

УДК 541.182.02

## МОНОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СЛОИ СМЕСЕЙ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С НЕИОНОГЕННЫМ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫМ ВЕЩЕСТВОМ (ТВИН-80)

А.Е. Харлов, Г.П. Ямпольская

*(кафедра коллоидной химии; e-mail: Harlov@colloid.chem.msu.ru)*

Смешанные монослои бычьего сывороточного альбумина (БСА) и неионогенного ПАВ (Твин-80) получали при нанесении на поверхность субфазы (вода pH 6) растворов, содержащих оба компонента при широком варьировании составов. Согласно изотермам сжатия-растяжения, смешанные монослои отвечали конденсированному типу, если в наносимом растворе концентрации БСА намного превышали или были равны концентрации НПАВ. Такие монослои представлены преимущественно комплексами БСА–Твин-80 состава (1:1). В противоположность этому монослой БСА отнесен к расширенному типу. При избытке в растворе Твин-80 по сравнению с концентрацией БСА монослои становятся неустойчивыми. Результаты представляют интерес для мониторинга свойств смесей белок–ПАВ и конструирования пленок Ленгмюра–Блоджетт.

Практическое использование дисперсий (пищевая промышленность, моющие средства, биотехнология, косметика, фармакология, медицина) ставит перед исследователями множество задач. Одной из проблем является дестабилизация дисперсий из-за несовместимости механизмов стабилизации индивидуальными компонентами. Ее решение требует систематического исследования свойств смесей, изучения их составов в водной фазе и на поверхности, а также детального исследования тонких пленок (моделей дисперсий), стабилизированных такими комплексами.

Для надежности выводов следует использовать белки с хорошо изученными поверхностными свойствами. При выборе неионогенных поверхностно-активных веществ (НПАВ) выдвигаются следующие требования: 1) большая вероятность совмещения условий стабилизации дисперсий смесями ПАВ и белков, 2) отсутствие сведений о негативном влиянии НПАВ на конформацию белка, 3) нетоксичность НПАВ (это особенно важно для производства пищевых форм, фармакологии и медицины).

Белки – природные высокомолекулярные наночастицы, обладающие поверхностной активностью. С низкомолекулярными ПАВ белки образуют ассоциаты переменного состава, различающиеся по поверхностной активности. Этому обстоятельству до сих пор не уделяется должного внимания. Свойства смесей неаддитивны, поэтому нельзя надежно регулировать поведение систем, содержащих смеси ПАВ и белков.

Работы по изучению мономолекулярных слоев смесей ПАВ–белок являются лишь составной частью систематических исследований в этой области. В то же время они представляют и самостоятель-

ный интерес для создания биосенсоров на основе пленок Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ) и др.

### Объекты и методы исследования

В работе использован сывороточный альбумин быка (БСА) – лиофилизированный препарат фирмы “Sigma” (Германия) и НПАВ Твин-80 – полиоксиэтилен-20сорбитанмоноолеат (“х.ч.”, молекулярная масса 1308 г/моль, критическая концентрация мицеллообразования (ККМ)  $1,5 \times 10^{-4}$  М, гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) 15).

Концентрацию белка в растворе определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Все растворы готовили на бидистиллированной воде (pH 6,0). Смеси компонентов готовили титрованием раствора БСА (постоянная концентрация  $8,5 \times 10^{-5}$  М) раствором Твин-80 ( $1,3 \times 10^{-3}$  М) так, что концентрация Твин-80 в растворе менялась от  $1,4 \times 10^{-7}$  до  $8,5 \times 10^{-2}$  М.

Изотермы сжатия (двумерное давление–площадь) измеряли с помощью весов Ленгмюра кругового типа с регистрацией двумерного давления методом Вильгельми. На поверхность ванны (субфаза–бидистиллированная вода; pH 6,0) наносили 20 мкл раствора индивидуального компонента или смесей компонентов различного состава, давали раствору растечься по поверхности вода–воздух в течение 2 мин и проводили сжатие монослоя с постоянной скоростью  $0,01309$  м<sup>2</sup>/мин. Все измерения проводили при температуре 21°C.

