

УДК 664.38

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ БЕЛКОВ В ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ

*Толстогузов В. Б., Браудо Е. Е.,  
Гринберг В. Я., Гуров А. Н.*

Рассмотрен общий физико-химический подход к проблеме переработки белка в пищевые продукты. Проанализированы результаты исследований процессов гелеобразования белков и полисахаридов — основных макромолекулярных компонентов пищи. Обсуждены явления неравновесного комплексообразования белков и анионных полисахаридов, а также ограниченной термодинамической совместимости в системах белок — полисахарид — вода и белок — белок — вода. Кратко отмечены прикладные аспекты указанных явлений.

Библиография — 127 ссылок.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1738
II. Гелеобразование белков и полисахаридов	1739
III. Комплексообразование в растворах белков и анионных полисахаридов	1750
IV. Термодинамическая совместимость белков и полисахаридов в растворе	1753

### I. ВВЕДЕНИЕ

Переработка белков и других пищевых веществ в высококачественные пищевые продукты призвана обеспечить широкое применение этих веществ для питания людей.

Получение новых форм пищи (НФП), т. е. пищевых продуктов, производимых путем промышленной переработки пищевых веществ природного происхождения, получило интенсивное развитие в последние годы [1]. Тем самым решается задача экономически рационального использования ресурсов традиционного и нетрадиционного продовольственного сырья. Проблема переработки белков и полисахаридов как основных макромолекулярных компонентов пищи относится к области физико-химии растворов полимеров; она также имеет прямое отношение к моделированию многокомпонентных биополимерных систем и, кроме того, к получению и использованию полимеров медицинского назначения.

Вопросы, связанные с переработкой белка в различные формы пищи, могут быть разделены на две группы: 1) структурирование белков в смеси с другими пищевыми веществами для получения пищевых продуктов с заданной структурой и физико-химическими свойствами; 2) придание продуктам необходимого цвета, вкуса и запаха с помощью пищевых красителей, вкусовых и ароматических веществ, а также их обогащение аминокислотами, витаминами и другими незаменимыми факторами питания.

Это разделение является, однако, условным, поскольку вкус, цвет и запах продукта связаны с его структурой и физико-химическими свойствами. Так, вкусовые ощущения, возникающие при приеме пищи, находятся в зависимости от ее механических свойств, набухания и синерезиса, смачивания и т. п. Упругость паров ароматических веществ над пищевым продуктом в значительной степени определяется сорбцией этих веществ в объеме липидной и водной фаз, включая сольubilлизацию белками, а также на внутренних и внешних поверхностях раздела. Естественно, что введение в продукт различных дополнительных компонентов может вызвать десорбцию ароматических, вкусовых и окраши-

вающих веществ, приводить к изменению структуры и физико-химических свойств продукта.

В данной работе будут рассмотрены лишь вопросы, относящиеся к первой группе, т. е. физико-химические аспекты переработки белка в НФП. Эти вопросы анализируются с позиций развитого за последние годы общего физико-химического подхода к проблеме переработки белка. При разработке этого подхода исходили из двух очевидных соображений. Во-первых, пищевые продукты представляют собой многокомпонентные системы, во-вторых, пищевые продукты в большинстве случаев являются твердыми телами и в то же время содержат большое количество воды (более 50%). Такое сочетание состава и свойств присуще гелям. Иными словами, большинство твердых пищевых продуктов с точки зрения физической химии можно рассматривать как гели белков и других пищевых веществ. Отсюда следует, что основная задача исследований состоит в получении гелей с необходимым составом, структурой и физико-химическими свойствами [1].

Представлялось, однако, необходимым дополнить эту общую физико-химическую задачу двумя другими. Естественно желание перерабатывать какой-либо вид белка в широкий набор пищевых продуктов, что обуславливает необходимость получения жидких и гелеобразных систем с большим разнообразием свойств. Отсюда возникает задача регулирования растворимости белка, его способности стабилизировать дисперсные системы, образовывать гели и т. д. Этот сложный комплекс физико-химических характеристик, определяющих структурные функции белка в перерабатываемых системах, обозначают понятием «функциональные свойства белка» [2, 3].

Большое значение имеет также обратная задача, а именно, получение данного продукта питания на основе различных белков. В этой связи наибольший интерес представляют фундаментальные физико-химические явления и закономерности, общие для всех белков. Процессы, основанные на такого рода явлениях, должны, по-видимому, отличаться простотой, технологичностью и «универсальностью по белку».

В настоящем обзоре обсуждаются три фундаментальные физико-химические явления, лежащие в основе современных методов переработки белка в НФП: гелеобразование белков, полисахаридов и их смесей, образование комплексов белков и анионных полисахаридов, ограниченная термодинамическая совместимость в растворе белков и полисахаридов, а также белков друг с другом. Прикладные аспекты проблемы, затронутые в настоящем обзоре лишь кратко, более подробно обсуждены в монографии [1].

## II. ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЕ БЕЛКОВ И ПОЛИСАХАРИДОВ

Основная физико-химическая задача, возникающая при производстве НФП, заключается в разработке путей получения гелей (однофазных и двухфазных) с заданным и регулируемым составом, структурой, механическими и другими физико-химическими свойствами.

Задача получения НФП по своему характеру в известной мере близка другим физико-химическим задачам, возникающим при получении полимерных изделий через раствор, в частности при переработке технических полимеров [4, 5]. Такая аналогия является, однако, далеко не полной. Прежде всего, принципиальная многокомпонентность перерабатываемых пищевых систем и конечных продуктов, наряду с разнообразием функций, выполняемых отдельными компонентами, обуславливает сложность и многоаспектность физико-химических проблем, связанных с регулированием состава и свойств продуктов, что обычно не характерно для технических полимеров. Вторая важная особенность пищевых систем, отличающая их от технических полимеров, заключается в том, что в первом случае гелеобразное состояние характерно не только для промежуточных, но и для конечных продуктов. Соответственно возникает сложный комплекс требований к физико-химическим

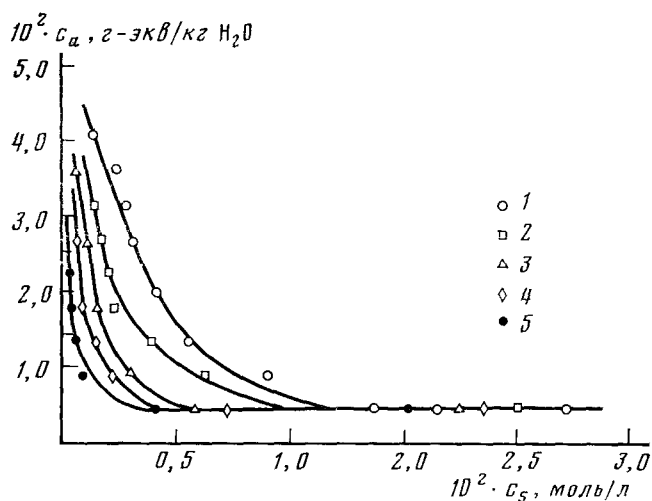


Рис. 1. Граничные условия гелеобразования систем альгинат натрия — хлорид поливалентного металла [22];  $c_a$  — концентрация альгината натрия;  $c_s$  — концентрация хлорида поливалентного металла; 1 —  $\text{CaCl}_2$ ; 2 —  $\text{SrCl}_2$ ; 3 —  $\text{BaCl}_2$ ; 4 —  $\text{CuCl}_2$ ; 5 —  $\text{LaCl}_3$

свойствам готовых продуктов питания как гелей. Эти свойства определяют в свою очередь пищевую ценность, органолептические и технологические характеристики продуктов [6].

При получении НФП используют три типа процессов перевода жидких растворов биополимеров в гелеобразное состояние: термотропное, ионотропное и лиотропное гелеобразование. В первом случае определяющую роль играет изменение температуры раствора, во втором — ионного состава системы, в третьем — концентрации биополимера. Последний тип гелеобразования лежит в основе технологии производства белковых продуктов пористой структуры, однако природа протекающих при этом процессов изучена крайне слабо [6].

Пример ионотропного гелеобразования — получение гелей альгината и пектината кальция. На этих процессах базируется технология производства макаронных изделий, круп, картофелепродуктов [7–12]. При получении трехмерных пищевых продуктов на основе гелей альгината и пектината кальция основная сложность заключается в достижении однородности их структуры, поскольку высокая скорость взаимодействия ионов кальция с молекулами полиуронидов не позволяет обеспечить удовлетворительное смешение реагентов. Известные способы получения изотропных гелей альгината и пектината кальция, по-видимому, основаны на регулировании активности ионов кальция в реагирующей системе.

Более широкое применение процесс ионотропного гелеобразования находит при получении одно- и двумерных гелей, т. е. волокон и пленок [13, 14]. В этих случаях используют диффузию ионов-осадителей в растворы полиуронидов. Таким путем получают гели с развитой фазовой структурой, воспроизводящей структуру ряда биологических тканей [1, 15–18]. Среди методов ионотропного волокнообразования систематически исследован процесс матричного прядения. Этот способ позволяет перерабатывать белки вне зависимости от их прядомости и регулировать в широких пределах функциональные свойства волокон [19–21]. Стабилизированные ионами кальция межфазные адсорбционные слои, содержащие белки и полиурониды, обеспечивают исключительно высокую устойчивость к коалесценции эмульсионных пищевых продуктов [22].

Разработан метод характеристики граничных условий ионотропного гелеобразования [23]. Он заключается в определении наименьших концентраций реагентов, достаточных для фиксации формы капли раство-

ра полиэлектролита, вводимого в раствор соли поливалентного металла. На рис. 1 приведены диаграммы гелеобразования для систем альгинат натрия — хлорид поливалентного металла. При сравнительно невысоких концентрациях сшивающего агента — иона поливалентного металла, граничные условия гелеобразования определяются константой равновесия ионного обмена. С увеличением концентрации сшивающего агента достигаются условия, при которых граничная концентрация полиэлектролита перестает зависеть от концентрации иона поливалентного металла. Эта концентрация полимера была названа «критической концентрацией гелеобразования». Она, по-видимому, зависит от молекулярной массы и от конформации макромолекул. Указанный метод удобен, в частности, для определения условий гелеобразования анионных полисахаридов в присутствии белков [22], что существенно при решении ряда прикладных задач, например при переводе в гелеобразное состояние полисахаридной фазы двухфазной жидкой системы белок — полисахарид — вода (см. ниже).

Термотропное гелеобразование было исследовано на примере глобулинов соевых бобов (ГБС), овальбумина, а также желатины и ряда полисахаридов. Исследовалось также термотропное гелеобразование растворов смесей белков и полисахаридов, что представляет собой очередной шаг в моделировании многокомпонентных пищевых систем [6].

