

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ

Катедра по Инженерна химия и фармацевтично инженерство

Лидия Манолова Димитрова

**Стабилизация на пени и емулсии с протеина хидрофобин и
негови смеси с други протеини**

Автореферат

представена за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“

4.2. Химически науки (Теоретична химия)

Научни ръководители: Акад. проф. дфзн Петър А. Кралчевски
Доц. д-р Кръстанка Г. Маринова

Научен консултант: Чл.-кор. проф. дмн Красимир Д. Данов

София, 2017

Глава 1. Увод

Дисперсните системи, като пени и емулсии, намират широко приложение в бита. Продукти, които представляват пяна, се срещат в препаратите за лична хигиена и за почистване на дома, както и в редица хранителни продукти. Пените намират приложение в строителството при получаването на изолационни материали, а също така и при пенната флотация, извличането на нефт и природен газ, в пожарогасенето и др. Емулсиите също намират приложение в хранителна индустрия, козметиката, нефтопреработването и много други.

1.2. Протеинът HFBI като пеностабилизатор и емулгатор

Протеините често се използват като емулгатори и по-рядко като пеностабилизатори. Те се адсорбират на междуфазовата граница и образуват монослой или мултислой, а във водната фаза образуват агрегати с различни размери. Протеиновите молекули са изградени от аминокиселини, които могат да имат положително или отрицателно заредени функционални групи, или пък да са електронеутрални, с хидрофилна (полярна незаредена) или хидрофобна странична верига.

В настоящата дисертация са изследвани свойствата на протеина HFBI, хидрофобин от клас II изолиран от гъбата *Trichoderma reesei*, като пеностабилизатор и емулгатор. Хидрофобините се синтезират от нишковидните гъби (filamentous fungi), включително и някои ядливи гъби, като печурката (Linder, 2009). Хидрофобините са силно повърхностно активни молекули, които образуват плътни адсорбционни слоеве на границите вода/въздух и вода/масло. Тези слоеве се отличават с най-високите еластични модули при деформации на разтягане и прехлъзване измежду всички изследвани протеини (Danov et al., 2015).

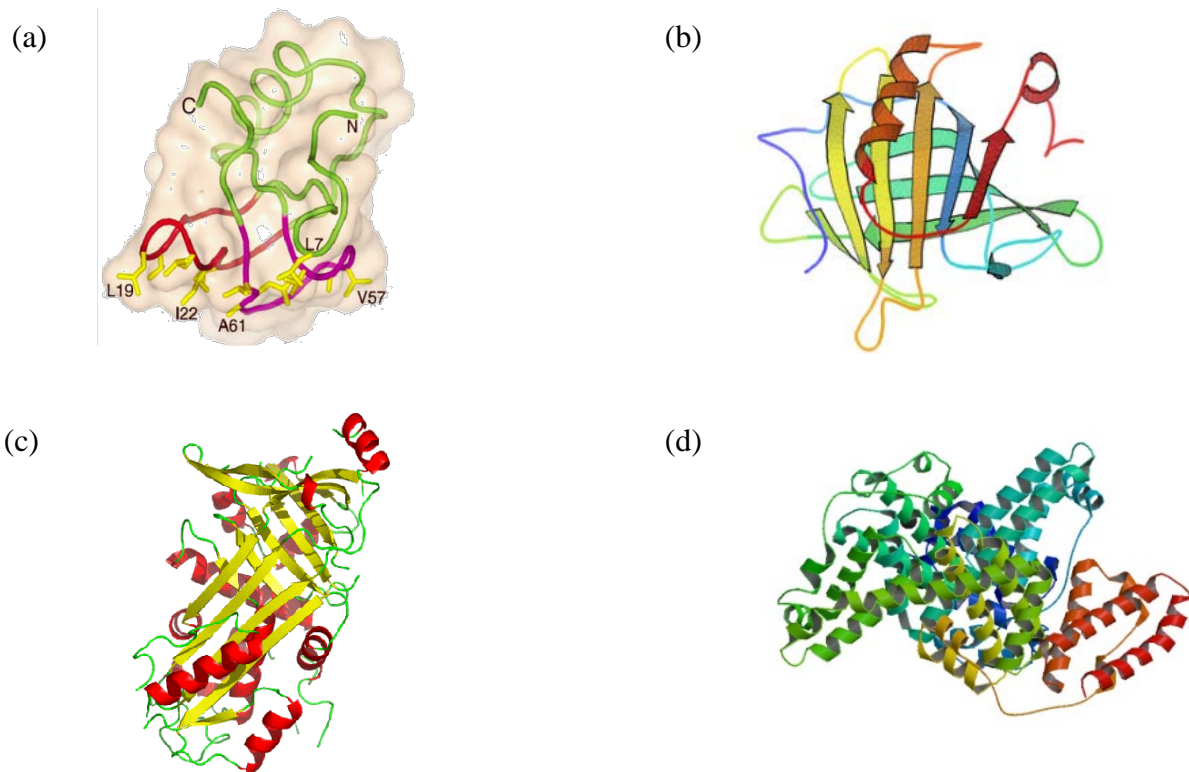
Хидрофобините се разделят на два класа: (i) хидрофобини от клас I, например SC3 който се извлича от *Schizophyllum commune*, и (ii) хидрофобини от клас II, например HFBI и HFBI извлечени от *Trichoderma reesei* (Wösten et al., 2015, Lienemann et al., 2013). Хидрофобините от клас I са водонеразтворими, докато хидрофобините от клас II са разтворими във водна среда, където образуват агрегати.

HFBI е относително малък протеин, ≈ 70 аминокиселинни остатъка, включително осем цистеинови остатъка, които образуват четири дисулфидни моста и водят до високата стабилност на молекулата на този протеин. Структурата на HFBI определена от изкристиализирани проби показват, че този протеин има приблизително формата на паралелепипед с размери $24 \times 27 \times 30 \text{ \AA}$ (Nakanpää et al., 2015). Молекулите на HFBI са силно амфибилни – всяка от тях има добре изразена хидрофобна и хидрофилна част, подобно на янус-частица (Tucker et al., 2015). Тези стабилни протеинови молекули се държат

като частици, за разлика от молекулите на неподредените протеини (като β -казеин), които имат поведение на полимери (Dickinson et al., 2016). Друго забележително свойство на хидрофобините молекули, е че трудно се денатурират. Например, при тяхната адсорбция на течни повърхности и при нагряване на техен воден разтвор до 90 °C не се наблюдават признаци за денатуриране (Askolin et al., 2006; Linder, 2009).

1.6. Цел и структура на дисертацията

Нашата цел е да изследваме свойствата на протеина HFBIII като пеностабилизатор и емулгатор. В случая на пени (вж. Глава 3), интерес представляват ефектите от рН и от добавянето на регулярни протеини (BLG, OVA, BSA; Фиг. 2.1) върху стабилността на пените и върху размера на мехурчетата в тях. Понастоящем, HFBIII е относително скъп протеин и затова в приложения е целесъобразно той да бъде частично заменен от друг (регулярен) протеин като β -лактоглобулин (BLG), овалбумин (OVA) и говежди серум албумин (BSA), без при това да се влошава стабилността и дисперсността на пяната. По стандартни формули са изчислявани средни стойности на радиуса на мехурчетата, като R_{10} и R_{32} . В допълнение към това, показано е, че масовият баланс на протеина в пяната дава възможност от нейната кратност да се оцени средният радиус, a_{32} , на адсорбираните протеинови агрегати.



Фиг. 2.1. Третична структура на молекулите на използваните протеини: (a) HFBIII; (b) BLG; (c) OVA; (d) BSA.

В Глава 4 представяме първото *системно* изследване на свойствата на HFBIII като емулгатор, включително ефектите от концентрацията на HFBIII и от обемната част на маслената фаза върху разпределението на капките по размери и стабилността на образуваните емулсии. Най-напред, установено е каква е праговата стойност на междуфазовото напрежение, при която се втвърдява адсорбционният слой от HFBIII на границата вода/масло (върху повърхността на емулсионните капки). По-нататък, с оптични наблюдения са определени пряко разпределенията на емулсионните капки по размери и от тях са изчислени средните радиуси R_{10} and R_{32} , и е изследвана тяхната зависимост (i) от концентрацията на протеин; (ii) от обемната част на маслото, и (iii) от времето на съхранение (до 50 дни).

