

КВАНТОВО-МЕХАНИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ В РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК С БИОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Галочкина Н. А., Макаркина Е. Н., Глотова И. А., Вторушина И. В.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», г. Воронеж, Россия (394087 ул. Мичурина, д. 1), e-mail: glotova-irina@yandex.ru, main@vsau.ru

Перспективным направлением в коррекции алиментарнозависимых состояний является проектирование пищевых и биологически активных добавок с заданными свойствами. Наиболее эффективный метод борьбы с алиментарными заболеваниями – массовая профилактика, связанная с обогащением дефицитным микроэлементом наиболее распространенных продуктов питания. В качестве такого элемента рассматривался селен в виде диметилдипиразолилселенида (ДДС), который в отличие от неорганических источников селена не только лишен токсичности, но и проявляет противовоспалительные и антиканцерогенные свойства. Применяемые технологические процессы, в связи с использованием жилок и сухожилий КРС как носителя микроэлементов, являются ресурсосберегающими и способствуют развитию безотходных или малоотходных технологий. Применяется иммобилизация селена, которая позволяет равномерно распределить селен по коллагеновой массе и в следствие в готовом продукте. Нами апробированы биомодифицированные коллагеновые фракции жилок и сухожилий крупного рогатого скота в качестве носителя селенсодержащего органического препарата – диметилдипиразолилселенида. Изученное молекулярно-массовое распределение коллагеновых фракций с помощью SDS-электрофореза показывает, что в составе продуктов их биомодификации преобладают низкомолекулярные одинарные цепи первоначальной трехспиральной макромолекулы коллагена. С помощью имеющихся алгоритмов программы HyperChem Release 8.0 осуществлена геометрическая оптимизация участка альфа (1) спирали коллагена. Обоснована квантово-механическая модель взаимодействия ДДС с продуктами модификации жилок и сухожилий КРС в виде низкомолекулярных пептидов. Ковалентная иммобилизация ДДС осуществляется посредством функциональных (карбоксильных) групп полярной части пептида, при этом его полярная часть модифицируется и оказывается экранированной для взаимодействующих с лигандом молекул. Свидетельством корректности геометрической оптимизации являются расчетные характеристики полученной модели, которые подтверждают ее адекватность.

Ключевые слова: диметилдипиразолилселенид (ДДС), иммобилизация, HyperChem, пептидный участок, коллаген, селен, геометрическая оптимизация.

KVANTOVO-MECHANICAL MODELING IN WORKING OUT OF NEW FOOD SUPPLEMENTS WITH BIOPROTECTIONA PROPERTIES

Galochkina N. A., Makarkina E. N., Glotova I. A., Vtorushina I. V.

Voronezh State Agricultural University after Peter I, Voronezh, Russia (1 Michurina, 394087 Voronezh, Russia), e-mail: glotova-irina@yandex.ru, main@vsau.ru

Perspective direction in selenium deficiency states is designing of food and biologically active supplements of favourable properties. The most effective method of struggle with alimentary diseases is the mass preventive maintenance connected with supplementation by deficient microcell of the most widespread foodstuff. We used selenium as a kind of dimetildipirasolilselenid (DDS) which unlike inorganic sources of selenium is not only is un toxic but also shows anti-inflammatory and anticancerogenic properties. Applied technological processes, in connection with cattle veins and sinews use as microcells carrier are resource-saving and contribute to development of wasteless technologies. We used selenium immobilization which allows even selenium distribution in collagenic substance thus in a finish product. We approved the biomodified collagenic fractions of cattle veins and sinews as the organic carrier of selenium - dimetildipirasolilselenid. The studied molekularno-mass distribution of collagenic fractions by means of SDS-elektroforeza shows that in unary chains of an initial three-spiral macromolecule of collagen prevail in peptides. Geometrical optimization of site alpha (1) collagen spirals is carried out by program HyperChem Release 8.0. The kvantovo-mechanical model of interaction DDS with products of updating of veins and sinews cattle as low-molecular peptides is proved. Covalent immobilization DDS is carried out by means of functional (carboxyl) groups of a polar part of a peptide, thus its polar part is modified and it appears to be screened for molecules cooperating with ligand. The evidence proper of geometrical optimization correctness are rated characteristics of the obtained model which confirm its identity.

Key words: dimetildipirasolilselenid (DDS), an immobilization, HyperChem, peptid site, collagen, selenium, geometrical optimization.

