

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ
ИМЕНИ Н.М. ЭМАНУЭЛЯ

На правах рукописи

УДК: 541.64:532.77

Ильин

Ильин Михаил Михайлович

**ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОВЕРХНОСТНО АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
НА СТРУКТУРООБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ**

02.00.06 – высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2005

Работа выполнена в Институте биохимической физики
им. Н.М. Эммануэля РАН

Научный руководитель: кандидат химических наук
Мария Германовна Семёнова

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Игорь Александрович Ямсков
доктор химических наук, профессор
Анатолий Анатольевич Попов

Ведущая организация: **Московская Государственная
академия тонкой химической
технологии имени М.В. Ломоносова**

Защита состоится «29» сентября 2005 г. в 10 часов на заседании
Диссертационного совета К 002.250.02. в Институте элементоорганических
соединений им. А.Н. Несмеянова РАН по адресу:
119991 Москва, ул. Вавилова, д. 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНЭОС РАН

Автореферат разослан «29» сентября 2005 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета К 002.250.02.
кандидат химических наук


А.Ю. Рабкина

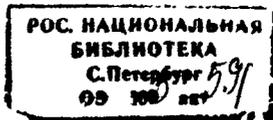
2006-4
11859

2164409

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Белки относятся к широко представленному в природе классу биополимеров, которые, благодаря большому разнообразию их молекулярных структур и свойств, выполняют множество важных и хорошо известных биологических функций. При этом одной из ключевых функций белков, вытекающей из их полимерной природы, является их структурообразующая функция. В её основе лежит ярко выраженная способность белков к самоассоциации, конформационным изменениям, адсорбции на границах раздела фаз, а также к фазовому расслоению и комплексообразованию с различными по природе низкомолекулярными соединениями и биополимерами

В настоящее время во всём мире отмечается растущий интерес к использованию структурообразующей функции белков *in vitro*, т.е. в промышленных целях, для создания продукции, обладающей усовершенствованной или уникальной структурой и свойствами, а также высокой физической стабильностью. Этот интерес, с одной стороны, подготовлен накопленными глубокими знаниями о молекулярных свойствах индивидуальных белков, способах их очистки и выделения из природного сырья, а также успехами в их широкомасштабном производстве и длительном хранении. С другой стороны, он вызван возрастающей потребностью, в частности, пищевой, фармацевтической и косметической промышленности в разнообразных полезных для человека, биосовместимых, нетоксичных, экологически чистых и высокофункциональных ингредиентах для разработки и выпуска так называемой «функциональной» продукции нового поколения, отличающейся ярко выраженным положительным воздействием на здоровье людей и, тем самым, на качество их жизни. При этом, наиболее перспективной с точки зрения инноваций, может быть разработка «функциональной» продукции коллоидного типа, т.е. такой, которая наряду с водной фазой (дисперсионной средой) содержит тонко диспергированные масляную или воздушную фазы (разнообразные эмульсии, пены, гели и их смешанные варианты). Такие системы предоставляют широкие возможности для молекулярного дизайна продукции нового поколения с уникальной структурой и свойствами, однако, являясь в принципе термодинамически метастабильными, они требуют для своего образования и существования в течение длительного времени введения высокоэффективных эмульгаторов и стабилизаторов. В настоящее время в качестве ключевых



стабилизирующих компонентов для таких систем используются различные белки и низкомолекулярные поверхностно активные вещества (ПАВ) природного и синтетического происхождения, которые благодаря их амфифильной природе способны формировать защитные адсорбционные слои на коллоидных частицах дисперсной фазы (масло, воздух). При этом широко распространённым на практике является одновременное использование ПАВ и белков для формирования специфической структуры и достижения более высокой стабильности коллоидных систем при их переработке и хранении или, напротив, для их целенаправленной дестабилизации в процессе производства.

К моменту начала нашей работы наиболее полно была изучена конкуренция между белками и ПАВ при формировании адсорбционных слоёв на границе раздела фаз в коллоидных системах. При этом, во многих работах высказывалось предположение о возможном значительном вкладе в этот процесс взаимодействий между ПАВ и белками. Также данные ряда работ свидетельствовали об эффективном взаимодействии ПАВ с белками с образованием комплексных молекулярных структур с новыми свойствами, отличными от свойств составляющих их компонентов.

Таким образом было очевидно, что для более глубокого понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе образования и стабилизации коллоидных систем, содержащих как ПАВ, так и белки, необходима более полная информация как о закономерностях взаимодействия белков с ПАВ, так и об особенностях молекулярных структур, термодинамических свойств и функциональности образующихся между ними комплексов. Кроме того, можно было предположить, что целенаправленное объединение, как правило более высокой, чем у белков, поверхностной активности ПАВ с полимерной природой белков, посредством их взаимодействия, могло бы привести к созданию более эффективных комплексных эмульгаторов и стабилизаторов коллоидных систем, обеспечивающих формирование более плотно упакованных и стерически более прочных защитных адсорбционных слоёв на коллоидных частицах различной природы. Актуальность постановки таких задач обусловлена также и насущной потребностью пищевой, фармацевтической и косметической промышленности в расширении как ассортимента, так и функциональности биологически совместимых и нетоксичных эмульгаторов и стабилизаторов для различных коллоидных систем. Поскольку хорошо

известно, что число наименований таких эмульгаторов и стабилизаторов, выпускаемых на сегодняшний день даже мировыми лидерами по их производству, например, датской компанией «Даниско», ограничивается только несколькими десятками, что значительно тормозит инновационный процесс в разработке продукции коллоидного типа нового поколения.

Таким образом, представляемая работа была посвящена выяснению как закономерностей взаимодействия белков с ПАВ, так и возможности формирования новой функциональности ПАВ и белков посредством этого взаимодействия. При этом, используя термодинамический подход и модельные коллоидные системы, мы пытались подойти к пониманию основных взаимосвязей в ряду: молекулярная структура ПАВ и белков – природа взаимодействия между ними – молекулярные параметры образующихся комплексов ПАВ+белок – функциональность образующихся комплексов ПАВ+белок.

Кроме того, к моменту постановки настоящей работы, большинство представленных в литературе публикаций относилось к исследованию взаимодействия ограниченного числа, как правило, разноимённо заряженных модельных ПАВ и белков, что безусловно требовало расширения объектов исследования как по природе, так и по их структуре. При этом, особый интерес вызывало изучение взаимодействия белков и ПАВ важных для практики и обычно одноимённо заряженных в условиях их возможно наиболее широкого промышленного использования (диапазон рН от 7.0 до 5.0).

Цель и задачи работы, объекты исследования. Цель работы состояла в выяснении основных взаимосвязей в ряду: молекулярная структура ПАВ и белков – характер их взаимодействия в водной среде – молекулярные параметры образующихся комплексов ПАВ+белок – структурообразующая способность комплексов ПАВ+белок.

Для достижения поставленной цели были определены следующие конкретные задачи:

1. Охарактеризовать термодинамику взаимодействия ПАВ с белками в водной среде в зависимости от химического строения ПАВ, молекулярного состояния ПАВ в растворе (индивидуальные молекулы, мицеллы) и молекулярных параметров белковой молекулы (конформация, заряд), при варьировании таких ключевых физико-химических параметров, как рН и температура.

