

Софийски Университет “Св. Климент Охридски”

Факултет по Химия и Фармация

Катедра “Инженерна химия”

Румяна Добрева Станимирова

**Състав и реология на адсорбционни слоеве
от смеси на протеини и ПАВ върху
различни междуфазови граници**

Автореферат

на дисертация представена за присъждане на образователната и
научна степен “Доктор”

4.2. Химически науки (Теоретична химия)

Научни ръководители: чл.-кор. проф. дмн Красимир Данов
доц. д-р Кръстанка Маринова

Научен консултант: акад. проф. дфзн. Петър Кралчевски

София, 2014

Дисертационният труд съдържа 104 страници, 45 фигури, 31 уравнения, 8 таблици и 120 цитирани литературни източника.

Номерацията на частите, фигурите, уравненията и таблиците в автореферата съответства на тази от дисертацията.

Глава 1. Увод

Протеините и ниско молекулните повърхностно-активни вещества (ПАВ) намират широко приложение в хранителната, химическата и фармацевтична промишленост. Те се използват като естествени стабилизатори на различни продукти, представляващи хранителни дисперсии (Dickinson, 2001; McClements, 2005). В реалните системи практически винаги присъстват смеси от протеини и/или ПАВ. Затова и повърхностните свойства, и стабилизиращата способност на смеси от вещества са обект на научни изследвания от много автори, например: Sengupta and Damodaran, 2000, Mackie et al., 2001, Zhang et al., 2004 описват смеси на два протеина; Zhang et al., 2011a,b,c, Angarska et al., 2014, Gerasimova et al., 2013 изследват смеси на протеин с ниско молекулно ПАВ.

Голям интерес от научна гледна точка представлява както структурата, така и реологичното поведение на смесените адсорбционни слоеве. Реологичните свойства на повърхностите определят скоростта на изтичане на течност от пени и емулсии (Saint-Jalmes et al., 2005), стабилността в динамични условия (Denkov et al., 2009) и спрямо Оствалдовото зреене (Tcholakova et al., 2011; Danov et al., 2012). Важен въпрос е как структурата и взаимодействията между компонентите в адсорбционния слой влияят върху повърхностната реология и цялостната стабилизираща способност за различни дисперсии.

От икономическа и производствена гледна точка е изгодно смесването на малко количество от скъп компонент с по-голяма част евтина суровина. Важен и търсен ефект е сместа да проявява свойствата на скъпия и уникалния компонент, дори и той да е в малко количество. Затова ние смесваме различни по свойства, структура и пазарна цена вещества и изследваме поведението на адсорбционния слой при различни условия (паралелна или последователна адсорбция). Образуваме и наблюдаваме тънките течни филми, за да охарактеризираме стабилността им и взаимодействията, които възникват в тях.

Основна цел на дисертацията. *Да се изследват реологичните свойства на протеинови адсорбционни слоеве на междуфазова граница вода-въздух и в частност на смеси от два протеина или на смеси от протеин с ниско молекулно ПАВ. Да се изясни каква е структурата на смесените адсорбционни слоеве и как тази структура и взаимодействията на молекулите оказват влияние върху повърхностните реологични свойства.*

Една част от изследването ни (Глава 3) е насочена към охарактеризиране на реологичното поведение на адсорбционен слой получен при конкурентна и паралелна адсорбция на два различни по структура протеини (глобуларен и неструктуриран).

Свойствата на индивидуалните протеини са добре изучени (Engelhart et al., 2012; Yampolskaya and Platikanov, 2006; Harzallah et al., 1998), но за тяхната смес наличната информация в литературата е доста оскъдна.

Друга част (Глава 4) от дисертацията е посветена на реологичното поведение и свойствата на слоеве получени от смес на протеин и ниско молекулно ПАВ. Хидрофобинът от клас II (HFBI), който използваме е силно повърхностно активен, добър стабилизатор на пени и на емулсии (Cox et al., 2007; 2009; Blijdenstein et al., 2010; 2013; Burke et al., 2013; Reger et al., 2011a,b; 2012), при ниски концентрации образува повърхностни слоеве с висока еластичност (Cox et al., 2007; Alexandrov et al., 2012; Danov et al., 2012), потиска Оствалдовото зреене и коалесценцията, но като цяло е доста скъп продукт. Ето защо намирането на подходящи смеси, които да съдържат малка част хидрофобин, но да запазват уникалните свойства на хидрофобиновите адсорбционни слоеве, е важно за различните приложения (Blijdenstein et al., 2013).

Последната 5-та глава от дисертацията е посветена на връзката между високата повърхностна еластичност на HFBI на междуфазова граница и мезоскопската структура на слоя.

Структура на дисертацията

Дисертацията е структурирана както следва:

В Глава 2 са описани основните материали и експериментални методи.

В Глава 3 е представено експериментално изследване на смесени адсорбционни слоеве на двата протеина: неструктуриран β -casein и глобуларен BSA. На базата на получените резултати за повърхностно напрежение, модули на разширение, дебелина и стабилност на тънки филми, са представени модели за структурата на адсорбционните слоеве, които се получават при различни условия (паралелна или последователна адсорбция).

В Глава 4 е представено изследването на конкурентната адсорбция на HFBI и ниско молекулното ПАВ натриев додецил сулфат (SDS). Използвани са подходящи експериментални методи, за да се охарактеризира влиянието на концентрацията и на последователността на адсорбция върху повърхностните свойства. Проведени са и аналогични експерименти с тънки течни филми. Предложени са възможни модели за структурата на адсорбционните слоеве.

В Глава 5 е дадено експерименталното ни изследване на топологията на адсорбционен слой HFBI при различно двумерно повърхностно налягане. Резултатите и заключенията показват връзката между мезоскопската структура и уникалните свойства на повърхностния слой хидрофобин.

Основните резултати от всяка част на изследванията са описани след всяка глава, а основните приноси от проведените изследвания са сумирани в края на дисертацията.

Глава 2. Експериментални методи и използвани материали

2.1. Използвани материали

За провеждане на изследванията използвахме четири различни по структура и свойства протеини:

HFBI - изолиран от гъби от вида *Trichoderma reesei* с молекулната маса 7.2 kDa състоящ се от 70–100 аминокиселини. В молекулата се образуват 4 дисулфидни връзки, които държат полипептидната верига компактно свързана с форма на паралелепипед.

β -*casein* - с молекулна маса 24 kDa (извлечен от краве мляко, продукт на Sigma). Молекулата на β -*casein* е изградена от 209 аминокиселини, няма образувани дисулфидни връзки и изградена третична структура.

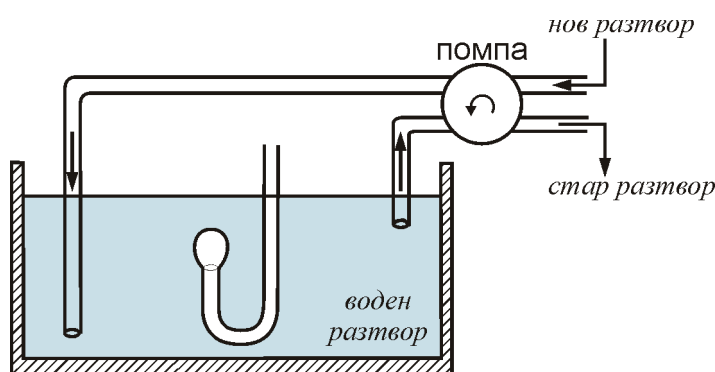
BSA - с молекулна маса 66 kDa (продукт на Sigma). *BSA* е глобуларен протеин, чиято молекула се състои от 580 аминокиселини и има ясно изразена третична структура стабилизирана от 17 дисулфидни връзки.

BLG (β -lactoglobulin) - с молекулна маса 18.4 kDa. Молекулата е изградена от 162 аминокиселини и съдържа 2 вътрешномолекулни дисулфидни връзки и една свободна тиолна група SH (McKenzie et al., 1972; Papiz et al., 1986).

Като нискомолекулно повърхностно-активно вещество използвахме анионното ПАВ натриев додецил сулфат (*SDS*). В повечето водни разтвори добавяхме неорганичен електролит NaCl (в концентрации 1 и 3 mM).

2.2. Експериментални методи

2.2.3. Паралелна и последователна адсорбция



Фигура 2.5. Скица на установката, конструирана за смяна на водната фаза заобикаляща мехурче, което е образувано на върха на извита капиляра. Кюветата с разтвора е монтирана на X–Y–Z масичката на апарата DSA 100R. Мехурчето се наблюдава в преминала светлина през цялото време на експеримента.

За да проверим дали протеините се адсорбират обратимо или необратимо на междуфазовата граница конструирахме клетка, подобна на тази, която са използвали Svitova et al., 2003. Тази клетка използвахме и при експерименти по последователна адсорбция. Клетката е показана схематично на Фигура 2.5. Разтворът на протеин (12–13 mL) е поставен в кювета с плоско-паралелни стени. На върха на извита капиляра, потопена в разтвора, образувахме деформирано мехурче. За подмяната на водния разтвор с нов използвахме две тръбички разположени в двата диагонални ъгъла на кюветата и двуканална перисталтична помпа (Cole Parmer Instrument Company, USA) свързана така, че вкарва нов и изсмуква стария разтвор от кюветата с един и същ дебит. За всяка смяна на разтвора помпата работеше една минута при скорост на потока от 150 mL/min. По този начин сменяхме първоначалния обем на разтвора 12 пъти. Процесът на смяна на водната фаза наричаме промиване, когато е с вода, или смяна на фазите (PhE, phase exchange), когато е със съответен разтвор.

Така конструираната клетка се монтираше на апарат DSA 100R (Част 2.2.1), съоръжен с модул за осцилации (Част 2.2.2). С помощта на софтуер DSA 1 определяхме повърхностните и реологичните параметри на адсорбционния слой.

2.2.4. Експериментални методи с тънки течни филми

Капилярна клетка на Шелудко-Ексерова: Експерименталният метод, който използвахме за охарактеризиране на тънките течни филми, е оптично наблюдение на филма с помощта на капилярна клетка на Шелудко-Ексерова (Scheludko, 1967). Наблюдението се извършва в отразена монохроматична светлина с дължина на вълната $\lambda = 546$ nm. Използвахме клетката в два работни режима: „отворена клетка” и „затворена клетка” за да наблюдаваме филмите съответно при високо ($\sim 5 \times 10^5$ Pa) и при ниско (~ 100 Pa) налягане.

Модифицирана клетка на Шелудко-Ексерова за последователна адсорбция на две междуфазови граници (“Flush cell”): Тази клетка за филми има две странични капиляри и по този начин може да се изследват свойствата на филми при последователна адсорбция на компонентите (Wierenga et al., 2009; Vasheva et al. 2011,a,b). С клетката също може да се работи в режим на „затворена клетка” и „отворена клетка”, т.е. при ниско налягане и при високо приложено налягане.

2.2.6. Процедура за приготвяна на проби за AFM

Използвахме наблюдения с атомносилов микроскоп (AFM) за изследване на адсорбционните слоеве от HFBI на междуфазова граница вода-въздух. Снимките бяха направени с апарат модел Nano Scope Multi Mode V (Bruker Inc., Germany) в Лабораторията по AFM на ФХФ. Слоевете пренасяхме върху гладка слюдена повърхност с помощта на специално адаптирана процедура. Хидрофобизирана

предварително слюда докосвахме отгоре (през въздуха) до разтечен слой HFBIІ върху вода по метода на Лангмюр-Шефер описан в статията на Houmadi et al., 2012.

Използвахме слюдени подложки с размери 1×1 cm хидрофобизирани с пари от хексаметил дисилазан (HMDS). При докосване на пластинката с повърхността спираме потапянето и изчакваме 5 минути за прехвърляне на слоя върху слюдената подложка. С помощта на бариерите поддържахме едно и също повърхностно налягане. Взетата проба за наблюдения с атомно силов микроскоп се изсушава на стайна температура.

Глава 3. Адсорбционни слоеве от смеси на β -casein и BSA

Тази глава от дисертацията е посветена на експерименталното изследване на адсорбционни слоеве от два протеина – глобуларен BSA и неструктуриран β -casein. И двата протеина са от животински произход и се срещат в храните. Молекулата на BSA е 2.8 пъти по-голяма от тази на β -casein по маса и има добре изградена третична структура стабилизирана от 17 дисулфидни връзки. За разлика от нея молекулата на β -casein е неопределена, няма дисулфидни връзки и третична структура и се състои от малка хидрофилна част ($\approx 20\%$) и голяма хидрофобна част ($\approx 80\%$). По тази причина β -casein е слабо разтворим във вода и образува мицели в обема (Portnaya, 2006).

Основна цел: *Да се получи информация за структурата и повърхностната реология на смесени адсорбционни слоеве от β -casein и BSA, както и за стабилността на съответните пенни филми, чрез анализ на експериментални данни от различни методи.*

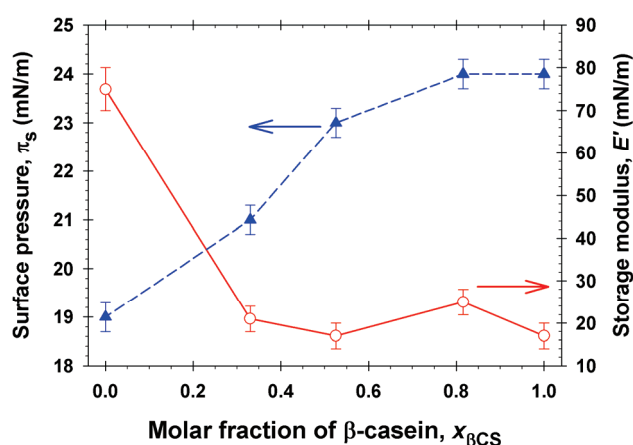
За постигане на поставената цел проведохме следните експерименти: (1) Измерихме повърхностно напрежение посредством метода на деформираното мехурче. Състава на разтворите контролирахме като използвахме конструирана от нас клетка за паралелна и последователна адсорбция. (2) Определихме повърхностните модули на разширение посредством метода на осцилиращо деформирано мехурче. (3) Изследвахме стабилността и дебелината на тънките течни филми в капилярна клетка на Шелудко–Ексерова и на тези получени при паралелната и последователната адсорбция на двата протеина.

3.1. Охарактеризиране на адсорбционни слоеве от протеин

3.1.1. Повърхностно напрежение и реология на разширение

Измерихме повърхностното напрежение на серия смесени разтвори на BSA и β -casein използвайки метода на деформираното мехурче. Определените равновесните

повърхностни напрежения за разтвор на 6.7 μM (0.016 wt%) β -casein $\sigma_{\text{eq}} = 48 \text{ mN/m}$ и за 1.5 μM BSA (0.01 wt%) $\sigma_{\text{eq}} = 53 \text{ mN/m}$ са в съгласие с литературните данни (Maldonado-Valderrama et al., 2008b; Yampolskaya and Platikanov, 2006; Cascão-Pereira et al., 2003a). На Фигура 3.2 е представено повърхностно налягане, $\pi_s = \sigma_0 - \sigma_{\text{eq}}$, като функция от моларното отношение на β -casein, $x_{\beta\text{CS}}$, в разтворите. От графиката се вижда, че повърхностното налягане постепенно нараства с увеличаване на моларното отношение на β -casein от 0 до 1. Това може да се обясни с добре известния факт от литературата, че β -casein е по-повърхностно активен от колкото BSA (Graham and Phillips, 1979).



Фигура 3.2. Измереното равновесно повърхностно налягане, $\pi_s = \sigma_0 - \sigma_{\text{eq}}$, и повърхностните еластични модули, E' , като функция от молната част на β -casein, $x_{\beta\text{CS}}$, в смесените разтвори с BSA.

За да охарактеризираме реологичното поведение на адсорбционните слоеве, проведохме експерименти с осцилации на площта на мехурчетата. Измерените еластични модули на разширение са нанесени на Фигура 3.2. Определените стойности $E' = 76 \text{ mN/m}$ за BSA при повърхностно налягане от 19 mN/m и $E' = 15 \text{ mN/m}$ за β -casein при повърхностно налягане от 24 mN/m са в отлично съгласие с литературните данни (Cascão-Pereira et al., 2003a; Maldonado-Valderrama et al., 2008b). Модулите на еластичност за всички смесени разтвори са близки до стойността за β -casein. Следователно β -casein определя повърхностната еластичност на тези адсорбционни слоеве.

Проведохме експерименти за последователна и паралелна адсорбция на двата протеина за да проверим как последователността на адсорбция влияе върху повърхностното напрежение и реологичното поведение.