### Результаты и их обсуждение

Твин-80 относится к водорастворимым НПАВ и при нанесении на поверхность вода–воздух не образу-

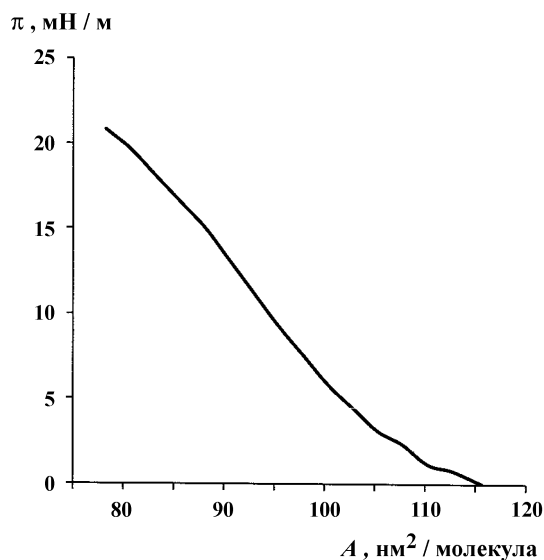


Рис. 1. Изотерма сжатия монослоя БСА (субфаза – дистиллированная вода, рН 6,0,  $t = 21^\circ\text{C}$ )

ет устойчивых монослоев: из-за неконтролируемого переноса молекул Твин-80 в субфазу регистрируемое двумерное давление ( $p$ , мН/м) не отвечает разумным значениям площади, приходящейся на молекулу Твин-80. Из тензиометрических измерений известно,

что площадь на молекулу Твин-80 в предельно насыщенном адсорбционном слое составляет  $0,65 \text{ nm}^2$  [1]. В то же время при нанесении на поверхность ванны более  $1 \times 10^{16}$  молекул предельное двумерное давление составляет 37–38 мН/м, что близко к величине, на которую максимально снижается поверхностное натяжение раствора Твин-80 при образовании насыщенного адсорбционного слоя.

На рис. 1 представлена изотерма сжатия монослоя БСА на поверхности воды (рН 6,0), имеющая S-образный вид, типичный для монослоев белков, что согласуется с литературными данными для БСА. Для этого белка известна зависимость изотермы сжатия от рН субфазы [2], а давление коллапса составляет примерно 20 мН/м. Экстраполяция прямолинейного участка изотермы к  $p = 0$ , дает площадь на молекулу белка, равную  $110 \text{ nm}^2$ , что существенно выше площади, которую занимала бы молекула БСА в насыщенном поверхностном слое. Радиус эквивалентной сферы молекулы белка  $R$  (нм) можно определить по формуле (1) [3]:

$$R = 0,067 \sqrt[3]{M}, \quad (1)$$

где  $M$  – молекулярная масса белка, равная в случае БСА  $67000 \text{ г/моль}$ .

Таблица 1

Количество вещества БСА, Твин-80 и их смесей, нанесенное на поверхность субфазы при формировании поверхностного слоя

Номер раствора	Нанесенное вещество				Соотношение БСА/Твин-80
	БСА		Твин-80		
	моль	молекул	моль	молекул	
1	$1,71 \cdot 10^{-9}$	$1,029 \cdot 10^{15}$	$2,85 \cdot 10^{-12}$	$1,71 \cdot 10^{12}$	600
2	$1,71 \cdot 10^{-9}$	$1,029 \cdot 10^{15}$	$1,71 \cdot 10^{-11}$	$1,029 \cdot 10^{13}$	100
3	$1,71 \cdot 10^{-9}$	$1,029 \cdot 10^{15}$	$1,71 \cdot 10^{-10}$	$1,029 \cdot 10^{14}$	10
4	$1,71 \cdot 10^{-9}$	$1,029 \cdot 10^{15}$	$1,71 \cdot 10^{-09}$	$1,029 \cdot 10^{15}$	1
5	$1,71 \cdot 10^{-9}$	$1,029 \cdot 10^{15}$	$1,71 \cdot 10^{-8}$	$1,029 \cdot 10^{16}$	0,1
6	$1,71 \cdot 10^{-9}$	$1,029 \cdot 10^{15}$	$1,71 \cdot 10^{-7}$	$1,029 \cdot 10^{17}$	0,01
7	$1,71 \cdot 10^{-9}$	$1,029 \cdot 10^{15}$	$1,71 \cdot 10^{-6}$	$1,029 \cdot 10^{18}$	0,001
8	$1,71 \cdot 10^{-9}$	$1,029 \cdot 10^{15}$	–	–	–
9	–	–	$2,04 \cdot 10^{-8}$	$1,22 \cdot 10^{16}$	–