Докато емулсиите стабилизирани с хидрофобин са много стабилни при покой, оказва се, че те лесно се разрушават при разбъркване. Това е свързано с факта, че пространствената мрежа от прилепнали една към друга емулсионни капки, покрити с втвърдени (и чупливи) слоеве от хидрофобин, се разкъсва от приложените механични напрежения. Демонстрирано е, че разрушаването на емулсията при разбъркване може да се предотврати ако емулсионните капки се покрият с втори адсорбционен слой от регулярен протеин, например BLG. За отбелязване е, че докато BLG е слаб пеностабилизатор, той е отличен емулгатор, понеже неговата естествена биологична функция е да стабилизира млякото (емулсия масло-във-вода). В това отношение, интерес представлява да сравним свойствата на BLG и HFBIII като емулгатори, което също е направено в Глава 4.

Накрая, в Глава 4 е изследвано дали плътните адсорбционни слоеве от HFBIII могат да предотвратят оствалдовото зреене в прави емулсии, при които молекулите на маслената фаза притежават забележима разтворимостта във вода. За целта са емулгирани две такива масла, ксилен и лимонен, като експериментално са определени разпределенията на емулсионните капки по размери и тяхната еволюция с времето. Резултатите за HFBIII са сравнени с тези получени с други емулгатори.

Глава 2. Използвани материали и експериментални методи

2.1. Използвани материали

Използвахме следните протеини за стабилизиране на пените и/или емулсиите:

(1) HFBIII е хидрофобин от клас II, който е изолиран от нишковидната гъба *Trichoderma reesei* (Basheva et al., 2011a). С молекулна маса $M_w = 7.2$ kDa; молекулата му има размери $24 \times 27 \times 30$ Å [Наканпää et al., 2004] и се състои се от 70 аминокиселини; богата е на

аминокиселината цистеин и е свързана с 4 дисулфидни моста. Молекулата на HFBI е силно повърхностно активна. Във водни разтвори, с течение на времето HFBI образува агрегати, които разрушавахме чрез третиране на разтвора в ултразвукова вана (соникаване) преди за започнем експериментите.

(2) β -лактоглобулин (BLG) е млечен протеин с молекулна маса $M_w = 18.3$ kDa; състои се от 162 аминокиселини с 2 дисулфидни моста.

(3) Овалбумин (OVA) е глобуларен протеин изолиран от яйца с молекулна маса, $M_w = 45$ kDa и полипептидна верига състояща се от 385 аминокиселини с един дисулфиден мост.

(4) Говежди серумен албумин (BSA съкратено от bovine serum albumin) е четвъртият протеин, който използвахме в нашите експерименти. Той е глобуларен протеин изграден 580 аминокиселини със 17 дисулфидни моста. От използваните протеини BSA е с най-голяма молекулна маса, $M_w = 66.4$ kDa.

За разлика от повечето протеини, HFBI е отличен пеностабилизатор. Протеините BLG, BSA и OVA, които са лоши пеностабилизатори, в дисертацията за краткост ще наричаме “регулярни” протеини.

(5) Обезмаслено мляко на прах (SMP съкратено от skim milk powder) използвахме за стабилизирането на емулсии в сравнителни експерименти по изследване на оствалдово зреене. SMP съдържа 35 wt% протеини, които са преобладаващо казеини и суроватъчни протеини, а останалото е лактоза и някои минерали.

Използвахме и водоразтворимото нейонно повърхностно-активно вещество Tween 20, полиоксиетилен 20–сорбитан монолаурат, $C_{58}H_{114}O_{26}$, с молекулна маса 1.228 kDa. В някои от експериментите използвахме, натриев додецил сулфат (SDS), с молекулна маса 288.37 g/mol, произведен от Acros.

Течните въгледороди (масла), които използвахме за емулсиите са следните:

Соево масло (SBO) произведено от местен производител; пречистено от нас през колона пълна с адсорбентите флорисил и силикагел 60. За да проверим дали маслото е пречистено от замърсители, измерихме междуфазовото напрежение, което беше 30.5 ± 0.5 mN/m, което е много близо до литературната стойност 31 mN/m [Gaonkar et al., 1991].

В емулсиите със соево не може да има оствалдово зреене, защото соевото масло е практически неразтворимо във вода. За да проверим дали HFBI може да спре оствалдовото зреене, ние проведохме експерименти с две органични течности, които имат забележима разтворимост във вода:

Лимоненът (4-isoprenyl-1-methylcyclohexene) има вискозитет 10 mPa·s; плътност 0.841 g/cm³; молекулна маса 136.24 g/mol, и разтворимост във вода 13.8 mg/L при 25 °C [Yalkowsky et al., 2010; Santos et al., 2015].

Ксилен (диметилбензен) C₈H₁₀ (смес от орто-, мета- и пара-ксилен); вискозитет 0.61 mPa·s; плътност 0.864 g/cm³; молекулна маса 106.16 g/mol; наличните данни за разтворимостта му във вода са в интервала 161–178 mg/L при 25 °C [Yalkowsky et al., 2010].

2.2. Експериментални методи

2.2.1. Получаване на пяна и оптични наблюдения на пяна

За провеждане на експериментите използвахме 3 mL разтвор в 25 mL чаши. След това, соникирахме разтвора за 20 секунди в ултразвукова вана с цел разрушаване на протеиновите агрегати. За получаване на пени използвахме два миксера: Nescafe frappe NE-12E (миксер № 1) със скорост на въртене 16 20 krpm и Multifunction Frotheir 464701 (миксер № 2) със скорост на въртене 6 – 8 krpm. При по-ниска концентрация на протеин (≤ 0.5 wt% HFВII), използването на миксер № 1 за 60 секунди не бе достатъчно за получаване на фина пяна. В този случай, получавахме пяна чрез последователно използване на миксери № 1 и № 2, за по 60 секунди всеки.

Веднага след получаване на пяната, проведохме оптични наблюдения като част от нея бе поставена в съдче на Петри (дълбоко 3mm) покрито с покривно стъкло за да се спре изпарението на вода. Снимки (видеозаписи) на пяната направихме с помощта на микроскоп. Използвахме софтуер за полуавтоматичен анализ на снимки (видео-кадри) за да определим разпределението по размери на мехурчетата в пените. За дадена пяна, разпределението на мехурчетата по размери бе получавано въз основа на данни за измерените диаметри на 250–1400 мехурчета (всичките мехурчета, които се виждат на една и съща снимка). Минималният брой, 250, съответства на пяна с по-едри мехурчета.

2.2.2. Изследване стабилността на пени

При изследваните пени с HFВII, целият разтвор се превръщаше в пяна. По правило, тази пяна е вискозна и слой от нея остава отложен по стените на стъклената чаша. Поради тази причина, поставяхме получената пяна в полипропиленова спринцовка от 20 mL. Спринцовките с пените съхранявахме в хладилник при 4 °C и не беше нужно да добавяме

NaN₃. (Ако пяната се съхранява при 25 °С, стабилността ѝ драстично намалява). Експериментите показаха, че материалът на съда, в който съхранявахме пените (полипропилен или стъкло) не оказва влияние върху стабилността им. Възможна причина за това може да бъде обстоятелството, че пените не са в директен контакт с твърдата повърхност, а с адсорбционен слой от хидрофобин, който покрива стените на съда. Известно е, че HFВII спонтанно образува адсорбционни покрития върху твърди повърхности.

Измервахме обема и теглото, $V_F(t)$ и $G_F(t)$, на пените поставени в спринцовки като функция на времето, t . Трябва да се отбележи, че G_F , се определяше, чрез измерване на теглото на пяната след отстраняване на отделения серум (изтеклата течност). Както вече стана дума, в присъствие на HFВII първоначално (при $t = 0$) цялото количество разтвор (3 mL) се превръщаше в пяна. С течение на времето, при някои пени част от водата (серум) се отделяше под пяната. Серума отстранявахме през накрайника на спринцовката, и след това измервахме теглото на пяната, $G_F(t)$, съответстващо на време на съхранение t .

След като сме определили обема и теглото, $V_F(t)$ и $G_F(t)$, можем да изчислим обемната част на въздуха в пяната, Φ , от формулата:

$$\Phi(t) = \frac{V_F(t) - G_F(t) / \rho_w}{V_F(t)} \quad (2.1)$$

където, $\rho_w = 1 \text{ g/cm}^3$ е масовата плътност на водната фаза.

Кратността на пяната (overrun, O_{vr}) определяхме от следната формула [Raymundo et al., 1998]:

$$O_{vr}(t) = \frac{\text{Foam volume} - \text{Solution volume}}{\text{Solution volume}} = \frac{\Phi(t)}{1 - \Phi(t)} \quad (2.2)$$

По-голяма кратност означава, че по-голямо количество пяна е получено от водния разтвор при разпенването му. В началния момент след получаването на пяната, кратността ѝ бе оценявана при допускане, че при $t = 0$ няма изтичане на вода, в съответствие с нашите експериментални наблюдения.