В случай на последователна адсорбция следвахме следния протокол. (i) Образувахме мехурче в първия разтвор, изчакахме 10 мин за адсорбция на протеиновите молекули на междуфазовата граница и посредством осцилации определихме повърхностните модули на разширение. (ii) След това сменихме водната фаза с другия протеинов разтвор или с вода. (iii) Изчакахме до уравнивяване на

повърхностното напрежение и отново посредством осцилации определихме повърхностните модули.

За да се провери дали протеините, които се използват са адсорбирани необратимо или обратимо на повърхността, проведохме измерения и при смяна на протеиновия разтвор с вода. Резултатите, получени от всички проведени експерименти, са систематизирани в Таблица 3.2.

Таблица 3.2. Повърхностно напрежение, σ , и модули на разширение, E' и E'' , измерени с деформирано мехурче при честота на осцилациите 0.5 Hz.

No.	Протеинови разтвори и смяна на водните фази (PhE)	σ (mN/m)	E' (mN/m)	E'' (mN/m)
1	BSA (1.5 μ M)	55	76	11
2	BSA (1.5 μ M) след PhE с вода	54	74	15
3	BSA (1.5 μ M) след PhE с β -casein (6.7 μ M)	48.5	42	17
4	β -casein (6.7 μ M)	48.5	15	7
5	β -casein (6.7 μ M) след PhE с вода	48.5	13	5
6	β -casein (6.7 μ M) след PhE с BSA (1.5 μ M)	50	33	13
7	BSA (1.2 μ M) + β -casein (1.3 μ M)	51	16	8
8	BSA (1.4 μ M) + β -casein (0.7 μ M)	52	21	10

Измерените стойности на повърхностното напрежение, σ , и модулите E' и E'' остават практически еднакви (ред 1 и 2 в Таблица 3.2) преди и след смяната на разтвора на 1.5 μ M BSA с вода. Това показва, че адсорбцията на BSA на междуфазовата граница вода-въздух е необратима. Този резултат е в съгласие с изводите, които са направили Svitova et al., 2003. Проведохме аналогични измервания и с разтвори съдържащи само β -casein, които също не показаха десорбция на β -casein в резултат на промиването (ред 4 и 5 в Таблица 3.2). Нашите резултати потвърдиха заключенията и на други автори (MacRitchie, 1998 и Fainerman et al., 2006), че двата протеина се адсорбират необратимо на междуфазовата граница.

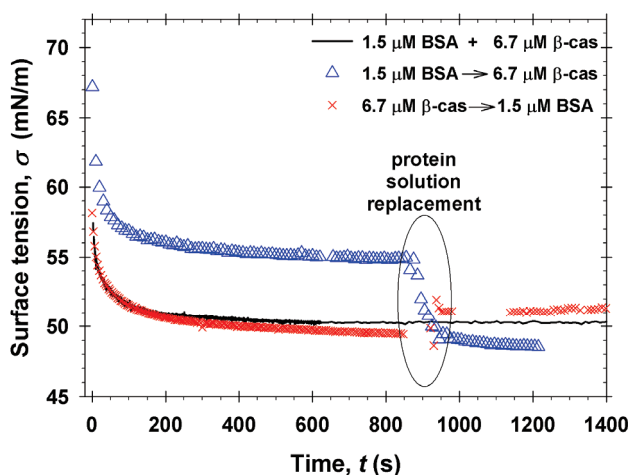
В Таблица 3.2 са сумирани и резултатите от два експеримента на последователна адсорбция. В единия образувахме мехурчето в разтвор на BSA, след което сменихме обемната фаза с разтвор на β -casein. Повърхностното напрежение се понижава от 55 mN/m за чист разтвор на BSA до 48.5 mN/m след сменянето на разтвора. Стойностите, които се получават за σ след смяна на обемните фази, са сравними с тези за адсорбционен слой изграден само от молекули на β -casein. От друга страна, високият модул на еластичност $E' = 42$ mN/m (около 2 пъти по-висок от този за индивидуално

адсорбиран β -casein) показва присъствието на молекули BSA в адсорбционния слой след замяна на разтвора.

Аналогичен експеримент проведохме и в обратен ред: първо образуваме мехурчето в разтвор на β -casein, след което сменихме водната фаза с разтвор на BSA. След извършване на смяната на единия протеинов разтвор с другия, измерените стойности за σ и E' са между тези за индивидуално адсорбирани BSA и β -casein. Това показва наличието и на двата протеина на повърхността на мехурчето.

Последните два реда от Таблица 3.2 съдържат данните от експерименти с паралелна (едновременна) адсорбция на двата протеина от смесен разтвор на BSA и β -casein. В този случай повърхностното напрежение е със стойност средна между тази на индивидуалните протеини. Що се отнася до стойностите на еластичния модул, E' , те са близки до тези, които измерихме за адсорбционен слой изграден само от молекули β -casein. От тези експериментални данни можем да направим извод, че при паралелна адсорбция молекулите и на двата протеина се адсорбират на междупазовата граница вода-въздух, но наличието на β -casein определя реологичното поведение на адсорбционния слой.

Кинетиката на повърхностното напрежение, $\sigma(t)$, в експериментите за последователна и паралелна адсорбция на BSA и β -casein е илюстрирана на Фигура 3.3. На графиката са показани типични криви за различните случаи. Сините триъгълници показват $\sigma(t)$ от експеримент по последователна адсорбция от разтвор на $1.5 \mu\text{M}$ BSA, заменен с разтвор на $6.7 \mu\text{M}$ β -casein. Червените кръстчета показват $\sigma(t)$ при първоначална адсорбция от $6.7 \mu\text{M}$ β -casein, заменен с $1.5 \mu\text{M}$ BSA. Кривата с черен цвят на графиката показва повърхностното напрежение при паралелна адсорбция на двата протеина от смесен разтвор на $1.5 \mu\text{M}$ BSA + $6.7 \mu\text{M}$ β -casein.



Фигура 3.3. Повърхностното напрежение като функция от времето за паралелна и последователна адсорбция от разтвори на BSA и β -casein. При експериментите по последователна адсорбция, около 900 секунди след образуване на мехурчето разтворът на първия протеин е заменен с разтвор на втория протеин.

От графиката ясно се вижда, че при промиване на изграден адсорбционен слой от BSA с β -casein повърхностното напрежение спада до стойностите на σ характерни за

чист β -casein. В обратния случай, когато имаме адсорбционен слой от β -casein промит с разтвор на BSA, повърхностното напрежение слабо се покачва и достига някаква средна стойност, но не и високите стойности характерни за адсорбционен слой изграден само от BSA. Следователно, и при последователна, и при паралелна адсорбция се образува смесен адсорбционен слой от двата протеина (Таблица 3.2 и Фигура 3.3).

3.1.2. Дебелина и стабилност на тънки течни филми

За да получим по-детайлна информация за структурата на смесените слоеве и за взаимодействията в тях ние проведохме експерименти с тънки течни филми (два взаимодействащи си адсорбционни слоя). Всички филми в режим „затворена клетка” имаха радиус около 100 μm , който се поддържа с контрол на приложеното налягане, P_c . Дебелината на филмите, h , се измерваше интерферометрично и беше по-голяма от 100 nm за всички изследвани разтвори. За частично екраниране на електростатичното отблъскване при изследваните пенни филми добавяхме 1 mM NaCl към всички разтвори. В резултат на това дебелината на филмите намаля от 100 nm (без NaCl) до около 80 nm за филмите с β -casein и до около 41 nm за филмите с BSA.

Таблица 3.3. Дебелина, h , и стабилност на пенни филми образувани от разтвори на BSA и β -casein, съдържащи 1 mM NaCl.

No.	Разтвор	h (nm) в затворена клетка ($P_c \approx 85$ Pa)	h (nm) в отворена клетка ($P_c \approx 5 \times 10^5$ Pa)
1	1.5 μM BSA	41	18 (нестабилен филм)
2	6.7 μM β -casein	87	12 (стабилен филм)
3	1.2 μM BSA + 1.3 μM β -casein	78	12 (стабилен филм)
4	1.5 μM BSA след PhE с 6.7 μM β -casein	79	13 (стабилен филм)
5	6.7 μM β -casein след PhE с 1.5 μM BSA	79	≥ 18 (нестабилен филм)

Резултатите получени при режим със затворена клетка са дадени в Таблица 3.3. По-малката дебелина на филмите стабилизирани с BSA е доказателство за по-малка плътност на повърхностния заряд на молекулите. Дебаевата дължина е $\kappa^{-1} = 9.6$ nm за всички изследвани протеинови разтвори с 1 mM NaCl.

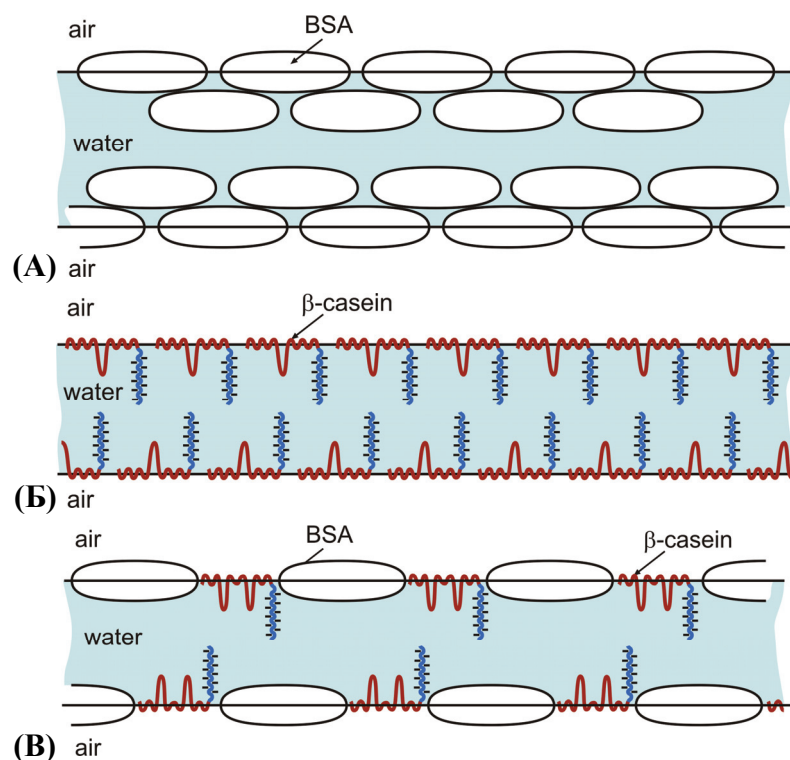
При работа с отворена клетка налягането е от порядъка на $P_c \approx 5 \times 10^5$ Pa. Такова високо налягане преодолява електростатичното отблъскване и двата адсорбционни слоя от протеин влизат в контакт, т.е. филмите се стабилизират от стерично отблъскване. Това се доказва от появата на черни петна. Петната имат еквивалентна водна дебелина 18 nm за филми от 1.5 μ M BSA и от β -casein сменен с BSA, но филмите са нестабилни и се късат бързо след появата на петна. Петната във филмите от β -casein и от BSA сменен с β -casein имаха по-малка дебелина, $h = 12-13$ nm, и филмите останаха стабилни въпреки разширяването им.

3.2. Обсъждане на получените резултати за структурата на адсорбционния слой и възникналите взаимодействия в него

3.2.1. Адсорбционен слой от BSA

Формата на молекулата на BSA е много близка до тази на издължен елипсоид с дължина 14 nm и напречно сечение 4 nm (Wright and Thompson, 1975; Peters, 1985). Молекулата на BSA има хидрофобни остатъци и острови, които играят ролята на адхезионни центрове на междуфазова граница вода-въздух и вода-масло, както и за взаимодействието между протеиновата молекула и молекули на повърхностно активни вещества (Díaz et al., 2003; Zhang et al., 2011). В близост до изоелектричната точка молекулите на BSA се адсорбират като образуват бислой (Engelhardt et al., 2012). Еквивалентната водна дебелина на черните петна образувани в течните филми от BSA е $h = 18$ nm (Фигура 3.4Б и Таблица 3.3), което отговаря на реална дебелина на филма $18 \times 1.33 / 1.45 \approx 16$ nm, където $n = 1.45$ е типичната стойност за коефициента на пречупване на протеина, а $n = 1.33$ е коефициента на пречупване на водата (Russev et al., 2000). На Фигура 3.5А е показана схема на пенен филм от BSA адсорбиран като бислой. Дебелина от 16 nm отговаря на бислой в контакт (както е показано на Фигура 3.5А): 4 слоя \times 4 nm = 16 nm. Добавянето на 1 mM NaCl към разтворите на BSA води до образуване на нестабилни филми, които при приложени високи налягания се късат. Следователно, двата вътрешни слоя от BSA (Фигура 3.5А) са свързани със слаби връзки и могат да бъдат изтласкани от филма при високо налягане. Образуването на слабо свързан подповърхностен слой е наблюдавано също и при високите концентрации на β -casein (Grigoriev et al., 2002).

Сравнително високите стойности на еластичния модул, E' , за адсорбционен слой от BSA могат да бъдат приписани на сравнително здраво опаковани полипептидни вериги в молекулата на BSA. С други думи, еластичността на разширение на адсорбционния слой от BSA (Фигура 3.5А) се дължи на еластичния отговор на сравнително здраво свързаната молекула на BSA, когато слой е подложен на свиване и разширение.



Фигура 3.5. Модели на пенни филми от разтвори на (А) BSA, (Б) β -casein и (В) на тяхна смес в случай на паралелна адсорбция конструиран на основата на данни за σ , E' , и h (Таблицы 3.2, 3.3 и Фигури 3.1–3.4).

3.2.2. Адсорбционен слой от β -casein

Молекулата на β -casein се състои от къса хидрофилна част ($\approx 20\%$) и по-дълга хидрофобна част ($\approx 80\%$). Хидрофилната част има 21 отрицателни заряда и 5 положителни, така че сумарно остават 16 некомпенсирани отрицателни заряда (Farrell et al., 2001). Ако дължината на един аминокиселинен остатък е 0.3 nm (Horne, 2006), то дължината на хидрофилната част от веригата на β -casein в най-разтегнато положение е 13 nm. Обаче във водна среда хидрофилната част от молекулата добива вълнообразна форма и разстоянието от край до край е около 2 пъти по-късо ($\approx 6\text{--}7$ nm).

Експерименталната дебелина на тънките течни филми с β -casein, $h = 12$ nm, може да бъде обяснена със сили на стерично отблъскване между опашките, които се дължат на хидрофилната част от молекулите на β -casein (Фигура 3.5Б). 80% от звената в молекулата на β -casein са много хидрофобни. Водата е слаб разтворител за такава верига и поради тази причина молекулите на β -casein образуват мицели в обема с приблизителен диаметър 13 nm (Portnaya, 2006). При адсорбция на междуфазова граница вода-въздух хидрофобната част от молекулата е склонна да образува примки и да се нагъва на повърхността, докато заредената хидрофилна част се ориентира във водната фаза (Graham and Phillips, 1979) Фигура 3.5Б. Сравнително ниските стойности на еластичния модул E' (Експерименти 4 и 5 в Таблица 3.3) могат да се обяснят с това,

че при деформация на слоя промяната в конформацията на молекулата е сравнително малка.

3.2.3. Паралелна адсорбция на BSA и β -casein

На базата на получените резултати за дебелината на пенните филми, σ , E' и E'' , можем да направим следното заключение: когато образуваме тънък течен филм в смесен разтвор молекулите и на двата протеина β -casein и BSA се адсорбират на междуфазовата граница вода-въздух, както е представено на Фигура 3.5B. Тази структура може да обясни средните стойности на повърхностното напрежение, които получаваме при паралелна адсорбция на двата протеина. Освен това, повърхностните свивания и разширявания ще доведат до деформация на адсорбираните гъвкави полипептидни вериги на β -casein, докато големите молекули на BSA ще останат не достатъчно деформирани. Това обяснява защо стойностите на E' , получени при паралелна адсорбция, са близки до тези на еластичността на адсорбционен слой от β -casein. Измерената дебелина на тънките течни филми може да се обясни със сили на отблъскване от стерично взаимодействащите си хидрофилни части от молекулата на β -casein (сравни Фигури 3.5B и 3.5B).

