

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**имени М.В.Ломоносова**

**ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

*На правах рукописи*

**ИВАНОВ РОМАН АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**КОЛЛОИДНО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СМЕСЕЙ  
ЛИЗОЦИМ – ПАВ В СИСТЕМЕ ВОДНЫЙ РАСТВОР/ОКТАН**

**Диссертация**

**на соискание ученой степени кандидата химических наук**

**по специальности 02.00.11 – коллоидная химия**

**Научный руководитель:**

**к.х.н. Соболева Оксана Анатольевна**

МОСКВА - 2014

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	3
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Взаимодействие белков с поверхностно-активными веществами в водных растворах .....	7
1.2. Поверхностное натяжение и адсорбция смесей белок – ПАВ .....	19
1.3. Использование метода радиоактивных индикаторов для изучения адсорбции белков и ПАВ.....	31
1.4. Стабилизация эмульсий, пен и пенных пленок смесями белок – ПАВ.....	36
II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	40
2.1. Объекты исследования .....	41
2.2. Методы исследования.....	44
2.2.1. Метод сцинтиллирующей фазы.....	44
2.2.2. Метод висящей капли.....	51
2.2.3. Определение размера частиц и электрокинетического потенциала.....	52
2.2.4. Получение спектров поглощения в УФ области .....	53
2.2.5. Метод флуоресценции .....	54
2.2.6. Ферментативная активность лизоцима в присутствии ПАВ.....	55
2.2.7. Избирательное смачивание .....	56
III. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. ....	58
3.1. Взаимное влияние лизоцима и ПАВ на распределение в системе вода/октан	58
3.2. Адсорбция смесей лизоцим – ПАВ на границе вода/октан .....	63
3.3. Поверхностное натяжение смесей лизоцим – ПАВ.....	73
3.4. Определение констант взаимодействия белок – ПАВ в адсорбционных слоях по модели Файнермана .....	84
3.4. Определение размера частиц .....	88
3.6. Изучение взаимодействия Lz – ПАВ методом флуоресценции .....	93
3.7. Ферментативная активность лизоцима в присутствии ПАВ .....	95
3.8. Избирательное смачивание в системе водный раствор смеси Lz – ПАВ/октан/гидрофобизованное стекло .....	101
3.9. Адсорбция и распределение смесей лизоцим – ПАВ в системе вода/октан..	104
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ .....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	128

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Изучение адсорбции глобулярных белков на границах раздела фаз водный раствор/органическая жидкость в присутствии ПАВ актуально с точки зрения понимания ряда биологических процессов, происходящих в клеточных мембранах, и развития новых биохимических технологий в различных областях [1, 2]. Интерес к изучению смесей белок – ПАВ связан с широким использованием таких композиций при создании лекарственных препаратов, моющих средств, эмульсий в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности. Большинство результатов, полученных в последнее время, относится к изучению водных растворов смесей белок – ПАВ или их адсорбции на границе водный раствор/воздух. Система усложняется, если водная фаза граничит с органической, так как оба компонента смесей и их комплексы могут не только адсорбироваться на межфазной поверхности, но и переходить в органическую фазу. Такие двухфазные системы ближе к условиям протекания биологических процессов в живых организмах, а также к условиям ряда технологических процессов. Слабая изученность поведения смесей белок – ПАВ в системе водный раствор/органическая жидкость объясняется ограниченным набором экспериментальных методик, позволяющих получать достоверные данные об адсорбции на межфазной границе. Использование в данной работе метода сцинтиллирующей фазы с мечеными тритием веществами открывает широкую перспективу получения надежных данных об адсорбции, распределении веществ в системе и, главное, о взаимном влиянии белка и ПАВ на эти свойства. Развитый в диссертации подход к изучению бинарных смесей, в котором тритиевую метку содержит поочередно один из компонентов смеси, дает информацию о взаимном влиянии веществ на их адсорбцию, распределение, состав адсорбционного слоя в широкой области концентраций, включая область низких концентраций, в которой другие методы не работают. В последнее время разработаны методики получения, выделения и идентификации меченных тритием органических веществ различного строения [3 – 5], что позволило исследовать смеси глобулярного белка лизоцима

(Lz) не только с традиционными ПАВ - бромидом додецилтриметиламмония (DTAB) и додецилсульфатом натрия (SDS), но и с цвиттерионным ПАВ кокоамидопропил бетаином (CAPB), который в последнее время широко используется в качестве соПАВ при создании различных композиций в косметической промышленности и моющих средствах [1, 6, 7]. Сочетание методов сцинтиллирующей фазы и межфазной тензиометрии позволило впервые показать, как взаимодействия между белком и ПАВ разной природы влияют на коллоидно-химические свойства двухфазных систем водный раствор/органическая жидкость.

Цель работы: установить механизмы адсорбции и распределения смесей лизоцима и ПАВ различной природы в системе двух несмешивающихся жидкостей. Установить влияние взаимодействия белка и ПАВ на коллоидно-химические свойства систем водный раствор смеси Lz – ПАВ/октан.

Для достижения поставленной цели в диссертации решались следующие задачи:

- методом сцинтиллирующей фазы определить коэффициенты распределения и величины адсорбции лизоцима и ПАВ на границе вода/октан, установить состав адсорбционных слоев;
- разработать методику получения меченного тритием цвиттерионного ПАВ кокоамидопропил бетаина;
- изучить взаимное влияние белка и ПАВ на межфазное натяжение;
- определить размер и структуру агрегатов белок – ПАВ;
- исследовать ферментативную активность лизоцима в присутствии ПАВ;
- оценить устойчивость смачивающих пленок, стабилизированных смесями лизоцим – ПАВ.

Научная новизна. Разработанный в диссертации подход, основанный на сочетании методов сцинтиллирующей фазы и межфазной тензиометрии, позволил получить уникальные данные о взаимном влиянии лизоцима и ПАВ на адсорбцию на границе водный раствор/октан, на распределение в двухфазной системе, определить состав смешанных адсорбционных слоев Lz с ПАВ различного типа (анионного, катионного и, впервые, цвиттерионного) в широкой области концентраций.

На основании сопоставления данных методов сцинтиллирующей фазы, тензиометрии, статического и динамического светорассеяния, флюоресценции, определения ферментативной активности установлены основные стадии перераспределения компонентов между контактирующими фазами и межфазным адсорбционным слоем. Выявлены области концентраций, при которых формируются гидрофобный и гидрофильный комплексы белок – ПАВ, установлена их локализация и влияние на межфазное натяжение, ферментативную активность, устойчивость смачивающих пленок.

Практическая значимость. Выявленные закономерности адсорбции глобулярных белков в присутствии других веществ на границе жидкость/жидкость могут способствовать пониманию функционирования белков в живых организмах, а также быть использованы для развития новых биохимических технологий. Данные о влиянии ПАВ на ферментативную активность Lz позволяют оптимизировать состав композиций, используемых для создания дисперсных систем, стабилизированных смесями белок – ПАВ.

Полученные закономерности поведения смесей белок – ПАВ в системе водный раствор/органическая жидкость могут быть использованы в спецкурсах для студентов и аспирантов, специализирующихся в области коллоидной химии, биохимии, биотехнологии.

# I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## Список сокращений, используемых в обзоре литературы.

### Белки и биополимеры:

$\beta$ -Cs –  $\beta$ -казеин,

$\beta$ -LG –  $\beta$ -лактоглобулин,

BSA – бычий сывороточный альбумин,

Gn – желатин,

HFB – гидрофобин,

HSA – сывороточный альбумин человека,

Lz – лизоцим,

OVA – овальбумин,

OVT – овотрансферин,

RM – липаза *rhizomucor miehei*,

WPI – изолят сывороточного протеина.

### Поверхностно-активные вещества:

AOT – бис(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия,

C<sub>10</sub>DMPO – децилдиметилфосфин оксид,

C<sub>12</sub>DMPO – додецилдиметилфосфин оксид,

C<sub>12</sub>E<sub>5</sub> – додециловый эфир пентаэтиленгликоля,

C<sub>12</sub>E<sub>6</sub> – додециловый эфир гексаэтиленгликоля,

C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> – додециловый эфир октаэтиленгликоля,

CTAB – бромид гексадецилтриметиламмония,

DTAB – бромид додецилтриметиламмония,

SDBS – додецилбензолсульфоната натрия,

SDS – додецилсульфат натрия,

SOS – октилсульфат натрия,

Span 20 – сорбитан монолаурат,

TTAB – бромид тетрадецилтриметиламмония,

Tween 20 – полиоксиэтилен сорбитан монолаурат,

Tween 80 – полиоксиэтилен сорбитан олеат,

Тритон X-100 – п-третоктилфениловый эфир полиоксиэтиленгликоля.

## 1.1 Взаимодействие белков с поверхностно-активными веществами в водных растворах

Механизмы взаимодействия низкомолекулярных ПАВ с белками достаточно сложны, сильно зависят от ряда параметров, таких как аминокислотный состав белков, pH, электролитный состав раствора, третичная структура белка, наличие зарядов на поверхности, количество и относительное расположение гидрофобных и гидрофильных участков на макромолекуле белка. Как известно, трехмерная упаковка мономеров в макромолекуле белка такова, что гидрофобные и гидрофильные аминокислотные остатки в значительной степени сегрегированы: внутренняя часть молекул глобулярных белков преимущественно гидрофобна, а поверхность молекулы белка – гидрофильна с небольшими гидрофобными доменами. ПАВ способны связываться как с полярными, так и с гидрофобными доменами белков. Важнейшими вопросами, связанными с взаимодействием белков и ПАВ, являются: обратимость связывания, идентификация центров связывания, определение влияния взаимодействия на поведение смесей на поверхности, изучение стабилизирующего действия по отношению к различным системам (пенам, эмульсиям, суспензиям), денатурация белка в присутствии ПАВ. Несмотря на всю важность этих вопросов, системы, включающие белок и ПАВ, остаются мало исследованными, и до сих пор нет общепринятых количественных моделей для их описания [1, 2, 8].

Наиболее часто встречающейся моделью комплекса белок – ПАВ является модель «ожерелье и бусинки». Модель предполагает, что полипептидная цепь в растворе является гибкой, и мицеллоподобные кластеры ПАВ располагаются вдоль развернутой пептидной цепи. Так, при изучении методами флуоресценции и электронного спинового резонанса, индуцированного анионным ПАВ додецилсульфатом натрия (SDS) разворачивания макромолекулы бычьего сывороточного альбумина (BSA), установлено [9], что белок индуцирует образование мицеллоподобных агрегатов вдоль развернутой полипептидной цепи. Схема процесса представлена на рис. 1. Методом динамического светорассеяния показано, что агрегаты SDS, формирующиеся вблизи макромолекулы BSA, меньше, чем мицеллы

SDS в водном растворе. Анализ данных ЯМР с использованием двух дейтерированных образцов SDS позволил установить, что макромолекула взаимодействует, в основном, с полярными группами мицелл SDS.

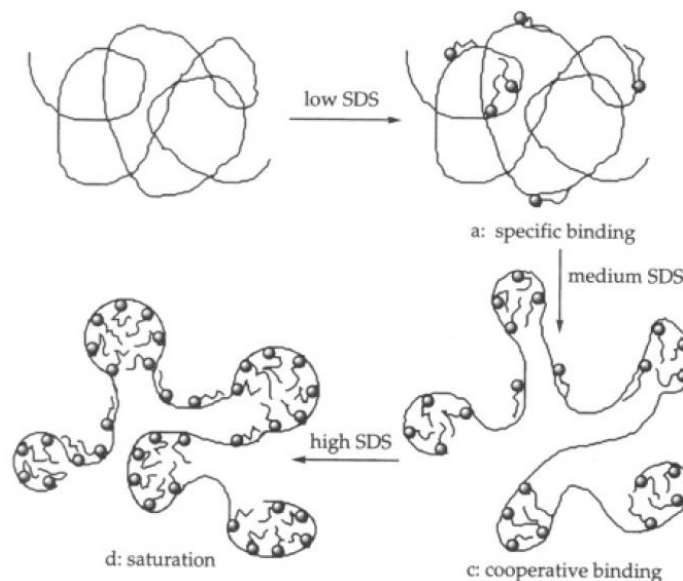


Рис. 1. Взаимодействие SDS с BSA с образованием агрегата типа «жемчужного ожерелья» [9].

Изучение структуры ассоциатов BSA с SDS, бромидом гексадецилтриметиламмония (СТАВ) и додециловым эфиром октаэтиленгликоля  $C_{12}E_8$ , а также лизоцима (Lz) с SDS с использованием флюоресцентной пробы показало, что модель ожерелья подходит для систем BSA – ПАВ и весьма ограничена для системы Lz – SDS [10]. Наличие четырех дисульфидных мостиков обеспечивает структурную устойчивость глобулы Lz; разворачивания макромолекулы не происходит. Число кластеров ПАВ на полипептидной цепи составляет 2 – 4 для системы BSA – SDS и 1 для смеси Lz – SDS. Размер мицелл SDS, образующихся на цепи BSA, увеличивается с ростом концентрации ПАВ, после достижения ККМ происходит мицеллообразование в растворе [11].

В [12] полагают, что в системе Lz – SDS образуется комплекс, представляющий собой разбухшую мицеллу с белком в нативной и частично развернутой формах, расположенным вблизи оболочки мицеллы (рис. 2). Лизоцим, благодаря своему малому размеру, встраивается в мицеллу SDS, но не входит внутрь ядра мицеллы из-за своей гидрофильности.



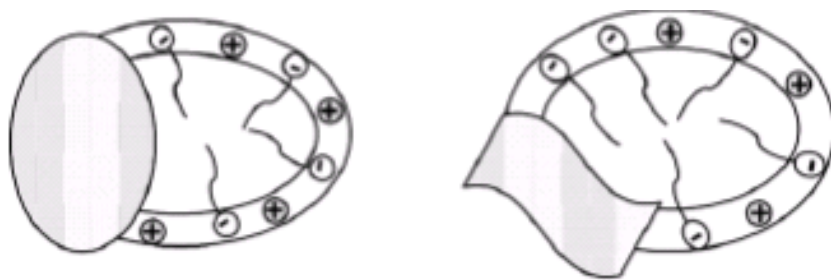


Рис. 2. Структура комплекса лизоцим – SDS [12].

С помощью методов криоэлектронной микроскопии, малоуглового рассеяния X-лучей и нейтронов, динамического светорассеяния было показано, что при молекулярной массе белка меньше 20 кДа формируются комплексы белка с одной мицеллой ПАВ [13 – 15].

В [16] было установлено, что при взаимодействии SDS с полипептидом между атомами кислорода в  $SO_4$ -группе SDS и атомом водорода в аминогруппе полипептида образуются водородные связи, что приводит к образованию агрегатов по типу «гибкой спирали» (рис. 3). При этом ПАВ формирует гибкую цилиндрическую мицеллу, вокруг которой по спирали оборачивается полипептид.

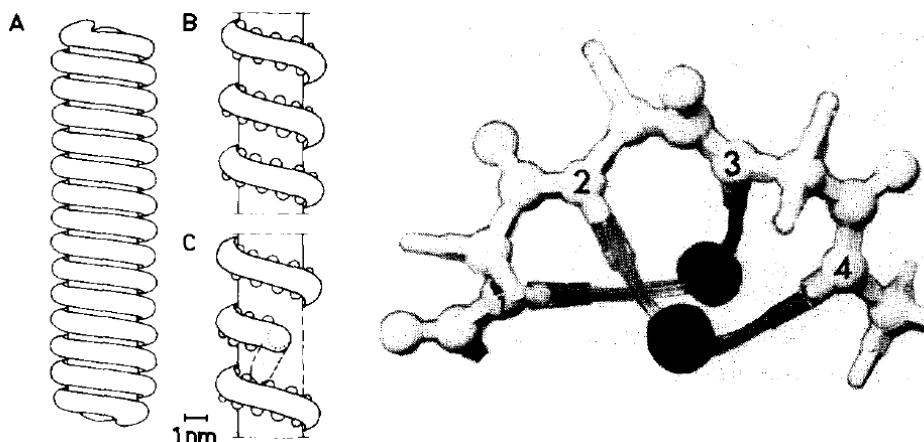


Рис. 3. Структура комплекса полипептид – SDS [16].

В работах [17, 18] отмечается, что при добавлении ПАВ к раствору белка вначале формируется гидрофобный комплекс вследствие взаимодействия полярных групп белка и ПАВ. При этом углеводородные цепи ПАВ обращены в сторону раствора. При увеличении концентрации ПАВ происходит связывание по гидрофобному механизму и образование гидрофильного комплекса. При этом глобула белка остается компактной.

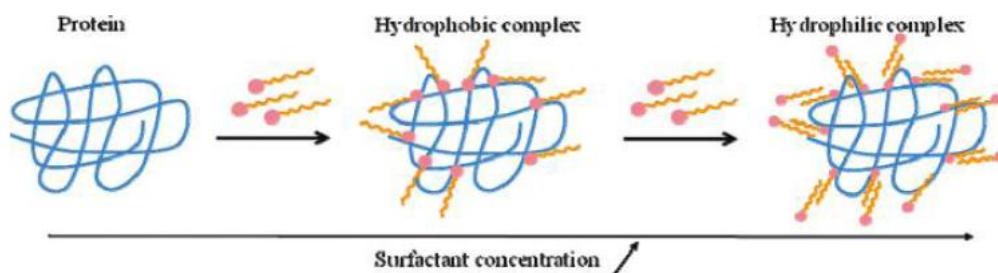


Рис. 4. Формирование гидрофобного и гидрофильного комплексов в водном растворе смесей белок – ПАВ [17].

При добавлении к раствору белка противоположно заряженного ПАВ при определенной концентрации белка и соотношения компонентов, в системе наблюдается формирование осадка [14, 19 – 22]. В работе [19] исследовано образование и растворение осадка в бинарном растворе Lz и октилсульфата натрия (SOS). Белок и ПАВ формируют комплекс стехиометрией  $Lz(OS)_8$ , выпадающий в осадок. С ростом общей концентрации раствора в избытке ПАВ образуются комплексы с 28 и 30 октасульфатными фрагментами на 1 молекулу лизоцима. Полагают, что начальный комплекс формируется за счет электростатических взаимодействий, после чего между ПАВ и комплексом наблюдается отталкивание. С ростом концентрации ПАВ происходит растворение комплекса, вызванное индуцированным белком мицеллообразованием при критической концентрации ассоциации (ККА), равной 74 мМ. Выше ККА образуется гель. Считают, что при высокой концентрации ПАВ происходит неспецифическое кооперативное связывание с белком (процесс, аналогичный мицеллообразованию).

В работе [20] отмечают, что при концентрации Lz свыше 0,1% его взаимодействие с SDS приводит к образованию осадка вследствие нейтрализации положительного заряда белка при взаимодействии с поверхностно-активными анионами. При нейтральных pH поверхность глобулы Lz содержит 8 положительных зарядов. При увеличении концентрации ПАВ, когда соотношение SDS:Lz достигает 19:1, происходит полное растворение осадка. При концентрации белка от 7 до 20% образуется изотропный голубой прозрачный вязкий гель из частично денатурированных молекул лизоцима, соединенных мицеллами ПАВ. Авторами работы [14] установлено, что структурной единицей геля являются агрегаты радиусом

4,5 – 5,5 нм из 8 молекул Lz и ПАВ. Эти агрегаты соединяются в нитеобразные структуры, которые формируют сетку геля.

В работе [23] представлена экспериментально полученная фазовая диаграмма системы Lz – SDS – вода, дополненная теоретическими расчетами, учитывающими электростатические и гидрофобные взаимодействия. Взаимодействие по полярным группам белка и ПАВ приводит к образованию нейтрального гидрофобного комплекса, который выпадает в осадок. С увеличением концентрации ПАВ анионы додецилсульфата связываются с нейтральным комплексом за счет гидрофобных взаимодействий, увеличивая его заряд. При этом вода и противоионы встраиваются в структуру осадка, вызывая набухание, однако, гидрофобные связи достаточно сильны, и осадок не растворяется. При увеличении концентрации SDS выше ККМ происходит полное растворение осадка. В работах [24, 25] образование и растворение осадка Lz – SDS описано с использованием ряда термодинамических параметров, измеренных методом изотермического калориметрического титрования.

Как правило, изучение смесей белок – ПАВ проводят в фосфатном буферном растворе при рН близких к 7 и низкой ионной силе раствора. Изменение рН среды влияет на образование осадка в системе белок – ПАВ, что связано с изменением поверхностного заряда белковой глобулы. Изоэлектрическая точка лизоцима  $pI = 11$ , при рН 3 и 4, когда белок заряжен положительно, наблюдалось помутнение раствора и выпадение осадка в системе Lz – SDS. При рН 11 и 13, когда белок не заряжен или заряжен отрицательно, помутнение раствора происходит в значительно меньшей степени [26]. Полагают, что при высоких рН белок и ПАВ могут связываться исключительно за счет гидрофобных взаимодействий. Изучение изменений во вторичной и третичной структуре белка методом кругового дихроизма показало наличие переходных состояний между компактным гидрофобным комплексом Lz – SDS и комплексом с развернутой белковой глобулой, полученным в результате гидрофобного связывания. Установлено образование переходного состояния в виде фибрилл. Добавки циклодекстрина препятствуют связыванию Lz с SDS и формированию осадка [27]. Выпадение осадка в системах

овальбумин – SDS и кональбумин – SDS также происходило при pH ниже изоэлектрической точки белков. Число молей SDS, приходящихся на моль белка в осадке, зависело от pH раствора и увеличивалось с увеличением заряда белка. Осадок полностью растворялся при pH выше изоэлектрической точки. Увеличение температуры усиливает образование осадка и денатурацию белка.

При изучении взаимодействия Lz с шестью анионными ПАВ установлено, что взаимодействия с алкилсульфатами натрия сильнее, чем с алкилсульфонатами натрия при одинаковой длине алкильной цепи [21]. Взаимодействия анионных ПАВ с Lz усиливаются при удлинении алкильной цепи (для ПАВ с одинаковыми полярными группами). В работе [22] методами кругового дихроизма, флуоресценции, УФ спектроскопии, динамического светорассеяния, поверхностной тензиометрии и турбидиметрии установлено, что осадок, образованный при взаимодействии Lz с анионными ПАВ при нейтральном pH, растворяется при последующем добавлении катионных ПАВ. При этом белок самопроизвольно сворачивается с восстановлением нативной структуры. Причина такого поведения состоит в образовании смешанных мицелл из анионных и катионных ПАВ, что является более выгодным процессом по сравнению с формированием комплексов белок – ПАВ.

Конкурентные взаимодействия между противоположно заряженными ПАВ и белком исследованы в работе [28]. Представлена фазовая диаграмма смеси SDS и хлорида додецилтриметиламмония в отсутствие и в присутствии Lz. При добавлении SDS к раствору Lz, как уже отмечалось, формируется осадок, который растворяется при добавлении как анионного, так и катионного ПАВ. Установлено, что при добавлении катионного ПАВ с додецильной цепью, SDS предпочтительно агрегирует с катионным ПАВ, а не с белком. При добавлении катионных ПАВ с децильной и октильной цепью, растворение комплекса анионного ПАВ с белком происходит только в большом избытке катионного ПАВ.

Ассоциация ПАВ с белками напрямую доказывается изотермами связывания, которые можно получить методами равновесного диализа с использованием ПАВ-селективных электродов и другими методами [1, 2, 9, 29]. Изотермы связы-

вания характеризуются комбинацией слабого некооперативного связывания в области низких концентраций ПАВ и интенсивного кооперативного связывания при более высоких концентрациях ПАВ (рис. 5).

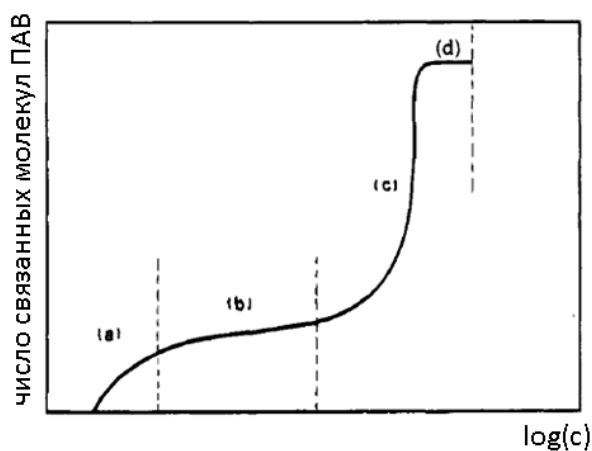


Рис. 5. Изотерма связывания белка с ПАВ [9].

При взаимодействии ПАВ с белками сначала происходит связывание малых количеств ПАВ со специфическими центрами связывания белков, обладающих высоким сродством к ПАВ (участок а), затем идёт область некооперативного связывания (b), и, наконец, кооперативное связывание, аналогичное мицеллообразованию на полимерных цепях (с), и достижение насыщения (d). На участке (с) может происходить разворачивание белковой глобулы, что делает доступным для взаимодействия с ПАВ гидрофобные группы белка, находящиеся внутри нативной глобулы. Таким образом, при добавлении ПАВ многие глобулярные белки переходят в состояние неупорядоченных клубков. В этом случае применима модель «ожерелья»: «бусины» небольших глобулярных мицелл «декорируют» полипептидную цепь. Изотермы связывания, содержащие области специфического, некооперативного и кооперативного связывания были получены для смесей SDS с рибонуклеазой А,  $\beta$ -LG и BSA [30].

Изотермы связывания SDS с Lz при различных рН и концентрации соли были получены в [31, 32]. Увеличение числа молекул ПАВ, связанных с белком, с ростом концентрации проходит через область высокоэнергетического связывания по полярным группам, а затем низкоэнергетического за счет гидрофобных взаимодействий. Насыщение полярных связей происходит при мольном соотношении

Lz:SDS равном 1:8, полное насыщение связей происходит при соотношении 1:80 – 1:220 в зависимости от концентрации белка [33]. Далее зависимость числа связанных молекул проходит через максимум, что объясняют началом образования мицелл ПАВ в растворе. В отсутствие соли мицеллообразование в растворе начинается после того, как прошло гидрофобное связывание. В присутствии соли мицеллообразование начинается при меньших концентрациях ПАВ. При увеличении концентрации соли изменение свободной энергии  $\Delta G$  ионного связывания незначительно уменьшается, а  $\Delta G$  гидрофобного связывания слабо повышается по абсолютной величине за счет экранирования поверхностного заряда и усиления гидрофобного эффекта. При увеличении pH происходит сдвиг начального участка изотерм связывания в область более высоких концентраций ПАВ и началу гидрофобного связывания при более низких числах агрегации, положение максимума практически не меняется. Добавки этанола в систему приводят к сдвигу изотерм связывания в область низких концентраций ПАВ [34]. Установлено, что лизоцим обладает большей термодинамической стабильностью в отсутствие спирта, а увеличение концентрации этанола усиливает связывание Lz с SDS и приводит к денатурации белка. Данные подтверждены измерением энтальпии денатурации и свободной энергии связывания.

Связывание октил- и додецилсульфатов натрия с BSA было изучено в работе [29]. Показано, что связывание не зависит от pH при его изменении от 4,8 до 6,8, т.е. в этом диапазоне pH гидрофобные взаимодействия предпочтительнее электростатических. При понижении pH взаимодействия BSA с SDS усиливаются, возможно, за счет появления положительного заряда на макромолекуле и возникновения электростатического притяжения. Получено, что при увеличении молярного соотношения SDS:BSA свыше 10 – 15, происходит разворачивание белка. Образование в системе мицелл, обладающих неполярным ядром, подтверждено экспериментами по изучению солюбилизации маслорастворимых красителей.

В работе [35] методом изотермического калориметрического титрования изучено взаимодействие СТАВ и SDS с Lz, желатином (Gn) и ДНК при различной концентрации биополимеров. Характер взаимодействия ПАВ – биополимер оце-

нивался из зависимостей энтальпии связывания от концентрации ПАВ. Получено, что СТАВ, в отличие от SDS, взаимодействует с отрицательно заряженной молекулой ДНК, что говорит об исключительно электростатической природе взаимодействий. СТАВ и SDS взаимодействуют с Gp и Lz за счет электростатических и дисперсионных взаимодействий. Показано, что процесс взаимодействия ПАВ и биополимера является сложным и зависит от pH среды и температуры.

Взаимодействие липазы *rhizomucor miehei* (RM) и амфотерного ПАВ N-(2-гидроксидодецил)-саркозината натрия описано в [36]. ПАВ имеет положительный заряд при pH 3,0, нейтральный при pH 7,5 и отрицательный при pH 10,5. Показано, что белок взаимодействует с ПАВ, только когда его полярная группа заряжена положительно. RM образует агрегаты с бромидом додецилтриметиламмония (DTAB), в то время как с анионным и неионогенным ПАВ белок не взаимодействует [37]. Показано, что число молекул ПАВ, связанных с белком, отличается для разных ПАВ. Авторы полагают, что между гидрофобными доменами RM, расположенными вблизи отрицательных зарядов на белке и углеводородными цепями ПАВ возможно гидрофобное связывание.

Изучение скорости звука в растворе, плотности, поверхностного натяжения и УФ-поглощения подтвердили образование заряженного комплекса между Lz и SDS [38]. Электростатические и гидрофобные взаимодействия белка и ПАВ достаточно сильны и вызывают конфигурационные изменения в структуре Lz. Нарушение структуры лизоцима под действием SDS также отмечалось в [12, 23, 39]. Денатурация лизоцима под действием ряда анионных ПАВ описана в [22]. Спектры кругового дихроизма показали, что малые добавки додецилбензолсульфоната натрия SDBS предотвращают агрегирование молекул лизоцима, а большие концентрации ПАВ приводят к конформационным изменениям в макромолекуле белка [40].

Распределение заряда по белковой глобуле лизоцима неоднородно, на поверхности одновременно присутствуют положительно и отрицательно заряженные участки [41]. Поэтому, несмотря на наличие общего положительного заряда на макромолекуле Lz, белок способен связываться не только с анионным, но и с

катионными ПАВ [42, 43]. В [42] взаимодействие Lz с СТАВ изучали с помощью анализа динамики сольватации кумарина 153, красителя, который не связывается отдельно с СТАВ и Lz в нативной форме. Однако краситель сольбилизируется в агрегате Lz – СТАВ. Времена сольватации кумарина 153 в агрегате существенно больше, чем в растворах СТАВ или Lz.

Методом изотермического калориметрического титрования изучено взаимодействие ДТАВ с яичным Lz [43]. ДТАВ взаимодействует с Lz эндотермически. В результате взаимодействия происходит денатурация белка, изменение его структуры и биологической активности. Полагают, что при низких концентрациях ДТАВ связывание происходит за счет электростатических взаимодействий, а также за счет дисперсионных взаимодействий углеводородных цепей ПАВ с гидрофобными участками лизоцима. Эти начальные взаимодействия вызывают разворачивание белка, и новые гидрофобные участки становятся доступны для взаимодействия с ПАВ. Энтальпия индуцированной ДТАВ денатурации лизоцима составляет  $86,46 \pm 0,02$  кДж/моль.

В отличие от ионогенных ПАВ, с неионогенными ПАВ лизоцим связывается слабо. При изучении влияния добавок белков (BSA и Lz) на поверхностное натяжение додецилового эфира пентаэтиленгликоля  $C_{12}E_5$  показано, что минимальное поверхностное натяжение (27 мН/м) устанавливается для смеси BSA/ПАВ при большей концентрации, чем для чистого ПАВ или смеси Lz/ПАВ [44]. Сделан вывод, что ПАВ связывается с BSA, но не с Lz.

При измерении кажущегося молярного объема, адиабатической сжимаемости и скорости звука в водных растворах SDS, нонилсульфата натрия, SDBS, СТАВ, дидодецилдиметиламмоний бромида в присутствии  $\beta$ -лактоглобулина ( $\beta$ -LG) при изменении температуры от 10 до 36°С на температурных зависимостях молярного объема обнаружены два минимума при 22 и 32°С [45]. Глубина минимумов уменьшается с ростом концентрации ПАВ. Наблюдаемые зависимости связывают с наличием взаимодействия белка с ПАВ. Сложные температурные зависимости исчезают при добавлении денатуратора белка 2-меркаптоэтанола.



Изучены взаимодействия желатина при рН 4,84 с катионным ПАВ СТАВ [46]. При концентрации ПАВ ниже ККМ формируются два вида комплексов белок – ПАВ. Сначала образуется высоко поверхностно-активный комплекс  $G_n$  – СТАВ(мономер), адсорбирующийся на границе вода/воздух, а потом, при критической концентрации агрегирования, он трансформируется в слабо поверхностно-активный комплекс  $G_n$  – СТАВ(агрегат). При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ возникают коацерваты из агрегатов, что приводит к возрастанию мутности системы. При увеличении содержания СТАВ коацерваты распадаются и не образуются в мицеллярном растворе СТАВ.

Взаимодействие белков с ПАВ зависит от величины и знака заряда белков, на которые влияют рН и концентрация добавленного электролита. При измерении зависимости заряда лизоцима от концентрации NaCl при рН 2,5 – 11,5 было показано, что белок преимущественно связывается с хлорид-ионами (до 12 ионов при рН 2,5), нежели с натрием [47]. Заряд лизоцима меняется с положительного на отрицательный при концентрации добавленной соли 0,01 М [48]. Взаимодействие белка с ионами описано в терминах модели двойного электрического слоя. В [49] показано, что лизоцим имеет отрицательный  $\zeta$ -потенциал при рН 7 и 11 и положительный при рН 3,2 в 0,05 М буферных растворах. Добавление н-алкилсульфонатов с длиной углеводородной цепи 8 – 16 атомов приводит к снижению  $\zeta$ -потенциала, а при рН 3,2 вызывает перезарядку поверхности. Уменьшение длины цепи ПАВ приводит к увеличению концентрации, при которой происходит перезарядка. Для гомолога с длиной цепи  $C_{16}$  потенциал практически постоянен, и перезарядка поверхности не наблюдается. При добавлении бромидов н-алкилтриметиламмония также наблюдался рост  $\zeta$ -потенциала и перезарядка поверхности при рН 7 и 11 [50]. Так же, как и при добавлении анионного ПАВ, рост длины алкильной цепи способствует уменьшению концентрации, при которой происходит перезарядка. Авторы полагают, что катионные и анионные ПАВ взаимодействуют, соответственно, с карбоксильными и аминогруппами лизоцима. Перезарядка поверхности происходит при полном насыщении этих групп и начале гидрофобного связывания. Добавки неионогенного ПАВ  $C_{12}E_6$  не влияют

на заряд лизоцима и его электрофоретическую подвижность даже при большом избытке ПАВ [51].

Многообразие возможных механизмов взаимодействия белка и ПАВ приводит к тому, что ПАВ могут не только вызывать денатурацию белка и снижать его ферментативную активность, но также могут сохранять её или даже активировать фермент [8].

Добавки анионных ПАВ, таких как алкилсульфаты, алкилсульфонаты, алкилбензолсульфонаты натрия, вызывают уменьшение бактериолитической активности лизоцима по отношению к грам-положительным бактериям *Micrococcus lysodeikticus* [22, 40]. Введение в систему реагентов, специфически связывающих анионные ПАВ (катионных ПАВ [22] или гидроксипропил  $\beta$ -циклодекстрина [40]) приводит к полному восстановлению структуры лизоцима и его активности. Денатурирующее действие додецилсульфата натрия также снижается в присутствии неионогенных или цвиттерионных ПАВ [1]. Анионные ПАВ не всегда вызывают денатурацию лизоцима: так, например, ферментативная активность лизоцима сохраняется после его экстракции раствором обратных мицелл бис(2-этилгексил)сульфосукцината натрия (АОТ) [52 – 54]. SDS оказывает инактивирующее действие на каталазу из печени быка, однако, не влияет на активность бактериальной каталазы [55]. Добавки анионных ПАВ с короткой углеводородной цепью не влияют на активность алкогольдегидрогеназы, а ПАВ с длинной или разветвленной алкильной цепью, а также катионные ПАВ СТАВ – уменьшают активность энзима [56]. При исследовании влияния ПАВ различной природы на бактериолитическую активность липазы *Thermomyces lanuginosus* было установлено, что малые добавки ПАВ увеличивают активность фермента, однако, при высоких концентрациях происходит снижение активности до значений, полученных в отсутствие ПАВ [57]. Аналогичным образом ионогенные ПАВ действуют на активность фосфолипазы С, в то время как неионогенные и цвиттерионные ПАВ не влияют на активность этого фермента [58]. Повышение активности эндוליцина бактериофага SPZ7 в лизисе клеток *Salmonella enteritidis* N60 и *Escherichia coli* TGI наблюдалось в присутствии высокомолекулярных поверхностно-

активных веществ и плуроников с крупным гидрофобным блоком [59]. Малые добавки бромида п-октилоксибензилтрибутиламмония значительно увеличивают активность  $\alpha$ -хемотрипсина, при дальнейшем увеличении концентрации ПАВ происходит снижение активности фермента, до значений, соответствующих белку без добавок [60].

Сильные взаимодействия положительно заряженных белков с анионными ПАВ влияют на термическую устойчивость белка [61]. По изменению интенсивности пика поглощения при 280 нм судили о денатурации Lz с ростом температуры в присутствии ПАВ. Показано, что добавки ПАВ с короткой алкильной цепью (октилсульфата натрия) приводят к повышению температуры денатурации белка. Стабилизирующее действие ПАВ связывают с формированием «мостиков» между полярными и неполярными участками на молекуле белка за счет их взаимодействия с ПАВ.

## **1.2. Поверхностное натяжение и адсорбция смесей белок – ПАВ**

Трехмерная упаковка аминокислот в белковой глобуле такова, что на поверхности молекулы белка присутствуют гидрофильные и гидрофобные участки. Благодаря мозаичному строению поверхности белки сами по себе проявляют поверхностно-активные свойства, активно адсорбируются на различных границах раздела фаз. Снижение поверхностного натяжения на границе водного раствора с воздухом или органическими жидкостями невелико и даже при плотном заполнении белковыми молекулами поверхностного слоя двумерное давление не превышает 10 – 20 мН/м [62, 63].

При измерении динамического поверхностного натяжения растворов Lz получено [62], что кинетику адсорбции белка на границе вода/воздух можно описать как диффузионно-контролируемый процесс при низких концентрациях белка и как смешанный процесс при высоких концентрациях, когда конформационные изменения в макромолекулах в поверхностном слое становятся определяющими. Адсорбция лизоцима достигает постоянного значения за 20 часов. При изменении

концентрации от  $5 \cdot 10^{-8}$  до  $2 \cdot 10^{-6}$  М на изотерме двумерного давления обнаружено плато, на котором площадь на моль лизоцима меняется от  $4,95 \cdot 10^{-5}$  до  $7,72 \cdot 10^{-6}$  м<sup>2</sup>/моль. Возникновение плато связывают с переориентацией белковой глобулы на поверхности, в результате которого образуется более плотный слой. Полагают, что жёсткая глобулярная структура лизоцима не позволяет ему развернуться на межфазной границе. Методами эллипсометрии и зеркального отражения нейтронов была доказана переориентация лизоцима на поверхности при увеличении концентрации [64, 65]. Показана возможность ориентации длинной оси эллипсоида белковой глобулы параллельно и перпендикулярно межфазной поверхности при сохранении компактной структуры макромолекулы. При увеличении рН происходит рост адсорбции лизоцима [66] с достижением максимального значения в изоэлектрической точке при рН 11.

Взаимодействия белка и ПАВ может по-разному влиять на поверхностное натяжение растворов. При заметном связывании белка и ПАВ, происходящем, в основном, за счет сильных взаимодействий (электростатических, образования водородных связей) между полярными группами белка и ПАВ может образовываться комплекс белок – ПАВ, обладающий большей поверхностной активностью, чем белок или ПАВ по отдельности. Такой тип поведения наблюдали для системы BSA – Tween 80: в области малых концентраций поверхностное натяжение смеси сильнее убывает с ростом концентрации ПАВ, чем поверхностное натяжение индивидуального Tween 80 [67]. Полагают, что на границе вода/воздух адсорбируется гидрофобный комплекс, образующегося за счет водородных связей между оксиэтиленовой цепью ПАВ и триптофановыми остатками белка, а также с находящимися в непосредственной близости от них амидными группами. После начального падения поверхностного натяжения начинается область плато, на котором поверхностное натяжение не меняется с ростом концентрации ПАВ. По аналогии с растворами полимер – ПАВ, концентрацию, отвечающую началу плато, относят к ККА, и считают, что в области плато происходит ассоциация белка и ПАВ в растворе. При этом связывание белка с ПАВ происходит не только за счет образования водородных связей, но и за счет гидрофобных взаимодействий. При гидро-

фобных взаимодействиях углеводородные цепи ПАВ взаимодействуют с неполярными участками макромолекулы белка, и образуются ассоциаты более гидрофильные, чем нативные белки. Эти ассоциаты не обладают повышенной поверхностной активностью и остаются в водном растворе. После окончания процесса ассоциирования, когда в растворе опять появляются свободные молекулы ПАВ, происходит дальнейшее снижение поверхностного натяжения до значений, соответствующих поверхностному натяжению чистого ПАВ. В избытке ПАВ происходит вытеснение комплексов белок – ПАВ с поверхности, и поверхностный слой заполняется молекулами ПАВ.

В [11] проведен анализ изотерм поверхностного натяжения смесей BSA – SDS, дополненный данными метода малоуглового рассеяния X-лучей. Полученные изотермы имеют два излома при ККА и КKM. При концентрациях ПАВ ниже ККА не происходит изменения структуры белка. После ККА наблюдается кооперативное связывание BSA и SDS, приводящее к разворачиванию белковой глобулы и формированию комплекса по типу «жемчужного ожерелья», о чем свидетельствует увеличение радиуса инерции макромолекулы белка.

При сопоставлении результатов измерения межфазного натяжения и адсорбции методом малоуглового рассеяния нейтронов смеси Lz – SDS было установлено образование гидрофобного комплекса со стехиометрией ПАВ:белок = 7:1 (при  $C_{SDS} \leq 0,2$  мМ) и гидрофильного комплекса состава 25:1 при больших концентрациях ПАВ [68].

Изотермы поверхностного натяжения с плато в области средних концентраций ПАВ получены для системы Gn – SDS. В случае неионогенного ПАВ (Тритон X-100) добавки Gn не оказывают существенного влияния на величины поверхностного натяжения [1].

В ряде случаев добавки белка не приводят к появлению плато на изотермах поверхностного натяжения, однако изотермы сдвигаются в область более низких концентраций ПАВ, что также указывает на взаимодействие белка с ПАВ. Такие зависимости были получены для смесей Тритон X-100 с BSA, Lz с  $C_{12E_5}$  [69]. Для таких систем получено, что в области малых концентраций ПАВ поверхностное

натяжение остается таким же, как в растворах белка, а при больших концентрациях – совпадает с натяжением чистого ПАВ. Методом отражения нейтронов подтверждено, что при малых концентрациях ПАВ в адсорбционном слое содержится белок, при средних концентрациях – смесь белок – ПАВ, при высоких – ПАВ. Показано, что неионогенные ПАВ вызывают частичное разрушение нативной структуры белка.

Иногда, для растворов смесей противоположно заряженных белка и ПАВ, изотермы поверхностного натяжения имеют более сложный вид: на изотермах наблюдается локальный максимум [68]. Рост натяжения растворов смесей Lz – SDS вблизи максимума связывают с гидрофилизацией гидрофобного комплекса белок – ПАВ и оттеснением его с поверхности. При этом адсорбция свободного SDS недостаточна для снижения поверхностного натяжения. Аналогичные экстремумы на изотермах поверхностного натяжения получены для смесей ионогенных ПАВ с противоположно заряженными полимерами [70 – 74]. Во всех работах вид изотерм объясняют одинаково: первоначальное снижение натяжения за счет адсорбции гидрофобного комплекса полимер – ПАВ, последующий рост натяжения при формировании гидрофильного комплекса и десорбции образующихся агрегатов полимер – ПАВ и, наконец, повторное снижение натяжения при адсорбции ПАВ. Изучение адсорбции смеси SDS с полидиметилдиаллиламмоний хлоридом (poly-dmdaac) [70] и SDS с полиэтиленимином [71] методом нейтронного рассеяния показало вытеснение комплекса полимер – ПАВ из адсорбционного слоя, что приводит к увеличению поверхностного натяжения. Образование осадка в системе SDS – poly-dmdaac также может являться одной из причин возникновения максимума на изотерме поверхностного натяжения. Вытеснение комплекса полилизин – SDS и рост поверхностного натяжения связывают с формированием более растворимого комплекса полипептида с мицеллами ПАВ [72]. Аналогичное явление наблюдалось в смеси полистиролсульфоната натрия с алкилтриметиламмоний бромидами [73]. В работе [74] предложена математическая модель, описывающая изотермы поверхностного натяжения с максимумом, которая учитывает формирование комплексов полимера с мономерами и мицеллами ПАВ.