### 1. Термотропное гелеобразование глобулярных белков

Термотропное гелеобразование является следствием термической денатурации глобулярных белков [24—28]. Исследование термической денатурации ГБС в разбавленном растворе методом прецизионной сканирующей калориметрии [29] показало, что 7S-компонент глобулиновой фракции денатурирует при более низких температурах, чем 11S-компонент (рис. 2) [30]. Температура и энтальпия денатурации основных компонентов ГБС линейно возрастают при повышении концентрации NaCl. Наклон этой зависимости (для температуры денатурации) — лиотропная константа  $K_s$ , необычно велик, около  $20 \text{ град} \cdot (\text{моль} \cdot \text{л})^{-1}$ . Отношение лиотропной константы к температуре денатурации, характеризующее величину лиотропного эффекта, линейно возрастает с увеличением молярной доли гидрофобных звеньев в молекуле белка. Необычно сильное влияние NaCl на температуру денатурации основных компонентов ГБС можно объяснить сравнительно высоким содержанием гидрофобных звеньев и их полной маскировкой в нативном состоянии. Разности энтальпий и энтропий переноса денатурированной и нативной форм основных компонентов ГБС из воды в раствор NaCl положительны и также линейно возрастают с увеличением концентрации соли. Это показывает, что в основе влияния соли на термическую денатурацию ГБС лежит уменьшение гидратации белка.

Исследовано влияние условий гелеобразования на структуру термотропных гелей ГБС методами релаксации напряжения и электронной микроскопии [31, 32]. С помощью метода планирования многофакторного экстремального эксперимента установлено, что зависимость модуля сдвига указанных гелей от температуры и длительности нагревания имеет единственный максимум, причем его положение ( $95 \pm 5^\circ \text{C}$ ;  $35 \pm 5 \text{ мин}$ ) не зависит от концентрации белка. В то же время релаксационные свойства гелей ГБС зависят исключительно от температуры нагревания. Это объясняется тем, что температура (но не продолжительность) нагревания определяет состав компонентов ГБС, участвующих в процессе гелеобразования.

Релаксационные свойства термотропных гелей ГБС могут быть однозначно охарактеризованы параметром  $\bar{H} = -[\partial F(\tau)/\partial \ln(\tau)]$ , где  $F(\tau)$  — нормализованная функция релаксации, представляющая собой отношение значений релаксационного модуля при некотором времени  $\tau$  и при  $\tau_0 = 1 \text{ мин}$ . В интервале от  $70$  до  $115^\circ \text{C}$  зависимость параметра  $\bar{H}$  от температуры нагревания линейна (рис. 2). По данным сканирующей

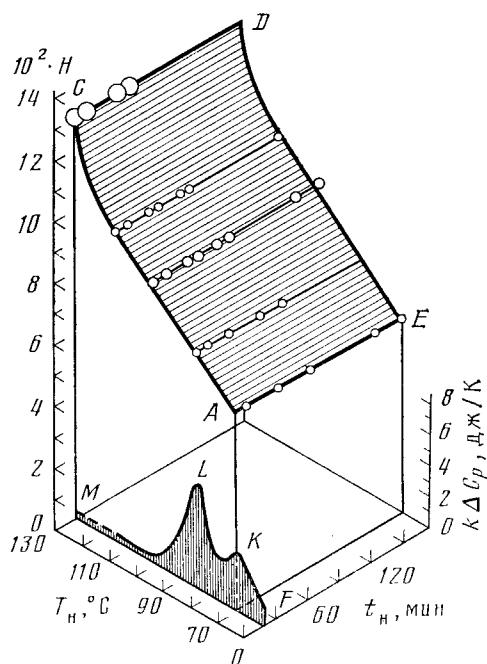


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость наклона нормализованной функции релаксации термотропных гелей глобулиновой фракции бобов сои при 25°С ( $\bar{H}$ ) (левая ось ординат) от температуры и длительности нагревания в процессе гелеобразования (поверхность  $ACDE$ ). На лицевой плоскости диаграммы нанесена термограмма раствора глобулиновой фракции (правая ось ординат,  $k$  — масштабный фактор, значение которого несущественно) при скорости сканирования 2 град·мин<sup>-1</sup> (кривая  $FKLM$ ) [30]

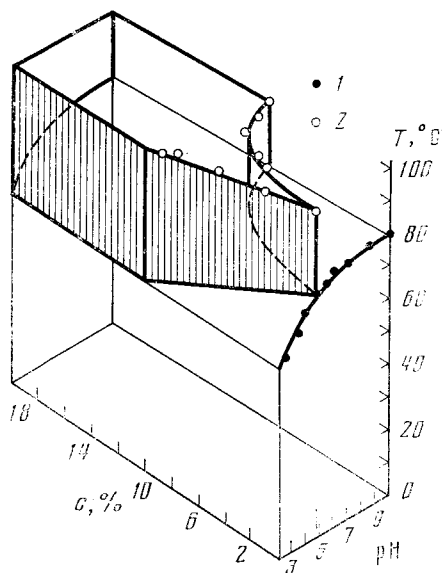


Рис. 3

Рис. 3. Диаграмма состояния системы овальбумин — вода при разных температурах, рН и концентрациях белка (1 — рН-зависимость температуры денатурации; 2 — рН-зависимость порога гелеобразования); область гелеобразного состояния заштрихована, изоэлектрическая точка отмечена стрелкой

калориметрии, при повышении температуры в этом интервале монотонно увеличивается содержание денатурированных форм 11S-глобулина, а, следовательно, и степень его участия в процессе гелеобразования. Отклонение от линейного характера зависимости  $\bar{H}=f(T)$  выше 115°С вызвано, по-видимому, возрастанием вклада декструкционных процессов.

Экспериментальные данные по изотермической релаксации напряжения для гелей ГБС различных концентраций обобщены в виде концентрационно-инвариантной релаксационной кривой в результате приведения по модулю, но без приведения по времени [33]. Аналогичные результаты были получены и при исследовании реологических свойств термотропных гелей овальбумина, а также ряда анионных полисахаридов [34]. Отсутствие приведения по времени свидетельствует о независимости скорости релаксационных процессов в гелях от концентрации полимера, что является признаком микронеоднородной структуры геля, во многом сходной со структурой мицеллярных растворов ПАВ. Увеличение концентрации полимера в растворе микронеоднородной структуры приводит к увеличению числа структурных элементов — ассоциатов макромолекул, не изменяя состав и структуру ассоциата. Последнее обстоятельство определяет концентрационную инвариантность скорости релаксационных процессов, равно как и других интенсивных свойств раствора. Так, в работе [35] при исследовании концентрационной зависимости относительного коэффициента активности противоионов<sup>1</sup> в

<sup>1</sup> Относительный коэффициент активности иона — отношение коэффициента активности иона в исследуемом растворе к коэффициенту активности данного иона в растворе его хлорида при одинаковой эквивалентной концентрации.

растворах анионных полисахаридов было показано, что при переходе, предположительно, в область полуразбавленных растворов эта величина становится постоянной.

Параметр приведения релаксационных кривых по модулю — величина, пропорциональная равновесному модулю упругости. Опираясь на этот параметр, можно определять скейлинговые зависимости равновесного модуля упругости несмотря на то, что для большинства исследованных гелей белков и полисахаридов из-за низкой скорости релаксационных процессов этот модуль не может быть измерен. Концентрационная зависимость равновесного модуля упругости гелей ГБС [33], овальбумина, а также желатины и агара [36] описывается теоретическим соотношением Херманса [37], выведенным для модели процесса гелеобразования как случайной обратимой ассоциации линейных идентичных макромолекул без циклизации с образованием узлов сетки по бимолекулярному механизму.

Лидирующая роль в термотропном гелеобразовании ГБС принадлежит гидрофобным взаимодействиям. Так, термотропные гели ГБС растворяются в 8 М растворе мочевины, но не растворимы в 0,01 М растворе  $\beta$ -меркаптоэтанола, вещества, разрушающего дисульфидные связи. Под действием мочевины термотропные гели ГБС и нативные белки распадаются на практически идентичные субъединицы или их димеры. На основании данных ПМР высказано предположение, что плотности упаковки полипептидных цепей в структурных элементах гелей и в субъединицах нативных белков сравнимы по величине. В случае 17,5%-ного геля один структурный элемент состоит приблизительно из 20 субъединиц.

Учитывая определяющее значение гидрофобных взаимодействий в гелеобразовании ГБС, можно полагать, что гелеобразующая способность этих белков коррелирует с величиной параметра гидрофобности по Тенфорду — Бигелоу, который представляет собой среднюю свободную энергию переноса звена полипептидной цепи из гидрофобного интерьера макромолекулы белка в водное окружение [38, 39]. В соответствии с этим критерием гелеобразующая способность мономерных форм основных глобулинов бобов сои должна убывать в ряду  $2,8S\text{-глобулин} > >B > \beta > \alpha > A$ , где  $A$  и  $B$  — соответственно кислая и основная субъединица 11S-глобулина, а  $\alpha$  и  $\beta$  — тяжелая и легкая субъединицы 7S-глобулина. Анализ золь-фракции показал, что кислые субъединицы 11S-глобулина действительно обладают наименьшей гелеобразующей способностью среди мономерных форм основных глобулинов бобов сои и накапливаются в золь-фракции в процессе гелеобразования.

По данным Малеева и Гасана [40], температура денатурации гелей овальбумина практически не зависит от его концентрации в растворе. Диаграмма состояния системы овальбумин — вода представлена на рис. 3<sup>2</sup>. Зависимость критической концентрации гелеобразования овальбумина от pH имеет резкий минимум в окрестности изоэлектрической точки (ИЭТ). Это означает, что скорость гелеобразования и функциональность молекул овальбумина при ИЭТ максимальны. Известно [41], что именно в ИЭТ существенен отрицательный вклад флуктуаций зарядов в величину химического потенциала белка в растворе.

Так же, как и в случае гелей ГБС, зависимость модуля упругости гелей овальбумина от температуры и продолжительности нагревания имеет единственный максимум<sup>3</sup>. Оптимальное время гелеобразования (30 мин) не зависит от pH, но оптимальная температура, равная 80°С, вдали от ИЭТ, резко возрастает в области pH 4,0–5,5. Гели, образованные вдали от ИЭТ, однофазны, а в окрестностях ИЭТ — двухфазны. Для каждой из этих групп характерна своя функция механической релаксации. Поскольку температура и время нагревания раствора, pH и

<sup>2</sup> Grinberg N. V., Bikbov T. M., Grinberg V. Ya., Chaika T. S., Vaintraub I. A., Tolstoguzov V. B. Int. J. Biol. Macromol., 1985, v. 7, p. 152.

<sup>3</sup> Grinberg N. V., Bikbov T. M., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B. Colloid and Polym. Sci., 1985, v. 33, в печати.