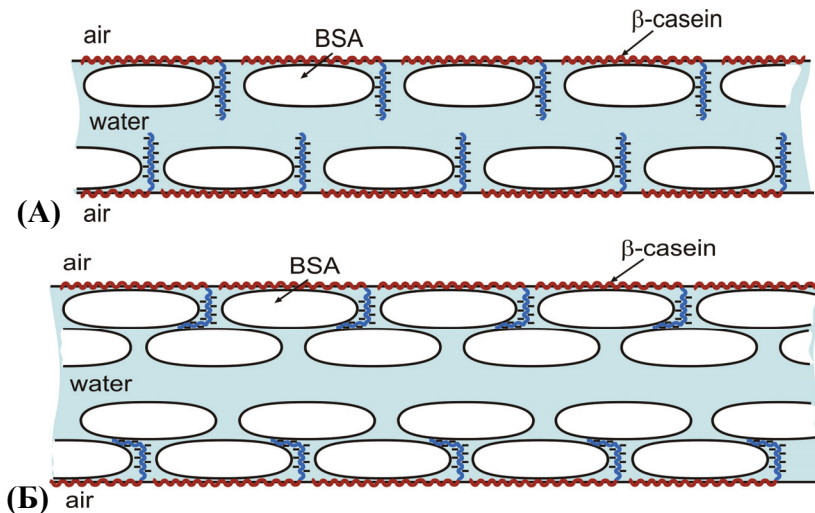
3.2.4. Последователна адсорбция на BSA и β -casein

При последователната адсорбция се оказва важно, кой от двата протеина е адсорбиран първи на междуфазовата граница вода-въздух.

Ако първо е адсорбиран BSA и след това β -casein, то повърхностното напрежение намалява от стойностите характерни за BSA до тези отговарящи на адсорбционен слой от β -casein. Що се отнася обаче за получените стойности за еластичния модул – те са много по-високи от тези отговарящи на адсорбционен слой изграден само от β -casein. От друга страна при високи налягания филмите са стабилни и имат дебелина 13 nm, която е почти същата както тази на течни филми образувани от разтвор само на β -casein (Експерименти 2 и 4 в Таблица 3.3).

За да обясним всички експериментални резултати, конструирахме модел на структурата на адсорбционните слоеве в тънък филм, както е показан на Фигура 3.6A. След смяната на водната фаза молекулите на β -casein проникват между молекулите на адсорбирания вече BSA. Хидрофобните части от молекулата на β -casein се адсорбират и заемат изцяло междуфазовата граница вода-въздух. Това може да обясни стойностите на повърхностното напрежение след извършване на смяната на обемната фаза. Молекулите на BSA от своя страна се прикрепват към хидрофобните участъци на проникналите полипептидни вериги на молекулата на β -casein (Фигура 3.6A). Вторият слой молекули на BSA, които са слабо свързани в бислои (Фигура 3.5A), се откъсват от адсорбционния слой след промиването с разтвора на β -casein. Присъствието на

молекули BSA в адсорбционния слой може да обясни измерените високи еластични модули в сравнение с тези на β -casein. Измерената дебелина на тънките течни филми, $h = 13$ nm, може отново да бъде обяснена със стерично отблъскване между хидрофилните вериги в молекулата на β -casein. Напречното сечение на молекулите на BSA е само 4 nm и те не оказват влияние върху дебелината на филма (Фигури 3.5B и 3.6A).



Фигура 3.6. Структурни модели на пенни филми от BSA и β -casein в случай на последователна адсорбция на междуфазова граница вода-въздух. (А) Първоначално адсорбиран BSA; β -casein е адсорбиран втори, прониква между молекулите на изградения адсорбционен слой от BSA и хидрофобната част от молекулата му се адсорбира на междуфазовата граница. (Б) β -casein е адсорбиран първи на междуфазовата граница; BSA се адсорбира втори и образува бислой върху хидрофобната част от молекулата на β -casein.

При първоначално адсорбиран β -casein и смяна на разтвора с BSA повърхностното напрежение слабо се повишава, а стойностите на еластичността са средни спрямо тези за индивидуалните протеини (Фигура 3.3 и Експеримент 6 в Таблица 3.2). В допълнение, при високо налягане измерената дебелина на филмите, $h = 18$ nm, е близка до тази на филми стабилизирани с BSA. Филмите са нестабилни и бързо се късат след образуването им (сравни Експерименти 1 и 5 от Таблица 3.3).

Резултатите от тези експерименти могат да бъдат обяснени с модела на адсорбционния слой даден на Фигура 3.6Б. След смяната на водния разтвор адсорбционният слой на β -casein е в контакт с разтвор на BSA. Молекулите на BSA се адсорбират върху хидрофобните вериги на β -casein, след което образуват втори слой от молекули на BSA както на Фигура 3.5А. Относно дебелината на пенните филми, бислойът от BSA (≈ 8 nm) е по-дебел от нагънатата хидрофилна част от молекулата на β -casein (≈ 6 nm) и хидрофилните части се внедряват в адсорбционния слой от BSA (Фигура 3.6Б). В следствие на това отсъстват силите на стерично отблъскване. Повърхностите на тънките течни филми имат поведение като на адсорбционни слоеве

само от BSA и това обяснява бързото късане на филма при прилагане на високо налягане (Фигура 3.5A).

3.3 Основни резултати и заключения

Комбинирахме измерване на повърхностно напрежение и повърхностната реология на разширение с изследване поведението на тънките течни филми, за да получим информация за свойствата и структурата на смесените адсорбционни слоеве от BSA и β -casein и за стабилността на съответните тънки течни филми. Нашите експерименти потвърдиха, че в изследвания концентрационен диапазон адсорбционните слоеве от β -casein имат по-ниско повърхностно напрежение и еластичност на разширение в сравнение с тези от BSA. При ниско приложено налягане (< 100 Pa) пенните филми от водни разтвори и на двата протеина са дебели и електростатично стабилизирани. При високо налягане ($\sim 5 \times 10^5$ Pa) филмите от β -casein са стабилни, а тези от BSA са нестабилни и се късат.

Проведените експерименти по паралелна и последователна адсорбция за смеси на двата протеина показаха, че свойствата на адсорбционните слоеве и стабилността на пенните филми зависят от реда на адсорбция на междуфазовата граница. Анализът на всички получени данни ни позволява да направим предположения за възможни структури на адсорбционните слоеве. Когато и двата протеина са в обема на разтвора и се адсорбират едновременно (паралелна адсорбция), молекулите на β -casein са разположени между тези на BSA на границата (виж Фигура 3.5B). Това води до понижаване на повърхностното напрежение и еластичността на образувания смесен слой. В случай на последователна адсорбция, ситуацията е различна и зависи от реда на адсорбция. Ако първо е адсорбиран β -casein, поведението на филма се определя от молекулите на BSA. Филмът е нестабилен при прилагане на високо налягане. В обратния случай, когато първи се адсорбира BSA, повърхностната еластичност е висока, но повърхностното напрежение е сравнително ниско и пенните филмите са стабилни като тези от β -casein.

Глава 4. Конкуrentна адсорбция на хидрофобин (HFBI) и натриев додецил сулфат (SDS)

В Глава 4 от дисертацията е представено експерименталното изследване на конкурентната адсорбция на хидрофобин (HFBI) и натриев додецил сулфат (SDS).

Основна цел: *Да се изследва кинетиката на адсорбция от смесени разтвори на HFBI и SDS. Да се изследва конкурентната адсорбция на двата компонента при паралелна (едновременна) и последователна адсорбция. Да се определи ефектът на*

SDS върху повърхностната реология на разширение на адсорбционни слоеве съдържащи хидрофобин.

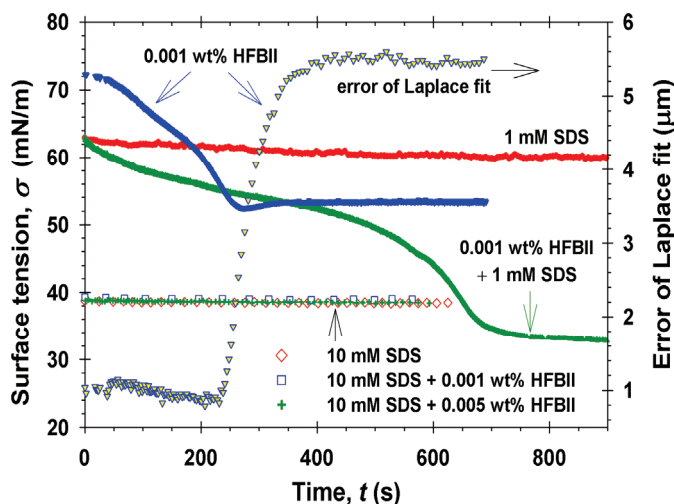
За постигане на поставените цели проведохме и анализирахме различни експерименти. За измерване на повърхностното напрежение използвахме метода на деформираното мехурче. Приложихме осцилации за определяне на повърхностните модули на разширение. Използвахме клетката за смяна на обемните фази (Фигура 2.5). Експериментите са провеждани в две направления, паралелна и последователна адсорбция на компонентите с метода описан в Част 2.2.3. От друга страна проверихме какво е поведението на адсорбционния слой при концентрации под и над ККМ за анионното ПАВ. За потвърждаване на заключенията, направени от експериментите с промиване на мехурчета, направихме експерименти и с тънки течни филми.

4.1. Кинетика на паралелна адсорбция на HFBI и SDS

4.1.1. Експериментални резултати

Фигура 4.1А показва релаксацията на повърхностното напрежение като функция от времето за различни разтвори. За разтворите на HFBI грешката при интерполирането на профила на мехурчето с уравнението на Лаплас рязко нараства, когато повърхностното напрежение спадне до $\sigma \approx 53$ mN/m. Това е индикация за втвърдяване на адсорбционния слой на повърхността на мехурчето (Alexandrov et al., 2012). Такова втвърдяване не се наблюдава, когато разтворът на HFBI съдържа SDS.

В случай на втвърден адсорбционен слой отклонението от формата на Лаплас се дължи на това, че повърхностното напрежение е неравномерно разпределено във всяка една точка и е неизотропно – стойностите измерени в две перпендикулярни посоки са различни. Следователно повърхностното напрежение е тензорна величина (Petkov et al., 2000; Danov et al., 2010). В тази глава всички данни за повърхностно напрежение са получени за изотропни адсорбционни слоеве, за които грешката при обработката на формата на мехурчето с уравнението на Лаплас е малка.



(A)

Фигура 4.1. (А) Повърхностното напрежение като функция от времето за разтвори на 0.001 wt% HFBII, 1 mM SDS, тяхната смес, и за разтвори съдържащи 10 mM SDS + 0.001 и 0.005 wt% HFBII. В разтвора, съдържащ само 0.001 wt% HFBII адсорбционният слой се втвърдява и грешката от интерполацията с уравнението на Лаплас – нараства.

Повърхностното напрежение за смесения разтвор на 0.001 wt% HFBII и 1 mM SDS започва от стойността характерна за чист SDS в началото на измерването, но с течение на времето постепенно намалява и достига до равновесна стойност от около 33 mN/m след 800 s. Понижаването на повърхностното напрежение може да бъде обяснено със сравнително бавната адсорбция на молекулите на хидрофобин и образуването на смесен адсорбционен слой с вече адсорбираната на повърхността SDS.

За разтворите на 10 mM SDS с 0.001 или с 0.005 wt% HFBII кинетиката на адсорбция е напълно различна – виж хоризонталните криви съответстващи на $\sigma \approx 38.6$ mN/m на Фигура 4.1A. Разтворът на 10 mM SDS е над ККМ и в този случай хидрофобинът в разтвора не влияе на стойностите на повърхностното напрежение. Най-вероятно протеинът образува смесени агрегати с SDS в обема, които не се адсорбират на междуфазовата граница вода-въздух. Zhang et al. (2011) също са показали, че за разтвори на HFBII и SDS над ККМ, SDS преобладава в адсорбционния слой, а в обема се образуват смесени агрегати.

Проведохме осцилационни експерименти и определихме повърхностните еластични и вискозни модули на разширение, E' и E'' , които са показани в Таблица 4.1.

Експеримент 1 в Таблица 4.1 съответства на осцилации с период 2 s приложено при равновесно повърхностно напрежение $\sigma = 60$ mN/m за разтвор на 1 mM SDS + 3 mM NaCl. Получените стойности за $E' = 2.7$ mN/m и $E'' = 1.2$ mN/m са сравнително ниски и типични за конвенционални водно разтворими ПАВ. Експеримент 2 в Таблица 4.1 отговаря на началния етап от кинетиката за разтвор на 0.001 wt% HFBII при високо повърхностно напрежение, $\sigma = 70$ mN/m. Измереният висок еластичен модул, $E' =$

143.2 mN/m, показва наличието на значително количество HFBII на междуфазовата граница дори и при такива високи стойности на σ .

Таблица 4.1. Повърхностни модули на разширение E' и E'' , измерени чрез прилагане на осцилации на площта на мехурчето с период 2 s, при различни повърхностни напрежения σ и повърхностни налягания π_s за разтвори показани на Фигура 4.1А.

Ред No.	Система	σ , N/m	π_s , mN/m	E' , mN/m	E'' , mN/m
1	1 mM SDS + 3 mM NaCl	60	22	2.7	1.2
2	0.001 wt% HFBII	70	2	143.2	5.0
3	0.001 wt% HFBII + 1 mM SDS + 3 mM NaCl	51	21	35.7	5.0
4		35	38	155.6	0
5	0.001 wt% HFBII + 10 mM SDS + 3 mM NaCl	38	34	0	0.4

Редове 3 и 4 съответстват на два последователни етапа в кинетичната крива на разтвора, съдържащ 0.001 wt% HFBII + 1 mM SDS. Както се вижда от Фигура 4.1А, повърхностното напрежение на този разтвор спада от 51 до 33 mN/m, което е придружено с повишаването на повърхностния еластичен модул от 35.7 до 155.6 mN/m. Това е доказателство за повишената адсорбция на HFBII с времето. Този резултат потвърждава, че в смесени разтвори на HFBII и SDS, когато концентрацията на SDS е под ККМ, молекулите на хидрофобин могат да се адсорбират на междуфазовата граница, и вероятно частично да изместят адсорбираните се вече молекули ПАВ на повърхността.

На Ред 5 в Таблица 4.1 са представени данните за повърхностните модули на разширение определени в разтвор на 0.001 wt% HFBII + 10 mM SDS. Измерените нулеви стойности на E' и E'' потвърждават, че адсорбционният слой най-вероятно не съдържа протеин, което може да се дължи на образуване на смесени агрегати от HFBII и SDS в обема.

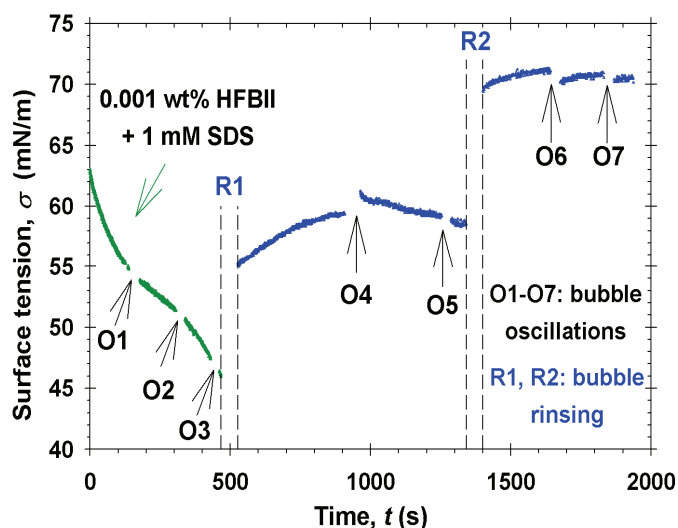
4.2. Паралелна адсорбция със смяна на фазите

4.2.1. Експерименти с осцилиращи мехурчета

При паралелна адсорбция на SDS и HFBII след известно изчакване за достигане на равновесие и определяне на повърхностните модули, водният разтвор на HFBII и SDS е заменен с вода съдържаща само 3 mM NaCl. Промиването на мехурчето с вода цели да се провери дали адсорбираните молекули на междуфазовата граница ще се десорбират.

Протоколът за провеждане на експериментите с промиване е както следва. (i) Мехурчето се образува в дадения разтвор и се изчаква известно време за адсорбция на повърхностно активните компоненти като в няколко различни момента са правени експерименти с осцилации, за да се определят повърхностните модули на разширение E' и E'' . (ii) Водният разтвор е заменен с вода съдържаща само 3 mM NaCl отбелязано като R1 и R2 на графиките, и отново са проведени осцилации означени като O4–O8.

Фигура 4.2 показва експеримента с паралелна адсорбция от разтвор на 0.001 wt% HFBII + 1 mM SDS + 3 mM NaCl. Както и в предходната част, кинетиката на σ на този разтвор започва от стойности на повърхностното напрежение характерни за SDS, но те намаляват с течение на времето поради адсорбцията на HFBII. С намаляване на повърхностното напрежение еластичността, която измерихме в участъците O1, O2 и O3, нараства (виж Таблица 4.2), което отново е индикация за нарастване на количеството HFBII в адсорбционния слой.