От измерените радиуси на мехурчетата изчислихме средните радиуси R_{10} и R_{32} , както следва:

$$R_{10} = \frac{\sum_{i=1}^N R_i}{N}, \quad R_{32} = \frac{\sum_{i=1}^N R_i^3}{\sum_{i=1}^N R_i^2} \quad (2.3)$$

Подходът на масовите баланси, използван от други автори за характеризиране на емулсии стабилизирани с монодисперсни частици/протеинови молекули [Wiley et al., 1954, Tcholakova et al., 2002, Tcholakova et al., 2003, Arditty et al., 2003], може да се обобщи за случай на *полидисперсни* частици (агрегати от HFBI) за да се изведе израз за кратността на пени стабилизирани с хидрофобин [Jin et al., 2012].

$$O_{vr} = \frac{w_p \rho_w R_{32}}{4 \varphi_a \rho_p a_{32}} \quad (2.4)$$

При извода на ур. (2.4) е допуснато, че протеинът присъства под формата на частици (агрегати) със среден радиус обем-повърхност a_{32} ; w_p е тегловната част на протеина във водния разтвор; ρ_p е масовата плътност на протеина. Също така, допуснато е, че по време на разпенването всички частици са се адсорбировали върху повърхностите на образувалите се мехурчета; φ_a е частта от границата вода/въздух (на повърхността на мехурчетата), която е покрита с частици. Тези допускания са напълно реалистични, понеже е известно, че в разтвори HFBI съществува преобладаващо под формата на агрегати [Cox et al., 2007, Zhang et al., 2011a].

2.2.3. Емулгиране и оптични наблюдения на емулсиите

За емулгиране използвахме ротор-статор хомогенизатор Ultra Turrax T25 digital на фирмата IKA; диспергиращ елемент S25N-10G със скорости на въртене между 3000 и 25 000 rpm. Емулсиите бяха приготвени в 100 mL чаши. Общият обем на разтвора (водна и маслена фаза) беше 40 mL. Първо, соникирахме водната фаза в ултразвукова вана за 20 s, за да се разрушат протеиновите агрегати. (При използваната ниска мощност на соникване отсъстват сонохимични ефекти). След това, приготвихме *премикс* на емулсията с Ultra Turrax при 12 000 rpm за 3 минути, и накрая разбърквахме *премикса* при 24 000 rpm за 5 минути.

Наблюдавахме получените емулсии под микроскоп в преминала светлина. Разпределението на емулсионните капки по размери определяхме както за пряно приготвени емулсии, така и за емулсии след съхранение за определен период време. За да

можем да измерим диаметрите на отделните капки, емулсиите бяха разреждани в 5 mM воден разтвор на SDS. Наблюденията проведохме с микроскоп Аxioplan свързан със CCD камера и дигитално записващо видео устройство, оборудвано с обектив Epiplan, 50x.

2.2.4. Режими на емулгиране

Експериментално могат да се наблюдават два различни режима на емулгиране, ограничена коалесценция [Wiley, 1957; Whitesides et al., 1995; Arditty et al., 2003; Golemanov et al., 2006] и режим на Колмогоров [Kolmogorov, 1949; Hinze, 1955; Walstra, 1983; Walstra et al., 1999; Tcholakova et al., 2004; Tcholakova et al., 2006]. При режим на *ограничена коалесценция*, който се среща при по-ниска концентрация на протеин и/или при по-високи обемни части на маслената фаза, адсорбционният протеинов слой на повърхността на емулсионните капки не е достатъчно плътен за да предотврати тяхната коалесценция. В резултат на сливането на две капки се образува по-голяма капка, която има по-малка площ от изходните две капки, докато броят на адсорбираните молекули остава същият. Това води до формирането на по-плътен адсорбционен слой и спиране на по-нататъшната коалесценция.

Ако разбъркването по време на емулгиране е достатъчно дълго и интензивно, може да допуснем, че *цялото* количество HFВII се е адсорбирало на повърхността на емулсионните капки, като по този начин се е изградил плътен адсорбционен слой, който съдържа агрегати. В този случай, средният радиус обем-повърхност, R_{32} може да бъде изразен по формула, която е еквивалентна на ур. (2.4) по-горе:

$$R_{32} = \frac{4\rho_{\text{HFВII}}}{\rho_w} \frac{\Phi_{\text{oil}}}{1 - \Phi_{\text{oil}}} \frac{a_{32}}{C_{\text{HFВII}}} \quad (2.9)$$

където Φ_{oil} е обемната част на маслото (дисперсната фаза) в емулсията; $\rho_{\text{HFВII}}$ и ρ_w масовите плътности на HFВII и вода; $C_{\text{HFВII}}$ е тегловната част на HFВII във водната фаза; площната част, φ_a , на адсорбирания се протеин върху повърхността на капките е приета да е равна на 1 за плътен адсорбционен слой (мембрана) от HFВII; a_{32} средният радиус обем-повърхност за адсорбираните се HFВII агрегати:

$$a_{32} = \left(\sum_{i=1}^N a_i^3 \right) / \left(\sum_{i=1}^N a_i^2 \right) \quad (2.10)$$

При достатъчно висока концентрация на протеин и/или достатъчно ниска обемна част на маслената фаза емулгирането е в *режим на Колмогоров*. В този режим, разпределението по размери се определя от енергията вложена за диспергиране на капките от хомогенизатора.

Както е установено в изследванията на Колмогоров и Хинце [Kolmogorov, 1949; Hinze, 1955], средният диаметър на капките се определя от взаимодействието на емулсионните капки с турбулентните вихри създадени от хомогенизатора. Приема се, че концентрацията на повърхностно активното вещество е достатъчно висока, така че образувалите се капки не коалесцират; виж. също [Walstra, 1983, Walstra et al., 1999, Tcholakova et al., 2004, Tcholakova et al., 2006]. Режимите на разкъсване на капките от турбулентните вихри са два: (1) Турбулентен-инерционен режим, вихрите са сравними или по-малки по размер от маслените капки и могат да ги разцепят при сблъсък. (2) турбулентен-вискозен режим, вихрите са по-големи от капките, и действат като мелница. Като правило, капките получени във вискозен режим са по-малки от тези в инерционен режим. Средните диаметри, d_K , на капките получени във въпросните два режима са [Kolmogorov, 1949, Hinze, 1955, Walstra, 1983, Walstra et al., 1999, Tcholakova et al., 2004, Tcholakova et al., 2006]:

$$d_K \approx \varepsilon^{-2/5} \sigma^{3/5} \rho_c^{-1/5} \quad (\text{inertial regime}) \quad (2.11)$$

$$d_K \approx \varepsilon^{-1/2} \sigma \eta_c^{-1/2} \quad (\text{viscous regime}) \quad (2.12)$$

където ε е вложената механична енергия за единица време и единица обем; σ е междуфазовото напрежение на границата масло/вода; η_c и ρ_c съответно са вискозитет и масова плътност на непрекъснатата (в нашия случай – водната) фаза. Трябва да се отбележи, че d_K в ур. (2.11) и (2.12) зависи нито от концентрацията на протеин, $C_{\text{НФВП}}$, нито от обемната част на маслото, Φ_{oil} , за разлика от случая на ограничена коалесценция, описан от ур. (2.9).