Т а б л и ц а 2

**Составы растворов смесей, наносимых на поверхность ванны**

Номер раствора	$C_{\text{БСА}}, \text{M}$	$C_{\text{Твин-80}}, \text{M}$
1	$8,5 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$
2	$8,5 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^{-7}$
3	$8,5 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^{-6}$
4	$8,5 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^{-5}$
5	$8,5 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^{-4}$
6	$8,5 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^{-3}$
7	$8,5 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^{-2}$
8	$8,5 \cdot 10^{-5}$	–
9	–	$1 \cdot 10^{-3}$

Радиус молекулы БСА ( $R_{\text{БСА}}$ ) составляет 2,7 нм, а площадь проекции молекулы белка на поверхность в предельно заполненном монослое – 23 нм<sup>2</sup>. Таким образом, монослой БСА относится к расширенному

типу, возможно, он имеет сетчатую или кластерную структуру, что отвечает моделям работы [4].

Рассмотрим далее свойства смешанных монослоев БСА–Твин-80. Составы смесей, нанесенных на поверхность субфазы, представлены в табл. 1, составы растворов, наносимых на поверхность субфазы – в табл. 2 (номера соответствуют номерам систем, приведенным в табл. 1). Изотермы сжатия монослоев в координатах  $\pi$ – $A$  индивидуальных компонентов и их смесей разных составов представлены на рис. 2. Номера на кривых соответствуют номерам систем, представленных в табл. 1, 2. Из рис. 2 следует, что положение и вид изотерм сильно зависят от соотношения компонентов (табл. 1): изотермы смещены в сторону меньших площадей по сравнению с изотермой монослоя БСА (рис. 2, кривая 8) и отличаются от изотермы сжатия поверхностного слоя Твин-80 (рис. 2, кривая 9). Необходимо отметить, что изотермы сжатия монослоев (рис. 2, кривые 1–4) хорошо воспроизводятся и обнаруживают обратимый гистерезис в циклах сжатия-растяжения.

На рис. 3 представлены те же изотермы сжатия монослоев, что и на рис. 2 (сплошные кривые 1–4), но в координатах  $\pi$  (мН/м)– $A$  (площадь на молекулу БСА, нм<sup>2</sup>). При экстраполяции начальных прямолинейных участков изотерм к  $\pi = 0$  получаем значения

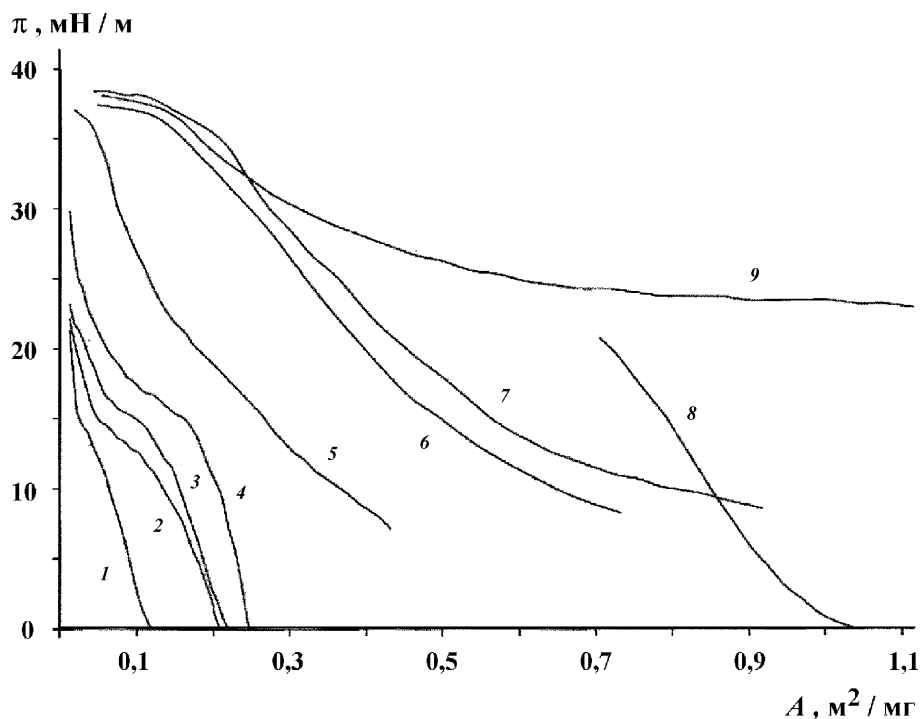


Рис. 2. Изотермы сжатия смешанных монослоев БСА и Твин-80 при разных мольных соотношениях БСА/Твин-80 в наносимом растворе (моль/моль): 1 – 600; 2 – 100; 3 – 10; 4 – 1; 5 – 0,1; 6 – 0,01; 7 – 0,001; 8 – БСА; 9 – Твин-80