2. Изучить влияние различных по структуре ПАВ на конформационную стабильность глобулярного белка.
3. Охарактеризовать молекулярные параметры комплексов ПАВ + белок, образующихся в результате взаимодействия белков как с индивидуальными молекулами ПАВ, так и с их мицеллами.
4. Установить корреляции между молекулярными параметрами образующихся комплексов и их структурообразующей способностью на границе раздела фаз воздух-вода.
5. На основании объединённых данных по термодинамике взаимодействия белков с ПАВ и характеристике молекулярных параметров, образующихся между ними комплексов, предложить схемы молекулярных механизмов взаимодействия белков и ПАВ в водной среде.

Для достижения поставленной цели и решения перечисленных задач был выбран ряд промышленно-важных ПАВ (Рис.1), имеющих одинаковую углеводородную часть их молекул, но различную как по заряду, так и по размеру полярную часть А именно, анионные ПАВ – CITREM (сложный эфир лимонной кислоты и моноглицерида) и SSL (натриевая форма сложного эфира жирной кислоты с молочной кислотой) и неионный ПАВ – PGE (сложный эфир жирной кислоты и полиглицерина). (По данным фирмы-производителя все ПАВ, исследуемые в данной работе, содержали практически равные количества стеариновой и пальмитиновой жирных кислот).

Со стороны белков были изучены основной белок молока – казеинат натрия, представляющий собой пористую наночастицу мицеллярного строения, объединяющую в своём составе конформационно неупорядоченные цепочки индивидуальных казеинов (38% α_1 -, 10% α_2 -, 36% β -, 13% κ - казеина), а также растительный олигомерный белок – легумин (11 S глобулин), основной запасной белок кормовых бобов, в нативном (глобула) и термоденатурированном (клубок) состояниях. Взаимодействие выбранных ПАВ с белками изучали в широком диапазоне концентраций ПАВ как ниже, так и выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ) ПАВ. Заряд на белке и ПАВ изменяли варьированием pH.

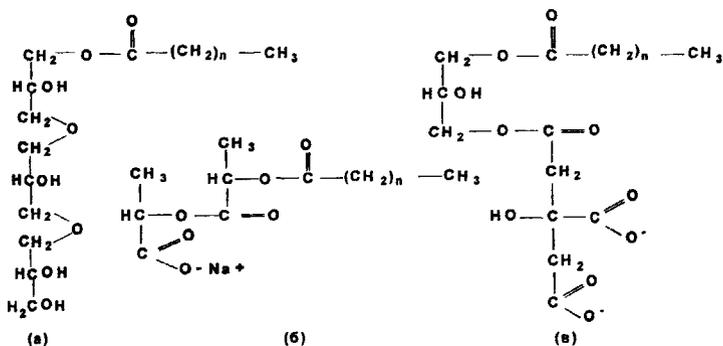


Рис. 1. Химические формулы ПАВ, $n = 14$ или 16 : (а) PGE, (б) SSL, (в) CITREM.

Научная новизна

1. В работе впервые проведён систематический термодинамический анализ природы взаимодействий одноимённо заряженных ПАВ и белков в водной среде в широком диапазоне концентраций ПАВ, охватывающем концентрации как ниже, так и выше ККМ, при различных экспериментальных условиях (рН, Т). Впервые установлено определяющее влияние заряда и размера полярной группы ПАВ на характер их взаимодействия с одноимённо заряженным белком. Также, впервые выявлена роль заряда и конформации белков во взаимодействии с одноимённо заряженными ПАВ.
2. Впервые показана возможность эффективной модификации молекулярных параметров и структурной функциональности белков посредством взаимодействия с низкими концентрациями ПАВ в водной среде.
3. Впервые, установлено влияние молекулярного состояния ПАВ на изменение молекулярных параметров и структурной функциональности белков.
4. Впервые, предложены термодинамически обоснованные схемы молекулярных механизмов образования комплексов между одноимённо заряженными ПАВ и белками в водной среде.
5. Впервые, с использованием термодинамического подхода, установлены корреляции между характером взаимодействия одноимённо заряженных белков и ПАВ, молекулярными параметрами образующихся между ними комплексов и их структурообразующей способностью на границе раздела фаз воздух-вода.

Практическая значимость работы. Проведённое систематическое термодинамическое исследование показало перспективность модификации молекулярных и термодинамических параметров белков, а также их структурообразующих свойств, посредством взаимодействия с низкими концентрациями ПАВ в водной среде, что может служить хорошей основой для разработки и создания широкой гаммы природных эмульгаторов и стабилизаторов нового поколения, а также систем доставки с легко варьируемым составом и структурой для пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. Кроме того, в данной работе продемонстрированы преимущества применённого для исследований термодинамического подхода, позволяющего глубже понять молекулярные механизмы взаимодействия и модификации такого амфифильного биополимера, как белок, при помощи также амфифильных по своей природе ПАВ, что открывает возможности предсказания, регулирования и молекулярного дизайна широкого круга систем, типа биополимер – амфифильное низкомолекулярное соединение, в практике современных биохимических и биотехнологических исследований.

Апробация работы Материалы диссертации были представлены в виде устных и стендовых докладов на четырёх молодёжных конференциях в Москве: ИБХФ РАН-ВУЗы, «Биохимическая физика» (за период 2001-2004 гг.); I Международном конгрессе «Биотехнология – перспективы развития» (Москва, октябрь 2002 г.), Международной конференции по коллоидной химии (Минск, октябрь 2003 г.); а также на двух международных конференциях «Food Colloids» (Голландия, 2002 г. и Англия, 2004 г.) и на Международном симпозиуме “Delivery of Functionality in Complex Food Systems”, Lausanne, Switzerland, январь 2005

Публикации По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 9 статей и 5 тезисов докладов на международных и российских конференциях

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 187 страницах печатного текста, содержит 48 рисунков и 19 таблиц. Состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы (219 наименований).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Термодинамическая характеристика ПАВ в водной среде в зависимости от их концентрации, значения pH и температуры.

Объединённые данные тензиометрии, калориметрии смешения и лазерного светорассеяния позволили с высокой точностью определить критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) для изучаемых ПАВ. При этом было установлено, что в пределах ошибки опыта, значения ККМ для каждого ПАВ практически не изменяются как с изменением температуры в диапазоне от 20 до 50 °С, так и с изменением значений pH от 5.5 до 7.2. Усреднённые по pH и температуре концентрационные области, отвечающие ККМ, приведены в Табл. 1.

Таблица 1. Усреднённые по pH и температуре концентрационные области, отвечающие ККМ для изучаемых низкомолекулярных ПАВ (I = 0.05 M).

ПАВ	ККМ, мг/л
CITREM	12.5 – 17.5
SSL	2.5 – 3.5
PGE (080)	0.75 – 1.0

Знание значений ККМ делает возможным расчёт изменения свободной энергии Гиббса в процессе образования мицелл данными ПАВ и, тем самым, оценку термодинамической стабильности этих мицелл по следующему уравнению:

$\Delta G_{\text{миц}} = kT \ln(\text{ККМ})$, где значение ККМ выражено в мг/л. При расчёте $\Delta G_{\text{миц}}$ для каждой температуры, использовались pH-усреднённые значения ККМ.

На Рис. 2 показана температурная зависимость нормализованной по kT свободной энергии Гиббса процесса мицеллообразования изучаемых ПАВ, $\Delta G_{\text{миц}}$. Чем ниже

значение ККМ и чем более отрицательное изменение свободной энергии Гиббса, $\Delta G_{\text{миц}}$, тем более термодинамически выгоден процесс мицеллообразования ПАВ, т.е. очевидно, что при этом образуются более термодинамически стабильные мицеллы.