2.2.5. Експериментални и теоретични разпределения по размери

Радиусите на съвкупност от N на брой мехурчета или капки бяха измерени чрез полуавтоматичен анализ на образи. За всеки набор от данни, радиусите бяха подредени в нарастващ ред, R_1, R_2, \dots, R_K , където K е общият брой на различните радиуси на мехурчета/капки. Всеки радиус на мехурче/капка, R_i , се появява n_i пъти в оригиналния набор от данни, $i = 1, 2, \dots, K$. (Например, ако сме измерили размерите на 400 мехурчета/капки, може пет различни мехурчета/капки да имат радиус $R_i = 10.7 \mu\text{m}$; в такъв случай $n_i = 5$.) Общият брой на мехурчетата/капките е:

$$N = \sum_{i=1}^K n_i \quad (2.13)$$

По определение кумулативната функция $f(R_i)$ е равна на броя на мехурчета/капките с радиус $R \leq R_i$. Функцията $f(R_i)$ е нормирана с общия брой мехурчета, N [Vox et al., 2005, Crow et al., 1988]:

$$f(R_i) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^i n_j \quad (2.14)$$

Като се използва ур. (2.14) може да се пресметне $f(R_i)$ за всички експериментално определени радиуси на мехурчетата, R_i . Често размерите на мехурчетата/капките в пени/емулсии се подчиняват на *логнормално разпределение*. Неговата плътност на вероятността може да се представи във вида [Vox et al., 2005, Crow et al., 1988]:

$$p(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{1}{\ln \sigma_d} \exp \left[-\frac{\ln^2(R/\bar{R})}{2 \ln^2 \sigma_d} \right] \quad (R > 0) \quad (2.15)$$

Физически, $p(R)d(\ln R)$ е броят на мехурчетата/капките с радиус, който е в интервал $[\ln R, \ln R + d(\ln R)]$; \bar{R} е средният радиус, а σ_d е безразмерната дисперсия ($\sigma_d > 1$). Пикът на разпределението $p(R)$, дефинирано с ур. (2.15), е симетричен ако R се нанесе в логаритмичен мащаб. Радиусът на 50% от мехурчетата/капките принадлежат на интервала $\bar{R}/\sigma_d \leq R \leq \bar{R}\sigma_d$, характеризиращ полидисперсността на разпределението. В граничния случай $\sigma_d \rightarrow 1$, ур. (2.15) се свежда до нормално (гаусово) разпределение.

Кумулативната функция, $f(R)$, която съответства на логнормалното разпределение, ур. (2.15), е

$$f(R) \equiv \int_{-\infty}^{\ln R} p(\hat{R}) d(\ln \hat{R}) = \frac{1}{2} \left\{ 1 + \operatorname{erf} \left[\frac{\ln(R/\bar{R})}{\sqrt{2} \ln \sigma_d} \right] \right\} \quad (2.16)$$

Където \hat{R} интеграционна променлива и $\operatorname{erf}(x)$ е функция на грешките (Korn, 1968). При интерпретация на опитни данни, напасвахме експерименталната функция $f(R_i)$, зададена от ур. (2.14), с теоретичната крива дефинирана с ур. (2.16); при това, стойностите на \bar{R} и σ_d бяха варираны и определяни от най-добрата апроксимираща крива. После, замествайки получените \bar{R} и σ_d в ур. (2.15), пресмятахме и теоретичната крива $p(R)$.

В някои случай, опитните данни могат да се опишат с *бимодално логнормално разпределение*. Изразът за функцията на вероятностите, $p(R)$, за това разпределение представлява сума от две различни унимодални логнормални разпределения с тегловни коефициенти β_1 и $\beta_2 = 1 - \beta_1$; със средни радиуси R_{d1} и R_{d2} , и безразмерни дисперсии σ_1 и σ_2 [Christov et al., 2008]:

$$p(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{\beta_1}{\ln \sigma_1} \exp\left[-\frac{\ln^2(R/R_{d1})}{2 \ln^2 \sigma_1}\right] + \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{\beta_2}{\ln \sigma_2} \exp\left[-\frac{\ln^2(R/R_{d2})}{2 \ln^2 \sigma_2}\right] \quad (2.17)$$

Кумулативната функция, $f(R)$, съответстваща на бимодално логнормално разпределение е [Christov et al., 2008]:

$$f(R) \equiv \int_{-\infty}^{\ln R} p(\xi) d(\ln \xi) = \sum_{i=1}^2 \frac{\beta_i}{2} \left\{ 1 + \operatorname{erf} \left[\frac{\ln(R/R_{di})}{\sqrt{2} \ln \sigma_i} \right] \right\} \quad (2.18)$$

В случай на бимодално разпределение, експерименталната кумулативна функция $f(R_k)$, определена от ур. (2.14), напасвахме с теоретичната зависимост $f(R)$ зададена с ур. (2.18) и определяхме стойностите на β_1 , R_{d1} , R_{d2} , σ_1 , и σ_2 от най-добрата апроксимация.

Глава 3. Свойства на пени получени от водни разтвори на хидрофобин и негови смеси с други протеини

В Глава 3 от дисертацията сме изследвали пенливостта на водни разтвори на хидрофобин HFBI, стабилността на пените и размерите на мехурчетата при различни стойности на рН и концентрация на добавен млечен или яйчен протеин. Стабилността на пяната е охарактеризирана чрез проследяване промяната на нейните обем и тегло с времето. Изследвали сме още как добавянето на други „регулярни“ протеини, като β -лактоглобулин (BLG), овалбумин (OVA) и говежди серумен албумин (BSA), към разтвора на HFBI влияе върху стабилността на получените пени. Целта е да проверим дали е възможно да се замени част от (засега) скъпия хидрофобин с „регулярен“ протеин, без при това да се влошат качествата на пяната.

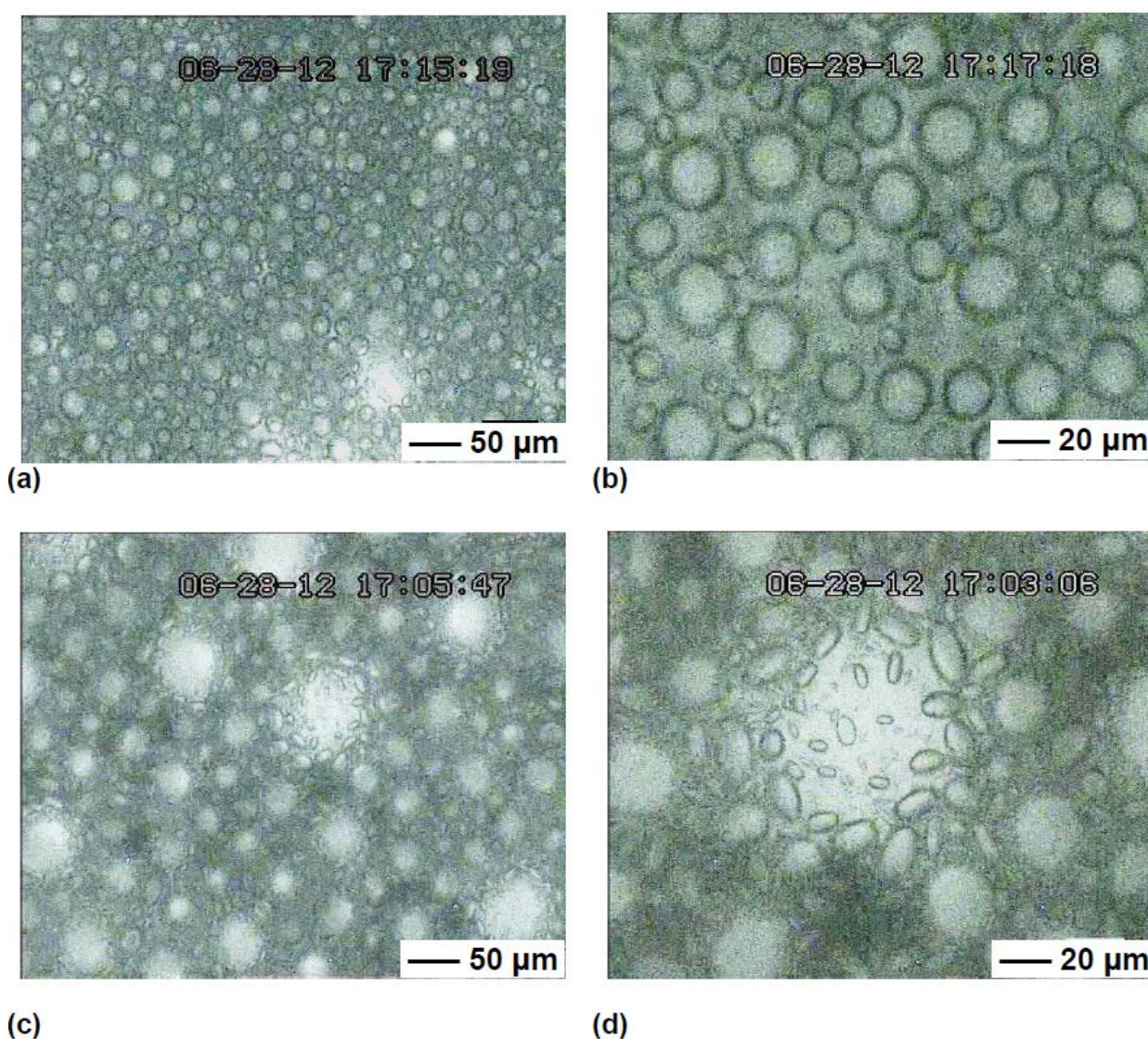
3.1. Разпределения по размери на мехурчетата в пените

