

УДК 541.182.64:543.45

ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ СМЕСЕЙ ЛИЗОЦИМА С БРОМИДОМ ДОДЕЦИЛТРИМЕТИЛАММОНИЯ И ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ НАТРИЯ НА ГРАНИЦАХ ВОДА/ВОЗДУХ И ВОДА/ОКТАН

О.А. Соболева, Р.А. Иванов

(кафедра коллоидной химии, e-mail: soboleva@colloid.chem.msu.ru)

Изучено влияние концентрации и состава смесей лизоцима с поверхностно-активными веществами (катионным бромидом додецилтриметиламмония и анионным додецилсульфатом натрия) на поверхностное натяжение на границах вода/воздух и вода/октан. Установлено, что вид изотерм поверхностного натяжения смешанных растворов зависит от характера взаимодействия белка с ПАВ.

Ключевые слова: *поверхностное натяжение, адсорбция, поверхностно-активные вещества, лизоцим.*

Системы, содержащие белки и поверхностно-активные вещества (ПАВ), широко используются при создании лекарственных веществ, предметов личной гигиены, моющих средств, пен и эмульсий в пищевой промышленности и т.д. Несмотря на широкое применение смесей белок–ПАВ, их поверхностные свойства, взаимное влияние на поверхностное и особенно на межфазное натяжение на границе водный раствор/органическая жидкость исследованы недостаточно [1, 2]. В настоящей работе изучены поверхностные свойства смесей ПАВ разной природы с лизоцимом. Лизоцим – хорошо известный белок; он содержится в первую очередь в местах соприкосновения организма животных с окружающей средой – в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, слезной жидкости, слюне и т.д. Лизоцим весьма широко используется в медицине как антибактериальный агент – при лечении глаз, носоглотки, десен, при ожогах и др. Применяется в пищевой промышленности, зарегистрирован в качестве пищевой добавки E1105. Изoeлектрическая точка белка рН ~11,0, поэтому в водных растворах при нейтральных рН лизоцим заряжен положительно. Можно ожидать, что при изучении смесей лизоцима с катионным и анионным ПАВ существенные различия во взаимодействиях ПАВ с белком окажут влияние на вид изотерм поверхностного натяжения. Согласно литературным данным, анионные ПАВ будут притягиваться к лизоциму за счет как электростатических сил, так и гидрофобного взаимодействия. Известно, что при высоких концентрациях из смешанных водных растворов анионное ПАВ–лизоцим выпадает осадок, представляющий собой нейтральный комплекс белок–ПАВ [3–5]. Дан-

ных о взаимодействиях лизоцима с катионными ПАВ мало. В [6] отмечено, что взаимодействие катионного ПАВ с лизоцимом возможно по механизму гидрофобного связывания.

Цель настоящей работы состояла в исследовании влияния концентрации и состава смесей белок–ПАВ на поверхностное и межфазное натяжение на границах водный раствор/воздух и водный раствор/октан и в выявлении влияния особенностей взаимодействия белок–ПАВ на вид изотерм поверхностного натяжения.

Объекты исследования

В работе использовали лизоцим («*Biomedicals*», Россия), молекулярная масса 14388 г/моль. В качестве катионного ПАВ использовали додецилтриметиламмоний бромид $C_{12}H_{25}(CH_3)_3N^+Br^-$ (ДТАБ, чистота более 98%), производство фирмы «*Merck*» (Германия). В качестве анионного ПАВ использовали додецилсульфат натрия $C_{12}H_{25}SO_4Na$ (ДДСН, «ч.»), ЗАО «НПО ЭК-РОС» (Россия). Для поддержания постоянного значения рН все растворы были приготовлены в фосфатном буфере (рН 7,6). В качестве неполярной жидкости использовали октан марки «ч.д.а.».

Рабочие растворы ПАВ были получены методом последовательного разбавления исходного раствора, приготовленного весовым методом. Концентрация исходного раствора лизоцима составляла $2,8 \cdot 10^{-4}$ М; последовательным разбавлением были приготовлены растворы в интервале концентраций от $7,0 \cdot 10^{-9}$ до $7,0 \cdot 10^{-5}$ М. В смешанных растворах лизоцим–ПАВ, концентрацию лизоцима поддерживали постоянной, а концентрацию ПАВ меняли.