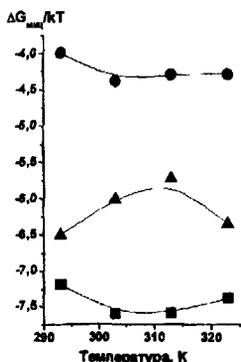


Рис. 2. Температурная зависимость изменения нормализованной по kT свободной энергии Гиббса процесса мицеллообразования, $\Delta G_{\text{миц}}$ для изучаемых ПАВ:

▲ SSL, ■ PGE, ● CITREM.

Таким образом, наиболее термодинамически стабильными в ряду изученных ПАВ можно считать мицеллы, образованные неионным PGE, а наименее – анионным CITREM. Мицеллы анионного ПАВ SSL занимают промежуточное положение по термодинамической стабильности.

2. Термодинамический анализ влияния структуры индивидуальных молекул ПАВ и белков на характер их взаимодействия в водной среде.

В целом, взаимодействия между белками и ПАВ складываются из большого числа различных физико-химических процессов с вовлечением различных функциональных групп и сегментов (полярных, заряженных, гидрофобных) этих амфифильных по своей природе молекул. Преимущественный характер взаимодействий белок-ПАВ может варьироваться от электростатического, донорно-акцепторного и образования водородных связей до гидрофобного, в зависимости от условий окружающей водной среды (рН, ионная сила, температура), а также от особенностей химического строения (наличие специфических функциональных групп и сегментов) и физических молекулярных параметров (молекулярный вес, размер, конформация) взаимодействующих молекул.

Доступной термодинамической функцией, которая напрямую отражает преобладающий характер взаимодействий белок-ПАВ в водной среде, является энтальпия взаимодействия, $\Delta H_{\text{бел-ПАВ}}$, которую можно измерить методом калориметрии смешения. Отрицательные значения $\Delta H_{\text{бел-ПАВ}}$ указывают на преобладание в системе экзотермических по характеру взаимодействий: ионных или образования водородных связей. Напротив, положительные значения $\Delta H_{\text{бел-ПАВ}}$ обычно свидетельствуют о преобладании гидрофобных взаимодействий в системе.

На основании данных калориметрии смешения нам удалось, в первую очередь, установить влияние величины одноимённого с белком заряда и размера полярной части анионных ПАВ на характер их взаимодействия с белками. Наиболее ярко это влияние может быть продемонстрировано на примере взаимодействия одноимённо заряженных при нейтральном значении рН (7.2) казеината натрия и анионных ПАВ, различающихся по строению полярных частей их молекул – CITREM (две карбоксильные группы) и SSL (одна карбоксильная группа). При этом, в случае CITREM, при 293К, наблюдался преимущественно эндотермический характер взаимодействия, а в случае SSL, напротив, преимущественно экзотермический характер. При повышении температуры эти

тепловые эффекты взаимодействия трансформировались в экзотермический и эндотермический соответственно (Рис. 3а, б). По-видимому, в случае молекул CITREM (Рис. 3а), достаточно большой одноимённый с белком заряд и размер их полярной части препятствуют их проникновению внутрь белковой наночастицы, что существенно снижает вероятность таких типов взаимодействий с белком, как электростатических, донорно-акцепторных или образования водородных связей. При этом, эндотермический характер взаимодействия между ними свидетельствует о преобладающем вкладе в суммарный тепловой эффект гидрофобных по своей природе взаимодействий между углеводородной цепью CITREM и неполярными группами белка. Кроме того, этот тепловой эффект может возникать за счёт эндотермического по характеру, при 293 К, перехода углеводородных цепей данного ПАВ из водной среды внутрь гидрофобного интерьера белковой наночастицы.

Повышение температуры приводит к изменению характера взаимодействия от эндотермического к экзотермическому, что наиболее соответствует ожидаемому в этом интервале температур изменению характера перехода углеводородных цепей ПАВ из водной среды в гидрофобный интерьер белка, подобно изменению характера перехода молекул ПАВ из водной среды в мицеллы с повышением температуры.

Напротив, в случае молекул SSL (Рис. 3б) меньший заряд и размер их полярной части, ослабляя электростатическое отталкивание с белком и уменьшая стерические затруднения при их взаимодействии с белком, способствует проникновению молекул SSL, как целого, внутрь интерьера белковых наночастиц, тем самым повышая вероятность различных видов взаимодействий. Об этом свидетельствует преимущественно экзотермический характер их взаимодействия, обусловленный, скорее всего, формированием большого числа электростатических, донорно-акцепторных или водородных связей, которые по своей энергии (10-40 кДж/моль), как правило, превосходят гидрофобные взаимодействия (5-10 кДж/моль) при комнатной температуре. Однако когда с увеличением температуры экзотермические по характеру полярные взаимодействия становятся слабее, мы наблюдаем усиление эндотермических по природе гидрофобных взаимодействий между неполярными участками ПАВ и белка.

Кроме того, данные калориметрии смещения свидетельствовали, что снижение одноимённого заряда как на белке, так и предположительно на анионных ПАВ, при

приближении значений pH к изоэлектрической точке белка ($pI_{\text{бел}} \approx 5$), также приводило к значительным изменениям в характере взаимодействия анионных ПАВ с белком (Рис. 4).

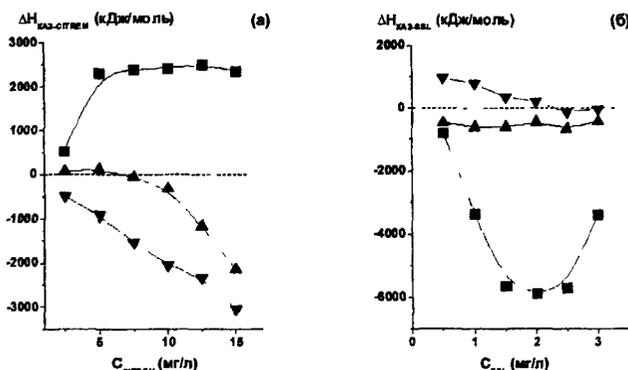


Рис. 3. Влияние температуры на концентрационные зависимости энтальпии взаимодействия между ПАВ и казеинатом натрия в водной среде (pH 7.2, $I=0.05$ M): ■ - 293K, ▲-313K, ▼- 323K для (а) CITREM и (б) SSL. Чувствительность калориметрических измерений составляет не менее, чем 3×10^{-6} Дж/сек.

В случае молекул CITREM характер взаимодействия становился менее эндотермическим. Наиболее вероятно, что меньший заряд белка и, следовательно, меньшее электростатическое отталкивание между одноимённо заряженными белком и ПАВ, благоприятствовало формированию большего числа контактов между полярными функциональными группами анионного ПАВ и белка, имеющих экзотермический характер, что и определяло найденное уменьшение суммарного эндотермического теплового эффекта их взаимодействия. Для менее заряженного SSL наблюдалось резкое изменение характера взаимодействия с белком, а именно, переход от преимущественно экзотермического к ярко выраженному эндотермическому характеру взаимодействия. Этот результат вероятнее всего связан с увеличением вклада в общий тепловой эффект процесса образования преимущественно гидрофобных контактов между неполярными участками ПАВ и белка при уменьшении их одноимённого заряда, вызванного понижением pH.