Поведение смесей белок – ПАВ на границе водный раствор/воздух подробно изучали Р. Миллер, В.Б. Файнерман и др. [63, 75 – 86]. Ими была предложена теоретическая модель, описывающая адсорбцию ПАВ [75], белка [81, 82] и смесей белок – ПАВ [17, 63, 76, 77], которая учитывает значительное различие между площадью, занимаемой молекулами белка и ПАВ в адсорбционном слое, а также наличие заряда на молекуле белка и возможное агрегирование на поверхности. В основе модели лежит уравнение двумерного давления Фрумкина, в котором учтены площадь, занимаемая молекулой адсорбированного вещества в насыщенном слое, а также парные взаимодействия между молекулами в адсорбционном слое. Для адсорбционных слоев ионогенных ПАВ изотермы двумерного давления и адсорбции имеют вид [75, 78]:

$$-\frac{\Pi\omega_s}{2RT} = \ln(1 - \theta_s) + a_s\theta_s^2 \quad (1-1),$$

$$b_s(c_s c_c)^{1/2} = \frac{\theta_s}{1 - \theta_s} \exp\{-2a_s\theta_s\} \quad (1-2),$$

где  $\Pi = \sigma_0 - \sigma$  – двумерное давление, Н/м,  $\omega_s$  – площадь, занимаемая молекулами ПАВ в насыщенном адсорбционном слое, м<sup>2</sup>/моль,  $\theta_s = \Gamma\omega$  – степень заполнения поверхности молекулами ПАВ,  $c_c$  – концентрация добавленного электролита, М,  $a_s$  – двумерный аналог константы  $a$  в уравнении Ван-дер-Ваальса, характеризует притяжение молекул ПАВ между собой,  $b_s$  – константа адсорбционного равновесия, л/моль.

При адсорбции белка площадь, занимаемая молекулами вещества в насыщенном адсорбционном слое, может меняться от минимального значения  $\omega_{min}$ , соответствующего перпендикулярной ориентации большой оси белковой глобулы относительно поверхности, до максимального  $\omega_{max}$ , соответствующего параллельной ориентации. Величины  $\omega_{min}$  и  $\omega_{max}$  можно рассчитать, исходя из размеров белковой глобулы при ее различной ориентации на поверхности. Согласно модели Файнермана, для  $i$ -го состояния площадь, занимаемая молекулой белка, определяется как

$$\omega_i = \omega_{min} + (i - 1)\omega_0 \quad (1-3),$$

где  $\omega_0$  – площадь, занимаемая молекулой растворителя.

Изотерма двумерного давления и адсорбции раствора индивидуального белка описывается уравнениями (1-4) и (1-5) [81].

$$-\frac{P\omega_0}{RT} = \ln(1 - \theta_p) + \left(1 - \frac{\omega}{\omega_0}\right) \theta_p + a_p \theta_p^2 \quad (1-4),$$

$$b_p c_p = \frac{\theta_p}{(1-\theta_p) \frac{\omega_i}{\omega}} \exp\left\{-2a_p \left(\frac{\omega_i}{\omega}\right) \theta_p\right\} \quad (1-5),$$

где  $\omega$  – средняя площадь, занимаемая молекулой белка в насыщенном адсорбционном слое,  $\theta_p = \Gamma\omega$  – степень заполнения поверхности молекулами белка,  $a_p$  – параметр взаимодействия между молекулами белка,  $b_p$  – константа адсорбционного равновесия.

При адсорбции смеси белок – ПАВ в поверхностном слое присутствуют молекулы ПАВ, а также комплексы белок – ПАВ. В этом случае уравнение двумерного состояния и изотермы адсорбции ПАВ и комплексов белок – ПАВ для смеси белка с ионогенным ПАВ описываются следующим образом:

$$-\frac{P\omega_0}{RT} = \ln(1 - \theta_{ps} - \theta_s) + \left(1 - \frac{\omega}{\omega_0}\right) \theta_{ps} + a_{ps} \theta_{ps}^2 + a_s \theta_s^2 + 2a_{sps} \theta_{ps} \theta_s \quad (1-6),$$

$$b_s (c_s c_c)^{1/2} = \frac{\theta_s}{1-\theta_{ps}-\theta_s} \exp\{-2a_s \theta_s - 2a_{sps} \theta_{ps}\} \quad (1-7),$$

$$b_{ps} (c_p^m c_s)^{1/(1+m)} = \frac{\theta_{ps}}{(1-\theta_{ps}-\theta_s) \frac{\omega_i}{\omega}} \exp\left\{-2a_{ps} \frac{\omega_i}{\omega} \theta_{ps} - 2a_{sps} \theta_{ps}\right\} \quad (1-8),$$

где  $a_s$  – параметр взаимодействия между молекулами ПАВ,  $a_{ps}$  – между комплексами белок – ПАВ,  $a_{sps}$  – между молекулами ПАВ и комплексами белок – ПАВ,  $\theta_s$  – степень заполнения поверхности молекулами ПАВ,  $\theta_{ps}$  – комплексами белок – ПАВ,  $m$  – заряд белка.

Теоретические и экспериментальные зависимости хорошо согласуются для смесей HSA и C<sub>10</sub>DMPO [76, 77]. Предложенная теоретическая модель удовлетворительно описывает изотермы поверхностного натяжения и адсорбции для смесей HSA – СТАВ и  $\beta$ -LG – SDS [78]. У смесей, как правило, начальные значения поверхностного натяжения ниже, чем у индивидуальных ПАВ, что говорит о специфическом связывании ПАВ с белками, а при больших концентрациях изотермы для ПАВ в присутствии и в отсутствие белка совпадают.



Экспериментальный и теоретический подходы в изучении адсорбции  $\beta$ -лактоглобулина в присутствии катионных ПАВ бромидов алкилтриметиламмония с длиной углеводородной цепи  $C_{10} - C_{16}$  [17] позволили прояснить ситуацию с образованием и адсорбцией гидрофобного комплекса. Полагают, что в смесях белка с  $C_{10}$ ТАВ и  $C_{12}$ ТАВ происходит конкурентная адсорбция, несмотря на образование гидрофобного комплекса при низких концентрациях ПАВ и гидрофильного при более высоких концентрациях ПАВ. Для смесей белка с  $C_{14}$ ТАВ и  $C_{16}$ ТАВ получено, что после того, как заряд белка был полностью нейтрализован вследствие взаимодействия с молекулами ПАВ, система ведет себя как смесь белок – неионогенное ПАВ, в которой реализуются гидрофобные взаимодействия между комплексом белок – ПАВ и ПАВ. Дальнейшее увеличение концентрации ПАВ приводит к образованию гидрофильного комплекса, который вытесняется с межфазной границы в водный раствор.

На основании анализа профиля пузырька и капли были получены изотермы поверхностного натяжения без плато для смеси Lz –  $C_{10}$ DMPO и с плато для Lz – SDS [79]. Изучение адсорбции методом эллипсометрии выявило конкурентную адсорбцию в смеси с  $C_{10}$ DMPO, в результате которой белок вытесняется из слоя при увеличении концентрации ПАВ. Для смеси с SDS наблюдается рост совместной адсорбции, что связывают с образованием гидрофобного комплекса Lz – SDS, который при увеличении добавок ПАВ гидрофилизуется и оттесняется в раствор [83]. При достижении ККМ поверхностное натяжение определяется молекулами ПАВ.

Изучение адсорбции смесей  $\beta$ -LG –  $C_{10}$ DMPO,  $\beta$ -казеин ( $\beta$ -Cs) –  $C_{10}$ DMPO и  $\beta$ -Cs –  $C_{12}$ DMPO на границе вода/воздух [84] показало, что увеличение длины цепи ПАВ приводит к более эффективному вытеснению  $\beta$ -Cs из слоя. С ростом концентрации ПАВ происходит утолщение диффузного поверхностного слоя до тех пор, пока белок полностью не десорбируется с поверхности. Полученный результат объясняют взаимодействием белка и ПАВ по гидрофобному механизму, приводящим к разворачиванию белковой глобулы и постепенной гидрофиллизации белка. Подобный эффект наблюдается и для смесей с  $\beta$ -LG, но при более высоких

концентрациях ПАВ, что объясняют более жесткой структурой  $\beta$ -LG. Поведение смеси  $\beta$ -LG –  $C_{10}$ DMPO было описано в рамках модели белок – неионогенное ПАВ [85]. Модель конкурентного вытеснения HSA под действием  $C_{10}$ DMPO была предложена в [86].

Методом рассеяния нейтронов было установлено, что взаимодействие гидрофобина (HFB) и полиоксиэтилен сорбитан моностеаратов с различной длиной полиоксиэтиленовой цепи приводит к формированию самоорганизованных структур на границе вода/воздух, имеющих ярко выраженное слоистое строение [87]. Межмолекулярные взаимодействия включают как электростатическое, так и гидрофобное связывание белка и ПАВ. Варьирование длины полиоксиэтиленовой цепи ПАВ приводит к изменениям в структуре слоев. Показано, что смешанные слои устойчивы при длине цепи 6 – 17 оксиэтиленовых групп. При большем или меньшем числе групп образуется монослой ПАВ или белка, соответственно.

Измерения поверхностного натяжения в некоторых работах [79, 88, 89] дополнены исследованием поверхностной реологии. Изучение реологии позволяет сделать выводы о составе и структуре адсорбционных слоев на различных межфазных поверхностях, а также выявить конформационные изменения в структуре белков. При проведении динамических испытаний было установлено, что на значение модулей упругости влияют жесткость белка и величина межфазное натяжение [90]. В работе [79] измерена дилатационная вязкость систем  $Lz$  –  $C_{10}$ DMPO и  $Lz$  – SDS, что позволило определить модуль упругости и поверхностную вязкость адсорбционного слоя. Найдено, что при некоторых концентрациях SDS модуль упругости смеси превышает соответствующий модуль для индивидуального лизоцима. В целом модули упругости при добавлении ПАВ уменьшаются, что отражает уменьшение содержания белка в поверхностном слое. В работе [89] проведен анализ литературы по изучению реологии адсорбционных слоев белков и белков с ПАВ на границе жидкость/газ и жидкость/жидкость с помощью прямых и косвенных методов. Косвенные методы подразумевают измерение скоростей течения с помощью капиллярных и ротационных вискозиметров. К прямым относится измерение деформации, возникающего при приложении сдвигового напря-

жения к поверхности. В обзоре рассмотрено устройство и принцип работы некоторых реометров, собраны результаты исследований по каждому методу.

Слои  $\beta$ -Cs обладают упругими свойствами, при концентрации свыше 0,005% белок образует двумерный поверхностный гель [91]. Слои термически модифицированного  $\beta$ -Cs, содержащего волокна неразвернутых мономеров и гидролизированных пептидов, обладают более упругими свойствами, чем исходный  $\beta$ -Cs [92]. Наличие неполярной фазы – органической жидкости, контактирующей с водным раствором, – усиливает разворачивание белка на межфазной границе, что приводит к увеличению дилатационных модулей упругости [93]. В работе [94] установлено наличие двух вкладов в значения дилатационных модулей: вклад, связанный с внутренней структурной устойчивостью мономера, и вклад, относящийся к конформационным изменениям, происходящим при адсорбции на поверхности и приводящим к образованию сеток из молекул белка (так называемого поверхностного геля). Первый вклад наиболее важен, поскольку он объясняет, почему слои глобулярных белков с жесткой структурой, таких как BSA, более эластичны, чем слои белков с более гибкой структурой, таких как  $\beta$ -Cs. При сжатии молекулы BSA ведут себя как твердые сферы, сопротивляющиеся сжатию, что приводит к более высоким значениям модуля накопления. Гибкие белки реагируют как мягкие сферы, и, как следствие, значения модуля накопления более низкие.

Слои BSA на границе вода/воздух обладают вязкоупругим поведением, близким к упругому [95]. В адсорбционных слоях BSA [96] и Lz [97] увеличение ионной силы раствора приводит к уменьшению электростатического отталкивания и увеличению модулей упругости. При увеличении pH раствора уменьшается поверхностный заряд таких белков как Lz и каталаза, что приводит к росту адсорбции за счет снижения электростатического отталкивания. При достижении изоэлектрической точки белков наблюдался максимум на зависимости модуля упругости от pH среды [98].

Добавки ПАВ могут влиять на вторичную и третичную структуру белка. Малые добавки DTAB к растворам BSA и  $\beta$ -LG приводят к формированию гид-

рофобных комплексов [99]. Рост концентрации ДТАВ приводит к разрушению вторичной и третичной структуры белков в слое, о чем свидетельствуют экстремальные зависимости  $E(\pi)$  и  $E(t)$  ( $E$  – модуль упругости,  $\pi$  – двумерное давление,  $t$  – время). При этом происходит увеличение гибкости белковых макромолекул, образование петель и цепей. Добавки SDS не приводят к заметному разрушению вторичной структуры белка, на что указывают монотонные зависимости  $E(\pi)$  при всех концентрациях ПАВ. Уменьшение модулей упругости при увеличении концентрации ПАВ связывают с разворачиванием белка в слое. Добавки NaCl усиливают гидрофобные взаимодействия белка и ПАВ и приводят к сильному нарушению вторичной структуры белка. В этих условиях зависимости  $E(\pi)$  проходят через максимум.

При изучении смеси  $\beta$ -Cs с неионогенным ПАВ  $C_{12}DMPO$  и катионным ДТАВ было установлено, что белок вытесняется из адсорбционного слоя, о чем свидетельствуют данные адсорбции и уменьшение дилатационных модулей [100, 101].  $C_{12}DMPO$  вытесняет белок более эффективно, чем ДТАВ, благодаря большей поверхностной активности. Показаны различия видов зависимостей модулей упругости от концентрации ПАВ при различных частотах, которые вызваны изменениями в структуре белка и в характере взаимодействия белка с ПАВ (вкладом электростатических и гидрофобных взаимодействий). Для смеси  $\beta$ -Cs –  $C_{12}DMPO$  не обнаружено различий при одновременной (из одного раствора) и последовательной (из двух) адсорбции компонентов смеси [102]. В случае смеси с ДТАВ слои в большей степени заполнены белком при одновременной адсорбции, и ПАВ при последовательной. При низких концентрациях ПАВ значения модулей упругости и вязкости выше в смеси  $\beta$ -Cs –  $C_{12}DMPO$ , что говорит о более сильном взаимодействии белка с неионогенным ПАВ, чем с ДТАВ.

Неполярная жидкость, контактирующая с водным раствором, заметно влияет на поведение смесей белок – ПАВ. Адсорбция смеси  $\beta$ -LG – SDS на границах вода/воздух и вода/гексан изучена в [103]. Значения рассчитанных параметров взаимодействия указывают на формирование комплексов белок – ПАВ на границе с гексаном, в то время как на границе с воздухом происходит постепенное вытес-

нение  $\beta$ -LG из слоя. Комплексы гидрофобны и в большей степени находятся в гексане, чем в воде. Вытеснение белка с поверхности вода/гексан происходит только при большом избытке SDS. При взаимодействии  $\beta$ -LG и катионных ПАВ ТТАВ и СТАВ в системе вода/гексан также было установлено формирование гидрофобного комплекса за счет электростатических взаимодействий, который вытесняется с поверхности молекулами ПАВ при достижении ККМ [104]. Образование и вытеснение комплексов  $\beta$ -Cs с DTAB и SDS наблюдалось как на границе с гептаном, так и с воздухом [105].  $\beta$ -Cs имеет высокое сродство к неполярной фазе, что приводит к его разворачиванию на поверхности вода/тетрадекан [93]. В работе [18] дан обзор результатов о влиянии образования гидрофобных и гидрофильных комплексов белков с ПАВ на реологию, межфазное натяжение, толщину адсорбционного слоя.

Образование поверхностных сеток  $\beta$ -Cs на границе вода/органическая жидкость отмечено в [106]. Конкуренное вытеснение белка из адсорбционного слоя под действием неионогенного ПАВ Tween 20 происходит при существенно больших концентрациях ПАВ, чем в системе вода/воздух. В случае жесткого белка  $\beta$ -LG не выявлено значительных различий в механизме вытеснения белка в обеих системах.

Экстракция лизоцима из водного раствора в изооктан при помощи АОТ описана в [107]. Перенос Lz из воды в органическую фазу возможен как за счет солюбилизации в обратных мицеллах, так и за счет электростатического связывания положительно заряженного белка и анионным ПАВ. Увеличение ионной силы в значительной степени снижало экстракцию. Процесс переноса контролируется только диффузией через межфазную поверхность.

Формирование смешанных адсорбционных слоев белок – ПАВ на твердой поверхности является сложным процессом, который зависит не только от типа поверхности, но и от характера взаимодействия и природы компонентов смеси, локального микроокружения, концентрации и состава смесей и т.д. [108]. Изменение рН среды влияет на заряд белка и, как следствие, на электростатическое отталкивание в слое [109 – 111]. В большинстве случаев добавки ПАВ приводят к

вытеснению белка с твердой поверхности. Данный процесс, как правило, описывается двумя механизмами: механизм «солюбилизации» за счет образования комплексов белок – ПАВ, или механизм конкурентной адсорбции ПАВ [112]. Последовательное или одновременное добавление компонентов влияет на результат адсорбции, что связано с различием структуры и состава образуемых в воде комплексов, конформацией белка и диффузией к твердой поверхности.

Изучение адсорбции смесей белок – ПАВ на твердой поверхности является важной задачей промышленности при очистке твердых поверхностей от белков [113] и стабилизации высокодисперсных суспензий твердых частиц [114, 115]. Возможность очистки контактных линз от лизоцима, инсулина и альбумина с помощью лецитина описана в [116]. В некоторых системах, напротив, присутствие ПАВ способствует адсорбции белков. В работе [117] отмечено, что изолят сывороточного протеина (WPI) не способен эффективно адсорбироваться на гидрофобной поверхности арахиса, однако, добавки ПАВ Span 20 увеличивают покрытие белком до 88 – 95% за счет образования самоорганизованных структур на поверхности арахиса. Увеличение адсорбции белка в присутствии ПАВ также наблюдали при исследовании адсорбции смеси овальбумина и SDS на магнезите [118]. Данный эффект объясняют формированием кластеров на твердой поверхности за счет электростатического связывания белка и ПАВ.

Лизоцим необратимо адсорбируется на оксиде кремния за счет электростатического притяжения к отрицательно заряженной поверхности [119]. Изменение концентрации белка, ионной силы и pH раствора может приводить к переориентации белка за счет изменения поверхностного заряда белковой глобулы и, как следствие, к изменению сил притяжения белка к поверхности и сил отталкивания между макромолекулами белка. Добавление DTAB приводит к оттеснению белка, которое сопровождается очень низкой адсорбцией ПАВ на твердой поверхности, что указывает на образование высокорастворимых комплексов Lz – DTAB [120]. В случае смеси Lz – SDS малые добавки ПАВ приводят к набуханию слоя за счет связывания Lz с SDS и частичной его денатурации [121]. Вытеснение белка с твердой поверхности происходит при достижении ККМ. Аналогичное поведение

наблюдалось и для смеси BSA – SDS [122, 123]. Удаление белка с гидрофильной поверхности за счет формирования комплексов с ПАВ описано для смесей гидрофобин (HFB) – SDS и HFB – СТАВ [124]. С гидрофобной поверхности белок удалялся только мицеллярными растворами ионогенных ПАВ. Отмечено, что неионогенный  $C_{12}E_6$  не влияет на адсорбцию белка на гидрофобной поверхности.

Лизоцим необратимо адсорбируется на поверхности слюды за счет электростатического притяжения, что приводит к нейтрализации поверхностного заряда [125, 126]. Малые добавки SDS не вызывают изменения адсорбции белка. При концентрации ПАВ свыше 4 мМ, SDS начинает связываться с белком, вызывая его денатурацию, что приводит к оттеснению Lz с поверхности и уменьшению толщины адсорбционного слоя. При достижении ККМ белок полностью десорбируется [125]. Однако, в [126] не обнаружено заметной десорбции Lz в присутствии SDS. Только вблизи ККМ наблюдается незначительная десорбция белка из внешних областей адсорбционного слоя.

При изучении адсорбции смеси  $\beta$ -LG – Tween 20 на графите установлено, что при малой концентрации молекулы ПАВ образуют «зародыши» доменов с белковой сеткой на поверхности [127]. Эти домены расширяются при увеличении концентрации ПАВ, что приводит к оттеснению  $\beta$ -LG от поверхности и, как следствие, утолщению белковой сетки. При достижении достаточно высокой концентрации Tween 20 происходит полное вытеснение белка с поверхности.

### **1.3. Использование метода радиоактивных индикаторов для изучения адсорбции белков и ПАВ**

Применение радиоактивных индикаторов может дать полезную информацию о количественных характеристиках адсорбции белков и ПАВ на границе жидкость/жидкость и об их распределении между двумя несмешивающимися жидкостями. Исследования основаны на введении веществ, меченных радиоактивными изотопами, в двухфазную систему водный раствор/органическая фаза. Благодаря своим ядерно-физическим характеристикам, наиболее удобным является

ся применение  $\beta$ -излучателей:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  и  $^{35}\text{S}$ . Если органическая фаза способна преобразовывать энергию  $\beta$ -частиц в кванты видимого света (сцинтиллировать), то возможна регистрация излучения меченого компонента в объеме органической фазы и из адсорбционного слоя вблизи межфазной границы. Толщина адсорбционного слоя ограничена максимальным пробегом излучения в конденсированной фазе. Ядерно-физические свойства трития таковы, что 50 % частиц поглощается в слое воды толщиной 0,3 – 0,4 мкм, 80 % частиц – в слое 1 мкм, максимальный пробег  $\beta$ -частиц трития в веществе составляет 1,5 – 1,7 мкм [128, 129]. Глубина зоны регистрации для  $^{14}\text{C}$  и  $^{35}\text{S}$  составляет порядка 10 – 30 мкм [130 – 132].

В работах [133, 134] меченные  $^{14}\text{C}$   $\beta$ -казеин и  $\alpha_s$ -казеин использовали для изучения конкурентной адсорбции смесей на границе вода/триолеин. Авторами статьи было показано, что хотя адсорбция из индивидуального раствора  $\beta$ -казеина на границе вода/триолеин существенно ниже, чем адсорбция  $\alpha_s$ -казеина, при адсорбции смеси с мольным соотношением 1:1, в поверхностном слое соотношение  $\beta$ -Cs: $\alpha_s$ -Cs составляет 2:1. Установлено, что равновесный состав адсорбционных слоев при различных соотношениях концентраций белков в водной смеси не согласуется с моделью Ленгмюра. Отклонение от идеального поведения связано с термодинамической несовместимостью смешения этих казеинов на межфазной границе.  $\beta$ -казеин способен вытеснять  $\alpha_s$ -казеин из разреженного слоя, но не может этого сделать из насыщенного адсорбционного слоя, и наоборот.

Изучение адсорбции в системе вода/триолеин целого ряда  $^{14}\text{C}$ -белков: BSA,  $\beta$ -лактальбумина,  $\alpha$ -лактоглобулина, овальбумина, Lz,  $\beta$ -химотрипсина и пепсина было проведено в работах [135, 136]. Показано, что адсорбция белков на межфазной границе не просто диффузионно-контролируемый процесс, но и сильно зависит от энергетики взаимодействия белков с поверхностью. Так, для положительно заряженных белков адсорбция определяется энергетическим барьером, в то время как для отрицательно заряженных белков лимитирующей стадией оказывается диффузия вещества к поверхности. Авторами работ [130,131] показано, что в области низких поверхностных концентраций энергия активации адсорбции равна нулю, а скорость адсорбции определяется процессами диффузии. В области кон-



центраций, соответствующих насыщенному слою, энергия активации отлична от нуля, и скорость процесса определяется способностью белка проникать в существующий слой и переорганизовываться на поверхности.

С помощью радиоактивных индикаторов можно изучать адсорбцию не только белков, но и ПАВ. Так, в [137] концентрацию меченых  $^{14}\text{C}$ -ПАВ и  $^{14}\text{C}$ -ацетил-производных белков на границе раздела фаз толуол/вода определяли по  $\beta$ -излучению, вызывающему сцинтилляции в органической фазе, представляющий собой раствор поверхностно-инактивного сцинтиллятора в толуоле.

В качестве метки вместо  $^{14}\text{C}$  возможно использование трития  $^3\text{H}$ . Тритий имеет ряд преимуществ по сравнению с углеродом  $^{14}\text{C}$ . Период полураспада трития (12,262 года) достаточно велик для проведения экспериментов практически любой продолжительности. Малая энергия  $\beta$ -частиц трития ( $E_{\max} = 18,6$  кэВ) определяет низкую радиотоксичность тритий-содержащих препаратов, позволяет работать с относительно большим количеством изотопа по радиоактивности без специальных мер защиты. Развитие метода и установок жидкостного сцинтилляционного счета позволяет регистрировать тритий с эффективностью до 60%. Замена одного атома водорода на тритий дает препарат с молярной радиоактивностью ( $A_{mol}$ ) 29,12 Ки/ммоль. Использование таких препаратов и современных сцинтилляционных счетчиков трития позволяет зарегистрировать менее  $10^{-14}$  моля меченого соединения [138]. Меньший пробег  $\beta$ -излучения трития позволяет проводить наблюдения за явлениями, развивающихся в более тонких поверхностных слоях (1 мкм) по сравнению с  $^{14}\text{C}$  (30 мкм) [137, 139].

В [140, 141] метод сцинтиллирующей фазы с использованием меченных тритием веществ, по-видимому, впервые использовали для изучения адсорбции BSA на границе вода/толуол. Позднее данная методика была применена для изучения влияния хлоридов щелочных металлов (лития, натрия, калия, цезия) на распределение BSA между водной фазой, межфазным слоем и толуолом в широком диапазоне концентраций белка [142]. Было показано, что соли, как правило, увеличивают относительное содержание белка в межфазном слое и снижают его относительное содержание в углеводородной фазе.

Метод сцинтиллирующей фазы активно применяется лабораторией радионуклидов и меченых соединений кафедры радиохимии МГУ им. Ломоносова [3, 143 – 146]. Данным методом исследована как кинетика адсорбции, так и равновесные значения адсорбции веществ самой разной природы на границе раздела органическая (сцинтиллирующая) фаза/водный раствор, а также определены коэффициенты распределения веществ в двухфазных системах. Метод сцинтиллирующей фазы был использован для исследования распределения между фазами альфа-аминокислот с неразветвленной углеводородной цепью: аланина, норвалина и норлейцина, для изучения гидрофобности и поверхностно-активных свойств гуминовых и фульвокислот, адсорбции ПАВ разной природы [3] и глобулярных белков [4, 5] на границе жидкость/жидкость.

При изучении адсорбции катионных ПАВ бромидов додецил-, тетрадецил- и гексадецилтриметиламмония на границах вода/толуол и вода/октан с сцинтиллирующими добавками (нафталин и 1,2-дифенилоксазол) получено, что адсорбция и коэффициент распределения ( $D$ ) на границе с алканом ниже, чем на границе с ароматом [147]. Найдено, что при концентрации ПАВ выше 0,1 ККМ экспериментально определенная адсорбция превышает величину, рассчитанную по уравнению Гиббса. Увеличение количества вещества на межфазной границе при концентрации больше ККМ может быть вызвано образованием промежуточной микроэмульсионной фазы. При изучении адсорбции СТАВ и ТТАВ на границах вода/толуол, вода/параксилол и вода/циклогексан методом сцинтиллирующей фазы [148] было показано, что природа органической фазы влияет на адсорбцию ПАВ, катионные ПАВ лучше адсорбируются на границе с ароматической жидкостью. При изучении адсорбции СТАВ и гуминовых кислот угля в системе вода/толуол [149] была обсуждена возможность использования двух экспериментальных подходов для определения поверхностной активности и гидрофобности органических соединений и для изучения проницаемости межфазных слоев, основанных на изучении двухфазной и капельной систем. Показано преимущество двухфазной системы.

Образование межфазных структур, содержащих в составе молекулы ПАВ, воды и органической фазы, характерны для плуроников L64 и F68 на межфазной поверхности вода/гексан [143]. Полагают, что образованию подобных структур в системах вода/алкан способствовал присутствовавший в системе нафталин.

Изучение адсорбции индивидуальных ПАВ SDS и DTAB на границе вода/п-ксилол и вода/октан показало невозможность корректного определения адсорбции при концентрациях выше ККМ, что связано с образованием микроэмульсии вблизи межфазной поверхности [150]. Различие в изотермах адсорбции каждого ПАВ на разных границах указывает на сильное влияние органической фазы на его адсорбцию.

В [4] методом сцинтиллирующей фазы изучено влияние природы органической фазы на  $D$  и адсорбцию лизоцима. Показано, что величины  $D$  увеличиваются в ряду октан < п-ксилол < октанол. Установлен полимолекулярный характер адсорбции лизоцима на границе жидкость/жидкость.

Большим достоинством метода сцинтиллирующей фазы является возможность изучения адсорбции из смешанных растворов. Поочередное введение метки в компоненты смеси позволяет изучить адсорбцию каждого компонента из смеси, определить суммарную адсорбцию и состав смешанного адсорбционного слоя. Методом сцинтиллирующей фазы с использованием меченных тритием ПАВ изучено поведение смесей плуроника P123 и бромида тетрадецилтриметиламмония в системе вода/п-ксилол [151]. Показано, что слои обогащены более поверхностно-активным компонентом P123.

При добавлении SDS и DTAB к раствору Lz происходит оттеснение белка с поверхности вода/п-ксилол в органическую фазу в виде гидрофобного комплекса [152]. Рассчитанные параметры взаимодействия указывают на формирование комплексов с неполным погашением заряда, что приводит к электростатическому отталкиванию между комплексами и молекулами DTAB в слое и притяжению между комплексами и SDS.

С помощью радиохимического подхода были изучены смеси HSA – DTAB и HSA – SDS в системе вода/параксилол в области низких концентраций ПАВ (до

$10^{-6}$  М) [5]. Найдено, что полное связывание катионного ПАВ с отрицательно заряженным белком препятствует свободному переходу ПАВ из водной фазы в органическую. В работе впервые показано, что в системе одноименно заряженных белка и ПАВ не происходит конкурентного замещения веществ в адсорбционном слое и в органической фазе. Белок занимает «свободные места» в разреженном адсорбционном слое SDS.

Введение радиоактивной  $I^{125}$ -метки в молекулы белков в ряде работ позволило изучить кинетику адсорбции и структуру слоев на твердой поверхности. Так было изучено поведение фибриногена [153], альбумина, иммуноглобулина [154], аро- $\alpha$ -лактальбумина [155], рибонуклеазы [156] и HSA [157] на твердых поверхностях различной степени гидрофобности. Выявлены структурные изменения в макромолекуле белка при адсорбции.

#### **1.4. Стабилизация эмульсий, пен и пенных пленок смесями белок – ПАВ.**

Способность смесей белок – ПАВ к формированию слоев, обладающих механической прочностью, на границах водный раствор/воздух и водный раствор/органическая жидкость способствует их использованию в качестве стабилизаторов пенных и эмульсионных пленок. Пены и эмульсии, стабилизированные смесями белок – ПАВ используются, например, в пожаротушении [158 – 161], при разработке моющих композиций и косметических препаратов [162 – 165], в пищевой промышленности [164, 166 – 170], в частности, при производстве молочной продукции [171, 172], и других областях.

В работе [80] было изучено формирование и измерена толщина тонких пенных пленок, стабилизированных смесями Lz –  $C_{10}DMPO$  и Lz – SDS, методом интерферометрии на приборе Эксеровой-Шелудко. Показано, что в области малых концентраций ПАВ, когда адсорбционный слой практически полностью занят белком, лизоцим не способен образовывать стабильные пленки. Однако, при увеличении концентрации ПАВ наблюдалось формирование черных ньютоновских пленок. В работе была показана корреляция между изотермами поверхностного

натяжения, формированием черных пленок и стабилизацией пен смесью белок – ПАВ.

При изучении структурных изменений овальбумина (OVA), овотрансферина (OVT) и лизоцима в пенах получено, что в OVA происходят конформационные изменения, приводящие к полимеризации вследствие образования межмолекулярных дисульфидных связей [173]. OVT при контакте с поверхностью вода/воздух претерпевает значительные изменения в структуре, приводящие к увеличению гидрофобности белка. Лизоцим, напротив, не подвергается изменениям в структуре.

Увеличение ионной силы раствора увеличивает плотность пены, стабилизированной Lz [166]. Экранирование заряда приводит к уменьшению электростатического отталкивания молекул белка в слое и, как следствие, к росту адсорбции. Лизоцим в нативной форме не образует прочные межмолекулярные связи, необходимые для создания стабильной пены. При pH 3 белок не образует пены, что связано с сильным электростатическим отталкиванием в слое и увеличением растворимости лизоцима в растворе. Добавки Lz не позволяют восстановить пенообразующую способность шампанских вин после обработки бентонитом и углём [174].

Неионогенное ПАВ Tween 20 снижает стабильность пен, образованных  $\beta$ -казеином и смесью  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  и  $\kappa$ -казеинов за счет вытеснения белка молекулами ПАВ из слоя [175]. Устойчивость пен сопоставлена с изотермами поверхностного натяжения. В случае смеси казеинов при концентрации добавленного ПАВ выше ККА устойчивость пен начинает увеличиваться, что связано с агрегированием белка и ПАВ в слое. Показано, что чем толще адсорбционный слой, тем более устойчива пена. Совпадение ККМ ПАВ в случае раствора индивидуального ПАВ и смеси с  $\beta$ -Cs говорит о том, что комплекс  $\beta$ -Cs – Tween 20 не образуется [176]. Устойчивость пленок, стабилизированных смесями, совпадает с устойчивостью белковых пленок при малых концентрациях ПАВ и с устойчивостью пленок, стабилизированных Tween 20, при достижении ККМ.

В отсутствие Tween 20 эмульсии, стабилизированные WPI вблизи его изоэлектрической точки, склонны к флокуляции благодаря образованию геля на межфазной поверхности [167, 168]. Добавки ПАВ снижают флокуляцию, что связано с уменьшением прочности геля вследствие вытеснения белка из слоя.

Образование поверхностных сеток белка благотворно сказывается на стабилизации эмульсионных пленок [177].  $\beta$ -LG способен полимеризоваться за счет дисульфидных связей на границе раздела вода/масло и стабилизировать эмульсии, в то время как  $\alpha$ -LG не полимеризуется из-за отсутствия свободных SH-групп [178]. Термическая модификация  $\beta$ -LG [179], Lz [166] и BSA [169] вызывает упрочнение плёнок за счет образования самоорганизованных структур и формирования поверхностного геля вследствие сшивки молекул. Добавки лецитина оказывают небольшой положительный эффект на устойчивость пленок, стабилизированных  $\beta$ -LG, за счет комплексообразования с белком. Добавление казеината натрия способствует снижению прочности из-за конкурентной адсорбции [180]. Увеличение времени, прошедшего после эмульгирования до добавления казеината натрия, влияет на конкурентную адсорбцию. Упрочнение слоя  $\beta$ -LG со временем делает его более устойчивым к разрушению вторым компонентом. В работе [181] отмечены различия в структуре адсорбционных слоев неупорядоченного белка  $\beta$ -Cs и глобулярных  $\alpha$ -LG и  $\beta$ -LG и их влияние на стабилизацию эмульсий вода/масло из индивидуальных и смешанных растворов. Показано существование конкурентной адсорбции в смеси белков. Некоторые из особенностей адсорбции из смешанных растворов были показаны с помощью компьютерного моделирования методом Монте-Карло.

Эмульсии, стабилизированные Lz,  $\beta$ -LG в присутствии слюнных белков различной молекулярной массы исследовали в [182]. Установлено, что высокомолекулярный муцин MUC5B лучше адсорбируется на межфазных границах эмульсии, стабилизированной Lz. MUC7 с более низкой молекулярной массой лучше адсорбируется на межфазных поверхностях в эмульсии, стабилизированной  $\beta$ -LG. Авторы полагают, что характер адсорбции слюнных белков на межфазных

поверхностях в основном определяется зарядом поверхности, положительным для адсорбционных слоев Lz и отрицательным для  $\beta$ -LG при нейтральных pH.

Анализ литературных данных показывает, что, несмотря на широкое исследование смесей белок – ПАВ и их большое значение для многих природных и технологических процессов, ряд вопросов остается недостаточно исследованным. Прежде всего, это относится к изучению взаимного влияния белка и ПАВ на адсорбцию на границе двух несмешивающихся жидкостей. Крайне ограничено число экспериментальных данных о составе смешанных адсорбционных слоев. Мало исследований, посвященных изучению межфазного натяжения смесей белков и ПАВ на границах водный раствор/органическая жидкость, а также исследований влияния ПАВ на ферментативную активность белка. Несмотря на широкое использование лизоцима для исследования его поведения в присутствии ПАВ, основные данные относятся к смесям с анионными ПАВ. Исследований влияния катионных ПАВ на поведение лизоцима мало, а цвиттерионных ПАВ практически нет. Отсутствуют работы по изучению влияния смесей белок – ПАВ на устойчивость смачивающих пленок. В связи с этим, исследование влияния взаимодействий Lz с ПАВ различного типа на поверхностные свойства систем (поверхностное натяжение, адсорбцию и смачивание) является актуальным для понимания многих природных и промышленных процессов.

## II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Список условных обозначений, используемых в экспериментальной части.**

$A$  – константа адсорбционного равновесия, л/моль,

$A_E$  – ферментативная активность,  $\text{с}^{-1}$ ,

$A_{mol}$  – молярная радиоактивность, Бк/моль,

$a_s, a_{ps}, a_{sps}$  – параметры взаимодействия между молекулами ПАВ, комплексами белок – ПАВ и между комплексами белок – ПАВ и молекулами ПАВ в адсорбционном слое, соответственно,

$b$  – параметр уравнения Шишковского, мН/м,

$b_s, b_{ps}$  – константы адсорбционного равновесия ПАВ и комплекса белок – ПАВ, соответственно (в модели Файнермана), л/моль,

$C, C_o, C_w$  – общая концентрация, концентрация в органической и водной фазах, соответственно, М,

$D$  – коэффициент распределения в системе вода/октан,

$I, I_v, I_s$  – суммарная скорость счета распадов трития, объемная и поверхностная составляющие скорости счета, имп/мин,

$K_{d1}, K_{d2}$  – константы десорбции ПАВ на участках связывания типа 1 и 2, соответственно, моль/л,

$OD$  – оптическая плотность,

$Q_1, Q_2$  – степень заполнения участков связывания типа 1 и 2, соответственно,

$R$  – радиус смоченной площади при растекании капли, мм,

$S$  – площадь поверхности вода/октан,  $\text{м}^2$ ,

$S_I$  – площадь, приходящаяся на молекулу ПАВ в насыщенном адсорбционном слое,  $\text{нм}^2$ ,

$t$  – время, с,

$U$  – скорость растекания капли, м/с,

$V_o, V_w, V_{al}$  – объемы органической фазы, водной фазы и аликвоты органической фазы, л,



$X_s, X_v$  – мольная доля ПАВ в смеси в адсорбционном слое и в водном растворе, соответственно.

$\Gamma$  – адсорбция, моль/м<sup>2</sup>,

$\varepsilon$  – эффективность регистрации трития,

$\eta$  – вязкость, Па·с,

$\theta$  – краевой угол, град.,

$\lambda$  – длина волны, нм,

$\pi$  – двумерное давление, мН/м,

$\rho$  – плотность, г/см<sup>3</sup>,

$\sigma$  – поверхностное натяжение, мН/м,

$\omega$  – средняя площадь, приходящаяся на моль белка в насыщенном адсорбционном слое, м<sup>2</sup>/моль,

$\omega_0$  – площадь, приходящаяся на моль растворителя в адсорбционном слое, м<sup>2</sup>/моль.

## 2.1. Объекты исследования

В работе были исследованы смеси лизоцима с ПАВ различной природы. Лизоцим (Lz) – фермент класса гидролаз, разрушающий клеточные оболочки бактерий путем гидролиза амидных групп мурамилглюкозамина клеточных стенок грам-положительных бактерий. Lz содержится, в первую очередь, в местах соприкосновения организма животных с окружающей средой – в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, слезной жидкости, слюне, слизи носоглотки. Лизоцим используется в медицине в качестве бактерицидного средства, а также в косметических препаратах [183 – 186]. Lz – малый глобулярный белок (молекулярная масса = 14,3 кДа), его единственная полипептидная цепь состоит из 129 аминокислотных остатков и свернута в компактную глобулу размером 3,0×3,0×4,5 нм, 55 аминокислотных остатков находятся в  $\alpha$ -спиральной конформации [187] (рис. 6). Жесткость структуры лизоцима обеспечена наличием дисульфидных мостиков. Изоэлектрическая точка белка  $pI = 11,0$ , поэтому в водных растворах с

низкой ионной силой при нейтральных рН лизоцим имеет положительный заряд, суммарный заряд поверхностных групп лизоцима +8 [1, 61, 62, 69]. В работе использовали Lz белка куриных яиц (MP «Biomedicals»).

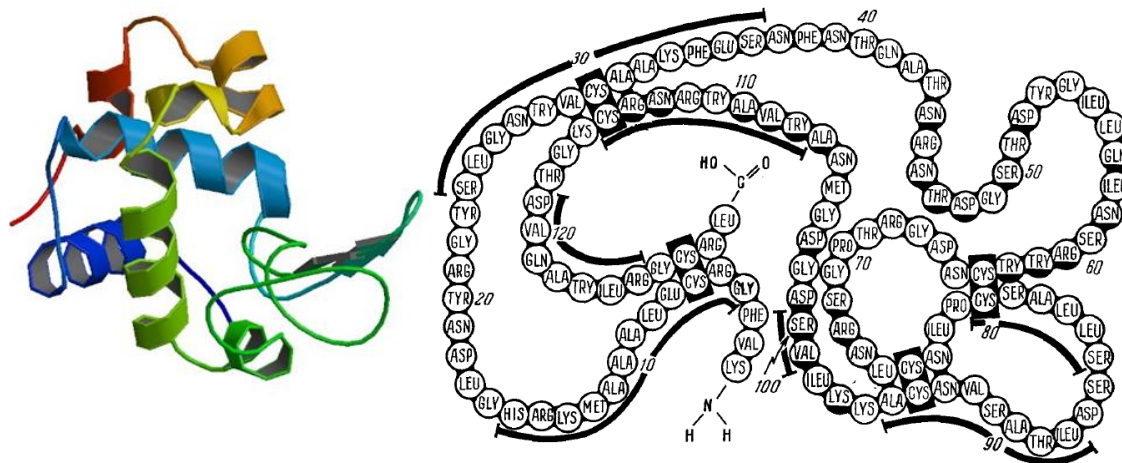
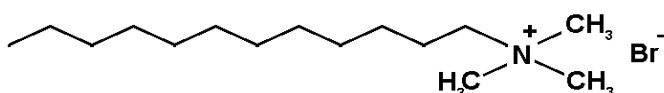


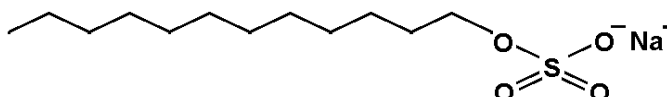
Рис. 6. Структура лизоцима [189] и последовательность аминокислот [187].

В работе были исследованы смеси Lz с ПАВ, имеющими одинаковую неполярную часть – н-додецильную цепь, – и полярную группу различного строения. Наряду с традиционными ионогенными ПАВ – катионным бромидом додецилтриметиламмония и анионным додецилсульфатом натрия, – в работе было изучено цвиттерионное ПАВ кокоамидопропил бетаин. Смеси Lz с цвиттерионным ПАВ впервые исследованы в настоящей работе.

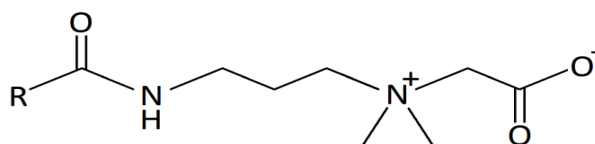
Бромид додецилтриметиламмония  $C_{12}H_{25}N^+(CH_3)_3Br^-$  (DTAB, «Merck» (Германия), чистота более 98%) – катионное ПАВ, молекулярная масса 308 г/моль, критическая концентрация мицеллообразования (ККМ)  $(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$  М [189 – 192].



Додецилсульфат натрия  $C_{12}H_{25}SO_4^-Na^+$  (SDS, ЗАО «НПО ЭКРОС», Россия, ч.) – анионное ПАВ, молекулярная масса 288 г/моль, ККМ =  $8,0 \div 10,0 \cdot 10^{-3}$  М [151, 189, 193]. Дополнительную очистку DTAB и SDS не проводили.



Кокоамидопропил бетаин  $R-C(O)N(H)(CH_2)_3N^+(CH_3)_2CH_2COO^-$  (CAPB, производство PCC ROKITA (Польша), 45% водный раствор). CAPB – цвиттерионное ПАВ, получаемое из кокосового масла и представляющее собой смесь *n*-алкильных гомологов с длиной углеводородной цепи  $R = C_8-C_{18}$ . Основным компонентом смеси (до 50%) является додецильный гомолог (молекулярная масса = 356 г/моль) [1, 194].



Широкое использование CAPB в качестве соПАВ в продуктах косметической, фармацевтической промышленности, в моющих средствах связано с несколькими моментами. CAPB не раздражает слизистую оболочку глаз и кожу, и его добавки к анионным ПАВ сильно уменьшают раздражающее действие последних [1]. Добавки CAPB к анионным ПАВ способствуют снижению ККМ, причем образующиеся смешанные мицеллы при достаточно малых концентрациях из сферических переходят в нитеобразные, обладающие большой солюбилизационной емкостью по отношению к жирным кислотам и другим органическим соединениям [6]. Добавки CAPB приводят к снижению точки Крафта анионных ПАВ, что позволяет использовать композиции в более широком температурном интервале, включая низкие температуры [195]. CAPB улучшает пенообразование в смесях с другими ПАВ [7]. К достоинствам CAPB относятся его доступность, хорошая биоразлагаемость, совместимость с ПАВ другого типа, антисептические и антистатические свойства. Несмотря на широкое использование и отмеченные достоинства CAPB, его смеси с белками практически не изучены и все полученные в работе данные имеют несомненную научную новизну. Литературные данные о ККМ CAPB сильно различаются: от 0,063% =  $1,77 \cdot 10^{-3}$  М [196] и  $2,92 \cdot 10^{-3}$  М [197] до  $9 \cdot 10^{-5}$  М [198, 199].