Фигура 4.2. Промяна на повърхностното напрежение при паралелна адсорбция от разтвор на 0.001 wt% HFBII + 1 mM SDS + 3 mM NaCl и двукратно (R1 и R2) промиване с вода с 3 mM NaCl. В различни моменти (означени с O1–O7) са правени осцилации за определяне на повърхностните модули на разширение E' и E'' .

Ред 4 в Таблица 4.2 отговаря на средната стойност от осцилации означени с O4 и O5 на Фигура 4.2, които са проведени след адсорбцията от разтвор 0.001 wt% HFBII + 1 mM SDS (под ККМ) и последвало промиване на адсорбционния слой. Нарастването на σ от 46 mN/m (преди промиването) до 61 mN/m (след промиването) е доказателство за десорбиране на молекули (на SDS) от адсорбционния слой. Високите стойности на еластичния модул, $E' = 230$ mN/m, измерени след първото промиване, показват че молекулите на HFBII не са отстранени от повърхността на мехурчето. Във всички експерименти, в които присъства HFBII на междуфазовата граница, кривите на Лисажу показват чисто еластично поведение (виж Част 4.5.1). В такива случаи появата на ненулеви стойности на E'' се дължат на грешките в експерименталните данни, но тези стойности не кореспондират с наличието на повърхностен вискозитет.

Таблица 4.2. Повърхностни модули на разширение E' и E'' , измерени чрез прилагане на осцилации с период 2 s, при различни повърхностни напрежения σ и повърхностни налягания π_s за експеримента с паралелна адсорбция от разтвор на 0.001 wt% HFBII + 1 mM SDS + 3 mM NaCl, показан на Фигура 4.2.

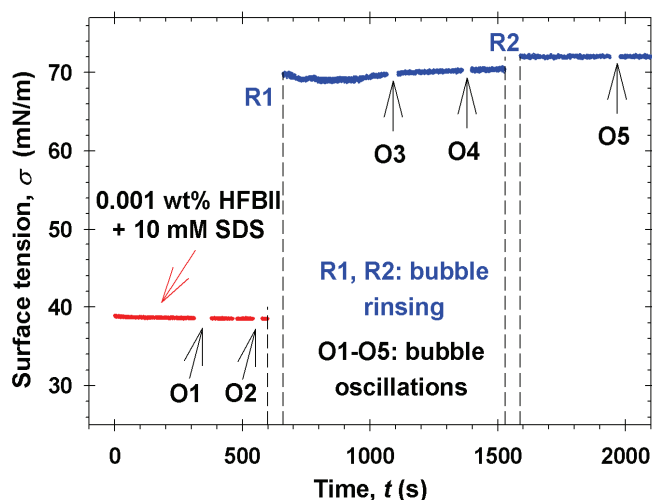
No.	Система / Етап	σ , mN/m	π_s , mN/m	E' , mN/m	E'' , mN/m
1	0.001 wt% HFBII + 1 mM SDS, O1	54.6	17.4	20.6	3.2
2	0.001 wt% HFBII + 1 mM SDS, O2	51.1	20.9	37.83	5.5
3	0.001 wt% HFBII + 1 mM SDS, O3	46.9	25.1	61.7	10.4
4	След 1 ^{BO} промиване с вода, O4, O5	61	11	230	≈ 0
5	След 2 ^{PO} промиване с вода, O6, O7	70	2	149	7.2

Проведохме експеримент на паралелна адсорбция на 0.001 wt % HFBII и 10 mM SDS (над ККМ), данните от който са показани на Фигура 4.3. Образувахме мехурчето в смесен разтвор на 0.001 wt % HFBII и 10 mM SDS и след изчакване от около 5 минути проведохме осцилации O1 и O2. След това сменихме разтвора с вода двукратно (R1 и R2) и отново приложихме осцилации. Повърхностните модули на разширение, E' и E'' , измерени в тези различни етапи са дадени в Таблица 4.3.

Ред 2 в Таблица 4.3 съответства на средната стойност от експериментите с осцилации O3 и O4 във Фигура 4.3. Покачването на σ от 38 mN/m (преди промиването с вода) до 70 mN/m (след промиването) е доказателство за десорбция на молекулите SDS от адсорбционния слой на междуфазовата граница. Хидрофобинът не беше регистриран на междуфазовата граница преди промиването: доказателство за това е стойността на еластичния модул $E' = 0$ (Ред 1 в Таблица 4.3). Стойностите на еластичния модул $E' = 6.5$ mN/m, измерени след първото промиване, може да се дължат на адсорбцията на малко количество HFBII останал след първото промиване поради разпадането на образуваните агрегати с SDS в обема. След второто промиване измерихме $\sigma = 72$ mN/m и $E' = 0$ (Ред 3 в Таблица 4.3), което означава, че всички повърхностно активни компоненти са напълно десорбирани от междуфазовата граница.

Таблица 4.3. E' и E'' измерени чрез осцилации (период 2 s) за експеримент с паралелна адсорбция от разтвор на 0.001 wt% HFBII + 10 mM SDS, показан на Фигура 4.3.

No.	Система	σ , mN/m	π_s , mN/m	E' , mN/m	E'' , mN/m
1	0.001 wt% HFBII + 10 mM SDS	38	34	0	0.4
2	След 1 ^{BO} промиване с вода	70	2	6.5	1.4
3	Следг 2 ^{PO} промиване с вода	72	0	0	0



Фигура 4.3. $\sigma(t)$ при паралелна адсорбция от разтвор на 0.001 wt% HFBII + 10 mM SDS и двукратно промиване на мехурчето с вода (с 3 mM NaCl) означено с R1 и R2 на графиката. Проведени са осцилации за определяне на повърхностните модули на разширение E' и E'' означени с O1–O5.

4.2.2. Експерименти с тънки течни филми

Проведените експерименти с тънки течни филми в клетка на Шелудко–Ексерова и в промивна клетка „Flush cell” допълват информацията за образуваните адсорбционни слоеве и тяхната структура. Експерименталните резултати за начина на изтъняване, времето на живот, дебелината на равновесния филм и наличието на захванати агрегати, са показани на Фигура 4.4.

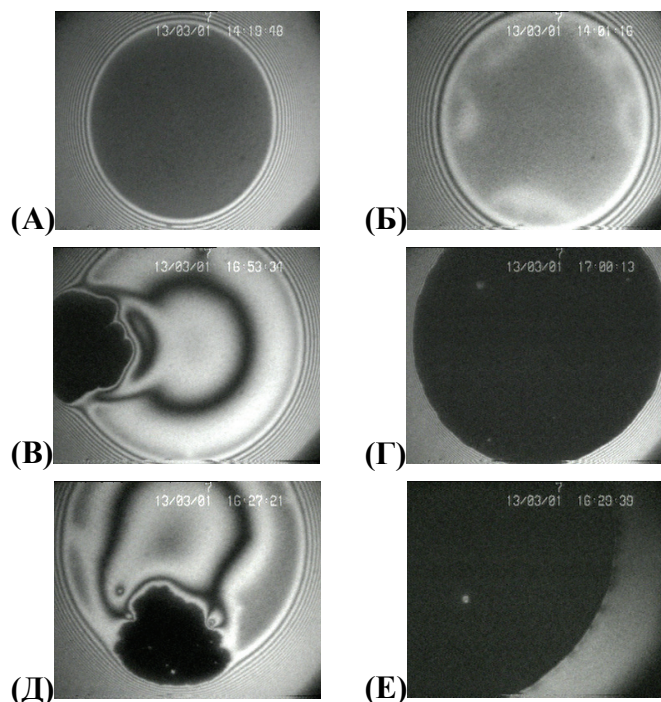
Фигура 4.4А представя снимка на стабилен равновесен филм с дебелина 20 nm от разтвор на 0.001 wt% HFBII + 10 mM SDS (над ККМ). Това е типичен пенен филм стабилизирани от SDS. Няма никаква индикация за присъствието на молекули HFBII като агрегати или по-бавно изтъняване на филма (Basheva et al., 2011 a,b).

Проведохме експеримент като в промивна клетка сложихме първоначално разтвор на HFBII + SDS (същият по състав както този на Фигура 4.4А), за да се образува съответният адсорбционен слой на повърхностите на филма. След 10 минути разтворът в клетката е сменен с вода с 3 mM NaCl и е образуван пенен филм. Филмът е нестабилен и се къса за една минута още преди да достигне равновесно състояние. Този резултат показва отсъствието на протеин и/или ПАВ на междуфазовите граници, и потвърждава заключенията направени от експеримента показан на Фигура 4.3.

Експериментите с филми при паралелна адсорбция потвърждават, че ако концентрацията на SDS е над ККМ, не се регистрира адсорбиран протеин на междуфазовата граница вода-въздух. Най-вероятно цялото количество от протеин е свързано в смесени агрегати от хидрофобин и ПАВ, и се намира в обема на разтвора.

Фигури 4.4В и 4.4Г показват снимки на пенен филм от разтвор на 0.001 wt% HFBII + 1 mM SDS + 3 mM NaCl (под ККМ). Неравномерната дебелина преди образуване на черно петно е индикация за наличие на протеин във филма. Освен това филмите изтичат значително по-бавно, което е характерно за филми стабилизирани от молекулите на HFBII (Basheva et al., 2011 a,b). Образуването на черно петно започва от

периферията на филма (Фигура 4.4В). Това черно петно се разпространява по цялата повърхност докато напълно измести по-дебелите участъци, и се образува равномерно дебел стабилен черен филм с дебелина 11.4 nm (Фигура 4.4Г).



Фигура 4.4. (А) Стабилен пенен филм с дебелина $h = 20$ nm от разтвор 0.001 wt% HFBII + 10 mM SDS + 3 mM NaCl (клетка на Шелудко–Ексерова). (Б) Нестабилен филм след 1 минута (точно преди да се скъса) образуван от същия разтвор след последвало промиване с вода с 3 mM NaCl (“Flush cell”). (В) и (Г) Два етапа от образуването на стабилен черен филм, $h = 11.4$ nm, от разтвор на 0.001 HFBII + 1 mM SDS + 3 mM NaCl (клетка на Шелудко–Ексерова). (Д) и (Е) Два етапа от появата на стабилен черен филм с дебелина 11.1 nm от същия разтвор след промиването (“Flush cell”).

Фигури 4.4Д и 4.4Е показват снимки на филми от разтвор на 0.001 wt% HFBII + 1 mM SDS + 3 mM NaCl, но образуван в промивната клетка. Първоначално клетката е заредена с разтвор и се оставя да се образува адсорбционен слой. След 10 минути течността в клетката се сменя с вода (с 3 mM NaCl) и се образува филм в центъра на клетката. Отново наблюдаваме образуване на черен филм с дебелина 11.1 nm, т.е. няма разлика с поведението на филм без промиване. Това поведение на филмите показва наличието на необратимо адсорбирани молекули хидрофобин на междуфазовата граница, които забавят изтъняването му и подобряват неговата стабилност.

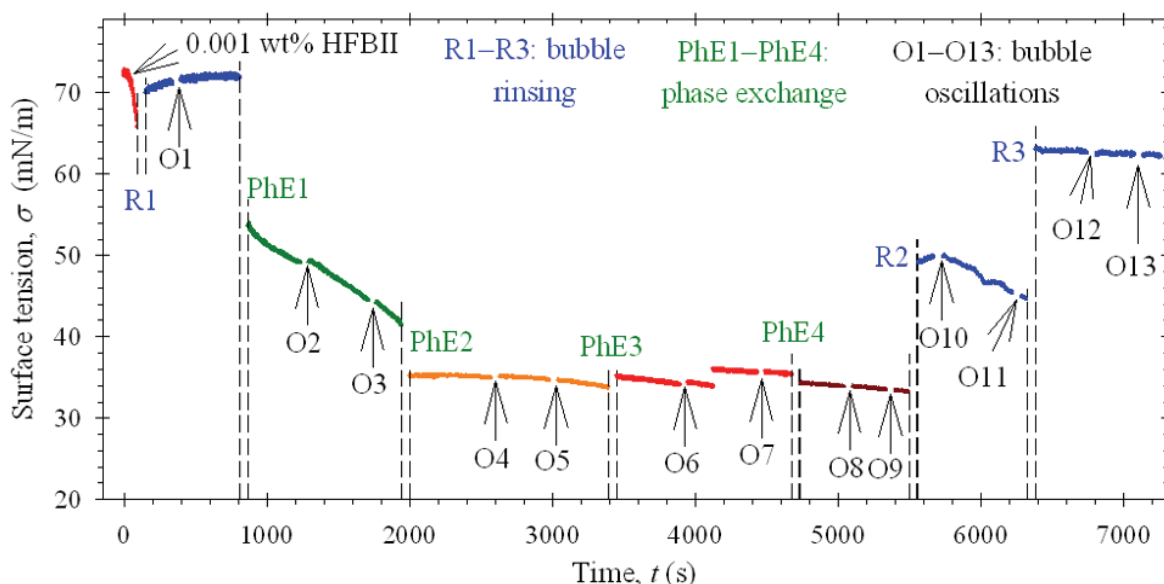
Сравнително по-малката дебелина на черния филм, образуван на Фигури 4.4Г и 4.4Е $h \approx 11$ nm в сравнение с $h = 20$ nm (характерна дебелина за електростатично стабилизирани филми с SDS, Фигура 4.4А), е доказателство, че в присъствие на HFBII повърхностната концентрация на SDS не е толкова голяма. Черният филм най-вероятно е стабилизирани от слепени малки агрегати HFBII, т.е. тетрамери (Basheva et al., 2011

a,b). Когато имаме SDS в разтвора, във филмите се наблюдават значително по-малко големи агрегати от HFBII. Вероятно засиленото електростатично отблъскване между додецил сулфатните аниони и молекулите хидрофобин води до образуването на по-малки агрегати.

Експериментите с пенни филми потвърждават, че ако концентрацията на SDS е под ККМ, то SDS не може да попречи на молекулите на HFBII да се адсорбират на междуфазовата граница вода-въздух, което установихме и в експериментите за измерване на σ , E' и E'' с мехурчета (Фигура 4.2).

4.3. Последователна адсорбция със смяна на водната фаза

4.3.1. Експерименти с деформирано мехурче в разтвор на HFBII



Фигура 4.5. $\sigma(t)$ в експеримент за последователна адсорбция: първоначална адсорбция от 0.001 wt% HFBII и промиване на мехурчето с вода (с 3 mM NaCl) за да се избегне втвърдяването на слоя (R1); смяна на водните фази с разтвори на 1 mM SDS (PhE1), 10 mM SDS (PhE2), 20 mM SDS (PhE3) и 50 mM SDS (PhE4) последователно; след това са проведени две промивания с вода (R2 и R3). На различни етапи са проведени осцилации за определяне на модулите на разширение, означени с O1–O13 на графиката.

В тази серия от експерименти деформираното мехурче е образувано в разтвор на HFBII и много скоро след образуването му разтворът на протеин е заменен с вода (с 3 mM NaCl). Промиването с вода се прави преди адсорбционният слой да се втвърди, за да работим с флуидни слоеве.

Експериментът, показан на Фигура 4.5, съответства на последователна адсорбция на HFBII и SDS като концентрацията на ПАВ се повишава. Редът на провеждане на експеримента е следният. Мехурчето е образувано в разтвор на HFBII, разтворът е сменен с вода (R1) и е направена осцилация (O1), след което водната фаза е сменена с

разтвор на 1 mM SDS (PhE1) и отново са проведени реологични експерименти (O2 и O3). На следващите етапи от експеримента разтворът от 1 mM SDS се заменя с разтвори с нарастваща концентрация 10 mM, 20 mM и 50 mM SDS (PhE2–PhE4). Във всеки разтвор провеждахме реологични експерименти, означени на графиката като O4–O9. Накрая, отново сменихме водната фаза с вода (R2 и R3) и определихме реологичните свойства на адсорбционния слой (O10–O13). Диаграмите на Лисажу получени от тези експерименти са включени в универсалните криви показани на Фигура 4.11А.

Таблица 4.4. Повърхностни реологични модули E' и E'' , измерени чрез прилагане на осцилации с период 2 s, за експеримента с последователна адсорбция от разтвор на 0.001 wt% HFBII и различни концентрации на SDS показан на Фигура 4.5.

No.	Система	σ , mN/m	π_s , mN/m	E' , mN/m	E'' , mN/m
1	0.001 wt% HFBII (O1)	70	2	139.0	5.70
2	След PhE1 с 1 mM SDS	49.2	22.8	99.3	12.1
3		43.9	28.1	102.2	17.3
4	След PhE2 с 10 mM SDS (O4 и O5)	34	38	30.8	3.62
5	След PhE3 с 20 mM SDS (O6 и O7)	35	37	29.7	2.7
6	След PhE4 с 50 mM SDS (O8 и O9)	33.6	38.4	28.5	3.6
7	След промиване с вода R2 (O11)	45.5	26.5	134	1
8	След промиване с вода R3 (O12, O13)	63	9	227.8	3.3

* Там където има повече от една осцилация на ред данните са осреднени.