Методы исследования

Поверхностное натяжение растворов смесей лизоцим–ПАВ, а также межфазное натяжение растворов индивидуальных веществ и смесей на границе вода/октан измеряли методом висящей капли. При измерении поверхностного натяжения на границе водный раствор/воздух в закрытой кювете, на дне которой находился исследуемый раствор, формировали каплю водного раствора. Перед проведением измерений межфазного натяжения в стеклянную кювету с пробкой помещали 1 мл исследуемого водного раствора и 1,5 мл октана и оставляли двухфазную систему на двое суток при комнатной температуре для взаимного насыщения фаз. Затем проводили измерения, используя взаимно насыщенные растворы. Время формирования капли при определении как поверхностного, так и межфазного натяжения составляло 30 мин. Каплю фотографировали цифровой видеокамерой DCM-130, установленной на горизонтальном микроскопе. Межфазное натяжение рассчитывали с помощью программного пакета *Drop Shape Analysis (Krus)* по профилю капли методом численного интегрирования уравнения Юнга–Лапласа и приближением рассчитанного профиля капли к полученному экспериментально. Точность измерения поверхностного натяжения составляла 0,5–2,5 мН/м (в зависимости от концентрации раствора). Все измерения проводили при комнатной температуре 24°C. Размер частиц в водном растворе определяли методом динамического светорассеяния с помощью прибора “Zetatrak” (США).

Полученные результаты и их обсуждение

Полученные изотермы поверхностного и межфазного натяжения для индивидуальных растворов ДТАВ и ДДСН имели вид, характерный для мицеллообразующих ПАВ: поверхностное натяжение снижается и при достижении критической концентрации мицеллообразования (ККМ) перестает изменяться. Величины ККМ, полученные по излому изотерм поверхностного натяжения, составляют $1,6 \cdot 10^{-2}$ и $1,0 \cdot 10^{-2}$ М для ДТАВ и ДДСН соответственно. Полученные величины близки к литературным данным [7–10].

Для того чтобы выбрать оптимальные значения концентраций лизоцима, которые давали бы точное представление о влиянии данного белка на поверхностное натяжение растворов ПАВ, предварительно были получены изотермы поверхностного и межфазного натяжения лизоцима (рис. 1). Снижение межфазного натяжения на обеих границах раздела фаз происходит в диапазоне концентраций $7,0 \cdot 10^{-9}$ – $7,0 \cdot 10^{-7}$ М. Для приготовления смесей лизоцим–ПАВ были выбраны концентрации $7,0 \cdot 10^{-9}$ и $7,0 \cdot 10^{-7}$ М. Концентра-

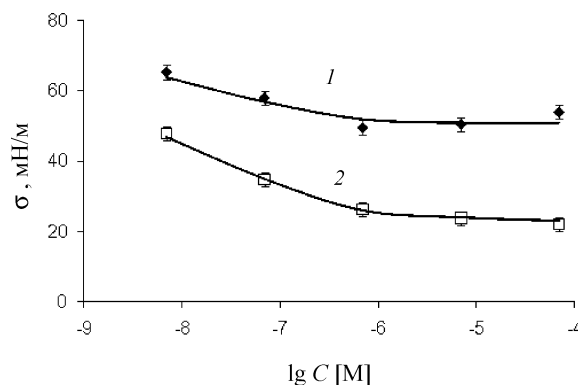


Рис. 1. Зависимость поверхностного натяжения лизоцима на границах вода/воздух (1) и вода/октан (2) от концентрации

ция $7,0 \cdot 10^{-9}$ М соответствует разреженному адсорбционному слою белка, $7,0 \cdot 10^{-7}$ М – выходу изотермы поверхностного натяжения на плато. Изотермы поверхностного натяжения $\sigma(\lg C)$ для системы лизоцим – ДТАВ на границах водный раствор/воздух и раствор/октан приведены на рис. 2. Для обеих межфазных поверхностей получено, что при малых концентрациях ДТАВ поверхностное натяжение смесей совпадает с поверхностным натяжением чистого лизоцима. При концентрации ДТАВ больше 10^{-2} М изотермы поверхностного натяжения смесей с различными добавками лизоцима совпадают с изотермой индивидуального ДТАВ.

