные. Ингредиенты пищевые функциональные : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому

регулированию и метрологии от 30 ноября 2010 г. № 683-ст: дата введения 2012-01-01/ Разработан ГОУ ВПО МГУПП. –М.: Стандартинформ, 2011.

54. ГОСТ Р 54060-2010. Продукты пищевые функциональные. Идентификация. Общие положения. Классификация и общие требования : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 ноября 2010 года N 684-ст: дата введения 2012-01-01 : переиздание январь 2019/ Разработан ГОУ ВПО МГУПП. –М.: Стандартинформ, 2019.

55. ГОСТ Р 55577-2013. Продукты пищевые специализированные и функциональные. Информация об отличительных признаках и эффективности (с Изменением N1) : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии 06 сентября 2013 г. N 852-ст: дата введения 2015-01-01/ Разработан ФГБУ "НИИ питания" РАМН. –М.: Стандартинформ, 2014.

56. СанПин 2.3.2 1078-01. Гигиенические требования безопасности продуктов, обогащенных витаминами и минеральными веществами : утвержден и введен в действие Главным государственным санитарным врачом РФ 01. 11. 2001 года : дата введения 01.09.2002. [текст: электронный]

57. Указ Президента РФ от 01.12.2016 N 642 "О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации": утверждено и введено в действие Указом Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. N 642. [текст : электронный].

58. Кодекс Алиментариус. Маркировка пищевых продуктов. Полные тексты К 57 / Пер. с англ., ФАО, ВОЗ – М.: Издательство «Весь Мир», 2006 – 62 с.

59. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года : утверждено Председателем Правительства РФ 24 апреля 2012 г./ разработана в соответствии с решением Правительственной комиссии по высоким технологиям и инновациям от 1 апреля 2011 г. [электронный ресурс]. – URL : http://economy.gov.ru/minec/activity/sections/innovations/development/doc20120427_06 (дата обращения 01.07.2019)

60. Информационная записка ИНФОСАН № 1/2008 – нанотехнология/ Международная сеть органов по безопасности пищевых продуктов (ИНФОСАН).– 2008 [электронный ресурс]. –URL: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_01_nanotechnology_Feb08_ru_rev1.pdf (дата обращения 01.05.2019).

61. Рынок функциональных продуктов питания в России : маркетинговое исследование/ИА Крединформ – 2012 [электронный текст]. –URL : <http://foodmarket.spb.ru/current.php?article=1832> (дата обращения 01.05.2018).

62. Cardiovascular health: A key area of functional food and drinks development. London, Euromonitor International : маркетинговое исследование/ Euromonitor Консалтинг. –2010 [электронный текст : ограниченный доступ]. –URL : <https://www.euromonitor.com/cardiovascular-health-a-key-area-of-functional-food-and-drinks-development/report> (дата обращения 01.05.2018)

63. Functional and Luxury Foods Market Analysis. Market Analysis-Functional Foods : маркетинговое исследование/ Frost & Sullivan. –2015. –142 P. [электронный текст]. – URL: http://www.pir.sa.gov.au/__data/assets/pdf_file/0004/283549/Frost_and_Sullivan_-_Market_Analysis_Functional_Foods.pdf (дата обращения 01.05.2018).

63. Vicentini, A. Functional foods: Trends and development on the global market/ A. Vicentini, L. Liberatore, D. Mastrocola //Ital J Food Sci. –2016. –28. –P. 338-351.

64. Vergari, F. An Overview of the Functional Food Market: From Marketing Issues and Commercial Players to Future Demand from Life in Space/ Vergari F., Tibuzzi A., Basile G// In: Bio-Farms for Nutraceuticals// Giardi M.T., Rea G., Berra B. (eds) / – Boston, MA: Springer. – 2010. – vol 698.–P.308. – Online ISBN 978-1-4419-7347-4.

65. Arista. : официальный сайт компании [электронный ресурс] –URL : <https://aristaindustries.com/products/> (дата обращения : 02.06.2018).

66. BASF : официальный сайт компании [электронный ресурс]. –URL : <https://products.basf.com/en/Dry-n-3.html> (дата обращения : 02.06.2018).
https://www.brenntag.com/media/documents/bsi/product_data_sheets/life_science/basf_omega_3/basf_dry_n-3_525c_pds.pdf (дата обращения : 02.06.2018).
67. Budenheim : официальный сайт компании [электронный ресурс]. –URL : <http://www.gat-foodessentials.com> (дата обращения : 02.06.2018).
68. Clover Corporation : официальный сайт компании [электронный ресурс]. –URL : <http://www.clovercorp.com.au/en/learn-about-us/> (дата обращения : 02.06.2018).
69. Copeinca : официальный сайт компании [электронный ресурс]. –URL : <http://www.copeinca.com/index.html> (дата обращения : 02.06.2018).
70. Croda : официальный сайт компании [электронный ресурс]. –URL : <https://www.croda.com/en-gb/news/2015/06/incromega-dha-ideal-for-cognitive-health> (дата обращения : 02.06.2018).
71. DSM : официальный сайт компании [электронный ресурс]. –URL : https://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/ru_RU/products/nutritional-lipids/life-dha.html (дата обращения : 02.06.2018).
72. Progel : официальный сайт компании [электронный ресурс]. –URL : <https://progel.com.au/> (дата обращения : 02.06.2018).
73. Электронный портал LoveToKnow.com [электронный ресурс]. –URL : https://kids.lovetoknow.com/wiki/DHA_Omega-3_Acid_and_Preschoolers_Interview (дата обращения : 02.06.2018).
74. Horizon : официальный сайт компании [электронный ресурс]. –URL : <https://horizon.com> (дата обращения : 02.06.2018).
75. Пат. 2009104050 РФ, МПК⁸ А23L 1/29. Состав безлактозной смеси для диетического питания детей с галактоземией / Бушуева Т.В., Боровик Т.Э., Ладодо К.С., Скворцова В.А. [и др.]; заявитель и патентообладатель: ГУ НЦЗД РАМН, ЗАО «Компания «НУТРИТЕК». - № 2009104050/10; заявл. 09.02.2009; опубл. 20.08.2010; 1 с.
76. Пат. 2003107824 РФ, МПК А23L 1/30, А23L 1/302, А23L 1/305. Пищевая композиция/ Фачс Э.К., Гарсия-Роденас К.Л., Гиго Ив. [и др.]; заявитель и патентообладатель: Сосьете де продюи Нестле С.А. - № 2003107824/13; заявл. 20.01.2001; опубл. 27.08.2004.
77. Пат. 2007124588 РФ, МПК⁸ А23L 1/30, А23L 1/304, А23D 7/00, А23L 2/38. Питательный батончик или другой пищевой продукт и способ его производства/ Готэм Э., Патрик М., Дэгерат М.Л.; заявитель и патентообладатель: Юнилевер Н.В. - № 2007124588/13; заявл. 21.11.2005; опубл. 10.01.2009.
78. Пат. 2008121897 РФ, МПК⁸ А23В 7/16. Инкапсулирование легкоокисляемых компонентов/ ВАН Л.Б., ВАЛЬТХЕР Г., ВАН О.Б.; заявитель и патентообладатель: Дженерал Миллз, Инк. (US). - № 2008121897/13; заявл. 27.09.2006; опубл. 10.12.2009; 39 С.
79. Пат. 2008128511 РФ. МПК⁸ А23L 2/38. Сбалансированная питательная композиция для функциональных напитков/ Токаев Э.С., Баженова Е.Н.; заявитель и патентообладатель: Закрытое акционерное общество "Академия-Т". - № 2008128511/13; заявл. 15.07.2008; опубл. 20.01.2010; Бюл. № 2; 2 С.
80. Пат. 2009145009 РФ, МПК⁸ А61К 9/00. Композиция полиненасыщенных жирных кислот, лютеина и/или зеаксантина / Манеров Ю.В., Сотникова Е.М., Егоров А.Г.; заявитель и патентообладатель: ООО «МегаДети». - № 2009145009/15; заявл. 04.12.2009; опубл. 10.06.2011, Бюл. № 16; 4 С.
81. Пат. 2009145010 РФ, МПК⁸ А61К 31/685. Композиция омега-3 и омега-6 полиненасыщенных жирных кислот / Манеров Ю.В., Сотникова Е.М., Егоров А.Г.; заявитель и патентообладатель: ООО «Аббифарм». - № 2009145010/15; заявл. 04.12.2009; опубл. 20.06.2011; Бюл. №17; 4 С.

82. Пат. 2010101903 РФ, МПК⁸ А47J 31/40. Напиток и способ его приготовления/ Янг Э.; заявитель и патентообладатель: СТАРБАКС КОРПОРЕЙШН, Ди/Би/Эй СТАРБАКС КОФЕ КОМПАНИ (US). - № 2010101903/12 заявл.12.06.2008; опубл. 27.07.2011, Бюл. № 21.

83. Пат. 2012124530 РФ, МПК⁸ А23D 7/00. Способ производства сливочно-растительных спредов / Остриков А.Н., Горбатова А.В.; заявитель и патентооблаатель: Воронежский государственный университет инженерных технологий. - № 2012124530/13; заявл.14.06.2012; опубл. 14.06.2013; Бюл. №35; 1 С.

84. Пат. 2012158310 РФ, МПК⁸ С11В 1/06, С11В 1/10, А23D 9/00 Композиция масла «Универсал» и способ её получения / Магомедов И.М., Чиркова А.И.; заявитель и патентообладатель: Магомедов И.М., Чиркова А.И. - № 2012158310/13; заявл. 27.12.2012; опубл. 10.07.2014, Бюл. №19; 1 С.

85. Пат. 2013135271 РФ, МПК⁸ А23D 7/005. Применение инкапсулированного масла в приготовлении теста / Арфстен Р., Бец Р., Мецценга Ш., Ульрих Г. [и др.] ; заявитель и патентообладатель: Нестек С.А. (CH). - № 2013135271/1; заявл. 23.12.2011; опубл. 10.02.2015; Бюл. № 4; 2 С.