Изследвахме разпределението по размери на мехурчетата в получените пени стабилизирани с HFBI. На Фиг. 3.1 са показани снимки на пени получени от разтвори с различна концентрация на HFBI. При по-високата концентрация на HFBI, 0.8 wt%

Фиг. 3.1a,b, получихме фина пяна с миксер № 1 за 60 секунди. При по-ниската концентрация на HFBI, 0.5 wt% Фиг. 3.1c,d, ползвайки миксер № 1 за 60 секунди не беше получена фина пяна. В този случай, получихме пяната като използвахме последователно миксер № 1 и № 2, всеки за по 60 s. Както се вижда на Фиг. 3.1c,d, в този случаи са се образували както по-големи така и по-малки мехурчета. По-големите мехурчета се получават главно при разбъркването с миксер № 1, докато по-малките мехурчета се получават с миксер № 2. Като

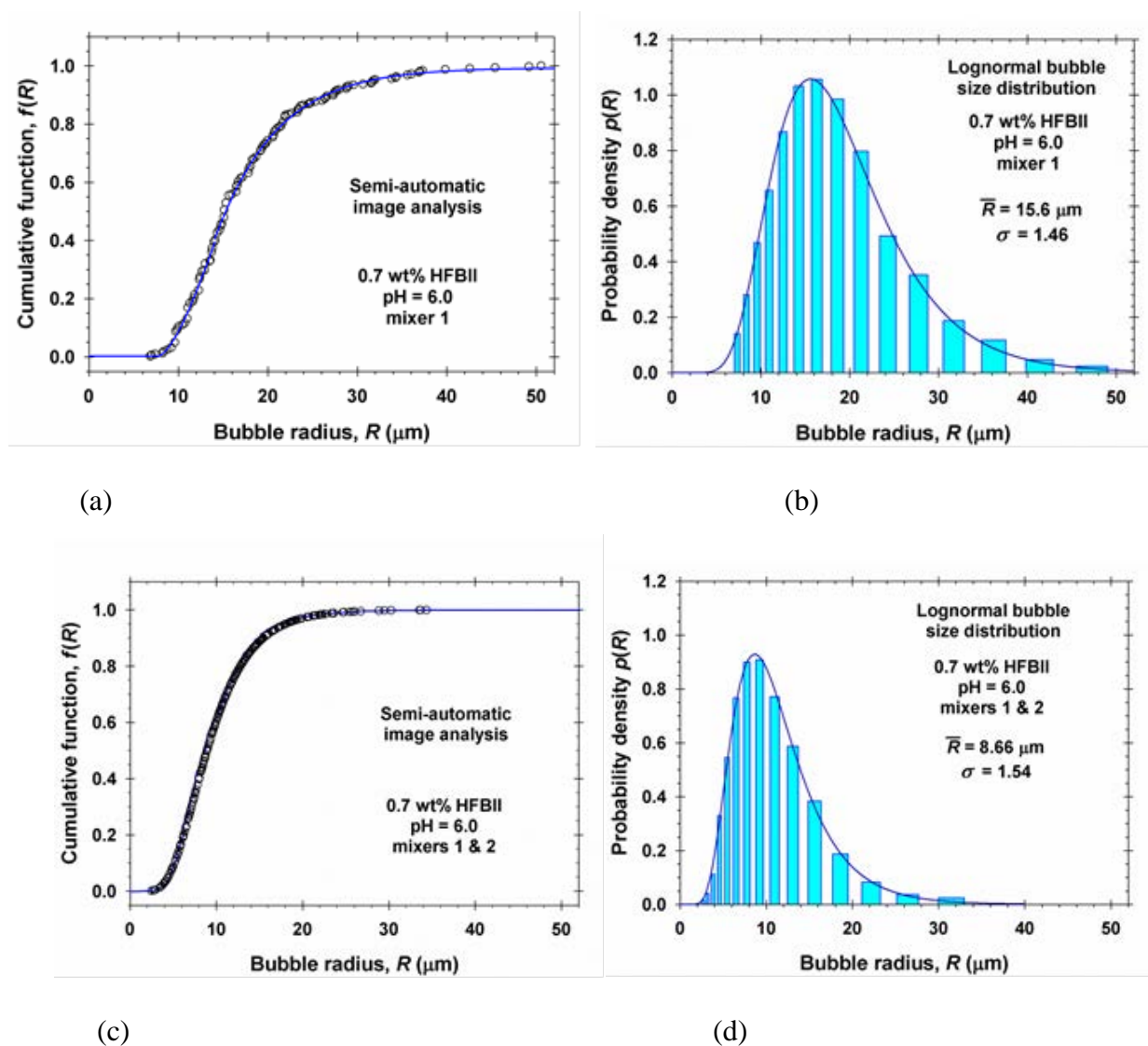
цяло, при по-високата концентрация на протеин се образуват по-малки мехурчета (сравни Фиг. 3.1a,b, с Фиг. 3.1c,d), което е за очакване.

Някои от мехурчетата имат елипсоидна форма, което се вижда по-добре на Фиг. 3.1d. Това се дължи на бързото втвърдяване на адсорбционните слоеве от хидрофобин, при което се запазва моментната форма на мехурчетата по време на разбъркването (Basheva et al., 2011a) Втвърдяването на повърхностния слой от хидрофобин е било наблюдавано по метода на висящата капка [Alexandrov et al., 2012]; по метода на динамометрия с капиларен менискус [Danov et al., 2016, Danov et al., 2015b] както и чрез измерване на повърхностната еластичност при деформация на прехлъзване с ротационен реометър [Radulova et al., 2012, Danov et al., 2012, Danov et al., 2015a].



Фиг. 3.1 Ефект от концентрацията на протеин върху получените пени: илюстративни снимки на пени от разтвори на HFBI при pH = 4.3: (a, b) 0.8 wt% HFBI, миксер № 1; (c,d) 0.5 wt. % HFBI, миксери № 1 и № 2. В последния случай се наблюдава образуване на несферични мехурчета.

На Фиг. 3.2 са показани разпределенията по размери (i) за пяна получена само с миксер № 1 и (ii) за пяна получена като последователно са използвани миксери № 1 и № 2, при еднакви други условия: 0.7 wt% HFBII и pH = 6. Използвайки полуавтоматичен анализ на снимки, измерихме радиуса на 320 и 1367 мехурчета, съответно, за Фиг. 3.2a и 3.2c. На фигурата, експерименталните точки представляват кумулативната функция, f пряко определена от експерименталните резултати с помощта на ур. (2.14). Непрекъснатата линия представлява най-добрата интерполация с ур. (2.16), т.е. с логнормално разпределение. Отличното съвпадение между теоретичната крива и експерименталните резултати показва, че разпределението на мехурчетата по размери наистина е логнормално.



Фиг. 3.2. Начални разпределения по размери на мехурчетата в пени от воден разтвор на 0.7 тегл.% HFBII при натурално pH = 6 получени чрез полуавтоматичен анализ на образи. (a,b) Пени получени чрез разбъркване само с миксер № 1 за 60 s. (c, d) Пени получени чрез разбъркване с миксер № 1 за 60 s и с миксер № 2 за 60 s. Точките са експерименталните резултати за кумулативната функция, $f(R)$; непрекъснатата линия за $f(R)$ е най-добрата интерполация на данните с ур. (2.16); непрекъснатата линия за $p(R)$ е изчислена от ур. (2.15) като са използвани стойностите на \bar{R} и σ определени от интерполацията на данните за $f(R)$.

Стойностите на параметрите σ и \bar{R} определени от интерполацията на данните за кумулативната функция на Фиг. 3.2a и 3.2c са показани в Таблица 3.1 Най-вероятната стойност на радиуса от логнормалното разпределение, \bar{R} , е близка, но леко по-ниска от средния аритметичен радиус R_{10} . Средният радиус пресметнат от логнормалното разпределение, който се дава с формулата $\langle R \rangle = \bar{R} \exp(\frac{1}{2} \ln^2 \sigma)$ (Box et al., 2005, Crow et al., 1988), на практика съвпада с R_{10} , както е за очакване в случай на добро съвпадение на теоретичната крива и експерименталните данни. Средният радиус обем-повърхност, R_{32} , е с около 40% по-голям от R_{10} , което се дължи на по-големия принос на по-големите мехурчета към стойността на R_{32} . Разликата между тези характерни средни размери е в резултат на полидисперсността на мехурчетата. Стойностите на безразмерната дисперсия, σ , са близки за двете системи (Таблица 3.1).