Интерес к использованию математических методов для вычисления параметров молекулярной структуры, физико-химических свойств и реакционной способности химических соединений возник практически вместе с развитием атомно-молекулярных представлений в химии. Однако лишь с развитием квантовой теории возможность прогнозирования геометрического строения молекул и свойств веществ получила настоящую научную основу. Сегодня компьютер стал таким же инструментом исследования, как привычный химический или физический эксперимент. Область науки, получившая название «компьютерная химия», не ограничивается только квантово-химическими расчетами и включает широкий круг теоретических методов, различные эмпирические и полуэмпирические методы расчета [5]. В универсальных химических пакетах программных средств HyperChem фирмы Hypercube Inc является на сегодняшний день одним из наиболее популярных во многих химических лабораториях различных стран мира. Он имеет все средства для создания и редактирования двумерных и трехмерных моделей молекул [6], в том числе, для проектирования БАД, заданного состава и свойств.

Предметом исследований послужил селен, в аспекте разработки новых пищевых добавок с биопротекторными свойствами для алиментарной коррекции селендефицитных состояний различных детерминированных групп населения, путем получения иммобилизованных на белковых носителях его малотоксичных форм с последующим использованием в составе пищевых систем на основе сырья животного происхождения. Показано (Тутельян и др., 2002 г.), что ферментативная защита организма, построенная на селене, способствует торможению многих патологических процессов, как на клеточном, так и на организменном уровне. Трудно переоценить роль этого микроэлемента в профилактике и лечении многих заболеваний [7].

Весьма перспективно использование органических производных селена, из-за почти полного отсутствия у них токсичности [4]. К таким источникам селена относится диметилдипирозолилселенид, который был синтезирован в конце прошлого века, в 2002 г. разрешен в качестве БАД. Он представляет собой белый порошок. Препарат относится к соединениям, где валентность металла равна 2. Существуют данные, что соединения двухвалентного селена относительно быстро всасываются в кишечнике и быстро распределяются в тканях. Диметилдипирозолилселенид оказывает антиоксидантное действие. Снижая и предотвращая накопление токсичных продуктов перекисного окисления липидов, он способствует нормализации обмена веществ [8]. Однако непосредственное его использование как компонента рецептур продуктов питания широкого потребительского спроса проблематично из-за сложности равномерного распределения по объему продукта.

Цель работы – изучение возможности получения иммобилизованных на коллагеновых носителях форм диметилдипиразолилселенида путем расчета квантово-механических характеристик продуктов их взаимодействия и построения гипотетической пространственной модели.

Объектами исследования служили: водный раствор диметилпиразолилселенида (ДДС) с содержанием диметилпиразолилселенида 0,657 г в 100 см³, продукты биомодификации отходов жиловки (смесь жилок и сухожилий крупного рогатого скота) при их обработке по следующей схеме: измельчение на волчке, промывка проточной водой, ферментативный гидролиз белковых фракций с использованием ферментного препарата «Коллагеназа пищевая» с повторной промывкой, пероксидно-щелочной гидролиз, а также продукты последующей иммобилизации ДДС на биомодифицированных коллагеновых носителях.

При выборе объектов для иммобилизации диметилдипиразолилселенида использовали данные по аминокислотному составу продуктов биомодификации (таблица 1), полученные на автоматическом аминокислотном анализаторе марки ААА-Т333 (Чехия). Разделение аминокислот проводили на аналитической колонке, заполненной катионообменной смолой «Ostion LGFA» со ступенчатым элюированием тремя натрий-цитратными буферными растворами с различным значением рН (3,50; 4,25; 9,50).

Таблица 1

Аминокислотный состав коллагеновых продуктов, мг/100 г

Аминокислоты	Продукт модификации жилок и сухожилий КРС	Коллагеновые массы из сухожилий КРС [1]	Коллаген дермы шкур КРС [1]
Аспарагиновая кислота	6,16	6,26	6,95
Треонин	2,06	1,96	2,26
Серин	2,86	2,96	4,27
Глутаминовая кислота	9,73	9,79	11,16
Пролин	11,1	13,1	11,37
Оксипролин	12,82	10,82	12,83
Глицин	12,03	6,03	26,57
Аланин	6,53	6,43	10,32
Валин	2,08	1,98	2,46
Метионин	1,44	1,54	0,97
Изолейцин	2,66	2,86	3,73
Лейцин	2,11	2,21	1,83
Тирозин	0,91	0,85	0,99
Фенилаланин	2,51	2,35	2,35
Гистидин	1,32	1,22	0,7
Лизин	5,26	5,42	3,96
Аргинин	9,3	9,1	8,22
Тирозиновый показатель	14,09	12,7	12,9

SDS-электрофорез коллагеновых фракций проводили на приборе вертикального электрофореза (VE-1M, ООО «Биоклон») по методу Лэммли. Маркерами служили: бычий сывороточный альбумин ($M_r = 67$ кДа); трипсин, выделенный из поджелудочной железы крупного рогатого скота ($M_r = 24$ кДа); лизоцим, выделенный из яичного белка ($M_r = 14,6$ кДа).