86. Пат. 2013135277 РФ, МПК⁸ А21D 13/00. Композиция наполнителя, содержащая инкапсулированное масло/ Арфстен Ю., ДЕ П.Ч., Хайнрих Э., Аутрем Д.У., Саркар А.; заявитель и патентообладатель: Нестек С.А./ - № 2013135277/13; заявл. 23.12.2011; опубл. 10.02.2015; Бюл. №4; 2 С.

87. Пат. 2013155993 РФ, МПК⁸ А23L 1/30. Оздоровительный пищевой продукт, содержащий сложные этиловые эфиры жирных кислот, а именно льняное масло, и способ получения данного пищевого продукта / Заяц Т.С., Заяц П., Зандер, Л.Б., Зандер, Ф.Д. [и др.] ; заявитель и патентообладатель: ЛинЛайф Фарма С.А. (PL). - № 2013155993/13; заявл. 30.05.2012; опубл. 10.07.2015; Бюл. № 19; 2 С.

88. Пат. 2014103239 РФ, МПК⁸ А23L 1/30. Коацерватные комплексы, способы и пищевые продукты/Чжан Н., Мьютилэнджи М.; заявитель и патентообладатель: ПЕПСИКО, ИНК. (US). - № 2014103239/13; заявл. 20.06.2012; опубл. 10.08.2015; Бюл. № 22; 5 С.

89. Пат. 2014142261 РФ, МПК⁸ А23Р 10/30, А23D 9/00. Продукт на водной основе, включающий маслосодержащие микрокапсулы, и способ его производства / Гивен П.С., Тромп Р.Х.; заявитель и патентообладатель: Пепсико. Инк. (US). - № 2014142261; заявл. 31.01.2013; опубл. 20.05.2016; Бюл. № 14; 4 С.

90. Пат. 2231270 РФ, МПК А23L 1/24, А23L 1/30, А23L 1/302. Пищевой эмульсионный продукт (варианты)/ Рекорд И.Г.; заявитель и патентообладатель: акционерное общество открытого типа «Продукт-металл». - № 2001134214/13; заявл. 11.12.2001; опубл. 27.06.2004, Бюл. № 18; 2 С.

91. Пат. 2275029 РФ, МПК⁸ А21D 13/08. Состав пищевого продукта на вафельной основе (варианты)/ Рекорд И.Г.; заявитель и патентообладатель: Малое государственное предприятие «Научно-консультационный центр». - № 2004115372/13; заявл. 17.05.2004; опубл. 27.04.2006, Бюл. № 12; 22 С.

92. Пат. 2311039 РФ, МПК⁸ А23С 23/00. Продукт энтерального питания «нутриэн фтизио»/ Попова Т.С., Перельман М.И., Тутельян В.А. [и др.] ; заявитель и патентообладатель: ЗАО «Компания «Нутритек». - № 2005114365/13; заявл. 13.05.2005; опубл. 27.11.2007, Бюл. № 33; 27 С.

93. Пат. 2335933 РФ, МПК⁸ А23L 1/314, А23L 1/317. Пищевой биологически активный мясосодержащий продукт / Рекорд И.Г.; заявитель и патентообладатель: Малое государственное предприятие «Научно-консультационный Центр». - № 2006129220/13; заявл. 07.08.2006; опубл. 20.10.2008, Бюл. № 29; 11 С.

94. Пат. 2380983 РФ, МПК⁸ А23L 1/29, А61К 36/00. Пищевые продукты для диабетиков / Шульман А., Пеллед Д., Коуэн Ц.; заявитель и патентообладатель ЭНЗИМОТЕК ЛТД. - № 2007108532/13; заявл. 09.08.2005; опубл. 10.02.2010, Бюл. № 4; 46 С.

95. Пат. 2426440 РФ, МПК⁸ А23D 7/00. Эмульсия масло-в-воде и ее применение для придания функциональности. / Сагалович Л., Лезер М., Михель М., Ватцке Г.Й. [и др.] ; заявитель и патентообладатель: НЕСТЕК С.А. (СН). - № 2008125101/13; заявл. 22.11.2006; опубл. 20.08.2011, Бюл. № 23; 44 С.
96. Пат. 2447701 РФ, МПК⁸ А23L 1/24. Майонез на основе молочно-растительного экстракта/ А.И. Окара, А.В. Жебо; заявитель и патентообладатель: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Хабаровская государственная академия экономики и права». - № 2010135068/13; заявл. 20.08.2010; опубл. 20.04.2012, Бюл. № 11. - 7с.
97. Пат. 2524076 РФ, МПК⁸ А23L 1/24. Соус майонезного типа с льняной мукой «Будь здоров»/ Миневич И.Э., Осипова Л.Л., Зубцов В.А.; заявитель и патентообладатель: ГНУ ВНИИМЛ Россельхозакадемии. - № 2013109883/13; заявл. 05.03.2013; опубл. 27.07.2014, Бюл. № 21; 9 С.
98. Пат. 2552957 РФ, МПК⁸ А23L 1/30, А23L 1/302, А23L 1/305, А61К 9/51, А61К 8/11. Наночастицы (Варианты), ее содержащая композиция, включающий названную композицию прокут питания и способ получения наночастиц (варианты)/ Агуэрос Б.М., Гонсалес Н.К., Гонсалес Ф.К., Ираче Г.Х., Ромо У.А., Эспарса К.И.; заявитель и патентообладатель: Универсидад де наварра (ES), Сентро насиональ де текнология и сегуридад алиментария, лабораторио дель эбро (ES). - № 2012141088/13; заявл. 24.02.2011; опубл. 10.06.2015, Бюл. № 1; 72 С.
99. Pravst, I. Functional Foods in Europe: A Focus on Health Claims/ I. Pravst// Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry. – 2012. – 25. – P. 2013.
100. Semenova, M.G. Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions/ M.G Semenova, E. Dickinson. –Leiden, Boston: Brill, 2010. –421 P. – ISBN 978-90-04-17186-2.
101. McClements, D.J. Nanoparticle- and Microparticle-based delivery systems. Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds / D.J. McClements. –London, NY: Taylor & Francis Group, 2015. – 572 P. –ISBN: 1-482-23315-0.
102. Given, P. S. Encapsulation of flavors in emulsions for beverages/ P. S. Given// Curr Opin Colloid In. –2009. – 14(1). –P. 43–47.
103. Sharma, M. Sodium caseinate stabilized clove oil nanoemulsion: Physicochemical properties/ M. Sharma, B. Mann, R. Sharma, R. Bajaj [et al.]// J Food Eng. –2017. –212. –P. 38–46.
104. Wang, L. Eugenol Nanoemulsion Stabilized with Zein and Sodium Caseinate by Self-Assembly/ L. Wang , Y. Zhang// J Agric Food Chem. –2017. – 65(14). –P. 990-2998.
105. McClements, D.J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles/ D. J. McClements // Curr Opin Colloid In. –2012a. – 17(5). –P. 235–245.
106. Boon, C.S. Role of iron and hydroperoxides in the degradation of lycopene in oil-in-water emulsions/ C. S. Boon, D. J. McClements, J. Weiss [et al.]// J Agr Food Chem. –2009. – 57(7). – P. 2993–2998.
107. Gibbs, B.F. Encapsulation in the food industry/ B. F. Gibbs, S. Kermasha, I. Alli et al.// Int J of Food Sci Nutr. –2010. –50. –P. 213–224.
108. Orchard, T. S. A systematic review of omega-3 fatty acids and osteoporosis/ T. S. Orchard, X. L. Pan, F.S. Cheek [et al.]//British Journal of Nutrition. –2012. –107. – P. S253–S260.
109. Chu, B.S. Stability of protein-stabilised beta-carotene nanodispersions against heating, salts and pH/ B. S. Chu Ichikawa, S. Kanafusa, M. Nakajima// J the Sci Food Agr. –2008. – 88(10). –P. 1764–1769.
110. Velikov, K. P. Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals// K.P. Velikov, E. Pelan / Soft Matter. –2008. – 4(10). –P. 1964–1980.
111. Qian, C. Inhibition of beta-carotene degradation in oil-in-water nanoemulsions: Influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants/ C. Qian, E.A. Decker, H. Xiao [et al.]// Food Chemistry. –2012a. – 135(3). –P. 1036–1043.