Изчислените E' и E'' след проведените осцилации O1–O13 (Фигура 4.5), както и стойностите на повърхностното напрежение, σ , са дадени в Таблица 4.4. Във всички етапи от експеримента, където са провеждани осцилации, адсорбционният слой е флуиден. Смяната на водния разтвор на 0.001 wt% HFBII с разтвор на 1 mM SDS води до понижаване на повърхностното напрежение и доста високи еластични модули. Тези високи стойности на E' са индикация за образуване на смесен адсорбционен слой от HFBII и SDS. Следващата смяна на водния разтвор с разтвор на 10 mM SDS (PhE2) води до намаляване на повърхностното напрежение до 34 mN/m и спад на модула на еластичност E' до 30.8 mN/m. По нататъшното повишаване на концентрацията на ПАВ (20 и 50 mM) не променя значително σ и E' , получени с 10 mM SDS. След това направихме две последователни промивания на мехурчето с вода, след които повърхностното напрежение се повиши до 63 mN/m, а измерените стойности на еластичния модул нараснаха до $E' = 228$ mN/m (Ред 8 в Таблица 4.4). Тези високи

стойности на E' показват, че адсорбираният първоначално HFBII не е изместен от междуфазовата граница вода-въздух от мицеларните разтвори на SDS въпреки високата концентрация на ПАВ и дългото време за контакт.

Следователно адсорбираното количество HFBII не се измества от междуфазовата граница вода-въздух след добавянето на SDS в обема (с концентрация над ККМ), въпреки че молекули SDS се вграждат/адсорбират в протеиновия слой и водят до намаляване на σ до 34 mN/m и E' до 30.8 mN/m.

4.3.2. Експерименти с деформирано мехурче в разтвори на BLG и BSA

В тази част ние изследвахме влиянието на SDS върху адсорбционен слой от други два протеина (BLG и BSA) при последователна адсорбция. Понеже BLG и BSA са по-слабо повърхностно активни от хидрофобин, ние използвахме десет пъти по-висока концентрация (0.01 wt%). Преди да промием мехурчето с разтвор на ПАВ направихме едно промиване с вода с цел да потвърдим, че протеинът не се десорбира от междуфазовата граница.

Таблица 4.5. Повърхностни модули на разширение E' и E'' за експериментите на последователна адсорбция от разтвори на 0.01 wt% BLG и на 0.01 wt% BSA, и промити последователно с 10 mM SDS, и с вода (Фигури 4.7 и 4.8).

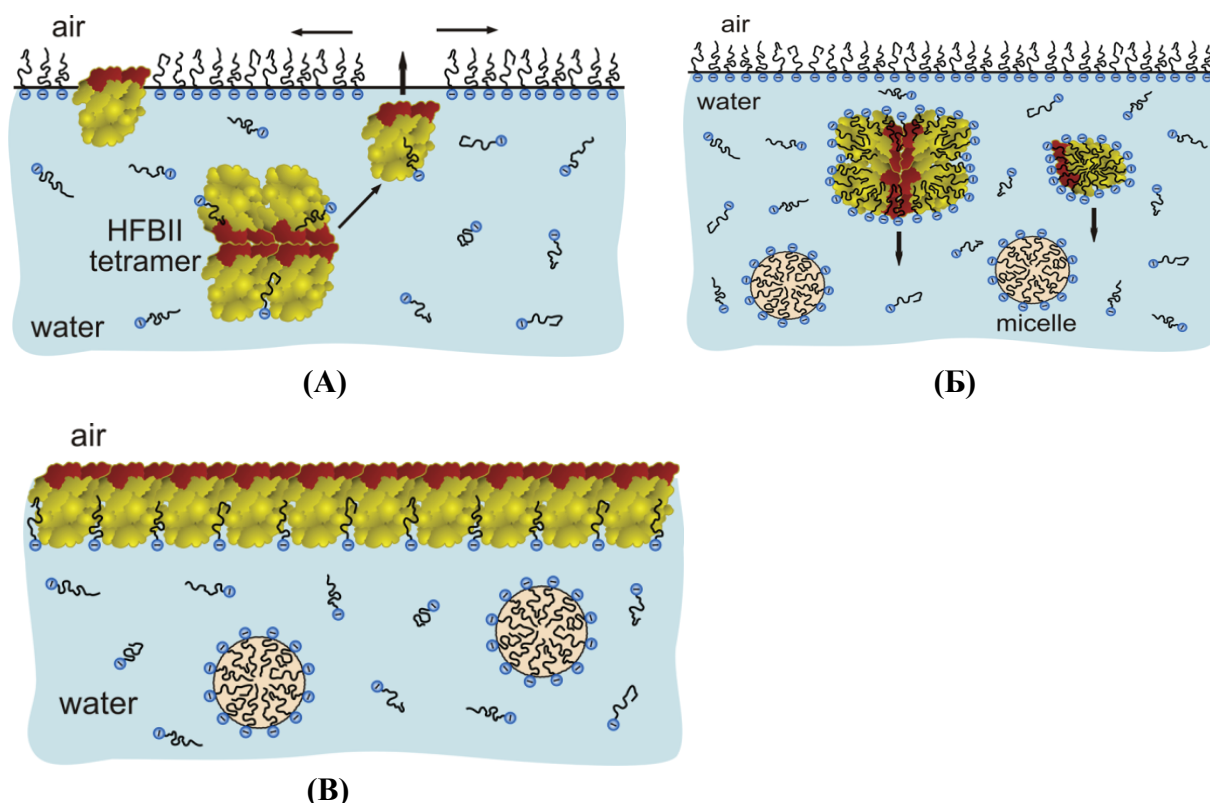
Но.	Система	σ , mN/m	π_s , mN/m	E' , mN/m	E'' , mN/m
1	0.01 wt% BLG	53.7	18.5	85.1	12.7
2	след PhE с 10 mM SDS	37.0	35.2	0.8	0.3
3	и промиване с вода	70	2.2	0	0
4	0.01 wt% BSA	57.1	15.1	76.8	13.1
5	след PhE с 10 mM SDS	35.1	37.1	8.6	1.9
18	и промиване с вода	71.5	0.7	0	0

Повърхностният модул на еластичност на разтвор от 0.01 wt% BLG ($E' = 85$ mN/m) съвпада с данни на други автори (Lucassen-Reynders et al., 2010) и е значително по-малък като стойност от този на разтвор състоящ се само от 0.001 wt% HFBII ($E' = 140$ mN/m).

Стойностите на σ и на повърхностните модули, определени при провеждане на експериментите за последователна адсорбция на 0.01 wt% BLG или BSA с 10 mM SDS са дадени в Таблица 4.5. Нулевите стойности на E' и E'' след промиването с вода, заменяща разтвора на 10 mM SDS, категорично показват, че BLG и BSA се изместват изцяло от междуфазовата граница от молекулите на SDS, за разлика от тези на HFBII.

4.4. Обсъждане на резултатите получени при паралелна и последователна адсорбция

Резултатите от всички експерименти по паралелна адсорбция с концентрация на SDS под ККМ показаха, че молекулите на HFBII се адсорбират на междуфазовата граница вода-въздух частично измествайки бързо адсорбиращия се SDS (Фигура 4.9А).



Фигура 4.9. Схематично представяне на процесите в разтвори на HFBII и SDS. (А) Образуване на смесен адсорбционен слой от разтвор на HFBII + 1 mM SDS (йонното ПАВ е под ККМ) при паралелна адсорбция: молекулите на протеина се адсорбират по-бавно от тези на SDS и се образува смесен адсорбционен слой. (Б) Образуване на смесени агрегати в обема при паралелна адсорбция от разтвор на HFBII + 10 mM SDS (SDS е над ККМ), протеинът не се адсорбира на междуфазовата граница вода-въздух. (В) Образуване на смесен адсорбционен слой при последователната адсорбция, когато първоначално е адсорбиран HFBII: молекулите на SDS не могат да го изместят от повърхността дори когато концентрацията на ПАВ е над ККМ.

Ако концентрацията на йонното ПАВ е над ККМ, то молекулите и агрегатите хидрофобин в обема най-вероятно образуват смесени агрегати с молекулите на SDS, което води до ефективно хидрофилизиране на протеина и пречи до неговата адсорбция на повърхността (Фигура 4.9Б).

В случай на последователна адсорбция, когато HFBII се адсорбира първи на междуфазовата граница вода-въздух, той не може да бъде изместен от нея дори и

разтворът на SDS да е над ККМ (Фигура 4.9В), за разлика от други протеини (BLG и BSA). Енергията на адсорбция на HFBII е достатъчно голяма и той не може да бъде изместен от междуфазовата граница от йонно ПАВ като SDS. Обаче молекулите на SDS могат да изместят други протеини като BLG, BSA и β -casein от адсорбционния слой. Механизмът, по който става изместването, е описан в работите на Mackie и съавтори (Mackie et al., 2000, 2003; Gunning et al., 2004).

Получените резултати показват съществуването на две метастабилни състояния на молекулите HFBII в контакт с мицеларен разтвор на йонно ПАВ (SDS): смесени агрегати от HFBII + SDS в разтвора (Фигура 4.9Б); адсорбционен слой на междуфазовата граница (Фигура 4.9В). В зависимост от експерименталната процедура (паралелна или последователна адсорбция) може да се получи първото или второто състояние, което означава, че двете метастабилни състояния се разграничават от достатъчно висока енергетична бариера. От тази гледна точка смесените агрегати на HFBII и SDS се различават от стандартните мицели на ПАВ, които обменят молекули с повърхността на разтвора.

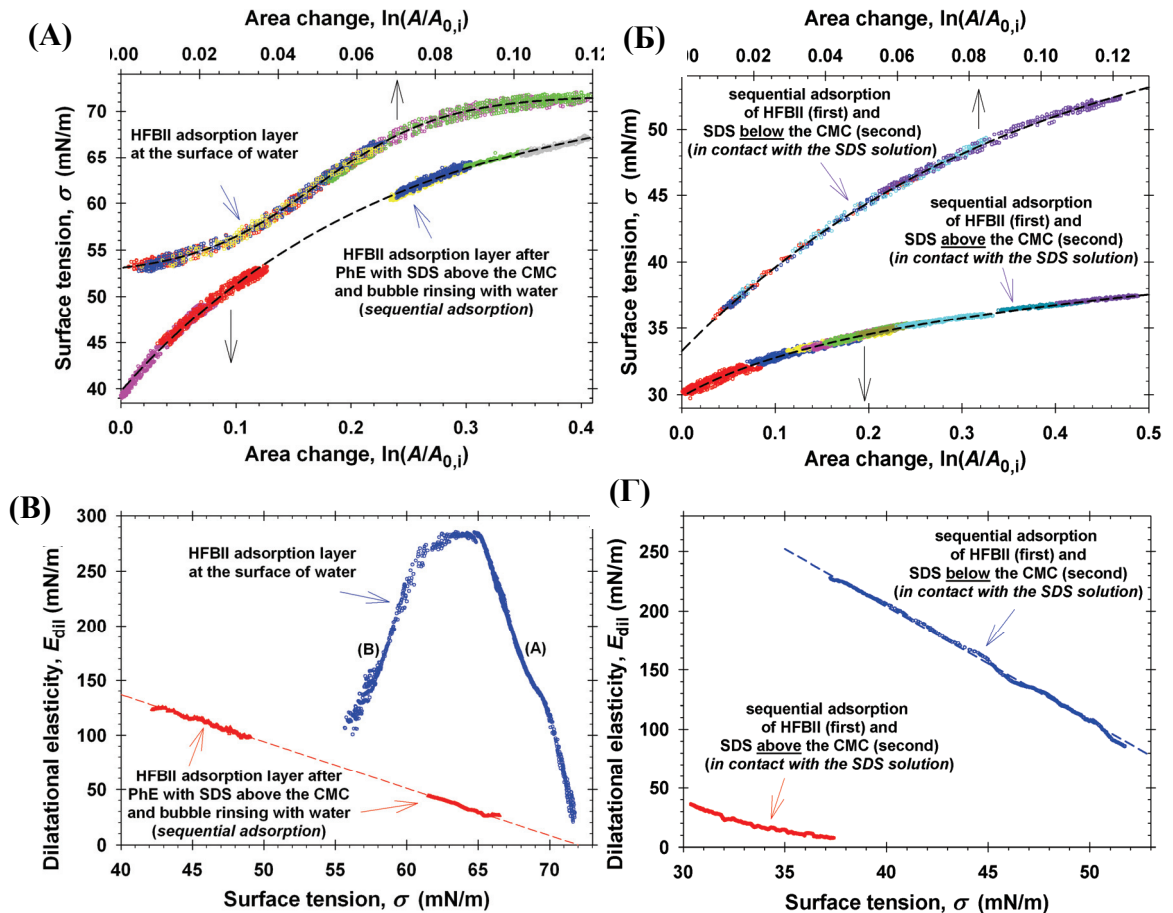
4.5. Зависимост на повърхностната еластичност от повърхностно напрежение

При всички проведени експерименти със смесени разтвори и слоеве на HFBII и SDS успешно използвахме повърхностния еластичния модул E' като индикация за наличието на протеин на междуфазовата граница, имайки предвид високите му стойности за слоеве съдържащи само HFBII (виж Таблица 4.1). Голямото количество натрупани данни от различни експерименти с осцилации ни позволява да извлечем и допълнителна информация за адсорбционните слоеве: зависимостта на повърхностната еластичност от повърхностното напрежение.

4.5.2. Резултати за повърхностна еластичност

Горната крива на Фигура 4.11А представя универсалната кумулативна крива на всички експерименти с осцилации на адсорбционен слой от HFBII без наличието на SDS. Тази група от данни включва експериментите от осцилации на първоначално адсорбиран слой от HFBII преди смяната на водните фази или след промиването на мехурчето от експериментите за паралелна или последователна адсорбция от разтвор на SDS с концентрация под ККМ. Долната крива от Фигура 4.11А е кумулативна универсална крива за подобни експерименти от осцилации при последователна адсорбция, проведени след смяната на разтвора на SDS с концентрация над ККМ с вода. На Фигура 4.11А и двете криви се отнасят за адсорбционни слоеве от HFBII, но адсорбционният слой на долната крива може да съдържа и някакво количество SDS,

което не сме успели да отстраним при първото промиване на мехурчето. Това се случва при начална концентрация на SDS в разтвора над ККМ.



Фигура 4.11. Кумулативни зависимости на σ от $\ln(A/A_{0,i})$ (А) за адсорбционен слой HFBII + SDS промити с вода (с 3 mM NaCl) и (Б) за адсорбционен слой състоящ се от първоначално адсорбиран HFBII промит с разтвор на SDS. (В и Г) E_{dil} получена чрез диференцирането на зависимостта на σ от $\ln(A/A_{0,i})$ на Фигури 4.11А и 4.11Б съответно.

Двете криви изобразени на Фигура 4.11В представляват пресметнатата повърхностна еластичност E_{dil} чрез диференциране на кумулативната зависимост показана на Фигура 4.11А, $E_{dil} = d\sigma/d\ln A$. Горната крива минава през максимум при $E_{dil} = 284$ mN/m, което е близко като стойност от определената с висяща капка (Alexandrov et al., 2012). Такъв максимум на зависимостта $E_{dil}(\sigma)$ се наблюдава и за други протеини адсорбирани на междуфазова граница вода-въздух, но стойностите на еластичността са значително по-ниски от тези за HFBII, а именно 25 mN/m за β -casein (Noskov et al., 2007), 75 mN/m за BSA и 80 mN/m за BLG и яйчен албумин (Lucassen-Reynders et al., 2010).

Долната крива във Фигура 4.11В има линеен вид и отреза съответства на $E_{dil} = 0$ при $\sigma = 72$ mN/m (чиста повърхност). Значителната разлика между двете зависимости

показани на Фигура 4.11В може да се обясни с действието на SDS. Горната крива с максимум представя еластичността на разширение на адсорбционен слой от HFBI без SDS, докато долната показва еластичността на слой от HFBI съдържащ молекули SDS. Слой HFBI с наличието на SDS също има висока еластичност, в сравнение със слоеве на други протеини, но тя е значително намалена спрямо тази на слой HFBI без SDS.