Можно предположить, что в растворах смесей лизоцим – ДТАВ имеет место конкурентная адсорбция. При малых концентрациях ДТАВ на поверхности адсорбируется лизоцим, о чем свидетельствует совпадение поверхностного натяжения для раствора белка и смеси. При увеличении концентрации ПАВ происходит замещение молекул лизоцима молекулами ДТАВ в поверхностном адсорбционном слое. Поверхностное натяжение уменьшается до величин, характерных для раствора ДТАВ в отсутствие лизоцима. Методом фотон-корреляционной спектроскопии получено, что в растворе лизоцима присутствуют агрегаты со средним гидродинамическим радиусом $3,4 \pm 1,0$ нм. Как известно, лизоцим – малый белок, его единственная полипептидная цепь свернута в компактную глобулу размером $3,0 \times 3,0 \times 4,5$ нм. Можно считать, что размер агрегатов в исследуемом нами растворе соответствует белковой глобуле. Добавки ДТАВ не вызывают существенных изменений в размере агрегатов, т.е. в присутствии ДТАВ не происходит разворачивания глобулы лизоцима.

Смеси лизоцима и ДДСН ведут себя иначе (рис. 3). При добавлении ДДСН к раствору лизоцима наблюдается резкое снижение межфазного натяжения. Затем, по мере увеличения концентрации ПАВ, межфазное

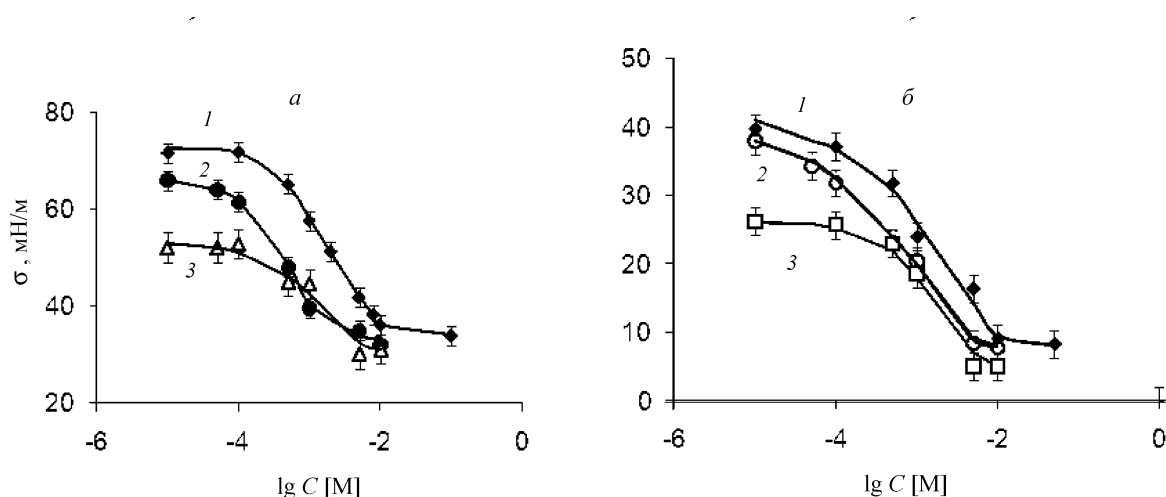


Рис. 2. Зависимость поверхностного натяжения на границе водный раствор/воздух (а) и водный раствор/октан (б) растворов смесей лизоцим – ДТАБ. Концентрация лизоцима в растворах 0 (1), $7,0 \cdot 10^{-9}$ (2), $7,0 \cdot 10^{-7}$ М (3)