112. Wrolstad, R.E. Alternatives to those artificial FD&C food colorants/ R.E. Wrolstad, C.A. Culver/ *Review of Food Science and Technology*. – 2012. –3(1). –P. 59–77.
113. Chiu, Y. Preparation of vitamin E microemulsion possessing high resistance to oxidation in air// Y. Chiu, W. Yang.// *Colloids Surf*. –1992. – 63(3–4). –P. 311–322.
114. Cranney, A. Summary of evidence-based review on vitamin D efficacy and safety in relation to bone health/ A. Cranney, H.A. Weiler, S. O'Donnell [et al.]// *Am J Clin Nutr*. –2008. – 88(2). –P. 513S–519S.
115. Feng, J.-L. Study on food-grade vitamin E microemulsions based on nonionic emulsifiers/ J.-L. Feng, Z.-W. Wang, J. Zhang [et al.] / *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. –2009. –339 (1–3). – P. 1– 6.
116. Haham, M. Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein Micelles/ M. Haham, S. Ish-Shalom, M. Nodelman [et al.]// *Food Func*. –2012. – 3(7). –P. 737–744.
117. Shukat, R. Crystallisation behaviour of palm oil nanoemulsions carrying vitamin E/ R. Shukat, C. Bourgaux, P. Relkin// *J Therm Anal Calorim*. –2012. –108(1). –P. 153–161.
118. Hatanaka, J. Physicochemical and pharmacological characterization of alpha-tocopherol-loaded nano-emulsion system/ J. Hatanaka, H. Chikamori, H. Sato [et al.]// *Int J Pharmaceut*. –2010. – 396 (1– 2). –P. 188–193.
119. Li, X. Microencapsulation of nanoemulsions: Novel Trojan particles for bioactive lipid molecule delivery/ X. Li, N. Anton, M. C. T. Thi, M. J. Zhao [et al.] // *Int J Nanomed*. –2011. – 6. –P. 1313–1325.
120. Saberi, A.H. Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification/ A.H. Saberi, Y. Fang, D.J. McClements // *J Colloid Interface Sci*. –2013. – 411. –P. 105–113.
121. Saberi, A. H. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification/ A. H. Saberi, Y. Fang, D.J. McClements // *J Colloid Interface Sci*. – 2013. – 391. –P. 95–102.
122. Sagalowicz, L. Delivery systems for liquid food products/ L. Sagalowicz, M E. Leser// *Curr Opin Colloid In*. –2010. –15. –P. 61–72.
123. Djordjevic, D. Chemical and physical stability of citral and limonene in sodium dodecyl sulfate chitosan and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions/ D. Djordjevic, L. Cercaci, J. Alamed [et al.] // *J Agr Food Chem*. –2007. – 55(9). –P. 3585–3591.
124. Matalanis, A., E. Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres/ A. Matalanis, E. A. Decker, D. J. McClements. // *Food Chem*. –2012. – 132(2). –P. 766–772.
125. McClements, D. J. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems/ D.J. McClements, E.A. Decker// *J Food Sci*. – 2000. – 65(8). –P. 1270–1282.
126. Salminen, H. Oil-in-water emulsions as a delivery system for n-3 fatty acids in meat products/ H. Salminen, K. Herrmann, J. Weiss // *Meat Science*. –2013. – 93(3). –P. 659–667.
127. Tur J. A. Dietary sources of omega-3 fatty acids: Public health risks and benefits/ J.A. Tur, M.M. Bibiloni, A. Sureda [et al.]// *British Journal of Nutrition*. –2012. – 107. – P. S23–S52.
128. Zimet, P. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for n-3 polyunsaturated fatty acids/ P. Zimet, Y.D. Livney// *Food Hydrocoll*. –2009. –23. –P.1120–1126.
129. Walker, R. Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: Opportunities and obstacles in the food industry/ R. Walker, E.A. Decker, D.J. McClements// *Food Func*. – 2015. – 6 (1). –P. 41–54.
130. Waraho, T. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions/ T. Waraho, D.J. McClements, E.A. Decker// *Trends in Food Sci Techn*. –2011. – 22(1). –P. 3–13.
131. Yashodhara B. M. Omega-3 fatty acids: A comprehensive review of their role in health and disease/ B. M. Yashodhara, S. Umakanth, J. M. Pappachan [et al.]// *Postgraduate Medical J*. –2009. – 85(1000). –P. 84–90.

- 132.Cercaci, L. Phytosterol oxidation in oil-in-water emulsions and bulk oil/ L. Cercaci, M. T. Rodriguez-Estrada, G. Lercker, E.A. Decker// *Food Chemistry* –2007. –102(1). –P. 161–167.
- 133.Engel, R. Formulation of phytosterols in emulsions for increased dose response in functional foods/ R. Engel, H. Schubert// *Innov Food Sci Emerg.* –2005. –6(2). –P. 233–237.
- 134.Leong, W.F. Preparation and characterization of water-soluble phytosterol nanodispersions/ W. F. Leong, , O. M. Lai, K. Long [et al.]// *Food Chemistry.* –2011. – 129(1). –P. 77–83.
- 135.Rozner, S. Competitive solubilization of cholesterol and phytosterols in nonionic microemulsions/ S. Rozner, A. Aserin, E. J. Wachtel [et al.] // *J Colloid Interface Sci.* –2007. – 314(2). – P. 718–726.
- 136.Soupas, L. Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation/ L. Soupas, L. Juntunen, A. M. Lampi [et al.] // *J Agr Food Chem.* –2004. – 52(21). –P. 6485–6491.
- 137.Heinonen, M. Inhibition of oxidation in 10% oil-in-water emulsions by beta-carotene with alpha- and gamma-tocopherols/ M. Heinonen, K. Haila, A. M. Lampi [et al.]// *J American Oil Chemists Society.* –1997. –74(9). – P. 1047–1052.
- 138.Qian, C. Physical and chemical stability of beta-carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type/ C. Qian, E.A. Decker, H. Xiao [et al.]// *Food Chemistry.* –2012b. – 132(3) –P. 1221–1229.
- 139.Ribeiro, H. S. Stability of lycopene emulsions in food systems/ H. S. Ribeiro, K. Ax, H. Schubert// *J Food Sci.* –2003. – 68(9). –P. 2730–2734.
- 140.Silva, H. Nanoemulsions of [beta]-carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique/ H.Silva, M. Cerqueira, B. Souza [et al.]//*J Food Eng.* –2010. –102(2). –P. 130–135.
- 141.Sotomayor-Gerding M. High carotenoid bioaccessibility through linseed oil nanoemulsions with enhanced physical and oxidative stability/ M. Sotomayor-Gerding, B.D. Oomah, F. Acevedo [et al.]// *Food Chemistry.* –2016. –199. –463-470.
- 142.Tan Ch.Liposomes as delivery systems for carotenoids: comparative studies of loading ability, storage stability and in vitro release/ Ch. Tan, J. Xue, X. Lou [et al.] // *Food Funct.* – 2014. –5(6). – P. 1232-40.
- 143.Nicolosi, R. J. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters/ R. J. Nicolosi, E. J. Rogers, D. Kritchevsky [et al.]// *Artery.* –1997. – 22(5). – P. 266–277.
- 144.Chin, S. F. Conjugated linoleic acid (9,11-octadecadienoic and 10,12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic-acid/ S.F. Chin, J.M. Storkson, K.J. Albright [et al.]// *Journal of Nutrition.* –1994. – 124(5). –P. 694–701.
- 145.Ha, Y. L. Anticarcinogenic fatty-acids from fried ground-beef/ Y. L. Ha, N. K. Grimm, M.W. Pariza // *FASEB Journal.* –1998. – 2(5). – P. A1192.
- 146.Park, Y. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA)/ Y. Park, M.W. Pariza. // *Food Res Int.* –2007. – 40(3). –P. 311–323.
- 147.Yang, Y. Delivery of bioactive conjugated linoleic acid with self-assembled amylose-CLA complex/ Y. Yang, Z. B. Gu, G.Y. Zhang// *J Agr Food Chem.* –2009. – 57(15). –P. 7125–7130.
- 148.Cook M. E. Feeding conjugated linoleic acid improves feed efficiency and reduces carcass fat in pigs/ D.L. Jerome, T.D. Crenshaw, D. R. Buege [et al.]// *FASEB Journal.* –1998. –12(5). –P. A836.
- 149.Fernandes-Avila, C. Vegetable protein isolate-stabilized emulsions for enhanced delivery of conjugated linoleic acid in Caco-2 cells/ C. Fernandes-Avila, A. Guri, E. Arranz [et al.]// *Food Hydr.* – 2016. –55. –P. 144-154.
- 150.Heo, W. Lecithin-Based Nano-emulsification Improves the Bioavailability of Conjugated Linoleic Acid/ W. Heo, LH Kim, JH Pan [et al.]// *J Agric Food Chem.* – 2016/ – 64(6). – 1355-60
- 151.McClements, D.J. Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components/ D.J. McClements// *Adv Colloid Interface Sci.* –2010. –159. –P. 213–228.

- 152.Semenova M.G. Advances in molecular design of biopolymer-based delivery micro/nanoparticles for essential fatty acids/ M.G. Semenova// *Food Hydrocolloids*. –2017. –68. –P. 114–121.
- 153.Schmidt, D.G. Association of caseins and casein micelle structure. In: *Developments in Dairy Chemistry/ PF Fox, editor*. – Barking, UK: Applied Science Publishers, 1982. —P.61-86.
- 154.Геннис, Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции/ Р. Геннис ; [пер. с англ. Л.И. Барсукова, А.А. Мулкиджаняна, А.Л. Семейкиной [и др.]. –М.: Мир, 1997. – 624 С. –ISBN 5-03-002419-0.
- 155.Тараховский, Ю.С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ/ Ю.С. Тараховский. – М: ЛКИ, 2010. –280 С. – ISBN 978-5-382-01257-5
- 156.Cullis, P.R. Structural Properties of Lipids and Their Functional Roles in Biological Membranes. In: *Membrane Fluidity in Biology/ PR Cullis, B de Kruiff, ML Hope, AJ Verkleij [et al.]*–NY: Academic Press, 1983. –Vol.1. –P. 39–81.
- 157.De Vries, A.H. Molecular structure of lecithin ripple phase/ A.H. de Vries, S. Yefimov, A.E. Mark, S.J. Marrink // *PNAS*. –2005. –102 (15). –P. 5392–5396.
- 158.Leekumjorn S.Molecular studies of the gel to liquid-crystalline phase transition for fully hydrated DPPC and DPPE bilayers/ S Leekumjorn, A.S. Sum// *Biochim Biophys Acta*. –2007. – 1768. –P. 354 – 365.
- 159.Mortensen A. Re-evaluation of lecithins (E 322) as a food additive/ A Mortensen, F Aguilar, R Crebelli, A. Domenico [et al.] // *EFSA Journal*. –2017. –15(4). –P. 4742 [74 PP.]
- 160.Ипатова О.М. Биологическая активность соевых фосфолипидов/ О.М. Ипатова, Н.Н. Прозоровская, Т.И. Торховская, В.С. Баранова [и др.] // *Медицинская химия*. –2004. –50 (5). – С. 436–450.
- 161.Arneshjö B. Intestinal digestion and absorption of cholesterol and lecithin in the human. Intubation studies with a fat-soluble reference substance/ B. Arnesjö, A. Nilsson, J. Barrowman, B Borgström // *Scand J Gastroenterol*. –1969. – 4(8). –653-65
- 162.Borgstrom B. Studies of intestinal digestion and absorption in the human/ B. Borgstrom, A.Dahlqvist, G. Lundh, J.J. Sjoval// *Clin Invest*. – 1957. – 36(10). –P. 1521–1536.
- 163.Nilsson, A. Intestinal absorption of lecithin and lysolecithin by lymph fistula rats/ *Biochim Biophys Acta*. – 1968. –4. – 152(2). –P. 379–390.
- 164.Le Kim, D. Intestinal absorption of polyunsaturated phosphatidylcholine in the rat/ D Le Kim, H Betzing // *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. –1976. – 357 (9). –P. 1321–1331.
- 165.Kidd P.M. Phosphatidylcholine: A superior protectant against liver damage / P.M. Kidd // *Alternative Med Rev*, 1996. –1 (4). –P. 258-274.
- 166.Zeisel, S.H. Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology / S.H. Zeisel // *Annu. Rev. Nutr*. –1981. – 1. – P. 95–121.
- 167.Kidd P.M. Dietary phospholipids as anti-aging nutraceuticals / P.M. Kidd [Eds. Klatz R.A., R. Goldman]// *Anti-Aging Medical Therapeutics*. – Chicago, IL: Health Quest Publications, 2000. – P. 283-301.
- 168.Feng, J.L. Study on food-grade vitamin E microemulsion based on nonionic emulsifiers/ J.L. Feng, Z. WuWang, J. Zhang, Z. NiWang [et al.]// *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. –2009. –339. –P. 1–6.
- 169.Garti, N. Nano-sized self-assemblies of nonionic surfactants as solubilization reservoirs and microreactors for food systems/ N. Garti, A. Spernath, A. Aserin, R. Lutz // *Soft Matter*. –2005. –1. –P. 206–218.
- 170.Garti, N. Micro- and nanoemulsions for delivery of functional food ingredients. In : *Delivery and controlled release of bioactives in food and nutraceuticals/ N. Garti (Ed)*. –Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2008. –P. 149–183. –eBook ISBN: 9781845694210.
- 171.Mozafari, M.R. Nanoliposomes and their application in food nanotechnology/ M.R. Mozafari, C. Johnson, S. Hatzianzoniou, C. Demetzos // *J Liposome Res*. –2008; – 18. –P. 309–327.