Для приготовления рабочих растворов CAPB исходный водный раствор упаривали на роторном испарителе до постоянства массы осадка, затем разбавляли до необходимой концентрации в солевом фосфатном буфере.

В смешанных растворах Lz – ПАВ концентрацию лизоцима поддерживали постоянной  $7 \cdot 10^{-7}$  М (0,01 г/л),  $7 \cdot 10^{-6}$  М (0,1 г/л) и  $7 \cdot 10^{-5}$  М (1 г/л), концентрацию ПАВ меняли в пределах от  $1 \cdot 10^{-7}$  до  $1 \cdot 10^{-2}$  М. Исходные растворы белка и ПАВ готовили весовым методом с использованием аналитических весов ( $\pm 10^{-4}$  г). Рабочие растворы получали при последовательном разбавлении исходных растворов ПАВ и внесении определенного объема раствора белка. Растворы, содержащие белок, хранили в холодильнике; свежеприготовленные растворы использовали в течение двух недель.

Для поддержания постоянного значения pH все растворы были приготовлены в солевом фосфатном буфере (pH  $7,2 \pm 0,1$ , ионная сила 0,15 М). Фосфатный буфер готовили из пропорции на 1 л дистиллированной воды 1,136 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,292 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 8,47 г NaCl, 0,5 г  $\text{NaN}_3$ . Концентрация NaCl соответствует физиологическому раствору. В работе использовали соли производства «Реахим» (Россия), хч.

Для создания двухфазных систем использовали свежеперегнаный октан. Плотность  $0,702 \text{ г/см}^3$ , температура кипения  $125,6 \text{ }^\circ\text{C}$ , вязкость  $0,514 \text{ мПа}\cdot\text{с}$ .

Все эксперименты проводили при комнатной температуре  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ .

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Метод сцинтиллирующей фазы

Метод сцинтиллирующей фазы основан на использовании меченных тритием соединений и их регистрации в объеме органического сцинтиллятора и вблизи межфазной поверхности [4, 5, 143 – 152]. Эксперимент проводили в сцинтилляционных полиэтиленовых флаконах диаметром 1 см, объемом 7 мл. К 1 мл водного раствора меченого вещества с общей концентрацией  $C$  добавляли 3 мл октана, содержащего сцинтиллирующие добавки (4% нафталина и 0,4% 2,5-дифенилоксазола). Двухфазную систему выдерживали в течение двух суток для взаимного насыщения фаз и достижения равновесного распределения меченого вещества между фазами и межфазным адсорбционным слоем. После этого оп-

ределяли суммарную скорость счета радиоактивных распадов трития в двухфазной системе ( $I$ , имп/мин), которая складывается из двух составляющих: объемной ( $I_V$ ) и поверхностной ( $I_S$ ):

$$I = I_V + I_S \quad (2-1).$$

Объемная составляющая определяется радиоактивностью объема органической жидкости, а поверхностная составляющая – радиоактивностью тонкого поверхностного слоя водного раствора, толщина которого соответствует длине пробега  $\beta$ -излучения трития в конденсированной фазе (1,6 мкм) [127, 128]. Поскольку вода не сцинтиллирует, скорость счета в объеме водной фазы равна нулю. Измерение радиоактивности проводили на жидкостном сцинтилляционном спектрометре Rack Beta 1215 (Финляндия).

Для расчета концентрации меченого тритием вещества в объеме сцинтиллирующей фазы, а также адсорбции на межфазной поверхности, отбирали аликвоту органической фазы объемом  $V_{al} = 1$  мл и измеряли скорость счета  $I_{al}$ . Скорость счета в объеме фазы  $I_V$  (имп/мин) рассчитывали из пропорции

$$I_V = \frac{I_{al}}{V_{al}} \cdot V_o \quad (2-2),$$

$V_o$ ,  $V_{al}$  – объем органической фазы и аликвоты, л.

Концентрацию меченого соединения в органической фазе  $C_o$  (М) рассчитывали по формуле

$$C_o = \frac{I_V}{60\varepsilon V_o A_{mol}} \quad (2-3),$$

где  $A_{mol}$  – молярная радиоактивность меченого вещества, Бк/моль,  $\varepsilon$  – эффективность регистрации трития, которую определяли экспериментально из регистрируемого спектра излучения трития для каждого флакона [4]; для сцинтилляционной жидкости на основе октана эта величина составляла от 0,4 до 0,45, 60 – коэффициент пересчета между имп/мин и Бк (1 имп/мин = 60 Бк). Концентрацию меченого соединения в водной фазе  $C_w$  определяли по разности между его содержанием в исходном водном растворе и его содержанием в органической фазе и на межфазной поверхности:

$$C_w = \frac{CV_w - C_o V_o - \Gamma S}{V_w} \quad (2-4),$$

где  $V_w$  – объем водной фазы, л,  $\Gamma$  – адсорбция, моль/м<sup>2</sup>,  $S$  – площадь межфазной поверхности, определяемая из сечения флакона, м<sup>2</sup>. В отдельных экспериментах  $C_w$  контролировали с использованием метода радиоактивных индикаторов. Для этого аликвоту водного раствора (20 мкл) помещали в сцинтиллирующую жидкость Ultima Gold (1 мл), измеряли радиоактивность полученного раствора и рассчитывали концентрацию по уравнениям 2-2 и 2-3. Во всех случаях было достигнуто согласие между экспериментально определенной концентрацией и рассчитанной по уравнению 2-4 (расхождение не превышало 5%).

На основании определенных значений  $C_o$  и  $C_w$  были рассчитаны коэффициенты распределения веществ в системе вода/октан

$$D = \frac{C_o}{C_w} \quad (2-5),$$

При изучении влияния смеси Lz – CAPB на растворимость воды в октане использовали тритиевую воду НТО с удельной радиоактивностью 288 МБк/моль. В 1 мл водного раствора ПАВ (или смеси белок – ПАВ) вносили 100 мкл НТО, добавляли 3 мл октана со сцинтиллирующими добавками и оставляли систему на двое суток для взаимного насыщения фаз. После измерения скорости счета в аликвоте органической фазы ( $V_{al} = 0,4$  мл), определяли концентрацию воды в октане по формуле 2-3.

Адсорбцию вещества на межфазной поверхности рассчитывали по формуле.

$$\Gamma = \frac{2I_S}{60\varepsilon SA_{mol}} \quad (2-6),$$

где  $I_S$  – поверхностная составляющая скорости счета, имп/мин. Коэффициент 2 появляется вследствие того, что эффективность регистрации трития из поверхностного слоя составляет половину от эффективности регистрации в объеме, так как на органический сцинтиллятор воздействует излучение меченого вещества из водного раствора, направленное в сторону органической фазы. Излучение, направленное в сторону водного раствора не фиксируется.

Для повышения точности расчета поверхностную составляющую скорости счета  $I_S$  рассчитывали двумя способами: по отбору органической жидкости и по радиоактивности оставшейся системы (после отбора). В первом случае из скоро-

сти счета всей системы вычитали скорость счета в органической фазе, полученную из пропорции:

$$I_s = I - \frac{I_{al}}{V_{al}} \cdot V \quad (2-7).$$

Во втором случае измеряли скорость счета в системе после отбора аликвоты органической фазы. Для расчета поверхностной составляющей из скорости счета в оставшейся системе  $I_{ост}$  вычитали, рассчитанную из пропорции, скорость счета в остатке органической фазы:

$$I_s = I_{ост} - \frac{I_{al}}{V_{al}} \cdot V_{ост} \quad (2-8).$$

$V_{ост}$  – объем органической фазы после отбора аликвоты. Величины скорости счета, полученные из радиоактивностей отбора и остатка совпадают в пределах 12%.

Меченные тритием лизоцим, SDS и DTAB были предоставлены сотрудниками кафедры радиохимии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Введение тритиевой метки проводили методом термической активации трития с последующей очисткой ПАВ с помощью тонкослойной хроматографии [143, 144], а белка – методом равновесного диализа в течение 5 дней и эксклюзионной хроматографии [200]. В результате были получены меченный тритием лизоцим с молярной радиоактивностью 5,4 ТБк/моль и меченые DTAB и SDS с удельной радиоактивностью 3,2 и 30,0 ТБк/моль соответственно. Величина радиоактивности меченых веществ такова, что позволяет фиксировать их содержание в органической фазе вплоть до концентрации  $10^{-11}$  М. При исследовании поведения индивидуальных веществ водная фаза представляла собой растворы ПАВ или белка с удельной радиоактивностью 74 кБк/мл. Для приготовления растворов с указанной радиоактивностью смешивались водные растворы меченого тритием и немеченого вещества.

Методика введения тритиевой метки в САРВ была разработана в рамках настоящей работы. Для получения меченого тритием САРВ его водный раствор наносили на стенки специального реактора при непрерывном вращении, после чего его замораживали в жидком азоте. Далее камеру заполняли газообразным тритием до давления 0,5 Па и проводили процесс мечения при распаде молекул три-

тия на атомы на вольфрамовой нити при температуре 1900 К в течение 10 с. Процесс введения тритиевой метки заключается в неспецифическом замещении доступных для атаки атомов водорода молекул мишени на тритий. Для удаления трития из лабильных положений проводили несколько раз растворение полученного вещества в воде и удаление воды на роторном испарителе. Анализ чистоты полученного САРВ проводили с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках Silica Gel 60 (Sigma Aldrich) в системе бутанол/уксусная кислота/вода в объемном соотношении 3:1:1. Для проведения хроматографического исследования вещество растворяли в воде до концентрации 0,1 М и каплю полученного раствора наносили на хроматографическую пластинку. Одновременно с меченым препаратом на той же пластине проводили хроматографию исходного САРВ. Положение немеченого вещества на пластинке определяли с помощью реактива Драгендорфа [201], образующего окрашенный комплекс с четвертичной аммониевой группой. Реактив Драгендорфа получали при смешивании 4 мл 1,4% раствора  $\text{Vi}(\text{NO}_3)_3$  в 20% уксусной кислоте, 1 мл 30% раствора KI и 20 мл дистиллированной воды. Распределение по пластине меченого тритием образца определяли с помощью сканера радиоактивности Бетахром (Россия). Результат сканирования представлен на рис. 7а. Красной пунктирной линией обозначено положение на пластине исходного САРВ. На фронте пластинки был получен максимум для примесей, которые удаляли с помощью экстракции.



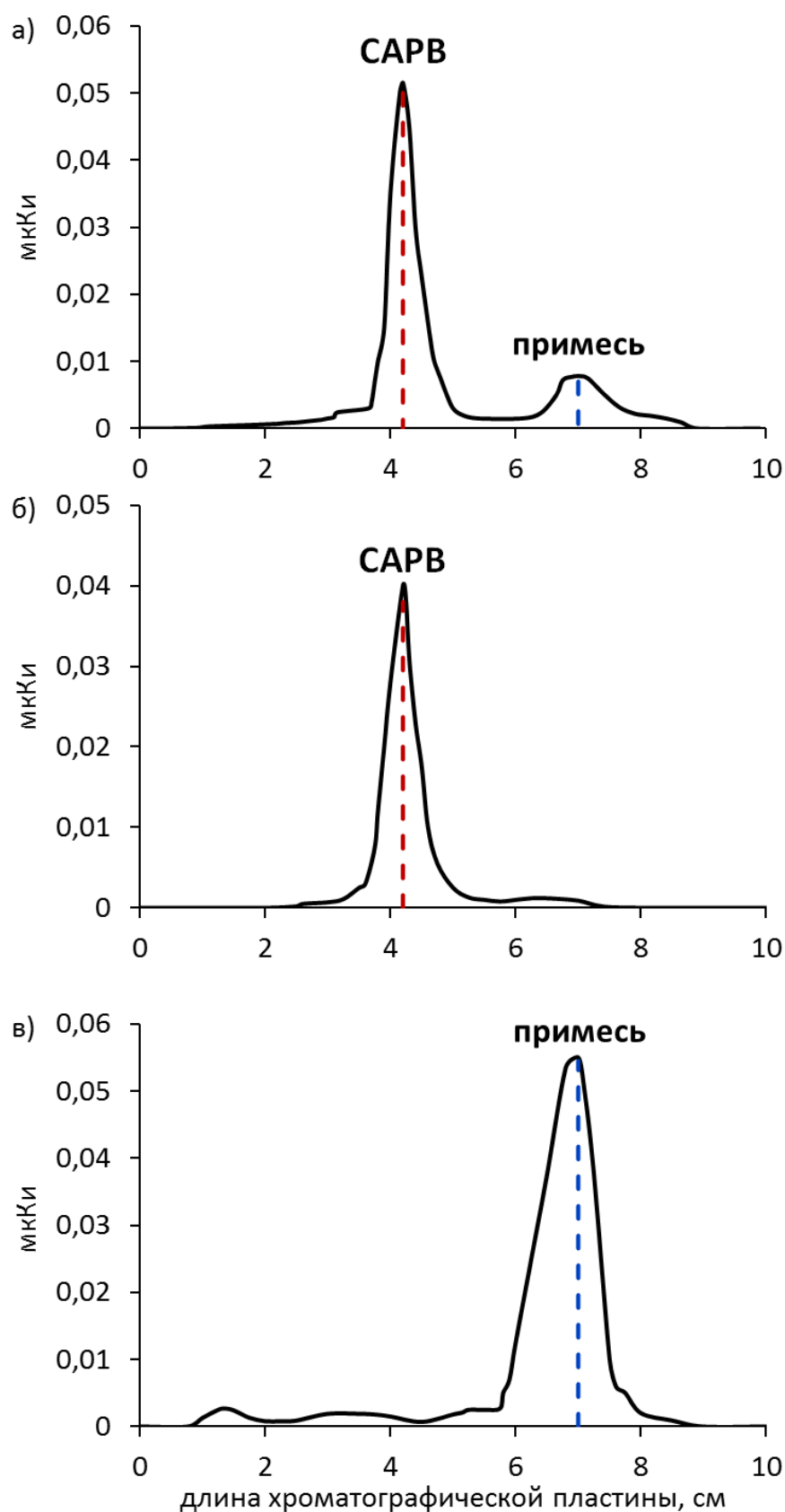


Рис. 7. Распределение радиоактивности на хроматографической пластинке водного раствора САРВ после удаления лабильной метки (а) и после восьмой экстракции в гептан: водного раствора (б) и органической фазы (в).

Экстракцию проводили в системе водный раствор/гептан в объемном соотношении 1:10 до постоянства радиоактивности отобранной из гептана аликвоты (8 раз), т.е. до тех пор, пока не устанавливалось постоянное значение коэффициента распределения САРВ (рис. 8). Затем водный раствор и органическую фазу вновь подвергли хроматографическому анализу (рис. 7 б, в).

Как видно из результатов сканирования, практически полностью удалось избавиться от пика примесей на границе фронта для водного раствора. Все примеси перешли в органическую фазу (синие пунктирные линии). Радиохимическая чистота полученного меченого САРВ составляет 95%, молярная радиоактивность 23,3 ТБк/моль.

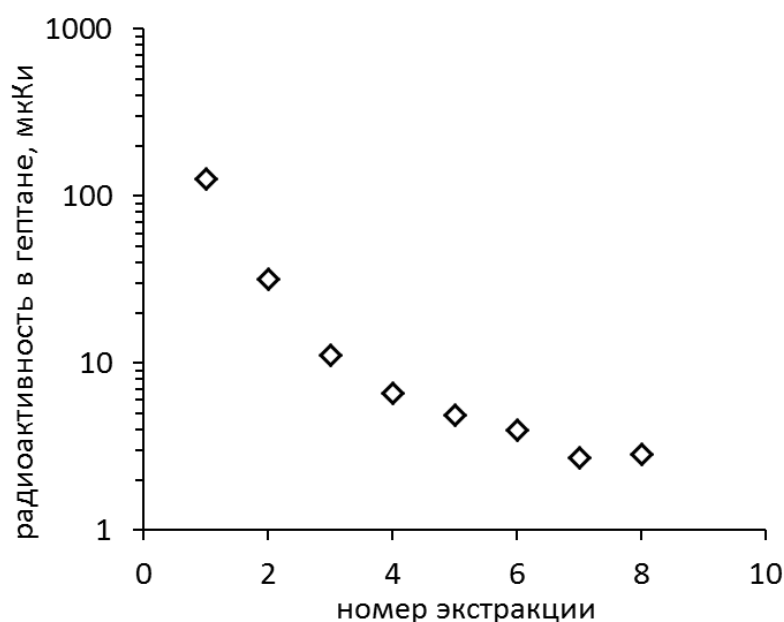


Рис. 8. Изменение радиоактивности гептана при экстракции  $^3\text{H}$ -САРВ.

При исследовании смесей Lz – ПАВ были выполнены две серии экспериментов, в каждой из которых тритиевая метка находилась только в одном из компонентов смеси. Постановка эксперимента позволяла изучить взаимное влияние компонентов смеси на распределение между фазами и адсорбцию, рассчитать суммарную адсорбцию и определить состав адсорбционного слоя. Каждый эксперимент воспроизводили 3 – 5 раз.

### 2.2.2. Метод висящей капли

Межфазное натяжение растворов индивидуальных веществ и смесей лизоцим – ПАВ на границе водный раствор/октан и раствор/воздух измеряли методом висящей капли. В исследуемых системах установление равновесной адсорбции ПАВ и, особенно, белка требует определенного времени, связанного как с диффузией веществ к межфазной поверхности, так и с их переориентацией в поверхностном слое. Метод висящей капли является статическим, позволяет варьировать время формирования межфазной поверхности в широких пределах и тем самым измерять поверхностное натяжение в равновесных условиях.

Суть метода висящей капли состоит в том, что при помещении капли в среду с плотностью, отличной от плотности жидкости в капле, под действием гравитационных и капиллярных сил будет происходить изменение её формы. Висящая капля деформируется до тех пор, пока гидростатическое давление не уравновесится капиллярным:  $\Delta\rho g z = \sigma \left( \frac{1}{r_1(z)} + \frac{1}{r_2(z)} \right)$ . Здесь  $\Delta\rho$  – разность плотностей жидкости в капле и в окружающей среде (принимали плотность водных растворов 1,000 г/см<sup>3</sup>, октана 0,702 г/см<sup>3</sup>, воздуха 0 г/см<sup>3</sup>),  $r_1(z)$  и  $r_2(z)$  – главные радиусы кривизны поверхности капли на уровне  $z$ . Для измерения поверхностного натяжения формировали с помощью дозатора каплю исследуемого раствора в стеклянной кювете, на дно которой был помещен исследуемый раствор (с целью предотвращения испарения капли). Затем каплю фотографировали при помощи горизонтального микроскопа, оборудованного цифровой видеокамерой DCM-130 (рис. 9).

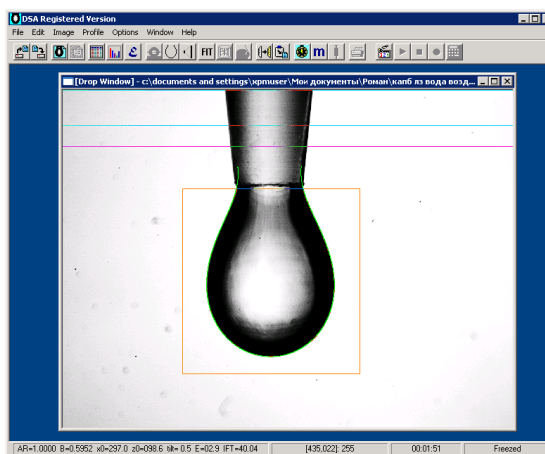


Рис. 9. Видеоизображение капли водного раствора лизоцима ( $C = 7 \cdot 10^{-8}$  М) в среде октана.

Межфазное натяжение рассчитывали с помощью программного пакета Drop Shape Analysis (Kruss) по профилю капли методом численного интегрирования уравнения Юнга-Лапласа и приближением рассчитанного профиля капли к полученному экспериментально.

Перед проведением измерений межфазного натяжения на границе водный раствор/октан в стеклянную кювету с пробкой помещали 1 мл исследуемого водного раствора и 2 мл октана и оставляли двухфазную систему на двое суток при комнатной температуре для взаимного насыщения фаз. Затем проводили измерения, используя взаимно насыщенные растворы. Каплю водного раствора формировали в среде октана и выдерживали до тех пор, пока межфазное натяжение не переставало меняться. Постоянное значение достигалось в течение 30 минут для растворов индивидуальных ПАВ и в течение 60 минут для растворов смесей белок – ПАВ. Каждое измерение выполняли 3 – 5 раз, погрешность измерения поверхностного натяжения составляла 0,5 – 2,5 мН/м (в зависимости от концентрации раствора).

### 2.2.3. Определение размера частиц и электрокинетического потенциала

Измерения размера частиц проводили на анализаторе размера частиц Zeta Trak (Microtrac, США). Прибор позволяет измерять размеры частиц в диапазоне 0,9 – 6500 нм, т.е. дает обширную информацию об образовании ассоциатов в растворе, денатурации белка, мицеллообразовании и т.д. В основе метода лежит эффект Доплера, то есть изменение частоты света при отражении от движущихся частиц. Свет лазера рассеивается на находящихся в броуновском движении частицах. Отраженный под углом  $180^\circ$  свет попадает обратно на детектор. По изменению частоты  $\nu$  строится распределение количества частиц по скоростям, и определяется длина волны  $\lambda$ , соответствующая максимуму. Связь скорости движения частиц с их радиусом дает теория броуновского движения Эйнштейна-Смолуховского. Диаметр частиц  $d$  вычисляется по формуле:

$$d = \frac{16\pi kT}{3\eta\lambda^2\nu} \quad (2-9),$$

где  $\eta$  – вязкость, Па·с,  $k$  – постоянная Больцмана, Дж/К,  $T$  – температура, К.

Этот же прибор позволяет измерить  $\zeta$ -потенциал частиц. Для этого в измерительной ячейке создается постоянное электрическое поле, в результате чего заряженные частицы начинают направленно двигаться к противоположно заряженному электроду. По смещению распределения скоростей определяется электрофоретическая подвижность частиц  $\mu$ :

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (2-10),$$

где  $v$  – скорость, м/с,  $E$  – напряженность электрического поля, В/м.

Электрокинетический потенциал  $\zeta$  рассчитывается из уравнения Смолуховского:

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\varepsilon} \quad (2-11),$$

где  $\varepsilon$  – относительная диэлектрическая проницаемость раствора.

#### 2.2.4. Получение спектров поглощения в УФ области

Измерения проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см на однолучевом спектрофотометре Agilent 8453 (Agilent Technologies, США). В качестве раствора сравнения использовали солевой фосфатный буфер. Спектр поглощения лизоцима (рис. 10) имеет максимум при длине волны 280 нм, что согласуется с литературными данными [22, 202, 203]. Поглощение происходит в ультрафиолетовом диапазоне длин волн, что обусловлено наличием ароматических фрагментов в аминокислотных остатках (в основном, в триптофане и тирозине). Для исследования светорассеяния в водных растворах Lz – ПАВ, определяли зависимость оптической плотности при 320 нм от состава раствора (в этой области длин волн отсутствует поглощение, и рост оптической плотности связан только со светорассеянием).

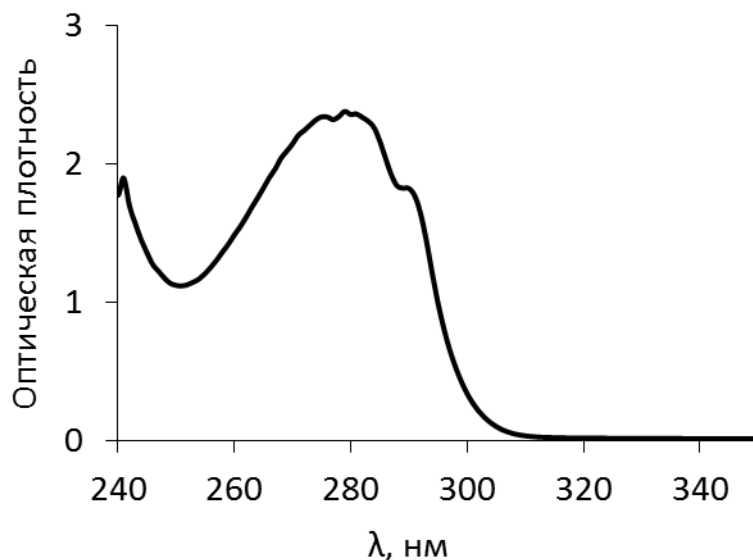


Рис. 10. Спектр поглощения лизоцима (концентрация 1 г/л).

### 2.2.5. Метод флуоресценции

Метод флуоресценции дает информацию о микрополярности окружения флуорофорных групп (в случае лизоцима – триптофан 62 и 108 [41]), что позволяет делать выводы о взаимодействии белка с ПАВ. Эксперимент проводили на спектрофлуориметре FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, Франция) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. При возбуждении УФ-светом с длиной волны 280 нм получали спектры эмиссии в области 300 – 400 нм. Время измерения одной точки – 0,5 с. Спектр флуоресценции лизоцима представлен на рис.11.

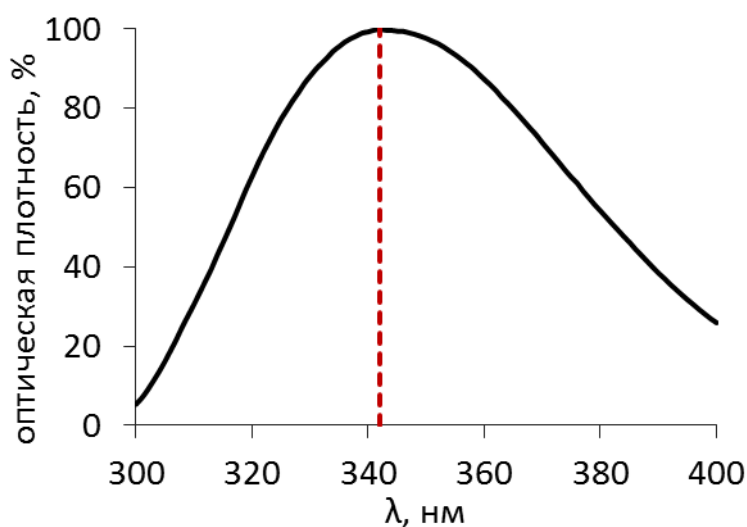


Рис.11. Спектр флуоресценции лизоцима (концентрация 1г/л).

При длине волны 342 нм наблюдается максимум, что согласуется с литературными данными [22, 41, 203 – 205]. При сопоставлении спектров исходного лизоцима и лизоцима в смеси с ПАВ, были получены величины относительной флюоресценции в максимуме (за 100% принимали оптическую плотность для индивидуального лизоцима). Чувствительность метода такова, что были изучены растворы, содержащие 1 г/л лизоцима; более разбавленные растворы данным методом исследовать не удалось.

### 2.2.6. Ферментативная активность лизоцима в присутствии ПАВ

Проведено изучение ферментативной активности Lz в присутствии ПАВ по отношению к грам-положительным бактериальным клеткам *Micrococcus luteus* турбидиметрическим методом, описанным в [206 – 208]. Для этого навеску лиофилизированных клеток *M.luteus* растворяли в буферном растворе, концентрацию полученной суспензии клеток подбирали таким образом, чтобы оптическая плотность суспензии  $OD$  при длине волны 650 нм составляла около 0,5. Для измерения светопоглощения растворов использовали двухлучевой спектрофотометр UV-1601PC (“Shimadzu”, Япония). Измерения проводили в термостатируемых микрокюветах с длиной оптического пути 1 см и объемом 0,5 мл. Температура эксперимента составляла 24° С. К суспензии клеток, помещенных в микрокювету, добавляли раствор смеси Lz – ПАВ определенной концентрации и состава, перемешивали и измеряли зависимость оптической плотности от времени  $OD(t)$  (рис. 12). Каждый эксперимент повторяли 3 – 5 раз, погрешность определения  $A_E$  составляла 5 – 30 %. В результате лизиса клеток фиксировали уменьшение оптической плотности суспензии. В качестве характеристики активности определяли изменения поглощения на начальном участке  $A_E = \lim_{t \rightarrow 0} \left( -\frac{dOD}{dt} \right)$ . Скорость уменьшения поглощения на начальном линейном участке пропорциональна изменению числа «целых» клеток и служит надежной характеристикой бактериолитического действия фермента [206]. Поскольку во всех экспериментах величина  $OD$

линейно уменьшалась в интервале времени от 5 до 20 с от начала лизиса, ферментативную активность оценивали как  $-dOD/dt$  на начальном линейном участке (пунктирная линия на рис. 12). В отсутствие бактериолитических факторов фонового самопроизвольного лизиса клеток в условиях эксперимента не наблюдалось. Суспензию клеток использовали в течение двух часов после ее приготовления.

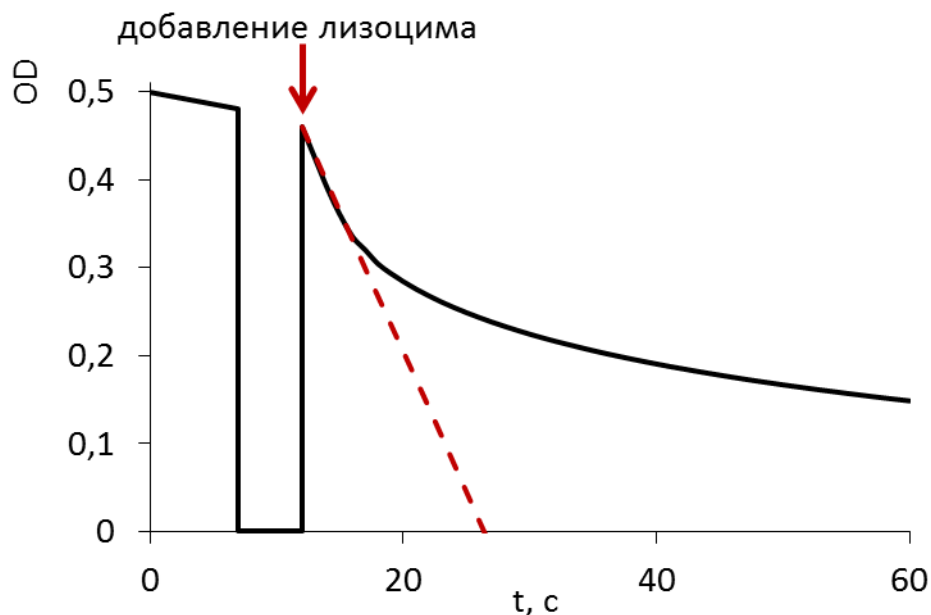


Рис. 12. Изменение оптической плотности суспензии *M. luteus* после добавления лизоцима.

### 2.2.7. Избирательное смачивание

Для исследования стабилизирующего действия смесей Lz – ПАВ было изучено их влияние на устойчивость смачивающих пленок и на кинетику растекания капель при избирательном смачивании. Изучение избирательного смачивания в системе водный раствор смеси Lz – ПАВ/октан/гидрофобизованное стекло проводили следующим образом. Пластину предметного стекла размером 1×2 см очищали в хромовой смеси, трижды промывали водой и высушивали на воздухе. Затем проводили гидрофобизацию в парах диметилдихлорсилана в течение суток с последующей промывкой хлороформом. Краевой угол воды на модифицированной поверхности составлял  $103 \pm 2$  град. Пластину помещали в кювету, заполненную водным раствором, в специальный держатель и снизу подводили каплю октана с помощью шприца с загнутой иглой (рис. 13а).



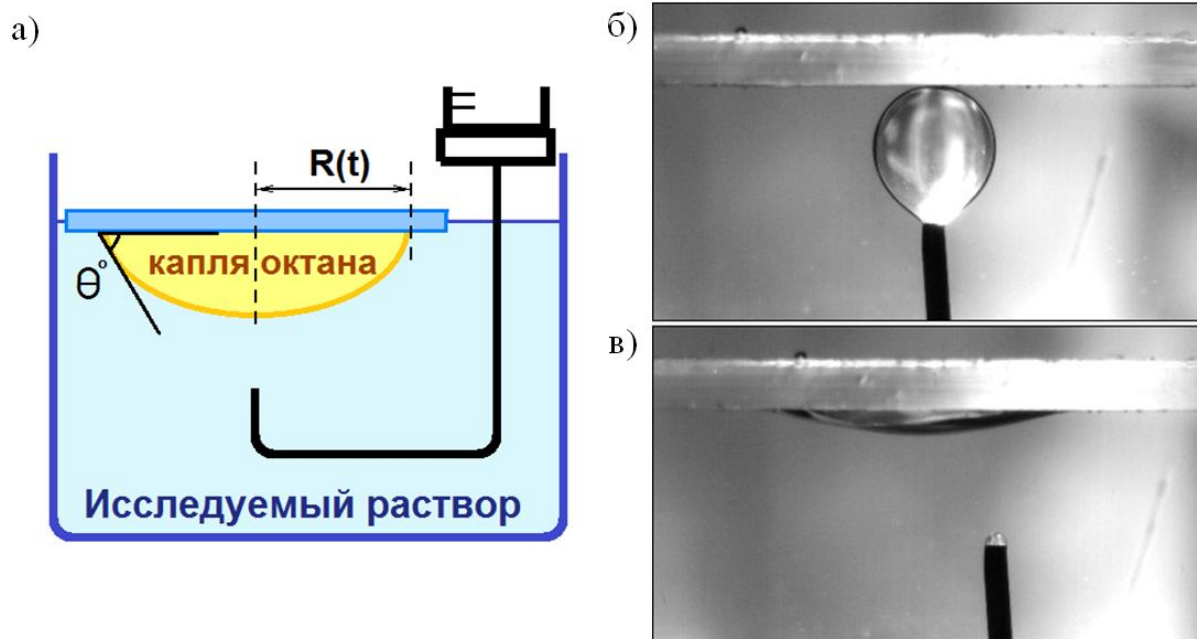


Рис. 13. Схема эксперимента по изучению избирательного смачивания (а) и видеоизображение капли октана, соприкасающейся с поверхностью стекла в среде водного раствора смеси Lz – ПАВ (б, в). (б) – капля в начальный момент времени, (в) – капля после растекания.

После прорыва смачивающей пленки капля октана смачивала поверхность гидрофобизованного стекла. Процесс избирательного смачивания изучали с помощью профильной (боковой) видеосъемки с использованием высокоскоростной видеокамеры Fastvideo-400 (НПО «Астек», Россия), скорость съемки до 1000 кадр/с (рис. 13 б, в). Каждый эксперимент повторяли 3 раза.

Анализ полученных видеофайлов позволил определить время прорыва смачивающей пленки и изучить кинетику растекания капель. Для этого был проведен покадровый обмер радиуса смоченной площади  $R$  и краевого угла  $\theta$  в зависимости от времени  $t$ . Для удобства проведения дальнейших расчетов крайевой угол отсчитывали в сторону капли октана.

### III. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

#### 3.1. Взаимное влияние лизоцима и ПАВ на распределение в системе вода/октан

Методом сцинтиллирующей фазы были определены концентрации компонентов смесей в октане и по уравнению (2-5) рассчитаны коэффициенты распределения меченого лизоцима и ПАВ в системе вода/октан.

Для индивидуального лизоцима коэффициент распределения составляет  $(3,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$  во всем диапазоне изученных концентраций белка. Распределение DTAB постоянно во всем диапазоне концентраций,  $D = (6,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$ . Коэффициент распределения индивидуального SDS составляет  $(4,3 \pm 1,3) \cdot 10^{-3}$ .

Коэффициент распределения лизоцима в бинарных растворах, содержащих 0,01 г/л белка и  $10^{-7} - 10^{-6}$  М ПАВ, составляет  $(4,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$  в случае смеси с DTAB и  $(5,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$  для смеси с SDS (рис. 14). Эти значения выше, чем  $D$  индивидуального лизоцима на 40% и 60% для смеси с DTAB и SDS, соответственно. При концентрации ПАВ  $10^{-6}$  М, что соответствует мольному соотношению Lz:ПАВ в системе  $\approx 1:1$ , коэффициент распределения лизоцима снижается до значений  $(3,3 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$ , что совпадает с величиной  $D$  для индивидуального лизоцима. При концентрации DTAB и SDS  $10^{-6}$  М мольное соотношение Lz:ПАВ в органической фазе составляет  $\approx 1:3$  и  $\approx 1:2$ , соответственно. С ростом концентрации ПАВ дальнейшего изменения величины  $D$  не происходит. Коэффициент распределения белка из смеси с концентрацией 0,1 г/л больше  $D$  индивидуального белка на 40% (DTAB) и 80% (SDS) в области концентраций ПАВ  $10^{-7} - 10^{-4}$  М. При мольном соотношении Lz:ПАВ в системе свыше 1:10 происходит снижение  $D$  до значений близких коэффициенту распределения индивидуального лизоцима.

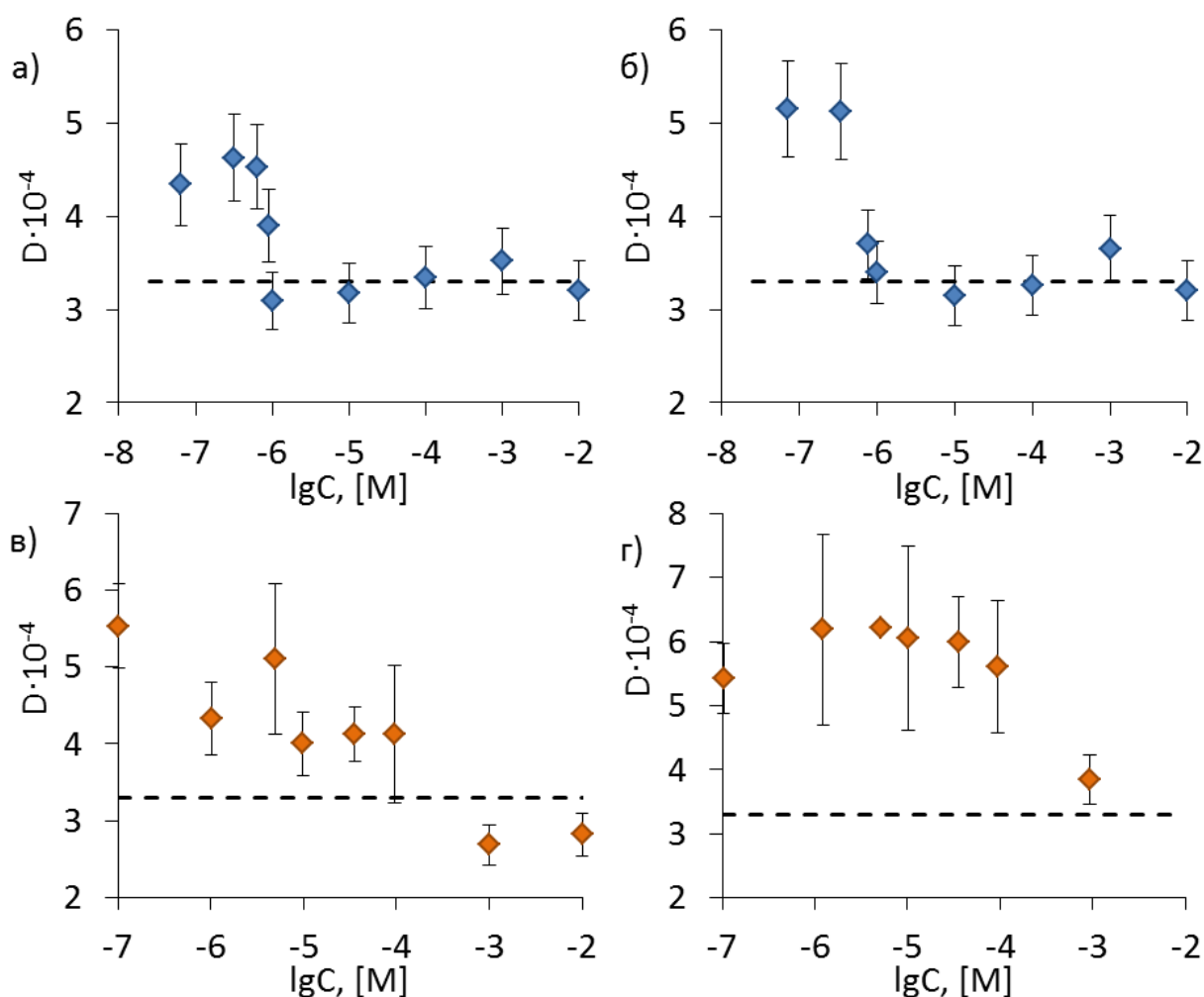


Рис. 14. Коэффициенты распределения лизоцима в смесях с DTAB (а, в) и SDS (б, г). Концентрация белка 0,01 г/л (а, б) и 0,1 г/л (в, г). Пунктирные линии – коэффициент распределения индивидуального Lz.

В присутствии лизоцима концентрация DTAB в органической фазе заметно выше, чем в случае индивидуального ПАВ для разбавленных растворов (концентрация ниже  $5 \cdot 10^{-6}$  М) (рис. 15 а). Дальнейший рост концентрации DTAB приводит к снижению  $D$  до  $6 \cdot 10^{-4}$ , что соответствует величине  $D$  для индивидуального DTAB. Добавление лизоцима ( $c = 0,01$  мг/мл) повышает  $D$  SDS в области малых концентраций добавленного ПАВ (ниже  $10^{-6}$  М) и практически не влияет на  $D$  SDS при более высоких концентрациях ПАВ (рис. 15 б).

При концентрации белка 0,1 г/л коэффициент распределения DTAB совпадает со значением для индивидуального ПАВ, а коэффициент распределения SDS уменьшается.

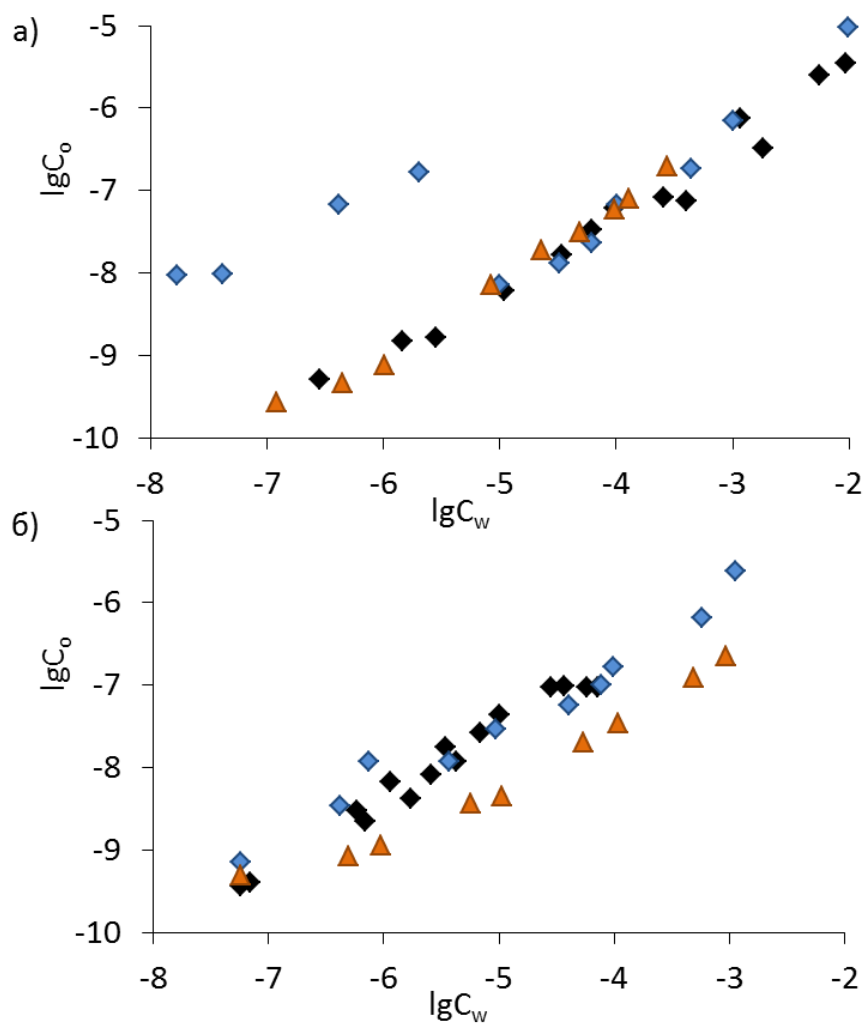


Рис. 15. Зависимости концентрации DTAB (а) и SDS (б) в органической фазе от их концентрации в водной фазе для индивидуальных ПАВ (◆) и ПАВ в присутствии лизоцима концентрацией 0,01 г/л (◆) и 0,1 г/л (▲).

Рост коэффициентов распределения лизоцима в бинарных растворах может быть связан с формированием гидрофобных комплексов белок – ПАВ, обладающих большей растворимостью в органической фазе, чем нативный белок.