Данните показани на Фигура 4.11Б представляват кумулативна универсална крива за експериментите от осцилации при последователна адсорбция на SDS и HFBI. Горната крива съответства на адсорбционен слой от HFBI, който е промит с разтвор на SDS с концентрация под ККМ, а долната отговаря на разтвор на SDS над ККМ. И двете криви представени на Фигура 4.11Г показват пресметнатата повърхностна еластичност, E_{dil} .

Горната крива на Фигура 4.11Г има линеен вид и е подобна на линейната зависимост на Фигура 4.11В. Долната крива съответства на значително по-ниски стойности на E_{dil} , които пък от своя страна са по-високи от тези отговарящи на адсорбционен слой изграден само от SDS. По-ниската еластичност в присъствие на SDS е много вероятно да се дължи на проникване и образуване на петна от ниско молекулно ПАВ в слоя на протеина, подобно на наблюдаваните образувания за друга система ПАВ-протеин от Maskie et al., 2003. Важно е да отбележим, че адсорбционният слой от хидрофобин се възстановява след смяната на разтвора на ПАВ с разтвор на чиста вода, т.е. премахват се само молекулите на SDS от адсорбционния слой, но не и тези на HFBI (виж Фигура 4.5).

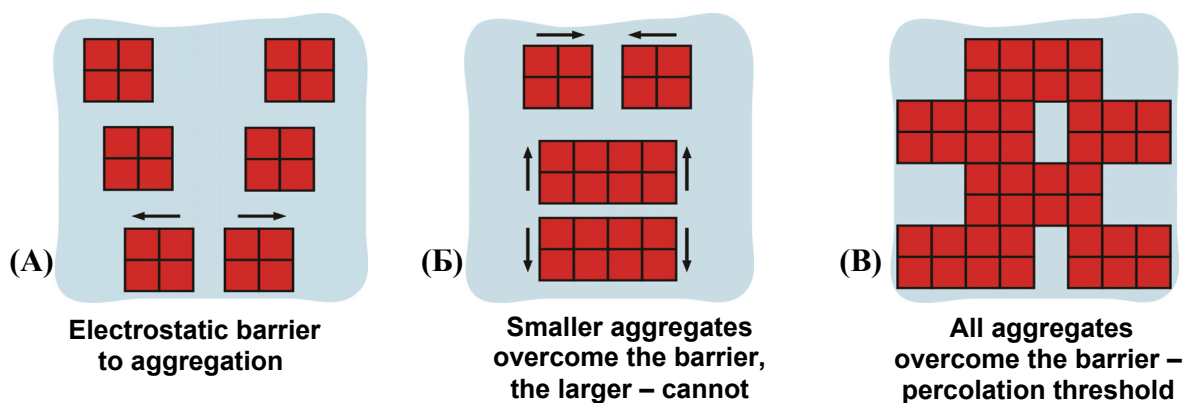
4.5.3. Обсъждане на формата на кривите за повърхностната еластичност като функция от повърхностното напрежение

Наличните максимуми в кривите на повърхностната еластичност като функция от повърхностното напрежение за различни протеини (BLG, BSA, яйчен албумин и β -casein) на различни междуфазови граници е интерпретирано количествено в рамките на уравнението на състоянието на Фрумкин (Lucassen-Reynders et al., 2010) като максимумът е обяснен с латерални взаимодействия между адсорбираните протеинови молекули. Уравнението на Фрумкин предсказва и възникване на фазови преходи на повърхността.

Между адсорбираните молекули HFBI действат както хидрофобно и Ван дер Ваалсово привличане, така и електростатично отблъскване. При някои експериментални условия преобладава привличането (Basheva et al., 2011a,b), но при други доминиращо е отблъскването (Wang et al., 2010). Подобни взаимодействия има между молекулите и на другите протеини (BLG, BSA, β -casein и т.н.). Ван дер Ваалсовите сили са значителни на близки разстояния (Israelachvili, 2011). За разлика от тях електростатичното отблъскване между едноименно заредени частици (включително

и агрегати от протеинови молекули) адсорбирани на междуфазова граница вода-въздух е далекодействащо (Aveyard et al., 2000; Aveyard et al., 2002; Horozov and Binks, 2005; Danov and Kralchevsky, 2010).

Например, Aveyard et al., 2002 наблюдават силно далекодействащо отблъскване между частици с микронни размери дори в разтвор на 1 М NaCl, което доказва електростатични взаимодействия при неполярен флуид. В такъв случай съществува електростатична бариера за сливането на повърхностните протеинови агрегати, при това бариерата е по-висока за по-големите агрегати, защото общият им заряд е по-голям.



Фигура 4.12. Три етапа на агрегация на адсорбиран протеин. (А) Олигомери, отблъскващи се един от друг при най-високи стойности на σ (дясно от максимума на фигура 4.11В). (Б) Сливане на по-малките агрегати (фазов преход) при междинни стойности на σ (от лявата страна на максимума на фигура 4.11В). (В) Праг на перколация и втвърдяване на повърхността, което се регистрира с покачване на грешката от интерполиране на профила на мехурчето с уравнението на Лаплас при $\sigma \leq 53 \text{ mN/m}$ (показано е на Фигура 4.1А).

Възможността да опишем максимума в зависимостта на E_{dil} от σ с неидеално уравнение на състоянието и вида на действащите сили води до следната физическа картина. При най-високите стойности на повърхностно напрежение ($65 < \sigma < 72 \text{ mN/m}$), съответстващи на участък А от горната крива на Фигура 4.11В, на повърхността има отделни молекули протеин и малки агрегати (олигомери) както схематично е показано на Фигура 4.12А. Максимумът в кривата на Фигура 4.11В отговаря на възникването на фазов преход на повърхността. Малките агрегати се сливат първи, докато по-големите агрегати се сливат при по-високи стойности на π_s , защото електростатичната бариера за тях е по-голяма (Фигура 4.12Б и участък Б на Фигура 4.11В). Накрая, при $\sigma \approx 53 \text{ mN/m}$, където грешката от обработката на профила на мехурчето с уравнението на Лаплас нараства, повърхностният адсорбционен слой от HFВІІ започва да се втвърдява. От структурна гледна точка втвърдяването може да се интерпретира като праг на

перколяция, т.е. от дисперсна повърхностна фаза адсорбираният протеин преминава в непрекъсната фаза и изглежда като еластична протеинова мрежа (Фигура 4.12B).

Наблюдаваните линейни зависимости на E_{dil} от σ , както е на Фигури 4.11B и Г, съответстват на адсорбционен слой HFBI с внедрени додецилсулфатни аниони, допринасящи за допълнително електростатично отблъскване между протеиновите агрегати (Фигура 4.12A). В този случай нямаме фазов преход на повърхността. Електростатичното отблъскване между частиците на повърхността е в състояние да доведе до повърхностно налягане и еластичност от порядъка на експериментално определените от нас (Aveyard et al., 2000; Reynaert et al., 2006).

Качествената картина на повърхностните процеси показани на Фигура 4.12 са едно възможно обяснение за различното поведение на зависимостта на E_{dil} от σ , показана на Фигури 4.11B и Г. Тази картина се нуждае от потвърждаване с допълнителни експерименти и теоретично моделиране, които могат да бъдат предмет на следващи изследвания.

4.6 Основни резултати и заключения

Кинетиката на повърхностното напрежение на смесен разтвор на HFBI + SDS (когато SDS е под ККМ) има нетривиално поведение. Молекулите на SDS се адсорбират много по-бързо на междуфазовата граница вода-въздух от тези на HFBI. Адсорбцията на HFBI от смесен разтвор е дифузионно контролирана, но експериментално определената скорост е 12 пъти по-бърза, отколкото скоростта предсказана от уравнението на Уорд и Тордай за ранни времена. Тази разлика може да се обясни с това, че молекулите на HFBI се адсорбират върху повърхност частично запълнена с молекули SDS, а не на чиста междуфазова повърхност вода-въздух.

Проведохме експериментите за последователна адсорбция, като първоначално адсорбирахме HFBI на повърхността на мехурчето и след това заменяхме водната фаза с разтвор на SDS. Резултатите показаха, че адсорбиран веднъж HFBI на междуфазовата граница вода-въздух не може да бъде изместен от SDS независимо от концентрацията му във водата. Хидрофобинът се адсорбира по-здраво на междуфазовата граница отколкото други протеини като BLG и BSA, които напълно се изместват от повърхността при промиване с мицеларен разтвор на SDS. В присъствие на ПАВ еластичността на разширение на адсорбционния слой от HFBI значително намалява, което е индикация за взаимодействието на молекулите на SDS и протеина. След смяна на разтвора на SDS с чиста вода високите модули на еластичност се възстановяват, което говори за почти пълното отстраняване на молекулите SDS от образувания смесен адсорбционен слой.

В случай на паралелна адсорбция на двата компонента има значителна разлика в резултатите от това дали концентрацията на SDS е под или над ККМ. Когато

концентрацията на SDS е под ККМ, натриевият додецил сулфат не може да предотврати адсорбцията на протеин на междуфазовата граница. В другия случай, не беше регистрирана адсорбция на HFBI, което може да се обясни с хидрофилизацията на агрегатите от протеин от молекулите ПАВ в обема на разтвора. Следователно, молекулите HFBI могат да съществуват в две метастабилни състояния в присъствие на мицеларен разтвор на SDS в зависимост от това дали двата компонента се адсорбират паралелно или последователно. Едното метастабилно състояние е под формата на смесени агрегати от протеин и ПАВ в обема (паралелна адсорбция Фигура 4.9Б), а другото е адсорбция на междуфазовата граница вода-въздух (последователна адсорбция Фигура 4.9В).

Експериментите по повърхностна реология показаха, че адсорбционните слоеве от HFBI и SDS имат чисто еластично поведение. Предложихме процедура, която позволява събирането на всички криви на Лисажу получени от отделни експерименти с осцилации на една универсална кумулативна крива. Така определената еластичност на разширение на слоевете HFBI минава през максимум като функция от повърхностното напрежение. Едно възможно обяснение за този максимум може да бъде появата на фазов преход на протеиновия адсорбционен слой. А именно сливане на по-малките повърхностни агрегати в по-големи такива, което води до преход с перколация (подпъхване на едни молекули протеин под други) или втвърдяване на повърхностния слой (Фигура 4.12).

Молекулите SDS допринасят за допълнително електростатично отблъскване между повърхностните протеинови агрегати в смесените разтвори. Измерените относително високи стойности на повърхностната еластичност може да бъде свързано с действието на електростатичното отблъскване на тези агрегати през въздуха, както е наблюдавано с едноименно заредени колоидни частици плуващи на междуфазова граница вода-неполярна течност (Aveyard et al., 2000; Aveyard et al., 2002; Horozov and Binks, 2005; Reynaert et al., 2006; Danov and Kralchevsky, 2010).

Глава 5. Адсорбционни слоеве от хидрофобин HFBI на границата вода-въздух: реология и структура определена с атомно силов микроскоп

Основна цел: *Да изследваме има ли връзка между мезоскопската структура и високата еластичност на адсорбционните слоеве HFBI при различни повърхностни налягания П.*

За постигане на тази цел ние комбинирахме измервания с AFM и Лангмюрова вана. Проведохме експерименти в Лангмюрова вана, за да определим реологичното

поведение на разтечен слой от HFBI на границата вода-въздух. Приложихме няколко режима на работа. Единият от тях е непрекъснато свиване на слоя с постоянна скорост на бариерите, а другият режим на работа е постепенно свиване на слоя и провеждане на експерименти с осцилации. Модулите на еластичност определихме от анализа на експерименталните данни за повърхностното налягане като функция на площта, и ги сравнихме със стойностите получени от експериментите с осцилации и тези от етапите на свиване.

За да вземем проби от адсорбционния слой при различни стойности на повърхностното налягане приложихме процедурата описана в Част 2.2.6. Наблюдавахме пробите с атомно силов микроскоп (AFM) в осцилиращ режим. Оказа се, че при високите стойности на Π , адсорбционният слой е доста плътен и за да определим абсолютната стойност на дебелината на слоя приложихме следния подход: след сканиране на повърхността на образеца в осцилиращ режим (tapping mode) издраскахме малка област от слоя използвайки контактен режим на работа. По този начин достигнахме чиста слюда, която ни служеше като референтна стойност. Данните получени от този експеримент са показани и обсъдени в Част 5.1.2.

Изследвахме слоеве при $\Pi > 25 \text{ mN/m}$, които са невъзможни за изследване с деформирано мехурче, защото адсорбционните слоеве са еластични мембрани.

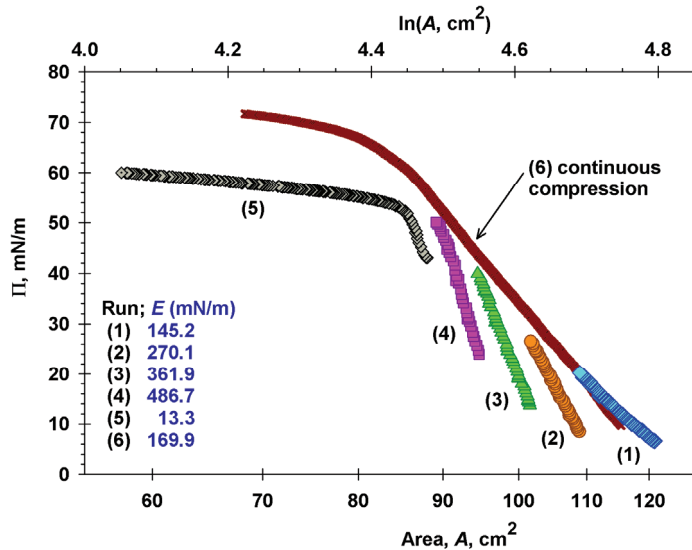
5.1. Повърхностна морфология на адсорбционния слой

5.1.1. Изотерми на повърхностно налягане

Фигура 5.2 показва данните за повърхностното налягане Π като функция от площта на слой от хидрофобин разтечен на повърхност на чиста вода в Лангмюрова вана. Горната крива (крива 6) на Фигура 5.2 съответства на непрекъснато свиване на разтечения слой със скорост от $10 \text{ cm}^2/\text{min}$. Както се вижда на фигурата, в този експеримент Π се увеличава с почти постоянен наклон до около 65 mN/m , след което наклонът спада значително и Π достига до постоянна стойност от $71\text{--}72 \text{ mN/m}$, т.е. повърхностното напрежение е почти нула. Слоеве с почти нулево повърхностно напрежение са видимо нагънати. Такива вълни и гънки са били експериментално наблюдавани в тънки филми (Basheva et al., 2011b) и по повърхности на мехурчета с HFBI (Cox et al., 2007), и са теоретично описани от Danov et al. (2010).

На Фигура 5.2 е показана и $\Pi(A)$ изотерма, получена с последователно свиване на площта на разтечен слой на пет стъпки (Етапи 1, 2, 3, 4 и 5). При тази процедура, в периодите на изчакване между отделните етапи прилагаме осцилации на площта с малка амплитуда ($\Delta A \approx \pm 2.4 \text{ cm}^2$) в продължение на 12–13 минути. По време на тези осцилации средната стойност на повърхностното налягане спадаше средно с 10 mN/m спрямо тази преди осцилациите. Промяната е свързана с повърхностното

преструктуриране на слоя, както ще бъде показано по-нататък. Затова и компресията на всяка следваща стъпка започва от по-ниски стойности на Π спрямо тази в края на предходната стъпка. При последното свиване (крива 5 на Фиг. 5.2) повърхностното налягане почти не се повишава над 60–62 mN/m, а слойт хидрофобин е видимо нагънат.



Фигура 5.2. Повърхностното налягане Π като функция от площта A за слой от HFBI разтечен в Лангмюрова вана и подложен на стъпково (1–5), или на непрекъснато (6) свиване на площта. Показани са и еластичностите определени за всеки един етап.

За да пресметнем еластичността, E , на разтечения слой от HFBI, може да използваме дефиницията (Joos, 1999; Saccani et al., 2004; Danov et al., 2010; Blijdenstein et al. 2010), $E = d\sigma/d\ln A = -d\Pi/d\ln A$, която да приложим към нашите експериментални зависимости $\Pi(A)$. Така изчислената еластичност е макроскопски феноменологичен параметър, който лесно може да бъде пресметнат, понеже и площта, A , и повърхностното налягане, Π , се измерват пряко. Но при тази дефиниция, не може да се отчете фактът, че междуфазовата повърхност може да бъде вълнообразна или нагъната на микрониво, а може да има и неравномерна дебелина (например области от монослой, мултислой или дупки).