172. Taylor, T.M. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture/ T.M. Taylor, P.M. Davidson, B.D. Bruce, J. Weiss // *Crit Deliv Food Science Nutr.* –2005. –45. –P. 587–605.
173. Landy, P. Model studies on the release of aroma compounds from structured and nanostructured oil systems using proton-transfer reaction mass spectroscopy/ P. Landy, P. Polien, A. Rytz, M.E. Leser [et al.]// *J Agric Food Chem.* – 2007. –55. –P. 1915–1922.
174. Phan, V.A. Delayed volatile compound release properties of self-assembly structures in emulsions/ V.A. Phan, Y.C. Liao, A. Antille, L. Sagalowicz [et al.]// *J Agric Food Chem.* –2008. –56. –P. 1072–1077.
175. Vauthey, S. Release of volatiles from cubic phases monitoring by gas sensors/ S. Vauthey, P. Visany, P. Frossard, N. Garti [et al.]// *J Dispers Sci. Technol.* –2000. –21. –P. 263–78.
176. Mills J.K., Needham D. Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition/ J.K. Mills, D. Needham // *Biochim. Biophys. Acta.* –2005. –1716, –P. 77–96.
177. Benedetto M.D. Lysoforte is a flexible tool in animal nutrition/ M.D. Benedetto // *Zootecnica International.* –2015. – №9 –P. 48-55.
178. Koo, S.I. Phosphatidylcholine enhances the lymphatic absorption of alfa-tocopherol in adults rats/ S.I. Koo, S.K. Noh // *J. Nutr.* –2001. –131. –P. 717–722.
179. Noh, S.K. Intraduodenal infusion of lysophosphatidylcholine restores the lymphatic absorption of vitamins A and E in rats fed a low zinc diet/ S.K. Noh, S.I. Koo // *Soc. Exp. Biol. Med.* – 2001. –226. –P. 342–348.
180. Sabiha, A. Lysophospholipids and their role in enhancing Digestion and Absorption/ A. Sabiha // *Avittech. Technical Bulletin.* Sept 2009.
181. Zampiga, M. Effect of dietary supplementation of lysophospholipids on productive performance, nutrient digestibility and carcass quality traits of broiler chickens/ M. Zampiga, A. Meluzzi, F. Sirri // *Ital J Anim Sci.* –2016. –15 (3). –P. 521–528.
182. ГОСТ 32052–2013. Добавки пищевые. Лецитины E322. Общие технические условия : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : введён впервые : введён Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии № 57-ст от 26 апреля 2013 г. : введён с 1 января 2014 г./ Разработан ГНУ ВНИИПАКК Россельхозакадемии. – ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 2004. –27 С.
183. Van Nieuwenhuyzen, W. The industrial uses of special lecithins: a review / W van Nieuwenhuyzen // *JAACS.* – 1981. –58 (10). –P. 886–888.
184. Livney, Y.D. Complexes and conjugates of biopolymers for delivery of bioactive ingredients via food/ Y.D. Livney// *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals/* Ed N. Garti.–Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2008. –P. 234–248. –eBook ISBN: 9781845694210.
185. Ramawat K.G. Polysaccharides Bioactivity and Biotechnology/ K.G. Ramawat, J.-M. Mérillon (Eds.). – NY, Springer, 2015. –2234 P. –ISBN: 978-3-319-16297-3.
186. Cook S.L. Mucoadhesion: a food perspective / S.L. Cook, S.P. Bull, L. Methven., J.K. Parker [et al.]// *Food Hydrocolloids.* – 2017. – 72. –P. 281-296.
187. Goy C.R. Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan/ C. Rejane Goy, D. de Britto, B. G. Assis Odilio// *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* –2009. –19 (3). –P. 241-247.
188. Acosta, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery/ E. Acosta// *Curr Opin Coll In*–2009. – 14. –P. 3–5.
189. Semenova M. G. Utilization of sodium caseinate nanoparticles as molecular nanocontainers for delivery of bioactive lipids to food systems: relationship to the retention and controlled release of phospholipids in the simulated digestion conditions/ In : *Gums and stabilisers for the food industry/* M.G. Semenova, L.E. Belyakova, Yu. N. Polikarpov [et al.] [P. A Williams (Ed)] // – Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008. –14. –P. 326–333.
190. Ahmed, O. Elzoghbi. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems/ O Wael S, Abo El-Fotoh, Nazik A Elgindy // *J Control Release.* –2011. –153. –P.206–216.

191. Arroyo-Maya, I.J. Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: Fabrication and properties/ I.J. Arroyo-Maya, D.J. McClements // *Food Res. Int.* – 2015. –69. –P. 1–8.
192. Komaiko, J. Encapsulation of ω -3 fatty acids in nanoemulsion-based delivery systems fabricated from natural emulsifiers: sunflower phospholipids/ J. Komaiko, A. Sastrosubroto., D.J. McClements // *Food Chemistry*. –2016. –203. –P. 331–339.
193. Bae, E.K. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin/ E.K. Bae, S.J. Lee // *J Microencapsul.* –2008. –25 (8). –P. 549–560.
194. Sahariah P. / Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure–activity relationship/ P. Sahariah, M. Masson // *Biomacromolecules*. – 2017. –18(11). –P. 3846–3868.
195. Livney Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives/ Y. D. Livney // *Curr Opin Colloid In.* –2010. –15. –P. 73–83.
196. Qiu, C. Influence of protein type on oxidation and digestibility of fish oil-in-water emulsions: Gliadin, caseinate, and whey protein/ C. Qiu, M. Zhao, E. A. Decker, D. J. McClements // *Food Chem.* –2015. –175. –P. 249 – 257
197. Ratnam, D.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective / D.V. Ratnam, D.D. Ankola, V. Bhardwaj, D.K. Sahana [et al.] // *J Control Release*. –2006. –113. –P. 189- 207.
198. Santiago, L. G. Novel technologies for the encapsulation of bioactive food compound / L.G. Santiago, G. R Castro // *Curr Opin Food Sci.* –2016. –7. –P. 78-85.
199. Tavares, G. M. Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends/ G. M. Tavares, T. Croguennec, A. F. Carvalhoc et al. // *Trends Food Sci & Techn.* –2014. –37. –P. 5–20.
200. Antunes, F. E. Polymer-vesicle association/ F. E. Antunes., E. F. Marques, M.G Miguel [et al.] // *Adv. Colloid Interface Sci.* –2009. –147–148. –P. 18–35.
201. Merishko-Liversidge, E. Nanosizing: a formulation approach for poorly water-soluble compounds/ E. Merishko-Liversidge, G.G. Liversidge, E.R. Cooper // *Eur J Pharm Sci.* –2003. –18. –P. 113–120.
202. Moghimi, S.M. Long-circulation and target-specific nanoparticles: theory to practice/ S.M. Moghimi, A.S. Hunter, J.C. Murray // *Pharmacological Review*. –2001. –53. –P. 238–318.
203. Nishioka, Y. Lymphatic targeting with a nanoparticulate system/ Y. Nishioka, H. Yoshino // *Adv Drug Deliver Rev.* –2001. –47. –P. 55-64.
204. Толстогузов, В.Б. Новые формы белковой пищи/ В. Б. Толстогузов. –М.: Агропромиздат, 1987. –303 С.
205. Григорович Н.В. Обезжиренный функциональный десерт для общественного питания / Н.В. Григорович, А.С. Антипова, Л.Е. Белякова [и др.]// *Пищевая промышленность*. – 2011. –3. – С. 42-43.
206. Моисеенко Д.В. Разработка многофункционального пищевого ингредиента на основе комплексов казеината натрия и фосфатидилхолина для стабилизации обезжиренных пищевых систем / Д.В. Моисеенко, Н.В. Григорович, А.С. Антипова [и др.]// *Сборник тезисов X ежегодной международной молодёжной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы*. – М.: РУДН, 2011. – С. 169-172.
207. Esmaili, M. Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin: food industry application/ M. Esmaili, M. S. Ghaffari, Z. Moosavi-Movahedi, M.S. Atri [et al.]// *Food Sci Technol.* –2011. – 44. –P. 2166-2172.
208. Hasni, I. Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols/ I. Hasni, P. Bourassa, S. Hamdani, G. Samson [et al.] // *Food Chemistry*. –2011.– 126. –P. 630–639.
209. Rahimi Yazdi, S. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study/ S. Rahimi Yazdi, M. Corredig // *Food Chemistry*. –2012. –132. – P. 1143–1149.