Добавки САРВ практически не влияют на распределение лизоцима (рис. 16)

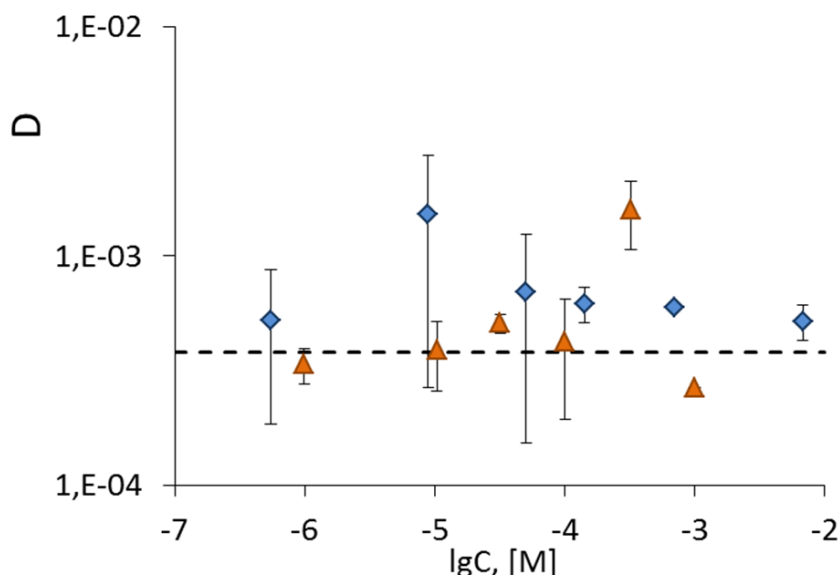


Рис. 16. Зависимость коэффициента распределения лизоцима в системе вода/октан от концентрации CAPB при концентрации белка 0,01 г/л (♦) и 0,1 г/л (▲). Пунктирные линии – коэффициент распределения индивидуального Lz.

Коэффициент распределения CAPB в области малых концентраций (до  $10^{-5}$  М) постоянен и составляет  $(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$ , при дальнейшем увеличении концентрации CAPB происходит рост значений  $D$  (рис. 17). В присутствии Lz величины  $D$  CAPB увеличиваются примерно в два раза. Величины  $D$  CAPB в смешанных растворах также постоянны вплоть до концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М, а затем начинают возрастать.

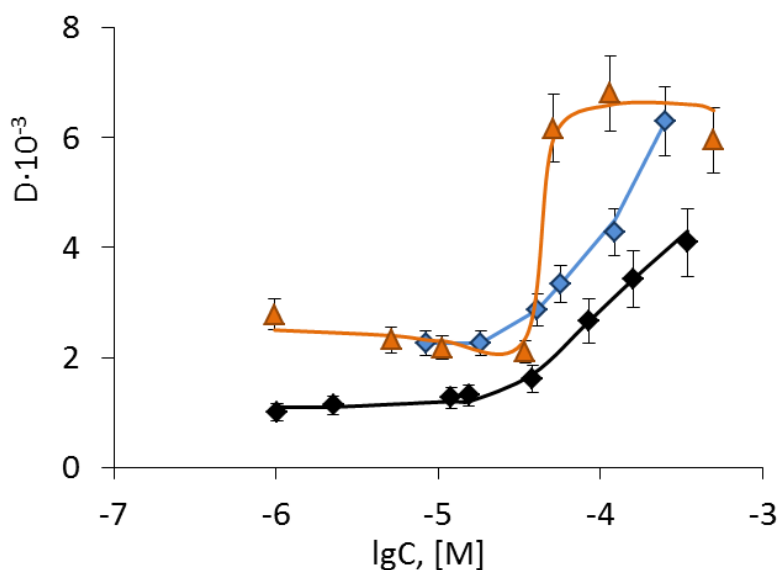


Рис. 17. Зависимость коэффициента распределения CAPB в системе вода/октан от концентрации ПАВ для индивидуального CAPB (♦) и для CAPB в присутствии Lz 0,01 г/л (♦) и 0,1 г/л (▲).

Рост  $D$  как в растворе индивидуального САРВ, так и в его смеси с лизоцимом может быть связан с образованием обратных предмицеллярных агрегатов в объеме органической фазы. Молекулы САРВ, благодаря наличию положительных и отрицательных зарядов в цвиттерионной полярной группе, могут взаимодействовать друг с другом за счет электростатического притяжения, образуя димеры, тримеры и т.д. Образованные агрегаты оказываются более гидрофобными и, соответственно, более растворимыми в октане, чем исходные молекулы САРВ. Для обоснования предположения о формировании в органической фазе обратных мицеллярных агрегатов, были проведены эксперименты по изучению распределения воды в системе, содержащей САРВ. Полагали, что при образовании обратных мицелл увеличится растворимость воды в органической фазе. Исследование проводили методом сцинтиллирующей фазы с использованием меченной тритием воды.

Таблица 1.

Объемная доля воды в октане в системе водный раствор/октан.

Состав водной фазы	Объемная доля воды в октане
$H_2O$	$(4,3 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$
+ САРВ ( $10^{-3}$ М)	$(4,8 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$
+ Lz (0,1 г/л)	$(3,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$
+ Lz – САРВ	$(3,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$

По литературным данным, растворимость воды в октане составляет  $6,1 \cdot 10^{-5}$  мл/мл [209], что согласуется с полученным нами значением (таблица 1). Установлено, что в системах, содержащих САРВ, Lz и смесь Lz – САРВ, растворимость воды практически не меняется. Это означает, что заметной полярной области (ядра обратных мицелл) в данных условиях не образуется, однако полученный результат не противоречит предположению о формировании в октане агрегатов с меньшим числом агрегации (например, димеров САРВ).

### 3.2. Адсорбция смесей лизоцим – ПАВ на границе вода/октан

Адсорбция лизоцима из индивидуальных растворов с концентрацией белка 0,01 и 0,1 г/л, рассчитанная по данным метода сцинтиллирующей фазы с помощью формулы (2-6), составила  $8,2 \cdot 10^{-9}$  моль/м<sup>2</sup> и  $2,0 \cdot 10^{-8}$  моль/м<sup>2</sup>, соответственно. Ранее было установлено, что при формировании на границе вода/октан насыщенного слоя из глобул Lz, ориентированных главной осью параллельно поверхности, адсорбция Lz составляет  $4 \cdot 10^{-8}$  моль/м<sup>2</sup>, а из ориентированных перпендикулярно поверхности –  $1,3 \cdot 10^{-7}$  моль/м<sup>2</sup> [4, 65]. Таким образом, в нашем эксперименте молекулами Lz занята примерно четверть (при концентрации 0,01 г/л) или половина (при 0,1 г/л) поверхности.

При добавлении ДТАВ к раствору белка с концентрацией 0,01 г/л в области малых концентраций ПАВ  $10^{-7}$  –  $10^{-6}$  М адсорбция лизоцима в 2,5 раза выше, чем у индивидуального белка, и составляет  $\approx 2 \cdot 10^{-8}$  моль/м<sup>2</sup> (рис. 18). Рост адсорбции Lz происходит при такой же концентрации ДТАВ, при которой наблюдается увеличение коэффициента распределения лизоцима (рис. 14а). Затем, в области концентраций ДТАВ  $10^{-6}$  –  $10^{-5}$  М происходит снижение величин адсорбции до постоянного значения  $\approx 8 \cdot 10^{-9}$  моль/м<sup>2</sup>, что соответствует адсорбции индивидуального лизоцима. При дальнейшем увеличении концентрации ДТАВ происходит снижение адсорбции Lz до значения  $\approx 2 \cdot 10^{-9}$  моль/м<sup>2</sup>, т.е. даже при большом избытке ДТАВ белок присутствует на поверхности. Для смеси Lz – ДТАВ с концентрацией белка 0,1 г/л адсорбция лизоцима в диапазоне концентраций ПАВ  $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  М в 4 раза выше, чем у индивидуального белка. Рост адсорбции коррелирует с увеличением растворимости Lz в октане. При больших концентрациях ПАВ адсорбция снижается.

На рисунках 14, 16, 17, 18 и далее по оси абсцисс отложена общая концентрация ПАВ  $C$ , поскольку уменьшение концентрации в водном растворе вследствие перехода веществ в органическую фазу и их адсорбции на межфазной поверхности не превышало, как правило, 5% (см. приложения 1, 2). Соответственно,

в масштабах шкалы концентраций отличие  $C$  от равновесной концентрации  $C_w$  пренебрежимо мало.

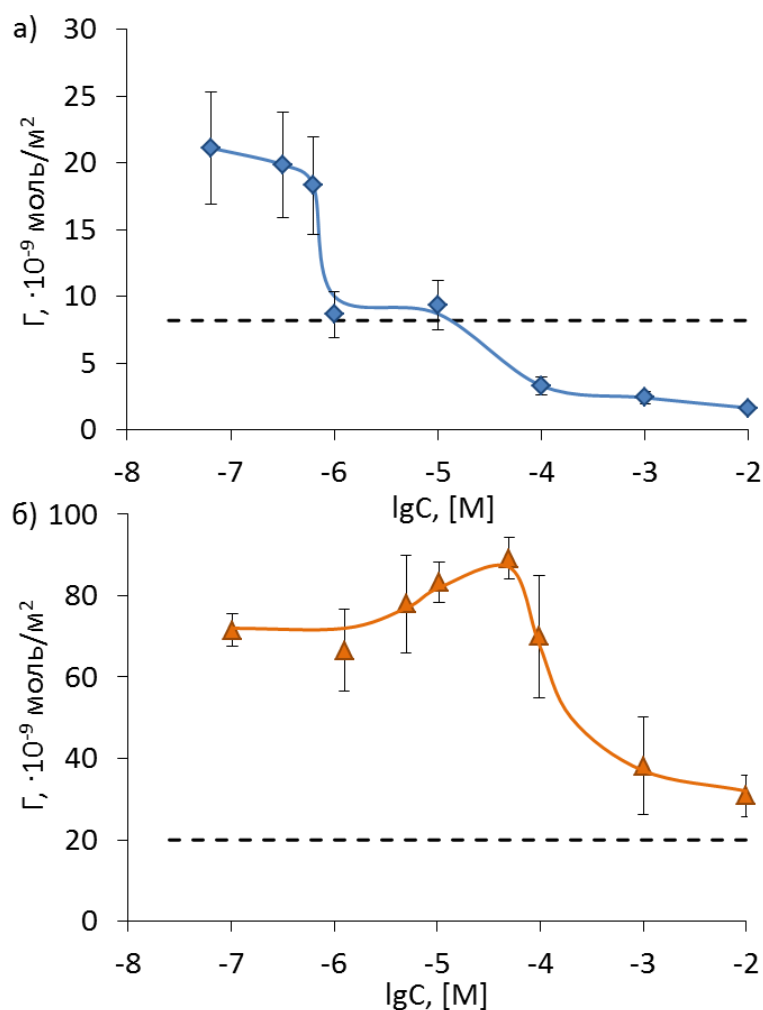


Рис. 18. Зависимость адсорбции лизоцима из смеси Lz – DTAB с концентрацией белка 0,01 г/л (а) и 0,1 г/л (б) от концентрации DTAB. Пунктирные линии – адсорбция индивидуального Lz.

Адсорбция лизоцима из смеси с SDS (концентрация Lz 0,01 г/л) в области концентраций ПАВ  $10^{-7} - 10^{-4}$  М на 50% выше, чем адсорбция индивидуального лизоцима. При увеличении концентрации SDS свыше  $10^{-4}$  М происходит снижение адсорбции белка до конечного значения  $\approx 2 \cdot 10^{-9}$  моль/м<sup>2</sup> (рис. 19).



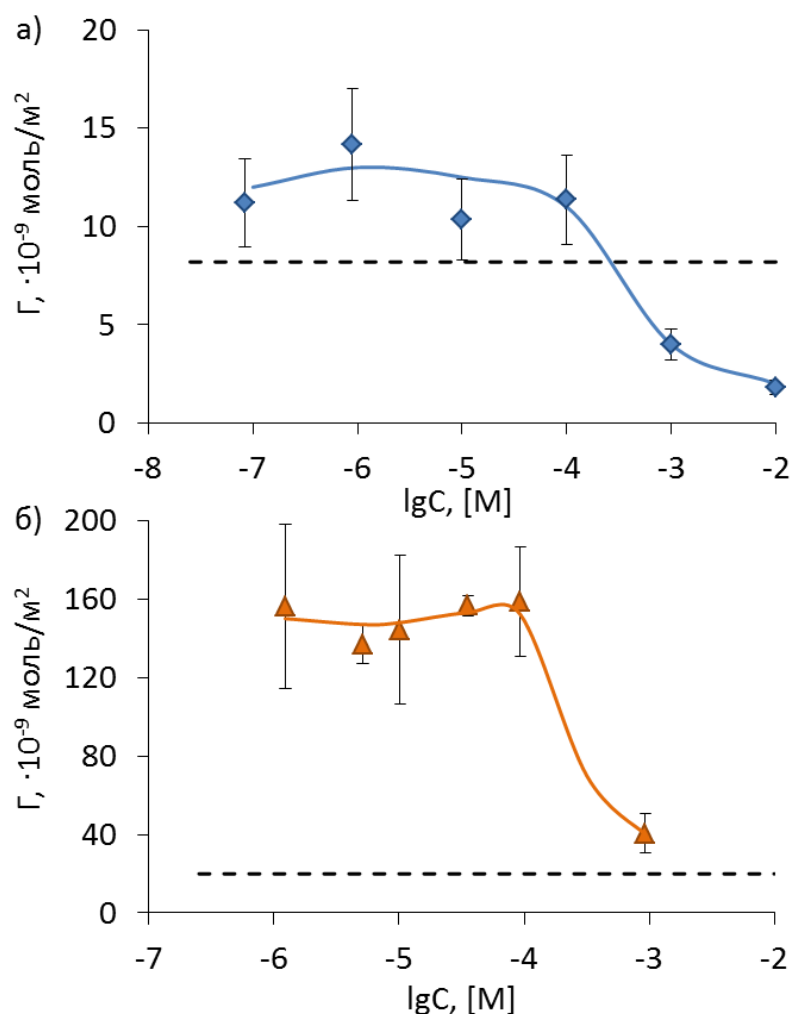


Рис. 19. Зависимость адсорбции лизоцима из смеси Lz – SDS с концентрацией белка 0,01 г/л (а) и 0,1 г/л (б) от концентрации SDS. Пунктирные линии – адсорбция индивидуального Lz.

Адсорбция лизоцима из бинарных растворов с SDS при концентрации белка 0,1 г/л в области концентраций SDS  $10^{-6} - 10^{-4}$  превышает адсорбцию индивидуального белка в 8 раз. Адсорбция Lz достигает величины, превышающей максимальную адсорбцию при формировании насыщенного монослоя из вертикально ориентированных глобул. По-видимому, в данной системе образуются полимолекулярные слои. Дальнейшее увеличение концентрации ПАВ приводит к снижению адсорбции белка.

Во второй серии экспериментов по изучению адсорбции методом сцинтилирующей фазы тритиевую метку содержали молекулы ПАВ. Адсорбция индивидуальных ПАВ с ростом концентрации увеличивается, достигает постоянной величины, а затем снова возрастает при концентрации DTAB свыше  $10^{-3}$  М и SDS более  $2 \cdot 10^{-4}$  М. Рост адсорбции при высоких концентрациях ПАВ, фиксируемый

методом сцинтиллирующей фазы, может быть связан с образованием предмицеллярных агрегатов и мицелл и солюбилизацией в них органического сцинтиллятора. В дальнейшем проводили анализ адсорбции ПАВ в области формирования мономолекулярного слоя.

В системе Lz – DTAB при концентрации лизоцима 0,01 г/л присутствие белка практически не влияет на адсорбцию ПАВ (рис. 20а). При концентрации белка в смеси 0,1 г/л адсорбция DTAB возрастает при концентрации ПАВ выше  $10^{-4}$  М. Рост адсорбции DTAB наблюдается при той же концентрации, при которой адсорбция лизоцима снижается (рис. 18б). Происходит вытеснение Lz из адсорбционного слоя как за счет конкурентной адсорбции с DTAB, так и за счет гидрофиллизации комплекса Lz – DTAB, происходящей при взаимодействии ПАВ с белком по механизму гидрофобного связывания. Снижение адсорбции до величин, превышающих адсорбцию индивидуального белка, указывает на незначительную гидрофиллизацию лизоцима.

Добавки Lz к раствору SDS слабо влияют на адсорбцию ПАВ при концентрации ниже  $3 \cdot 10^{-5}$  М (рис. 20б). При более высоких концентрациях ПАВ адсорбция SDS из бинарного раствора превышает адсорбцию индивидуального ПАВ. Поскольку уменьшение адсорбции лизоцима происходит только при концентрации SDS выше  $10^{-4}$  М, то в диапазоне концентраций  $3 \cdot 10^{-5} - 10^{-4}$  М наблюдается синергетический эффект при адсорбции: адсорбция и Lz, и SDS превышает соответствующую величину для индивидуальных веществ.

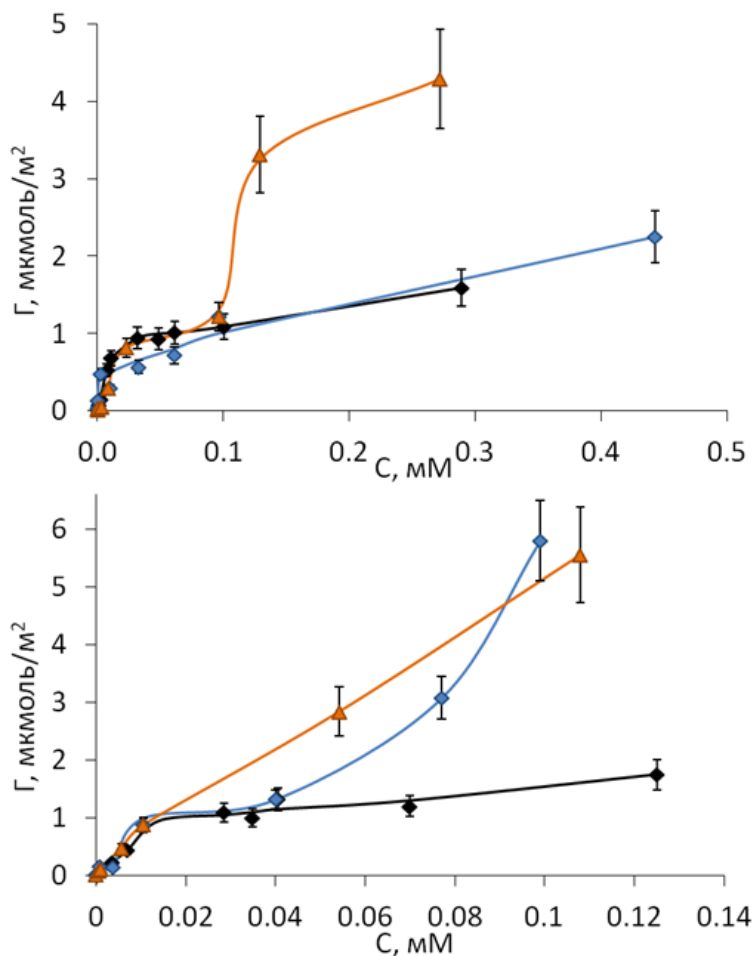


Рис. 20. Изотерма адсорбции DTAB(а) и SDS (б) из индивидуального раствора (♦) и из смеси с лизоцимом с концентрацией Lz 0,01 г/л (◆) и 0,1 г/л (▲).

При добавлении как катионного, так и анионного ПАВ к раствору Lz, в области низких концентраций (до  $10^{-6}$  М) происходит увеличение величин адсорбции (рис. 18, 19) и коэффициентов распределения белка (рис. 14). Полученные результаты указывают на формирование гидрофобного комплекса, растворимость которого в органической фазе и адсорбция на межфазной поверхности выше, чем у индивидуального Lz.

Формирование гидрофобного комплекса Lz – DTAB может происходить следующим образом. Молекула белка содержит в своей структуре кислотные и основные фрагменты, которые в водных растворах при pH близких к нейтральным могут иметь отрицательный и положительный заряд соответственно. На рис. 21а представлено распределение заряда по поверхности лизоцима согласно [41], а на рис. 21б показано расположение COOH и NH<sub>2</sub>-групп в глобуле лизоцима, основанное на пространственных координатах аминокислот, полученных из базы

данных белков (PDB код: 2LYZ, [210]). В результате доступности и кислотных, и основных групп, как катионное, так и анионное ПАВ имеют возможность взаимодействовать с лизоцимом за счет электростатического притяжения полярных групп.

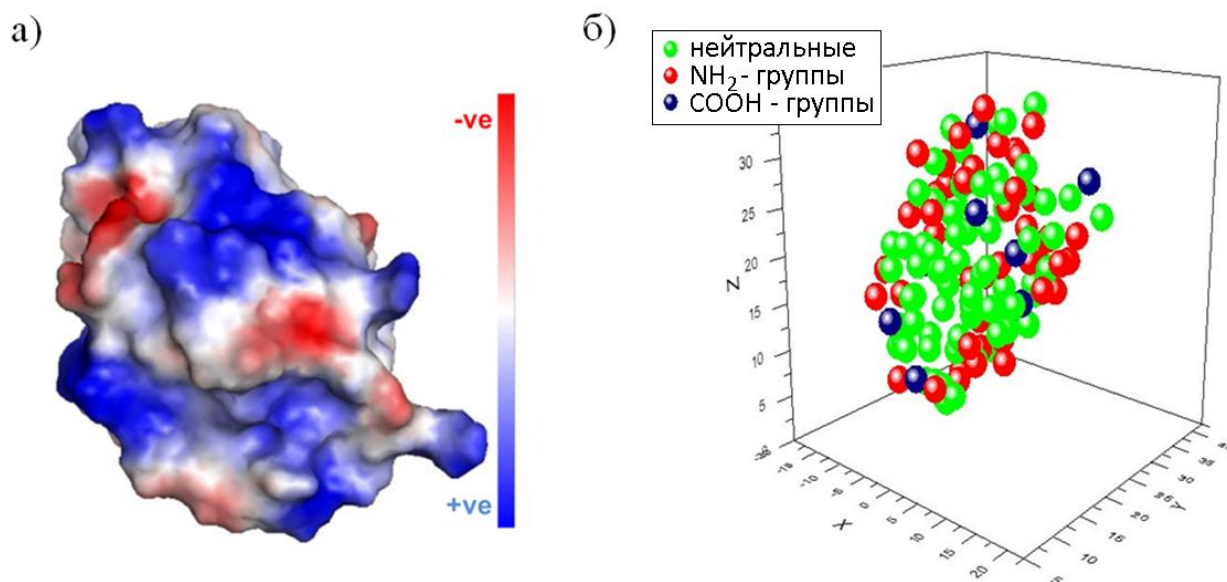


Рис. 21. Пространственное распределение зарядов по поверхности макромолекулы лизоцима (а) [41], а также пространственное расположение COOH и NH<sub>2</sub>-групп в молекуле лизоцима (б).

Как уже отмечалось ранее, глобула лизоцима в водных растворах при pH ниже изоэлектрической точки ( $pI = 11$ ) заряжена положительно. Однако следует отметить, что все эксперименты в данной работе проводили в солевом фосфатном буфере с ионной силой 0,15 М, которая соответствует физиологическому раствору и создается за счет добавления NaCl. Хлорид ионы, находящиеся в большом избытке, способны адсорбироваться на поверхности белка, вызывая её перезарядку. Измеренные нами величины электрофоретической подвижности лизоцима ( $(-0,32 \pm 0,06) \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ ) и электрокинетического потенциала ( $-4,31 \pm 0,03 \text{ мВ}$ ) показали отрицательные значения. Полученный результат согласуется и с литературными данными [47 – 49]: в [48] отмечалось изменение электрофоретической подвижности белка с  $+0,15 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$  в водном растворе до  $-0,2 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$  при увеличении концентрации NaCl до 0,15 М (рис. 22).

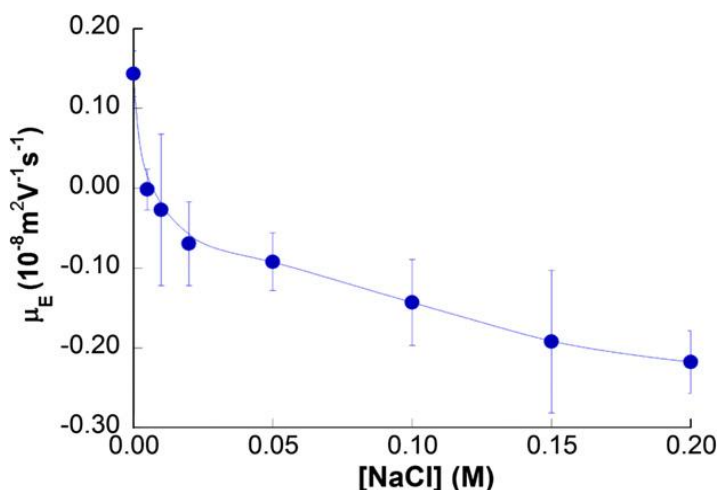


Рис. 22. Электрофоретическая подвижность лизоцима в зависимости от концентрации соли [48].

Соответственно, возможно электростатическое притяжение между поверхностно-активным катионом и белком. Получено, что добавки DTAB не влияют на значение  $\zeta$ -потенциала лизоцима во всем изученном диапазоне концентраций:  $\zeta$ -потенциал составляет  $-4,37 \pm 0,04$  мВ. Это возможно, если совместно с  $\text{DTA}^+$  внутрь границы скольжения входят противоионы. В изученной системе концентрация NaCl существенно превышает концентрацию DTAB, поэтому в качестве противоионов могут выступать не только  $\text{Br}^-$ , но и  $\text{Cl}^-$ . При взаимодействии полярной группы DTAB с Lz углеводородные цепи ПАВ обращаются в сторону водного раствора, в результате чего образуется комплекс белок – ПАВ более гидрофобный, чем нативный белок.

В системах Lz – SDS  $\zeta$ -потенциал частиц составляет  $-4,71 \pm 0,03$  мВ при всех концентрациях ПАВ. Рост гидрофобности лизоцима при сохранении  $\zeta$ -потенциала может происходить в результате замещения хлорид-анионов в двойном электрическом слое на анионы додецилсульфата.

Увеличение концентрации ПАВ в водном растворе приводит к снижению адсорбции и коэффициента распределения лизоцима до значений, соответствующих индивидуальному белку. Полученные результаты могут быть связаны с гидрофиллизацией комплекса Lz – ПАВ при взаимодействии белка и ПАВ по механизму гидрофобного связывания.

В системе Lz – DTAB гидрофиллизация начинается при мольном соотношении DTAB:Lz в водной фазе 1:1 в разбавленном растворе белка ( $C_{Lz} = 0,01$  г/л) и

при соотношении ДТАВ:Lz = 10:1 в более концентрированном растворе ( $C_{Lz} = 0,1$  г/л). При этом соотношение ДТАВ:Lz в адсорбционном слое в обоих случаях близко к 10:1, поэтому можно предположить, что состав гидрофобного комплекса соответствует стехиометрии ДТАВ:Lz = 10:1.

В системе Lz – SDS уменьшение адсорбции лизоцима происходит при концентрации SDS  $10^{-4}$  М, что соответствует мольному соотношению SDS:Lz в водном растворе 140:1 ( $C_{Lz} = 0,01$  г/л) и 14:1 ( $C_{Lz} = 0,1$  г/л). При этом адсорбционные слои обогащены молекулами ПАВ: мольное соотношение SDS:Lz в слое  $\approx 300:1$  ( $C_{Lz} = 0,01$  г/л) и 30:1 ( $C_{Lz} = 0,1$  г/л).

Данные метода сцинтиллирующей фазы позволяют изучить зависимость состава адсорбционного слоя от состава раствора (рис. 23). Определены мольные доли ПАВ в смеси в адсорбционном слое  $X_S$  в зависимости от мольной доли ПАВ в смеси в водном растворе  $X_V$ . Найдено, что межфазные слои обогащены молекулами ПАВ во всем изученном диапазоне концентраций. Даже при  $C_{ПАВ} < C_{Lz}$  слои формируются с избыточным содержанием ПАВ по отношению к белку. С ростом концентрации лизоцима мольная доля ДТАВ в смеси в адсорбционном слое уменьшается, а SDS – не меняется. Для смеси Lz – SDS изменение  $X_V$  от 0,5 до 0,9 не влияет на состав адсорбционного слоя:  $X_S = 0,9$ , что соответствует мольному соотношению SDS:Lz = 9:1.

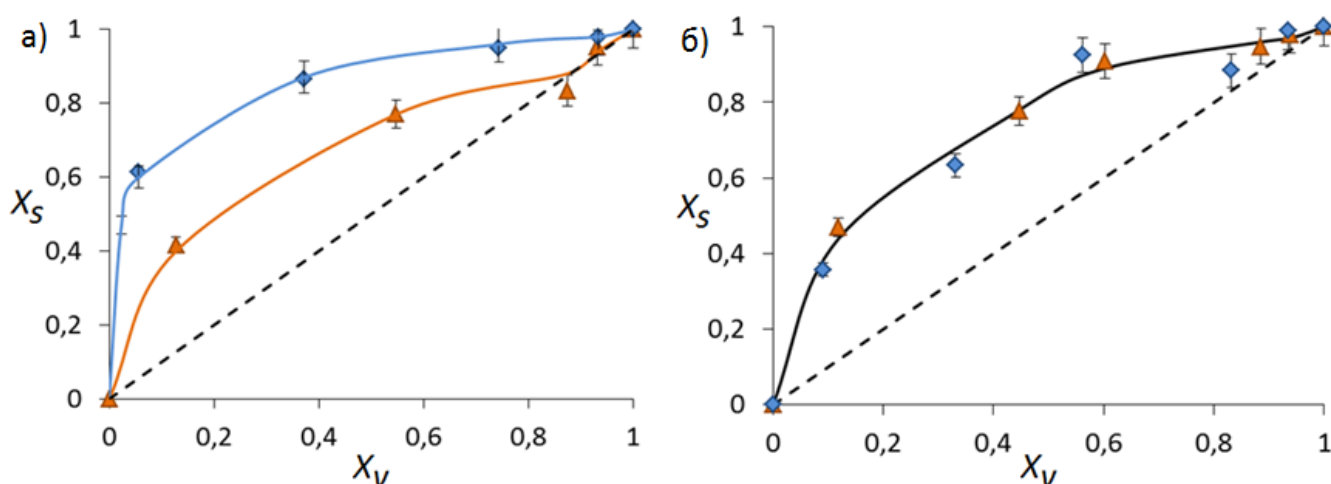


Рис. 23. Зависимость состава адсорбционного слоя смеси Lz – ДТАВ (а) и Lz – SDS (б) с концентрацией Lz 0,01 г/л (◆) и 0,1 г/л (▲) от состава раствора.

В системе Lz – САРВ при добавлении ПАВ к раствору лизоцима, адсорбция белка практически не меняется (в пределах ошибки эксперимента). Лизоцим сохраняет свое присутствие в адсорбционном слое даже при многократном избытке ПАВ в растворе (рис. 24).

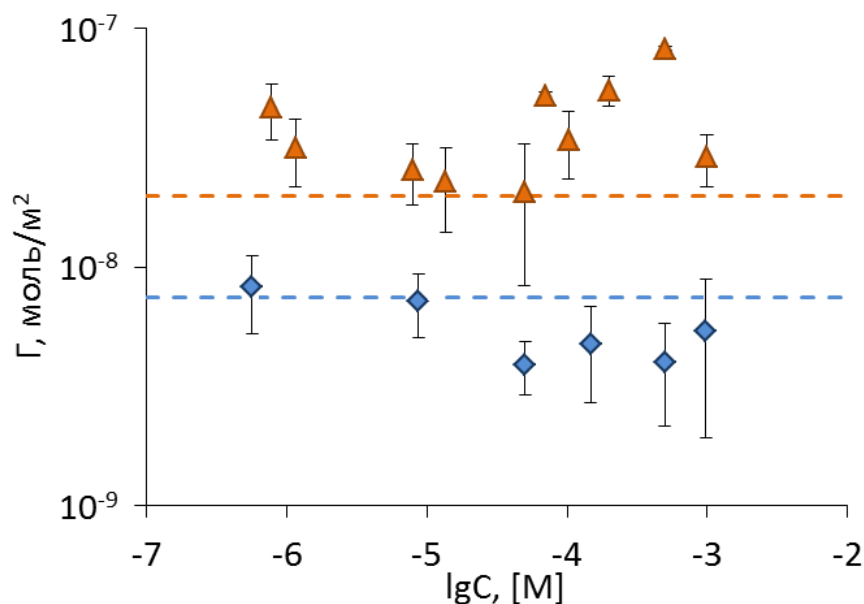


Рис. 24. Зависимость адсорбции лизоцима из смеси Lz – САРВ с концентрацией белка 0,01 г/л (а) и 0,1 г/л (б) от концентрации САРВ. Пунктирные линии – адсорбция индивидуального Lz.

Обращает на себя внимание большой разброс данных по коэффициентам распределения и адсорбции Lz при добавлении САРВ. Это не является ошибкой метода, поскольку при добавлении других ПАВ (DTAB и SDS) воспроизводимость данных оставалась высокой. Большой разброс можно объяснить особенностями САРВ, который не является индивидуальным веществом, а представляет собой смесь гомологов. Как известно, интенсивность гидрофобных взаимодействий сильно зависит от длины цепи ПАВ, чем длиннее цепь, тем при меньших концентрациях начинается агрегирование. Поэтому в растворе возможно одновременное образование как гидрофобных агрегатов (взаимодействующих по полярным группам), так и гидрофильных (взаимодействующих по механизму гидрофобного связывания). Такие процессы агрегирования по-разному влияют на величину коэффициента распределения белка между водной и органической фазами и его адсорбцию. Но в среднем, хотя и с большой погрешностью, получено, что распределение и адсорбция белка практически не меняются в присутствии ПАВ.

Адсорбция САРВ на границе вода/октан с ростом концентрации ПАВ сначала растет, при концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М достигает постоянного значения примерно  $1,5$  мкмоль/м<sup>2</sup> и при концентрации  $4 \cdot 10^{-4}$  М происходит дальнейшее увеличение адсорбции (рис. 25). На адсорбцию САРВ практически не влияет присутствие белка, поскольку слои белка разреженные и для адсорбции ПАВ доступна большая площадь поверхности. Кроме того, даже в насыщенном адсорбционном слое на каждую молекулу САРВ приходится большая площадь, которая может быть сокращена за счет конформационных изменений в адсорбированной молекуле ПАВ, а также за счет связывания молекул САРВ с Lz.

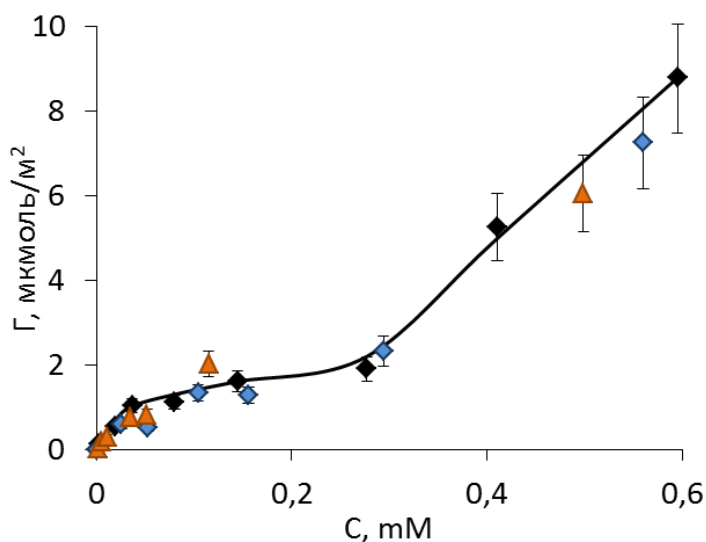


Рис. 25. Изотерма адсорбции САРВ из индивидуального раствора (♦) и из смеси с лизоцимом с концентрацией Lz 0,01 г/л (◆) и 0,1 г/л (▲).

Лизоцим при добавлении САРВ остается на поверхности и не вытесняется из межфазного адсорбционного слоя, несмотря на многократный избыток ПАВ в системе: в адсорбционном слое при концентрации, соответствующей области плато на изотерме адсорбции САРВ, на одну молекулу Lz приходится около ста молекул ПАВ. Такое возможно только при сильном взаимодействии полярных групп ПАВ с белковой глобулой, в результате которого формируется гидрофобный комплекс. Этим можно объяснить и рост коэффициента распределения САРВ в присутствии Lz.



### 3.3. Поверхностное натяжение смесей лизоцим – ПАВ

Методом висящей капли было измерено поверхностное натяжение растворов лизоцима на границе водный раствор/воздух и водный раствор/октан в диапазоне концентраций  $7 \cdot 10^{-9} - 7 \cdot 10^{-5} \text{M}$  (рис. 26).

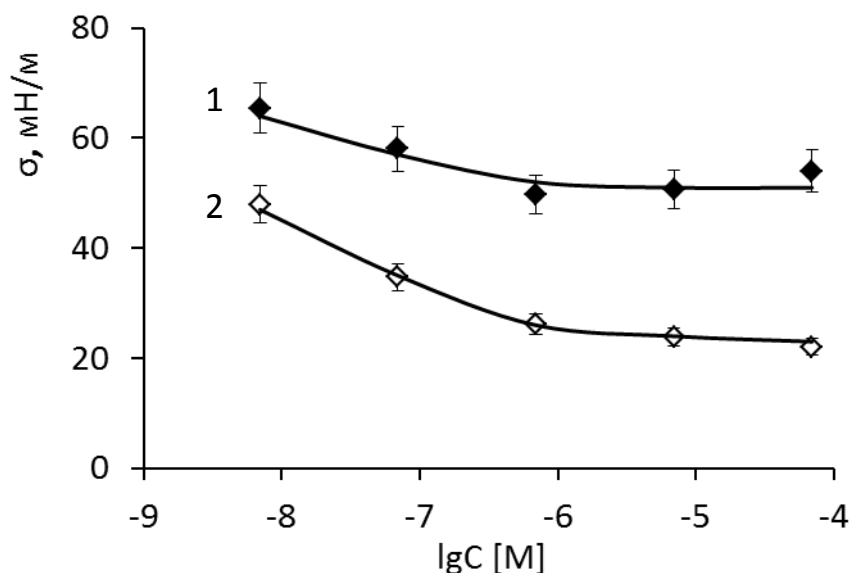


Рис. 26. Изотермы поверхностного натяжения растворов лизоцима на границах водный раствор/воздух (1) и раствор/октан (2).

Как видно из графиков, индивидуальный Lz незначительно снижает поверхностное натяжение: до 50,6 мН/м на границе водный раствор/воздух и до 23,0 мН/м на границе водный раствор/октан при изменении концентрации белка от  $7 \cdot 10^{-9} \text{M}$  до  $7 \cdot 10^{-7} \text{M}$ . При дальнейшем увеличении концентрации белка поверхностное и межфазное натяжение практически не менялись.

Изотермы поверхностного натяжения на границах вода/воздух и вода/октан для растворов индивидуальных ПАВ приведены на рис. 27. Для того чтобы выяснить, изменились ли поверхностные свойства меченого CAPB после экстракционной очистки, были получены изотермы поверхностного натяжения исходного и экстрагированного образца. Для этого раствор исходного ПАВ подвергли восьми последовательным экстракциям в гептан, высушили полученное вещество, приготовили растворы из экстрагированного CAPB и измерили их поверхностное натяжение. На рис. 27в величины поверхностного натяжения исходного CAPB представлены ромбами, а CAPB после экстракционной очистки – треугольниками. Ус-

тановлено, что изотермы для исходного САРВ и очищенного экстракцией полностью совпадают. Полученные результаты можно объяснить тем, что значения коэффициентов распределения САРВ в системе вода/октан малы; это ПАВ относится к водорастворимым и его концентрация в октане примерно в 100 – 1000 раз меньше, чем в воде (рис. 17). Соответственно, при экстракционной очистке ПАВ происходит незначительная убыль массы вещества, что не сказывается на его поверхностных свойствах (рис. 27в).

Изотермы поверхностного натяжения для индивидуальных ПАВ в домицеллярной области концентраций были обработаны по уравнению Шишковского (3-1), определена максимальная адсорбция  $\Gamma_{max} = \frac{b}{RT}$  и площадь, приходящаяся на молекулу в насыщенном слое,  $S_1 = \frac{1}{N_A \cdot \Gamma_{max}}$  (таблица 2).

$$\sigma = \sigma_0 - b \cdot \ln(AC + 1) \quad (3-1),$$

где  $\sigma_0$  – поверхностное натяжение буферного раствора, мН/м,  $b$  [мН/м] и  $A$  [л/моль] – константы уравнения Шишковского. Параметр  $A$  представляет собой адсорбционную активность ПАВ.

Расчетные кривые (пунктирные линии на рис. 27) описывают экспериментальные данные с коэффициентами корреляции от 0,96 до 0,99.

Таблица 2.

Параметры адсорбционных слоев индивидуальных ПАВ на границах водный раствор/воздух и раствор/октан.

	<b>DTAB</b>		<b>SDS</b>		<b>САРВ</b>	
	вода/воздух	вода/октан	вода/воздух	вода/октан	вода/воздух	вода/октан
ККМ, моль/л	$10^{-2}$		$10^{-2}$		$10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-4}$
$A$ , л/моль	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(1,7 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(1,3 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(5,5 \pm 2,5) \cdot 10^3$	$(4,0 \pm 2,1) \cdot 10^3$	$(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^5$
$b$ , мН/м	$12,4 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,1$	$11,8 \pm 3,2$	$11,0 \pm 1,7$	$12,0 \pm 0,1$	$11,0 \pm 1,0$
$\Gamma_{max}$ , мкмоль/м <sup>2</sup>	$5,0 \pm 0,1$	$2,71 \pm 0,03$	$4,8 \pm 1,3$	$4,5 \pm 0,7$	$4,90 \pm 0,02$	$4,3 \pm 0,4$
$S_1$ , нм <sup>2</sup>	$0,33 \pm 0,01$	$0,62 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,09$	$0,37 \pm 0,06$	$0,34 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,04$

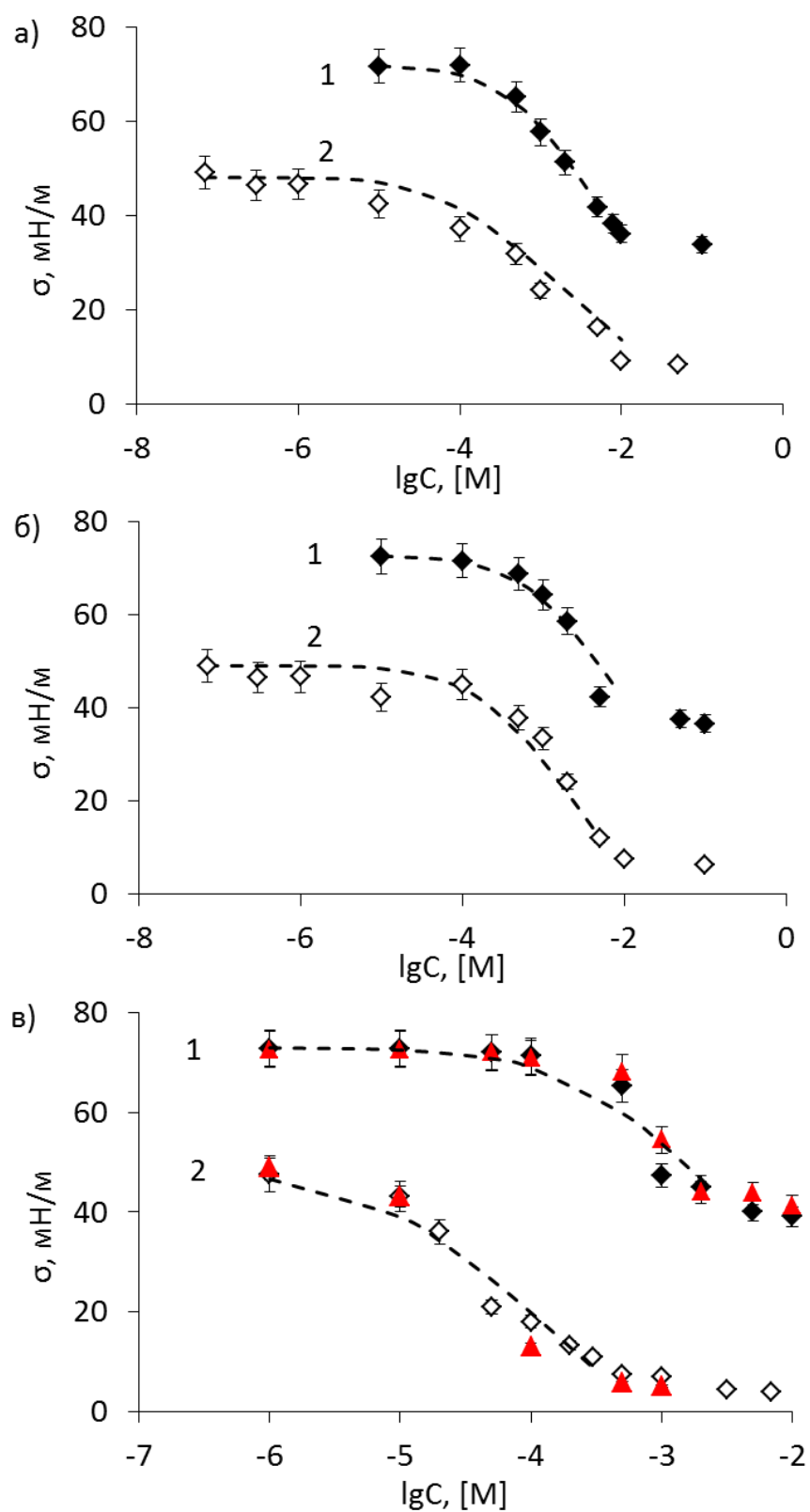


Рис. 27. Изотермы поверхностного натяжения водных растворов DTAB (а), SDS (б), CAPB (в) на границах с воздухом (1) и октаном (2).