Для сравнения, как и ожидалось, при понижении pH практически не отмечалось принципиальных изменений в экзотермическом характере взаимодействия между казеинатом натрия и неионным ПАВ PGE, который, главным образом, определялся

преимущественным образованием водородных связей между гидроксильными группами PGE и полярными группами белка.

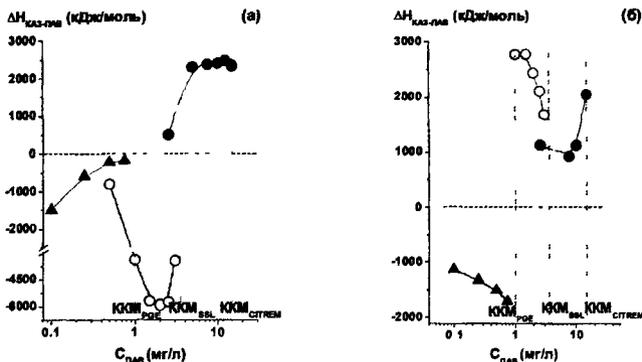


Рис. 4. Влияние pH на характер взаимодействия между казеинатом натрия и ПАВ в водной среде ($I = 0.05 \text{ M}$): ● - CITREM, ○ - SSL, ▲ - PGE для (а) pH 7.2 и (б) pH 5.5. Чувствительность калориметрических измерений составляет не менее, чем $3 \times 10^{-6} \text{ Дж/сек}$.

На основании данных калориметрии смешения нам также удалось выявить роль конформации белков при их взаимодействии с ПАВ, что наиболее ярко можно проиллюстрировать сравнением характера взаимодействий с ПАВ нативного и термоденатурированного белка на примере глобулярного растительного белка 11S глобулина (легумина) кормовых бобов (*Vicia Faba*).

На Рис. 5 отчетливо видно, что энтальпия взаимодействия термоденатурированного белка с ПАВ (Рис. 5б) на несколько порядков величины больше, чем энтальпия взаимодействия нативных глобул белка как с анионными (CITREM, SSL), так и с неионным (PGE) ПАВ. Данный результат, с одной стороны, может быть связан с большей доступностью для ПАВ реакционных групп или соответствующих участков в молекулах белка, из-за их частичного разворачивания в результате теплового воздействия ($90 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 мин), а с другой стороны, обусловлен увеличением числа мест связывания на белке, благодаря образованию растворимых агрегатов термоденатурированного легумина ($M_w = 6300 \text{ кДа}$). При этом интересно отметить, что в соответствии с меньшим зарядом и размером полярной части молекул SSL, наблюдались максимальные значения энтальпии их взаимодействия с легумином. По-видимому, как и в случае с казеинатом натрия, меньшие силы взаимного электростатического

отталкивания между одноимённо заряженными белком и ПАВ, а также меньший размер полярной части этого ПАВ, благоприятствуют проникновению молекул SSL внутрь интерьера белка и, следовательно, увеличению общего числа контактов белок-ПАВ различной природы.

Общность влияния конформации белков на их взаимодействие с ПАВ ясно видна из сравнения значений энтальпии взаимодействия ПАВ-белок, измеренных калориметрией смешения для различных по природе белков и представленных в Табл. 2.

Так из Табл. 2 видно, что энтальпия взаимодействия минимальна для нативного 11S глобулина, имеющего компактную конформацию глобулы ($R = 3+5$ нм), внутренний интерьер которой практически недоступен для молекул ПАВ. Напротив, для наночастиц казеината натрия ($M_w = 4000$ кДа, $R_h = 117$ нм) и растворимых агрегатов термоденатурированного 11S глобулина ($M_w = 6300$ кДа, $R_h = 58$ нм) характерны значительные величины энтальпий их взаимодействия с ПАВ. Интересно отметить, что близкие по величине энтальпии взаимодействия были обнаружены в случае взаимодействия казеината натрия и термоденатурированного 11S глобулина с более легко проникающими, благодаря меньшему заряду и размеру, молекулами SSL. Этот результат можно объяснить достаточно открытой конформацией как наночастиц казеината натрия, так и термоагрегатов денатурированного легумина, задаваемой клубкообразной конформацией индивидуальных казеинов и развёрнутых цепочек термоденатурированного легумина, соответственно. Однако, несмотря на близкую конформацию этих белков, энтальпии их взаимодействия с более заряженными и большими по размеру молекулами CITREM различались кардинально.

Данный результат, по-видимому, связан с большой разницей в суммарных зарядах казеината натрия и термоагрегатов денатурированного легумина, что находит своё подтверждение в кардинальном различии значений вторых вириальных коэффициентов, измеренных методом лазерного светорассеяния и отражающих большую разницу в гидрофильности этих белков (Табл. 2). При этом следует уточнить, что второй вириальный коэффициент в первую очередь характеризует термодинамическое сродство молекул белка к растворителю (в нашем случае к воде), представляя, таким образом, относительную характеристику гидрофобности/гидрофильности белковой поверхности

(растворитель термодинамически плохой, если $A_{\text{бел-бел}} < 0$ или, напротив, хороший, если $A_{\text{бел-бел}} > 0$ и идеальный при $A_{\text{бел-бел}} = 0$).

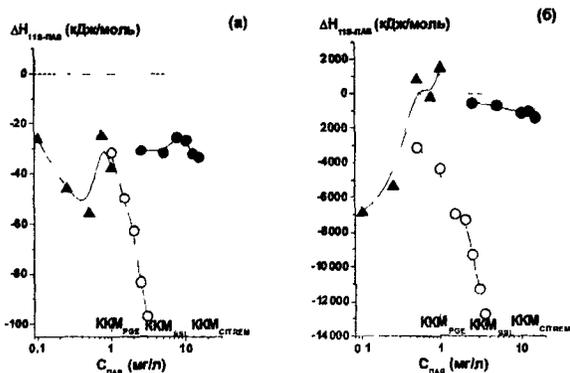


Рис. 5. Энтальпия взаимодействия 11S глобулина с ПАВ в водной среде (pH 7.2, $I = 0.05$ M): ● - CITREM, ○ - SSL, ▲ - PGE для (а) нативного 11S глобулина и (б) термоденатурированного 11S глобулина. Чувствительность калориметрических измерений составляет не менее, чем 3×10^{-6} Дж/сек.

Действительно, в соответствии с большей гидрофильностью казеината натрия, по всей вероятности заданной его большим суммарным зарядом, ожидаемое достаточно сильное электростатическое отталкивание с молекулами одноимённо заряженного CITREM препятствует развитию полярных взаимодействий между ними и приводит к преимущественному формированию гидрофобных контактов между неполярными участками ПАВ и белка. Напротив, достаточно высокий уровень гидрофобности термоденатурированного легумина, отражённый в отрицательных значениях $A_{\text{бел-бел}}$, и свидетельствующий, по-видимому, об относительно низком суммарном заряде белка и, следовательно, электростатическом отталкивании с одноимённо заряженными молекулами CITREM, способствует развитию ионных взаимодействий между ними, как это можно видеть из обнаруженного преимущественно экзотермического характера их взаимодействия (Табл. 2).

3. Модификация молекулярных параметров белков посредством их взаимодействия с индивидуальными молекулами ПАВ.