- 210.Sahu, A. Fluorescence Study of the Curcumin-Casein Micelle Complexation and Its Application as a Drug Nanocarrier to Cancer Cells/ N. Kasoju, U. Bora// *Biomacromolecules*. –2008. –9. –P. 2905–2912.
- 211.Burgain J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion/ J. Burgain, C. Gaiani, C. Cailliez-Grimal [et al.]// *Innov Food Sci Emerg Technol*. –2013. –19. –P. 233–242.
- 212.Heidebach T. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells/ T. Heidebach, P. Först, U. Kulozik // *J Food Eng*. –2010. –98. –P. 309–316.
- 213.Würth R. Protective effect of milk–protein based microencapsulation on bacterial survival in simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system/ R. Würth, G. Hörmannspenger, J. Wilke [et al.]// *J Funct Foods*. – 2015. – 15. –P. 116–125.
- 214.Shapira, A. Beta-casein nano-particles as an oral delivery system for chemotherapeutic drugs: Impact of drug structure and properties on co-assembly/ A. Shapira, Y.G. Assaraf, D. Epstein, Y.D. Livney// *Pharmaceutical Research*. –2010. – 27 (10). –P. 2175 – 2186.
- 215.Semenova M.G. Structural and thermodynamic properties underlying the novel functionality of sodium caseinate as delivery nanovehicle for biologically active lipids/ M. G. Semenova, A.S. Antipova, L.E. Belyakova [et al.]// *Food Hydr*. –2014. –42. –P. 149–161.
- 216.Swaisgood, H.E. Chemistry of the caseins/ H.E. Swaisgood// *Advanced dairy chemistry, Vol. 1, Proteins/ P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.)//* –NY: Kluwer Academic/Plenum, 2003 (3rd ed.). – Part A. –pp. 139-202.
- 217.Dickinson, E. Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions/ E. Dickinson// *Colloids Surface B* –2010. – 81. –P. 130–140.
- 218.Измайлова, В. Н. Поверхностные явления в белковых системах/ В.Н. Измайлова, Г.П. Ямпольская, Б.Д. Сумм // – М: Химия, 1988. –240 С. –ISBN 5-7245-109-0.
- 219.Dickinson, E. Stabilising emulsion-based colloidal structures with mixed food Ingredients/ E. Dickinson// *J Sci Food Agr*. –2013. – 93. –P. 710–721.
- 220.Dickinson, E. Structure formation in casein-based gels, foams, and emulsions / E. Dickinson // *Colloids Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. –2006. – 288. –P. 3-11.
- 221.Antipova, A.S. On the effect of calcium ions on the sticking behaviour of casein-coated particles in shear flow/ A.S. Antipova, E. Dickinson, B.S. Murray, M.G. Semenova // *Colloids Surface B*–2002. –27. –P. 123-131.
- 222.Belyakova, L.E. Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation/ L.E. Belyakova, A.S. Antipova, M.G. Semenova, E. Dickinson [et al.]// *Colloids Surface B*. –2003.– 31. –P.31–46.
- 223.Dickinson, E. Influence of calcium ions on creaming and rheology of emulsions containing sodium caseinate/ E. Dickinson, M. Golding // *Colloids Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. –1998. –144. –P. 167–177.
- 224.Dickinson, E. Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: relationship to emulsion flocculation/ E. Dickinson, M.G. Semenova, L.E. Belyakova [et al.]// *J Colloid Interface Sci*. –2001. – 239. –P. 87–97.
- 225.Eliot, C. Effect of ionic calcium on the flocculation and gelation of sodium caseinate oil-in-water emulsions/ C. Eliot, S.J. Radford, E. Dickinson // *Food Colloids: Biopolymers and Materials/ E. Dickinson, T. van Vliet (Eds)* –UK: Royal Society of Chemistry, 2003. –P. 234–242.
- 226.Radford, S. J. Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and alcohol/ S.J. Radford, E. Dickinson, M. Golding // *J Colloid Interface Sci*. –2004. – 274. –P. 673–686.
- 227.Waugh D.F. The interaction of α , β - and κ -caseins in micelle formation/ D.F. Waugh // *Faraday Society Discuss*. –1958. –25. –P. 182-92.
- 228.Walstra P. On the Stability of Casein Micelles/ P. Walstra // *J Dairy Sci*. –1990. –73. –P. 1965–1979.

229. Walstra P. Casein sub-micelles: do they exist? / P. Walstra // *Int Dairy J.* – 1999. – 9. – P. 189–92.
230. Horne, D.S. Casein structure, self-assembly and gelation / D.S. Horne // *Curr Opin Colloid In.* – 2002. – 7. – P. 456-461.
231. Horne D.S. Casein micelle structure: Models and muddles / D.S. Horne // *Curr Opin Colloid In.* – 2006. – 11. – P. 148-153.
232. De Kruif CG. Casein micelle structure, functions and interaction / CG. de Kruif, C. Holt // *Advanced Dairy Chemistry. Proteins, 3-rd Ed* / P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (Eds.). – NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. – P. 233-76.
233. Yearbook 1999. – Hannah Research Institute, Ayr, University of Glasgow, 1999.
234. De Kruif, Cornelis G. Casein micelles and their internal structure / Cornelis G. de Kruif, T. Huppertz, Volker S. Urban, A.V. Petukhov // *Adv in Coll and Interface Sci.* – 2012. – 171-172. – P. 36-52.
235. Dhingra, D. Dietary fibre in foods: A review / D. Dhingra, M. Michael, H. Rajput et al. // *J Food Sci Tech.* – 2012. – 49(3). – P. 255–266.
236. Grabitske, H. Gastrointestinal effects of low-digestible carbohydrates / H. Grabitske, J. Slavin // *Crit Rev Food Sci Nutr.* – 2009. – 49(4). – P. 327–360.
237. Dalzell, J.M. *Ingredients handbook* / J.M. Dalzell // –Leatherhead: Leatherhead Food RA, 1998.
238. Carneiro R. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials / R. Carneiro, R.V. Tonon, C. Grosso [et al.] // *J Food Eng* – 2003. – 115. – P. 443– 451.
239. Bule, M.V. Microencapsulation of ubiquinone-10 in carbohydrate matrices for improve stability / M.V. Bule, R.S. Singhal, J.F. Kennedy // *Carbohydrate Polymers.* – 2010. – 82 (1). – P. 1290–1296
240. Fernandes L.P. Volatile retention and antifungal properties of spray-dried micro particles of *Lippia sidoides* essential oil / L.P. Fernandes, I.C. Turatti, N.P. Lopes [et al.] // *Drying Technology.* – 2008. – 26 (12). – P. 1534-1542.
241. Hogan S.A. Microencapsulation and oxidative stability of spray-dried fish oil emulsions / S.A. Hogan, E.D. O’Riordan, M. O’Sullivan // *J of Microencapsulation.* – 2003. – 20 (5). – P. 675-688.
242. Dickinson, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers / E. Dickinson // *Food Hydrocolloids.* – 2009. – 23. – P. 1473-1482.
243. Benichou, A. Double emulsions stabilized with hybrids of of natural polymers for entrapment and slow release of active matters / A. Benichou, A. Aserin, N. Garti // *Adv Colloid Interface Sci.* – 108. – P. 29–41.
244. Grigoriev, D.O. Mono- and multilayer covered drops as carriers / D.O. Grigoriev, R. Miller // *Curr Opin Colloid In.* – 2009. – 14. – P. 48-59.
245. Dickinson, E. *Advances in Food Colloids* / E. Dickinson, D.J. McClements // – Glasgow: Blackie, 1995. – 333 P. – ISBN 9780751402032.
246. Israelachvili, J.N. *Intermolecular and Surface Forces, 3rd edn* / J.N. Israelachvili // – Amsterdam: Elsevier, 2011. – 704 P. – ISBN 978-0-12-375182-9.
247. McClements, D. J. *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques, 3rd ed* / D.J. McClements // – Boca Raton, FL: CRC Press, 2016. – 690 P. – ISBN 978-1-4987-2669-6.
248. Min, Y. The role of in- terparticle and external forces in nanoparticle assembly / Y. Min, M. Akbulut, K. Kristiansen [et al.] // *Nature Materials.* – 2008. – 7. – P. 527–538.
249. Finkelstein, A.V. *Protein Physics. A Course of Lectures (Soft Condensed Matter, Complex Fluid and Biomaterials)* / A.V. Finkelstein, O.B. Ptitsyn. – San Diego: Academic Press, 2002. – 354 P. – ISBN-13: 978-0122567810.
250. Jenks, W.P. *Catalysis and Chemistry in Enzymology* / W.P. Jenks. – Toronto: General Publishing Company, 1987. – ISBN 0-486-65460-5.
251. Тенфорд, Ч. *Физическая химия полимеров* / Ч. Тенфорд. – М: «Химия», 1965. – 772 с.

252. Nelson, D.L. *Lehninger principles of Biochemistry* 4th ed./ D.L. Nelson, M.M. Cox // –NY: Freeman, 2004. – 1100 P. –ISBN 978-0716743392.

253. Akhtar, M. Whey protein-maltodextrin conjugates as emulsifying agents: an alternative to gum Arabic/ M. Akhtar, E. Dickinson// *Food Hydrocolloids*. –2007. – 21. –P. 607-616.

254. Pat. 20180055777 USA, A61K 38 / 46, A61K 38 / 47. Hydrogel Beads With Self-Regulating Microclimate pH Properties/ McClements DJ, Zhang Z, Zhang R; University of Massachusetts, Boston, MA (USA); -№15.690,748; filed Aug 30, 2017; pub. date 1 Mar 2018. – 33 P.

255. Shaw, L.A. Emulsion droplet interfacial engineering to deliver bioactive lipids into functional foods. Ch. 7/ L.A. Shaw, H. Faraji, T. Aoki [et al.]// *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals*/ Garti, N. (Ed.). –Cambridge, England: CRS Press, 2008. –P.184 –206. – ISBN: 9781845694210.

256. Macleod, G.S. The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release/ G.S. Macleod, J.H. Collett, J.T. Fell // *J. Contr. Rel.* – 1999.– 58, – P.303– 310.