Таблица 3.1. Сравнение на σ , \bar{R} и $\langle R \rangle$, определени от интерполацията на данните на Фиг. 2a,c, със стойностите на R_{10} и R_{32} получени от ур. (2.3).

Система	σ	\bar{R} (μm)	$\langle R \rangle$ (μm)	R_{10} (μm)	R_{32} (μm)
Пени с миксер 1	1.46	15.6	16.8	17.2	24.2
Пени с миксер 1 & 2	1.54	8.7	9.6	9.6	13.9

Полидисперсността е илюстрирана също на Фиг. 3.2b,d, където е показано разпределението по размери. Вижда се, че използването на втори миксер води до образуването на по-малки мехурчета. На Фиг. 3.2b 50% от мехурчетата попадат в интервала $10.7 < R < 22.5 \mu\text{m}$, докато на Фиг. 3.2d – в интервала $5.63 < R < 13.3 \mu\text{m}$. Непрекъснатата линия е функция на вероятността, $p(R)$, изчислена от ур. (2.15) като са използвани стойностите за σ и \bar{R} от Таблица 1. Трябва да се отбележи, че ако зависимостта $p(R)$ бъде нанесена като функция на $\ln R$ (вместо на R), тя ще бъде симетрична; стълбовете на хистограмата ще имат еднаква ширина, а площта под кривата на вероятността ще бъде равна на 1; виж. ур. (2.16). Трябва също да отбележим, че теоретичните криви на Фиг. 3.2b,d, определени от кумулативната функция, са еднозначни, докато представянето на резултатите под формата на хистограми не е еднозначно, понеже то зависи от избора на ширината на стълбчетата.

3.2. Пенливост

За да охарактеризираме пенливостта на хидрофобините разтвори използвахме експерименталните резултати за *кратността на пяната (overrun)* като функция на концентрацията на HFBI. Данните се отнасят за началния момент, веднага след

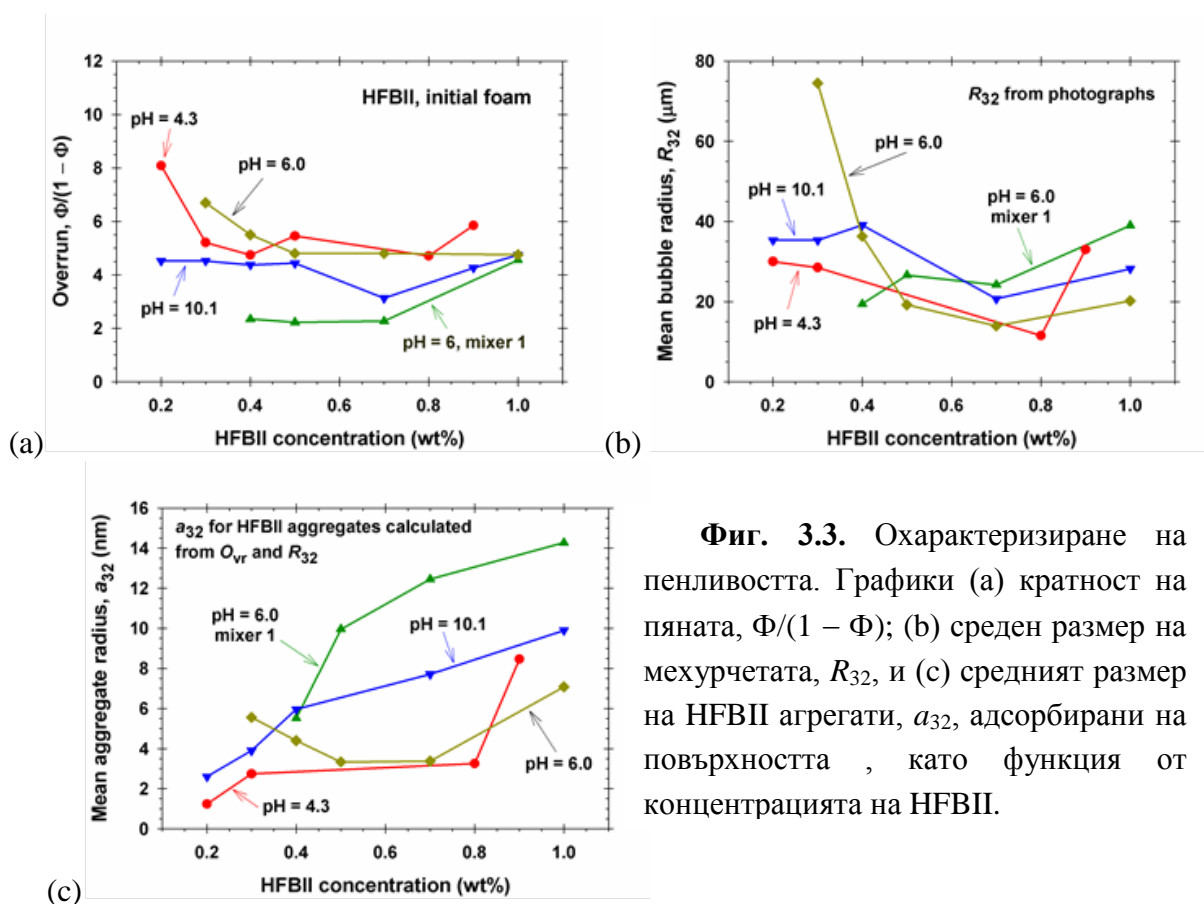
образуването на пяната и са показани на Фиг. 3.3. Кратността на пяната е изчислена от Ур. (2.2) използвайки експерименталната обемна част, Φ (при момент $t = 0$). За всички рН стойности, кратността е между 4 и 8 за всички пени получени с миксер 1 и 2, докато ползвайки миксер 1 кратността на пяната е в интервал 2 – 4.6. Кратността е леко по-висок за пените получени при рН = 4,3 както и при рН = 6 при по-ниска концентрация на HFВII. Това може да се обясни с флуидизацията на повърхността на мехурчетата при по-ниска концентрация [Alexandrov et al., 2012], което позволява бърза адсорбция на протеина на повърхността по време на разкъсването на големите мехурчета до по-малки.

За разлика от ниските концентрации, при висока концентрация на HFВII има образуване на твърд абсорбционен слой, който се разрушава по време на разкъсването на мехурчета и не може да се сформира нов при получаването на новите мехурчета, като по този начин не може да се предотврати коалесценцията. В крайна сметка това възпрепятстване на захващане на въздуха намалява пенливостта. Трябва да се отбележи, че лявата част на всички графики съответства на най-ниска концентрация на хидрофобин, при която е получена стабилна пяна.

Обемната част, Φ , на изучаваните пени е в границите на 0.69 – 0.90 (Фиг. 3.8d- виж в дисертацията) Тези сравнително високи стойности на Φ могат да се дължат на деформираните мехурчета [Princen, 1988]; полидисперсността [Farr et al., 2009] и удължената форма. Трябва да се отбележи, че HFВII е способен да стабилизира не само мехурчета с микрони размери, а и такива със субмикронни [Basheva et al., 2011a]. Последните не се виждат на нашите снимки, но оказват влияние на измереното тегло на пяната. На снимките на Фиг. 3.1 са показани мехурчета, които се намират само в най-горният слой на пяната. Въпреки това, мехурчетата в дълбочината на пяната се очаква да са деформирани от натиска на своите съседи и хидростатичното налягане.

На Фиг. 3.3b са показани резултатите за средния радиус обем – повърхност, R_{32} като функция на концентрацията на HFВII от полуавтоматичния анализ на снимки. Някои от неравностите в формата на експерименталната крива се дължат на ефекта от разкъсването на втвърдения абсорбционен слой на повърхността от миксера при разпенването на хидрофобиновият разтвор. Силното повишаване на R_{32} при рН = 6 (близо до изоелектричната точка на HFВII) за ниската концентрация на хидрофобин може да се обясни с ограничена коалесценция, подобно поведение се наблюдава при Пикеринговите емулсии [Wiley, 1954, Arditty et al., 2003, Whitesides et al., 1995, Golemanov et al., 2006]. С изключение на това отклонение, всички останали данни за R_{32} на Фиг. 3.3b попадат в интервала от 5 до 40 μm , което съответства на пяна с фини мехурчета. Тези малки размери на получените мехурчета са индикация, че нашия процес на пенообразуване не е сравним с този в статия [Cox et al., 2009], където R_{10} е измерен в границите на 57 до 118 μm . И в двата случая, пяната

е получена чрез разбъркване с миксер, но в нашият случай вложената механична енергия за единица обем е по-голяма. Действително, обемът на аерираната течност е била 75 mL в статията [Cox et al., 2009], докато в нашите експерименти използвахме 3mL.