В результате взаимодействий белков с ПАВ, как правило, наблюдалась ассоциация белка, что отражалось в увеличении значений его средневесовой молекулярной массы, M_w , и радиуса инерции, R_G , которые были измерены методом лазерного светорассеяния

(Табл. 3). При этом, с одной стороны, она сопровождалась возрастанием относительной гидрофильности поверхности наночастиц белка, что отражалось в увеличении положительных значений или в снижении отрицательных величин второго вириального коэффициента, $A_{\text{бел-бел}}$, и было наиболее заметно в случае взаимодействия анионных ПАВ (CITREM и SSL) как с казеинатом натрия, так и с термоденатурированным легумином (Табл. 3).

Таблица 2. Роль конформации белков и их относительной гидрофильности во взаимодействии с ПАВ.

	Казеинат натрия	Нативный 11S глобулин	Т/д 11S глобулин
$A_{\text{бел-бел}} 10^5$ ($\text{м}^3 \text{ моль} / \text{кг}^2$)	2.9	0	-21
	$\Delta H_{\text{бел-ПАВ}}$ (кДж/моль)		
CITREM (7.5 мг/л)	2202	-30	- 762
SSL (1 мг/л)	- 3366	- 34	- 4333

С другой стороны, ассоциация белка приводила к отчётливому увеличению относительной гидрофобности белковой поверхности, что было обнаружено в случае взаимодействия анионных ПАВ (CITREM и SSL) с нативным легумином (Табл. 3). Эти изменения в гидрофильно/липофильных свойствах поверхности белковых наночастиц в результате их взаимодействия с молекулами ПАВ (Табл. 3) наиболее вероятно обусловлены определённым пространственным расположением гидрофобных и гидрофильных участков в молекулах белка и ПАВ, которое, по всей вероятности, в определённой степени задаётся преобладающей природой их взаимодействий. Это означает, что большинство гидрофобных участков обеих взаимодействующих молекул может быть либо экспонировано в водную среду, и тогда $A_{\text{бел-бел}} < 0$, либо, наоборот, они спрятаны в интерьере белковых ассоциатов, а их гидрофильные участки направлены в водную среду, и тогда $A_{\text{бел-бел}} > 0$. При этом было обнаружено, что более гидрофильная поверхность белковых ассоциатов, как правило, образуется либо при большей полярности присоединившихся к белку молекул ПАВ, либо при более высокой степени ассоциации самого белка, k_1 , когда большая часть его гидрофобной поверхности оказывается изолированной от водной среды.

Кроме того, в случае нативного 11S глобулина, изменение его молекулярных свойств в результате взаимодействия с ПАВ, может быть обусловлено изменением

конформационной стабильности его белковой глобулы (степени её свёрнутости/развёрнутости), что может быть охарактеризовано термодинамическими параметрами, описывающими термоденатурацию белка, и измерено при помощи метода дифференциально сканирующей калориметрии (ДСК) в водной среде (Табл.4).

Таблица 3. Молекулярные и термодинамические параметры комплексов белок + ПАВ, образовавшихся в результате взаимодействий казеината натрия и 11S глобулина с индивидуальными молекулами ПАВ (ниже ККМ) в водной среде (рН 7.2, I = 0.05 M, T = 293K). Ошибка метода при определении R_h , M_w и $A_{\text{бел-бел}}$ составляет $\pm 10\%$. Ошибка метода в определении R_G составляет $\pm 5\%$.

ПАВ	$C_{\text{ПАВ}}$ (мг/л)	$M_w \cdot 10^{-6}$ (Да)	$k_1^{*)}$	$A_{\text{бел-бел}} 10^5$ (м ³ моль/ кг ²)	$A_{\text{бел-бел}}$ (м ³ /моль)	R_G (нм)	$k_2^{*)}$	$\rho = R_G/R_h$
Казеинат натрия								
	0	4		2.9	0.02	117		1.1
CITREM	5	29	7.3	11.2	188	211	1.8	2.0
SSL	1	25	6.3	6.3	78	207	1.8	2.2
PGE	0.5	15.6	3.9	5.9	29	191	1.6	2.0
Нативный 11S глобулин								
	0	0.33		0	0	-		-
CITREM	6	0.38	1.2	-24.5	-0.07	-	-	-
SSL	1	0.69	2.0	-0.7	-0.007	-	-	-
PGE	0.5	2.6	7.9	22	2.97	-	-	-
Термоденатурированный 11S глобулин								
	0	6.3		-21	-17	40		0.7
CITREM	6	19.2	3.0	14	10	108	2.7	1.7
SSL	1	55	8.7	32.8	1984	273	6.8	3.1
PGE	0.5	8.8	1.4	-8.5	-13	119	3.0	1.7

*) k_1 – степень ассоциации белка; $k_1 = M_w^{\text{бел+ПАВ}} / M_w^{\text{бел}}$

k_2 – степень увеличения размеров белковых ассоциатов;

$k_2 = R_G^{\text{бел+ПАВ}} / R_G^{\text{бел}}$.

К этим параметрам относятся: удельная энтальпия термоденатурации белка, ΔH_d ; разность между удельными теплоёмкостями нативного и термоденатурированного белка, $\Delta_d C_p$, характеризующая различие в степени экспонирования гидрофобных групп в водную среду в нативном и денатурированном состояниях, а также параметр кооперативности, $\Delta T_{1/2}$, который равен ширине калориметрического перехода на половине высоты теплового пика (К) на термограмме. Снижение как значения ΔH_d , так и

значения $\Delta_d C_p$ обычно указывает на частичное разворачивание белка и, следовательно, на уменьшение его конформационной стабильности уже до теплового воздействия, а их увеличение, напротив, на возрастание конформационной стабильности белка.

Действительно, из Табл. 4 видно, что наиболее ощутимое разворачивание белка до термоденатурации, обнаруженное в случае взаимодействия нативного 11S глобулина с PGE, приводит к наиболее выраженной ассоциации белка в водной среде (Табл. 3) так, как будто бы в этом случае было достигнуто максимальное увеличение гидрофобности нативного белка путём наложения процессов разворачивания белковой глобулы и присоединения к белку углеводородных радикалов от неионного ПАВ.

Таблица 4. Влияние индивидуальных молекул ПАВ (ниже ККМ) на термодинамические параметры процесса термоденатурации 11S глобулина. Точность измерений составляла $\pm 10\%$ от значений измеряемой теплоёмкости.

Добавл. ПАВ	$C_{\text{ПАВ}}$ (мг/л)	ΔH_d (Дж/г)	$\Delta_d C_p$ (Дж/(г К))	$\Delta T_{1/2}$ (К)
	0	25.1	0.35	11.8
CITREM	5	22.1	0.34	9.2
SSL	1	33.1	0.42	11.0
PGE	0.5	19.5	0.23	9.5

Кроме того, измерения ДСК свидетельствуют о том, что образование дополнительных связей ПАВ-белок, за счёт присоединившихся молекул ПАВ, может приводить к увеличению конформационной стабильности белка, как это наблюдалось в случае с SSL (Табл. 4). При этом была обнаружена меньшая степень ассоциации белка (Табл. 3), вызванная, в данном случае, по-видимому, только увеличением гидрофобности белка из-за присоединения к нему углеводородных «хвостов» ПАВ.

Интересно отметить, что наименьшая степень разворачивания белка, найденная при его взаимодействии с наиболее заряженными молекулами CITREM, хорошо согласуется как с наименьшим тепловым эффектом их взаимодействия (Рис. 5а), так и с наименьшей степенью ассоциации белка в присутствии этого ПАВ (Табл. 3).