Иммобилизацию ДДС на белковых носителях проводили в условиях: pH = 9, продолжительность 2–4 ч., температура 18–20 °С.

Построение гипотетической пространственной модели взаимодействия продуктов биомодификации коллагеновых белков и селена в форме диметилдипиразолилселенида осуществляли с использованием квантово-химической и молекулярно-динамической программы HyperChem Release 8.0 [6].

На первом этапе модификации коллагенсодержащее сырье подвергали ферментной обработке препаратом «Коллагеназа пищевая» (производитель – ЗАО «Биопрогресс», г. Щелково Московской обл.). Выбор данного ферментного препарата основан на оптимуме значения pH для проявления его максимальной активности, близкой к уровню pH мясного сырья, наличия его промышленного производства, а также высокого содержания коллагенсодержащих субстратов. Гидролиз проводили в течение четырех часов при дозировке ферментного препарата 0,05 % к массе сырья. В процессе ферментной обработки происходит существенная трансформация белковых фракций сырья, с увеличением количества ионогенных групп по месту разрыва водородных и пептидных связей в структуре белковых молекул.

Установлено, что биомодификация коллагенсодержащих субстратов по использованной схеме приводит к увеличению содержания свободных аминокислот в 5 раз по сравнению с контрольным образцом. В составе идентифицируемых аминокислот после ферментной обработки наблюдается значительное возрастание в 21,3; 25,7 и 16,5 раз пролина, оксипролина и глицина, соответственно, что характерно для деградированного коллагена.

Поскольку ДДС представляет собой органическую форму селена, для него характерно разнообразие типов селенидов, причем химическую связь в них можно считать ковалентно-металлической с вкладом определенной доли ионной связи. Селен ведет себя по аналогии с серой и это связано с его расположением в Периодической системе. Исходя из электронного строения, селен принимает на себя свободные электроны функциональных групп аминокислот и образует донорно-акцепторную связь в результате взаимодействия селена с пептидными фрагментами коллагена (рис. 1).

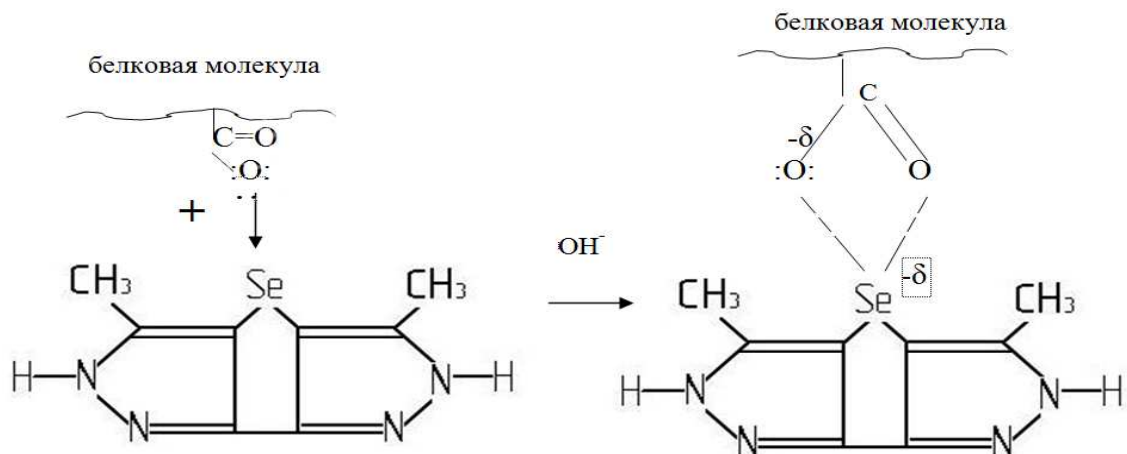


Рисунок 1. Схема взаимодействия ДДС и белковых молекул

Иммобилизация ДДС на продуктах биомодификации коллагена происходит в щелочной среде. Селен в молекуле ДДС связан ковалентной связью, а с пептидами – донорно-акцепторной. Иммобилизация осуществляется с участием функциональных групп полярной части молекулы (-COO), т.е. полярная часть модифицируется и оказывается экранированной для взаимодействующих с лигандом молекул.