Согласно литературным данным, площадь на молекулу в насыщенном адсорбционном слое составляет для DTAB 0,56 – 0,74 нм<sup>2</sup> [202, 211, 212] и для SDS 0,40 – 0,60 нм<sup>2</sup> [1, 202]. Полученные нами значения несколько ниже литературных данных, что может быть связано с присутствием соли в фосфатном буфере. Увеличение концентрации соли ослабляет электростатическое отталкивание между поверхностно-активными ионами в адсорбционном слое и способствует уменьшению площади, приходящейся на молекулу ПАВ. Для всех систем адсорбционная активность  $A$  на границе с октаном выше, чем на границе с воздухом.

Расчет для CAPB проводился в предположении, что ПАВ является индивидуальным веществом. Как известно, данное вещество, получаемое из природного сырья, представляет собой смесь гомологов с длиной углеводородной цепи C<sub>8</sub>–C<sub>16</sub> [1, 194]. В настоящей работе точный состав CAPB не определяли, поэтому проведенный расчет является оценочным. Получено, что на границе с октаном CAPB проявляет большую адсорбционную активность, чем на границе с воздухом и поверхностное натяжение выходит на постоянное значение при меньших концентрациях ПАВ (рис. 27, таблица 2). Последний результат можно объяснить влиянием октана на формирование предмицеллярных агрегатов и мицелл в водном растворе CAPB. Несмотря на малую растворимость октана в воде, в присутствии белка и ПАВ растворимость повышается, и молекулы октана могут инициировать формирование мицелл в водном растворе.

Для DTAB и SDS было проведено сопоставление величин адсорбции, полученных методом сцинтиллирующей фазы с адсорбцией, рассчитанной при совместном решении уравнений Гиббса и Шишковского с использованием констант, приведенных в таблице 2 (рис. 28). Расчет проводили по уравнению:

$$\Gamma = \frac{b}{RT} \cdot \frac{AC}{AC+1} \quad (3-2),$$

где  $R$  – универсальная газовая постоянная, Дж/(К·моль),  $T$  – абсолютная температура, К. Для расчета использовали уравнение Гиббса для неионогенных ПАВ, поскольку исследуемые растворы были приготовлены с использованием солевого

фосфатного буфера с ионной силой 0,15 М. В избытке электролита подавляется диссоциация ионогенных ПАВ.

В области малых концентраций ПАВ достигнуто согласие между расчетом и экспериментом с коэффициентами корреляции 0,87 (DTAB) и 0,95 (SDS), что указывает на корректность определения адсорбции методом сцинтиллирующей фазы.

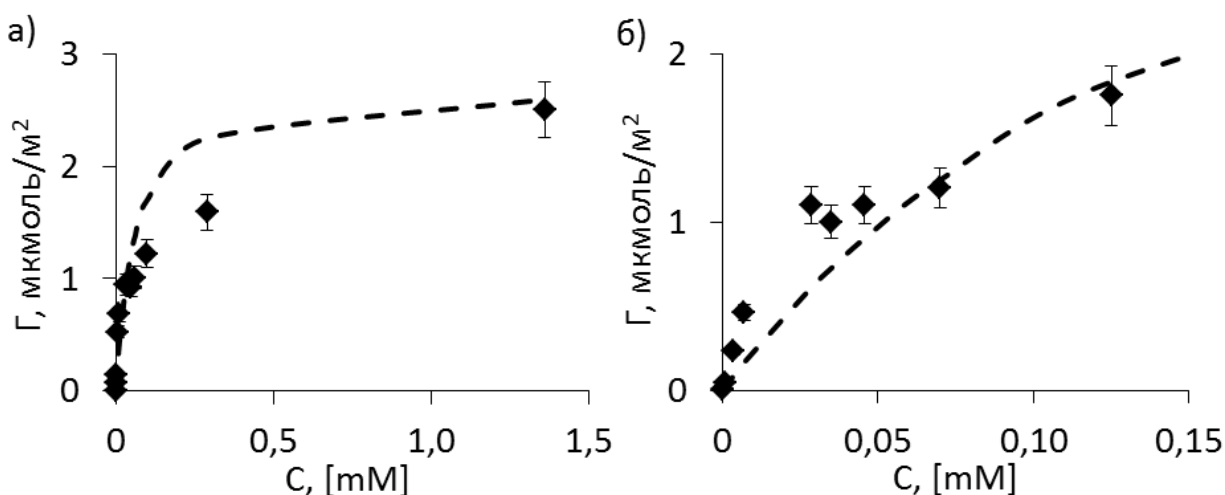


Рис. 28. Адсорбция DTAB (а) и SDS (б) на границе вода/октан. Пунктирные линии – расчет по уравнению (3-2).

Для CAPB метод сцинтиллирующей фазы дает значения адсорбции в области плато 1,7  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ , что существенно меньше величины максимальной адсорбции, полученной из расчета по уравнению Гиббса (таблица 2,  $\Gamma_{\text{max}} = 4,2$   $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ). Обнаруженные расхождения могут быть вызваны некорректностью термодинамического расчета, поскольку CAPB представляет собой не индивидуальное вещество, а смесь гомологов.

Изотермы поверхностного натяжения для смесей Lz – ПАВ приведены на рисунках 29, 31, 33 – 35.

Сопоставление рисунков 26 и 29 показывает, что для системы лизоцим – DTAB, начальный участок кривых соответствует значениям поверхностного натяжения чистого лизоцима. По мере увеличения концентрации DTAB поверхностное натяжение снижается до значений, соответствующих натяжению чистого DTAB. Снижение натяжения происходит в той же области концентраций, что и у индивидуального DTAB (см. рис. 27). Постоянные значения поверхностного на-

тяжения смесей Lz – DTAB достигаются при концентрациях, немного меньших ККМ DTAB. Для границы водный раствор/воздух увеличение концентрации Lz в растворе не влияет на поверхностное натяжение (все три серии растворов с концентрацией белка 0,01, 0,1 и 1 г/л описываются одной изотермой). На границе с октаном рост концентрации белка приводит к заметному снижению межфазного натяжения.

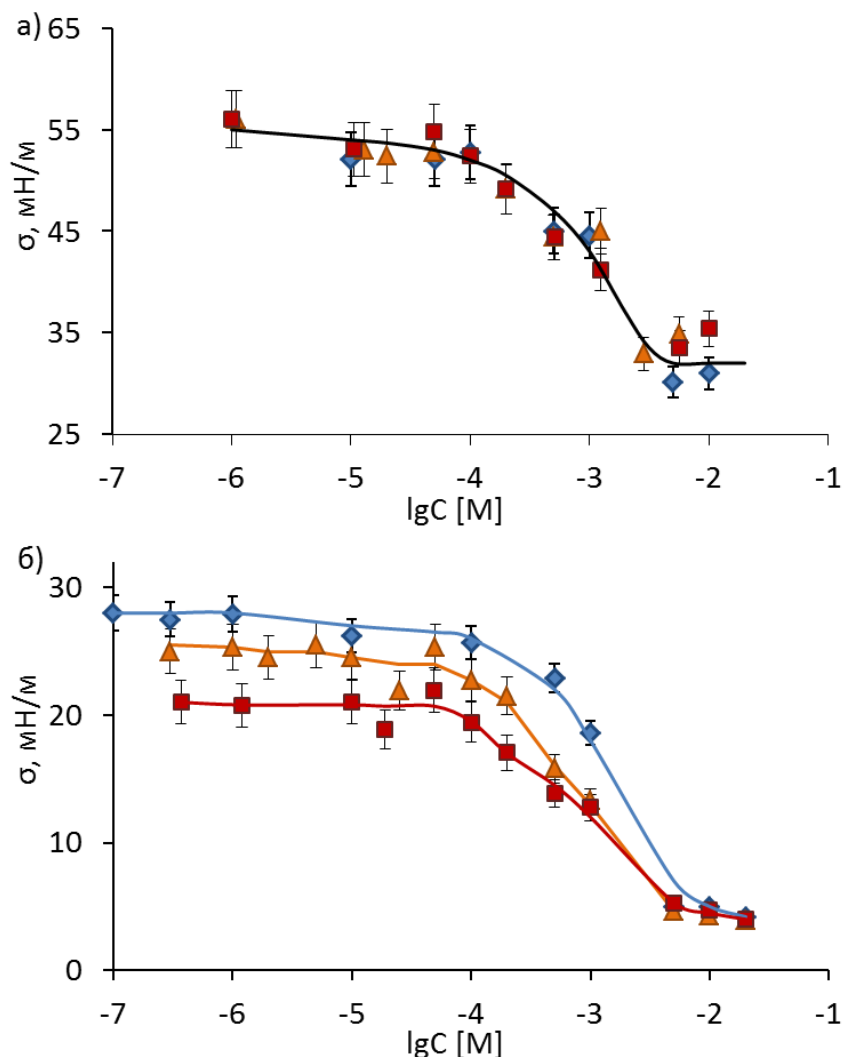


Рис. 29. Изотермы поверхностного натяжения смесей Lz – DTAB с концентрацией белка 0,01 г/л ( $\blacklozenge$ ), 0,1 г/л ( $\blacktriangle$ ) и 1 г/л ( $\blacksquare$ ) на границе водный раствор/воздух (а) и раствор/октан (б).

Сопоставление влияния ПАВ на величины межфазного натяжения, адсорбции и коэффициентов распределения белка показывает, что при концентрации DTAB меньше  $10^{-6}$  М формирование гидрофобного комплекса не вызывает уменьшения межфазного натяжения. Межфазное натяжение начинает снижаться

при концентрации ДТАВ  $10^{-4}$  М, когда происходит вытеснение Lz из адсорбционного слоя и рост адсорбции ДТАВ; слой заполняется молекулами ДТАВ, способными сильнее снизить межфазное натяжение, чем белок. Можно предположить, что в области концентраций ПАВ  $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  М происходит постепенная гидрофилизация комплекса Lz – ДТАВ, и при концентрации ДТАВ выше  $10^{-4}$  М адсорбция комплексов Lz – ДТАВ снижается и становится меньше, чем адсорбция индивидуального Lz. На рис. 30 представлена схема формирования гидрофобного комплекса между катионным ПАВ и белком, содержащим адсорбированные хлорид-ионы, а затем его последовательная гидрофилизация.

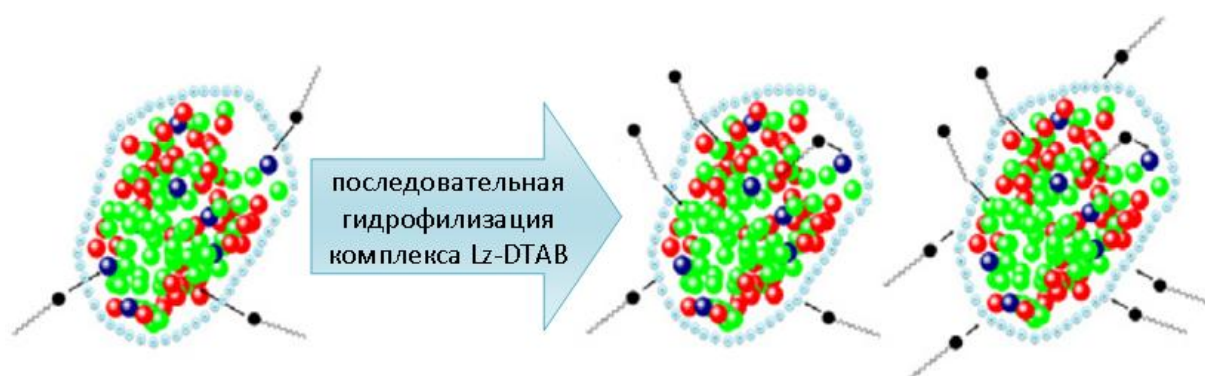


Рис. 30. Формирование комплексов белок – ДТАВ.

Начиная с концентрации ДТАВ  $5 \cdot 10^{-3}$  М, поверхностное натяжение смесей Lz – ПАВ перестает снижаться и выходит на постоянное значение, что свидетельствует о мицеллообразовании ПАВ в водном растворе.

Для смесей Lz – SDS значение поверхностного натяжения при концентрации SDS менее  $10^{-5}$  М соответствует натяжению чистого лизоцима (рис. 31). Как и в случае смеси Lz – ДТАВ, формирование гидрофобного комплекса не влияет на поверхностное натяжение в области малых концентраций ПАВ.

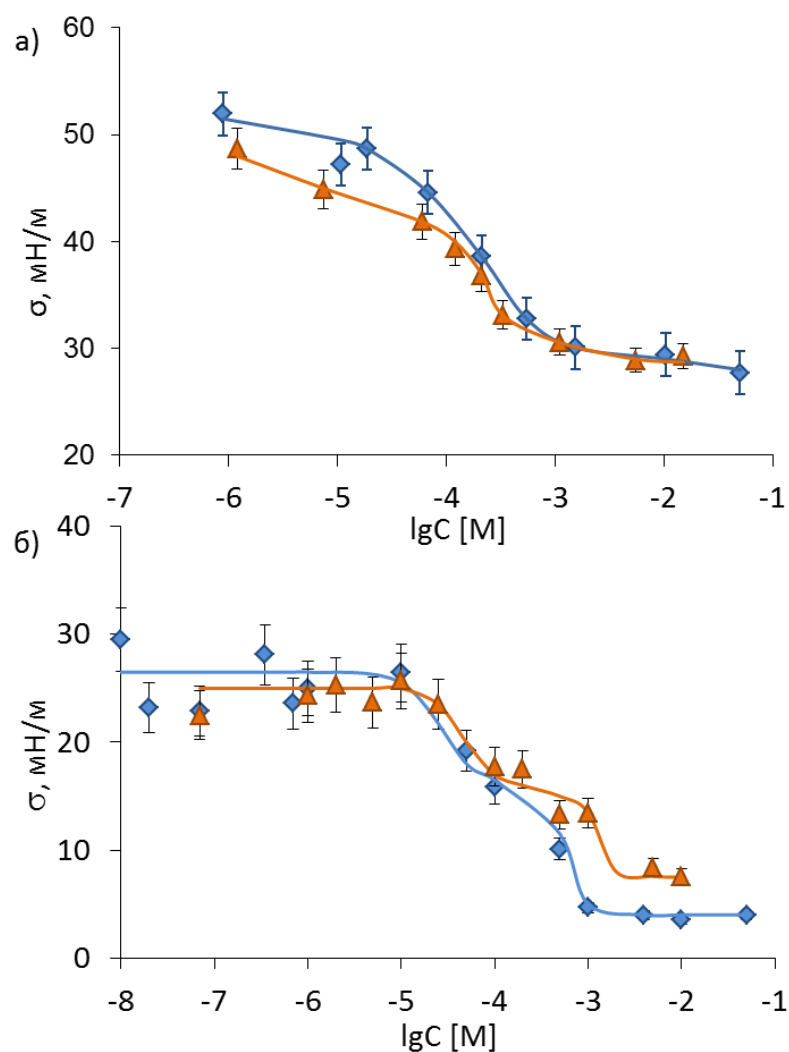


Рис. 31. Изотермы поверхностного натяжения смесей Lz – SDS с концентрацией белка 0,01 г/л (♦) и 0,1 г/л (▲) на границе водный раствор/воздух (а) и раствор/октан (б).

В отличие от смеси с DTAB, межфазное натяжение смешанного раствора Lz – SDS начинает снижаться при концентрации  $10^{-5}$  М, на порядок меньшей, чем у индивидуального SDS. Начало снижения межфазного натяжения соответствует мольному соотношению в водной фазе SDS:Lz  $\approx 10:1$  для растворов белка концентрацией  $C_{Lz} = 0,01$  г/л, SDS:Lz = 1:1 в растворах  $C_{Lz} = 0,1$  г/л и 1 г/л. При этом соотношение SDS:Lz в адсорбционном слое составляет 9:1 ( $C_{Lz} = 0,01$  г/л) и 8:1 ( $C_{Lz} = 0,1$  г/л). По-видимому, указанные соотношения SDS:Lz соответствуют стехиометрии гидрофобного комплекса. При концентрации ПАВ  $10^{-5}$  М лизоцим сохраняет свое присутствие в адсорбционном слое, и величина его адсорбции превышает соответствующее значение для индивидуального белка (рис. 19). Адсорбция SDS из бинарного раствора, начиная с концентрации ПАВ  $3 \cdot 10^{-5}$  М, увеличи-



вается и превышает адсорбцию индивидуального SDS (рис. 20б). Это значит, что в области концентраций SDS  $10^{-6} - 10^{-4}$  М происходит совместная адсорбция гидрофобного комплекса Lz – SDS и молекул SDS. Схема процесса представлена на рис. 32.

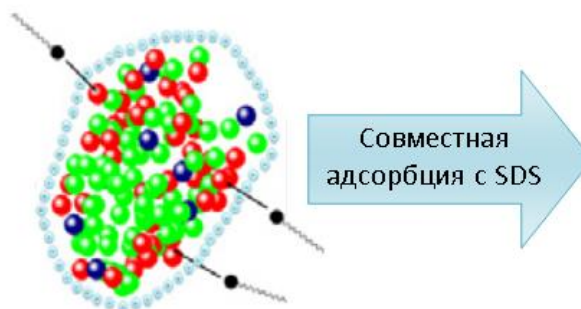


Рис. 32. Формирование гидрофобного комплекса Lz – SDS.

При дальнейшем увеличении концентрации SDS на изотермах межфазного натяжения на границе с октаном в области концентраций ПАВ  $10^{-4} - 10^{-3}$  М наблюдается слабо выраженное плато, после которого происходит дальнейшее снижение натяжения до постоянной величины при  $10^{-3} - 5 \cdot 10^{-3}$  М. Согласно литературным данным [1, 67, 78], наличие плато на изотермах поверхностного натяжения смесей полимер – ПАВ и белок – ПАВ может свидетельствовать об образовании ассоциатов между компонентами в водном растворе. В нашем случае ассоциат представляет собой гидрофильный комплекс Lz – SDS, образующийся по механизму гидрофобного связывания. Адсорбция Lz из бинарного раствора начинает снижаться при концентрации SDS выше  $10^{-4}$  М, что согласуется с предположением о формировании гидрофильного комплекса в этой области концентраций SDS.

При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ поверхностное натяжение снижается до постоянных значений, меньших поверхностного натяжения индивидуального SDS; выход на постоянные значения происходит при концентрациях, существенно меньших ККМ SDS. Последний результат позволяет сделать вывод о том, что белок индуцирует мицеллообразование в растворах SDS.

Для смесей Lz – SDS с концентрацией белка 1 г/л изотермы межфазного натяжения имеют вид, отличный от изотерм для других концентраций белка

(рис. 33). В области концентраций SDS  $2 \cdot 10^{-4} - 10^{-3}$  М в водном растворе выпадает осадок Lz – SDS, что приводит к снижению концентрации веществ в объеме фаз и на межфазной поверхности. Поверхностное натяжение в этой области концентраций возрастает, а потом снова снижается после растворения осадка.

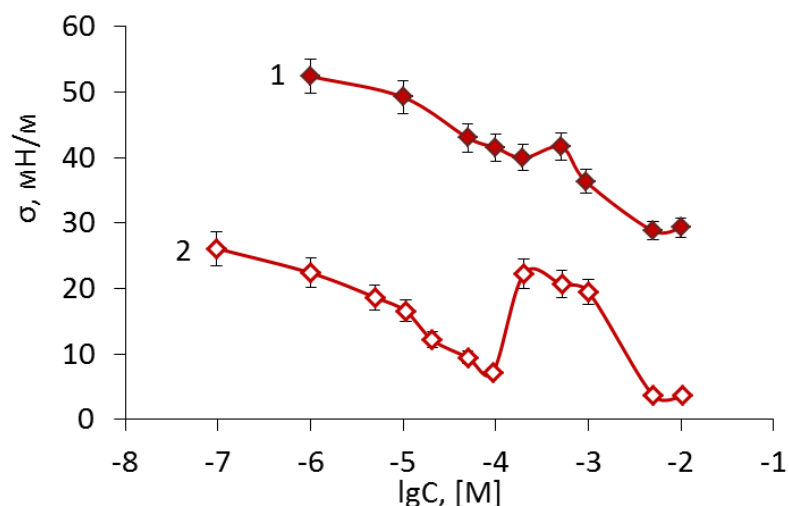


Рис. 33. Изотермы поверхностного натяжения смесей Lz – SDS с концентрацией Lz 1 г/л на границе раствор/воздух (1) и раствор/октан (2).

Формирование осадка начинается при мольном соотношении SDS:Lz в водном растворе  $\approx 1:1$ , а его растворение происходит при соотношении SDS:Lz  $\approx 15:1$ . Полученный результат хорошо согласуется с литературными данными, согласно которым при добавлении SDS к раствору Lz 1 г/л осадок начинает образовываться при мольном соотношении SDS:Lz = 1:1, а растворяется при SDS:Lz  $\geq 19:1$  [14, 20, 23 – 25]. В цитируемых работах изучали водные растворы с низкой ионной силой и полагали, что в осадок выпадает электронейтральный комплекс со стехиометрией Lz(SDS)<sub>8</sub>. Повторное растворение осадка достигается при избыточном связывании анионного ПАВ с комплексом, после полной компенсации заряда Lz (общее число положительно заряженных групп на макромолекуле Lz 19).

Для смесей Lz – CAPB на начальных участках изотерм межфазного натяжения ( $C 10^{-6} - 10^{-5}$  М) значения  $\sigma$  соответствуют значениям для индивидуального лизоцима (рис. 26). Затем, при увеличении концентрации CAPB, натяжение снижается и выходит на плато при концентрации  $2 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$  М. С ростом концен-

трации белка область плато расширяется. На изотермах межфазного натяжения на границе вода/октан область плато выражена слабее, чем на изотермах поверхностного натяжения на границе раствор/воздух. При дальнейшем увеличении концентрации САРВ натяжение снова снижается до минимальных значений, соответствующих (для границы вода/октан) или меньших (для границы вода/воздух) натяжениям раствора индивидуального САРВ.

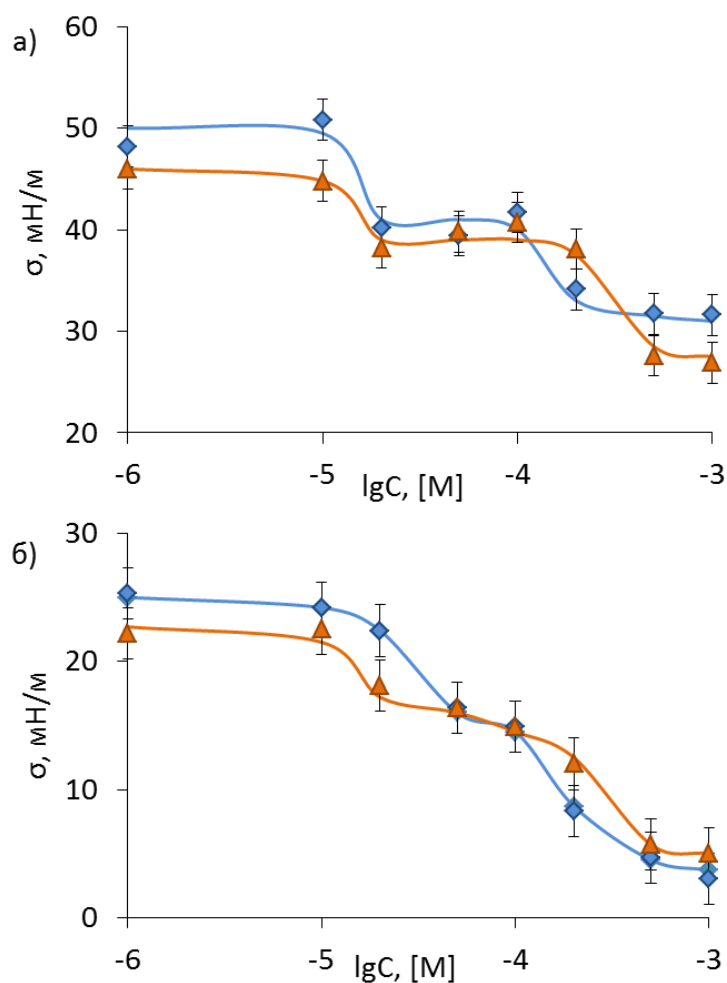


Рис. 34. Изотермы поверхностного натяжения смесей Lz – САРВ с концентрацией белка 0,01 г/л (—◆—) и 0,1 г/л (—▲—) на границе водный раствор/воздух (а) и раствор/октан (б).

Вид изотерм поверхностного натяжения позволяют судить о связывании белка с ПАВ в водном растворе. Начиная с концентрации САРВ  $10^{-5}$  М, поверхностное натяжение смешанных растворов снижается до значений, меньших натяжения индивидуального белка и ПАВ. Такое снижение можно объяснить формированием гидрофобного комплекса белок – ПАВ, образующегося за счет взаимодействия полярных групп белка и ПАВ. После начального снижения, натяжение вы-

ходит на плато. В области плато происходит связывание белка с молекулами ПАВ в водном растворе, количество «свободных» молекул ПАВ остается постоянным, чем и объясняется постоянство поверхностного натяжения. После завершения связывания, наблюдается дальнейшее снижение натяжения и выход на второе плато при концентрации, соответствующей образованию мицелл САРВ в водном растворе.

При концентрации Lz 1 г/л наблюдается резкое снижение поверхностного натяжения при концентрации САРВ  $3 \cdot 10^{-5}$  М, после чего устанавливается примерно постоянное значение  $\sigma$ . Постоянная величина поверхностного натяжения достигается при концентрации САРВ  $10^{-4}$  М, существенно меньшей ККМ (рис. 35). Можно сделать вывод, что лизоцим индуцирует агрегирование САРВ.

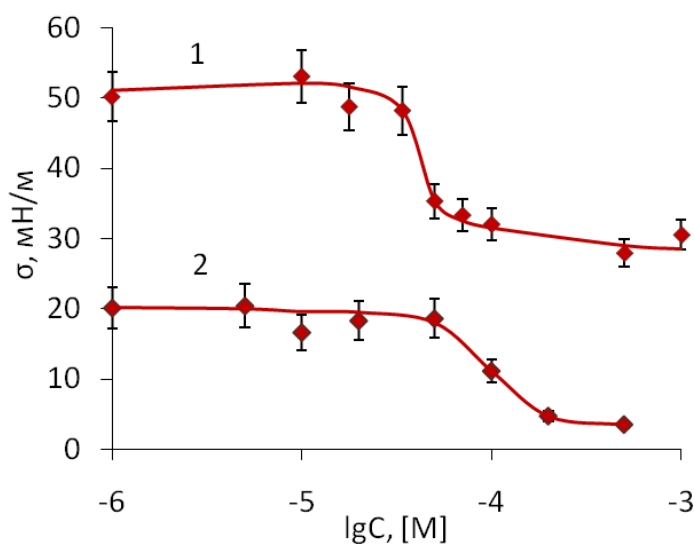


Рис. 35. Изотермы поверхностного натяжения смесей Lz – САРВ с концентрацией белка 1 г/л на границе водный раствор/воздух (1) и раствор/октан (2).

### 3.4. Определение констант взаимодействия белок – ПАВ в адсорбционных слоях по модели Файнермана

Для совместного описания изотерм поверхностного натяжения и адсорбции смесей белок – ПАВ была использована модель Файнермана, описанная в главе 1.2 обзора литературы. В модели учитывается, что молекулы на поверхности занимают определенную площадь и взаимодействуют друг с другом. Площадь, занимаемая молекулами ПАВ на поверхности, определяется из величин макси-

мальной адсорбции (таблица 2) и составляет  $3,7 \cdot 10^5 \text{ м}^2/\text{моль}$  для DTAB и  $2,2 \cdot 10^5 \text{ м}^2/\text{моль}$  для SDS. Площадь, занимаемая молекулами воды на поверхности  $\omega_0 = 4,95 \cdot 10^5 \text{ м}^2/\text{моль}$  [79, 80]. Для макромолекулы лизоцима  $\omega_{min} = 7,72 \cdot 10^6 \text{ м}^2/\text{моль}$  и  $\omega_{max} = 2,54 \cdot 10^7 \text{ м}^2/\text{моль}$  [79, 213], соответственно, среднее значение  $\omega = 1,66 \cdot 10^7 \text{ м}^2/\text{моль}$ .

Для описания адсорбции ПАВ из индивидуальных растворов были использованы уравнения (3-3 – 3-4). Избыток электролита, используемый при приготовлении буферных растворов, приводит к подавлению диссоциации ионогенных ПАВ, поэтому при расчетах использовали уравнения для неионогенных ПАВ:

$$-\frac{\Pi\omega_s}{RT} = \ln(1 - \theta_s) + a_s\theta_s^2 \quad (3-3),$$

$$b_s c_s = \frac{\theta_s}{1 - \theta_s} \exp\{-2a_s\theta_s\} \quad (3-4).$$

Расчет адсорбции и поверхностного натяжения для индивидуальных ПАВ необходим для определения параметра взаимодействия молекул ПАВ в адсорбционном слое  $a_s$ , который в дальнейшем использовали при описании смесей белок – ПАВ. Величины  $a_s$  были подобраны методом наименьших квадратов таким образом, чтобы расчётные изотермы адсорбции (рис. 36) и приведенного двумерного давления (рис. 37) совпадали с экспериментальными значениями.

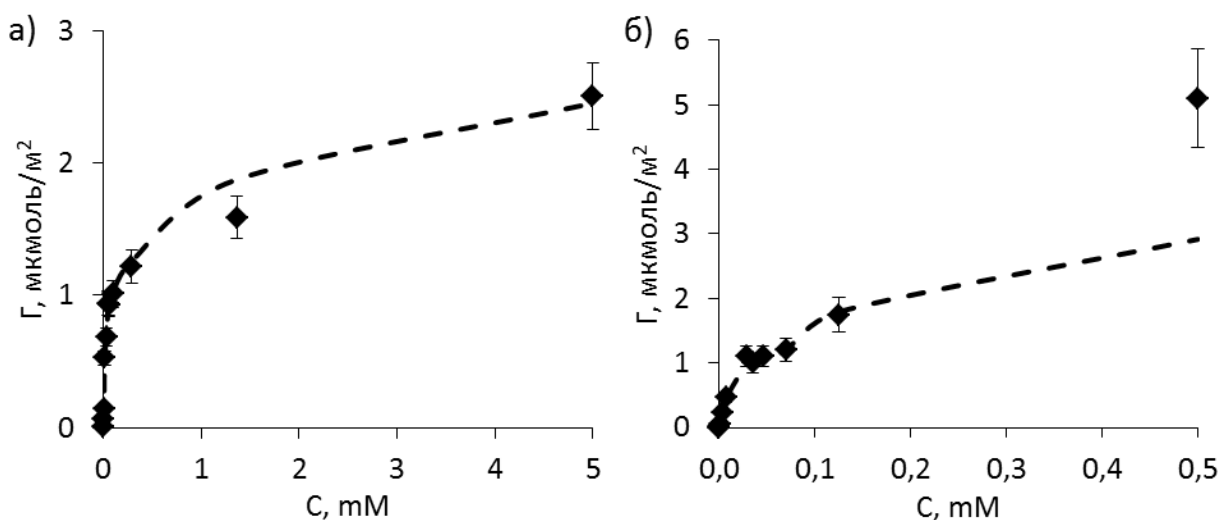


Рис. 36. Адсорбция DTAB (а) и SDS (б) из индивидуальных растворов. Точки (♦) – экспериментальные значения, пунктирные линии – расчет по модели Файнермана.

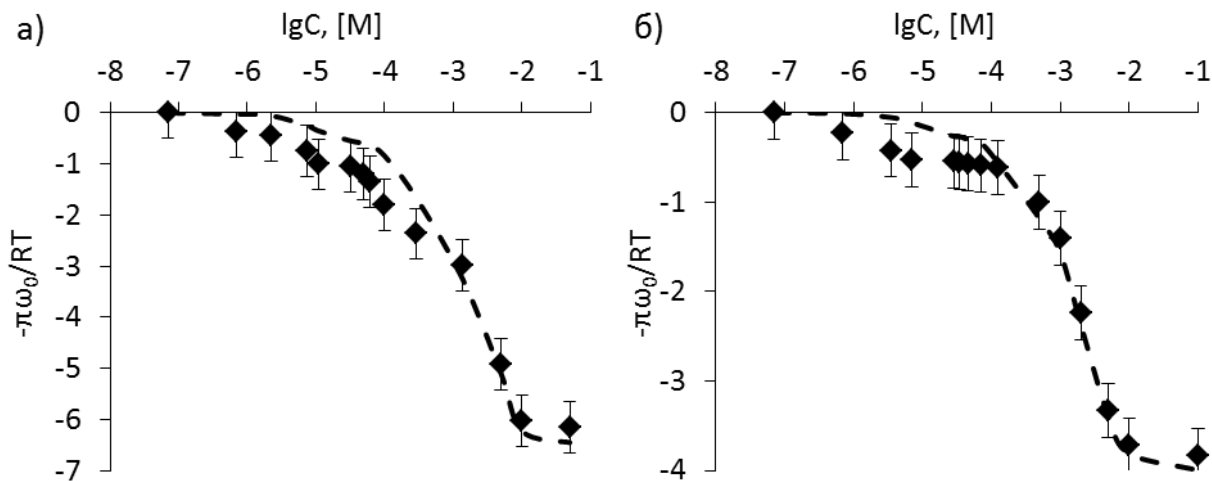


Рис. 37. Зависимость приведенного двумерного давления от концентрации DTAB (а) и SDS (б). Точки (◆) – экспериментальные значения, пунктирные линии – расчет по модели Файнермана.

Получено, что параметры  $a_s$  равны  $-0,9 \pm 0,1$  для DTAB и  $-0,4 \pm 0,2$  для SDS. Небольшие отрицательные значения констант соответствуют слабому взаимному отталкиванию молекул ПАВ в адсорбционном слое.

В растворах смесей белок – ПАВ, согласно модели, адсорбционный слой состоит из молекул ПАВ и комплексов белок – ПАВ. Уравнения двумерного состояния и изотермы адсорбции ПАВ и комплексов белок – ПАВ из смесей белок – неионогенное ПАВ имеют вид:

$$-\frac{\Pi\omega_0}{RT} = \ln(1 - \theta_{ps} - \theta_s) + \left(1 - \frac{\omega}{\omega_0}\right)\theta_{ps} + a_{ps}\theta_{ps}^2 + a_s\theta_s^2 + 2a_{sps}\theta_{ps}\theta_s \quad (3-5),$$

$$b_s c_s = \frac{\theta_s}{1 - \theta_{ps} - \theta_s} \exp\{-2a_s\theta_s - 2a_{sps}\theta_{ps}\} \quad (3-6),$$

$$b_{ps} c_p = \frac{\theta_{ps}}{(1 - \theta_{ps} - \theta_s)^{\frac{\omega_i}{\omega}}} \exp\left\{-2a_{ps} \frac{\omega_i}{\omega} \theta_{ps} - 2a_{sps}\theta_{ps}\right\} \quad (3-7).$$

Для растворов смесей Lz – ПАВ были подобраны параметры взаимодействия между комплексами белок – ПАВ  $a_{ps}$  и комплексами белок – ПАВ с ПАВ  $a_{sps}$ , позволяющие одновременно описать экспериментальные данные по адсорбции ПАВ (рис. 38), адсорбции лизоцима (рис. 39) и приведенному двумерному давлению  $-\frac{\Pi\omega_0}{RT}$  (рис. 40). Полученные результаты приведены в таблице 3.

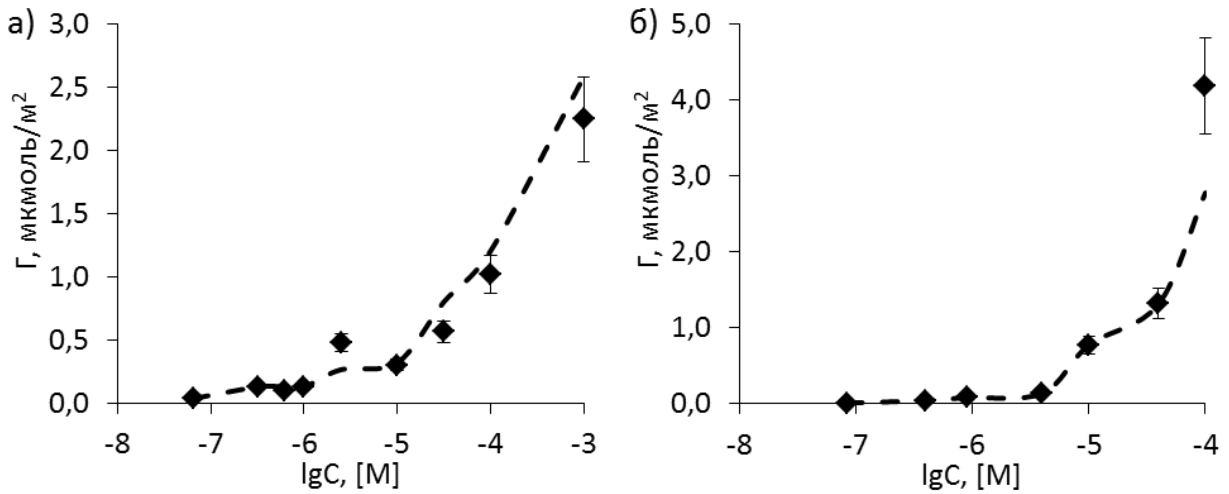


Рис. 38. Адсорбция ДТАБ (а) и SDS (б). Точки (♦) – экспериментальные значения, пунктирные линии – расчет по модели Файнермана.

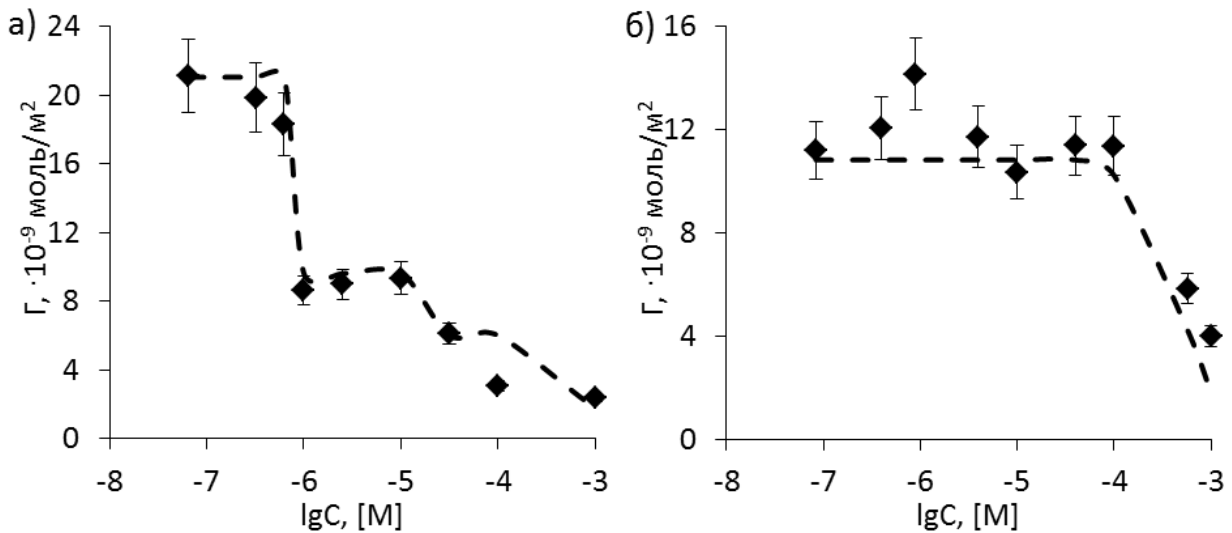


Рис. 39. Адсорбция лизоцима из смесей Lz – ДТАБ (а) и Lz – ДТАБ (б). Точки (♦) – экспериментальные значения, пунктирные линии – расчет по модели Файнермана.

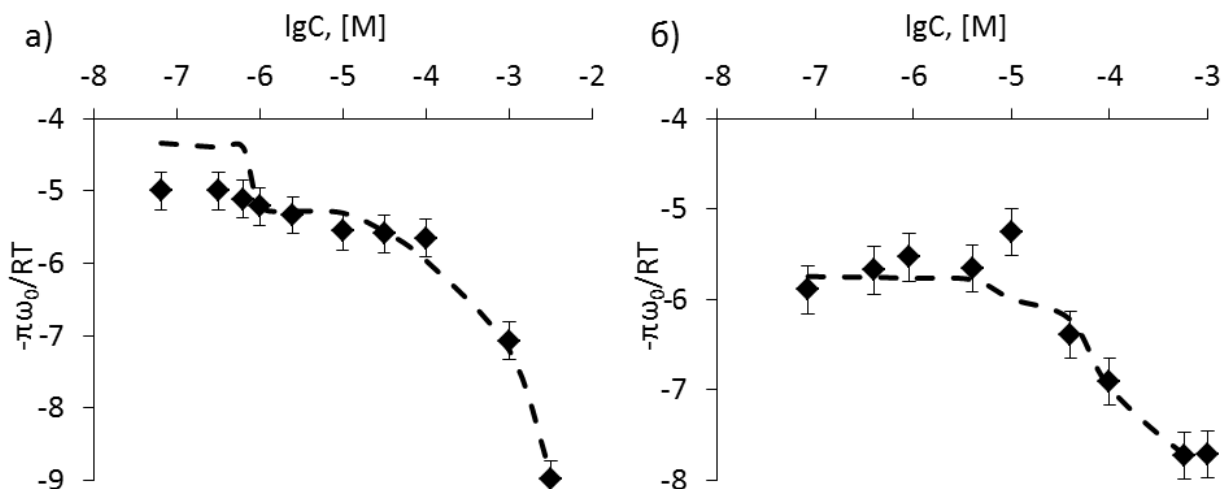


Рис. 40. Зависимость приведенного двумерного давления от концентрации ПАВ. Точки (♦) – экспериментальные значения, пунктирные линии – расчет по модели Файнермана.

Таблица 3.

Результаты расчета по модели Файнермана.

Параметр	DTAB – Lz	SDS – Lz
$b_{ps}$ , л/МОЛЬ	$(4,8 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(4,0 \pm 0,9) \cdot 10^4$
$b_s$ , л/МОЛЬ	$(3,0 \pm 1,4) \cdot 10^4$	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^4$
$a_{ps}$	$7,7 \pm 0,7$	$10,5 \pm 0,7$
$a_s$	$-0,9 \pm 0,1$	$-0,4 \pm 0,2$
$a_{sps}$	$2,7 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,5$

Положительные значения  $a_{ps}$  и  $a_{sps}$  обусловлены притяжением между комплексами белок – ПАВ и между комплексами и молекулами ПАВ. По-видимому, при концентрации соли, соответствующей физиологическому раствору, дисперсионные силы притяжения между компонентами адсорбционного слоя превышают силы электростатического отталкивания. Отметим, что для смесей лизоцима и с катионным, и с анионным ПАВ получены одинаковые знаки параметров взаимодействия.

### 3.4. Определение размера частиц

Методом динамического светорассеяния изучены растворы лизоцима с концентрацией 0,1 и 1 г/л и установлено, что на кривых распределения частиц по размерам при 3,5 нм наблюдается максимум (рис. 41). Полученный максимум соответствует гидродинамическому диаметру белковой глобулы Lz.

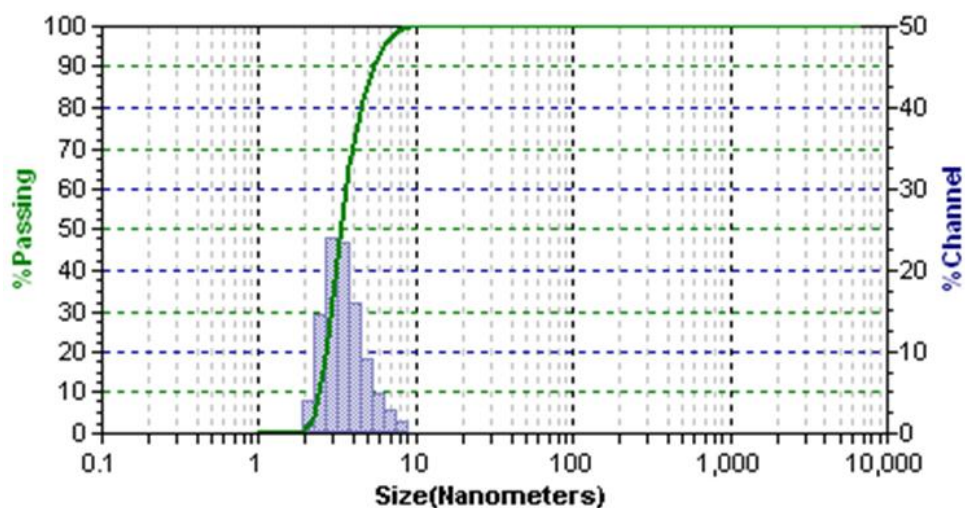


Рис. 41. Распределение частиц по размерам в водном растворе лизоцима концентрацией 0,1 г/л.