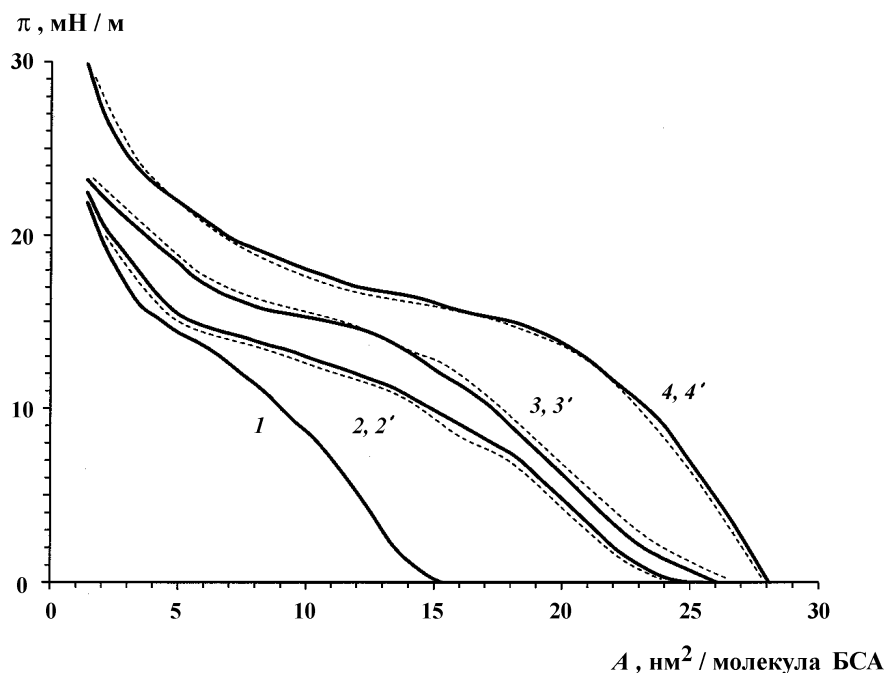


Рис. 3. Изотермы сжатия смешанных монослоев БСА и Твин-80, нормированные на площадь, приходящуюся на молекулу БСА (сплошные кривые) и на комплекс БСА–Твин-80 (1:1) (пунктирные кривые), при разных мольных соотношениях БСА/Твин-80 в наносимом растворе (моль/моль): 1 – 600; 2 (2′) – 100; 3 (3′) – 10; 4 (4′) – 1

площадей на молекулу (для изотерм 2–4 на рис. 3), близкую к площади приходящейся на молекулу БСА в предельно заполненном монослое (23–28 нм<sup>2</sup>/молекула). Это позволяет заключить, что монослои при избытке концентрации БСА по сравнению с концентрацией Твин-80 представлены белком или его комплексом с Твин-80, в котором третичная структура белка существенно не меняется. Для того чтобы получить более точные сведения о составе монослоя, обратимся к результатам недавно проведенных исследований взаимодействия БСА с Твин-80.

В работе [5] показано, что фазовое поведение растворов смесей компонентов определяется их соотношением, и при десятикратном преобладании (моль/моль) Твин-80 системы разделяются на макроскопические фазы. В работе [6] для смесей лизоцима и ионного ПАВ додецилсульфата натрия (ДСН) показано, что при связывании 8–10 молекул ДСН белок осаждается, причем растворение образующегося осадка происходит при увеличении концентрации и связывания ДСН белком в очень узком интервале этих параметров.

Недавно [7] свойства растворов смесей БСА и Твин-80 были подробно изучены комплексом методов (тензиометрия, УФ- и ИК-спектроскопия, тушевые флуоресценции и др.). Основные результаты,

имеющие непосредственное отношение к интерпретации полученных изотерм двумерного давления монослоев смесей, сводятся к следующему. При преобладании в растворе белка компоненты образуют комплекс состава 1:1, растворимость которого составляет 10<sup>-5</sup> М. Комплексообразование приводит к гидрофобизации молекул БСА, в результате чего поверхностная активность комплекса 1:1 оказывается выше поверхностной активности БСА в пять раз и в два раза превышает поверхностную активность Твин-80. При избытке Твин-80 образуются частицы переменного состава, причем усредненное связывание Твин-80 белком составляет примерно 10 молекул Твин-80 на одну молекулу белка.