Используя результаты анализа аминокислотного состава продуктов биомодификации жилок и сухожилий КРС, а также известные результаты (А. А. Зайдес) рентгенофазового анализа, характерного для альфа (1) спирали коллагена последовательности аминокислотных остатков - глицин-пролин-лизин-глицин-пролин-аланин-глицин-глутамин-аргинин [2], мы с помощью имеющихся алгоритмов (программа HyperChem версии 8,0) осуществили геометрическую оптимизацию данного участка альфа (1) спирали коллагена, изображенного на рисунке 2.

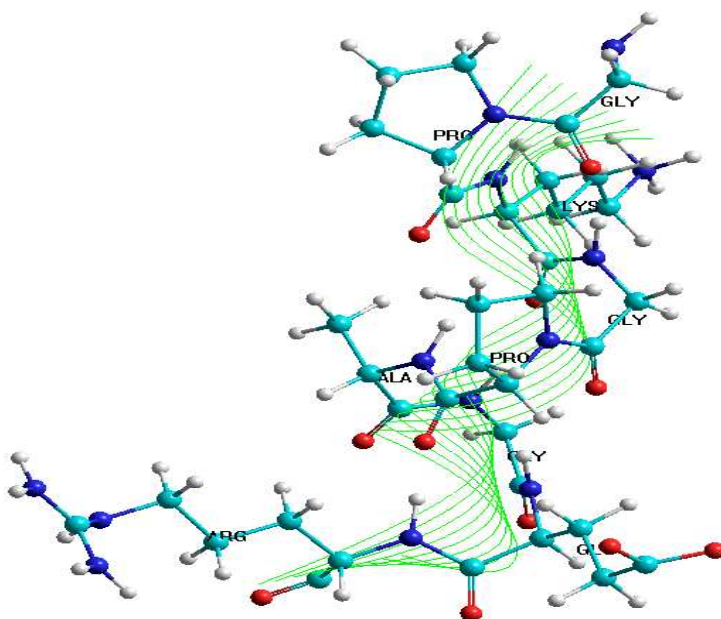


Рисунок 2. Конфигурация пептидного участка коллагена

В результате разделения исследованного раствора коллагена методом SDS-электрофореза в ПААГ в препарате было выявлено 4 основные белковые фракции (табл. 2).

Относительная электрофоретическая подвижность, молекулярная масса и массовая доля белковых фракций

Белок	R _f , отн.ед.	Ig, Mr	Молекулярная масса, Da	Массовая доля фракций, %
1	0,101	2,005	101100	18,4
2	0,217	1,950	89100	19,1
3	0,307	1,918	82700	22,3
БСА	0,246	1,826	67000	
4	0,512	1,706	50800	40,1
Трипсин	0,650	1,380	24000	
Лизоцим	0,830	1,158	14400	

Исходя из литературных данных (А. А. Зайдес, 1968; 1972), можно считать, что самая легкая фракция 4 состоит в основном из альфа-компонентов, представляющих собой отдельные одинарные цепи первоначальной трехспиральной макромолекулы коллагена, фракции 2 и 3 – из бета-компонентов – димеров, образующихся за счет внутримолекулярного скрепления альфа-компонентов. Наиболее тяжелая фракция 1 представлена различными типами гамма-компонентов коллагена, состоящими из трех отдельных цепей и представляющими собой тримеры альфа-компонентов, принадлежащих различным молекулам и скрепленных межмолекулярными связями.

Результаты исследований показали, что модифицированный нами коллаген состоит из низкомолекулярных фракций. Поэтому для моделирования пространственной структуры продуктов иммобилизации использовали пептидный участок α (1) коллагена со следующей последовательностью аминокислотных остатков: глицин-пролин-лизин-глицин-пролин-аланин-глицин-глутамин-аргинин.

Используя результаты компьютерного моделирования структуры пептидных участков коллагена, а также данные, полученные методами рентгенофазового анализа [1, 2], и известные данные о структуре диметилдипиразолилселенида, нами построена гипотетическая модель взаимодействия с ним продуктов модификации жилок и сухожилий КРС аминокислот, изображенная на рисунке 3. Свидетельством корректности геометрической оптимизации являются расчетные характеристики полученной модели. Величина суммарной энергии исследуемой модели являлась достаточно малой величиной (28,791 ккал/моль), среднеквадратичный градиент был приближен к нулевому значению (0,099 ккал/(Å×моль)), что свидетельствует об эффективно выполненной процедуре минимизации потенциальной энергии и сбалансированности энергетических свойств системы.