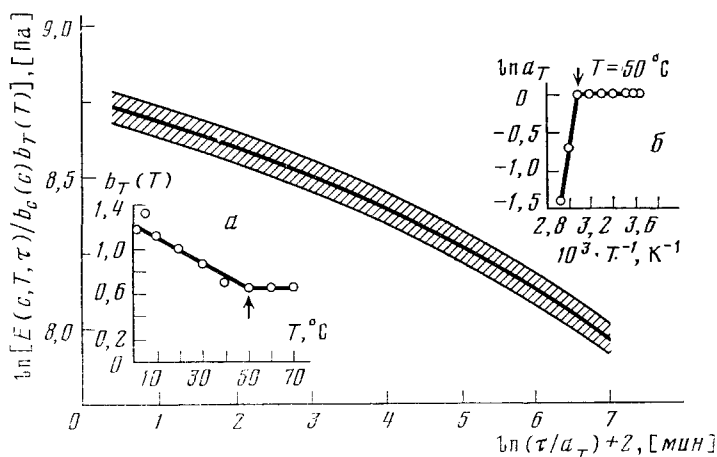


Рис. 4.  $c, T$ -Инвариантная обобщенная релаксационная кривая однофазных термотропных гелей овальбумина, приведенная к состоянию  $c_0=10\%$ ,  $T_0=50^\circ\text{C}$  ( $E$  — релаксационный модуль,  $c$  — концентрация белка,  $T$  — температура,  $\tau$  — время,  $b_c(c) = E(c, T, \tau)/E(c_0, T, \tau)$  и  $b_T(T) = E(c, T, \tau)/E(c, T_0, \tau)$  — параметры приведения модуля по концентрации и температуре,  $a_T$  — параметр приведения времени по температуре); полуширина заштрихованной полосы равна стандартному отклонению экспериментальных точек от средней кривой; на вставках  $a$  и  $b$  приведены температурные зависимости параметров приведения модуля и времени по температуре

концентрация белка ( $c$ ) влияют только на равновесный модуль упругости, все полученные кривые релаксации могут быть описаны двумя нормализованными функциями релаксации, отвечающими соответственно однофазным и двухфазным гелям.

Вид обобщенной релаксационной кривой гелей овальбумина<sup>4</sup> (рис. 4) позволяет отнести эти гели к системам, находящимся в начале зоны перехода из стеклообразного состояния в высокоэластическое [42]. Аналогичный характер имеют кривые механической релаксации для гелей желатины [43], мальтодекстрина [44] и ряда анионных полисахаридов [45–48]. Форма кривых релаксации свидетельствует о заторможенности релаксационных процессов, локализованных в ассоциатах макромолекул, образующих пространственную сетку [34]. В то же время температурно-инвариантная релаксационная кривая геля ГБС в интервале времени около семи десятичных порядков [33] имеет вид, характерный для аморфных шитых полимеров в конце переходной зоны или в начале зоны плато [42].

## 2. Термотропное гелеобразование полисахаридов

В отличие от гелеобразования глобулярных белков, процессы термотропного гелеобразования полисахаридов в большинстве случаев обратимы. Благодаря относительной простоте химического строения полисахаридов для этого класса биополимеров удастся проследить взаимосвязь между их химическим строением, конформацией и гелеобразующей способностью [49–51]. Термотропные гели полисахаридов, подобно многим другим термотропным гелям, в частности гелям желатины, образуются при ухудшении качества растворителя. Гелеобразованию обязательно предшествует стадия возникновения ассоциатов макромолекул, и гель образуется в результате объединения этих ассоциатов в пространственную сетку [52]. Некоторые особенности релаксационного поведения гелей полисахаридов, вытекающие из описанного механизма гелеобразования, обсуждены в предыдущем разделе.

Изучение зависимости структуры и свойств гелей от времени показало, что существуют два типа сеток: термодинамически стабильные и

<sup>4</sup> Гринберг В. Я., Гринберг Н. В., Бикбов Т. М., Толстогузов В. Б. Материалы V Всесоюз. совещания «Процессы студнеобразования в растворах полимеров», 1985, ч. 1, с. 96.

метастабильные. К последнему типу относятся гидрогели мальтодекстрина [44] и метилцеллюлозы<sup>5</sup>. При продолжительном хранении эти гели переходят в пастообразное состояние, что проявляется, в частности, в снижении теплоты плавления гелей мальтодекстрина. По данным электронной микроскопии [44], структурные элементы сетки геля мальтодекстрина со временем перегруппировываются, образуя изодиаметрические ассоциаты. Противоположное направление процесса структурообразования наблюдалось в случае гелей желатины [53]. Прочность таких гелей со временем возрастает [54]. Аналогично изменяются модули упругости гелей пектина [45] и других анионных полисахаридов. Для этих систем полимер — растворитель гелеобразное состояние является термодинамически устойчивым.

Термотропное гелеобразование пектинов протекает при pH 4 в присутствии веществ, понижающих коэффициент активности воды (сахароза, глицерин и др.) [55]. Гелеобразующая способность пектинов критическим образом зависит от их степени этерификации (СЭ). Эта зависимость определяется по крайней мере двумя факторами: 1) влиянием СЭ на гибкость цепи пектина, что определяет возможность возникновения оптимального числа зон контакта при гелеобразовании; 2) влиянием СЭ на свободную энергию межмолекулярных взаимодействий в зонах контакта. По-видимому, первый фактор имеет решающее значение, так как максимальные значения прочности и модуля упругости гелей достигаются при СЭ  $\approx 50\%$  [56, 57], т. е. тогда, когда гибкость цепи пектинов максимальна [35, 58]. Скорость гелеобразования при этой СЭ имеет минимальное значение [56]. Исследование структуры гелей методом спектротурбидиметрии показало<sup>6</sup>, что в этих условиях образуются системы с минимальными размерами структурных элементов, которым отвечает максимальная прочность геля (рис. 5).

Стандартная энтальпия распада узлов сетки гелей пектина в смесях воды с сахарозой [45] и глицерином [48] составляет 7 — 39 кДж·моль<sup>-1</sup>. Столь низкие значения энтальпии характерны для растворов полужесткоцепных полимеров, неспособных к конформационным превращениям в условиях гелеобразования. Формирование узлов сетки в таких системах не сопровождается значительными потерями конформационной энтропии. Поэтому процесс гелеобразования становится термодинамически выгодным уже при небольшом уменьшении энтальпии. Такой тип гелеобразования назван некооперативным [34].

Аналогичная картина наблюдается в случае гелей мальтодекстрина. Для 20%-ного геля распад узлов сетки характеризуется следующими термодинамическими параметрами:  $\Delta H^0 = 25$  кДж·моль<sup>-1</sup> [34, 44],  $\Delta S^0_{25^\circ\text{C}} \approx 32$  Дж·(моль·град)<sup>-1</sup>;  $\Delta G^0_{25^\circ\text{C}} \approx 15$  кДж·моль<sup>-1</sup>.

Совершенно по-иному протекает гелеобразование желатины. Стандартная энтальпия распада узлов сетки 5%-ного геля составляет 300 кДж·моль<sup>-1</sup> [34, 43]. В этом случае (кооперативный механизм гелеобразования) возникновение узлов сетки геля сопровождается спиралезобразованием гибких макромолекул, способных к конформационным превращениям. Высокая энтальпия процесса гелеобразования компенсирует большие потери конформационной энтропии.

Среди исследованных анионных полисахаридов конформационно лабильными являются сульфатированные галактаны —  $\kappa$ -каррагинан и фуцелларан. Оба полисахарида в процессе охлаждения их растворов до комнатной температуры претерпевают конформационное превращение клубок — спираль [49]. Образование гелей этих полисахаридов promoted ионами некоторых металлов, в том числе калия.

Существующие теории рассматривают спирализацию макромолекул  $\kappa$ -каррагинана в качестве первичного процесса при гелеобразовании

<sup>5</sup> Grishchenkova E. V., Braudo E. E., Tolstoguzov V. B. Colloid and Polym. Sci., 1985, v. 263, в печати.

<sup>6</sup> Платина И. Г. Автореферат дис. на соискание уч. степени канд. хим. наук. М., ИИЭОС АН СССР, 1984.



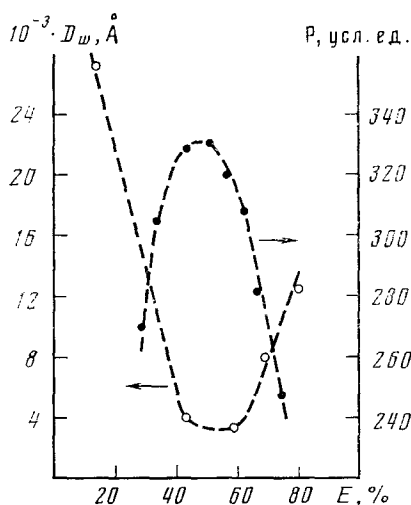


Рис. 5

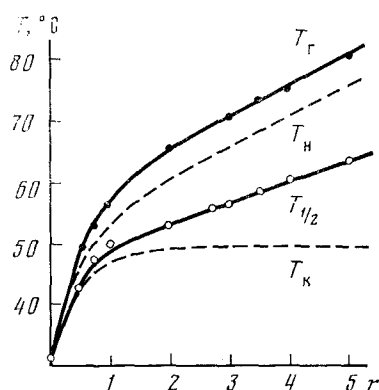


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость эффективного диаметра структурных элементов ( $D_w$ ) и прочности ( $P$ ) [57] гелей пектина от степени этерификации ( $E$ ) последнего; концентрация пектина — 1%; pH 2,2; растворитель — смесь воды и глицерина (1 : 1)

Рис. 6. Зависимость температуры гелеобразования ( $T_g$ ) и температур начала ( $T_n$ ), середины ( $T_{1/2}$ ) и конца ( $T_k$ ) перехода клубок — спираль 1,5%-ного раствора  $\kappa$ -каррагинана от концентрации KCl,  $r$  — отношение эквивалентных концентраций KCl и  $\kappa$ -каррагинана

[59–61], подобно тому, как это происходит при образовании гелей желатины [62]. Функция ионов металлов, способствующих гелеобразованию  $\kappa$ -каррагинана, сводится к промотированию спирализации [63] и к участию в формировании контактов между спирализованными участками макромолекул. Было, однако, показано, что образование ассоциатов макромолекул и сетки геля  $\kappa$ -каррагинана под действием ионов калия протекает выше температурной области конформационного перехода клубок — спираль. Так, эффективный размер ассоциатов макромолекул  $\kappa$ -каррагинана не изменяется при конформационном переходе [64]. По данным работы [46], температура плавления 1,5%-ного геля  $\kappa$ -каррагинана превышает температуру его полной деспирализации на  $13^\circ$ . На рис. 6 показаны зависимости от концентрации KCl температуры гелеобразования 1,5%-ного раствора  $\kappa$ -каррагинана, а также температур начала, середины и окончания перехода клубок — спираль в этом растворе<sup>7</sup>. Видно, что при  $[KCl] > 3,7 \cdot 10^{-2}$  моль  $\cdot$  л $^{-1}$  температура гелеобразования лежит выше температурной области спирализации. Предполагается, что сетка геля  $\kappa$ -каррагинана образуется за счет сшивки макромолекул полисахарида ионами калия, образующими координационные связи с гидроксильными группами. Необходимым условием образования сетки геля является нейтрализация ионами калия заряда сульфатных групп.

Конформационное состояние и стабильность конформаций макромолекул определяют термореологическое поведение гелей  $\kappa$ -каррагинана<sup>7</sup>. На рис. 7 показана температурная зависимость наибольшей ньютоновской вязкости 1,5%-ного геля в координатах уравнения Де Гузман — Аррениуса. Видно, что исследованный температурный диапазон распадается на три области:

1)  $t < 41^\circ \text{C}$  — область температур, в которой спиральная конформация макромолекул стабильна ( $\Delta H^0 = 36$  кДж  $\cdot$  моль $^{-1}$ ;  $\Delta S_{25^\circ \text{C}}^0 \approx 135$  Дж  $\cdot$  (моль  $\cdot$  град) $^{-1}$ ;  $\Delta G_{25^\circ \text{C}}^0 \approx -4$  кДж  $\cdot$  моль $^{-1}$  [34]);

2)  $41^\circ \text{C} \leq t < 52^\circ \text{C}$  — область конформационного перехода спираль — клубок ( $\Delta H^0 = 235$  кДж  $\cdot$  моль $^{-1}$ ;  $\Delta S_{41^\circ \text{C}}^0 \approx 775$  Дж  $\cdot$  (моль  $\cdot$  град) $^{-1}$ ;  $\Delta G_{41^\circ \text{C}}^0 \approx -9$  кДж  $\cdot$  моль $^{-1}$  [34]);

<sup>7</sup> Plashchina I. G., Muratalieva I. R., Braudo E. E., Tolstoguzov V. B. Carbohydr. Polym., 1985, v. 5, в печати.