В дополнение к вышесказанному можно отметить, что в присутствии ПАВ, независимо от их природы, параметр кооперативности, $\Delta T_{1/2}$, снижался (Табл. 4), что указывало на то, что термоденатурация белка происходит в более узком диапазоне температур и, таким образом, является более кооперативным процессом, по всей вероятности, за счёт образования достаточно протяжённых зон контактов между белком и ПАВ, разрушающихся одновременно при нагреве.

В то же время, рассмотрение степени увеличения размеров (R_G) белковых ассоциатов (k_2) показывает, что это значение, как правило меньше, чем степень возрастания (k_1) их средневесовой молекулярной массы (M_w) (Табл. 3), что свидетельствует о некотором сжатии наночастиц белка, объединённых в ассоциаты, наиболее вероятно за счёт их внутренней сшивки посредством взаимодействий ПАВ-белок. Это сжатие наиболее ощутимо в случае наночастиц казеината натрия, обладающих достаточно пористой и гибкой структурой. При этом, однако, архитектура модифицированных наночастиц белка становится в целом более открытой, что отражается в увеличении значений высоко структурно-чувствительного параметра, ρ (Табл. 3). Этот параметр указывает на трансформацию архитектуры белковых наночастиц от достаточно плотных сфер, $0.6 \leq \rho \leq 1$, к случайно свёрнутым клубкам, $1.5 \leq \rho \leq 2$ или даже к более открытой архитектуре полидисперсных твёрдых стержней, как в случае взаимодействия молекул SSL с термоденатурированным белком, когда $\rho > 2$ (Табл. 3).

На основании объединённых данных калориметрии смешения и лазерного светорассеяния можно схематически предположить молекулярный механизм взаимодействия белков с ПАВ, что, в качестве примера, продемонстрировано на Рис. 6 для взаимодействия казеината натрия с молекулами анионного ПАВ CITREM.

Так, первоначально мы имеем отдельные сферические наночастицы казеината натрия с характерным размером ($R_G = 117$ нм) и термодинамическим сродством к водной среде ($A_{\text{бел-бел}} = 0.02$ м³/моль). В результате их взаимодействия с молекулами CITREM формируются модифицированные белковые наночастицы, представляющие собой ассоциаты белка с высокой гидрофильностью ($A_{\text{бел-бел}} = 188$ м³/моль), которая обусловлена преимущественно гидрофобным встраиванием углеводородных радикалов молекул CITREM внутрь белковых наночастиц и их ассоциатов (Рис. 3а), сопровождающимся экспонированием полярных групп CITREM на их поверхности

4. Модификация структурообразующих свойств белков на границе раздела фаз воздух-вода посредством их взаимодействия с индивидуальными молекулами ПАВ.

Влияние на структурообразующие функции белка формирования модифицированных посредством ПАВ белковых ассоциатов с возросшим термодинамическим сродством к водной среде, что является наиболее частым результатом взаимодействия изученных белков и ПАВ (Табл. 3), можно наиболее чётко продемонстрировать на примере казеината натрия. Так, было установлено, что такая модификация белка, с одной

стороны, обычно приводит к снижению его поверхностной активности на границе раздела фаз воздух-вода, что проявляется в более низких значениях межфазного давления, π , (Рис. 7) и в образовании более грубодисперсных свежеприготовленных белковые пены (Рис. 8), а с другой стороны, способствует повышению стабильности белковых пен во времени (Рис. 8), за счёт формирования как стерически более прочных (благодаря адсорбции ассоциатов), так и более гидрофильных адсорбционных слоёв белка, дольше сохраняющих прослойку водной среды между пузырьками воздуха. Здесь необходимо также отметить, что сами ПАВ в изучаемом диапазоне концентраций не способны к формированию тонкодисперсных и стабильных во времени пен.

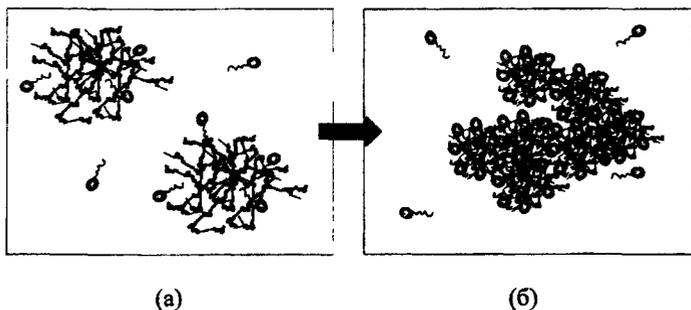


Рис. 6. Возможная схема молекулярного механизма образования комплекса казеинат натрия + молекулы CITREM (ниже ККМ) (рН 7.2, Т = 293 К);

(а) начальная стадия комплексообразования, (б) конечная стадия комплексообразования.

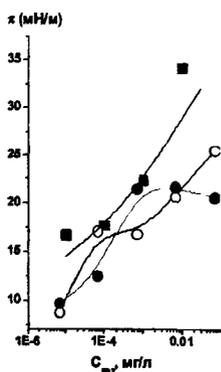


Рис. 7. Концентрационные изотермы межфазного давления для казеината натрия (■) и его комплексов с ПАВ (ниже ККМ): (●) CITREM, (○) SSL на границе раздела фаз воздух-вода (рН 7.2, I = 0.05 М, Т = 293 К). Точность метода составляет ± 1 мН/м.

Кроме того, в случае взаимодействия нативного IIS глобулина с ПАВ, т.е. когда его ассоциация выражена не так отчётливо, а термодинамическое сродство белковых наночастиц к водной среде ухудшается, т.е. возрастает их гидрофобность, что особенно проявляется в присутствии CITREM (Табл. 3), поверхностная активность

модифицированного белка, а также дисперсность и стабильность пен на его основе, могут значительно улучшиться (Рис. 9).

5. Особенности взаимодействий белок-ПАВ и модификация молекулярных параметров белка посредством этих взаимодействий при концентрации ПАВ выше ККМ.

Данные метода калориметрии смешения, полученные для казеината натрия, а также для нативного и термоденатурированного 11S глобулина при различных экспериментальных условиях (Т, рН) позволили установить, что в том случае, когда и мицеллы ПАВ, и белок обладают достаточно высоким одноимённым зарядом, тогда мицеллы не принимают участия во взаимодействии с белками из-за сильного электростатического отталкивания между ними, и взаимодействия происходят только между белком и индивидуальными молекулами ПАВ, которые находятся в равновесии с мицеллами.

Образец	1.5 мин	3 мин	6 мин	9 мин
Белок				
Белок + CITREM				
Белок + SSL				

Рис. 8. Стабильность пен, приготовленных на основе казеината натрия и его комплексов с ПАВ (ниже ККМ), во времени (1.5 – 9 мин.) (рН 7.2, I = 0.05 М, Т = 293 К).

Этот факт находит отражение в отсутствии каких-либо изменений в характере взаимодействия белок-ПАВ при переходе через область ККМ, как это было найдено,

например, для взаимодействия казеината натрия и нативного 11S глобулина с анионными ПАВ, а именно с CITREM и SSL при рН 7.2.

Образец	1.5 мин	3 мин	6 мин	9 мин
Белок $\pi_{2 \text{ часа}} = 10$ (мН/м)				
Белок + CITREM (5 мг/л) $\pi_{2 \text{ часа}} = 15$ (мН/м)				

Рис. 9. Влияние CITREM (ниже ККМ) на стабильность пены, приготовленной на основе нативного 11S глобулина, во времени (1.5 - 9 мин.) (рН 7.2, I = 0.05 М, Т = 293 К) $\pi_{2 \text{ часа}} = 4$ мН/м для чистого CITRFM (5 мг/л).