Аналогичные эксперименты были выполнены для растворов смесей Lz – ПАВ. В таблице 4 приведены средние размеры частиц для растворов смесей Lz – DTAB и Lz – SDS. Установлено, что размер частиц практически не изменялся при добавлении DTAB, а также при добавлении SDS к раствору белка с концентрацией 0,1 г/л. Формирующиеся в растворах комплексы белок – ПАВ сохраняют компактную структуру. Следует отметить, что благодаря дисульфидным мостикам молекула лизоцим весьма устойчива к различным воздействиям: даже подвергшейся тепловой денатурации Lz имеет размер глобулы не намного больший (гидродинамический радиус 22 Å), чем нативный белок (18 Å) [14]. Согласно литературным данным, комплекс SDS – Lz (SDS:Lz = 55÷100) также имеет компактные размеры (32 Å) [14, 15].

При добавлении SDS к раствору белка концентрацией 1 г/л, начиная с концентрации SDS  $5 \cdot 10^{-4}$  М, в растворе формируется осадок, препятствующий проведению измерений.

Таблица 4.

Диаметр частиц в растворах лизоцим – ПАВ.

C(ПАВ), М	DTAB + Lz		SDS + Lz	
	$C_{Lz} = 0,1$ г/л	$C_{Lz} = 1$ г/л	$C_{Lz} = 0,1$ г/л	$C_{Lz} = 1$ г/л
0	3,5±0,5	2,5±0,3	3,5±0,5	2,3±0,3
$10^{-4}$	4,0±2,0	2,3±0,3	6,0±2,0	5,6±3,0
$10^{-3}$	2,4±0,8	2,4±0,2	2,7±0,6	осадок
$10^{-2}$	2,7±0,7	2,6±0,5	3,6±0,9	–

Для водных растворов смесей Lz (0,1 г/л) – CAPB получено, что в диапазоне концентраций ПАВ  $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  максимум распределения по размерам частиц соответствует значениям для глобулы Lz. При концентрации  $10^{-4}$  М и выше, в объеме фазы присутствуют агрегаты, размеры которых составляют десятки и сотни нанометров (рис. 42). Отметим низкую воспроизводимость результатов, относящихся к системам, в которых присутствуют крупные агрегаты.

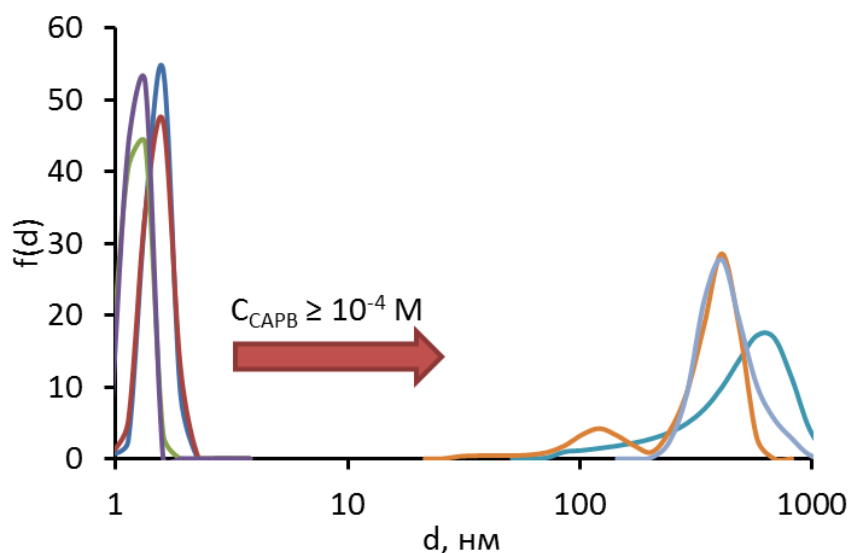


Рис. 42. Распределение частиц по размерам в водных растворах смеси лизоцим – CAPB при концентрации ПАВ  $10^{-6}$  М (—),  $10^{-5}$  М (—),  $2 \cdot 10^{-5}$  М (—),  $5 \cdot 10^{-5}$  М (—),  $10^{-4}$  М (—),  $5 \cdot 10^{-4}$  М (—),  $10^{-3}$  М (—).

В водных растворах, находящихся в равновесии с октаном, появление крупных агрегатов в водной фазе происходит при более низких концентрациях CAPB ( $2 \cdot 10^{-5}$  М) (рис. 43а). Также как при мицеллообразовании в растворах индивидуального CAPB, присутствие второй органической фазы приводит к тому, что агрегаты Lz – CAPB в водном растворе, уравновешенном с октаном, возникают при меньших концентрациях, чем в растворе, контактирующем с воздухом. В органической фазе при всех изученных концентрациях ПАВ присутствуют только малые частицы, размер которых соответствует размеру глобулы Lz (рис. 43б).

Крупные агрегаты в водном растворе могут быть образованы из частично денатурированного белка, связанного с молекулами или мицеллами CAPB. Частичное разрушение нативной структуры лизоцима может быть вызвано как взаимодействием с цвиттерионной группой CAPB, способной нарушить систему водородных связей в белке, так и с наличием амидной группы CAPB, способной к взаимодействию с активным центром лизоцима. Как известно, ферментативное действие лизоцима основано на разрушении амидных групп мурамилглюкозамина [214]. Кроме того, CAPB с лизоцимом может взаимодействовать и по механизму гидрофобного связывания (особенно длинноцепочечные компоненты CAPB). Крупные агрегаты начинают формироваться при той же концентрации CAPB, при

которой адсорбция ПАВ достигает постоянного значения, межфазное натяжение выходит на плато, и начинается рост коэффициента распределения САРВ. По-видимому, в системе одновременно происходит несколько процессов: формирование гидрофобного комплекса Lz – САРВ, адсорбирующегося на межфазной поверхности, и образование гидрофильного комплекса в водном растворе.

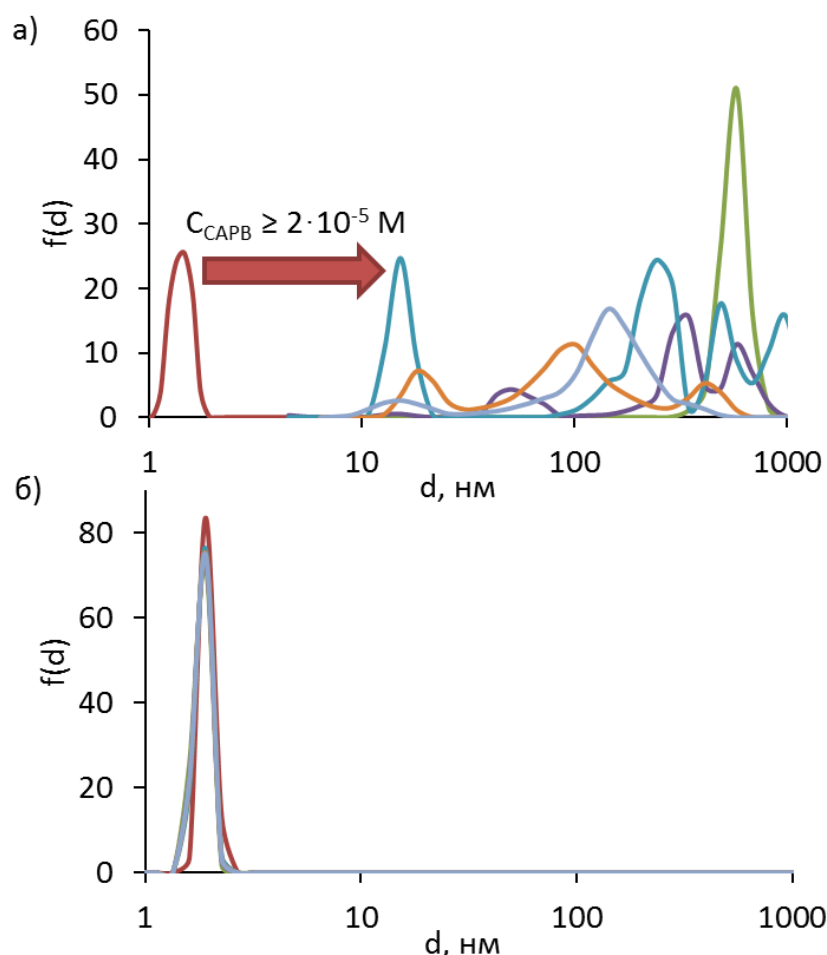


Рис. 43. Распределение частиц по размерам в водной (а) и органической (б) фазах системы Lz – САРВ при концентрации ПАВ  $10^{-6}$  М (—),  $10^{-5}$  М (—),  $2 \cdot 10^{-5}$  М (—),  $5 \cdot 10^{-5}$  М (—),  $10^{-4}$  М (—),  $5 \cdot 10^{-4}$  М (—),  $10^{-3}$  М (—).

При концентрации белка 1 г/л крупные агрегаты образуются во всей области изученных концентраций добавленного САРВ.

О формировании агрегатов в водных растворах смесей Lz – ПАВ можно судить на основании изучения светорассеяния. Для всех смесей Lz – ПАВ с концентрацией белка 1 г/л были получены спектры поглощения с максимумом при длине волны 280 нм (рис. 44). Для смесей Lz – SDS при концентрации ПАВ  $10^{-4}$  –

$5 \cdot 10^{-3}$  М в системе формируется осадок и на спектрах фиксируется высокое значение оптической плотности, выходящее за пределы рабочего диапазона измерений ( $OD$  выше 4). Эти спектры на рис. 44б не представлены.

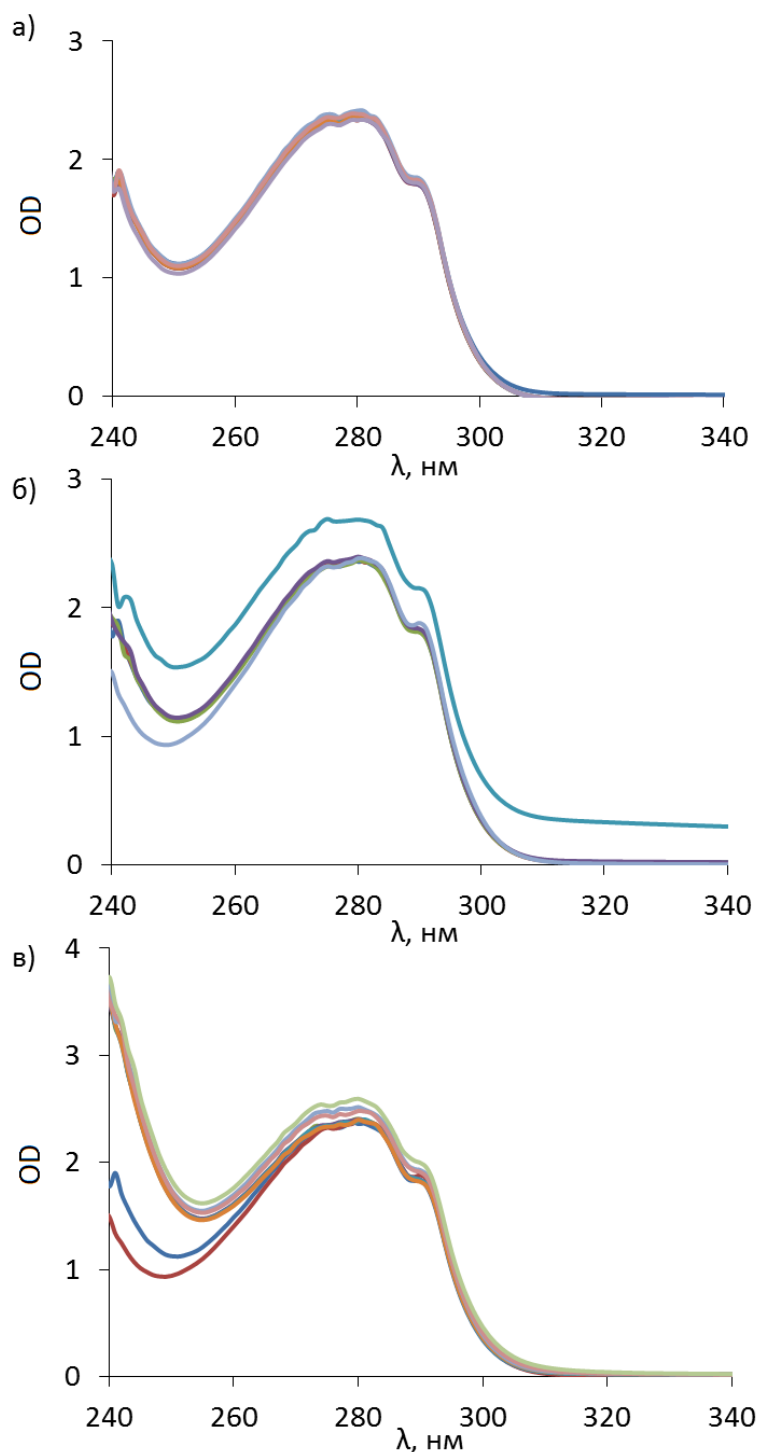


Рис. 44. Спектры поглощения растворов смесей Lz с DTAB (а), SDS (б), CAPB (в). Концентрация Lz 1 г/л, концентрация ПАВ 0 (—),  $10^{-6}$  М (—),  $10^{-5}$  М (—),  $5 \cdot 10^{-5}$  М (—),  $10^{-4}$  М (—),  $5 \cdot 10^{-4}$  М (—),  $10^{-3}$  М (—),  $5 \cdot 10^{-3}$  М (—),  $10^{-2}$  М (—).

Для растворов смесей были получены зависимости оптической плотности от концентрации ПАВ при фиксированной длине волны 320 нм, соответствующей области рассеяния света (рис. 45). Для смеси Lz – SDS была получена зависимость, проходящая через максимум в диапазоне концентраций ПАВ  $10^{-4}$  –  $5 \cdot 10^{-3}$  М (область формирования осадка). Для смеси Lz – CAPB характерен рост оптической плотности при увеличении концентрации ПАВ, что согласуется с увеличением размера частиц в водном растворе. В системе Lz – DTAB не происходит изменения оптической плотности.

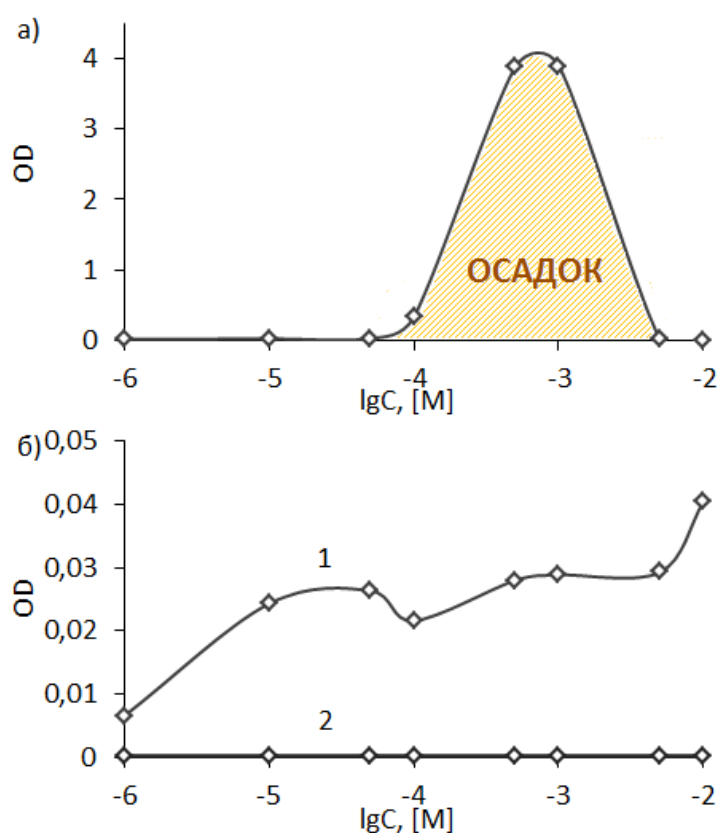


Рис. 45. Зависимость оптической плотности растворов Lz – ПАВ при длине волны 320 нм от концентрации SDS (а), CAPB (б, кривая 1) и DTAB (б, кривая 2).

### 3.6. Изучение взаимодействия Lz – ПАВ методом флуоресценции

Для смесей лизоцим – ПАВ с концентрацией белка 1г/л были получены спектры флуоресценции при возбуждении УФ светом с длиной волны 280 нм (рис. 46).

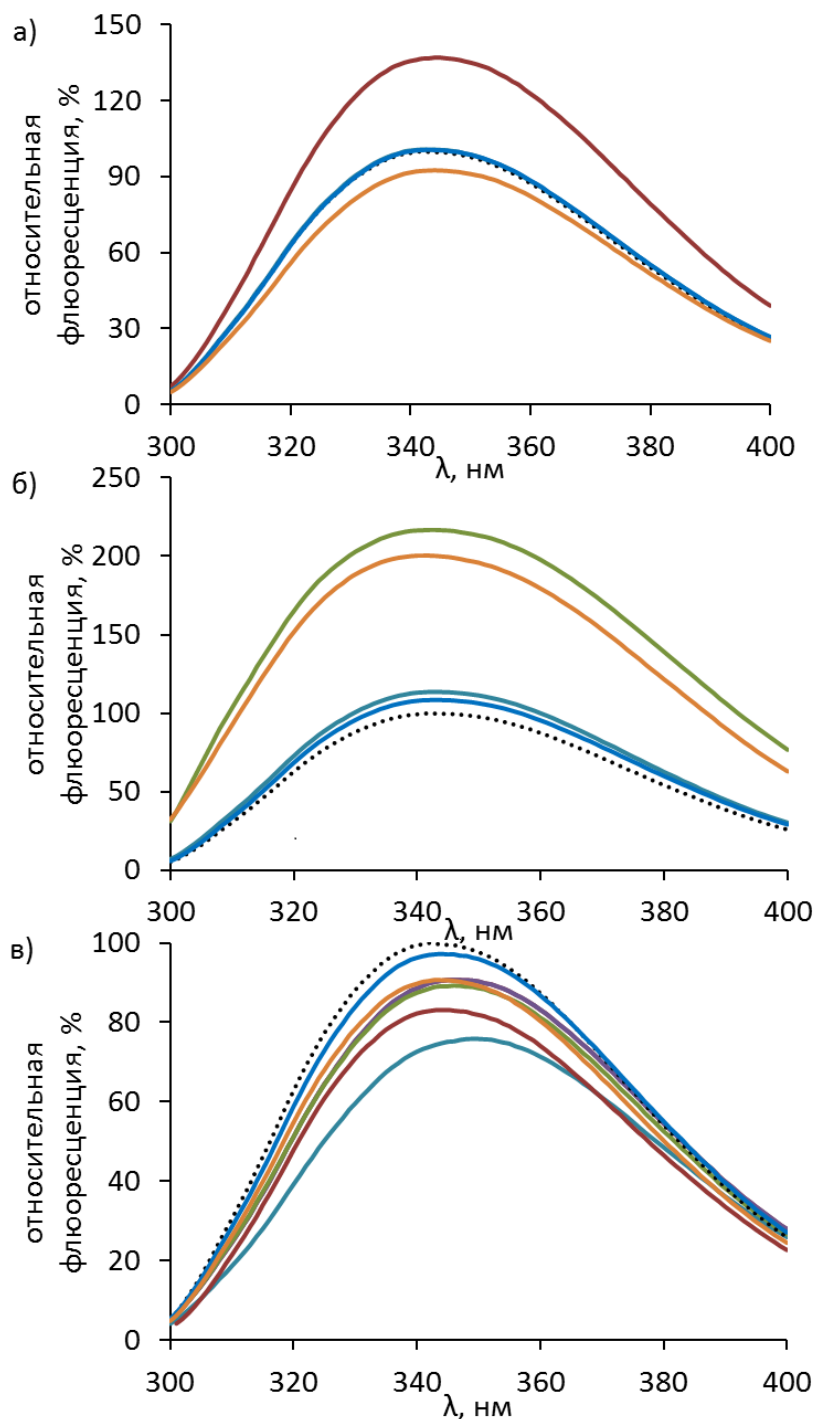


Рис. 46. Спектры флюоресценции лизоцима в присутствии DTAB (а), SDS (б) и CAPB (в) при концентрации ПАВ  $10^{-6}$  М (—),  $10^{-5}$  М (—),  $10^{-4}$  М (—),  $5 \cdot 10^{-4}$  М (—),  $10^{-3}$  М (—),  $10^{-2}$  М (—).

Максимум флюоресценции во всех изученных системах наблюдается при длине волны 342 нм. Для индивидуального лизоцима интенсивность флюоресценции принимали за 100% и получили величины относительной флюоресценции Lz из смесей с ПАВ (рис. 46). Для смеси Lz – SDS наблюдается рост интенсивности флюоресценции по сравнению с чистым Lz, начиная с концентрации ПАВ

$5 \cdot 10^{-4}$  М. Подобный эффект наблюдается для смеси Lz – DTAB при более высокой концентрации  $10^{-2}$  М. Рост флуоресценции указывает на увеличение полярности микроокружения триптофановых фрагментов лизоцима. Микрополярность может увеличиваться при взаимодействии полярных групп ПАВ с белком, в результате чего формируется гидрофобный комплекс.

Для смеси Lz – CAPB наблюдается тушение флуоресценции при добавлении ПАВ. Максимальное снижение интенсивности флуоресценции происходит при концентрации CAPB  $10^{-4}$  М, когда в растворе появляются крупные агрегаты. Тушение флуоресценции может быть вызвано уменьшением полярности микроокружения триптофана при взаимодействии с углеводородными цепями молекул ПАВ.

### **3.7. Ферментативная активность лизоцима в присутствии ПАВ**

При исследовании влияния ПАВ на ферментативную активность лизоцима по отношению к клеткам *M. luteus* вначале было определено, как влияют ПАВ и лизоцим по отдельности на фоновое изменение поглощения суспензии клеток во времени  $A_E = -dOD/dt$ . Установлено, что SDS и DTAB при концентрации менее  $10^{-4}$  М не влияют на величину  $A_E$  (рис. 47 а,б). При более высоких концентрациях ПАВ происходило заметное изменение поглощения во времени, поэтому в дальнейшем проводили исследования в области концентраций этих ПАВ от  $10^{-7}$  до  $10^{-4}$  М. Добавки CAPB вплоть до концентрации  $10^{-3}$  М практически не влияют на поглощение суспензии *M. luteus* (рис. 47в).

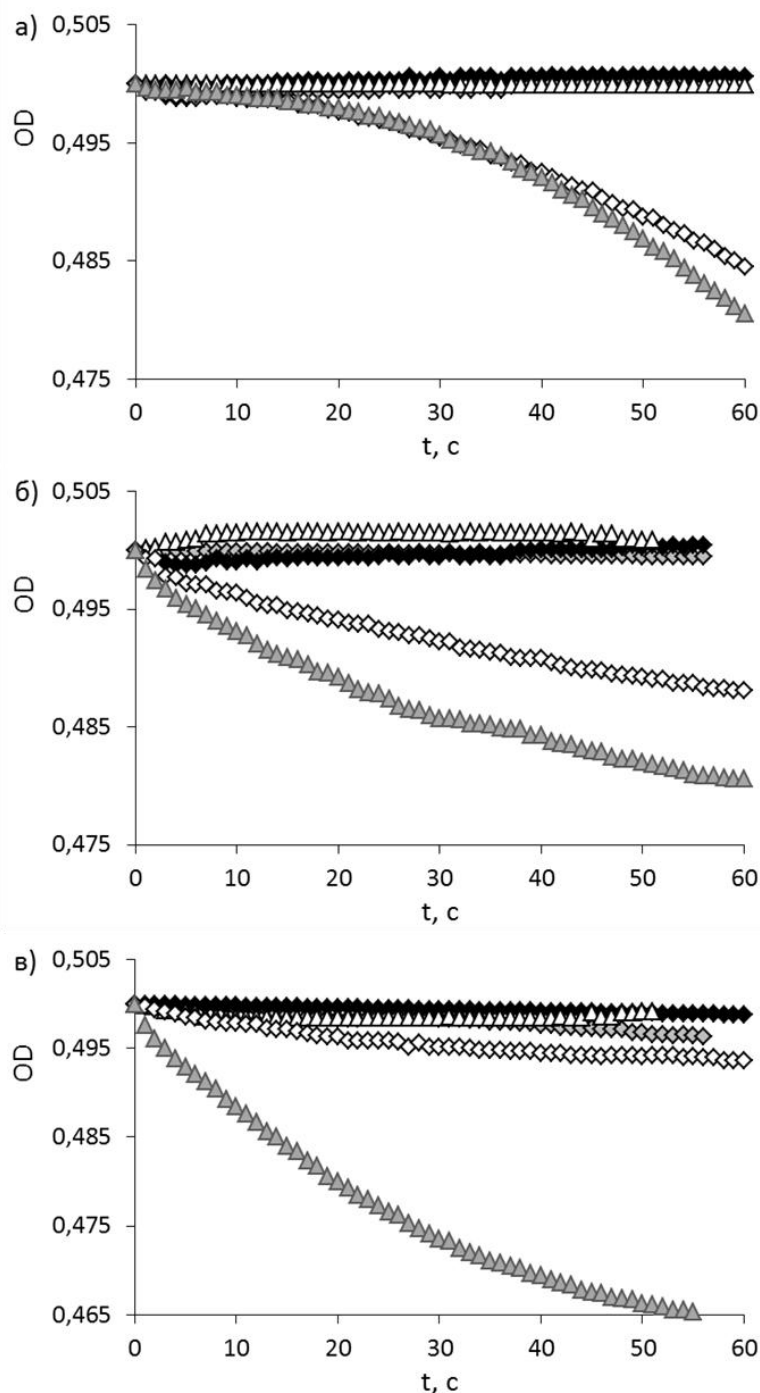


Рис. 47. Зависимость оптической плотности суспензии клеток *M. luteus* от времени при добавлении DTAB (а), SDS (б) и CAPB (в) с концентрацией  $10^{-6}$  М ( $\blacklozenge$ ),  $10^{-5}$  М ( $\triangle$ ),  $10^{-4}$  М ( $\blacklozenge$ ),  $10^{-3}$  М ( $\diamond$ ),  $10^{-2}$  М ( $\blacktriangle$ ).

Зависимость ферментативной активности от концентрации лизоцима приведена на рис. 48. Нелинейный рост  $A_E$  с увеличением концентрации лизоцима указывает на сложный механизм изучаемого процесса. Поэтому сопоставление активностей в присутствии и в отсутствие ПАВ позволяет сделать в основном качественные выводы о влиянии ПАВ на бактериолитическую активность лизоцима.



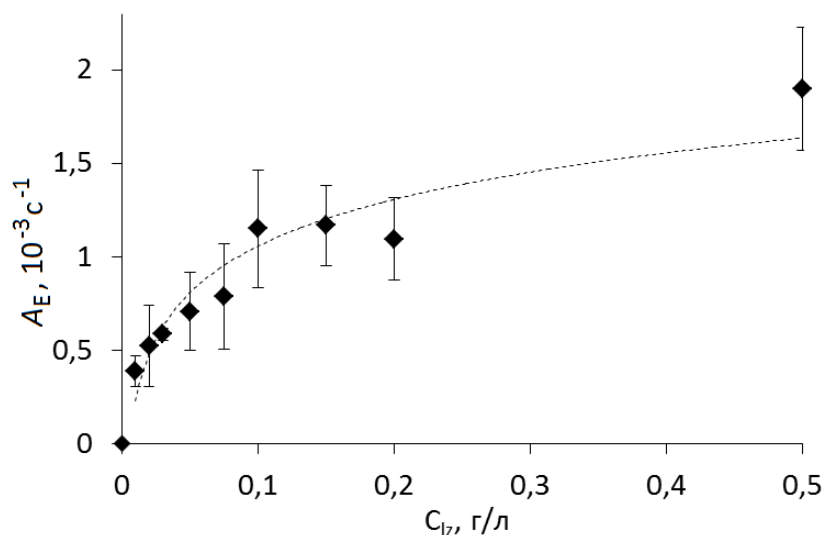


Рис. 48. Зависимость ферментативной активности от концентрации лизоцима.

На рис. 49 представлены зависимости скорости бактериального лизиса клеток от концентрации SDS и DTAB, соответственно. Величины активности лизоцима без ПАВ, составляющие для растворов с концентрацией 0,01 и 0,1 г/л  $(3,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$  и  $(1,24 \pm 0,25) \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ , соответственно, отмечены на рисунках пунктирными линиями. Как видно из графика, при концентрации лизоцима 0,01 г/л добавки как анионного, так и катионного ПАВ в области малых концентраций приводят к росту скорости лизиса. Затем, при дальнейшем увеличении концентрации SDS свыше  $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , а DTAB более  $3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , активность снижается до величины, близкой к активности лизоцима в отсутствие ПАВ. При концентрации лизоцима 0,1 г/л оба ПАВ слабо влияют на скорость лизиса.

Для смесей Lz с DTAB и SDS увеличение ферментативной активности Lz происходит в диапазоне концентраций  $10^{-7} - 4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , при которой формируется гидрофобный комплекс (рис. 49). Можно предположить, что в результате взаимодействия с ПАВ меняется микроокружение активного центра лизоцима, что приводит к уменьшению электростатического отталкивания между ферментом и клеткой. Активность снижается в области концентраций ПАВ, при которой начинают формироваться гидрофильные комплексы. Однако, следует отметить, что денатурации белка в присутствии DTAB и SDS не происходит: активность снижается до значений, характерных для индивидуального лизоцима.

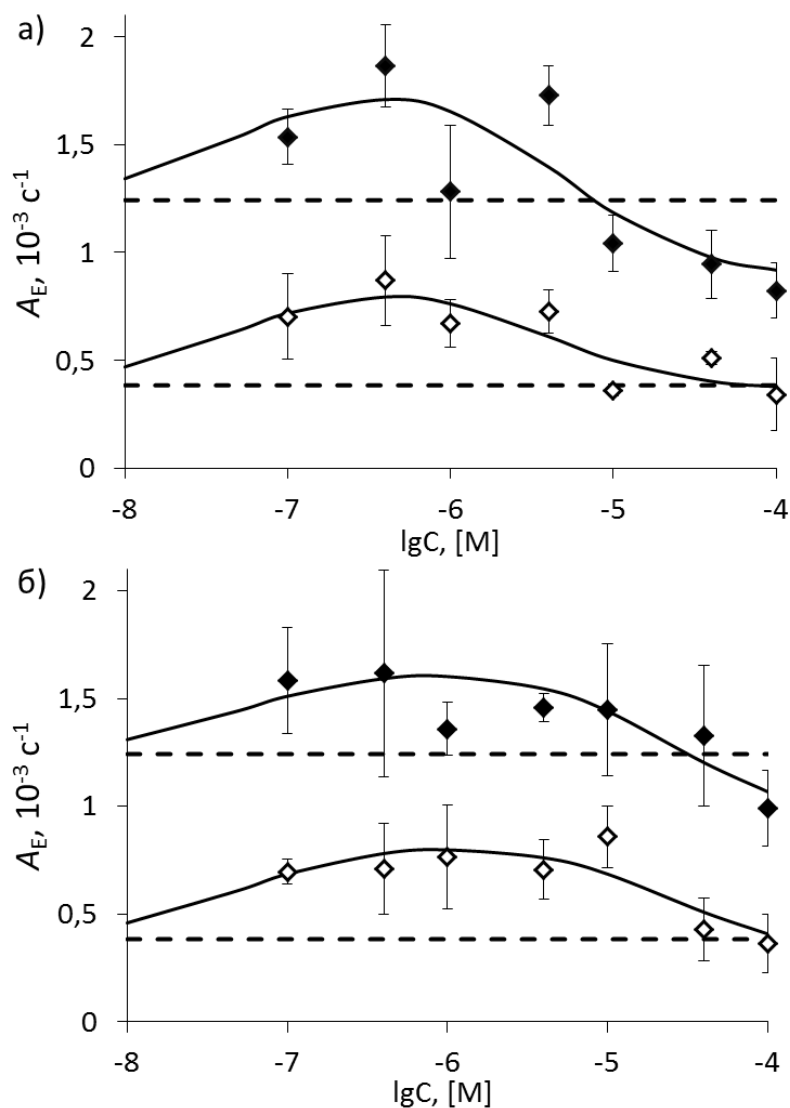


Рис. 49. Изменение ферментативной активности лизоцима с ростом концентрации ПАВ ДТАВ (а) и SDS (б). Концентрация лизоцима 0,01 г/л ( $\diamond$ ) и 0,1 г/л ( $\blacklozenge$ ). Пунктирные линии – ферментативная активность Lz в отсутствие ПАВ. Сплошные линии – расчет по уравнению 3-9.

Для описания экспериментальных данных рассмотрим простую модель, согласно которой на белке есть два типа участков связывания, которые можно охарактеризовать константами десорбции  $K_{d1}$  и  $K_{d2}$  для данного ПАВ. Эти участки связывания соответствуют формированию гидрофобного и гидрофильного комплексов. Допустим, что в случае связывания участком типа 1 нескольких молекул ПАВ,  $K_{d1}$  не меняется по мере заполнения участка связывания ( $PS_{n-1} + S \leftrightarrow PS_n$ ). Средняя степень заполнения (доля заполнения) ПАВ данного участка связывания будет описываться функцией  $Q_1 = [C]/(K_{d1} + [C])$ , значение которой меняется от 0 до 1 ( $[C]$  – концентрация ПАВ). Значение  $Q_1 = 0$  соответствует состоянию белка (P) без связанного ПАВ, а  $Q_1 = 1$  соответствует состоянию  $PS_N$ , где N – макси-

мальное число молекул ПАВ, которые могут связаться на данном участке. Вывод данного уравнения аналогичен выводу уравнения Ленгмюра для изотермы адсорбции. Допустим, что в первом приближении активность белка линейно меняется в зависимости от степени заполнения данного участка молекулами ПАВ. Получаем значение активности  $A_E = A_{E0} + (A_{E1} - A_{E0}) \cdot Q_1$ , где  $A_{E0}$  – активность в отсутствие ПАВ, а  $A_{E1}$  – активность при практически полном заполнении участка связывания ПАВ (приблизительно при  $[C] > 20 \cdot K_{d1}$ ). Теперь допустим, что при более высоких значениях концентрации ПАВ начинается независимое заполнение другого участка связывания ( $PS_N S_{m-1} + S \leftrightarrow PS_N S_m$ ), которое характеризуется константой десорбции  $K_{d2}$ . При заполнении второго участка связывания формируется гидрофильный комплекс. Если константа десорбции ПАВ для второго участка связывания намного больше константы для первого участка (например,  $K_{d2} > 50 \cdot K_{d1}$ ), то, рассуждая аналогично выше сказанному, для области концентраций ПАВ порядка величин значения  $K_{d2}$  можем записать  $A_E = A_{E1} + (A_{E2} - A_{E1}) \cdot Q_2$ , где  $A_{E2}$  – активность после полного заполнения второго участка связывания, а  $Q_2 = [C] / (K_{d2} + [C])$ . Полное уравнение для всего диапазона концентраций ПАВ в случае двух разных участков связывания будет соответственно

$$A_E = A_{E0} + (A_{E1} - A_{E0}) \cdot Q_1 + (A_{E2} - A_{E1}) \cdot Q_2 \quad (3-8).$$

Подставляя зависимости  $Q_1$  и  $Q_2$  от  $[C]$  получаем:

$$A_E = A_{E0} + (A_{E1} - A_{E0}) \cdot \frac{[C]}{(K_{d1} + [C])} + (A_{E2} - A_{E1}) \cdot \frac{[C]}{(K_{d2} + [C])} \quad (3-9).$$

Приближенно  $A_{E1}$  соответствует величине активности в точке максимума на зависимости активности от концентрации ПАВ,  $A_{E2}$  – значению активности в области больших концентраций ПАВ. Величины  $K_{d1}$  и  $K_{d2}$  численно совпадают с концентрациями ПАВ, при которых активность достигает значений  $(A_{E0} + A_{E1})/2$  (полувысота перехода) и  $(A_{E1} + A_{E2})/2$ , соответственно. Проведенные рассуждения позволяют приблизительно оценить значения  $A_{E1}$ ,  $A_{E2}$ ,  $K_{d1}$  и  $K_{d2}$  из экспериментально полученных зависимостей активности лизоцима от концентрации ПАВ. Более точные значения получены при подборе этих параметров методом наименьших квадратов. Для этого были рассчитаны квадраты разности между экспе-

риментально определенными величинами  $A_E$  и рассчитанными по уравнению (3-9). Затем проводилась процедура минимизации суммы квадратов разности при последовательном варьировании величин  $A_{E1}$ ,  $A_{E2}$ ,  $K_{д1}$  и  $K_{д2}$ .

Применительно к исследуемым системам величины  $A_{E0}$ ,  $A_{E1}$ ,  $A_{E2}$ ,  $K_{д1}$  и  $K_{д2}$  приведены в таблице 5. Полученные на основе расчетов по уравнению (3-9) зависимости  $A_E$  от концентрации ПАВ представлены сплошными линиями на рис. 49. Экспериментальные данные удовлетворительно аппроксимируются предложенным уравнением, таким образом, достигнуто согласие теоретической математической модели и эксперимента. По-видимому, более корректно рассматривать константы  $K_{д1}$  и  $K_{д2}$  для смесей с концентрацией белка 0,01 г/л, так как в этой системе большее количество молекул ПАВ приходится на одну молекулу белка, и эффект изменения активности в зависимости от концентрации ПАВ более выражен (рост активности составляет 120% для SDS и 140% для DTAB). В растворах с концентрацией белка 0,1 г/л влияние ПАВ на активность лизоцима заметно слабее (30% для SDS и 50% для DTAB).

Таблица 5.

Параметры уравнения (3-9) для системы Lz – ПАВ.

Система	$C_{Lz}$ , г/л	$A_{E0}$ , $10^{-3} \text{ с}^{-1}$	$A_{E1}$ , $10^{-3} \text{ с}^{-1}$	$A_{E2}$ , $10^{-3} \text{ с}^{-1}$	$K_{д1}$ , М	$K_{д2}$ , М
<b>Lz-</b>	0,01	0,38±0,06	0,9±0,3	0,4±0,1	$(4,8±1,5) \cdot 10^{-8}$	$(3,5±1,1) \cdot 10^{-6}$
<b>DTAB</b>	0,1	1,24±0,25	1,9±0,7	0,9±0,3	$(7,9±2,8) \cdot 10^{-8}$	$(4,7±1,7) \cdot 10^{-6}$
<b>Lz-SDS</b>	0,01	0,38±0,06	0,8±0,2	0,3±0,1	$(6,3±1,5) \cdot 10^{-8}$	$(2,6±0,6) \cdot 10^{-5}$
	0,1	1,24±0,25	1,7±0,3	0,9±0,2	$(2,6±0,5) \cdot 10^{-8}$	$(2,6±0,5) \cdot 10^{-5}$

В системе Lz – CAPB при концентрации добавленного ПАВ менее  $10^{-5}$  М активность возрастает на 60 и 30% в системах с концентрацией лизоцима 0,01 и 0,1 г/л соответственно, т.е. эффект слабее, чем для ионогенных ПАВ (рис. 50). При более высокой концентрации CAPB активность снижается на 60% (0,01 г/л) и 40% (0,1 г/л) по сравнению с активностью лизоцима в отсутствие ПАВ.

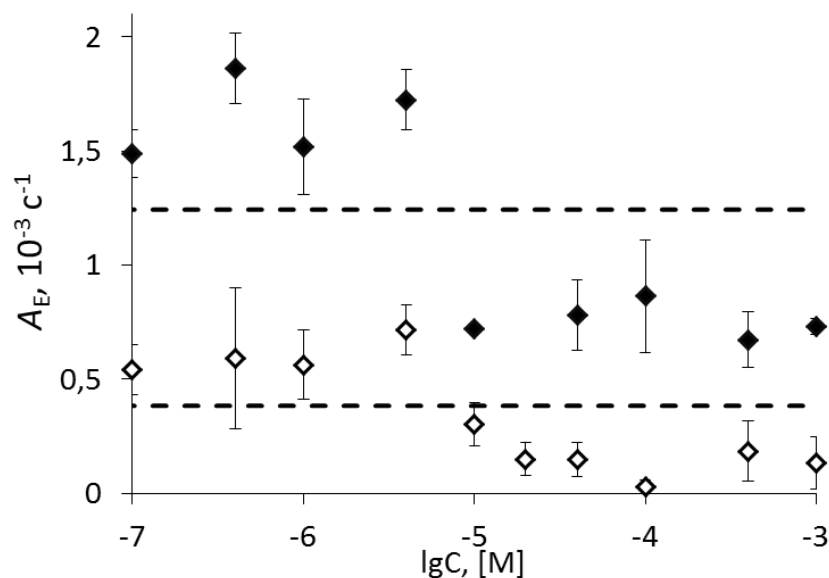


Рис. 50. Изменение ферментативной активности лизоцима с ростом концентрации CAPB. Концентрация лизоцима 0,01 г/л ( $\diamond$ ) и 0,1 г/л ( $\blacklozenge$ ). Пунктирные линии – ферментативная активность Lz в отсутствие CAPB.

Снижение активности происходит в той же области концентраций CAPB, в которой в водном растворе формируются крупные агрегаты. Процесс агрегирования заметно снижает доступность активных центров молекул лизоцима для субстрата и наблюдается уменьшение его ферментативной активности. Снижение ферментативной активности лизоцима в присутствии малых концентраций цвиттерийонного ПАВ ( $10^{-5}$  М) установлено впервые.

### 3.8. Избирательное смачивание в системе водный раствор смеси Lz – ПАВ/октан/гидрофобизованное стекло

При подведении капли октана к гидрофобизованному стеклу, погруженному в водный раствор, в процессе избирательного смачивания можно выделить несколько стадий. Первая стадия связана с прорывом смачивающей пленки между каплей и твердой поверхностью. Время прорыва смачивающей пленки может служить характеристикой стабилизирующего действия адсорбционных слоев Lz – ПАВ. Вслед за прорывом смачивающей пленки начинается собственно растекание капли, происходящее до тех пор, пока не установится равновесное значение крае-

вого угла. При сильной стабилизации смачивающей пленки, растекания капли может и не наблюдаться.

Сопоставление времен, необходимых для прорыва смачивающей пленки, в изученных системах (таблица 6) позволяет сделать вывод, что с ростом концентрации ПАВ увеличивается их стабилизирующее действие по отношению к смачивающим пленкам. Наиболее устойчивые пленки получены в системах с CAPB. Рост устойчивости смачивающих пленок наблюдается при концентрациях ПАВ, соответствующих образованию насыщенных адсорбционных слоев на границе водный раствор/октан. Добавки лизоцима практически не влияют на устойчивость пленок. Это означает, что устойчивость пленок обеспечивается плотным заполнением поверхности молекулами ПАВ, а не присутствием лизоцима в слое.

Таблица 6.

Времена прорыва смачивающих пленок (мс) при избирательном смачивании.

C, M	SDS	SDS + Lz	DTAB	DTAB+ Lz	CAPB	CAPB+ Lz
$10^{-5}$	0	0	—	—	0	35±10
$10^{-4}$	0	0	0	70±15	190±40	60±10
$10^{-3}$	130±50	80±20	0	130±50	1100±250	1250±250
$10^{-2}$	150±40	110±20	1500±300	860±30	1100±200	1200±300

После прорыва смачивающей пленки происходит растекание капель, которое было охарактеризовано зависимостью радиуса смоченной площади  $R$  от времени  $t$ . Типичные кривые, соответствующие изменению  $R$  со временем приведены на рис. 51.

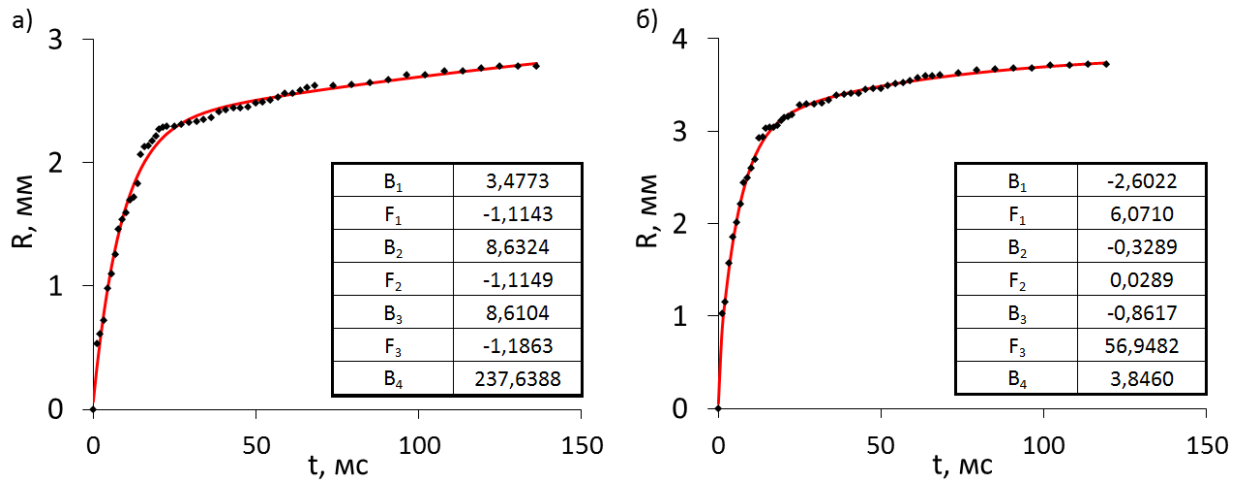


Рис. 51. Зависимость радиуса смоченной площади от времени при растекании капли октана по гидрофобизованному стеклу, погруженному в воду (а) и в водный раствор лизоцима (0,1 г/л) (б).