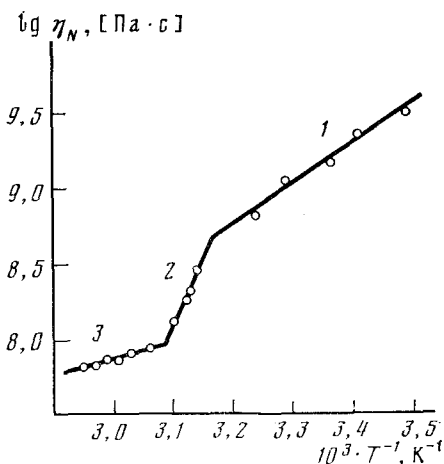


Рис. 7

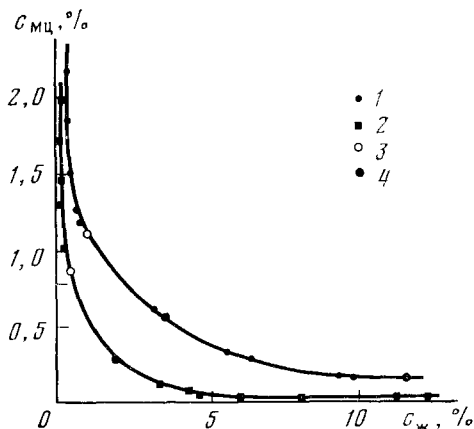


Рис. 8

Рис. 7. Температурная зависимость наибольшей вытоновской вязкости ( $\eta_N$ ) 1,5%-ного геля  $\kappa$ -каррагинана

Рис. 8. Фазовая диаграмма системы желатина — метилцеллюлоза — вода при 35°С [67];  $c_{мц}$  и  $c_{ж}$  — концентрации метилцеллюлозы и желатины; 1 — бинадаль при pH 3,0; 2 — бинадаль при pH 4,75 (изоионная точка желатины); 3 — пороговая точка; 4 — критическая точка

3)  $52^\circ\text{C} \leq t \leq 66^\circ\text{C}$  — область температур, в которой сетка геля  $\kappa$ -каррагинана образована деспирализованными макромолекулами ( $\Delta H^\circ = 11 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ).

Как видно из приведенных термодинамических параметров, в области 2 гелеобразование носит кооперативный характер. В областях 1 и 3 гелеобразование некооперативно: в первом случае это объясняется стабильностью спиральной конформации, благодаря чему полисахарид приобретает свойства полужесткоцепного полимера, во втором — невозможностью возникновения спиральной конформации.

По-видимому, повышенная, благодаря более низкому содержанию сульфатных групп по сравнению с  $\kappa$ -каррагиномом, стабильность спиральной конформации фуцелларана обуславливает некооперативный характер гелеобразования этого полисахарида в смеси сахарозы (70%) и воды вплоть до температуры  $50^\circ\text{C}$  ( $\Delta H^\circ = 19 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ) [34, 47].

Таким образом, для исследованных полисахаридов преимущественно характерно некооперативное гелеобразование. Оно наблюдалось в случае полисахарида с высокой жесткостью цепи (пектин), для полисахаридов со стабильной в условиях эксперимента спиральной конформацией (мальтодекстрин, фуцелларан,  $\kappa$ -каррагинан при температурах ниже  $41^\circ\text{C}$ ), а также при гелеобразовании выше температурной области перехода спираль — клубок ( $\kappa$ -каррагинан при температуре выше  $52^\circ\text{C}$ ).

### 3. Образование и свойства термотропных гелей, содержащих белки и полисахариды

Выделяют следующие типы многокомпонентных гелей [1, 65, 66]:

1) Наполненные гели, в которых один из макромолекулярных компонентов выполняет функцию гелеобразователя, а другие играют роль наполнителей. К этой группе можно отнести также гели, наполненные частицами дисперсной фазы.

2) Смешанные гели, в которых существуют две или более сетки, образованные различными гелеобразователями. Необходимыми условиями образования смешанных гелей являются термодинамическая совместимость гелеобразователей в растворе и отсутствие специфического взаимодействия между ними.

3) Комплексные гели, пространственная сетка которых образована продуктами взаимодействия различных макромолекулярных компонентов.

Свойства смешанных и комплексных гелей желатины и альгинатов и пектинов кальция и натрия суммированы в обзоре [66] и в монографии [1].

Образование смешанных и однофазных наполненных гелей ограничено низкой совместимостью макромолекулярных компонентов в отсутствие комплексообразования между ними. На рис. 8 приведена фазовая диаграмма системы желатина—метилцеллюлоза—вода при 35°С (при этой температуре ни один из компонентов не образует гель) [67]. Из рисунка видно, что совместимость желатины с метилцеллюлозой несколько увеличивается при сдвиге рН системы от изоэлектрической точки желатины. Это объясняется подавлением самоассоциации желатины, вызванной кулоновским взаимодействием за счет флуктуаций заряда, вследствие возрастания электростатического отталкивания [68]. Введение NaCl не приводит к заметному увеличению совместимости, так как снижение самоассоциации желатины компенсируется увеличением под действием NaCl самоассоциации метилцеллюлозы. Обращает на себя внимание асимметрия фазовой диаграммы желатина—метилцеллюлоза—вода, что характерно для квазибинарных белково-полисахаридных систем [69].

В однофазных многокомпонентных гелях в отсутствие комплексообразования наблюдается усиление структурообразования отдельных компонентов, т. е. развитие внутри- и межмолекулярных контактов между макромолекулами одного компонента в ущерб контактам полимер—растворитель. Это явление обусловлено эффектом исключенного объема [6, 70, 71].

Важным примером процесса, определяемого развитием внутримолекулярных контактов полимер—полимер, служит переход клубок—спираль. На рис. 9 показано влияние декстрана на мутаротацию желатины в растворе при 6°С. Видно, что присутствие всего лишь 0,2% декстрана, что составляет 5% от концентрации желатины, вызывает резкое ускорение конформационного перехода последней. Одновременно возрастает скорость гелеобразования. Переход клубок—спираль приводит к расширению области несовместимости желатины и декстрана [72].

Эффект усиления структурообразования компонентов в смешанных гелях проявляется и в снижении критической концентрации гелеобразования<sup>\*</sup>. Как видно из рис. 10, смешанный гель желатины и агарозы образуется при таких концентрациях полимерных компонентов, при которых каждый из них в отдельности еще не способен образовать сетку геля. Аналогичное явление отмечено для смешанных термотропных гелей агара и бычьего сывороточного альбумина [73].

Исследование вязкоупругих свойств гелей желатины, содержащих глобулярные белки или же полисахарид (декстран), показало, что присутствие наполнителей сказывается на эффективном числе узлов сетки геля (равновесном модуле упругости), тогда как скорость релаксационных процессов в большинстве случаев сохраняется неизменной [72, 74].

Свойства многокомпонентных гелей естественно зависят от их фазового состояния. В некоторых случаях на кривых зависимости свойств гелей от состава наблюдаются экстремальные точки, которые могут отвечать переходу из однофазного состояния в двухфазное. Такой переход в области концентрации наполнителя, отвечающей минимальному значению податливости (максимуму модуля упругости), был установлен для системы желатина—декстран—вода методом электронной микроскопии [72]. Снижение податливости в однофазном состоянии объясняется увеличением эффективного числа узлов сетки геля желатины под действием наполнителя (декстрана) благодаря эффекту исключенного объема. В двухфазном состоянии капли фазы, обогащенной декстраном, образуют дефекты сетки геля желатины.

<sup>\*</sup> Gottlieb A. M., Plashchina I. G., Braudo E. E., Tolstoguzov V. B. Colloid and Polym. Sci., 1985, v. 263, в печати.

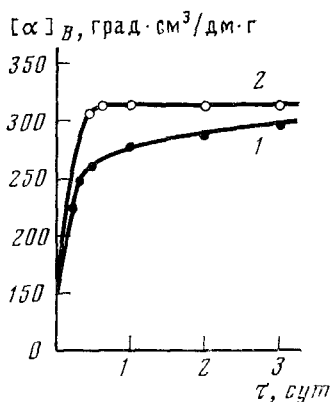


Рис. 9

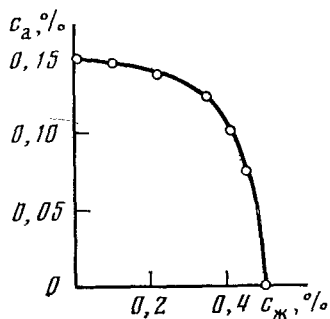


Рис. 10

Рис. 9. Влияние декстрана на мутаротацию 4%-ного раствора желатины [72];  $[\alpha]_B$  — удельное оптическое вращение при  $\lambda = 436$  нм; 1 — вода; 2 — 0,2% раствор декстрана

Рис. 10. Зависимость критической концентрации гелеобразования от состава смеси желатина — агароза — вода при 8°С;  $c_{ж}$  — концентрация желатины;  $c_a$  — концентрация агарозы

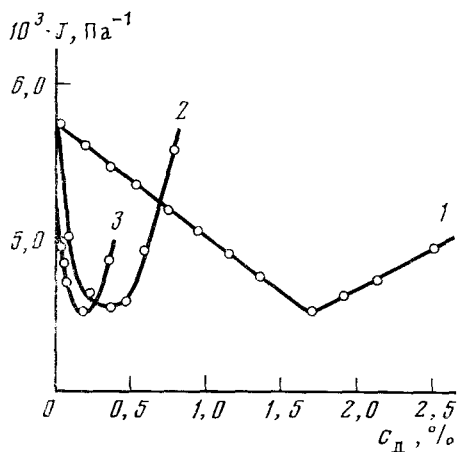


Рис. 11

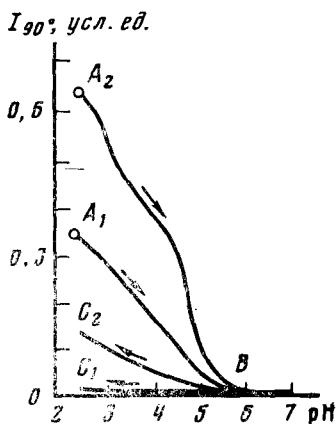


Рис. 12

Рис. 11. Влияние концентрации декстрана ( $c_d$ ) на податливость ( $J$ ) 10%-ных гелей желатины [72]; молекулярная масса декстрана: 1 — 20 кД; 2 — 65 кД; 3 — 500 кД

Рис. 12. Кривые нефелометрического титрования растворов комплексов бычьего сывороточного альбумина и декстрансульфата при их массовом соотношении 1:1 и 2,3:1 (кривые  $A_1BC_1$  и  $A_2BC_2$ ); суммарная концентрация макрореагентов — 0,1 г/л

В общем случае область концентраций наполнителя, отвечающую началу возрастания податливости и степени набухания гелей, предложено называть пределом структурной совместимости наполнителя и гелевой матрицы [6]. Этот предел зависит как от природы матрицы, так и от молекулярных характеристик наполнителя [74, 75]. Характер влияния молекулярной массы декстрана на предел его структурной (термодинамической) совместимости с матрицей геля желатины виден на рис. 11 [72].