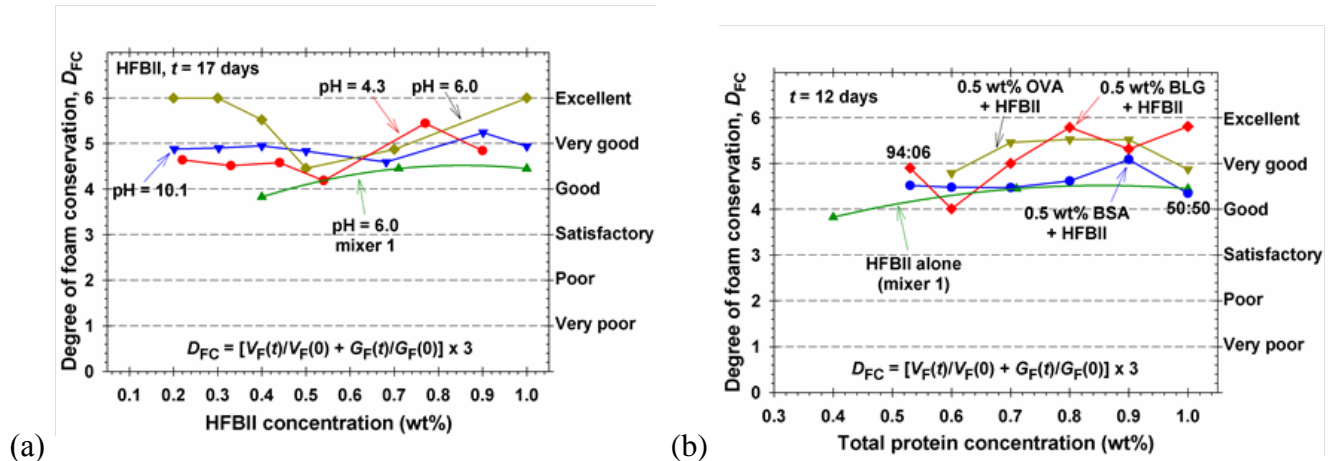
Фиг. 3.3. Охарактеризиране на пенливостта. Графики (а) кратност на пяната, $\Phi/(1 - \Phi)$; (б) среден размер на мехурчетата, R_{32} , и (в) средният размер на HFBIII агрегати, a_{32} , адсорбирани на повърхността, като функция от концентрацията на HFBIII.

На Фиг. 3.3с са показани стойностите за средният радиус на протеиновите агрегати, a_{32} , адсорбирани на повърхността на мехурчетата; a_{32} е изчислено по Ур. (2.4), където стойностите за *кратността на пяната* и R_{32} са взети от Фиг. 3.3а, б и са заместени в уравнението. За плътен адсорбционен слой, трябва да се използва $\phi_a \approx 1$ и $\rho_p = 1.5 \text{ g/cm}^3$, изчислени от емпирична зависимост в статия [Fisher et al., 2004]. Въпреки разсейването на някои резултати, има тенденция за a_{32} да нараства с повишаването на концентрацията на HFBIII (Фиг. 3.3с), което е физически разумен резултат. Най-ниските стойности на a_{32} , близки до радиуса на HFBIII, $\approx 1.5 \text{ nm}$ са получени при $\text{pH} = 4.3$, където молекулите на HFBIII имат положителен заряд [Basheva et al., 2011a]. Най-голяма стойност на a_{32} (най-големи адсорбирани агрегати) се наблюдават при изоелектричната точка ($\text{pH} \approx 6.0$), в случай когато е използван само миксер 1. Изглежда, че по-дългото разбъркване (с миксер 1 и 2) спомага за сформирването на по-тънък адсорбционен слой от HFBIII на повърхността на мехурчетата. Разсейването на данните във Фиг. 3.3, което е типично за пени стабилизирани с HFBIII, може да се дължи не само разкъсването на образуваният се твърд адсорбционен слой, но и на неконтролираното нарастване на протеиновите агрегати по време на разбъркване на дисперсията.

3.3. Стабилност на пяната

За да изследваме стабилността на получената пяна, спринцовките с пяна бяха съхранявани за 17 дни в хладилник при температура 4 °C. За да охарактеризираме количествено стабилността на пяната със стойността на един единствен параметър, нека да въведем величината *степен на пенна стабилност*, D_{FC} , дефинирана по следният начин:

$$D_{FC}(t) = 3 \times \left(\frac{V_F(t)}{V_F(0)} + \frac{G_F(t)}{G_F(0)} \right) \quad (3.1)$$



Фиг. 3.5. Данни за степента на пенна стабилност, D_{FC} , като функция на пълната концентрация на протеин: (a) D_{FC} като функция на концентрацията на HFВІІ за пени получени от водни разтвори на HFВІІ при различно рН: данни след период на съхранение $t = 17$ дни. (b) D_{FC} за пени получени от водни разтвори на HFВІІ и добавен 0.5 wt% регулярен протеин (BLG, OVA или BSA) след период на съхранение $t = 12$ дни.

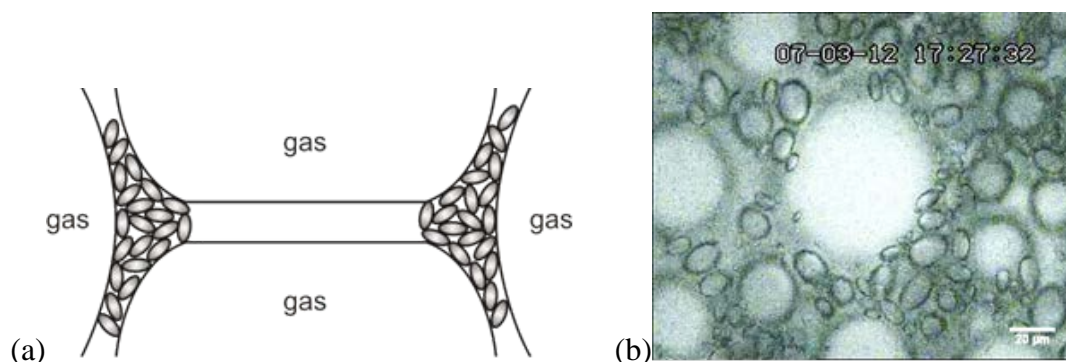
Нормиращият фактор 3 в Ур. (3.1) е избран по такъв начин, че $D_{FC} = 6$ при отлично съхранение на пяната, т.е. $V_F(t)/V_F(0) = 1$ и $G_F(t)/G_F(0) = 1$ (няма промяна в обема и теглото на пяна за периода на съхранение). Останалите степени са $D_{FC} = 5, 4, 3,$ и 2 , съответно, за много добра, добра, задоволителна и лоша степен на пенна стабилност (Фиг. 3.5).

На Фиг. 3.5а се вижда, че най-добри ($D_{FC} > 5$) са пените стабилизиращи с HFВІІ при рН = 6, близо до изоелектричната точка при рН = 5.8, определена от нас чрез измервания на електрофоретичната подвижност на мехурчета в разтвор на HFВІІ. При рН = 4.8 и 10.1 степента на пенна стабилност е малко по-ниска: $4.2 \leq D_{FC} \leq 5.4$. D_{FC} има най-малка стойност за пените получени само с миксер № 1. Варирането на рН има слаб ефект върху пенливостта, което е в съгласие с предишни данни, показващи че рН не оказва съществено влияние върху хидрофобиновия адсорбционен слой [Tucker et al. 2015], и върху повърхностните сили действащи във филми стабилизиращи с хидрофобин [Basheva et al. 2011b].

За сравнение, на Фиг. 3.5b са показани резултати за дълготрайността на пени стабилизиращи от смес на HFВІІ с три други протеина, BLG, BSA и OVA, за период на съхранение $t = 12$ дена. В тези експерименти концентрацията на HFВІІ варира, докато концентрацията на останалите протеини е фиксирана на 0.5 wt. %. Повече подробности за

пенливостта на тези смесени разтвори може да бъде намерена в Раздел 3.4 по-долу. Тук ще отбележим само, че стабилността на съответните пени, характеризирана от D_{FC} , е сравнима със стабилността на пени от разтвори само на HFBI, без добавени други протеини. Въпросната стабилност (трайност повече от 12 дена) изцяло се дължи на присъствието на HFBI. И наистина, при пените стабилизирани само с BLG, BSA или OVA (при същата обща концентрация) се наблюдава оствалдово зреене, което води до пълното разрушаване на пяната за 1–2 часа. Сравнението на поведението на пени с и без HFBI показва, че основното стабилизиращо свойство на хидрофобин е да блокира напълно оствалдовото зреене в пените. Това може да се обясни с образуването на плътен адсорбционен слой, който е непроницаем за преноса на газ.