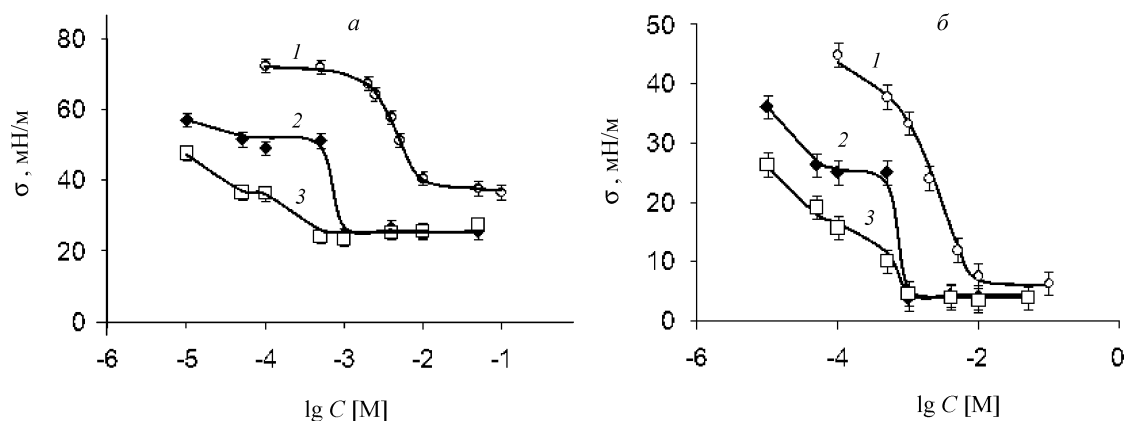


Рис. 3. Зависимость поверхностного натяжения на границе водный раствор/воздух (а) и водный раствор/октан (б) растворов смесей лизоцим – ДДСН. Концентрация лизоцима в растворах 0 (1), $7,0 \cdot 10^{-9}$ (2), $7,0 \cdot 10^{-7}$ М (3)

натяжение некоторое время сохраняет постоянное значение, после чего снова снижается до значений, меньших, чем межфазное натяжение чистого ДДСН. Минимальные значения межфазного натяжения устанавливаются при концентрациях ПАВ в растворе, много меньших критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Можно предположить, что вначале за счет взаимодействия между полярными группами анионного ПАВ и положительно заряженными группами белковой глобулы образуется ассоциат лизоцим-ДДСН, более поверхностно-активный по сравнению с нативным белком – при адсорбции этого ассоциата происходит начальное снижение поверхностного натяжения. Следующий за падением поверхностного натяжения участок с постоянным значением σ может возникнуть, если концентрация поверхностно-активных ионов в растворе поддерживается постоянной. По-видимому, в этой области концентраций происходит активное связывание ПАВ и белка в растворе как за счет электро-

статических, так и за счет гидрофобных взаимодействий. Авторы различных исследований получали плато на изотерме поверхностного натяжения и объясняли его возникновение связыванием белка с ПАВ [1, 11, 12]. Ассоциаты, образованные за счет гидрофобных взаимодействий, более растворимы в воде, чем нативный белок, и не адсорбируются на межфазной поверхности, оставаясь в растворе. Затем поверхностное натяжение снова уменьшается, что означает появление в растворе «свободных» молекул ПАВ, способных к адсорбции. В результате формируется смешанный адсорбционный слой, содержащий как ПАВ, так и гидрофобный ассоциат белок-ПАВ. Такой слой обеспечивает более низкое поверхностное натяжение, чем индивидуальное ПАВ, причем минимальное значение натяжения достигается при концентрациях ПАВ в растворе меньших ККМ.

Методом динамического светорассеяния установлено, что в растворе не возникают агрегаты большего

размера, чем глобула лизоцима. По-видимому, малая жесткая глобула лизоцима остается в нативной конформации даже при взаимодействии с ПАВ (по крайней мере, в изученной области концентраций). Этот результат согласуется с литературными данными [13, 14], согласно которым в системе лизоцим – ДДСН формируются комплекс, представляющий собой разбухшую мицеллу с белком, располагающимся вблизи оболочки мицеллы в нативной и частично развернутой формах; структура лизоцима при этом остается компактной.