Полученные зависимости  $R(t)$  были аппроксимированы экспоненциальной функцией  $R = B_1 \cdot \exp(-t/F_1) + B_2 \cdot \exp(-t/F_2) + B_3 \cdot \exp(-t/F_3) + B_4$ , параметры которой для систем вода – капля октана и водный раствор лизоцима (0,1 г/л) – капля октана приведены на рис. 51. Аппроксимацию проводили с помощью программы *Origin*. Экспериментальные значения скоростей растекания были рассчитаны при дифференцировании полученных экспоненциальных функций. Аналогичные процедуры были проведены со всеми исследуемыми системами. Скорости растекания  $U = dR/dt$  в зависимости от времени приведены в Приложениях 3 – 8.

Экспериментальные скорости растекания были сопоставлены с величинами, рассчитанными по модели Де Жена [215]. Согласно модели, при растекании капли вязкое сопротивление сосредоточено в узкой области вблизи линии смачивания. Скорость растекания определяется соотношением:

$$U = \frac{\sigma}{3\eta K} \cdot \operatorname{tg} \theta \cdot (\cos \theta_f - \cos \theta) \quad (3-10)$$

где  $\sigma$  – межфазное натяжение на границе октан/водный раствор, мН/м,  $\eta$  – вязкость октана (0,5 мПа·с),  $\theta_f$  и  $\theta$  – конечное и текущее значение краевых углов,  $K$  – константа, равная 10. Краевые углы определяли по видеоизображению капли. Конечные значения краевых углов  $\theta_f$  для разных систем практически совпали и составили 17 – 25 град. (углы отсчитывали в сторону капли октана). Такие малые значения углов, близкие и для воды, и для растворов ПАВ, и для растворов смесей

Lz – ПАВ, свидетельствуют об отеснении капель октана при ее растекании адсорбционных слоев смесей Lz – ПАВ с поверхности гидрофобизованного стекла. Рассчитанные по уравнению 3-10 значения скоростей также приведены в Приложениях 3 – 8. Установлено, что для всех систем расчетные скорости существенно выше экспериментальных. Т.е. при избирательном смачивании существует дополнительное сопротивление растеканию, по сравнению с растеканием на воздухе. Можно предположить, что это сопротивление связано с необходимостью «деадгезии» жидкости-предшественника с твердой поверхности, а также с десорбцией и перестройкой адсорбционных слоев на границах жидкость/твердое тело и жидкость/жидкость [216, 217].

### **3.9. Адсорбция и распределение смесей лизоцим – ПАВ в системе вода/октан.**

На основании сопоставления данных, полученных методами сцинтиллирующей фазы, тензиометрии, динамического и статического светорассеяния, флюоресценции, измерения ферментативной активности, можно предложить следующие схемы адсорбции смесей Lz – ПАВ в системе вода/октан.

#### Смесь Lz – ДТАВ (рис. 52).

I.  $C < 10^{-6}$  М.

Рост адсорбции Lz и коэффициентов распределения Lz и ДТАВ указывает на формирование гидрофобного комплекса Lz – ДТАВ, растворимость которого в октане и адсорбция на межфазной поверхности выше, чем у индивидуального белка. Повышается ферментативная активность лизоцима.

II.  $10^{-6} < C < 10^{-4}$  М.

Происходит постепенная гидрофилизация комплекса Lz – ДТАВ, способствующая уменьшению концентрации Lz в октане и его адсорбции на поверхности. Взаимодействие ДТАВ с белком не влияет на размер белковой глобулы. Ферментативная активность лизоцима снижается до значений, соответствующих активности индивидуального белка.



III.  $10^{-4} < C < 5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ .

Уменьшение адсорбции Lz, рост адсорбции ДТАВ, снижение межфазного натяжения. Происходит вытеснение Lz из адсорбционного слоя как за счет формирования гидрофильного комплекса Lz – ДТАВ, так и за счет конкурентной адсорбции с ДТАВ.

IV.  $C > 5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ .

В органической фазе и на межфазной поверхности доминируют молекулы ПАВ, небольшое количество белка на поверхности присутствует в виде гидрофобного комплекса. В водном растворе находится гидрофильный комплекс белок – ПАВ компактной структуры, мицеллы и отдельные молекулы ДТАВ. В этой области концентраций повышается устойчивость смачивающих пленок, стабилизированных смесями Lz – ДТАВ.

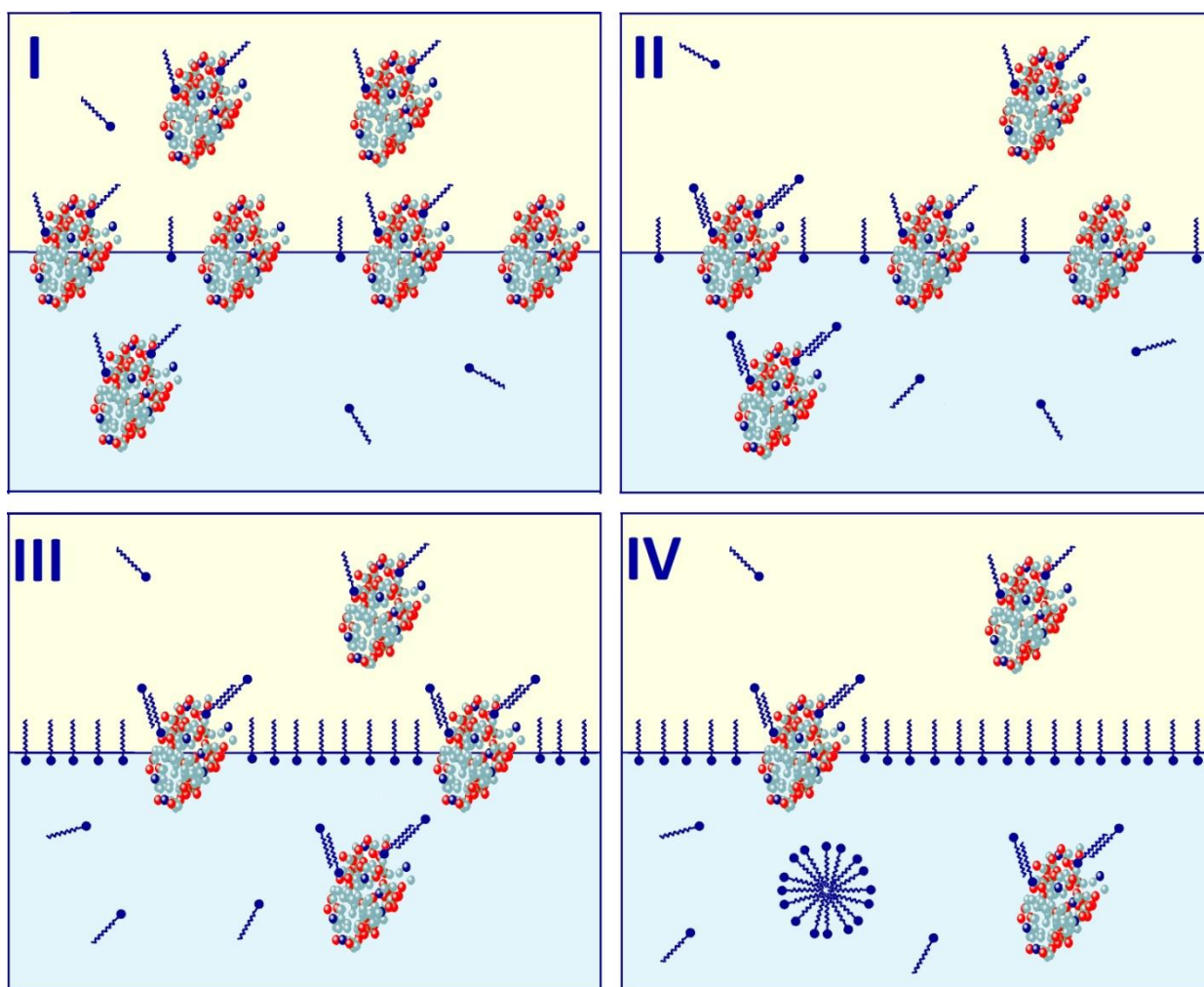


Рис. 52. Схема адсорбции смеси Lz – ДТАВ на границе вода/октан.

Смесь Lz – SDS (рис. 53).

I.  $C < 10^{-6}M$ .

Формируется гидрофобный комплекс Lz – SDS, переходящий в органическую фазу и адсорбционный слой. Ферментативная активность Lz повышена.

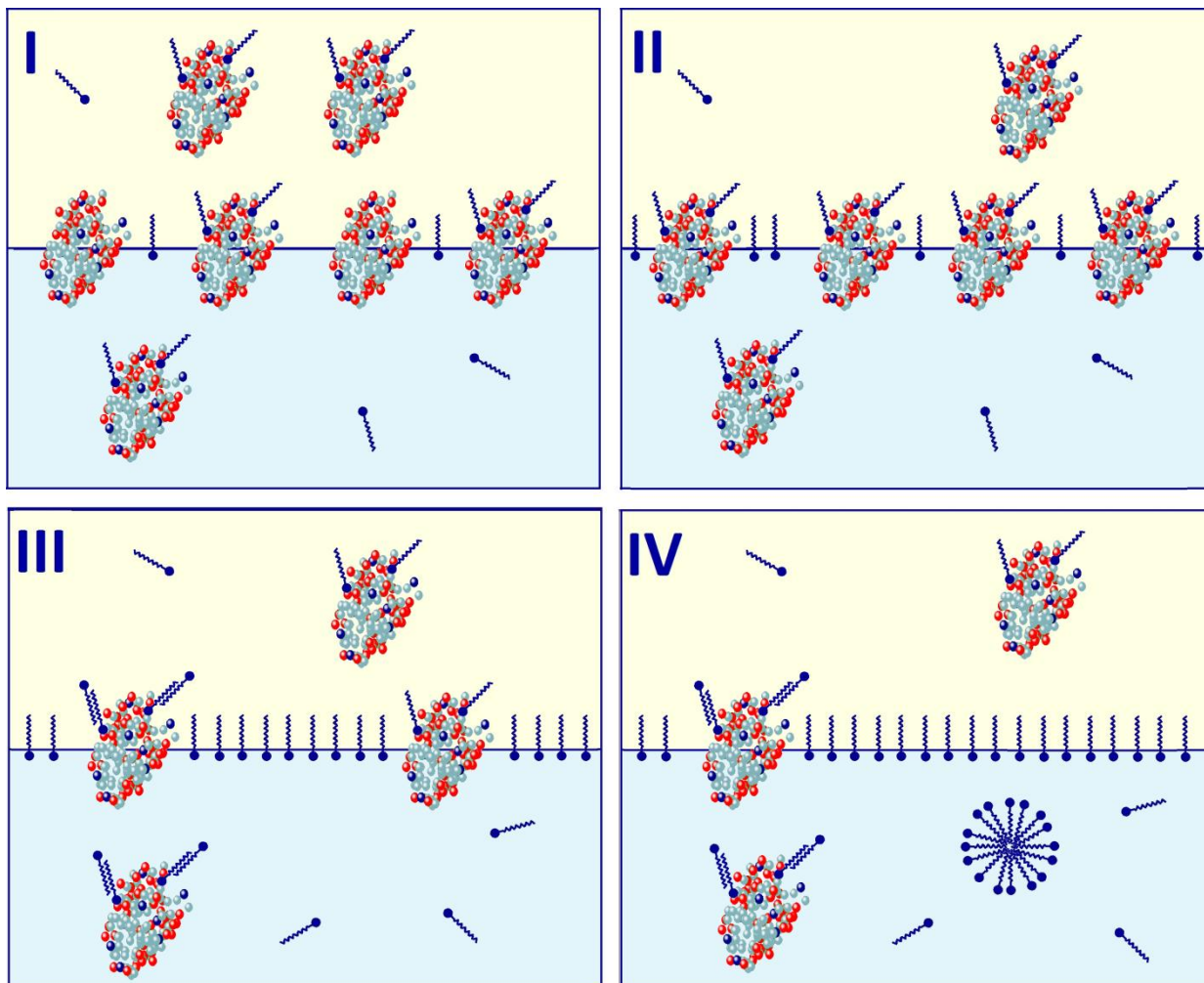


Рис. 53. Схема адсорбции смеси Lz – SDS на границе вода/октан.

II.  $10^{-6} < C < 10^{-4}M$ .

Адсорбция Lz не меняется, адсорбция SDS возрастает, межфазное натяжение снижается. Происходит совместная адсорбция гидрофобного комплекса Lz – SDS и SDS, что приводит к синергетическому эффекту при снижении межфазного натяжения. Lz сохраняет ферментативную активность, аналогичную активности индивидуального белка.

### III. $10^{-4} < C < 10^{-3} \text{M}$ .

Начало формирования компактного гидрофильного комплекса в водном растворе, приводящее к появлению плато на изотерме межфазного натяжения и уменьшению адсорбции лизоцима. При концентрации белка  $7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  (1 г/л) при мольном соотношении  $\text{Lz:SDS} \approx 1:1$  в водном растворе образуется осадок.

### IV. $C > 10^{-3} \text{M}$ .

Вытеснение белка из адсорбционного слоя вследствие формирования гидрофильного комплекса. В органической фазе и на межфазной поверхности доминируют молекулы ПАВ, небольшое количество белка присутствует в виде гидрофобного комплекса. В водном растворе находится гидрофильный комплекс белок – ПАВ компактной структуры, мицеллы и отдельные молекулы SDS. В этой области концентраций повышается устойчивость смачивающих пленок, стабилизированных смесями  $\text{Lz} - \text{SDS}$ .

Обращает на себя внимание достаточно сходное поведение смесей  $\text{Lz} - \text{SDS}$  и  $\text{Lz} - \text{DTAB}$  при концентрации белка 0,01 и 0,1 г/л: формирование гидрофобного комплекса и рост ферментативной активности лизоцима в области малых концентраций ПАВ, последующее образование гидрофильного комплекса и вытеснение лизоцима из адсорбционного слоя, близкие значения электрокинетического потенциала, размера частиц в системах, а также параметров взаимодействия комплексов белок – ПАВ, рассчитанных по модели Файнермана. Основные отличия заключаются в том, что в смеси  $\text{Lz} - \text{SDS}$  образуется более гидрофобный комплекс, чем в смеси с DTAB. Это приводит к снижению натяжения при меньших концентрациях и к вытеснению белка из адсорбционного слоя в водный раствор при больших концентрациях добавленного ПАВ. Более сильные взаимодействия SDS с Lz способствуют формированию осадка в системах с концентрацией белка 1 г/л, что не наблюдается для смеси с DTAB.

Смесь Lz – САРВ (рис. 54).

I.  $C < 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

В области малых концентраций поверхностное натяжение постоянно и соответствует значениям для чистого лизоцима. В этой области концентраций САРВ наблюдается линейный рост его адсорбции. Можно сделать вывод, что в слое происходит независимая адсорбция лизоцима и САРВ. В водной фазе присутствуют только малые частицы, соответствующие нативному лизоциму. Рост коэффициента распределения САРВ в присутствии Lz позволяет предположить образование гидрофобного комплекса, переходящего в органическую фазу.

II.  $10^{-5} \leq C \leq 2 \cdot 10^{-5}$

Начинается снижение поверхностного натяжения смешанного раствора до значений, меньших натяжения растворов индивидуальных веществ; адсорбция САРВ продолжает расти, а адсорбция лизоцима не меняется. Такое уменьшение натяжения может быть вызвано формированием гидрофобного комплекса белок – ПАВ, адсорбирующегося на поверхности и переходящего в органическую фазу.

III.  $2 \cdot 10^{-5} < C < 10^{-4} \text{ M}$

В этой области концентраций ПАВ адсорбция САРВ и межфазное натяжение выходят на плато, увеличивается коэффициент распределения ПАВ и в водном растворе начинают формироваться большие агрегаты, снижается ферментативная активность белка. В этой области концентраций адсорбционный слой, состоящий из молекул ПАВ, гидрофобных комплексов белок – ПАВ и индивидуального белка, близок к насыщению. В водном растворе начинается взаимодействие САРВ с лизоцимом по механизму гидрофобного связывания, в результате которого в растворе появляются большие агрегаты частично денатурированного белка. Рост  $D$  САРВ, который наблюдается как в индивидуальном растворе, так и в присутствии белка, может быть вызван началом процесса формирования обратных предмицеллярных агрегатов ПАВ в органической фазе.

IV.  $C \geq 10^{-4} \text{ M}$

Завершается процесс связывания белка с ПАВ в водной фазе, в водном растворе появляются «свободные» молекулы ПАВ, и поверхностное натяжение снова

начинает уменьшаться и совпадает с натяжением для чистого ПАВ. Рост адсорбции ПАВ, происходящей начиная с концентрации  $3 \cdot 10^{-4}$  М, уже связан с полимолекулярной адсорбцией и/или с формированием прямых предмицеллярных агрегатов ПАВ в растворе вблизи межфазной поверхности, которые может регистрировать метод сцинтиллирующей фазы. При  $C \geq 5 \cdot 10^{-4}$  М межфазное натяжение постоянно и соответствует натяжению индивидуального САРВ. В водном растворе начинается образование мицелл САРВ. Таким образом, в области высоких концентраций органическая фаза содержит белок, ПАВ (отдельные молекулы и обратные предмицеллярные агрегаты) и гидрофобные комплексы белок – ПАВ. Поверхностный слой состоит из молекул ПАВ и гидрофобного комплекса белок – ПАВ. В водном растворе находятся большие гидрофильные агрегаты белок – ПАВ, молекулы и мицеллы ПАВ.

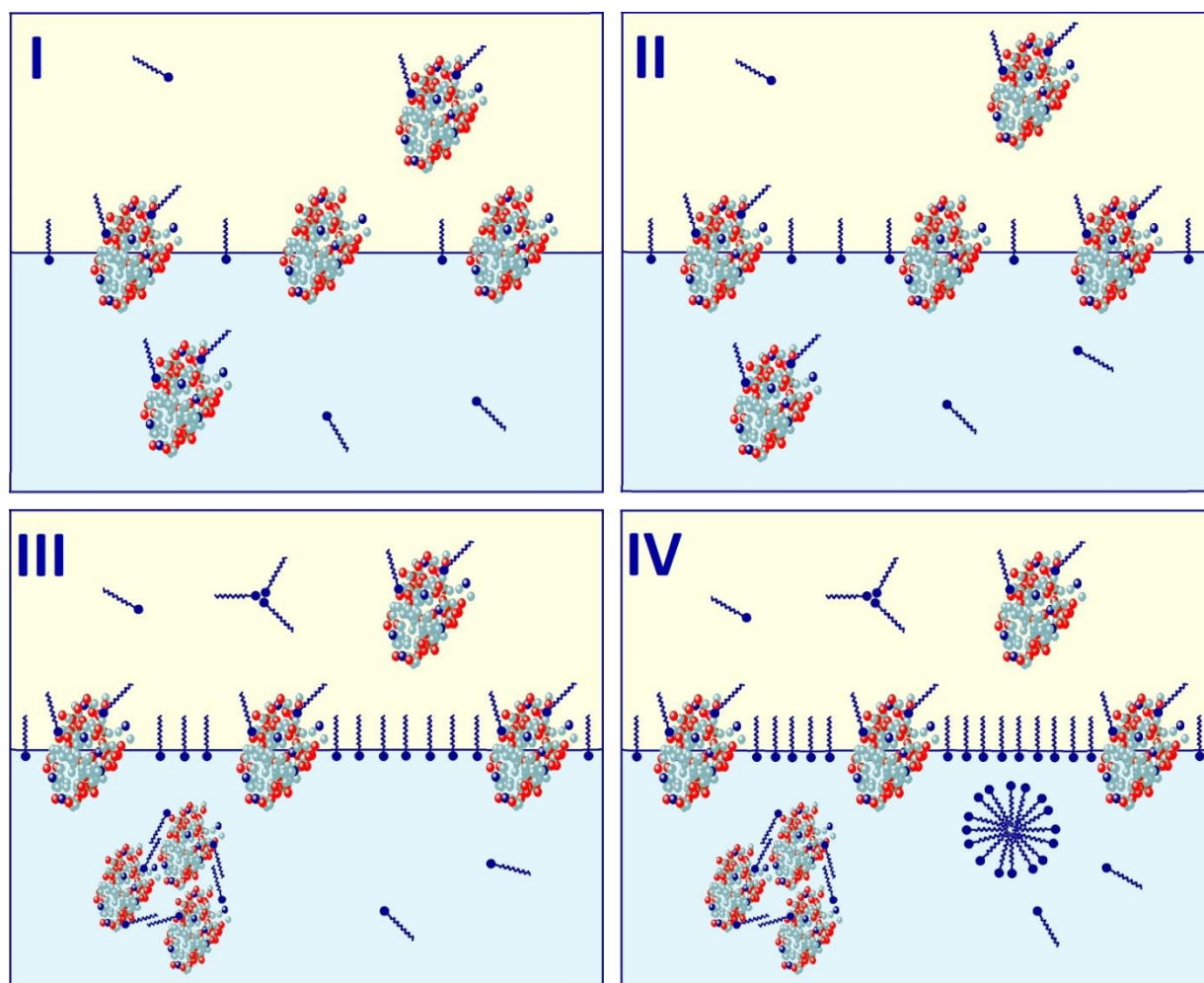


Рис. 54. Схема адсорбции смеси Lz – САРВ на границе вода/октан.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Впервые методом сцинтиллирующей фазы получены количественные данные об адсорбции и распределении компонентов смесей Lz – ПАВ в системе вода/октан. Для систем Lz – SDS и Lz – DTAB установлено, что в области малых концентраций ПАВ ( $10^{-7}$  –  $10^{-6}$  М) образуется гидрофобный комплекс стехиометрией ПАВ:Lz = 8÷10:1, обладающий более высокой растворимостью в октане и адсорбцией на границе вода/октан по сравнению с нативным белком.
2. Установлены условия, при которых происходит частичное вытеснение лизоцима из адсорбционного слоя. Показано, что при мольных соотношениях DTAB(SDS):Lz в системе свыше 10(100):1 адсорбция лизоцима уменьшается как за счет конкурентной адсорбции с ПАВ, так и за счет формирования в водной фазе гидрофильного комплекса компактной структуры.
3. Установлено, что гидрофобные комплексы Lz – SDS и Lz – DTAB обладают повышенной ферментативной активностью по отношению к грамположительным бактериальным клеткам *Micrococcus luteus* по сравнению с индивидуальным Lz. Предложена модель, описывающая зависимость ферментативной активности лизоцима от концентрации ПАВ.
4. Впервые получен меченный тритием CAPB, что позволило применить метод сцинтиллирующей фазы для изучения смеси Lz – CAPB в системе вода/октан. Не обнаружено взаимного влияния Lz и CAPB на адсорбцию компонентов смеси. Впервые установлено снижение ферментативной активности лизоцима при добавлении цвиттерионного ПАВ с концентрацией свыше  $10^{-5}$  М.
5. Показано, что смешанные адсорбционные слои Lz – ПАВ на границе вода/октан обогащены ПАВ; мольная доля ПАВ в слое возрастает в ряду DTAB < SDS < CAPB.
6. Найдено, что устойчивость смачивающих пленок в системе гидрофобизованное стекло/октан/водный раствор смеси Lz – ПАВ увеличивается с ростом концентрации ПАВ; добавки Lz практически не влияют на устойчивость смачивающих пленок. Растекание капель в условиях избирательного смачивания происходит в режиме граничной кинетики.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Холмберг К., Йёнссон Б., Кронберг Б., Линдман Б. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах. М. БИНОМ. Лаборатория знаний. 2007. 528с.
2. Anantapadmanabhan K.P. Protein-surfactant interactions. In: Interactions of surfactants with polymers and proteins, E.D. Goddard and K.P. Anantapadmanaban (Eds), CRC Press, Boca Raton, FL, 1993. Ch.8.
3. Позднякова В.Ю. Получение меченных тритием гуминовых веществ и исследование их свойств. Дисс ... к.х.н. Москва. 2006.
4. Chernysheva M.G., Badun G.A. Liquid scintillation spectrometry of tritium in studying lysozyme behavior in aqueous/organic liquid systems. The influence of the organic phase // *Langmuir*. 2011. V. 27. N.6. P. 2188-2194.
5. Чернышева М.Г., Разживина И.А., Соболева О.А., Бадун Г.А. Радиохимический подход в исследовании конкурентной адсорбции сывороточного альбумина человека и ионогенных поверхностно-активных веществ на границе раздела вода/п-ксилол // *Радиохимия*. 2013. Т.55. N.2. С.180-185.
6. Christov N.C., Denkov N.D., Kralchevsky P.A., Ananthapadmanabhan K.P., Lips A. Synergistic sphere-to-rod micelle transition in mixed solutions of sodium dodecyl sulfate and cocoamidopropyl betaine // *Langmuir*. 2004. V.20. N.3. P.565.
7. Golemanov K., Denkov N.D., Tcholakova S., Vethamuthu M., Lips A. Surfactant mixtures for control of bubble surface mobility in foam studies // *Langmuir*. 2008. V.24. N.18. P. 9956.
8. Hegg P.O. Precipitation of egg white proteins below their isoelectric points by sodium dodecyl sulphate and temperature // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1979. V.579. N.1. P.73-87.
9. Turro N.J., Lei X-G., Ananthapadmanabhan K.R., Aronson M. Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions: the BSA/SDS system // *Langmuir*. 1995. V.11. N.7. P.2525-2533.
10. Vasilescu M., Angelescu D., Almgren M., Valstar A. Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescence probe methods // *Langmuir*. 1999. V.15. N8. P.2635-2643.
11. Santos S.F., Zanette D., Fischer H., Itri R. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering // *J. Colloid and Interface Sci*. 2003. V.262. N.2. P.400-408.
12. Narayanan J., Abdul Rasheed A.S., Bellare J.R. A small-angle X-ray scattering study of the structure of lysozyme-sodium dodecyl sulfate complexes // *J. Colloid and Interface Sci*. 2008. V.328. N.1. P.67-72.



13. Samsó M., Dabah J.-R., Hansen S., Jones G.R. Evidence for sodium dodecyl sulfate/protein complexes adopting a necklace structure // *Eur. J. Biochem.* 1995. V.232. N3. P.818-824.
14. Stenstam A., Montalvo G., Grillo I., Gradzielski M. Small angle neutron scattering study of lysozyme – sodium dodecyl sulfate aggregates // *J. Phys. Chem. B.* 2003. V.107. N44. P.12331-12338.
15. Valstar A., Brown W., Almgren M. The lysozyme–sodium dodecyl sulfate system studied by dynamic and static light scattering // *Langmuir.* 1999. V.15. N.7. P.2366-2374.
16. Lundahl P., Greijer E., Sandberg M., Cardell S., Eriksson K.O. A model for ionic and hydrophobic interactions and hydrogen-bonding in sodium dodecyl sulfate-protein complexes // *Biochimica et Biophysica Acta.* 1986. V.873. N.1. P.20-26.
17. Pradines V., Fainerman V.B., Aksenenko E.V., Kragel J., Wustneck W., Miller R. Adsorption of protein-surfactant complexes at the water/oil interface // *Langmuir.* 2011. V.27. N.3. P.965-971.
18. Kotsmar Cs., Pradines V., Alahverdijeva V.S., Aksenenko E. V., Fainerman V. B., Kovalchuk V.I., Kragel J., Leser M., Noskov B.A., Miller R. Thermodynamics, adsorption kinetics and rheology of mixed protein-surfactant interfacial layers // *Advances in Colloid and Interface Science.* 2009. V.150. N.1. P.41-54.
19. Stenstam A., Topgaard D., Wennerstrom H. Aggregation in a protein-surfactant system. The interplay between hydrophobic and electrostatic interactions // *J. Phys. Chem. B.* 2003. V.107. N32. P.7987-7992.
20. Moren A.K., Khan A. Phase equilibria of an anionic surfactant (sodium dodecyl sulfate) and oppositely charged protein (lysozyme) in water // *Langmuir.* 1995. V.11. N10. P.3636-3643.
21. Liu J-L., Lu R.-C., Xiao J-X., Gao L-X., Gao Z-W. Phase behaviors of the interaction between the anionic surfactants and lysozyme // *J. Shaanxi Normal University (Natural Science Edition).* 2008. V.36. N1. P.53-57.
22. Lu R-C., Xiao J-X., Lai L-H., Zhu B-Y., Zhao G-X. Surfactant-induced refolding of lysozyme // *Biochimica et Biophysica Acta G.* 2005. V.1722. N3. P.271-281
23. Stenstam A., Khan A., Wennerstrom H. The lysozyme-dodecyl sulfate system. An example of protein-surfactant aggregation // *Langmuir.* 2001. V.17. N.24. P.7513-7520.
24. Behbehani G.R., Ramazani S., Gonbadi K. A Thermodynamic investigation on the binding of lysozyme with sodium dodecyl sulfate // *Chem. Soc. Pak.* 2013. V.35. N.6. P.1427-1431.
25. Behbehani G.R., Saboury A.A., Taleshi E. A direct calorimetric determination of denaturation enthalpy for lysozyme in sodium dodecyl sulfate // *Colloids and Surfaces B.* 2008. V.61. N.2. P.224-228.



26. Pirzadeh P., Moosavi-Movahedi A.A., Hemmateenejad B., Ahmad F., Shamsipur M., Saboury A.A. Chemometric studies of lysozyme upon interaction with sodium dodecyl sulfate and  $\beta$ -cyclodextrin // *Colloids and Surfaces B*. 2006. V.52. N.1. P.31-38.
27. Moosavi-Movahedi A.A., Pirzadeh P., Hashemnia S., Ahmadian S., Hemmateenejad B., Amani M., Saboury A.A., Ahmad F., Shamsipur M., Hakimelahi G.H., Tsai F.Y., Alijanvand H.H., Yousefi R. Fibril formation of lysozyme upon interaction with sodium dodecyl sulfate at pH 9.2 // *Colloids and Surfaces B*. 2007. V.60. N.1. P.55-61.
28. Stenstam A., Khan A., Wennerstrom H. Lysozyme in cationic surfactant mixtures // *Langmuir*. 2004. V.20. N.18. P.7760-7765.
29. Reynolds J.A., Gallagher J.P., Steinhardt J. Effect of pH on the binding of N-alkyl sulfates to bovine serum albumin // *Biochemistry*. 1970. V.9. N.5. P.1232-1238.
30. Jones M.N. A theoretical approach to the binding of amphipathic molecules to globular proteins // *Biochem J*. 1975. V.151. N.1. P.109-114.
31. Jones M.N., Manley P., Midgley P.J. Adsorption maxima in a protein surfactant solution // *J. Colloid and Interface Sci*. 1981. V.82. N.1. P.257-259.
32. Jones M.N., Manley P., Holt A. Cooperativity and effects of ionic strength on the binding of sodium n-dodecyl sulphate to lysozyme // *Int. J. Biol. Macromol*. 1984. V.6. N.2. P.65-68.
33. Lad M.D., Ledger V.M., Briggs B., Green R.J., Frazier R.A. Analysis of the SDS-lysozyme binding isotherm // *Langmuir*. 2003. V.19. N.12. P. 5098-5103.
34. Alizadeh N., Ranjbar B., Mahmoodian M. Electrochemical study of thermodynamics of interaction of lysozyme with sodium dodecyl sulfate in binary ethanol/water mixtures // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2003. V.212. N.2. P.211-218.
35. Chatterjee A., Moulik S.P., Majhi P.R., Sanyal S.K. Studies on surfactant-biopolymer interaction. I. Microcalorimetric investigation on the interaction of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and sodium dodecylsulfate (SDS) with gelatin (Gn), lysozyme (Lz) and deoxyribonucleic acid (DNA) // *Biophysical Chemistry*. 2002. V.98. N.3. P.313-327.
36. Folmer B., Holmberg K., Svensson M. Interaction of *Rhizomucor miehei* lipase with an amphoteric surfactant at different pH values // *Langmuir*. 1997. V.13. N.22. P.5864-5869.
37. Skagerlinda P., Holmberg K. Effect of the surfactant on enzymatic hydrolysis of palm oil in microemulsion // *Journal of Dispersion Science and Technology*. 1994. V.15. N.3. P.317-322.
38. Chauhan S., Chauhan M.S., Sharma P., Rana D.S., Umar A. Physico-chemical studies of oppositely charged protein-surfactant system in aqueous solutions: Sodium dodecyl sulphate (SDS)-lysozyme // *Fluid Phase Equilibria*. 2013. V.337. P.39-46.

39. Behbehani G.R., Saboury A.A., Taleshi E. A direct calorimetric determination of denaturation enthalpy for lysozyme in sodium dodecyl sulfate // *Colloids and Surfaces B*. 2008. V.61. N.2. P.224-228.
40. Li Q, Zhai T, Du K, Li Y, Feng W. Enzymatic activity regulated by a surfactant and hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin // *Colloids and Surfaces B*. 2013. V.112. P.315-321.
41. Jain N., Bhattacharya M., Mukhopadhyay S. Kinetics of surfactant-induced aggregation of lysozyme studied by fluorescence spectroscopy // *J. Fluoresc.* 2011. V.21. N.2. P.615-625.
42. Sahu K., Mondal S.K., Roy D., Karmakar R., Bhattacharyya K. Study of interaction of a cationic protein with a cationic surfactant using salvation dynamics: lysozyme:CTAB // *Chem. Phys. Lett.* 2005. V.413. N.4-6. P.484-489.
43. Behbehani G.R., Saboury A.A., Taleshi E. Determination of partial unfolding enthalpy for lysozyme upon interaction with dodecyltrimethylammonium bromide using extended salvation model // *J. Molecular Recognition*. 2008. V.21. N1. P.132-135.
44. Wahlgren M., Kedstrom J., Arnebrant T. The interactions in solution between nonionic surfactants and globular proteins: effects on cloud points // *J. Dispersion Science and Technology*. 1997. V.18. N4. P.449-458.
45. Chauhan M.S., Rajni, Sharma K., Pathania S., Chauhan S., Kumar G. Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with ionic surfactants: apparent molar volume and compressibility studies of ionic surfactants in aqueous solutions of  $\beta$ -lactoglobulin // *Colloids and Surfaces A*. 2008. V.329. N1-2. P.106-111.
46. Mitra D., Bhattacharya S.C., Moulik S.P. Physicochemical studies on interaction of gelatin with cationic surfactants alkyltrimethylammonium bromides (ATABs) with special focus on the behavior of the hexadecyl homologue // *J. Phys. Chem. B*. 2008. V.112. N21. P.6609-6619.
47. Kuehner D.E., Engmann J., Fergg F., Wernick M., Blanch H.W., Prausnitz J.M. Lysozyme net charge and ion binding in concentrated aqueous electrolyte solutions // *J. Phys. Chem. B*. 1999. V.103. N.8. P.1368-1374.
48. Steri D., Monduzzi M., Salis A. Ionic strength affects lysozyme adsorption and release from SBA-15 mesoporous silica // *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013. V.170. P.164-172.
49. Sarmiento F., Ruso J.M., Prieto G., Mosquera V.  $\zeta$ -potential study on the interactions between lysozyme and sodium n-alkylsulfates // *Langmuir*. 1998. V.14. N.20. P.5725-5729.
50. Mosquera V., Ruso J.M., Prieto G., Sarmiento F. Characterization of the interactions between lysozyme and n-alkyltrimethylammonium bromides by zeta potential measurements // *J. Phys. Chem.* 1996. V.100. N.41. P.16749-16753.

51. Szymanski J., Pobozy E., Trojanowicz M., Wilk A., Garstecki P., Hołyst R. Net charge and electrophoretic mobility of lysozyme charge ladders in solutions of nonionic surfactant // *J. Phys. Chem. B*. 2007. V.111. N.19. P.5503-5510.
52. Kinugasa T., Watanabi K., Takeuchi H. Activity and conformation of lysozyme in reversed micellar extraction // *Ind. Eng. Chem. Res.* 1992. V.31. N.7. P.1827-1829.
53. Shin Y.O., Rodil E., Vera J.H. Selective precipitation of lysozyme from egg white using AOT // *Journal of Food Science*. 2006. V.68. N.2. P.595-598.
54. Shin Y.O., Weber M.E., Vera J.H. Reverse micellar extraction and precipitation of lysozyme using sodium di(2-ethylhexyl)sulfosuccinate // *Biotechnol Prog.* 2003. V.19. N.3. P.928-935.
55. Jones M.N., Manley P., Midgley P.J., Wilkinson A.E. Dissociation of bovine and bacterial catalases by sodium n-dodecyl sulfate // *Biopolymers*. 1982. V.21. N.7. P.1435-1450.
56. Creagh A.L., Prausnitz J.M., Blanch H.W. The effect of aqueous surfactant solutions on alcohol dehydrogenase (LADH) // *Biotechnol Bioeng.* 1993. V.41. N.1. P.156-161.
57. Mogensen J.E., Sehgal P., Otzen D.E. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents // *Biochemistry*. 2005. V.44. N.5. P.1719-1730.
58. El-Sayed M.Y., Roberts M.F. Charged detergents enhance the activity of phospholipase C (*Bacillus cereus*) towards micellar short-chain phosphatidylcholine // *Biochem. Biophys. Acta*. 1985. V.831. N.1. P.133-141.
59. Клячко Н.Л., Легоцкий С.А., Левашов П.А., Попова В.М., Белогурова Н.Г., Тимашева А.В., Дятлов И.А., Левашов А.В. Эндолизин бактериофага SPZ7: влияние эффекторов на каталитическую активность фермента в лизисе грамотрицательных микроорганизмов // *Вестник Моск. ун-та. Серия 2. Химия*. 2010. Т. 51. N.3. С.222-226.
60. Spreti N., Di Profio P., Marte L., Bufali S., Brinchi L., Savelli G. Activation and stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by cationic additives // *Eur J Biochem*. 2001. V.268. N.24. P.6491-6497.
61. Blanko E., Ruso J.M., Sabin J., Prieto G., Sarmiento F. Thermal stability of lysozyme and myoglobin in the presence of anionic surfactants // *J. Thermal Analysis and Calorimetry*. 2007. V.87. N.1. P.211-215.
62. Alahverdjieva V.S., Grigoriev D.O., Ferri J.K., Fainerman V.B., Aksenenko E.V., Leser M.E., Michel M., Miller R. Adsorption behavior of hen egg-white lysozyme at air/water interface // *Colloids and Surfaces. A*. 2008. V.323. N.1-2. P.67-174.
63. Miller R., Fainerman V.B., Leser M.E., Michel M. Surface tension of mixed non-ionic surfactant/protein solutions: comparison of a simple theoretical model with experiments // *Colloids and Surfaces. A. Physicochem. Eng. Aspects*. 2004. V.233. P.39-42.

64. Sundaram S., Ferri J.K., Vollhardt D., Stebe K.J. Surface phase behavior and surface tension evolution for lysozyme adsorption onto clean interfaces and into DPPC monolayers: theory and experiment // *Langmuir*. 1998. V.14. N.5. P.1208-1218.
65. Lu R.J., Su T.J., Thomas R.K., Penfold J., Webster J. Structural conformation of lysozyme layers at the air/water interface studied by neutron reflection // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1998. V.94. N.21. P.3279-3287.
66. Lu R.J., Su T.J., Howlin B.J. The effect of solution pH on the structural conformation of lysozyme layers adsorbed on the surface of water // *J. Phys. Chem. B*. 1999. V.103. N.28. P.5903-5909.
67. Задымова Н.М., Ямпольская Г.П., Филатова Л.Ю. Взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с неионогенным ПАВ Твин-80 в водных растворах: комплексообразование и ассоциация // *Коллоидн. журн.* 2006. Т.68. N.2. С.187-197.
68. Green R.J., Su T.J., Joy H., Lu R.J. Interaction of lysozyme and Sodium Dodecyl Sulfate at the air-liquid interface // *Langmuir*. 2000. V.16. N.13. P.5797-5805.
69. Green R.J., Su T.J., Lu J.R., Webster J., Penfold J. Competitive adsorption of lysozyme and C<sub>12</sub>E<sub>5</sub> at air/liquid interface // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2000. V.2. P.5222-5229.
70. Staples E., Tucker I., Penfold J., Warren N., Thomas R.K., Taylor D.F.J., Organization of polymer-surfactant mixtures at the air-water interface: sodium dodecyl sulfate and poly(dimethyldiallylammonium chloride) // *Langmuir*. 2002. V.18. N.13. P.5147-5153.
71. Zhang X.L., Taylor D.J.F., Thomas R.K., Penfold J. Adsorption of polyelectrolyte/surfactant mixtures at the air-water interface: modified poly(ethyleneimine) and sodium dodecyl sulfate // *Langmuir*. 2011. V.27. N.6. P.2601-2612.
72. Penfold J., Tucker I., Thomas R.K., Taylor D.F.J., Zhang X.L. pH sensitive adsorption of polypeptide/sodium dodecyl sulfate mixtures // *Langmuir*. 2006. V.22. N.18. P.7617-7621.
73. Monteux C., Williams C.E., Bergeron V. Interfacial microgels formed by oppositely charged polyelectrolytes and surfactants. Part 2. Influence of surfactant chain length and surfactant/polymer ratio // *Langmuir*. 2004. V.20. N.13. P.5367-5374.
74. Bell C.G., Breward C.J.W., Howell P.D., Penfold J., Thomas R.F. Macroscopic modeling of the surface tension of polymer-surfactant systems // *Langmuir*. 2007. V.23. N.11. P.6042-6052.
75. Stubenrauch, V. B. Fainerman, E. V. Aksenenko, R. Miller. Adsorption behavior and dilational rheology of the cationic alkyl trimethylammonium bromides at the water/air interface // *J. Phys. Chem. B*. 2005. V.109. N.4. P.1505-1509.

76. Miller R., Fainerman V.B., Makievski A.V., Kragel J., Wustneck R. Adsorption characteristics of mixed monolayers of a globular protein and non-ionic surfactant // *Colloids Surf. A*. 2000. V.161. N.1. P.151-157.
77. Fainerman V.B., Lucassen-Reynders E.N., Miller R. Adsorption of surfactant and proteins at fluid interfaces // *Colloids and Surfaces A*. 1998. V.143. N.2-3. P.141-165.
78. Fainerman V.B., Zholob S.A., Leser M.E., Michel M., Miller R. Adsorption from mixed ionic surfactant/protein solutions: analysis of ion binding // *J. Phys. Chem. B* 2004. V.108. N.43. P. 16780-16785.
79. Alahverdijeva V.S., Grigoriev D.O., Fainerman V.B., Aksenenko E.V., Miller R., Mohwald H. Competitive adsorption from mixed hen egg-white lysozyme/surfactant solution at air-water interface studied by tensiometry, ellipsometry, and surface dilatational rheology // *J. Phys. Chem.* 2008. V.112. P.2136-2143.
80. Alahverdijeva V.S., Khristov K., Exerova D., Miller R. Correlation between adsorption isotherms, thin liquid films and foam properties of protein/surfactant mixtures: lysozyme/C<sub>10</sub>DMSO and lysozyme/SDS // *Colloids and Surfaces A*. 2008. V.323. N.1-3. P.132-138.
81. Makievski A. V., Fainerman V. B., Bree M., Wustneck R., Kragel J., Miller R. Adsorption of proteins at the liquid/air interface // *J. Phys. Chem. B*. 1998. V.102. N.2. P.417-425.
82. Fainerman V.B., Lucassen-Reynders E.H., Miller R. Description of the adsorption behavior of proteins at water/fluid interfaces in the framework of a two-dimensional solution model // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2003. V.106. N.1-3. P.237-259.
83. Yang F., Liu Y., Gao L., Sun J. pH-sensitive highly dispersed reduced graphene oxide solution using lysozyme via an in situ reduction method // *J. Phys. Chem. C*. 2010, V.114. P.22085-22091.
84. Kotsmar Cs., Grigoriev D.O., Xu F., Aksenenko E. V., Fainerman V. B., Leser M. E., Miller R. Equilibrium of adsorption of mixed milk protein/surfactant solutions at the water/air interface // *Langmuir*. 2008. V.24. N.24. P.13977-13984.
85. Miller R., Fainerman V. B., Leser M., Michel M. Kinetics of adsorption of proteins and surfactants // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2004. V.9. N.5. P.350-356.
86. Fainerman V. B., Zholob S. A., Leser M., Michel M., Miller R. Competitive adsorption from mixed nonionic surfactant/protein solutions // *J. Colloid and Interface Sci.* 2004. V.274. N.2. P.496-501.
87. Penfold J., Thomas R.K., Li P., Petkov J.T., Tucker I.M., Cox A.R., Hedges N., Webster J.R.P., Skoda M.W.A. The impact of the degree of ethoxylation of the ethoxylated polysorbate nonionic surfactant on the surface self-assembly of

- hydrophobin-ethoxylated polysorbate surfactant mixtures // *Langmuir*. 2014. V.30. N.32. P.9741-9751.
- 88.Zhu Y-Y., Xu G-Y. Investigation of macromolecule/surfactant interaction by interfacial dilational rheology method // *Acta Phys.-Chim. Sin.* 2009. V.25. N.1. P.191-200.
- 89.Kragel J., Derkach S.R., Miller R. Interfacial shear rheology of protein-surfactant layers // *Adv. Colloid and Interface Sci.* 2008. V.144. N.1-2. P.38-53.
- 90.Lucassen-Reynders E.H., Benjamins J., Fainerman V.B. Dilational rheology of protein films adsorbed at fluid interfaces // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2010. V.15. N.4. P.264-270.
- 91.Bantchev G.B., Schwartz D.K. Surface shear rheology of  $\beta$ -Casein layers at the air/solution interface: formation of a two-dimensional physical gel // *Langmuir*. 2003. V.19. N.7. P.2673-2682.
- 92.Jung J.M., Zeynel Gunes D., Mezzenga R. Interfacial activity and interfacial shear rheology of native  $\beta$ -lactoglobulin monomers and their heat-induced fibers // *Langmuir*. 2010. V.26. N.19. P.15366-15375.
- 93.Maldonado-Valderrama J., Fainerman V.B., Galvez-Ruiz M.J., Martin-Rodriguez A., Cabrerizo-Vilchez M.A., Miller R. Dilatational rheology of  $\beta$ -casein adsorbed layers at liquid-fluid interfaces // *J. Phys. Chem. B*. 2005. V.109. P.17608-17616.
- 94.Cascao Pereira L.G., Theodoly O., Blanch H.W., Radke C.J. Dilatational rheology of BSA conformers at the air/water interface // *Langmuir*. 2003. V.19. N.6. P.2349-2356.
- 95.Rodriguez Nino M.R., Wilde P.J., Clark D.C., Husband F.A., Rodriguez Patino J.M. Rheokinetic analysis of protein films at the air-aqueous subphase interface. 2. Bovine serum albumin adsorption from sucrose aqueous solutions // *J. Agric. Food Chem.* 1997. V.45. N.8. P.3016-3021.
- 96.Noskov B.A., Mikhailovskaya A.A., Lin S.Y., Loglio G., Miller R. Bovine serum albumin unfolding at the air/water interface as studied by dilational surface rheology // *Langmuir*. 2010. V.26. N.22. P.17225-17231.
- 97.Malcolm A.S., Dexter A.F., Middelberg A.P.J. Mechanical properties of interfacial films formed by lysozyme self-assembly at the air-water interface // *Langmuir*. 2006. V.22. N.21. P.8897-8905.
- 98.Roberts S.A., Kellaway I.W., Taylor K.M.G., Warburton B, Peters K. Combined surface pressure-interfacial shear rheology study of the effect of pH on the adsorption of proteins at the air-water interface // *Langmuir*. 2005. V.21. N.16. P.7342-7348.
- 99.Mikhailovskaya A.A., Noskov B.A., Lin S.Y., Loglio G., Miller R. Formation of protein/surfactant adsorption layer at the air/water interface as studied by dilational surface rheology // *J. Phys. Chem. B*. 2011. V.115. N.33. P.9971-9979.