Еластичността, изчислена за кривата получена при непрекъснато свиване (крива 6 на Фигура 5.2) в участъка с постоянен наклон при $87 \leq A \leq 115 \text{ cm}^2$, е $E = 169.9 \text{ mN/m}$. Тази стойност е близка до получената от Етап 1 на стъпковата изотерма $E = 145.2 \text{ mN/m}$. При Етапи 2, 3 и 4 наклоните значително нарастват и съответно стойностите на еластичността се увеличават до $E = 486.7 \text{ mN/m}$ за Етап 4 на Фигура 5.2. Това повишаване може да се обясни с уплътняването на адсорбционния слой протеин в резултат на приложените осцилации между отделните етапи. Съответните структурни промени, които настъпват в слоя, се виждат и на изображенията от AFM, както са показани в следващата част.

При образуването на гънки в слоя по време на Етап 5 при $\Pi \geq 52 \text{ mN/m}$, промяната на повърхностното налягане е много слаба и това води до изчислена

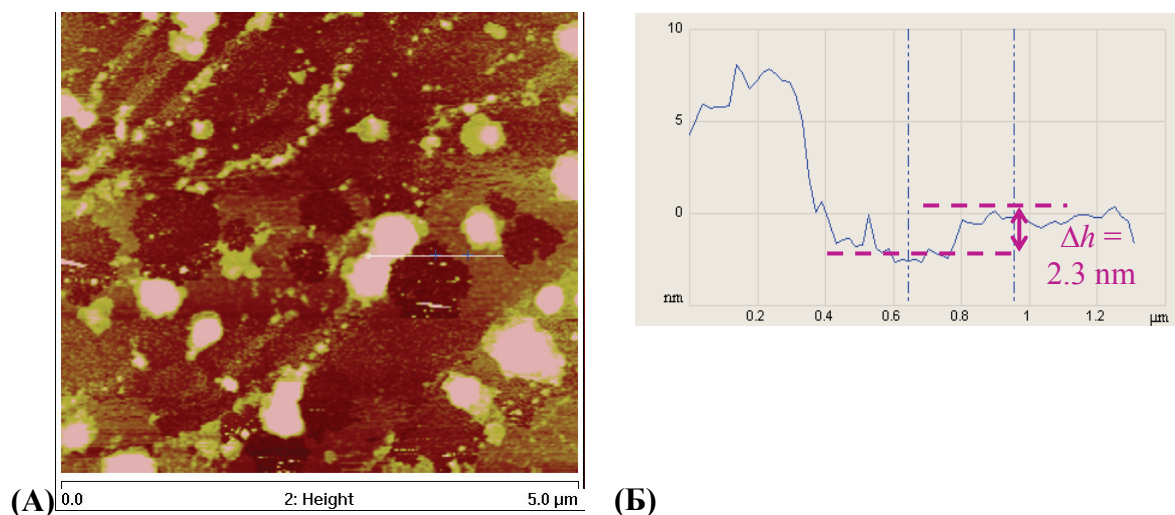
ефективна ниска еластичност, $E = 13.3 \text{ mN/m}$. Трябва да отбележим, че възникването на периодични гънки и вълни е енергетически изгодно при $\sigma \approx 0 \text{ mN/m}$, защото положителните стойности на повърхностното напрежение силно потискат нагъването (Danov et al., 2010). Слой от HFBI се втвърдява при $\Pi > 22 \text{ mN/m}$ (Alexandrov et al., 2012) и σ не е постоянна и не е хомогенна навсякъде в слоя. Появата на гънки започва локално в отделни повърхностни участъци, което се вижда и при микроскопските наблюдения. От гледна точка на теоретичния модел (Danov et al., 2010) може да се предположи, че това са области с мембранно напрежение близко до нула. Измерените стойности за повърхностното налягане $\Pi = 55 - 60 \text{ mN/m}$ (вместо 72) за Етап 5 може да се дължат на такива нехомогенности: протеиновият слой в околността на пластинката на Вилхелми е локално издължен, което води до $\sigma_{xx} > 0$ в тази област (σ_{xx} е компонентата от повърхностния тензор на напрежение, която се измерва с пластинката на Вилхелми).

5.1.2. AFM изображения на разтечен адсорбционен слой HFBI

Протеиновите слоеве, които наблюдавахме с атомно силов микроскоп, са образувани в Лангмюрова вана, както е описано в Част 2.2.6. Фигура 5.3А показва AFM изображение на слой хидрофобин с $\Pi = 25 \text{ mN/m}$ получен при свиването на разтечения слой до площ $A = 99.8 \text{ cm}^2$. На снимката тъмните петна съответстват на кухини в адсорбционния слой, които съдържат и малки разпръснати по-светло жълти петна, най-вероятно малки агрегати HFBI. Зоните на снимката с бледо жълт цвят представляват монослой с дебелина $\Delta h = 2.3 \text{ nm}$ спрямо кухините, т.е. един слой молекули HFBI (виж секционния анализ показан на Фигура 5.3Б). По-големите бели петна съответстват на слой с дебелина от 3–5 молекули протеин.

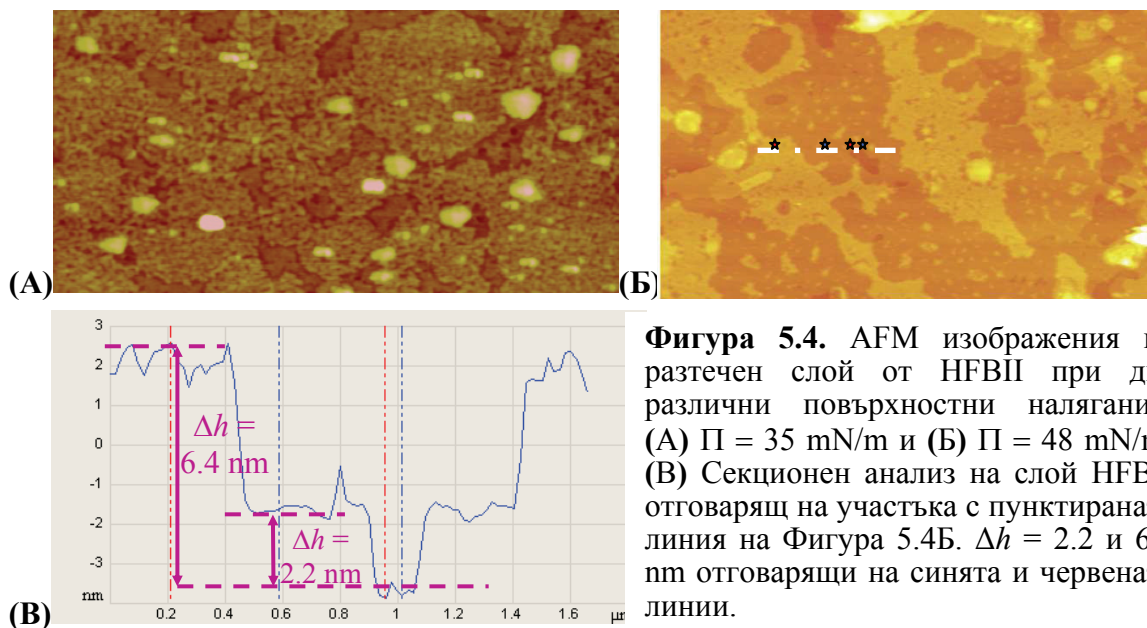
Въпреки сравнително ниското повърхностно налягане, $\Pi = 25 \text{ mN/m}$, резултатите на Фигура 5.3 показват, че повърхността е силно нехомогенна. Нейната структура е напълно различна от хомогенен монослой (както за BSA например, получен от Angarska et al., 2014). Ако повърхността се разгледа като двумерна дисперсия, празнините може да разгледаме като дисперсна фаза (те образуват отделни петна), докато протеиновият слой с нехомогенна дебелина като непрекъснатата фаза. Този резултат е в съгласие с установеното втвърдяване на адсорбционните слоеве HFBI при $\Pi \approx 22 \text{ mN/m}$ (Alexandrov et al., 2012). Втвърдяването на повърхността може да се счита като праг на перколация: за $\Pi < 22 \text{ mN/m}$ празнините са непрекъснатата фаза, докато при $\Pi > 22 \text{ mN/m}$ участъците от монослой или мултислой хидрофобин се докосват и образуват непрекъснатата еластична мембрана, която обгражда диспергирани празнини, както е показано на Фигура 4.12. Тази картина съответства на AFM изображението на Фигура 5.3А.

На Фигура 5.4А е представена AFM снимка при повърхностно налягане $\Pi = 35$ mN/m. Протеиновият слой е подобен като този на Фигура 5.3А, но тук тъмните петна (празнините) са значително по-малки и по-малко на брой, т.е. големи области от чиста слюда почти липсват. Следователно, адсорбционният слой при $\Pi = 35$ mN/m е поплътен в сравнение с този при $\Pi = 25$ mN/m (виж Фигура 5.3А). Светлите петна на снимката показват наличието на области с по-дебел слой, наподобяващи изолирани високи плата.

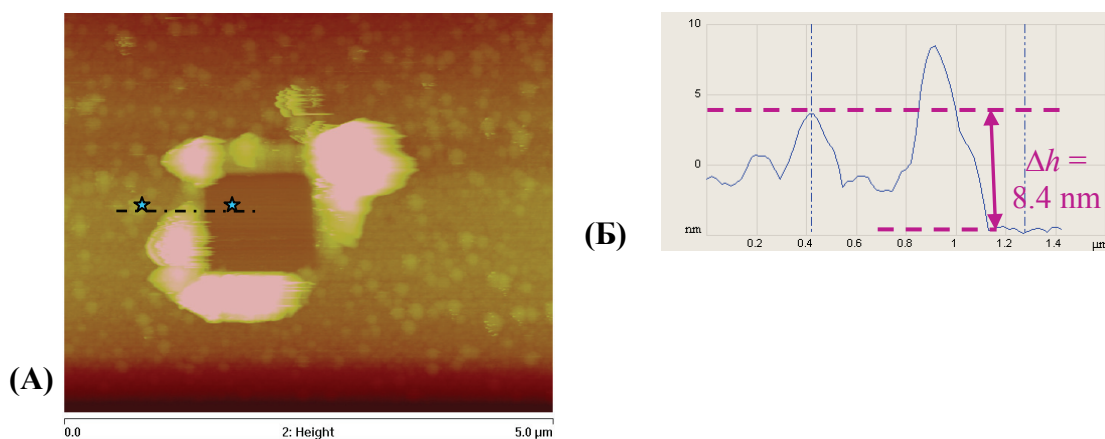


Фигура 5.3. (А) AFM изображение на слой от HFBI при $\Pi = 25$ mN/m; слойът беше първоначално разтечен на площ 125 cm^2 и след това компресиран до 99.8 cm^2 със скорост на бариерите $4 \text{ cm}^2/\text{min}$. (Б) Секционен анализ на слой HFBI отговарящ на участъка с пунктираната линия на Фигура 5.3А. Разликата във височината между двете отбелязани точки, $\Delta h = 2.3 \text{ nm}$, не зависи от позицията на нулата на ординатата, която е произволно избрана.

Фигура 5.4Б представя AFM снимка на слой отложен върху слюдена подложка при налягане $\Pi = 48$ mN/m. Празнини (тъмни петна) почти няма, и съвместно съществуват големи области от монослой и слой отговарящ на височината на три молекули. На Фигура 5.4В е показан секционен анализ: синята крива отговаря на дебелина на слоя $\Delta h = 2.2 \text{ nm}$ съответстващ на монослой, а червената $\Delta h = 6.4 \text{ nm}$ на трислой.

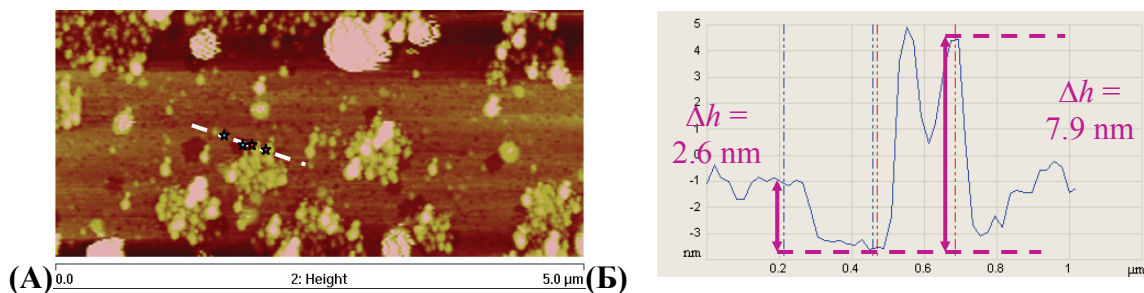


Фигура 5.4. AFM изображения на разтечен слой от HFBI при две различни повърхностни налягания: (A) $\Pi = 35 \text{ mN/m}$ и (B) $\Pi = 48 \text{ mN/m}$; (B) Секционен анализ на слой HFBI отговарящ на участъка с пунктираната линия на Фигура 5.4Б. $\Delta h = 2.2$ и 6.4 nm отговарящи на синята и червената линии.



Фигура 5.5. (A) Снимка от AFM на разтечен слой HFBI при $\Pi = 62 \text{ mN/m}$; образецът беше надраскан в средата, така че образуваното квадратче отговаря на чиста слюда. (B) Секционен анализ на слой HFBI отговарящ на участъка с пунктираната линия на Фигура 5.5А. Разликата в дебелината между двете позиции избрани със звездички и означени с вертикалните пунктирани линии.

На Фигура 5.5А е представена снимка от AFM на разтечен слой HFBI, който е силно компресиран до $\Pi = 62 \text{ mN/m}$. Множеството кръгли агрегати, които се виждат, образуват плътен зърнест слой. Определихме абсолютната дебелина на слоя като в малка област изчистихме всичкия протеин, използвайки контактен режим на работа (Фигура 5.5А). Секционният анализ, означен с пунктираната линия на снимката, е показан на графиката на Фигура 5.5Б. Относителната дебелина на слоя е $\Delta h = 8.4 \text{ nm}$, което е малко повече от три слоя молекули.

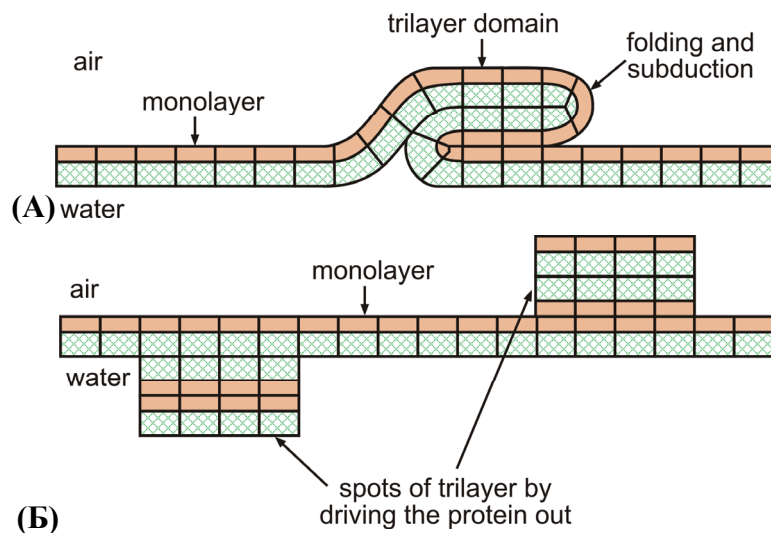


Фигура 5.6. (А) AFM изображение на слой HFBI, който първо е компресиран без прекъсване до $\Pi = 50 \text{ mN/m}$ и след това са проведени осцилации с период 61.6 s и амплитуда $\Delta A/A \approx \pm 2.4 \%$. (Б) Секционен анализ на слой HFBI отговарящ на участъка с пунктираната линия на Фигура 5.6А. Разликата в дебелината между двете позиции избрани със звездички и означени с вертикалните пунктирани линии е $\Delta h = 2.6 \text{ nm}$ (синята) и $\Delta h = 7.9 \text{ nm}$ (червената).

На Фигура 5.6А е дадена снимка от AFM на слой от хидрофобин след осцилации. Първоначално протеинът беше разтечен на границата вода-въздух, изчакано бе да се уравни повърхностното налягане и след това свихме площта от 123 до 99.6 cm². Преди да проведем осцилациите повърхностното налягане беше $\Pi \approx 50 \text{ mN/m}$ при площ $A = 99.6 \text{ cm}^2$. Приложихме осцилации с период 61.6 s и амплитуда $\Delta A/A \approx \pm 2.4 \%$ в продължение на 13 минути, и след това отложихме слой за наблюдение с AFM. На снимката, показана на Фигура 5.6А, се вижда, че малките зърнести агрегати, които се наблюдават при бавно свиване на слоя (Фигура 5.5А) са се превърнали в големи клъстери. Правейки секционен анализ на снимката (показан с пунктираната линия на Фигура 5.6Б) се вижда, че основният слой е с дебелина $\Delta h = 2.6 \text{ nm}$, а клъстерите с $\Delta h = 7.9 \text{ nm}$. По тези измерени дебелини на агрегатите те могат да се класифицират като монослой и трислой HFBI.