257. Vandamme Th.F. The use of polysaccharides to target drugs to the colon/ Th. F. Vandamme, A. Lenourry, C. Charrueau// *Carbohydr. Polym.* – 2002. – 48. – P.219– 231.

258. Hodge, J.E. Chemistry of Browning Reactions in Model Systems/ J.E. Hodge // *J. Agric. Food Chem.* –1953. –1. –P. 928–94.

259. Al-Hakkak J. Functional egg white-pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction/ J. Al-Hakkak, F. Al-Hakkak. // *J Food Eng.* – 2010. –100. –P. 152–159.

260. Fechner, A. Stability and release properties of double emulsions stabilized by caseinate-dextran conjugates/ A. Fechner, A. Knoth, I. Scherze [et al.]// *Food Hydrocolloids*. –2007. –21. –P. 943-952.

261. Gu, F. Optimization of Maillard reaction products from casein-glucose using response surface methodology / F. Gu, S. Abbas, X. Zhang // *LWT – Food Science and Technology*. –2009. – 42. – P. 1374-1379.

262. Aminlari, M. Effect of Maillard-based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein/ M. Aminlari, R. Ramezani, F. Jadidi // *J Sci Food Agr* –2005. – 85. –P. 2617-2624

263. Mu, M. Acidic solution properties of β -graft-dextran copolymer prepared through Maillard reaction/ M. Mu, X. Pan, O. Yao [et al.]// *J Colloid Interface Sci.* –2006. –301. –P. 98-106.

264. Григорович, Н.В. Сравнение потенциальных возможностей использования ковалентных конъюгатов и простых смесей казеината натрия с мальтодекстринами в качестве наноконтейнеров для доставки фосфатидилхолина через пищевые системы/ Н.В. Григорович, Д.В. Моисеенко, А.Д. de Oliveira Junior [et al.]// Сборник тезисов X ежегодной международной молодёжной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. – М.: РУДН, 2011. – С. 55-58.

265. Термодинамический и структурный анализ формирования и функциональности пищевых биополимерных наносистем для доставки биологически активных веществ : специальность 02.00.04 «Физическая химия» : диссертация кандидата химических наук : Григорович Надежда Викторовна ; Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук. –Москва, 2012. – 170 с.

266. Dickinson, E. Protein displacement from the emulsion droplet surface by oil-soluble and water-soluble surfactants/ E. Dickinson, S. Tanai // *J Agr Food Chem* – 1992. – 40 – P. 179-183.

267. Harkema, Ir. J. Paselli SA-2 and Paselli Excel/ Ir. J. Harkema// *Ingredients Handbook. Fat Substitutes*/ J.M. Dalzell (Ed.).– Surrey: Leatherhead Food RA. –1998. –P. 103-115.

268. O'Regan J. Preparation, Characterization and selected functional properties of sodium caseinate-maltodextrin conjugates/ J. O'Regan, D. Mulvihill // *Food Chem.*, 115, 4, –2009. P.1257–1267.

269. Misharina T.A., Inhibition of Linseed Oil Autooxidation by Essential Oils and Extracts from Spice Plants/ T.A. Misharina, E.S. Alinkina, M.B. Terenina [et al.] // *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*. – 2015. – 51 (4). –P. 417–423.

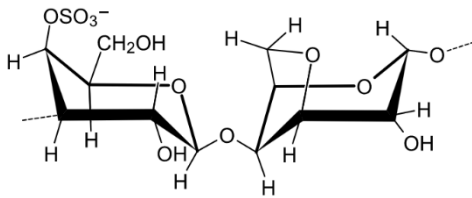
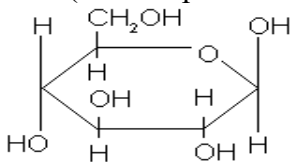
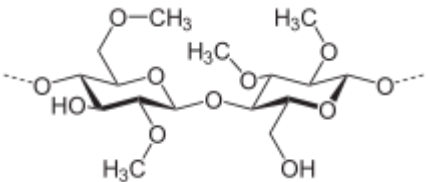
270. Cabrera A.C. Application of artificial neural networks to the prediction of the antioxidant activity of essential oils in two experimental *in vitro* models/ A.C. Cabrera, J.M. Prieto // *Food Chem.* –2010. –118. –P.141.

271. Hazzit M. Composition of the Essential Oils of Thymus and Origanum Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities/ M. Hazzit, A. Baalioamer, M.L. Faleiro [et al.]// *J. Agric. Food Chem.* –2006. –V54. –№17. –P. 6314–6321.
272. Kumar V.V. Lanthanide-induced phosphorus-31 NMR downfield chemical shifts of lysophosphatidylcholines are sensitive to lysophospholipid critical micelle concentration/ V.V. Kumar, W.J. Baumann // *Biophysical Journal* –1991. –59. –P. 103–107.
273. Vitiello G. Microstructural characterization of lysophosphatidylcholine micellar aggregates: The structural basis for their use as biomembrane mimics/ G. Vitiello, D. Ciccarelli, O. Ortona, G. D'Errico // *J Colloid Interface Sci.* –2009. –336 (2). –P. 827–833.
274. Manson, W. Bovine α_{s0} -casein; aphosphorylated homologue of α_{s1} -casein/ W. Manson, T. Carolan, W. D. Annan // *European Journal of Biochemistry.* –1977. –78. –P. 411–417.
275. Burchard, W. Light scattering / W. Burchard // *Physical techniques for the study of food biopolymers* / Ed. S. B. Ross-Murphy. – London: Chapman & Hall, 1994. –P. 151–213.
276. Edmond, E. An approach to the study of phase separation in ternary aqueous systems/ E. Edmond, A. Ogston // *Biochemistry J.* –1968. –109. –P. 569–576.
277. Nagasawa M. Light scattering from polyelectrolyte solutions/ M. Nagasawa, A. Takahashi / *Light scattering from polymer solutions* // Ed. M. B. Huglin. – London: Academic Press, 1972. –P. 671–723.
278. Ioan, C.E. Structure properties of dextran. 2. Dilute solution/ C.E. Ioan, T. Aberle, W. Burchard // *Macromolecules.* –2000. –33. –P. 5730–5739.
279. Kajiwara, K. Rotational isomeric state calculations of the dynamic structure factor and related properties of some linear chains. 1. The r_j (S2)1/2(RH-1) parameter / K. Kajiwara, W. Burchard // *Macromolecules.* –1984. –17. –P. 2669–2673.
280. Kunz, D. Dynamic light scattering from spherical particles/ D. Kunz, A. Thurn, W. Burchard // *Coll. Pol. Sci.* –1983. –261. –P. 635–644.
281. Tuteja, A. Molecular architecture and rheological characterization of novel intramolecularly crosslinked polystyrene nanoparticles / A. Tuteja, M.E. Mackay, C.J. Hawker [et al.] // *J. of Polymer Sci.: Part B: Polymer Physics.* –2006. –44. –P. 1930–1947.
282. Tanford, C. *Physical chemistry of macromolecules*/ C. Tanford.– New York: Wiley, 1961. –724 P.
283. Цветков В.Н. Жёсткоцепные молекулы полимеров/ В.Н. Цветков ; Дерягин Б.В. (ред.), 1986. –М: Наука. –397 с.
284. Dufrene Y. F. Towards nanomicrobiology using atomic force microscopy. *Nature Reviews*/ Y. F. Dufrene // *Microbiology.* –2008. –6(9). –P. 674–680.
285. Gutteridge, J.M. The measurement of malondialdehyde in peroxidised ox-brain phospholipid liposomes / J.M. Gutteridge // *Anal. Biochem.* –1977. –82. –P. 76–82.
286. Gutteridge, J.M., Tickner T.R. The thiobarbituric acid-reactivity of bile pigments / J.M. Gutteridge, T.R. Tickner // *Biochem. Med.* –1978. –19. –P. 127–132.
287. Рыбакова, О. В. Определение спектральных характеристик спиртовых растворов растительных масел и масляных экстрактов методом УФ-спектрофотометрии / О. В. Рыбакова, Е. Ф. Сафонова, А.И. Сливкин// *Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация.* –2007. –2. –P. 171–173.
288. Fernandez, J. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat/ J. Fernandez, J.A. Perez-Alvarez, J.A. Fernandez-Lopez // *Food Chem.* –1997. –59(3). –P. 345–353.
289. Fu, J. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress/ J. Fu, B. Huang // *Environ. Exp. Bot.* –2001. –45. –P. 105–114.
290. Kwon, T.W. Reactivity of malonaldehyde with food constituents / T.W. Kwon, D.B. Menzel, H.S. Olcott // *J. Food Sci.* –1965. –30. –P. 808–813.
291. McClements, D.J. Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems / D.J. McClements, Y. Li // *Food Funct.* –2010. –1. –P. 32–59.