100. Maestro A., Kotsmar C., Javadi A., Miller R., Ortega F., Rubio R.G. Adsorption of  $\beta$ -casein-surfactant mixed layers at the air-water interface evaluated by interfacial rheology // *J. Phys. Chem. B*. 2012. V.116. N.16. P.4898-4907.
101. Kotsmar C., Kragel J., Kovalchuk V.I., Aksenenko E.V., Fainerman V.B., Miller R. Dilation and shear rheology of mixed beta-casein/surfactant adsorption layers // *J. Phys. Chem. B*. 2009. V.113. N.1. P.103-113.
102. Kotsmar C., Kragel J., Kovalchuk V. I., Aksenenko E. V., Fainerman V. B., Miller R. Dilation and Shear Rheology of Mixed  $\beta$ -Casein/Surfactant Adsorption Layers // *J. Phys. Chem. B*. 2009. V.113. N.1. P.103-113.
103. Pradines V., Kragel J., Fainerman V. B., Miller R. Interfacial Properties of Mixed  $\beta$ -Lactoglobulin-SDS Layers at the Water/Air and Water/Oil Interface // *J. Phys. Chem. B*. 2009. V.113. N.3. P.745-751.
104. Pradines V., Fainerman V.B., Aksenenko E.V., Kragel J., Wustneck R., Miller R. Adsorption of protein-surfactant complexes at the water/oil interface // *Langmuir*. 2011. V.27. N.3. P.965-971.
105. Kotsmar C., Aksenenko E.V., Fainerman V.B., Pradines V., Kragel J., Miller R. Equilibrium and dynamics of adsorption of mixed  $\beta$ -casein/surfactant solutions at the water/hexane interface // *Colloids and Surfaces A*. 2010. V.354. N.1-3. P.210-217.
106. Mackie A.R., Gunning A.P., Wilde P.J., Morris V.J. Orogenic displacement of protein from the oil/water interface // *Langmuir*. 2000. V.16. N.5. P.2242-2247.
107. Kinugasa T., Tanahashi S., Takeuchi H. Extraction of lysozyme using reversed micellar solution: distribution equilibrium and extraction rates // *Ind. Eng. Chem. Res.* 1991. V.30. N.11. P.2470-2476.
108. Mackie A.R. Structure of adsorbed layers of mixtures of proteins and surfactants // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2004. V.9. N.5. P.357-361.
109. Lu J.R., Swann M.J., Peel L.L., Freeman N.J. Lysozyme adsorption studies at the silica/water interface using dual polarization interferometry // *Langmuir*. 2004. V.20. N.5. P.1827-1832.
110. Perriman A.W., White J.W. Kinetics of adsorption of lysozyme at the air-water interface and the role of protein charge // *Physica. B*. 2006. V.385-386. P.716-718.
111. Engelhardt K., Lexis M., Gochev G., Konnerth C., Miller R., Willenbacher N., Peukert W., Braunschweig B. pH effects on the molecular structure of  $\beta$ -lactoglobulin modified air-water interfaces and its impact on foam rheology // *Langmuir*. 2013. V.29. N.37. P.11646-11655.
112. Arnebrant T., Wahlgren M.C. Proteins at Interfaces II // *ACS Symposium Series*. 1995. V.602.
113. Liu G., Craig V.S. Improved cleaning of hydrophilic protein-coated surfaces using the combination of nanobubbles and SDS // *ACS Appl. Mater Interfaces*. 2009. V.1. N.2. P.481-487.

114. Yang F., Liu Y., Gao L., Sun J. pH-sensitive highly dispersed reduced graphene oxide solution using lysozyme via an in situ reduction method // *J. Phys. Chem. C*. 2010. V.114. N.50. P.22085-22091.
115. Mehan S., Chinchalikar A.J., Kumar S., Aswal V.K., Schweins R. Small-angle neutron scattering study of structure and interaction of nanoparticle, protein, and surfactant complexes // *Langmuir*. 2013. V.29. N.36. P.11290-11299.
116. Sariri P.R., Toosi A.E. Lecithin treatment to prevent protein adsorption onto contact lenses // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2003. V.39. N.4. P.471-474.
117. Lin S.Y., Krochta J.M. Whey protein coating efficiency on surfactant-modified hydrophobic surfaces // *J. Agric. Food Chem*. 2005. V.53. N.12. P.5018-5023.
118. Bastrzyk A., Polowczyk I., Szelağ E., Sadowski Z., The effect of protein surfactant interaction on magnesite rock flotation // *Physicochemical Problems of Mineral Processing*. 2008. V.42. N.42. P.261-269.
119. Daly S.M., Przybycien T.M., Tilton R.D. Coverage-dependent orientation of lysozyme adsorbed on silica // *Langmuir*. 2003. V.19. N.9. P.3848-3857.
120. Green R.J., Su T.J., Lu J.R. The displacement of preadsorbed protein with a cationic surfactant at the hydrophilic SiO<sub>2</sub>-water interface // *J. Phys. Chem. B*. 2001. V.105. N.38. P.9331-9338.
121. Green R.J., Su T.J., Lu J.R. The interaction between SDS and lysozyme at the hydrophilic solid-water interface // *J. Phys. Chem. B*. 2001. V.105. N.8. P.1594-1602.
122. Lu J.R., Su T.J., Thomas R.K., Penfold J. Binding of sodium dodecyl sulfate to bovine serum albumin layers adsorbed at the silica-water interface // *Langmuir*. 1998. V.14. N.21. P.6261-6268.
123. Lu J.R., Su T.J. Binding of surfactants onto preadsorbed layers of Bovine Serum Albumin at the silica-water interface // *J. Phys. Chem. B*. 1998. V.102. N.50. P.10307-10315.
124. Zhang X.L., Penfold J., Thomas R.K., Tucker I.M., Petkov J.T., Bent J., Cox A., Campbell R.A. Adsorption behavior of hydrophobin and hydrophobin/surfactant mixtures at the air-water interface // *Langmuir*. 2011. V.27. N.18. P.11316-11323.
125. Froberg J.C., Blomberg E., Claesson P.M. Desorption of lysozyme layers by sodium dodecyl sulfate studied with the surface force technique // *Langmuir*. 1999. V.15. N.14. P.1410-1417.
126. Tilton R.D., Blomberg E., Claesson P.M. Effect of anionic surfactant on interactions between lysozyme layers adsorbed on mica // *Langmuir*. 1993. V.9. N.8. P.2102-2108.
127. Gunning A.P., Mackie A.R., Wilde P.J., Morris V.J. In situ observation of the surfactant-induced displacement of protein from a graphite surface by atomic force microscopy // *Langmuir*. 1999. V.15. P.4636-4640.
128. Беловодский Л.Ф., Гаевой В.К., Гришмановский В.И. Тритий. М., 1985. 248 С.
129. Feinendegen L.E. Tritium-labeled molecules in biology and medicine. Acad. press. NY London. 1967. P.429.
130. Graham D.E., Philips M.C. Protein at liquid interface. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation // *J. Colloid and Interface Sci*. 1979. V.70. N.3. P.403-414.



131. Graham D.E., Philips M.C. Protein at liquid interface. II. Adsorption isotherms // J. Colloid and Interface Sci. 1979. V.70. N.3. P.414-426.
132. Wang R., Schlenoff J.B. Adsorption of a radiolabeled random hydrophilic/hydrophobic copolymer at the liquid/liquid interface: kinetics, isotherms, and self-exchange// Macromolecules. 1998. V.31 . N.2. P.494-500.
133. Damodaran S., Sengupta T. // Dynamics of competitive adsorption of  $\beta$ -casein and  $\alpha$ -casein at planar triolein-water interface: evidence for incompatibility of mixing in the interfacial film // J. Agric. Food Chem. 2003. V.51. N.6. P.1658-1665.
134. Anand K., Damodaran S. Dynamics of exchange between  $\alpha_{S1}$ -casein and  $\beta$ -casein during adsorption at air-water interface // J. Agric. Food Chem. 1996. V.44. N.4. P.1022-1028.
135. Sengupta T., Razumovsky L., and Damodaran S. Energetics of protein-interface interactions and its effect on protein adsorption // Langmuir. 1999. V.15. N.20. P.6991-7001.
136. Sengupta T., Damodaran S. Role of dispersion interactions in the adsorption of proteins at oil-water and air-water interfaces // Langmuir. 1998. V.14. P.6457-6469.
137. Graham D.E., Chattergoon L., Phillips M.C. A technique for measuring interfacial concentrations of surfactants at the oil-water interface // J. Phys. E: Intsrum. 1975. V.8. N.8. P.696-699.
138. Бадун Г.А. Меченные тритием соединения. Методическое руководство к курсу «Методы получения меченых органических соединений». М.: 2008. 38 с.
139. Graham D.E., Phillips M.C. Proteins at liquid interfaces // J. Colloid and Interface Sci. 1979. V. 70. N.3. P.415-426.
140. Алентьев А.Ю. Филатов Э.С. Радиометрический метод исследования межфазных границ двух несмешивающихся жидкостей // Радиохимия. 1991. Т.54. N.6. С.80-87.
141. Алентьев А.Ю. Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П. Распределение сывороточного альбумина в системе вода - межфазный адсорбционный слой - углеводород // Коллоид. журн. 1992.Т. 54. С. 14-20.
142. Пелех В.В., Алентьев А.Ю., Ямпольская Г.П., Измайлова В.Н. Влияние хлоридов щелочных металлов на распределение сывороточного альбумина в системе вода-межфазный адсорбционный слой-толуол. 2. Влияние солей на равновесное распределение белка в системе // Коллоидн. журн. 1998. Т.60. N.2. С.239-244.
143. Бадун Г.А., Чернышева М.Г., Тясто З.А., Федосеев В.М. Жидкостная сцинтилляционная спектрометрия трития в исследовании адсорбции веществ на межфазной границе вода-неполярная жидкость // Вестник Моск. ун-та. Сер.2. Химия. 2009. Т.50. N.5. С.355-362.

144. Чернышева М.Г. Определение состава и строения поверхностных слоев молекулярных систем с помощью атомарного трития и меченых тритием соединений. Дисс ... к.х.н. Москва. 2008.
145. Badun G.A., Pozdnyakova V.Yu., Chemysheva M.G., Shchepina N.E., Fedoseev V.M. Determination of hydrophobicity and surface activity of substances in system toluene - water with help of tritium labeled compounds // Proc. of 8th Int. Sci. Conf. "Physical and Chemical Processes on Selection of Atoms and Molecules". Zvenigorod. Russia. 2003. P.193-198.
146. Chernysheva M.G., Tyasto T.A., Badun G.A. Scintillation phase method: A new approach for studying surfactant behavior at liquid/liquid interface // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2009. V.280. N.2. P.303-306.
147. Badun G.A., Soboleva O.A., Chernysheva M.G. Surfactant adsorption at the water-p-xylene interface as studied by scintillation phase method // Mendeleev Commun. 2007. V.17. N6. P.357-358.
148. Badun G.A., Chernysheva M.G., Tyasto Z.A., Fedoseev V.M. Liquid scintillation spectrometry of tritium in the investigation of compound adsorption at a water/nonpolar liquid interface // Moscow University Chemistry Bulletin. 2009. V.64. N.5. P.282-288.
149. Бадун Г.А., Чернышева М.Г., Позднякова В.Ю., Федосеев В.М. Новый вариант метода сцинтиллирующей фазы // Радиохимия. 2005. Т.7. N.6. С.536-540.
150. Chernysheva M.G., Badun G.A. Ionic surfactant adsorption at aqueous/organics interfaces determined by a scintillation phase method // Mendeleev Commun. 2011. V.21. N.2. P.99-100.
151. Chernysheva M.G., Soboleva O.A., Badun G.A. Studing adsorption of surfactant mixtures at water/p-xylene interface by scintillation phase technique // Mendeleev Commun. 2008. V.18. N.6. P.345-346.
152. Chernysheva M.G., Soboleva O.A., Badun G.A. Competitive adsorption and interactions between lysozyme and ionic surfactants in an aqueous/organic liquid system // Colloids and Surfaces A. 2012. V.409. P.130-137.
153. Luan Y., Li D., Wang Y., Liu X., Brash J.L., Chen H. <sup>125</sup>I-radiolabeling, surface plasmon resonance, and quartz crystal microbalance with dissipation: three tools to compare protein adsorption on surfaces of different wettability // Langmuir. 2014. V.30. N.4. P.1029-1035.
154. Wagner M.S., Horbett T.A., Castner D.G. Characterization of the structure of binary and ternary adsorbed protein films using Electron Spectroscopy for Chemical Analysis, Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, and Radiolabeling // Langmuir. 2003. V.19. P.1708-1715.
155. Bentaleb A., Abele A., Haikel Y., Schaaf P., Voegel J.C. FTIR-ATR and radiolabeling study of structural modifications during protein adsorption on hydrophilic surfaces. 2. The case of Apo- $\alpha$ -lactalbumine // Langmuir. 1999. V.15. N.14. P.4930-4933.
156. Bentaleb A., Abele A., Haikel Y., Schaaf P., Voegel J.C. FTIR-ATR and radiolabeling study the adsorption of Ribonuclease A onto hydrophilic surfaces: Correla-

- tion between the exchange rate and the interfacial denaturation // *Langmuir*. 1998. V.14. N.22. P.6493-6500.
157. Sousa S.R., Moradas-Ferreira P., Saramago B., Melo L.V., Barbosa M.A. Human serum albumin adsorption on TiO<sub>2</sub> from single protein solutions and from plasma // *Langmuir*. 2004. V.20. N.22. P.9745-9754.
158. Ackermann D.M., Jewell D.N., Stedman M.L., Burapatana V., Atukorale P.V., Pinson M.L., Wardle A.E., Zhu W., Tanner R.D. Breathing air from protein foam // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2003. V.107. N.1-3. P.659-671.
159. Alsaati H.A., Ditzler D., Burapatana V., Tanner R.D. Using egg albumin foam to extinguish fires // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2003. V.46. N.4. P.735-740.
160. Nash P. Fighting fires in oil storage tanks using base injection of foam. Part I // *Fire Technology*. 1978. V.14. N.1. P.15-27.
161. Zaggia A., Conte L., Padoan G., Bertani R. Synthesis and application of perfluoroalkyl quaternary ammonium salts in protein-based fire-fighting foam concentrates // *Journal of Surfactants and Detergents*. 2010. V.13. N.1. P.33-40.
162. Rieger M., Rhein L.D. Surfactants in cosmetics. Second Edition // *Surfactant Science*. 1997. V.68. P.658.
163. Holmberg K., Shah D.O., Schwuger M.J. Handbook of applied surface and colloid chemistry // John Wiley & Sons, LTD. 2001. 591 p.
164. Aehle W. Enzymes in Industry: Production and Applications // Wiley. Weinheim. 2007. 484 p.
165. Otzen D. Protein-surfactant interactions: A tale of many states // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011. V.1814. N.5. P.562-591.
166. Desfougères Y., Lechevalier V., Pezennec S., Artzner F., Nau F. Dry-heating makes hen egg white lysozyme an efficient foaming agent and enables its bulk aggregation // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V.56. N.13. P.5120-5128.
167. Chen J., Dickinson E. Viscoelastic properties of protein-stabilized emulsions: effect of protein-surfactant interactions // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V.46. N.1. P.91-97.
168. Demetriades K., McClements D.J. Influence of pH and heating on physicochemical properties of Whey Protein-stabilized emulsions containing a nonionic surfactant // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V.46. N.10. P.3936-3942.
169. Knudsen J.C., Ogendal L.H., Skibsted L.H. Droplet surface properties and rheology of concentrated oil in water emulsions stabilized by heat-modified beta-lactoglobulin B // *Langmuir*. 2008. V.24. N.6. P.2603-2610.
170. Dickinson E. Proteins at interfaces and in emulsions. Stability, rheology and interactions // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1998. V.94. P.1657-1669.
171. Goff, H. D., Jordam, W. K. Action of emulsifiers in promoting fat destabilization during the manufacture of ice-cream // *J. Dairy Sci.* 1989. V.72. N.1. P.18.
172. Gelin J.L., Poyen L., Courthaudon J.L., Le Meste M., Lorient D. Structural changes in oil-in-water emulsions during the manufacture of ice-cream. // *Food Hydrocolloids*. 1994. V.8. N.3-4. P.299.

173. Lechevalier V., Croguennec T., Pezennec S., Guerin-Dubiard C., Pasco M., Nau F. Ovalbumin, ovotransferrin, lysozyme: three model proteins for structural modifications at the air-water interface // *J. Agric. Food. Chem.* 2003. V.51. N.21. P.6354-6361.
174. Marchal R., Chaboche D., Douillard R., Jeandet P. Influence of lysozyme treatments on champagne base wine foaming properties // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V.50. N.6. P.1420-1428.
175. Maldonado-Valderrama J., Langevin D. On the difference between foams stabilized by surfactants and Whole Casein or  $\beta$ -Casein. Comparison of foams, foam films, and surfaces studies // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V.112. N.13. P.3989-3996.
176. Maldonado-Valderrama J., Martin-Molina A., Martin-Rodriguez A., Cabrerizo-Vilchez M.A., Galvez-Ruiz M.J., Langevin D. Surface properties and foam stability of protein/surfactant mixtures: theory and experiment // *J. Phys. Chem. C.* 2007. V.111. N.6. P.2715-2723.
177. Chen J., Dickinson E. Viscoelastic properties of protein-stabilized emulsions: effect of protein-surfactant interactions // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V.46. N.1. P.91-97.
178. Dickinson E., Matsumura Y. Time-dependent polymerization of  $\beta$ -lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions // *Int. J. Biol. Macromol.* 1991, V.13. N.1. P.26-30.
179. Dickinson E., Yamamoto Y. Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase // *J. Agric. Food Chem.* 1996. V.44. N.6. P.1371-1377.
180. Dickinson E., James J.D. Influence of competitive adsorption on flocculation and Rheology of high-pressure-treated milk protein-stabilized emulsions // *J. Agric. Food Chem.* 1999. V.47. N.1. P.25-30.
181. Dickinson E. Structure and composition of adsorbed protein layers and the relationship to emulsion stability // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1992. V.88. N.20. P.2973-2983.
182. Silletti E., Vitorino R.M., Schipper R., Amado F.M., Vingerhoeds M.H. Identification of salivary proteins at oil-water interfaces stabilized by lysozyme and beta-lactoglobulin // *Arch. Oral. Biol.* 2010. V.55. N.4. P.268-78.
183. Sim Y.C., Lee S.G., Lee D.C., Kang B.Y., Park K.M., Lee J.Y., Kim M.S., Chang I.S., Rhee J.S. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products // *Biotechnology Letters.* 2000. V.22. N.2. P.137-140.
184. Патент WO 2006079288 A. Use of human lysozyme for preparing cosmetics against acne. 3.08.2006.
185. Патент CN 1410051 A. Human lysozyme series cosmetics and its preparation method. 16.04.2003.
186. Патент CN 1679503 A. Human lysozyme prickly-heat powder and its preparation. 12.10.2005.
187. Вайнштейн Б.К. Рентгеноструктурный анализ глобулярных белков // *Успехи Физ. Наук.* 1966. Т.88. N.3. С.527-565.

188. Diamond R. Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme // *Journal of Molecular Biology*. 1974. V.82. N.3. P.371-374.
189. Абрамзон А.А., Гаевой Г.М. Поверхностно-активные вещества: справочник. 1979. Л.: Химия. 376 с.
190. Vautier-Giongo C., Singh Bakshi M., Singh J., Ranganathan R., Hajdu J., Bales B. L. Effects of interactions on the formations of mixed micelles of 1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine with sodium dodecyl sulfate and dodecyltrimethylammonium bromide // *J. Colloid Interface Sci.* 2005. V.282. N.1. P.149-155.
191. Carnero Ruiz C., Aguiar J. Interaction, stability and microenvironmental properties of mixed micelles of Triton X100 and n-Alkyltrimethylammonium bromides: influence of alkyl chain length // *Langmuir*. 2000. V.16. N.21. P.7946-7953.
192. Tamoto Y., Segawa H., Shiota H. Solvation dynamics in aqueous anionic and cationic micelle solutions: sodium alkyl sulfate and alkyltrimethylammonium bromide // *Langmuir*. 2005. V.21. N.9. P.3757-3764.
193. Rosen M.J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 2004. New Jersey. Wiley&Sons. 444p.
194. Levine L., Garland J., Johnson J. HPLC/ESI-quadrupole ion trap mass Spectrometry for characterization and direct quantification of amphoteric and nonionic surfactants in aqueous samples // *Anal. Chem.* 2002. V.74. N.9. P.2064-2071.
195. Prajapati R.R., Bhagwat S.S. Effect of Foam Boosters on Krafft Temperature // *J. Chem. Eng. Data*. 2012. V.57. P. 869-874.
196. Liua S.X., Kimb J.T. Study of adsorption kinetics of surfactants onto polyethersulfone membrane surface using QCM-D // *Desalination*. 2009. V.250. N.1-3. P.19-25.
197. Dai C., Zhao J., Yan L., Zhao M. Adsorption Behavior of Cocamidopropyl Betaine Under Conditions of High Temperature and High Salinity // *J. Appl. Polym. Sci.* 2014. V.131. N.12.
198. Tzocheva S.S., Kralchevsky P.A., Danov K.D., Georgieva G.S., Post A.J., Ananthapadmanabhan K.P. Solubility limits and phase diagrams for fatty acids in anionic (SLES) and zwitterionic (CAPB) micellar surfactant solutions // *J Colloid and Interface Sci.* 2012. V.369. N.1. P.274-86.
199. Danov K.D., Kralchevska S.D., Kralchevsky P.A., Ananthapadmanabhan K.P., Lips A. Mixed solutions of anionic and zwitterionic surfactant (betaine): surface tension isotherms, adsorption and relaxation kinetics // *Langmuir*. 2004. V.20. N.13. P.5445-5453.
200. Badun G.A., Chernysheva M.G., Ksenofontov A.L. Increase in the specific radioactivity of tritium-labeled compounds obtained by tritium thermal activation method // *Radiochimica Acta*. 2012. V.100. N.6. P.401-408.

201. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. 1991. М.: Мир. 383 с.
202. Raman B., Ramakrishna T., Rao C.M. Refolding of denatured and denatured/reduced lysozyme at high concentrations // *J. Biol. Chem.* 1996. V.271. N.29. P.17067-72.
203. Wu L.Z., Sheng Y.B., Xie J.B., Wang W. Photoexcitation of tryptophan groups induced reduction of disulfide bonds in hen egg white lysozyme // *Journal of Molecular Structure.* 2008. V.882. N.1-3. P.101-106.
204. Imoto T., Forster L.S., Ropley J.A., Tanaka F. Fluorescence of Lysozyme: Emissions from Tryptophan Residues 62 and 108 and Energy Migration // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1971. V.69. N.5. P.1151-1155.
205. Троицкий А.В., Лысенко А.М. Круговой дихроизм и флюоресценция лизоцима бактериофага T2 // *Биоорг. Химия.* 1975. Т.1. N.6. С.742-748.
206. Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S., Belogurova N.G., Levashov A.V. Quantitative turbidimetric assay of enzymatic gram-negative bacteria lysis // *Anal. Chem.* 2010. V.82. N.5. P.2161-2163.
207. Mitchell G.J., Nelson D.C., Weitz J.S. Quantifying enzymatic lysis: estimating the combined effects of chemistry, physiology and physics // *Phys. Biol.* 2010. V.7. N.4. P.1-12.
208. Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A.V., Levashov P.A. Lysis of *Escherichia coli* cells by lysozyme: discrimination between adsorption and enzyme action // *Colloids and Surface. B.* 2011. V.88. N.1. P.131-133.
209. Shaw D.G., Maczynski A., Goral M., Wisniewska-Gocłowska B., Skrzecz A., Owczarek I., Blazej K., Haulait-Pirson M.C., Hefter G.T., Kapuku F., Maczynska Z., Szafranski A. IUPAC-NIST Solubility Data Series. 81. Hydrocarbons with Water and Seawater Revised and Updated. Part 7. C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>-C<sub>8</sub>H<sub>18</sub> Hydrocarbons with Water // *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 2005. V.34. N.4. P.2278.
210. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The protein data bank // *Nucleic Acids Res.* 2000. V.28. N.1. P.235-242.
211. Medrzycka K., Zwierzykowki W. Adsorption of alkyltrimethylammonium bromides at the various interfaces // *J. Colloid and Interface Sci.* 2000. V.230. N.1. P.67-72.
212. Filipovic-Vincekovic N., Bujan M., Juranovic I. Adsorption and association in binary mixtures of cationic surfactants // *J. Dispersion Sci. and Technol.* 1999. V.20. N.7. P.1737-1758.
213. Alahverdijeva V.S., Fainerman V.B., Aksenenko E.V., Leser M.E, Miller R. Adsorption of hen egg-white lysozyme at the air-water interface in presence of sodium dodecyl sulphate // *Colloids and Surfaces A.* 2008. V.317. N.1-3. P.610-617.

214. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М.: Издательский центр "Академия". 2005. 480 с.
215. Eustathopoulos N., Nicholas M. Drevet B. Wettability at High Temperatures. Elsevier. Amsterdam. 1999. 419 p.
216. Сумм Б.Д., Соболева О.А. Статические и кинетические закономерности избирательного смачивания // Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия. 2006. Т.47. N.5. С.307-317.
217. Сумм Б.Д., Соболева О.А., Должикова В.Д. Развитие представлений Ребиндера о гистерезисе смачивания // Коллоидный журнал. 1998. Т.60. N.5. С.650-657.

## ПРИЛОЖЕНИЯ.

### Приложение 1.

Изменение концентрации лизоцима в водной фазе в системе водный раствор Lz (0,01 г/л) + ПАВ/октан.

	<b>C (ПАВ), М</b>	<b>C<sub>0</sub>, М</b>	<b>Г, моль/м<sup>2</sup></b>	<b>C<sub>w</sub>, М</b>	<b>ΔC, %</b>
<b>Lz</b>	0	2.3E-10	8.2E-09	6.97E-07	0.49
<b>Lz+DTAB</b>	1.0E-06	3.2E-10	1.8E-08	6.93E-07	0.98
	1.0E-05	2.2E-10	9.3E-09	6.96E-07	0.53
	1.0E-04	2.3E-10	3.3E-09	6.98E-07	0.26
<b>Lz+SDS</b>	1.0E-06	3.6E-10	1.4E-08	6.94E-07	0.81
	1.0E-05	2.2E-10	1.0E-08	6.96E-07	0.57
	1.0E-04	2.3E-10	1.1E-08	6.96E-07	0.62
<b>Lz+CAPB</b>	1.0E-06	3.7E-10	8.2E-09	6.96E-07	0.54
	1.0E-05	1.1E-09	7.2E-09	6.94E-07	0.79
	1.0E-04	4.4E-10	4.8E-09	6.97E-07	0.41



## Приложение 2.

Изменение концентрации ПАВ в водной фазе в системе водный раствор Lz (0,01 г/л) + ПАВ/октан.

	<b>C, M</b>	<b>C<sub>0</sub>, M</b>	<b>Г, моль/м<sup>2</sup></b>	<b>C<sub>w</sub>, M</b>	<b>ΔC, %</b>
<b>SDS</b>	1.0E-06	5.3E-09	4.6E-08	9.69E-07	3.09
	1.0E-05	5.9E-08	8.8E-07	9.53E-06	4.66
	1.0E-04	5.1E-07	1.1E-06	9.81E-05	1.90
<b>SDS +Lz</b>	1.0E-06	1.6E-08	7.5E-08	9.28E-07	7.22
	1.0E-05	3.1E-08	7.8E-07	9.65E-06	3.52
	1.0E-04	1.7E-07	5.8E-06	9.76E-05	2.42
<b>DTAB</b>	1.0E-06	5.9E-10	6.9E-08	9.75E-07	2.45
	1.0E-05	5.6E-09	5.2E-07	9.81E-06	1.88
	1.0E-04	6.2E-08	1.1E-06	9.94E-05	0.56
<b>DTAB+Lz</b>	1.0E-06	8.2E-08	1.3E-07	7.13E-07	28.71
	1.0E-05	7.2E-09	2.9E-07	9.88E-06	1.16
	1.0E-04	6.7E-08	1.1E-06	9.94E-05	0.57
<b>САРВ</b>	1.0E-06	1.1E-09	3.5E-08	9.85E-07	1.49
	1.0E-05	1.2E-08	6.7E-07	9.74E-06	2.57
	1.0E-04	2.7E-07	1.4E-06	9.87E-05	1.26
<b>САРВ+Lz</b>	1.0E-06	2.8E-09	2.2E-08	9.84E-07	1.56
	1.0E-05	2.3E-08	2.9E-07	9.84E-06	1.65
	1.0E-04	4.3E-07	1.3E-06	9.83E-05	1.72

## Приложение 3.

Скорости растекания капель октана по гидрофобизованному стеклу в воде и в водных растворах ДТАВ. Расчетную скорость определяли по уравнению (3-10).

t, мс	вода		ДТАВ 10 <sup>-4</sup> М		ДТАВ 10 <sup>-3</sup> М		ДТАВ 10 <sup>-2</sup> М	
	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.
14	4,160	0,0580	19,256	0,0400	0,2678	0,0387	0,492	0,0136
18	1,390	0,0361	3,936	0,0316	1,0542	0,0328	0,255	0,0113
23	2,124	0,0231	0,679	0,0204	2,5063	0,0242	0,176	0,0083
27	1,199	0,0154	0,513	0,0140	12,763	0,0184	0,124	0,0066
32	1,715	0,0108	0,444	0,0101	7,4906	0,0146	0,101	0,0056
36	1,023	0,0081	0,344	0,0078	3,2674	0,0120	0,079	0,0048
41	1,046	0,0065	0,377	0,0064	10,289	0,0102	0,072	0,0043
45	1,008	0,0055	0,417	0,0054	9,767	0,0089	0,057	0,0039
51	0,698	0,0047	0,357	0,0046	5,113	0,0078	0,053	0,0035
57	0,778	0,0043	0,302	0,0040	3,988	0,0071	0,044	0,0031
62	0,698	0,0040	0,238	0,0036	2,969	0,0065	0,038	0,0028
68	0,723	0,0038	0,222	0,0032	1,707	0,0061	0,035	0,0025
74	0,602	0,0037	0,188	0,0029	1,568	0,0057	0,033	0,0022
79	0,651	0,0036	0,190	0,0026	0,743	0,0054	0,026	0,0020
85	0,698	0,0035	0,188	0,0024	0,566	0,0051	0,023	0,0018
91	0,512	0,0034	0,186	0,0022	0,497	0,0048	0,020	0,0016
96	0,527	0,0033	0,171	0,0020	0,341	0,0046	0,019	0,0014
102	0,504	0,0032	0,170	0,0018	0,299	0,0043	0,017	0,0013
108	0,425	0,0032	0,170	0,0016	0,260	0,0041	0,015	0,0012
114	0,490	0,0031	0,170	0,0015	0,256	0,0040	0,012	0,0010
119	0,427	0,0030	0,160	0,0013	0,252	0,0037	0,010	0,0009
125	0,430	0,0030	0,173	0,0012	0,254	0,0036	0,008	0,0008
131	0,405	0,0029	0,166	0,0011	0,246	0,0034	0,008	0,0008

## Приложение 4.

Скорости растекания капель октана по гидрофобизованному стеклу в водных растворах SDS. Расчетную скорость определяли по уравнению (3-10).

t, мс	SDS $10^{-5}$ М		SDS $10^{-4}$ М		SDS $10^{-3}$ М		SDS $10^{-2}$ М	
	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.
20	1,222	0,0231	1,166	0,0620	1,094	0,01765	0,867	0,0446
25	0,977	0,0157	0,825	0,0507	0,768	0,01451	0,860	0,0394
30	0,641	0,0124	0,662	0,0415	0,512	0,00994	1,165	0,0307
32	0,584	0,0114	0,611	0,0339	0,633	0,00688	19,915	0,0240
36	0,420	0,0100	0,589	0,0277	0,504	0,00478	1,239	0,0188
41	0,391	0,0091	0,709	0,0227	0,622	0,00332	0,563	0,0149
45	0,317	0,0085	0,500	0,0205	0,461	0,00231	0,420	0,0118
51	0,292	0,0080	0,414	0,0160	0,625	0,00147	0,402	0,0089
57	0,236	0,0075	0,454	0,0124	0,463	0,00093	0,355	0,0068
62	0,254	0,0070	0,418	0,0097	0,595	0,00059	0,351	0,0053
68	0,219	0,0066	0,513	0,0075	0,633	0,00038	0,317	0,0042
74	0,237	0,0063	0,543	0,0058	0,403	0,00024	0,254	0,0034
79	0,164	0,0059	0,381	0,0045	0,515	0,00015	0,233	0,0028
85	0,150	0,0056	0,356	0,0035	0,361	0,00010	0,199	0,0024
91	0,134	0,0053	0,433	0,0027	0,451	0,00006	0,178	0,0021
96	0,131	0,0050	0,446	0,0021	0,491	0,00004	0,166	0,0019
102	0,157	0,0047	0,310	0,0017	0,309	0,00002	0,146	0,0017
108	0,118	0,0044	0,253	0,0013	0,403	0,00002	0,120	0,0016
114	0,153	0,0042	0,223	0,0010	0,264	0,00001	0,104	0,0015
119	0,134	0,0039	0,348	0,0008	0,283	0,00001	0,094	0,0015

## Приложение 5.

Скорости растекания каплей октана по гидрофобизованному стеклу в водных растворах САРВ. Расчетную скорость определяли по уравнению (3-10).

t, мс	САРВ 10 <sup>-5</sup> М		САРВ 10 <sup>-4</sup> М		САРВ 10 <sup>-3</sup> М		САРВ 10 <sup>-2</sup> М	
	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.
16	0,110	0,0673	1,044	0,0760	0,066	0,0247	0,344	0,0196
18	0,077	0,0556	0,549	0,0700	0,107	0,0201	0,297	0,0169
20	0,058	0,0459	2,716	0,0645	0,097	0,0164	0,267	0,0146
23	0,112	0,0380	2,716	0,0594	0,113	0,0135	0,195	0,0126
25	0,008	0,0314	2,022	0,0548	0,124	0,0111	0,216	0,0110
27	0,046	0,0260	3,080	0,0506	0,086	0,0093	0,178	0,0095
30	0,042	0,0215	13,032	0,0468	0,158	0,0078	0,172	0,0083
32	0,082	0,0177	2,478	0,0433	0,160	0,0065	0,119	0,0072
34	0,060	0,0147	1,953	0,0401	0,138	0,0056	0,123	0,0063
36	0,067	0,0121	4,477	0,0371	0,130	0,0048	0,095	0,0055
39	0,046	0,0100	2,582	0,0345	0,359	0,0042	0,099	0,0048
41	0,031	0,0083	3,170	0,0320	0,330	0,0037	0,069	0,0042
43	0,018	0,0069	5,708	0,0298	1,055	0,0033	0,066	0,0037
45	0,063	0,0057	4,039	0,0278	1,113	0,0029	0,073	0,0032
51	0,032	0,0039	2,401	0,0234	1,216	0,0024	0,054	0,0027
57	0,036	0,0032	1,029	0,0199	1,886	0,0021	0,048	0,0020
62	0,030	0,0014	0,947	0,0171	2,935	0,0019	0,034	0,0014
68	0,026	0,0008	0,590	0,0148	1,963	0,0018	0,034	0,0011
74	0,022	0,0005	0,300	0,0130	0,338	0,00171	0,025	0,0008
80	0,017	0,0003	0,206	0,0116	0,301	0,00167	0,035	0,0006
85	0,012	0,0002	0,293	0,0104	0,161	0,00163	0,035	0,0004
91	0,010	0,00013	0,183	0,0095	0,116	0,00161	0,029	0,00033
97	0,010	0,00008	0,109	0,0087	0,125	0,00158	0,026	0,00025
102	0,006	0,00005	0,175	0,0081	0,089	0,00157	0,030	0,00019
108	0,006	0,00003	0,088	0,0075	0,093	0,00155	0,022	0,00014

## Приложение 6.

Скорости растекания каплей октана по гидрофобизованному стеклу в водных растворах Lz и смесей Lz – ДТАВ. Расчетную скорость определяли по уравнению (3-10).

t, мс	Lz 0,1 г/л		Lz-ДТАВ 10 <sup>-4</sup> М		Lz-ДТАВ 10 <sup>-3</sup> М		Lz-ДТАВ 10 <sup>-2</sup> М	
	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.
14	4,221	0,0621	0,522	0,0173	0,445	0,0422	0,712	0,0195
16	33,464	0,0427	0,516	0,0153	0,531	0,0382	1,110	0,0173
18	4,488	0,0325	0,517	0,0135	0,784	0,0347	2,198	0,0153
20	5,673	0,0254	0,517	0,0120	1,290	0,0316	2,656	0,0135
25	0,793	0,0168	0,485	0,0094	1,384	0,0263	6,965	0,0120
30	1,079	0,0123	0,325	0,0073	2,999	0,0220	18,148	0,0094
34	0,649	0,0099	0,265	0,0057	1,775	0,0186	13,539	0,0073
39	0,730	0,0084	0,198	0,0045	1,299	0,0158	5,299	0,0057
43	0,704	0,0074	0,189	0,0040	1,042	0,0135	2,353	0,0045
45	0,593	0,0071	0,176	0,0035	1,042	0,0125	1,398	0,0035
51	0,404	0,0063	0,149	0,0031	0,906	0,0105	1,084	0,0031
57	0,424	0,0056	0,147	0,0023	0,893	0,0089	0,768	0,0023
62	0,391	0,0051	0,144	0,0017	0,890	0,0076	0,768	0,0017
68	0,368	0,0046	0,144	0,0012	0,834	0,0065	0,763	0,0012
74	0,332	0,0041	0,136	0,0009	0,569	0,0057	0,757	0,0009
79	0,330	0,0038	0,136	0,0007	0,336	0,0050	0,753	0,0007
85	0,311	0,0034	0,128	0,0005	0,262	0,0044	0,714	0,0005
91	0,400	0,0031	0,125	0,0004	0,220	0,0039	0,682	0,0004
96	0,226	0,0028	0,102	0,0003	0,220	0,0035	0,661	0,0003
102	0,185	0,0025	0,079	0,00020	0,166	0,0032	0,622	0,00020
108	0,191	0,0023	0,076	0,00015	0,152	0,0028	0,621	0,00015
114	0,230	0,0021	0,074	0,00011	0,150	0,0026	0,614	0,00011
119	0,203	0,0019	0,062	0,00008	0,140	0,0023	0,614	0,00008
125	0,273	0,0017	0,052	0,00006	0,140	0,0021	0,594	0,00006

## Приложение 7.

Скорости растекания капель октана по гидрофобизованному стеклу в водных растворах смесей Lz – SDS. Расчетную скорость определяли по уравнению (3-10).

t, мс	Lz-SDS 10 <sup>-5</sup> М		Lz-SDS 10 <sup>-4</sup> М		Lz-SDS 10 <sup>-3</sup> М		Lz-SDS 10 <sup>-2</sup> М	
	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.
20	4,125	0,0134	0,211	0,0198	0,572	0,0131	—	0,0175
25	12,348	0,0100	0,144	0,0136	0,797	0,0103	—	0,0135
30	19,921	0,0084	0,150	0,0097	0,548	0,0087	—	0,0108
34	4,968	0,0074	0,125	0,0070	0,300	0,0076	—	0,0090
39	5,878	0,0066	0,122	0,0052	0,310	0,0067	—	0,0077
43	3,342	0,0060	0,091	0,0039	0,367	0,0059	0,308	0,0068
49	1,820	0,0053	0,107	0,0033	0,301	0,0056	0,415	0,0064
54	1,143	0,0048	0,077	0,0023	0,309	0,0048	0,294	0,0057
60	1,120	0,0042	0,070	0,0016	0,190	0,0042	0,211	0,0052
66	0,900	0,0038	0,075	0,0011	0,245	0,0036	0,156	0,0048
72	0,802	0,0034	0,073	0,0008	0,273	0,0031	0,265	0,0045
77	0,808	0,0030	0,058	0,0005	0,196	0,0027	0,209	0,0043
83	0,625	0,0027	0,053	0,0004	0,205	0,0023	0,172	0,0041
89	0,436	0,0024	0,051	0,0003	0,132	0,0020	0,122	0,0039
94	0,575	0,0022	0,059	0,0002	0,144	0,0018	0,176	0,0037
100	0,504	0,0019	0,080	0,00013	0,116	0,0015	0,091	0,0036
106	0,445	0,0017	0,074	0,00009	0,108	0,0013	0,108	0,0034
111	0,502	0,0015	0,074	0,00006	0,077	0,0011	0,121	0,0033
117	0,502	0,0014	0,086	0,00004	0,079	0,0010	0,101	0,0031
123	0,342	0,0012	0,074	0,00003	0,074	0,0008	0,126	0,0030

## Приложение 8.

Скорости растекания каплей октана по гидрофобизованному стеклу в водных растворах смесей Lz – CAPB. Расчетную скорость определяли по уравнению (3-10).

t, мс	Lz-CAPB 10 <sup>-5</sup> М		Lz-CAPB 10 <sup>-4</sup> М		Lz-CAPB 10 <sup>-3</sup> М		Lz-CAPB 10 <sup>-2</sup> М	
	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.	расчет	экспер.
27	0,498	0,0136	0,681	0,0128	0,276	0,0091	0,094	0,0260
30	0,562	0,0112	0,644	0,0108	0,266	0,0081	0,129	0,0195
32	0,476	0,0093	0,653	0,0092	0,258	0,0073	0,053	0,0146
34	0,513	0,0078	0,753	0,0080	0,320	0,0066	0,111	0,0109
36	0,511	0,0066	0,805	0,0070	0,323	0,0061	0,124	0,0095
39	0,392	0,0057	0,610	0,0062	0,602	0,0056	0,123	0,0071
41	0,398	0,0049	0,615	0,0055	0,549	0,0051	0,046	0,0053
43	0,371	0,0043	0,567	0,0044	0,657	0,0048	0,042	0,0046
51	0,268	0,0030	0,420	0,0038	1,311	0,0041	0,031	0,0032
57	0,203	0,0025	0,375	0,0035	5,400	0,0035	0,035	0,0022
62	0,162	0,0022	0,403	0,0033	0,649	0,0031	0,034	0,0016
68	0,177	0,0021	0,415	0,0031	0,634	0,0027	0,033	0,0011
74	0,146	0,0020	0,325	0,0031	0,465	0,0025	0,026	0,0008
79	0,142	0,0019	0,309	0,0030	0,304	0,0022	0,019	0,0005
85	0,129	0,0019	0,295	0,0030	0,154	0,0020	0,022	0,0004
91	0,127	0,0019	0,277	0,0030	0,256	0,0018	0,020	0,0003
96	0,112	0,0019	0,260	0,0030	0,218	0,0016	0,027	0,0002
102	0,114	0,0019	0,220	0,0030	0,187	0,0015	0,023	0,00012
108	0,111	0,0019	0,223	0,0030	0,185	0,0013	0,018	0,00009