5.1.3. Обсъждане на получените резултати

Данните представени на Фигури 5.4–5.6 показват, че в разтечените слоеве от HFBI се образуват предимно монослой и трислой от хидрофобин. Физически образуването на мултислойни структури с нечетен брой слоеве на междуфазова граница вода-въздух се случва, когато има опашка-опашка и глава-глава привличане в амфифилните молекули. Във водата не само хидрофобните, но и хидрофилните части от молекулата на протеин се привличат една към друга, което се проявява при спонтанно образуване на бислой от HFBI (Basheva et al, 2011a,b). Когато имаме такива амфифилни молекули адсорбирани на граница въздух-вода-въздух (пенни филми) се образуват бислоеви (слоеве с четен брой молекули), докато ако адсорбирането става на граница вода-въздух (каквото е слоя във Лангмюровата вана или деформирано мехурче) се образуват монослой, трислой, т.е. слой от нечетен брой молекули.



Фигура 5.7. Различни механизми за образуване на трислой от монослой подложен на деформация. (А) Големи трислойни области могат да се образуват от монослой при нагъване и подпъхване на слоя един под друг. (Б) Многобройни структури от трислой могат да се образуват когато монослоят е подложен на непрекъсната компресия.

На снимките от AFM се виждат два различни типа трислой. Трислой може да се образува под формата на големи участъци както е на Фигура 5.4Б. Вторият начин за образуване на трислой е под формата на зърнеста структура със субмикронни размери както е показано на Фигури 5.5А и 5.6А. Ние предполагаме, че двата типа мезоскопски структури се образуват по два различни механизма.

Трислойни структури (Фигура 5.4Б) могат да се образуват при процес на нагъване и подпъхване на слоя, както е показано на Фигура 5.7А. Етап 5 ($E = 13.3 \text{ mN/m}$) от Фигура 5.2 може да се обясни с появата на периодични вълни, докато непрекъснатото свиване Етап 6 ($E = 169.9 \text{ mN/m}$) може да включва нагъване и подпъхване на адсорбционния слой както е показано на Фигура 5.7А.

Трислойните структури (Фигури 5.5А и 5.6А) могат да бъдат образувани при притискането на протеиновите молекули при осцилирането на слоя. Изместените молекули образуват монослой и два допълнителни слоя (Фигура 5.7Б). Силите на адхезия между хидрофилните части от молекулата на НФВІІ, които са отговорни за образуването на бислой, играят ключова роля за закрепването и образуването на монослой от протеин, като парчетата могат да се отложат или от долната или от горната страна на монослоя.

5.2. Еластичност на разширение получена чрез осцилации на площта

5.2.1. Анализ на данните получени от експерименти с осцилации

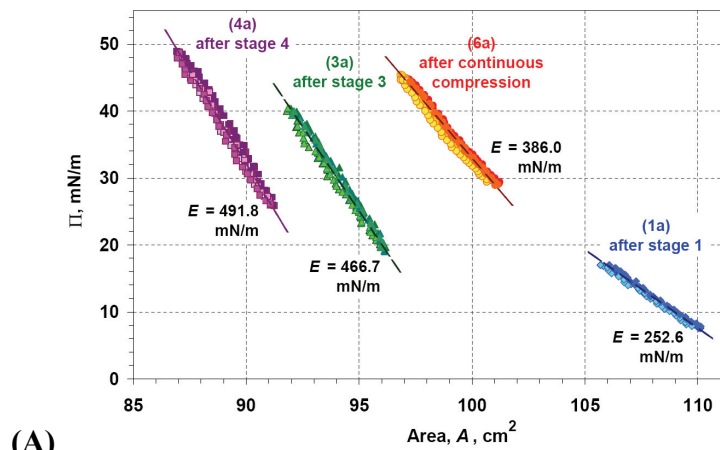
Резултатите получени от експериментите с осцилации показват, че слой претърпява постепенни промени в хода на осцилациите. Осредненото повърхностно

налягане $\langle \Pi \rangle$ намалява, докато повърхностната еластичност $\langle E \rangle$ расте. Изменението на тези физически параметри може да се дължи на уплътняването на адсорбционния слой от НFBII. В действителност, както се вижда от Фигури 5.3 до 5.6, слойът от протеин не е еднороден, а се състои предимно от монослой и трислой с отделни кухини и участъци с по-голяма дебелина. Освен това участъците с по-дебел слой имащи зърнеста структура прерастват в клъстери след осцилиране на площта. Като цяло уплътняването на адсорбционния слой е свързано с увеличаването на средната му дебелина и механичната му устойчивост, което се проявява в повишаването на еластичността $\langle E \rangle$ показано на Фигура 5.9 в дисертацията. В допълнение може да кажем, че образуването на области с три или повече слоя протеин води до нагъването на слоя в латерална посока, което пък от своя страна се отразява в намаляването на средната стойност на Π .

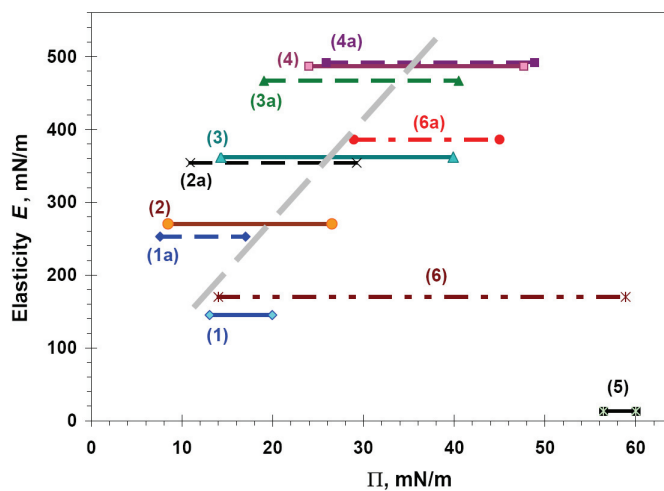
5.2.2. Сравнение на данните за измерената еластичност в различните кинетични режими

Както вече споменахме, прекъсванията в долната експериментална крива на Фигура 5.2 съответстват на осцилации на площта в продължение на 12–13 минути. На Фигура 5.10А е представена $\Pi(A)$ зависимостта за данните получени от експериментите с осцилации. Наклонът на всеки един сегмент от Фигура 5.10А задава съответната стойност на еластичността на разширение E .

На Фигура 5.10Б са сравнени стойностите за еластичността на разширение получени от $\Pi(A)$ зависимостта от Етапи 1–6 на Фигура 5.2 с тези, получени от режим на осцилации след свиване на слоя до съответното Π , означени с 1а, 2а, ..., 6а на графиката. Ясно се вижда, че стойностите получени за еластичността след осцилации са по-високи от тези от етапите на свиване, т.е за 1а е по-висока от тази за 1, 2а > 2 и 3а > 3. Това поведение може да се обясни със значителното уплътняване на слоя протеин след осцилациите, както е показано на Фигури 5.6. Еластичностите получени за Етапи 3а, 4 и 4а имат много близки стойности, което означава, че адсорбционният слой достига до оптимално уплътняване. Това съответства на адсорбционен слой показан на Фигура 5.6А, който е получен след осцилации на площта при достигане на налягане $\Pi = 50 \text{ mN/m}$.



(A)



(B)

Фигура 5.10. (A) Графика изобразяваща зависимостта $\Pi(A)$. Крива 1a, 3a, 4a и 6a съответстват на данните получени от експерименти с осцилации след етапите на свиване 1, 2, 4 и 6 във Фигура 5.2. (Б) Фигурата показва зависимостта на еластичността E от повърхностното налягане Π . Направено е сравнение на данните от етапите на самото свиване 1, 2, ..., 6 (Фигура 5.2) с тези получени от експериментите от осцилации 1a, 2a, ..., 6a след всеки един етап (Фигура 5.10А).

На Фигура 5.10Б Етапи 5, 6 и 6a не се подчиняват на общата тенденция E да нараства линейно с увеличаване на повърхностното налягане Π (показана с прекъснатата наклонена линия). Етап 5 съответства на последния етап при стъпковото свиване показано на Фигура 5.2, при който се наблюдава появата на гънки по повърхността. Поради нагъването промяната на площта на ваната е много различно от промяната на истинската площ на слоя, т.е. изчислената еластичност не трябва да се сравнява с тази от другите етапи. Етапи 6 и 6a съответстват на непрекъснато свиване без спиране за осцилации, както е при стъпковата изотерма. Различната деформация на слоя води до разлики в мезоскопската структура, и в еластичността, съответно.

5.3. Основни резултати и заключения

Резултатите ни потвърдиха, че разтечен на междофазовата граница вода–въздух, HFBI не се десорбира от повърхността (Фигура 5.1). AFM наблюденията показаха, че мезоскопската структура на разтечения слой протеин е силно нехомогенна: съставена от празнини, монослойни и мултислойни участъци (Фигура 5.3). При продължителна деформация на повърхностния слой (например с осцилации) празнините се запълват, а части от монослой могат да се трансформират в трислой. Анализът на промените показва, че са възможни два различни модела на образуване на трислой: чрез нагъване и подпъхване на слой HFBI един под друг, подобно на липидни слоеве (Фигура 5.7А), или чрез изтласкване на агрегати (Фигура 5.7Б). Образуването на такъв тип структури е свързано с факта, че не само хидрофобните, но и хидрофилните участъци от молекулата HFBI прилепват една към друга във водна среда (Basheva et al, 2011a).

Еластичността на разширение на разтечен слой HFBI зависи от структурата на слоя, която се променя в зависимост от приложените деформации. Затова еластичностите определени от осцилации на площта са значително по-високи от тези определени от наклона на изотермите $P(A)$. Осцилациите водят до уплътняването на слоя, намаляване на празнините, и по този начин – до увеличаване на еластичността. Тези резултати показват пряката връзка между мезоскопската структура и еластичността на слоеве хидрофобин.

Основни приноси на дисертацията:

1. Експериментално са изследвани повърхностните и реологични свойства на адсорбционни слоеве от глобуларен протеин (BSA), неструктуриран β -casein, и техни смеси с измерване на повърхностното напрежение, реологичните параметри на разширение и поведението на тънките течни филми. Потвърдени са заключенията от литературата за свойствата на индивидуалните протеини. Анализът на даните за смесени протеинови адсорбционни слоеве показва, че те имат различни свойства в зависимост от реда на адсорбиране на компонентите и ни позволява да изкажем аргументирани хипотези за възможната структура на слоевете.

2. Количествено са охарактеризирани смесените адсорбционни слоеве от хидрофобин (HFBII) и натриев додецил сулфат (SDS) на повърхност разтвор-въздух получени чрез паралелна или последователна адсорбция на компонентите с измервания и анализ на повърхностното напрежение, σ , еластичността на разширение, E_{dil} , и поведението на тънките течни филми. Показано е, че HFBII адсорбиран веднъж на междуфазовата граница вода-въздух не може да бъде изместен от SDS независимо от концентрацията му във водата. Наблюдавани са две метастабилни състояния на HFBII и SDS над критичната му концентрация на мицелообразуване: смесени хидрофилни агрегати от HFBII и SDS в обема; адсорбиран HFBII (със SDS) на междуфазовата граница. Еднозначно е показано, че адсорбционните слоеве съдържащи протеин са чисто еластични. Получени са универсалните зависимости $E_{dil}(\sigma)$, които по същество представляват диференциалните двумерни уравнения на състоянието на слоя. Изказана е възможна хипотеза за високите стойности на еластичността дори и в присъствие на SDS и протеинови агрегати.

3. Чрез комбинирани експерименти с Лангмюрова вана и атомно силов микроскоп е изследвано поведението на разтечени хидрофобинови (HFBII) слоеве на водна повърхност над фазов преход. Определена е мезоскопската структура на нееднородните адсорбционни слоеве – празнини, монослоеви и два типа трислойни структури. Чрез структурата на слоя при различни двумерни налягания са обяснени съответните високи стойности на повърхностната еластичност (до 500 mN/m).

Списък на публикациите по дисертацията

- Д1. Marinova, K. G.; Stanimirova, R. D.; Georgiev, M. T.; Alexandrov, N. A.; Basheva, E. S.; Kralchevsky, P. A. (2013) Co-Adsorption of the Proteins β -casein and BSA in Relation to the Stability of Thin Liquid Films and Foams. *In Colloid and Interface Chemistry for Nanotechnology* (P.A. Kralchevsky, R. Miller and F. Ravera, Eds.). Taylor & Francis, New York, pp. 439–458.
- Д2. Stanimirova, R. D.; Gurkov, T. D.; Kralchevsky, P. A.; Balashev, K. T.; Stoyanov, S. D.; Pelan, E. G. (2013) Surface Pressure and Elasticity of Hydrophobin HFBII Layers on the Air-Water Interface: Rheology vs. Structure Detected by AFM Imaging. *Langmuir*, 29, 6053–6067.
- Д3. Stanimirova, R. D.; Marinova, K. G.; Danov, K. D.; Kralchevsky, P. A.; Basheva, E. B.; Stoyanov, S. D.; Pelan E. G. Competitive Adsorption of HFBII Hydrophobin and Surfactant: Sequential vs Parallel Adsorption and Effect of Surfactant Micelles. (2014) *Colloids and Surfaces A, submitted for publication*.

Други публикации с участието на дисертанта:

1. Stanimirova, R.D.; Marinova, K. G.; Tcholakova, S. S.; Denkov, N. D.; Stoyanov, S. D.; Pelan, E. G. (2011) Surface Rheology of Saponin Adsorption Layers., *Langmuir*, 27, 12486-12498.

Материали по дисертацията са докладвани на следните форуми:

1. Krastanka Marinova, Romyana Stanimirova, Mihail T. Georgiev, Nikola Alexandrov, Elka Basheva “Co-adsorption in solutions of BSA and β -casein studied by solution exchange experiments with pendant bubbles and thin films”, COST D43 Symposium, Borovets, Bulgaria, 14 – 15 July, 2010 - постер
2. Krastanka G. Marinova, Elka Basheva, Romyana Stanimirova, Mihail T. Georgiev, Nikola Alexandrov, Krassimir D. Danov, Peter A. Kralchevsky “Co-adsorption in mixed protein and/or surfactant solutions studied by solution exchange experiments with pendant bubbles and thin films”, Workshop "Smart and Green Interfaces, Prague, Czech Republic, 21-22.03.2013 – устен доклад
3. T. D. Gurkov, R. D. Stanimirova, and B. D. Nenova “Rheology of interfacial layers at different density and degree of entanglement” Workshop "Smart and Green Interfaces, COST Action MP1106, Prague, Czech Republic, 21-22.03.2013 – устен доклад
4. Румяна Д. Станимирова, Кръстанка Г. Маринова, Михаил Т. Георгиев, Никола А. Александров. Елка С. Башева, Петър А. Кралчевски. „Адсорбция от смесени разтвори на β – casein и BSA като стабилизатори на тънки течни филми и пени”, XII

национална конференция по химия за студенти и докторанти, София, май, 2013 – устен доклад.

5. Theodor D. Gurkov, Romyana D. Stanimirova, Peter A. Kralchevsky, Konstantin T. Balashev, Simeon D. Stoyanov, Eddie G. Pelan., “Surface Pressure and Elasticity of Hydrophobin HFBII Layers on the Air – Water Interface: Rheology vs. Structure Detected by AFM Imaging”, ECIS 2013, 27th Conference of European Colloid and Interface Society, Sofia, Bulgaria, 1-6 September 2013 – устен доклад
6. Romyana D. Stanimirova, Krastanka G. Marinova, Krassimir D. Danov, Peter A. Kralchevsky, Simeon D. Stoyanov, Eddie G. Pelan, “Competitive adsorption of HFBII hydrophobin and surfactant: Sequential vs. parallel adsorption and effect of surfactant micelles”, ECIS 2013, 27th Conference of European Colloid and Interface Society, Sofia, Bulgaria, 1-6 September 2013 – постер
7. Mihail T. Georgiev, Krastanka G. Marinova, Rumiana D. Stanimirova, Nikola A. Alexandrov, Elka S. Basheva, Peter A. Kralchevsky, “Co-Adsorption of the Proteins β -Casein and BSA in Relation to the Stability of Thin Liquid Films and Foams”, ECIS 2013, 27th Conference of European Colloid and Interface Society, Sofia, Bulgaria, 1-6 September 2013 – постер