В области двухфазного состояния каждый из полимерных компонентов концентрируется в одной из фаз. В этом случае свойства смешанных гелей определяются в первую очередь свойствами непрерывной фазы. При изменении состава системы в широких пределах происходит инверсия фаз, сопровождающаяся изменением свойств геля [6, 36, 75, 76].

### III. КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ В РАСТВОРАХ БЕЛКОВ И АНИОННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Взаимодействие между белками и анионными полисахаридами изучалось многими авторами, и некоторые аспекты этого явления обобщены в ряде обзоров [77—81]. Уже первые систематические исследования, посвященные главным образом природе фазового расслоения в растворах белков и анионных полисахаридов (т. е. образованию комплексных коацерватов или нерастворимых комплексов), показали, что белково-полисахаридные комплексы (БПК) стабилизированы преимущественно силами электростатической природы. С другой стороны, продемонстрированное в ряде работ комплексообразование между анионными полисахаридами и белками при pH выше изоэлектрической точки белка (когда макрореагенты заряжены одноименно) [82—86], а также комплексообразование между нейтральными полисахаридами и белками (не лектинами) [87, 88] указывают на существенную роль вторичных неэлектростатических взаимодействий в стабилизации комплексов белок—анионный полисахарид.

Функциональные свойства БПК, такие как растворимость, поверхностная активность, реологические характеристики, существенно отличаются от аналогичных свойств исходных макрореагентов и, что особенно важно, могут регулироваться в широких пределах.

Водорастворимые БПК представляют особый интерес для пищевой технологии, однако их структура и свойства изучены мало. Представляется актуальным изучение равновесности БПК, природы стабилизирующих их сил, молекулярной структуры БПК и связанного белка, функциональных свойств комплексов.

#### 1. Исследование неравновесных комплексов

Исследования процесса образования БПК показали, что последние при достаточно низких значениях pH и ионной силы не являются равновесными: их свойства, в частности растворимость<sup>9</sup>, зависят от пути получения [89]. Так, при смешении растворов макрореагентов в условиях интенсивного комплексообразования (при pH ниже ИЭТ) образуются «комплексы смешения» (С-комплексы), плохо растворимые в воде. Напротив, при медленном титровании раствора, когда условия среды изменяются таким образом, что взаимодействие постепенно усиливается, образуются хорошо растворимые «комплексы титрования» (Т-комплексы).

Различия в растворимости С- и Т-комплексов наглядно проявляются при нефелометрическом титровании (рис. 12). Полуколичественной характеристикой выхода нерастворимых БПК в этом случае служит мутность системы.

Различие в растворимости С- и Т-комплексов (агрегационный гистерезис) особенно сильно в случае БПК высокосульфатированных полисахаридов, таких как декстрансульфат и гепарин. Кроме того, для растворов и суспензий этих БПК характерна высокая агрегационная устойчивость: светорассеяние и волновой экспонент (чувствительный к изменению размера рассеивающих частиц) могут быть постоянными в течение нескольких суток при комнатной и повышенной (40—50° С) температуре.

Наиболее детально неравновесные БПК были изучены на примере комплексов высокомолекулярного декстрансульфата с белками, в частности с бычьим сывороточным альбумином (БСА) [90].

Характер взаимодействия БСА с декстрансульфатом резко меняется в зависимости от pH. При  $5,6 \leq \text{pH} \leq 8,5$  (диапазон относительно слабого взаимодействия) свойства БПК не зависят от способа их получения, что указывает на равновесный характер комплексообразования. Анализ

<sup>9</sup> Используемые нами по отношению к неравновесным комплексам термины «растворимые» и «нерастворимые» условны, так как, строго говоря, должны относиться к устойчивому термодинамическому равновесию.

состава водорастворимых комплексов при рН 5,6 показал, что сорбция БСА декстрансульфатом некооперативна, т. е. взаимодействие белок — белок не оказывает заметного влияния на процесс связывания белка полисахаридом. В этих условиях БПК не агрегированы: каждая их частица содержит одну молекулу декстрансульфата.

В окрестности изоэлектрической точки БСА ( $5,0 < \text{pH} < 5,6$ ) состав растворимых комплексов также не зависит от пути их получения, но сильно зависит от рН. Вместе с тем, в этом диапазоне рН уже наблюдается агрегационный гистерезис (рис. 12)<sup>10</sup>.

Особый интерес представляет тот факт, что в указанном диапазоне рН наблюдается переход от равномерного распределения молекул белка между цепями декстрансульфата к неравномерному: в растворе появляются две дискретные фракции комплекса — быстро седиментирующая  $\alpha$ -фракция и медленно седиментирующая  $\beta$ -фракция. Анализ методом скоростной седиментации и гель-хроматографии показал, что соотношение между этими фракциями закономерно меняется: с ростом доли БСА в растворе увеличивается доля  $\alpha$ -фракции и уменьшается доля  $\beta$ -фракции. Одновременно увеличиваются и коэффициенты седиментации этих фракций. Обе они представляют собой комплекс БСА — декстрансульфат, но различаются по составу:  $\alpha$ -фракция обогащена белком, а  $\beta$ -фракция им обеднена. Неравномерное распределение белка между цепями полисахарида объясняется кооперативным характером его сорбции [91, 92]. Переход от некооперативной сорбции БСА к кооперативной обусловлен, по-видимому, усилением взаимодействия между молекулами белка в частицах БПК при уменьшении рН, что, в свою очередь, можно объяснить уменьшением суммарного заряда белка, препятствующего при более высоком рН сближению белковых глобул [93, 94].

При  $\text{pH} \leq 5,0$  сорбция БСА становится необратимой. В этих условиях  $\alpha$ -фракция С-комплексов любого состава осаждается. Напротив,  $\alpha$ -фракция Т-комплексов хорошо растворима, если весовое соотношение БСА и декстрансульфата не превышает 4 : 1 (критический состав смеси). При соотношении БСА : декстрансульфат 4 : 1 и выше Т-комплексы полностью осаждаются. Это соотношение отвечает также полному исчезновению  $\beta$ -фракции, которая растворима вне зависимости от пути получения комплексов.

Агрегация комплексов белок — декстрансульфат и агрегационный гистерезис наблюдаются и в концентрированных растворах мочевины. Поскольку агрегация белков в этой среде подавлена, можно полагать, что вторичные взаимодействия — водородные связи и гидрофобные взаимодействия, не играют решающей роли в стабилизации агрегатов комплексов белок — декстрансульфат (равновесных и неравновесных). По-видимому, образование неравновесных агрегатов обусловлено взаимодействиями электростатической природы. Вместе с тем, количество ионных связей между макрореагентами не зависит от пути получения комплексов, так как при потенциометрическом титровании растворов БСА — декстрансульфат не наблюдается гистерезис сорбции протонов. Поэтому можно полагать, что различия между С- и Т-комплексами обусловлены различным распределением молекул белка между цепями полисахарида: Т-комплексы представляют собой частицы с одной цепью декстрансульфата (мономатричные комплексы), тогда как С-комплексы ( $\alpha$ -фракция) — это трехмерные перепутанные сетки из цепей декстрансульфата, сшитых белком (полиматричные комплексы).

Таким образом, смешение растворов БСА и декстрансульфата при  $\text{pH} < 5,0$  (при всех исследованных соотношениях) приводит к возникновению сильно агрегированной  $\alpha$ -фракции, образованной в результате сшивания белком хаотической сетки цепей декстрансульфата, наряду с хорошо растворимой  $\beta$ -фракцией. В Т-комплексах, получаемых при «замораживании» равновесия комплексообразования при  $\text{pH} \approx 5,0$  и пос-

<sup>10</sup> Tolstoguzov V. B., Grinberg V. Ya., Gurov A. N. J. Agric. Food Chem., 1985, v. 33, p. 151.

ледующем переводе в те же условия, что и С-комплексы,  $\alpha$ -фракция сохраняет растворимость вплоть до соотношений белок:декстрансульфат 4:1 благодаря электростатическому отталкиванию одноименно заряженных частиц, содержащих одну цепь декстрансульфата.

## 2. Влияние температуры на структуру белка, связанного в комплекс с полисахаридом

Комплексообразование с анионными полисахаридами позволяет предотвратить тепловую коагуляцию белка [95], что объясняется, очевидно, иммобилизацией белковых молекул в комплексе, препятствующей образованию агрегатов при денатурации. Например, в случае комплексов БСА — декстрансульфат коагуляция в отсутствие свободного белка не наблюдается вплоть до  $100^\circ\text{C}$  (при pH 5,6). Метод кругового дихроизма позволяет наблюдать денатурацию связанного белка, причем столь же глубоко, как и свободного. Однако денатурация связанного белка, в отличие от свободного, происходит некооперативно и поэтому не сопровождается пиком теплопоглощения, характерным для термоденатурации свободных белков.

## 3. Использование БПК для регулирования поверхностных свойств белка

Комплексы белка с анионными полисахаридами как поверхностно-активные вещества обладают рядом преимуществ перед исходными белками. Так, они могут обеспечивать более высокую стабильность эмульсий типа «масло — вода» [96]. На рис. 13 приведены диаграммы стабильности модельных эмульсий *n*-декана в водных растворах БСА и его комплексов с декстрансульфатом (последний не обладает поверхностной активностью и не стабилизирует сам по себе эмульсии). Как видно, в широком диапазоне концентраций белка стабильность эмульсий *n*-декана в растворе комплексов существенно выше. Различия между эмульгирующими свойствами белка и его комплексов с декстрансульфатом уменьшаются с ростом ионной силы, полностью исчезая в условиях разрушения комплексов.

Аналогичное увеличение стабильности эмульсий при использовании БПК вместо белка мы наблюдали для комплексов казеин — каррагинан, казеин — пектин, сывороточный альбумин человека — декстрансульфат и некоторых других.