Напротив, в условиях эксперимента, когда уменьшается одноимённый заряд и у белка, и у ПАВ, например, при понижении рН в случае казеината натрия или при переходе от нативного 11S глобулина к его растворимым

термоденатурированным агрегатам, наблюдается резкое изменение характера взаимодействий белков с ПАВ в области выше ККМ, что постулирует участие мицелл ПАВ во взаимодействии с белками.

Кроме того, в случае казеината натрия данные калориметрии смешения свидетельствовали об образовании мицеллоподобных кластеров ПАВ внутри или на поверхности белковых наночастиц при концентрациях ПАВ в области ККМ. При этом, энтальпия мицеллообразования ПАВ на белке была в несколько раз или даже на порядки величины ниже, чем при формировании мицелл ПАВ в свободном состоянии, т.е. в отсутствие белка. Этот результат указывает на то, что формирующиеся внутри белка мицеллоподобные кластеры оказываются значительно меньше, чем свободные мицеллы ПАВ, при этом постулируется важность влияния особенностей интерьера белка на характер мицеллообразования ПАВ. Очевидно, что для лучшего понимания влияния такого рода мицеллообразования на молекулярные свойства белков и их функциональность требуются дальнейшие систематические исследования.

Далее, в качестве примера, более детально рассмотрены особенности участия мицелл анионных ПАВ во взаимодействии с казеинатом натрия при pH 5.5. Так, в случае CITREM нами было обнаружено резкое увеличение эндотермического теплового эффекта взаимодействия между данным ПАВ и белком выше ККМ (Рис. 10а).

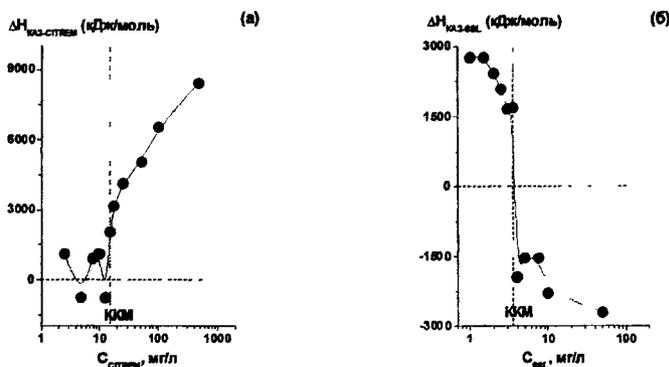


Рис. 10. Влияние молекулярного состояния ПАВ на характер их взаимодействия с казеинатом натрия в водной среде (pH 5.5, $I = 0.05$ M, $T = 293$ K) для (а) CITREM и (б) SSL. Чувствительность калориметрических измерений составляет не менее, чем 3×10^{-6} Дж/сек.

Этот результат объясняется, скорее всего, разрушением мицелл CITREM при их взаимодействии с белком с последующим высвобождением из них большого числа молекул ПАВ, что является причиной значительного увеличения числа гидрофобных контактов, образуемых молекулами CITREM с белком.

Резкое изменение характера взаимодействий между SSL и белком от эндотермического к экзотермическому при переходе ККМ также позволяет предположить участие мицелл этого ПАВ во взаимодействии с белком, однако в этом случае, наиболее вероятно, что мицеллы вовлекаются во взаимодействие с белком как единое целое (Рис. 10б). При этом осуществляется переход от преобладающих взаимодействий между неполярными участками белка и ПАВ к преимущественному взаимодействию между их полярными группами.

Полученные результаты хорошо согласуются с более отрицательным значением свободной энергии Гиббса, найденной для процесса мицеллообразования в случае SSL ($\Delta G_{\text{миц}} = -6\text{кТ}$) (Рис. 2), что указывает на большую термодинамическую стабильность мицелл данного ПАВ по сравнению с мицеллами CITREM ($\Delta G_{\text{миц}} = -4\text{кТ}$) (Рис. 2)

Как результат вовлечения большого числа молекул CITREM выше ККМ в преимущественно гидрофобное взаимодействие с белком, интенсифицируется процесс меж- и внутримолекулярной сшивки белка, приводящий к образованию больших ассоциатов с более высокой гидрофильностью поверхности, с более компактной структурой и сферической архитектурой (Табл. 5). Напротив, когда во взаимодействие с белком вовлечены целые мицеллы, как в случае SSL, молекулярные параметры исходных белковых частиц изменяются незначительно, при этом не происходит ощутимой сшивки молекул белка, но происходит добавление гидрофильных свойств поверхности мицелл к исходным свойствам белковой поверхности (Табл. 5). Наиболее вероятно, что дополнительный заряд, сообщаемый белку в результате его взаимодействия с мицеллами, предотвращает дальнейшую ассоциацию белковых частиц из-за усиления электростатического отталкивания между ними.

На основе комбинации данных калориметрии смешения (Рис. 10) и лазерного светорассеяния (Табл. 5) можно предложить следующую схему молекулярного механизма взаимодействия казеината натрия и анионных ПАВ выше ККМ (Рис. 12).

6. Эффективность модификации структурообразующих свойств белка посредством взаимодействия с мицеллами ПАВ.

В результате обнаруженной модификации молекулярных параметров белка, посредством его взаимодействия с мицеллами ПАВ (Табл. 5), происходят значительные изменения в его структурообразующих свойствах, как это наиболее ярко может быть продемонстрировано на примере казеината натрия.

Так, в частности, можно предположить, что ярко выраженная ассоциация белка в случае добавления мицелл CITREM (Табл. 5), очевидно сопровождающаяся значительным снижением числа модифицированных белковых наночастиц, способных формировать защитные адсорбционные слои на пузырьках воздуха, приводит к тому, что стабильные белковые пены не могут образовываться (Рис. 11)

Таблица 5. Молекулярные и термодинамические параметры комплексов белок + ПАВ, образовавшихся в результате взаимодействия казеината натрия с мицеллами анионных ПАВ в водной среде (рН 5.5, I = 0.05 М, 293 К).

ПАВ	С _{ПАВ} (мг/л)	M _w 10 ⁻⁶ , (Да)	A _{бел-бел} 10 ⁵ , k ₁ ^{*)} (м ³ моль/ кг ²)	A _{бел-бел} , (м ³ / моль)	R _G , (нм)	ρ = k ₂ ^{*)} R _G /R _h
Казеинат натрия						
	0	15	2.0	9	200	2.2
CITREM	500	123	8.2	1.7	517	0.93
SSL	100	18	1.2	5.9	38	0.94

*) k₁ – степень ассоциации белка; k₁ = M_w^{бел+ПАВ} / M_w^{бел}

k₂ – степень увеличения размеров белковых ассоциатов;

С другой стороны, при концентрациях CITREM выше ККМ, можно также ожидать наличия отрицательного вклада в образование и стабильность пен со стороны процесса конкурентной адсорбции CITREM, поскольку, как уже отмечалось ранее, все исследуемые ПАВ по отдельности не способны стабилизировать пены во всём диапазоне изученных концентраций.