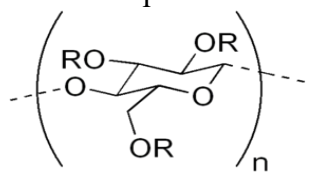
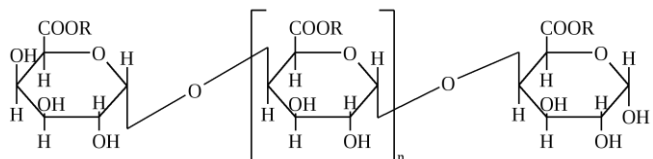
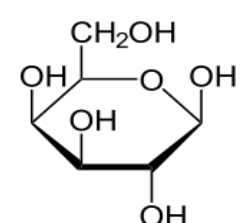
292. Minekus M. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus / M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Balance [et al.] // *Food Funct.* –2014. – 5. –P. 1113–1124.
293. Warren F.J. The interplay of α -amylase and amyloglucosidase activities on the digestion of starch in in vitro enzymic systems / F.J. Warren, B. Zhang, G. Waltzer [et al.] // *Carbohydrate Polymers.* – 2015. –117. –P. 192–200.
294. Itzhak, R. F. Amicro-Biuret method for estimating proteins / R. F. Itzhak, D. M. Gill // *Anal. Biochem.* – 1964. – 9. –P. 401–410.
295. Моисеенко 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. Матсон [и др] // Сборник тезисов XII ежегодной международной молодёжной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. – М.: РУДН, 2012. – С. 119-122.
296. Moiseenko 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.] // Сборник тезисов XI ежегодной международной молодёжной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. – М.: РУДН, 2012. – С. 307-310.
297. 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 [et al.] // *Food Hydrocolloids.* – 2016. – 52. – P. 144 – 162.
298. Bai G. Association and phase behavior of cholic acid-modified dextran and phosphatidylcholine liposomes / G. Bai, M. Nichifor, M. Bastos // *J. Phys. Chem. Lett.* –2010. –1 (6). –P. 932–936.
299. Menger, F. M. A tribute to the phospholipid/ F. M. Menger, M.E. Chlebowski, A.L. Galloway [et al.] // *Langmuir*, 2005. –21. – P. 10336–10341.
300. de Oliveira Tiera, V. A. Interaction of amphiphilic derivatives of chitosan with DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) / V. A. de Oliveira Tiera, F.M. Winnik, M. J. Tiera // *J. Therm. Anal. Calorim.* – 2010. –100. – P. 309–313.
301. Schulz, M. Beyond the lipid-bilayer: Interaction of polymers and nanoparticles with membranes / M. Schulz, A. Olubummo, W.H. Binder // *Soft Matter*, 2012. – 8. –P. 4849–4864.
302. Strömstedt, A.A. Interaction between amphiphilic peptides and phospholipid membranes/ A. A. Strömstedt, L. Ringstad, A. Schmidtchen [et al.] // *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.* – 2010. – 15. – P. 467–478;
303. Istarova, T. A. Effect of pH on the interactions of sodium caseinate with soy phospholipids in relation to the foaming ability of their mixtures // T.A. Istarova, M.G. Semenova, G.M. Sorokoumova [et al.] // *Food Hydrocolloids.* –2005. –19. –P. 429–440.
304. Semenova, M. G. Thermodynamic and structural insight into the underlying mechanisms of the phosphatidylcholine liposome-casein associates co-assembly and functionality / M. G. Semenova, A. S. Antipova, M. S. Anokhina [et al.] // *Food Funct.* –2012. – 3(3). –P. 271–282.
305. Il'in M.M. Calorimetric Study of the Interactions between Small- Molecule Surfactants and Sodium Caseinate with Reference to the Surface Activity of Their Binary Mixtures/ M.M. Il'in, M.S. Anokhina, M.G. Semenova [et al.] // *Food Hydrocolloids.* –2005. –18. – P. 441-453.
306. Semenova M.G. Thermodynamic analysis of the impact of the surfactant-protein interactions on the molecular parameters and surface behavior of food proteins/ M.G. Semenova, L.E. Belyakova, Yu.N. Polikarpov [et al.] // *Biomacromolecules.* – 2006.– 7(1). –P. 101 – 113.
307. Horne, D.S. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products/ D.S. Horne // *Int. Dairy Journal.* –1998. –8. –P. 171–177.
308. Gernall, A.B. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction/ A.B. Gernall, C.I. Bardavil, M.M. David // *Journal of Biological Chemistry* –1949. – 177- P. 751-766.

309. Stenekes, R.J.H. Degradable dextran microspheres for the controlled release of liposomes/ R.J.H. Stenekes, A.E. Loebis, C.M. Fernandes [et al.] // *Int. J. Pharm.* –2001. –214. –P. 17–20.
310. Shoemaker, S.D. Calcium modulates the mechanical properties of anionic phospholipid membranes / S.D. Shoemaker, T.K. Vanderlick // *J. Coll. Int. Sci.* – 2003. – 266. –P. 314–321.
311. Wassall S.R. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation/ Wassall S. R., Caffrey M., Cherezov [et al.]// *Chem. Phys. Lip.* – 2004. – 132. – P. 79–88.
312. Chen, A. Determination of the binding isotherm and size of the bovine serum albumin sodium dodecyl sulphate complex by diffusion-ordered 2D NMR / A. Chen, D. Wu, C.S. Johnson // *J. Phys. Chem.* –1995. – 99 (2). –P. 828–834.
313. Vasilescu, M. Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescence probe methods / M. Vasilescu, D. Angelescu, M. Almgren [et al.]// *Langmuir.* – 1999. – 15. –P. 2635–2643.
314. Semenova, M.G. Protein-polysaccharide interactions and digestion of the complex particles / M.G. Semenova, D.V. Moiseenko, N.V. Grigorovich [et al.]// *Food structure, digestion and health (1st Ed)*// Под ред. M. Boland, M. Golding, H. Singh.– London, Waltham (USA), San Diego (USA): Elsevier Academic Press, 2014. – P. 169–192. –ISBN: 9780124046108.
315. Pachekrepapol U. Effect of dextran and dextran sulfate on the structural and rheological properties of model acid milk gels/ U. Pachekrepapol, D.S. Horne, J.A. Lucey // *J. Dairy Sci.* – 98. – 2843–2852.
316. Semenova, M.G. Light scattering study of sodium caseinate - dextran sulfate in aqueous solution: relationship to emulsion stability/ M.G. Semenova, L.E. Belyakova, Yu.N. Polikarpov [et al.]// *Food Hydr.* –2009. –23 (3). –P. 629–639.
317. 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 [et al.]// *Nanotechnology in Food Industry, volume II: Encapsulations.* – Cambridge: Elsevier. – 2016. – P. 193–228. –ISBN : 9780128043073.
318. 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 [et al.]// *Gums and Stabilisers for the Food Industry 18.* – Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2016. –P. 182–189. –ISBN: 978-1-78262-327-4.
319. Semenova M.G. Biopolymer nanovehicles for essential polyunsaturated fatty acids: Structure–functionality relationships/ M.G. Semenova, A.S. Antipova, D.V. Zelikina [et al.] // *Food Research International.* – 2016. –88. – P. 70–78.
320. Nicolai, T. Structure of self-assembled globular proteins / T. Nicolai // *Food colloids: Self-assembly and material science*/ E. Dickinson, M. E. Leser (Eds.). – Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2007. –P. 35–56. –ISBN: 978-1-4987-2669-6.
321. 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 gastro-intestinal conditions in vitro / A.S. Antipova, D.V. Zelikina, E.A. Shumilina [et al.]// *Food Research International.* – 2016. –88. – P.173–178.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Характеристика некоторых полисахаридов, используемых в пищевой промышленности

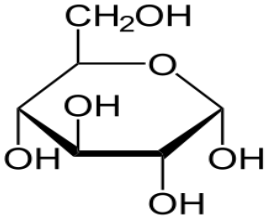
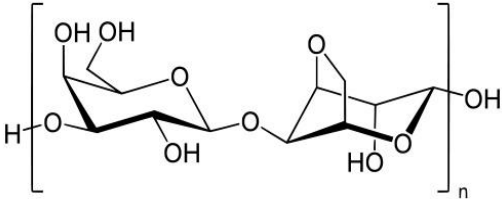
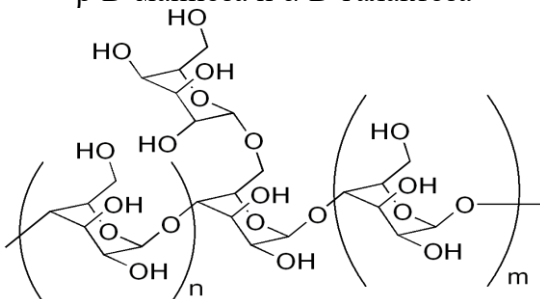
Наименование	Природное воспроизводимое сырьё	Основной тип структуры полисахаридной цепочки	Основной мономер	Заряд при pH = 7.0
<i>Каррагинан</i>	Водоросли	Линейная/ спиральная	Сульфатированный галактан 	Сильно отрицательный (анионный)
<i>Ксантановая камедь</i>	Бактерии <i>Xanthomonas campestris</i>	Линейная/ спиральная (высокий молекулярный вес)	β -D-Глюкоза (мономерное звено) 	Нейтральный
<i>Метилцеллюлоза, Гидроксипропилцеллюлоза, Гидроксипропилметилцеллюлоза</i>	Древесная масса, стебли растений	Линейная	Метилированная глюкоза 	Нейтральный

Продолжение приложения А.

Наименование	Природное воспроизводимое сырьё	Основной тип структуры полисахаридной цепочки	Основной мономер	Заряд при pH= 7.0
<i>Карбоксиметил-целлюлоза</i>	Древесная масса, стебли растений	Линейная	Карбоксиметилированная глюкоза 	Анионный
<i>Пектин</i>	Стенки растительных клеток	Линейная	Глюкуроновая кислота 	Анионный
<i>Гуммиарабик</i>	Древесный сок акации	Разветвлённая	Галактоза 	Нейтральный

R = H or CH₂CO₂H

Продолжение приложения А.