Таким образом, кривые 1–4 на рис. 3 можно интерпретировать с учетом образования комплекса БСА–Твин-80 с мольным соотношением компонентов 1:1, растворимость которого составляет приблизительно 1×10<sup>-5</sup> М. Интерпретация кривых 5–7 (рис. 2) в настоящее время затруднена.

Образование комплекса 1:1 можно записать следующим образом:



где P и S – соответственно белок и НПВ, находящиеся в равновесии с комплексом PS.

Поскольку растворимость комплекса много меньше растворимости индивидуальных компонентов, реакция (2) сдвинута в сторону образования комплекса и его концентрация определяется концентрацией компонента, присутствующего в системе в недостатке.

Константа диссоциации комплекса ( $K_d$ ):

$$K_d = [P]_0 [S]_0 / [PS], \quad (3)$$

$$[P] = [P]_0 - [PS] \text{ и } [S] = [S]_0 - [PS], \quad (4)$$

где  $[P]_0$  и  $[S]_0$  – исходные концентрации БСА и Твин-80, соответственно.

С учетом равенств (4) уравнение (3) запишется в виде:

$$K_d = ([P]_0 - [PS])([S]_0 - [PS]) / [PS]. \quad (3a)$$

При больших концентрациях белка по сравнению с концентрацией Твин-80 ( $[P]_0 \gg [PS]$ ) уравнение (3a) принимает вид:

$$K_d = [P]_0 [S]_0 - [PS] / [PS], \quad (4)$$

и  $[PS]$  можно выразить уравнением (5):

$$[PS] = [P]_0 [S]_0 / (K_d + [P]_0). \quad (5)$$

В том случае, если  $K_d \ll [P]_0$  (что, по-видимому, справедливо для концентраций БСА порядка  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  М), уравнение (5) можно записать в виде (6):

$$[PS] = [P]_0 [S]_0 / [P]_0. \quad (6)$$

Пренебречь  $K_d$  можно в том случае, если его значение по крайней мере на порядок или более меньше  $[P]_0$  ( $K_d \leq 10^{-6}$  М). При больших значениях  $K_d$  устойчивость комплекса будет незначительной. Таким образом, определены условия, при которых концентрация комплекса близка к концентрации Твин-80 в его бинарной смеси с БСА.

На основании приведенного выше обсуждения рассмотрим изотермы 1–4 на рис. 2 с учетом данных об образовании комплекса БСА–Твин-80 состава 1:1 в наносимых на поверхность вода–воздух растворах и свойств этого комплекса, среди которых главные – повышенная поверхностная активность и растворимость. Эти свойства обуславливают вытеснение из монослоя всех компонентов, кроме комплекса БСА–Твин-80. Согласно уравнению (6), концентрации комплекса 1:1 в растворах, отвечающих изотермам 1–3 на рис. 2, равны концентрациям Твин-80 ( $1,7 \cdot 10^{-7}$ ;  $8,5 \cdot 10^{-7}$  и  $8,5 \cdot 10^{-6}$  М соответственно).

Концентрация комплекса 1:1 в растворе 4 могла быть примерно равной концентрациям компонентов ( $[P]_0 = [S]_0 \approx 8,5 \cdot 10^{-5}$  М). В то же время растворимость комплекса 1:1 составляет  $10^{-5}$  М, поэтому