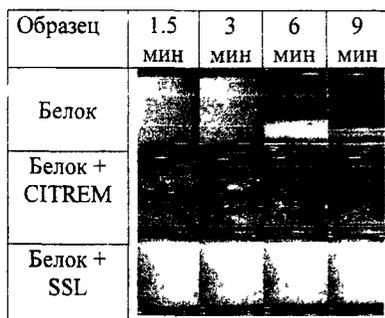


Рис. 11. Влияние взаимодействия мицелл ПАВ (выше ККМ) с белком на стабильность пены, приготовленной на основе модифицированного казеината натрия, во времени (1.5 - 9 мин.) (рН 5.5, I = 0.05 М, T = 293 К).

В отличие от этого, в случае SSL, т.е. когда число модифицированных наночастиц белка практически не изменяется, в то время как их гидрофильность а, следовательно, и

способность к удерживанию воды адсорбционными слоями белка возрастает (Табл. 5), стабильность пен также возрастает кардинально, несмотря на возможную конкурентную

адсорбцию SSL на границе раздела фаз воздух-вода при его достаточно высокой концентрации в растворе (Рис. 11).

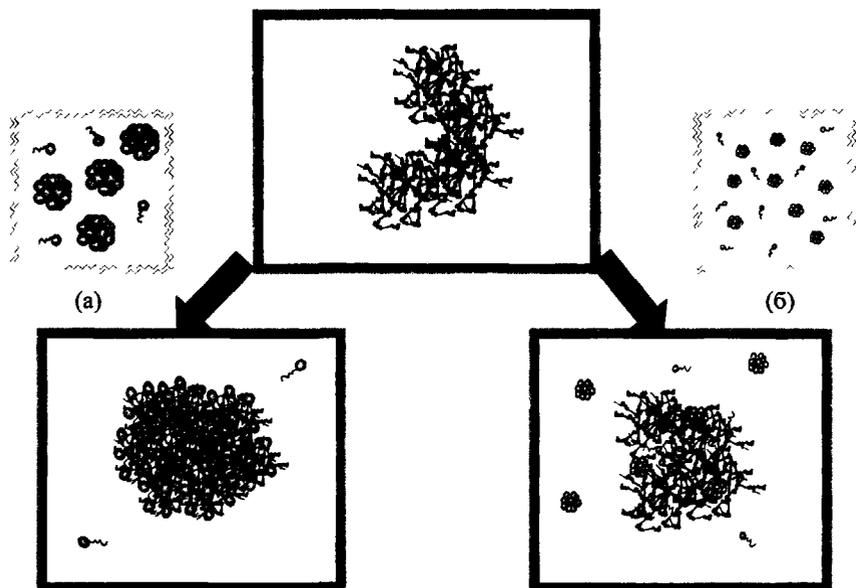


Рис. 12. Возможная схема молекулярного механизма взаимодействия казеинат натрия с мицеллами ПАВ (выше ККМ) в водной среде (рН 5.5, $I = 0.05$ М, 293 К): (а) CITREM; (б) SSL.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлено влияние структурных особенностей полярной части (заряда, размера, наличия специфических функциональных групп) молекул ПАВ, имеющих близкую длину углеводородной части, на характер их взаимодействия с одноимённо заряженными белками. Также выявлена роль заряда и коформации белков во взаимодействии с одноимённо заряженными ПАВ.

2. Разработан способ получения стабильных комплексов белков с низкомолекулярными ПАВ в водной среде.

3. Показано, что взаимодействия низкомолекулярных ПАВ с белками в водной среде приводят к эффективной модификации молекулярных (M_w , R_G , R_h , $\rho = R_G/R_h$) и термодинамических параметров ($A_{\text{бел-бел}}$, конформационной стабильности) белков, а также их структурообразующих свойств. При этом установлено влияние молекулярного состояния ПАВ на изменение молекулярных параметров и структурной функциональности белков.

4. Установлено, что ярко-выраженная ассоциация белка в комплексе с ПАВ, сопровождающаяся существенными изменениями в гидрофобно/гидрофильном балансе их свойств, лежит в основе найденных значительных изменений как их поверхностной активности на границе раздела фаз воздух-вода, так и стабильности во времени пен, приготовленных на их основе.

5. Предложены термодинамически обоснованные схемы молекулярных механизмов образования комплексов между одноименно заряженными ПАВ и белками в водной среде.

6. Впервые, с использованием термодинамического подхода, установлены корреляции между молекулярной структурой одноименно заряженных белков и ПАВ, характером их взаимодействия, молекулярными параметрами образующихся между ними комплексов и структурообразующей способностью последних на границе раздела фаз воздух-вода.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. M. M. II'in, M. G. Semenova, L. E. Belyakova, A. S. Antipova and Y. N. Polikarpov. Molecular, thermodynamic and functional properties of legumin (11S globulin from *Vicia faba*) in the presence of small-molecule surfactants: effect of temperature and pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, 278, 2004, PP. 71-80.

2. M. M. II'in, M. S. Anokhina, M. G. Semenova, L. E. Belyakova and Yu.N. Polikarpov. Calorimetric Study of the Interactions between Small- Molecule Surfactants and Sodium Caseinate with Reference to the Surface Activity of Their Binary Mixtures. *Food Hydrocolloids*, 19, 2005, PP. 441-453.

3. M. S. Anokhina, M. M. II'in, M. G. Semenova, L. E. Belyakova and Yu. N. Polikarpov. Calorimetric Investigation of the Thermodynamic Basics of the Effect of Maltodextrins on the Surface Activity of Legumin in the Presence of Small- Molecule Surfactants. *Food Hydrocolloids*, 19, 2005, PP. 455-466.

4. M. S. Anokhina, M. M. II'in, M.G. Semenova, L.E. Belyakova, Yu. N. Polikarpov. Effect of maltodextrins on the surface activity of small-molecule surfactants and their mixtures with legumin. *Starch-2004. From polysaccharides to granules, simple and mixture gels*. Yuryev V.P., Tomasic P. and Ruck H. (Eds.), v. 1, part 4, PP. 217-229.

5. M.G. Semenova, M.M. II'in, L E Belyakova and A.S. Antipova. Protein + small-molecule surfactant mixtures: Thermodynamics of interactions and functionality. In E. Dickinson and Ton van Vliet (Eds.) *Food Colloids, Biopolymers and Materials*, Royal Society of Chemistry, 2003, PP. 377-387.

6. E. Dickinson, M. G. Semenova, L. E. Belyakova, A. S. Antipova, M. M. II'in, E. N. Tsapkina, C. Ritzoulis. Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: relationship to emulsion flocculation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 239, 2001, PP. 87-97.

7. A.S. Antipova, M. G. Semenova, L. E. Belyakova, M.M. II'in. On relationships between molecular structure, interaction and surface behaviour in mixture: small – molecule surfactant + protein. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 21, 2001, PP. 217-230.

8. M.G. Semenova, L.E. Belyakova, A.S. Antipova , Yu. N. Polikarpov, L. Klouda, A. Markovic, M.M. II'in. Effect of maltodextrins on the surface activity of small-molecule surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, PP. 47-54.

9. M.G. Semenova, L.E. Belyakova, A.S. Antipova , Yu. N. Polikarpov, L. Klouda, A. Markovic, M.M. II'in. Effect of maltodextrins on the surface activity of small-molecule surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, PP. 47-54.

Принято к исполнению 20/06/2005
Исполнено 22/06/2005

Заказ № 932
Тираж: 100 экз..

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-г, 20-2-93
(095) 747-64-70
www.autoreferat.ru

№ 14759

РНБ Русский фонд

2006-4
11859