Важно отметить, что БПК позволяют регулировать реологические характеристики эмульсий в широких пределах. В частности, один из

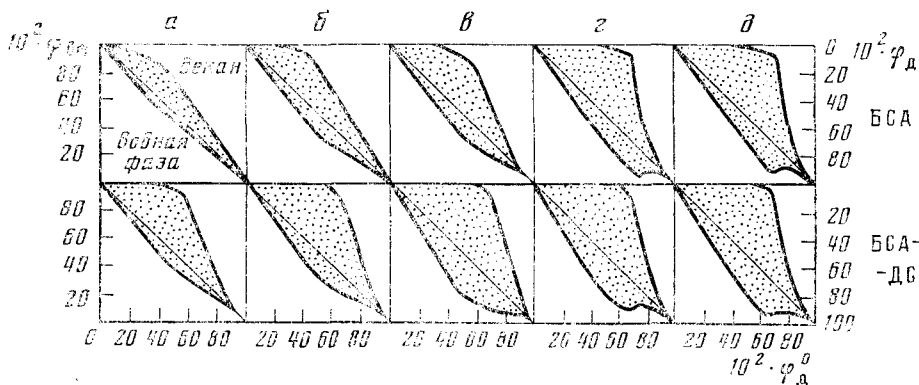


Рис. 13. Диаграммы стабильности эмульсий *n*-декана в водных растворах бычьего сывороточного альбумина (БСА, верхний ряд) и его комплекса с декстрансульфатом при массовом соотношении 1:1 (БСА — ДС, нижний ряд), pH 4,0 и ионной силе 0,01;  $\varphi_d^0$  — объемная доля декана в системе,  $\varphi_{df}$  — объемная доля отделившейся водной фазы,  $\varphi_d$  — объемная доля отделившегося декана; концентрация БСА %: а — 0,025; б — 0,05; в — 0,10; г — 0,30; д — 0,50 [96]

вариантов высоковязких (фаршеподобных) эмульсий, стабилизированных комплексами белок — анионный полисахарид, использован в производстве вареных колбас [97].

Свойства межфазных адсорбционных слоев, образованных БПК, до сих пор не исследовались. Можно, однако, предположить, что структурная организация БПК на границах раздела фаз подобна той, которая имеет место в комплексных гелях. Образование последних и их свойства наиболее детально изучены на примере гелей комплексов желатина — альгинат натрия [98, 99] и желатина — пектин [100], для которых обнаружены существенные отличия от гелей желатины. В отличие от последних, гели комплексов желатина — альгинат натрия не плавятся в диапазоне 30—40°С, а обнаруживают лишь скачкообразное возрастание податливости при сохранении упругих свойств вплоть до 100°С. Существенно, что гелеобразование в растворах БПК можно наблюдать в тех условиях, в которых отдельные макрореагенты не образуют гелей. Примером является термообратимый комплексный гель казеина и альгината натрия<sup>11</sup>.

#### **IV. ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ СОВМЕСТИМОСТЬ БЕЛКОВ И ПОЛИСАХАРИДОВ В РАСТВОРЕ**

Многокомпонентные смеси полимеров, как правило, гетерофазны; совместимость достигается лишь в том случае, если смешение сопровождается выделением тепла. С позиций технологии получения НФП представляло большой интерес изучение термодинамической совместимости в растворе основных классов пищевых полимеров — белков и полисахаридов.

##### **1. Термодинамическая совместимость в системах белок — полисахарид — вода**

Хотя ограниченная термодинамическая совместимость желатины и полисахаридов в растворе обнаружена еще в конце прошлого столетия [101] и с этого времени была предметом ряда исследований [68, 102—108], систематическое изучение термодинамической совместимости в растворе полисахаридов и белков, прежде всего глобулярных, было начато лишь в последние годы.

В работах [68, 106, 109—114] исследована феноменология явления ограниченной термодинамической совместимости в растворе для основных классов белков и полисахаридов. На примере более чем 80 систем белок — полисахарид — вода показана общность явления ограниченной термодинамической совместимости. Все эти системы претерпевают жидкофазное расслоение с преимущественным концентрированием макромолекулярных компонентов в разных фазах. Это происходит при достаточно высокой суммарной концентрации макромолекулярных компонентов (обычно выше 4%) в условиях, обеспечивающих подавление ассоциации разнотипных и благоприятствующих ассоциации однотипных макромолекул. Основные условия ограниченной термодинамической совместимости различаются для систем, содержащих нейтральные, карбоксилсодержащие и сульфатированные полисахариды.

Наиболее детально исследована термодинамическая совместимость казеина [110, 111] и глобулиновой фракции бобов сои [112] с различными полисахаридами. Получены данные о влиянии важнейших термодинамических переменных (рН, ионной силы, температуры, молекулярной массы) на совместимость белков и полисахаридов. Они представлены в работах [110—113] в виде трехмерных диаграмм состояния. Как правило, совместимость уменьшается при приближении рН к изоэлектрической точке белка, а также при повышении концентрации низкомолекулярной соли, температуры и молекулярной массы полисахарида. Известное исключение представляют сульфатированные полисахариды. В этом

<sup>11</sup> Мухин М. А. Автореферат дис. на соискание уч. степени канд. хим. наук. М., ИНЭОС АН СССР, 1984.



случае совместимость возрастает по мере приближения рН к изоэлектрической точке белка. В окрестностях этой точки имеется область полной совместимости.

Системы белок — нейтральный полисахарид — вода и белок — сульфатированный полисахарид — вода имеют нижнюю критическую точку выше некоторой концентрации низкомолекулярной соли. Если концентрация соли ниже этой пороговой величины, то белок и указанные полисахариды полностью совместимы. Пороговая концентрация соли зависит от ее состава и от рН. Влияние солей на термодинамическую совместимость белков и нейтральных полисахаридов в целом не коррелирует с положением солей в лиотропном ряду.

С целью выяснения природы термодинамической совместимости было выполнено термореологическое исследование однофазных систем белок — нейтральный полисахарид — вода при различных ионных силах, соответствующих полной или же ограниченной совместимости макромолекулярных компонентов при более высоких концентрациях [114]. Были рассчитаны значения избыточной энергии активации вязкого течения, обусловленной взаимодействием белок — полисахарид. Для условий полной совместимости компонентов в системе характерны положительные значения этого параметра, для систем с ограниченной совместимостью — отрицательные, что свидетельствует о превалировании соответственно сил притяжения или отталкивания между разнотипными макромолекулами. Таким образом, удалось продемонстрировать образование слабых комплексов белок — нейтральный полисахарид в средах с низкой ионной силой, где компоненты термодинамически совместимы, и их распад при высокой ионной силе, т. е. в условиях ограниченной термодинамической совместимости белков и нейтральных полисахаридов.

## 2. Термодинамическая совместимость в системах белок — белок — вода

В последнее время появились также данные о термодинамической совместимости белков. На примере девяти систем показано [115], что в определенных условиях белки, относящиеся к разным классам по Осборну, ограниченно совместимы друг с другом в водной среде. Фазовые диаграммы некоторых систем белок 1 — белок 2 — вода<sup>12</sup>, полученные методом отношения объема фаз [116], приведены на рис. 14 и 15.

Анализ уравнения состояния систем полимер 1 — полимер 2 — растворитель по Флори — Хаггинсу приводит к закономерностям, определяющим вид их фазовых диаграмм [117]. В частности, порог расслоения, т. е. точка касания бинодали и прямой, отсекающей равные отрезки на осях координат, должен быть смещен в сторону оси полимера с меньшей молекулярной массой, а критическая точка (точка пересечения бинодали и прямолинейного диаметра) — в сторону оси полимера с меньшей лиофильностью. Эти закономерности справедливы для смесей белков в общем растворителе. Такой результат свидетельствует о том, что указанное уравнение состояния применимо вне рамок модели (свободно-сочлененные цепи на решетке [118, 119]), на основании которой оно получено.

Известный интерес представляет возможность регулирования термодинамической совместимости белков. Одним из эффективных путей такого регулирования является термотропная агрегация белка. Известно [120], что нагревание выше температуры денатурации приводит к образованию растворимых кластеров молекул белка, если его концентрация не превышает порог гелеобразования [121]. Размер, форму

<sup>12</sup> Polyakov V. I., Kireeva O. K., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B. *Nahrung*, 1985, В. 29, S. 153.

Polyakov V. I., Popello I. A., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B. *Ibid*, 1985, В. 29, в печати.

Рис. 14. Фазовые диаграммы некоторых систем белок 1 — белок 2 — вода при 20° С: овальбумин (1) — казеин (2) — вода (рН 6,6) (А); овальбумин (1) — глобулиновая фракция бобов сои (2) — вода (рН 6,6). (Б); казеин (1) — глобулиновая фракция бобов сои (2) — вода (рН 6,9) (В); казеин 1 — глицерин (2) — вода (рН 11) (Г):  $c_1$  и  $c_2$  — массовые концентрации белков 1 и 2 в системе:  $a$  — точки биналали,  $b$  — порог расслоения,  $в$  — критическая точка

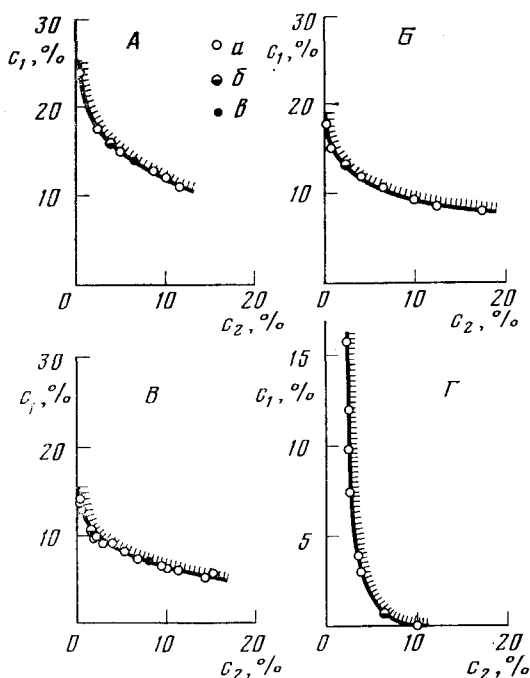
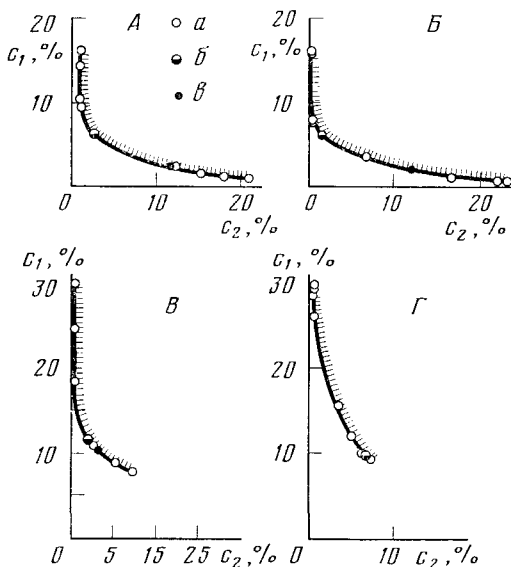


Рис. 15. Фазовые диаграммы некоторых систем белок 1 — белок 2 — вода: желатина (1) — глобулиновая фракция кормовых бобов (2) — вода ( $t=40^{\circ}\text{C}$ , рН 7,0) (А); желатина (1) — 11S-глобулин кормовых бобов (2) — вода ( $t=40^{\circ}\text{C}$ , рН 7,0) (Б); овальбумин (1) — термотропный кластер овальбумина (2) — вода ( $t=20^{\circ}\text{C}$ , рН 6,8) (В); бычий сывороточный альбумин (1) — термотропный кластер овальбумина (2) — вода ( $t=20^{\circ}\text{C}$ , рН 6,8) (Г); условия получения термотропного кластера овальбумина: температура 100° С, длительность нагревания — 60 мин, концентрация белка — 5%, способ концентрирования — лиофилизация



[122] и, вероятно, гидрофильность доступной поверхности этих кластеров можно изменять, варьируя условия термообработки раствора белка. О том, насколько сильно термообработка влияет на совместимость белков, свидетельствуют фазовые диаграммы В и Г на рис. 15. В нативном состоянии бычий сывороточный альбумин (БСА) и овальбумин полностью совместимы в водной среде. Однако термотропные кластеры овальбумина несовместимы не только с БСА, но и с нативным овальбумином.