свойства монослоя будут определяться концентрацией комплекса 1:1, если его концентрация в наносимом растворе равна его растворимости, т.е.  $10^{-5}$  М. Ассоциированные частицы комплекса не обладают поверхностной активностью [7] и могут частично выводиться с поверхности. Площади ( $\text{м}^2/\text{мг}$ ), отсекаемые на оси ординат при экстраполяции прямолинейных участков изотерм, можно нормировать на массу и концентрацию комплекса 1:1. Оказалось, что площади на молекулу в монослоях, отвечающих изотермам 2–4, составляют 26–27  $\text{нм}^2/\text{молекула}$ , что близко совпадает с размерами молекул БСА (24–28  $\text{нм}^2/\text{молекула}$  [8]). Как показано на рис. 3 (изотерма 1), для комплекса БСА–Твин-80 площадь составляет 13–15  $\text{нм}^2/\text{молекула}$ , что свидетельствует о коллапсе монослоя комплекса 1:1. Результаты аналогичного расчета для всего хода изотерм (2–4) представлены на рис. 3 пунктирными кривыми (2'–4'). Видно, что кривые (2'–4') в первом приближении повторяют ход изотерм 2–4. Это свидетельствует о том, что в монослоях в основном присутствуют комплексы состава 1:1. В поверхностном слое, сжатие которого отражено на изотерме 4 (рис. 3), по-видимому, присутствуют также не обладающие поверхностной активностью частицы, представленные ассоциатами комплекса 1:1, окруженными поверхностно-активным комплексом БСА–Твин-80. Это объясняет тот факт, что изотерма 4 по сравнению с почти совпадающими изотермами 2 и 3 сдвинута в сторону больших площадей. Такая интерпретация подтверждается расчетами сжимаемости монослоя ( $\pi/A$ ) на начальном участке изотерм ( $\pi \leq 10$  мН/м). Эта величина (2,2 пН·молекула·м<sup>-3</sup>) является максимальной для изотермы 4. Соответствующая величина для изотермы сжатия монослоя БСА равна 0,6 пН·молекула·м<sup>-3</sup>. Для изотерм 2 и 3 она имеет промежуточное значение (1,0–1,5 пН·молекула·м<sup>-3</sup>).

Перегибы на изотермах 1–4 (рис. 3) свидетельствуют о перестройке конденсированных монослоев комплекса БСА–Твин-80 состава 1:1 с образованием поверхностных пленок согласно моделям [4]. Дополнительным подтверждением того, что монослой в основном представлен комплексами белка с Твин-80, служат высокие значения предельного двумерного давления, достигающие 35 мН/м, в то время как соответствующая величина для расширенных монослоев БСА в таких условиях, когда молекулы белка не связывают гидрофобные ПАВ, составляет 20 мН/м.

Таким образом, исследование монослоев смесей БСА и Твин-80 подтвердило ранее сделанные выво-

ды об образовании в растворе поверхностно-активного комплекса 1:1, растворимость которого составляет примерно  $10^{-5}$  М. Проведенное исследование является частью систематических исследований взаимодействий белков с поверхностно-активными веще-

ствами в смешанных растворах и на границах раздела фаз. Результаты работы предполагается в дальнейшем использовать для конструирования конденсированных ЛБ-пленок БСА, перспективность которых отмечена в работе [9].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 04-03-32633.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Потешнова М.В. // Автореф. канд. дис. М., 2005.
2. Sanchez-Gonzales J., Cabrerizo-Vilchez M.A., Galvez-Ruiz M.J. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2001. **21**. P. 19.
3. Richards F.M. // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1977. **6**. P. 151.
4. Wijmans C. M., Dickenson E. // Phys. Chem. 1999. **1**. P. 2141.
5. Ямпольская Г.П., Задымова Н.М., Тарасевич Б.Н., Еленский А.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2004. **45**. С. 371.
6. Fukushima K., Murata Y., Sugihara G., Tanaka M. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1981. **54**. P. 3122.
7. Задымова Н.М., Ямпольская Г.П., Филатова Л.Ю. // Коллоид. журн. 2006. **68**. № 2. С. 187.
8. Asanov A.N., DeLucas L.J., Oldham P.B., Wilson W.W. // Colloid Interface Sci. 1997. **191**. P. 222.
9. Ямпольская Г.П., Левачев С.М., Харлов А.Е., Фадеев А.С., Измайлова В.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2001. **42**. С. 355.

Поступила в редакцию 13.10.05

## MIXED MONOLAYERS OF BOVINE SERUM ALBUMIN WITH NONIONIC SURFACTANT (TWEEN-80)

A.Ye. Kharlov, G.P. Yampol'skaya

(Department of Colloid Chemistry)

Mixed monolayers of BSA and nonionic surfactant (Tween-80) were obtained by spreading on the surface of the subphase (water pH 6) of solutions, containing both component at wide variation of the composition. According to compression-expansion isotherms monolayers were related to the condensed type, when BSA concentrations in a solution were much larger or equal to surfactant concentrations. Such monolayers are mainly performed by the 1:1 complexes of BSA-Tween-80. Unlike to this, monolayer of BSA is of the expanded type. At an excess of Tween-80 in a solution as compared to BSA concentration monolayers stop to be stable. Results are of interest to control properties of protein- surfactant mixtures and to design LB-films.