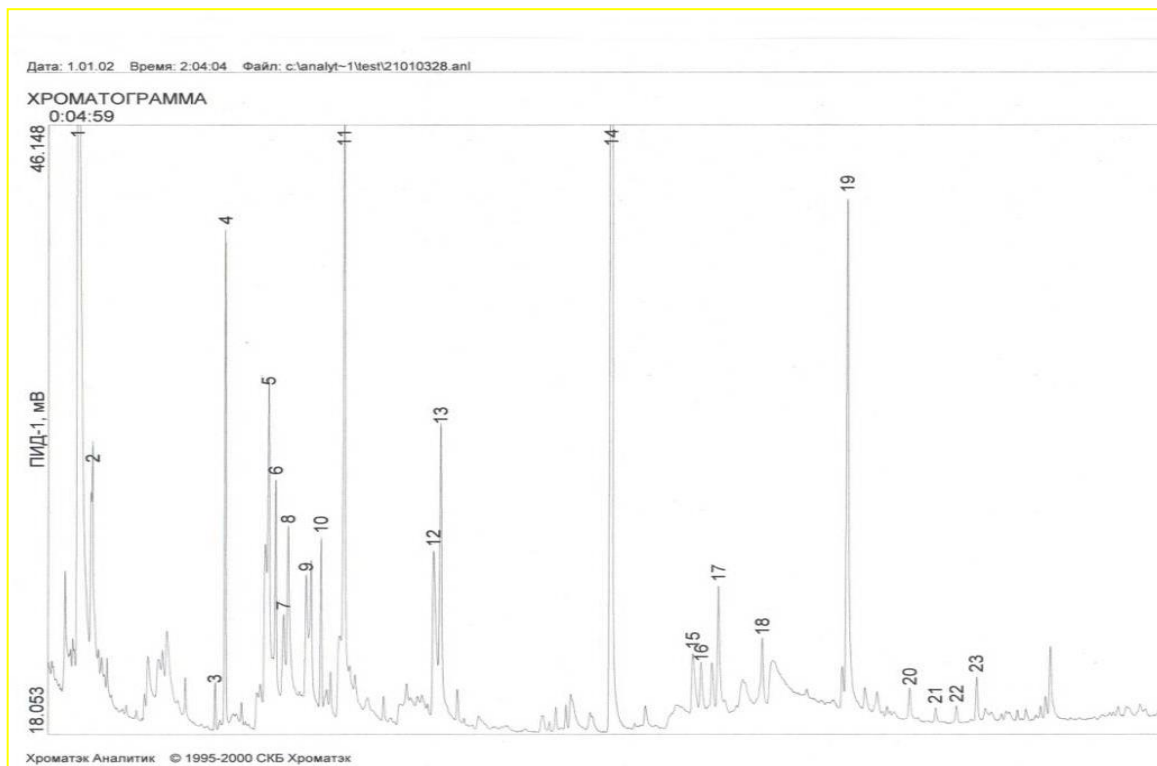
Наименование	Природное воспроизводимое сырьё	Основной тип структуры полисахаридной цепочки	Основной мономер	Заряд при pH= 7.0
Крахмал: основные компоненты - амилоза и амилопектин	Корнеплоды, листовые, стеблевые, бобовые, плодовые, тыквенные	Линейная (амилоза) Разветвленная (амилопектин)	α -D-Глюкозные единицы 	Нейтральный
Агар (агароза и агаропектин)	Водоросли	Линейная	α - и β -галактоза 	Нейтральный
Галактоманнаны (камеди)	Семена растений и деревьев (рожковое дерево, камеди тары и гуара)	Разветвленная	β -D-манноза и α -D-галактоза 	Нейтральный

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Химический состав образца фосфатидилхолина, используемого в работе

Компонент	ФХ (Lipoid S 100)
Фосфолипиды (г/100г)	
Фосфатидилхолин (сухой вес)	≥ 94
N-Асуl-фосфатидил этаноламин	$\leq 0,5$
Фосфатидилэтанолламин	$\leq 0,1$
Фосфатидилинозитол	$\leq 0,1$
Лизофосфатидилхолин	$\leq 3,0$
Жиpнокислотный состав (в % от общего количества жирных кислот)	
Линолевая (ω -6)	59 ÷ 70
Линоленовая (ω -3)	3 ÷ 7
Олеиновая (ω -9)	11 ÷ 15
Пальмитиновая	12 ÷ 17
Стеариновая	2 ÷ 5
Неполярные липиды (г/100г)	
Триглицериды	$\leq 2,0$
Свободные жирные кислоты	$\leq 0,5$
DL- α -токоферол	0,15 ÷ 0,25
Аналитические данные:	
Фосфор (г/100г)	3,7 ÷ 4,0
Вода (г/100г)	$\leq 2,0$
Этанол (г/100г)	$\leq 0,2$
Пероксидное число (мэкв O ₂ /кг)	≤ 3
Йодное число	97 ÷ 107
Тяжелые металлы	≤ 10

*Данные предоставлены производителем Lipoid GmbH, Германия.

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Хроматограмма льняного масла, используемого в работе



Математическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2007 и Sigma Plot 10. Стандартное отклонение средних величин из 3-х измерений не превышало 5% (относительных).

Номер пика	RI	Наименование летучего компонента	мг на 100г масла
1	776	Гексаналь	2164
2	797	Бутилацетат	76
3	923	2-Гептаналь	19
4	931	Бензальдегид	194
5	962–966	2-октен-3-ол-2-гептанон	106
6	970	2-октанон	69
7	974	2,4-гептадиеналь	16
8	980	Октаналь	54
9	1000	Декан	38
10	1005	Фенилацетальдегид	65
11	1027	2-октеналь	276
12	1082	Гептановая кислота	40
13	1087	2-ноненаль	194
14	1200	Додекан	2000
15	1253	Деканаль	25
16	1258	2-Деценаль	17
17	1271	2,4 Декадиеналь	68
18	1300	Тридекан	66
19	1358	2-Ундеценаль	355
20	1400	Тетрадекан	22
21	1419	γ-декалактон	5
22	1434	Ундекановая кислота	10
23	1448	δ-декалактон	10

* Данные предоставлены сотрудниками лаборатории флейвохимии ИБХФ РАН (зав. лаб., д.х.н. Т. А. Мишарина).

ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Образцы растворов и их обозначения, используемые в работе

Кон _S –ФХ, Кон _M –ФХ	Образец, содержащий липосомы фосфатидилхолина (ФХ), инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S /Кон _M
Кон _S –ЛФХ, Кон _M –ЛФХ	Образец, содержащий мицеллы лизофосфатидилхолина (ЛФХ), инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S /Кон _M
Кон _S –ДПФХ, Кон _M –ДПФХ	Образец, содержащий липосомы дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S /Кон _M
[Б–ФХ]–ДС	Образец, содержащий липосомы ФХ, инкапсулированные казеинатом натрия (Б) и декстран сульфатом (ДС)
ФХ–ЛМ	Образец, содержащий липосомы ФХ, обогащённые с помощью триглицеридов льняного масла (ЛМ)
ФХ–АЛК	Образец, содержащий липосомы ФХ, обогащённые с помощью индивидуальной альфа-линоленовой жирной кислоты (АЛК)
ЛФХ–ЛМ	Образец, содержащий мицеллы лизофосфатидилхолина (ЛФХ), обогащённые с помощью триглицеридов льняного масла
ЛФХ–АЛК	Образец, содержащий мицеллы лизофосфатидилхолина (ЛФХ), обогащённые с помощью АЛК
ДПФХ–ЛМ	Образец, содержащий липосомы дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), обогащённые с помощью триглицеридов льняного масла
ДПФХ–АЛК	Образец, содержащий липосомы дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), обогащённые с помощью АЛК
ФХ–(АЛК–ЭМГ)	Образец, содержащий липосомы ФХ, обогащённые с помощью индивидуальной альфа-линоленовой жирной кислоты (АЛК) с добавлением эфирного масла гвоздики (ЭМГ)
ФХ–(ЛМ–ЭМГ)	Образец, содержащий липосомы ФХ, обогащённые с помощью триглицеридов льняного масла с добавлением эфирного масла гвоздики (ЭМГ)

Продолжение приложения Г.

Кон _S –(ФХ–АЛК)	Образец, содержащий липосомы ФХ, обогащённые с помощью АЛК, инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S
Кон _S –(ФХ–ЛМ)	Образец, содержащий липосомы ФХ, обогащённые с помощью триглицеридов льняного масла (ЛМ), инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S
Кон _S –(ЛФХ–ЛМ)	Образец, содержащий мицеллы ЛФХ, обогащённые с помощью триглицеридов льняного масла, инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S
Кон _S –(ЛФХ–АЛК)	Образец, содержащий мицеллы ЛФХ, обогащённые с помощью индивидуальной АЛК, инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S
Кон _S –(АЛК–ЛК)	Образец, содержащий эквимасовую смесь АЛК и линолевой жирной кислоты (ЛК), инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S
Кон _S –(ФХ–ЛМ–ЭМГ)	Образец, содержащий липосомы ФХ, обогащённые с помощью триглицеридов льняного масла (ЛМ), с добавлением ЭМГ, инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S
Кон _S –(ФХ–АЛК–ЭМГ)	Образец, содержащий липосомы ФХ, обогащённые с помощью индивидуальной АЛК, с добавлением ЭМГ, инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S
Кон _S –(ФХ–ЭМГ)	Образец, содержащий липосомы ФХ, с добавлением ЭМГ, инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S
Кон _S –(ДПФХ–АЛК)	Образец, содержащий липосомы ДПФХ, обогащённые с помощью индивидуальной АЛК, инкапсулированные ковалентным конъюгатом Кон _S
ДПФХ–АЛК–ЭМГ	Образец, содержащий липосомы дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), обогащённые с помощью АЛК, с добавлением ЭМГ

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубочайшую признательность своему научному руководителю, д.х.н. Семёновой Марии Германовне за неоценимую поддержку и многократные обсуждения работы на всех ее этапах выполнения.

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам лаборатории функциональных свойств биополимеров, а именно к.х.н. Антиповой А.С., к.х.н. Григорович Н.В. и к.б.н. Мартиросовой за помощь в проведении отдельных экспериментов, ценные рекомендации и всестороннюю поддержку.

Автор выражает благодарность сотрудникам ИБХФ РАН: д.х.н. Мишариной Т.А. за проведение характеристики жирнокислотного состава льняного масла методом газо-жидкостной хроматографии. Автор искренне благодарит д.б.н., проф. Пальмину Н.П., к.б.н. Богданову Н.Г., д.х.н., проф. Коварского А.Л. и к.х.н. Каспарова В.В. за помощь в проведении экспериментов методом электронно-парамагнитного резонанса. Автор выражает благодарность к.х.н. Плащиной И.Г. за помощь в проведении экспериментов, связанных с измерением дзета-потенциала, а также к.б.н. Бинюкову В.И. за исследования и обсуждение данных, полученных атомно-силовой микроскопией.

Автор также благодарен сотрудникам РЭУ им. Г.В. Плеханова, в частности, д.т.н, проф. Баранову Б.А. и доценту кафедры ресторанного бизнеса Липатовой Л.П. за доброе отношение и дружескую поддержку при подготовке диссертации.

Автор бесконечно благодарен своей семье за поддержку, оказанную в период подготовки диссертационной работы.