Изучено влияние лизоцима на поверхностное натяжение водных растворов ДТАБ и ДДСН на границе с воздухом и октаном. Установлено, что в отсутствие сильного взаимодействия лизоцима с катионным ПАВ

происходит конкурентное вытеснение белка ПАВ из адсорбционных слоев. Наличие электростатического притяжения между лизоцимом и анионным ПАВ приводит к резкому изменению вида изотерм поверхностного и межфазного натяжения по сравнению с соответствующими изотермами для индивидуального ПАВ. В области малых концентраций ДДСН происходит заметное снижение поверхностного натяжения; при средних концентрациях на изотерме появляется плато, соответствующее интенсивному взаимодействию белка и ПАВ в объеме раствора. При более высоких концентрациях поверхностное натяжение снова снижается до постоянной величины, меньшей, чем для индивидуального ПАВ. Это постоянное значение достигается при концентрациях, меньших ККМ ДДСН.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 09-03-00819) и Федерального агентства по образованию (Государственный контракт № П2351).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Холмберг К., Йёнссон Б., Кронберг Б., Линдман Б. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах. М., 2007.
2. Anantapadmanabhan K.P. Protein-surfactant interactions // Interactions of surfactants with polymers and proteins / E.D. Goddard, K.P. Anantapadmanabhan. Ch.8. Boca Raton, FL, 1993.
3. Stenstam A., Topgaard D., Wennerstrom H. // J. Phys. Chem. B. 2003. **107**. P. 7987.
4. Moren A.K., Khan A. // Langmuir. 1995. **11**. P.3636.
5. Lu R-C., Xiao J-X., Lai L-H., Zhu B-Y., Zhao G-X. // Biochimica et biophysica acta (G). General subjects. 2005. **1722**. P.271.
6. Behbehani G.R., Saboury A.A., Taleshi E. // J. Molecular Recognition. 2008. **21**. P. 132.
7. Rosen M.J. Surfactants and Interfacial Phenomena. New Jersey, 2004.
8. Абрамзон А.А., Гаевой Г.М. Поверхностно-активные вещества: справочник. Л., 1979.
9. Tamoto Y., Segawa H., Shirota H. // Langmuir. 2005. **21**. P. 3757.
10. Filipovic-Vincekovic N., Bujan M., Juranovic I. // J. Dispersion Sci. and Technol. 1999. **20**. P. 1737.
11. Задьмова Н.М., Ямпольская Г.П., Филатова Л.Ю. // Коллоид. журн. 2006. **68**. С. 187.
12. Alahverdijeva V.S., Grigoriev D.O., Fainerman V.B., Aksenenko E.V., Miller R., Mohwald H. // J. Phys. Chem. **112**. P. 2136.
13. Vasilescu M., Angelescu D., Almgren M., Valstar A. // Langmuir. 1999. **15**. P. 2635.
14. Stenstam A., Montalvo G., Grillo I., Gradzielski M. // J. Phys. Chem. B. 2003. **107**. P. 12331.

Поступила в редакцию 20.01.10

SURFACE TENSION OF LYZOZYME MIXTURES WITH DODECYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE AND SODIUM DODECYL SULFATE AT THE WATER/AIR AND WATER /OCTANE INTERFACES

O.A. Soboleva, R.A. Ivanov

(Division of Colloid Chemistry)

Influence of the concentration and composition of lyzozyme/surfactant mixtures (cationic dodecyltrimethylammonium bromide and anionic sodium dodecylsulphate) on surface tension at water/air and water/octane interfaces were investigated. It was demonstrated that the shape of surface tension isotherm depends on the interactions between protein and surfactants.

Key words: surface tension, adsorption, surfactants, lyzozime.

Сведения об авторах: *Соболева Оксана Анатольевна* – доцент кафедры коллоидной химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (soboleva@colloid.chem.msu.ru); *Иванов Роман Александрович* – студент химического факультета МГУ.