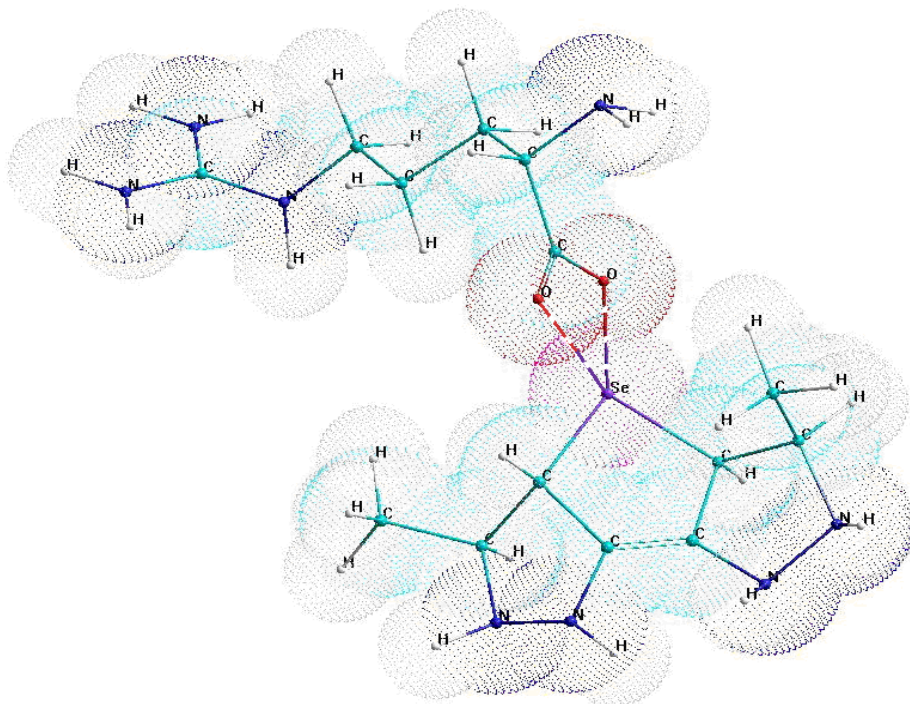


Рисунок 3. Гипотетическая модель взаимодействия диметилдипиразолилселенида с глицином и аргинином в структуре продуктов гидролиза коллагена

Таким образом, из полученной модели ковалентной иммобилизации ДДС с пептидным участком коллагена видно, что в процессе участвуют донорно-акцепторные связи между гидрофильными аминокислотами и селеном в структуре молекулы диметилдипиразолилселенида. Полученные данные могут быть использованы при прогнозировании свойств, проектируемой пищевой добавки, с биопротекторными свойствами.

Список литературы

1. Антипова Л. В. Использование вторичного коллагенсодержащего сырья мясной промышленности / Л. В. Антипова, И. А. Глотова. – СПб.: ГИОРД, 2006. – 324 с.
2. Болтыхов Ю. В. Получение и применение коллагенсодержащих пленкообразующих композиций в технологии мясных продуктов: Автореф. дис. канд. техн. наук. – Воронеж, 2009. – 22 с.
3. Вторушина И. В. Исследование условий получения полифункциональной добавки для обогащения селеном пищевых систем / И. В. Вторушина, И. А. Глотова // В мире научных открытий. – 2010. – № 4.4. – С. 58-59.
4. Гмошинский И. В., Мазо В. К., Тутельян В. А., Хотимченко С. А. Микроэлемент селен: роль в процессах жизнедеятельности // Экология моря. – 2000. – № 54. – С. 5-19.
5. Романова Т. А. Теория и практика компьютерного моделирования нанообъектов: Справочное пособие [Текст] / Т. А. Романова, П. О. Краснов, С. В. Качин, П. В. Аврамов // Красноярск: ИПЦ КГТУ, – 2002. – 223 с.

6. Соловьев М. Е. Компьютерная химия [Текст] / М. Е. Соловьев, М. М. Соловьев. – М.: СОЛОН-Прес, 2005. – 535 с.

7. Тутельян В. А. Селен в организме человека. Метаболизм. Антиоксидантные свойства. Роль в канцерогенезе [Текст] / В. А. Тутельян, В. А. Княжев, С. А. Хотимченко. – М.: Колос, 2002. – 316 с.

8. Шабунин С. В. Результаты применения препарата «Селедант» (Селекор) в ветеринарии и животноводстве [Текст] / С. В. Шабунин, В. И. Беляев, Ю. П. Балым // Селекор. Биологическое действие. – М.: MAGERIC, 2006. – С. 89- 99.

Рецензенты:

Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, декан биолого-почвенного факультета, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Россия, г. Воронеж.

Корнеева О. С., д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и биохимии ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», г. Воронеж.