### 3. Практическое использование двухфазных жидких систем

#### а) Концентрирование и очистка белков

Для фазовых диаграмм систем белок — полисахарид — вода типичны низкое значение порога расслоения и высокое отношение концентраций белка и полисахарида в критической точке. Иными словами, системы белок — полисахарид — вода распадаются на фазы, резко различающиеся по концентрации макромолекулярных компонентов, а именно на высоконцентрированную фазу, обогащенную белком (содержание полисахарида — не выше 0,5%), и разбавленную полисахаридную фазу. На этом явлении основан новый метод концентрирования растворов белков, названный безмембранным осмосом [69]. Он использован, в частности, для концентрирования белков обезжиренного молока с помощью яблочного пектина. Концентрирование белков молока до 30% достигается при концентрации полисахарида в системе, равной 1%. К достоинствам процесса можно отнести высокую производительность благодаря развитой поверхности раздела, простоту аппаратного оформления и относительно высокий энергетический к. п. д.

Еще одна возможность практического использования явления ограниченной термодинамической совместимости белков и полисахаридов в растворе основана на том, что белково-липидные комплексы менее совместимы с полисахаридами, чем белки, не содержащие липидов. Этот эффект был использован для очистки глобулиновой фракции белков пекарских дрожжей от липидов [123, 124]. Таким путем удалось снизить содержание липидов в белковом препарате до 0,1%.

#### б) Производство НФП путем переработки двухфазных жидких систем

В последние годы показаны широкие возможности получения НФП путем переработки двухфазных жидких систем типа «вода в воде». Такие системы образованы термодинамически несовместимыми растворами белков и полисахаридов или же различных белков.

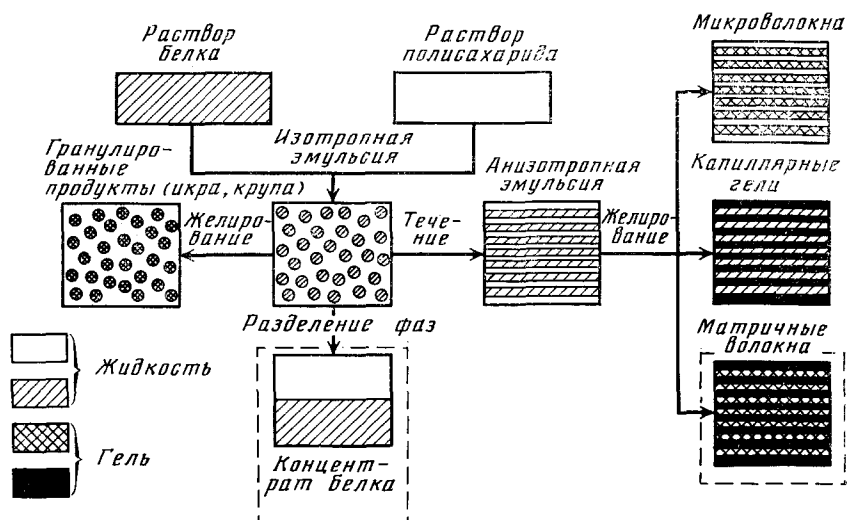


Рис. 16. Схема использования двухфазных систем белок — полисахарид — вода в процессах переработки белка [1, 66]

Общая схема процессов переработки двухфазных жидких систем в НФП [1, 66] представлена на рис. 16. Она включает деформацию двухфазной жидкой системы в потоке и перевод одной или обеих фаз в гелеобразное состояние.

Возможность достижения высоких степеней деформирования двухфазной жидкой системы обеспечивается низким межфазным натяжением; необходимо также приблизительное равенство вязкостей обеих фаз [125]. Соотношение вязкостей фаз, наряду с размерами частиц дисперсной фазы и скоростью сдвига, определяет структуру двухфазных жидких систем в потоке и возможности их переработки [126].

При переходе в гелеобразное состояние в потоке частиц дисперсной фазы образуются белковые микроволокна. В зависимости от объемной доли дисперсной фазы можно получать как короткие волокна, так и волокна бесконечной длины. В последнем случае гелеобразованию предшествует коалесценция деформированных дисперсных частиц. Такой процесс назван бесфильтренным прядением [126]. При невысоких степенях деформации могут быть получены гранулированные продукты с различной степенью анизодиаметрии гранул.

Если в гелеобразное состояние в потоке переходит дисперсионная среда, то возникают гели, наполненные жидкими цилиндрами, ориентированными в направлении потока, так называемые гели капиллярной структуры. Прочность таких гелей в направлении, поперечном направлению ориентации капилляров, намного выше, чем в продольном, причем степень анизотропии прочности возрастает с увеличением скорости сдвига [125, 127]. При высоких степенях наполнения непрерывная фаза представляет собой профилированные волокна. Наконец, возможен перевод обеих фаз деформированной двухфазной жидкой системы в гелеобразное состояние. Таким путем получают анизотропные по механическим свойствам гели, наполненные волокнами, ориентированными в направлении деформации.

Все три основных варианта переработки белка в составе двухфазных жидких систем в условиях высоких степеней деформации дисперсных частиц (не ниже 10) имеют практическое значение при получении аналогов мясосюдактов — волокон и текстуратов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Толстогузов В. Б. Искусственные продукты питания. Новый путь получения пищи и его перспективы. Научные основы производства. М.: Наука, 1978.
2. Kinsella K. CRC Crit. Rev. Food Sci. and Nutr., 1976, v. 7, p. 219.
3. Tolstoguzov W. B., Braudo E. E., Gurov A. N. Nahrung, 1981, B. 25, S. 231, 817.
4. Панков С. П. Физико-химические основы переработки растворов полимеров. М.: Химия, 1971.
5. Панков С. П. Студнеобразное состояние полимеров. М.: Химия, 1974.
6. Tolstoguzov W. B., Braudo E. E. J. Text. Stud., 1983, v. 14, p. 183.
7. Tolstoguzov W. B., Tschimirow Ju. I., Braudo E. E., Wainerman E. S., Kosmina E. P. Nahrung, 1975, B. 19, S. 33.
8. Tolstoguzov W. B., Tschimirow Ju. I., Suchanow B. P., Braudo E. E., Ignatjew A. D., Kosmina E. P. Ibid., 1976, v. 20, S. 329.
9. Tolstoguzov W. B. Ibid., 1979, B. 23, S. 649, 821.
10. Tolstoguzov W. B., Lemisova L. V., Chimirov Ju. I., Braudo E. E., Tsyryapkin V. A., Volnova A. I., Kozmina E. P. Ibid., 1980, B. 24, S. 951.
11. Chimirov Ju. I., Braudo E. E., Tolstoguzov V. B. Ibid., 1981, B. 25, S. 719.
12. Chimirov Ju. I. et al. Ibid., 1982, B. 26, S. 741.
13. Монкрифф Р. У. Химические волокна. М.: Легкая индустрия, 1964, с. 227.
14. Ершова В. А., Толстогузов В. Б., Браудо Е. Е., Михеева Н. В., Бондарева Э. С. Тр. Московского ин-та народного хозяйства им. Г. В. Плеханова, 1968, вып. 58, с. 125.
15. Thiele H. Hystolyse und Hystogenese; Gewebe und ionotrope Gele. Prinzip einer Strukturbildung. Frankfurt/M.: Akademische Verlagsgesellschaft, 1967.
16. Толстогузов В. Б., Мжельский А. И., Гринберг Н. В., Рысев Б. П., Браудо Е. Е., Изюмов Д. Б., Шельнова Н. М. Высокомолек. соед., 1973, т. 15А, с. 2703.
17. Obolonkova E. S. et al. Colloid and Polym. Sci., 1974, v. 252, p. 526.
18. Obolonkova E. S. et al. Ibid., 1978, v. 256, p. 133.
19. Suchkov V. V., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B. Nahrung, 1980, B. 24, S. 893.
20. Antonov Yu. A., Grinberg V. Ya., Zhuravskaya N. A., Schmidt G., Schmandke H., Tolstoguzov V. B. Ibid., 1982, B. 26, S. 9.
21. Suchkov V. V., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B. Carbohydr. Polym., 1981, v. 1, p. 39.
22. Semenov S. G., Braudo E. E., Yaroshenko Yu. F., Zharikova G. G., Tolstoguzov V. B. Nahrung, 1982, B. 26, S. 21.
23. Yuryev V. P. et al. Starch/Stärke, 1979, v. 31, p. 121.
24. Tombs M. P. Faraday Discuss. Chem. Soc., 1974, v. 57, p. 158.
25. Bezrukov M. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1979, v. 18, p. 599.

26. Clark A. H., Tuffnell C. D. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1980, № 17, p. 339.
27. Clark A. H., Sanderson D. H. P., Suggett A. *Ibid.*, 1981, v. 17, p. 353.
28. Clark A. H. et al. *Ibid.*, 1981, v. 17, p. 380.
29. Privalov P. L. et al. *J. Chem. Thermodyn.*, 1975, v. 3, p. 631.
30. Bikbov T. M., Grinberg V. Ya., Danilenko A. N., Chaika T. S., Vaintraub I. A., Tolstoguzov V. B. *Colloid and Polym. Sci.*, 1983, v. 261, p. 346.
31. Bikbov T. M., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B. *Nahrung*, 1979, B. 23, S. 403, 487.
32. Олехнович А. А., Каменская Э. А., Белавцева Е. М., Бикбов Т. М., Гринберг В. Я., Толстогузов В. Б. *Биофизика*, 1981, т. 26, с. 439.
33. Bikbov T. M., Grinberg V. Ya., Schmandke H., Chaika T. S., Vaintraub I. A., Tolstoguzov V. B. *Colloid and Polym. Sci.*, 1981, v. 259, p. 536.
34. Braudo E. E., Plashchina I. G., Tolstoguzov V. B. *Carbohydr. Polym.*, 1984, v. 4, p. 23.
35. Yuryev V. P. et al. *Ibid.*, 1981, v. 1, p. 139.
36. Clark A. H. et al. *Macroboles.*, 1983, v. 16, p. 1367.
37. Hermans J., Jr. *J. Polym. Sci., A*, 1965, v. 3, p. 1859.
38. Tanford Ch. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1962, v. 84, p. 4240.
39. Bigelow C. C. *J. Theor. Biol.*, 1967, v. 16, p. 187.
40. Maleev V. Ya., Gasan A. I. *Biopolym.*, 1974, v. 13, p. 2409.
41. Тенфорд Ч. *Физическая химия полимеров*. М.: Химия, 1965, с. 270.
42. Ферри Дж. Д. *Вязкоупругие свойства полимеров*. М.: Иностран. лит., 1967, с. 267.
43. Браудо Е. Е., Плащина И. Г., Кузьмина Н. С., Толстогузов В. Б. *Высокомолек. соед.*, 1974, т. 16А, с. 2240.
44. Braudo E. E., Belavtseva E. M., Titova E. F., Plashchina I. G., Krylov V. I., Tolstoguzov V. B., Schierbaum F. R., Richter M., Berth G. *Starch/Stärke*, 1979, v. 31, p. 188.
45. Plashchina I. G., Fomina O. A., Braudo E. E., Tolstoguzov V. B. *Colloid and Polym. Sci.*, 1979, v. 257, p. 1180.
46. Plashchina I. G., Grinberg N. V., Braudo E. E., Tolstoguzov V. B. *Ibid.*, 1980, v. 258, p. 939.
47. Plashchina I. G., Fishkina N. A., Braudo E. E., Tolstoguzov V. B. *Nahrung*, 1980, B. 24, S. 543.
48. Plashchina I. G., Gottlieb A. M., Braudo E. E., Tolstoguzov V. B. *Colloid and Polym. Sci.*, 1983, v. 261, p. 672.
49. Rees D. A. *Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.*, 1969, v. 24, p. 267.
50. Rees D. A., Welsh E. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1977, v. 16, p. 214.
51. Rees D. A. *Biochem. Soc. Trans.*, 1981, v. 9, p. 25.
52. Розовина Л. З., Слонимский Г. Л. *Успехи химии*, 1974, т. 43, с. 1102.
53. Titova E. F., Belavtseva E. M., Braudo E. E., Tolstoguzov V. B. *Colloid and Polym. Sci.*, 1974, v. 252, p. 497.
54. Измайлова В. Н., Самир Абу Али, Пчелин В. А. В сб.: *Физико-химическая механика дисперсных структур*. Под ред. П. А. Ребиндера. М.: Наука, 1966, с. 77.
55. Rees D. A. *Chem. and Ind.*, 1972, p. 630.
56. Owens H. S., Swenson H. A., Schultz T. H. *Adv. Chem. Ser.*, 1954, v. 11, p. 10.
57. Smith J. B., Bryant E. F. *J. Food Sci.*, 1968, v. 33, p. 262.
58. Smidsrød O., Haug A. *Biopolym.*, 1971, v. 10, p. 1213.
59. Morris E. R., Rees D. A., Robinson G. J. *Mol. Biol.*, 1980, v. 138, p. 349.
60. Smidsrød O., Andersen I. L., Grasdalen H., Larsen B., Painter T. *Carbohydr. Res.*, 1980, v. 80, p. C11.
61. Smidsrød O., Grasdalen H. *Carbohydr. Polym.*, 1982, v. 2, p. 270.
62. Бейс А. *Макромолекулярная химия желатина*. М.: Пищ. промышленность, 1971.
63. Morris E. R., Rees D. A., Norton I. T., Goodall D. M. *Carbohydr. Res.*, 1980, v. 80, p. 317.
64. Grinberg N. V., Plashchina I. G., Braudo E. E., Tolstoguzov V. B. *Colloid and Polym. Sci.*, 1980, v. 258, p. 1038.
65. Tolstogusow W. B. *Nahrung*, 1974, B. 18, S. 523.
66. Tolstogusow W. B., Braudo E. E., Wainerman E. S. *Ibid.*, 1975, B. 19, S. 973.
67. Grishchenkova E. V., Antonov Yu. A., Braudo E. E., Tolstoguzov V. B. *Ibid.*, 1984, B. 28, S. 15.
68. Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B. *Carbohydr. Res.*, 1972, v. 25, p. 313.
69. Antonov Yu. A., Grinberg V. Ya., Zhuravskaya N. A., Tolstoguzov V. B. *Carbohydr. Polym.*, 1982, v. 2, p. 81.
70. Laurent T. In: *The Chemical Physiology of Mucopolysaccharides*. Ed. by Quintarelli G. Boston: Little, Braun and Co., 1968, p. 153.
71. Бектуров Е. А. *Тройные полимерные системы в растворе*. Алма-Ата: Наука, 1975, с. 168.
72. Tolstogusov V. B., Belkina V. P., Gulov V. Ja., Grinberg V. Ya., Titova E. F., Belavtseva E. M. *Starch/Stärke*, 1974, v. 26, p. 130.
73. Clark A. H., Richardson R. K., Robinson G., Ross-Murphy S. B., Weaver A. C. *Progr. Food and Nutr. Sci.*, 1982, v. 6, p. 149.
74. Braudo E. E., Tolstogusov W. B. *Nahrung*, 1974, B. 18, S. 173.
75. Watase M., Nishinari K. *Rheol. Acta*, 1980, v. 19, p. 220.
76. Moritaka H., Nishinari K., Horiuchi H., Watase M. *J. Text. Stud.*, 1980, v. 11, p. 257.
77. Booy H. L., Bungenberg de Jong H. G. *Biocolloids and their Interactions*. Wien: Springer-Verlag, 1956.
78. Евреинова Т. Н. *Концентрирование веществ и действие ферментов в коацерватах*. М.: Наука, 1966.
79. Серебровская К. Б. *Коацерваты и протоплазма*. М.: Наука, 1971.

80. *Tolstoguzow W. B., Wajnermann E. S.* Nahrung, 1975, B. 19, S. 45.
81. *Ledward D. A.* In: Polysaccharides in Food. Ed. by J. M. V. Blanshard and J. R. Mitchell. London: Butterworth, 1979, p. 205.
82. *Sasaki S., Noguchi H. J.* Gen. Physiol., 1959, v. 43, p. 1.
83. *Noguchi H. J.* Phys. Chem., 1960, v. 64, p. 185.
84. *Thompson T. E., McKernan W. M.* Biochem. J., 1961, v. 81, p. 12.
85. *Snoeren Th. H. M., Payens T. A. J., Jeunink J., Both P.* Milchwissenschaft. 1975, B. 30, S. 393.
86. *Розенфельд М. А., Ерзинкян К. Л., Пирюзян Л. А.* Изв. АН СССР. Сер. биол., 1975, с. 419.
87. *Ponder E., Ponder R. V. J.* Gen. Physiol., 1959, v. 43, p. 753.
88. *Comper W. D., Laurent T. C.* Biochem. J., 1978, v. 175, p. 703.
89. *Gurov A. N., Wajnerman E. S., Tolstoguzow W. B.* Stärke, 1977, B. 29, S. 186.
90. *Гуров А. Н., Ларичев Н. А., Лозинская Н. В.* В сб.: Водорастворимые полимеры. II всесоюз. конф. Тез. докл. Иркутск, 1982, с. 84.
91. *Olins D. E., Olins A. L., von Hippel P. H. J.* Mol. Biol., 1967, v. 24, p. 157.
92. *McGhee J. D., von Hippel P. H.* Ibid., 1974, v. 86, p. 469.
93. *Кабанов В. А., Евдаков В. П., Мустафаев М. И., Антипина А. Д.* Молек. биол., 1977, т. 11, с. 582.
94. *Кабанов В. А., Мустафаев М. И., Белова В. В., Евдаков В. П.* Биофизика. 1978, т. 23, с. 789.
95. *Gurov A. N., Larichev N. A., Krylov V. I., Tolstoguzov V. B.* Studia biophysica. 1978, B. 72, S. 7.
96. *Larichev N. A., Gurov A. N., Tolstoguzov V. B.* Colloids and Surfaces, 1983, v. 6, p. 27.
97. *Токаев Э. С., Рогов Н. А., Гуров А. Н., Толстогузов В. Б.* Мясная индустрия СССР, 1981, № 6, с. 22.
98. *Muchin M. A., Wajnerman E. S., Tolstoguzov W. B.* Nahrung, 1976, B. 20, S. 313.
99. *Muchin M. A., Streltsova Z. A., Wajnerman E. S., Tolstoguzov V. B.* Ibid., 1978, B. 22, S. 867.
100. *Tschumak G. Ja., Wajnerman E. S., Tolstoguzov W. B.* Ibid., 1976, B. 20, S. 321.
101. *Beijerinck M. W.* Zentrallbl. Bakteriол., Abt. 2, 1896, B. 2, S. 627, 628.
102. *Bütschli O.* Untersuch. Strukturen, 1898, S. 251.
103. *Beijerinck M. W.* Koll.-Z., 1910, B. 7, S. 16.
104. *Ostwald Wo., Hertel R. H.* Ibid., 1929, B. 47, S. 258, 357.
105. *Doi K.* Biochim. et biophys. acta, 1965, v. 94, p. 257.
106. *Толстогузов В. Б., Гринберг В. Я., Федотова Л. И.* Изв. АН СССР. Сер. хим., 1969, с. 2839.
107. *Гринберг В. Я., Толстогузов В. Б., Слонимский Г. Л.* Высокомолек. соед., 1970, т. 12А, с. 1593.
108. *Гринберг В. Я., Швенке К.-Д., Толстогузов В. Б.* Изв. АН СССР. Сер. хим., 1970, с. 1430.
109. *Толстогузов В. Б., Гринберг В. Я.* Там же, 1970, с. 1423.
110. *Antonov Yu. A., Grinberg V. Ya., Tolstoguzow V. B.* Starch/Stärke, 1975, v. 27, p. 242.
111. *Antonov Yu. A., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B.* Colloid and Polym. Sci., 1977, v. 255, p. 937.
112. *Antonov Yu. A., Lozinskaya N. V., Grinberg V. Ya., Dianova V. T., Tolstoguzov V. B.* Ibid., 1979, v. 257, p. 1159.
113. *Antonov Yu. A., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B.* Nahrung., 1979, B. 23, S. 207, 597, 847.
114. *Varfolomeeva E. P., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B.* Polym. Bull., 1980, v. 2, p. 613.
115. *Polyakov V. I., Grinberg V. Ya., Antonov Yu. A., Tolstoguzov V. B.* Ibid., 1979, v. 1, p. 593.
116. *Polyakov V. I., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B.* Ibid., 1980, v. 2, p. 757.
117. *Hsu C. C., Prausnitz J. M.* Macromolec., 1974, v. 7, p. 320.
118. *Huggins M. L. J.* Chem. Phys., 1941, v. 9, p. 440.
119. *Flory P. J.* Ibid., 1941, v. 9, p. 660.
120. *Можжаев В. В., Мартинек К.* Молек. биол., 1982, т. 16, с. 676.
121. *Bikbov T. M., Grinberg V. Ya., Antonov Yu. A., Tolstoguzov V. B., Schmandke H.* Polym. Bull., 1979, v. 1, p. 865.
122. *Kamata T.* Int. J. Biol. Macromolec., 1979, v. 1, p. 33.
123. *Bogacheva T. Ya., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B.* Carbohydr. Polym., 1982, v. 2, p. 163.
124. *Bogacheva T. Ya., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B.* Nahrung, 1983, B. 27, S. 735.
125. *Tolstoguzov V. B., Mzhelsky A. I., Gulov V. Ya.* Colloid. and Polym. Sci., 1974, v. 252, p. 124.
126. *Antonov Yu. A., Grinberg V. Ya., Zhuravskaya N. A., Tolstoguzov V. B.* J. Text. Stud., 1980, v. 11, p. 199.
127. *Толстогузов В. Б., Мжельский А. И., Гулов В. Я.* Высокомолек. соед., 1973, т. 15Б, с. 824.

Институт элементоорганических  
соединений им. А. Н. Несмеянова  
АН СССР, Москва