Както се вижда, HFBI потиска изтичането на вода от пяната. Това означава, че HFBI притежава свойството да запушва каналите на Плато и да спира изтичането на течност по тях. Известно е, че HFBI стабилизира мехурчета с микронни и субмикронни размери [Basheva et al. 2011a), Lohrasbi-Nejad et al., 2016]. Това лесно може да се види, като се разтръска воден разтвор на HFBI, който веднага помътнява. Това се дължи на образуването на малки мехурчета. Такива мехурчета (с μm -размери и по-малки) се появяват и в пените, които изследваме. Понеже HFBI е “лепкав” протеин [Basheva et al. 2011b)], образуваните мехурчета залепват към стените на каналите на Плато и блокират изтичането на водата, както това е илюстрирано на Фиг. 3.6. Тъй като последователното разбъркване с миксери № 1 и № 2 води до образуване на повече малки мехурчета (виж Фиг. 3.6b) отколкото ако се разбърква само с миксер № 1, в последния случай получените пени имат по-ниска степен на стабилност с времето (виж Фиг. 3.5). Тесните канали между малките мехурчета се запълват от протеинови агрегати, което допълнително затруднява изтичането на водата (синерезиса) при пените стабилизирани с протеини [Marinova et al., 2009, Saint-Jalmes et al., 2005, Wierenga et al., 2010].



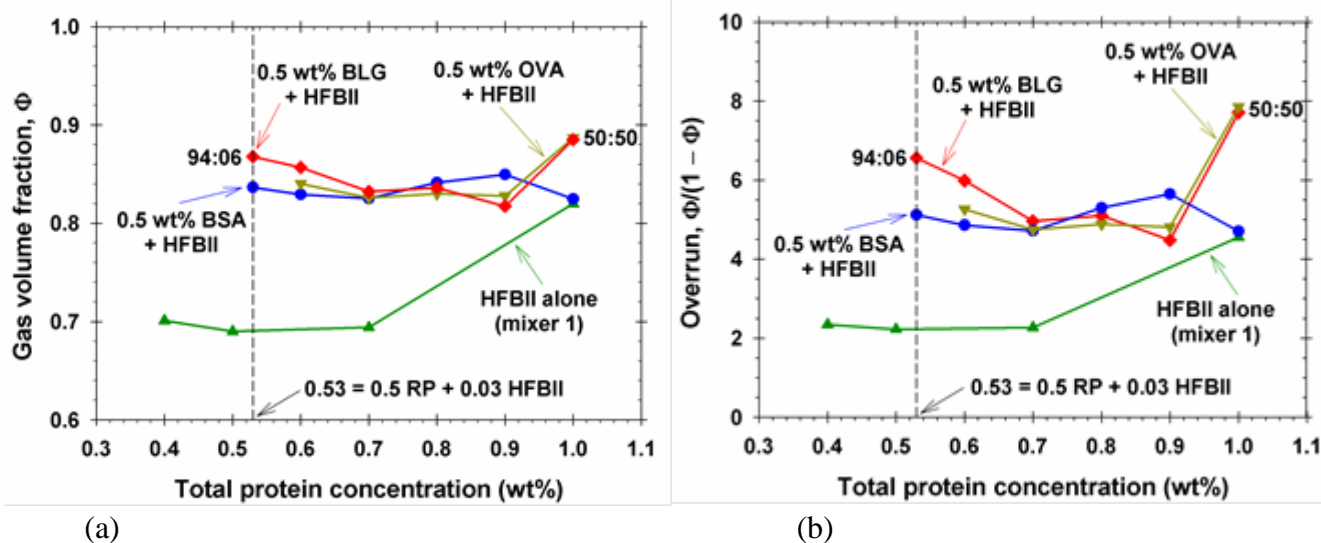
Фиг. 3.6 (a) Скица на канали на Плато в пени стабилизирани с хидрофобин, които са запълнени и запушени от малки мехурчета. (b) Снимка на пяна с малки и големи мехурчета получена от воден разтвор на 0.5 wt% HFBI + 0.5 wt% OVA при разбъркване с миксери № 1 и № 2.

3.4. Пени от смесени разтвори на HFBI с други протеини

3.4.1. Пенливост на смесени протеинови разтвори

Тук нашата цел ще бъде да изследваме каква част от хидрофобина може да бъде заменена с регулярен протеин без това да доведе до значително намаляване на пенливостта и стабилността на пяната.

Във всички експерименти със смесени протеинови разтвори, концентрацията на регулярен протеин беше постоянна, 0.5 wt%, а концентрацията на HFBI варираше. Експериментите бяха извършени при натуралното рН на смесените протеинови разтвори, което бе в интервала $5.5 < \text{pH} < 6.5$. Такива малки промени на рН не се очаква да оказват съществено влияние върху взаимодействието между протеиновите молекули и свойствата на пяната. И наистина, стабилността на пените от тези смесени протеинови разтвори се дължи на HFBI, а се знае, че промяната в рН не оказва съществено влияние върху адсорбцията на хидрофобин [Tucker et al., 2015] и повърхностните сили във филми стабилизирани с HFBI [Basheva et al. 2011b]. Най-високата концентрация на HFBI, която ползвахме беше 0.5 wt%, което съответства в тегловно съотношение на 50:50 RP/HFBI (RP = regular protein); виж Фиг. 3.8. Концентрацията на HFBI в смесените протеинови разтвори бе понижавана до достигане на стойност, при която получавахме нестабилни пени.



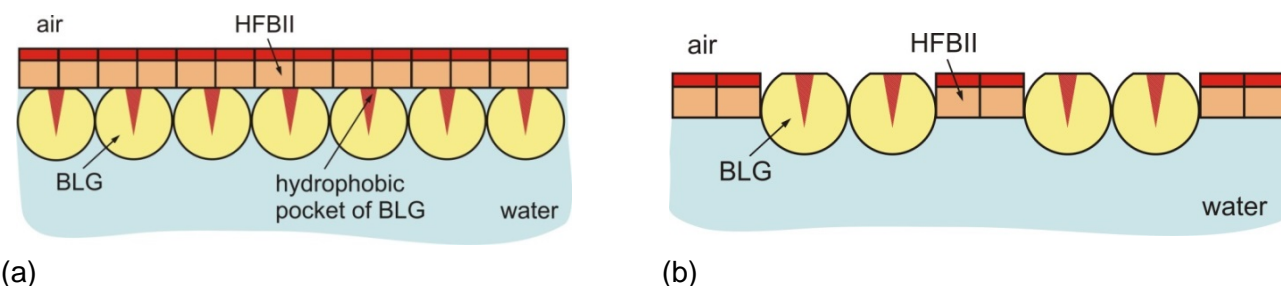
Фиг. 3.8. Характеризиране на пенливостта. Концентрацията на регулярен протеин (BLG, OVA или BSA) е постоянна, 0.5 wt%, докато концентрацията на HFBI варира. (a) Обемната част на въздуха, Φ , и (b) кратността на пяната, $\Phi/(1 - \Phi)$ като функции от пълната концентрация на протеин.

За всички експериментални криви на Фиг. 3.8 най-левите точки съответстват на минималната концентрация на хидрофобин, при която се наблюдава стабилна пяна. За пените с BLG и BSA, най-левите точки съответстват на тегловно съотношение 94:06

RP/НFBII. При по-ниска тегловна част на НFBII пенливостта и стабилността на пяната силно намалява.

На Фиг. 3.8а са показани експерименталните данни за обемната част на въздуха в пяната, Φ , която е в интервала 0.82 – 0.90. За сравнение, при пяната получена от разтвор на НFBII само с миксер № 1 стойностите на Φ са по-ниски, от 0.70 до 0.82. На Фиг. 3.8 в е показана кратността на същите пени. От графиката се вижда, че кратността на пените от смесените разтвори практически не се променя, като в широк концентрационен диапазон приема стойности между 4 и 7, същите като за пени стабилизирани само с НFBII (Фиг. 3.3а). Този факт е една допълнителна индикация за това, че пенливостта на смесените разтвори се определя от свойствата на НFBII.

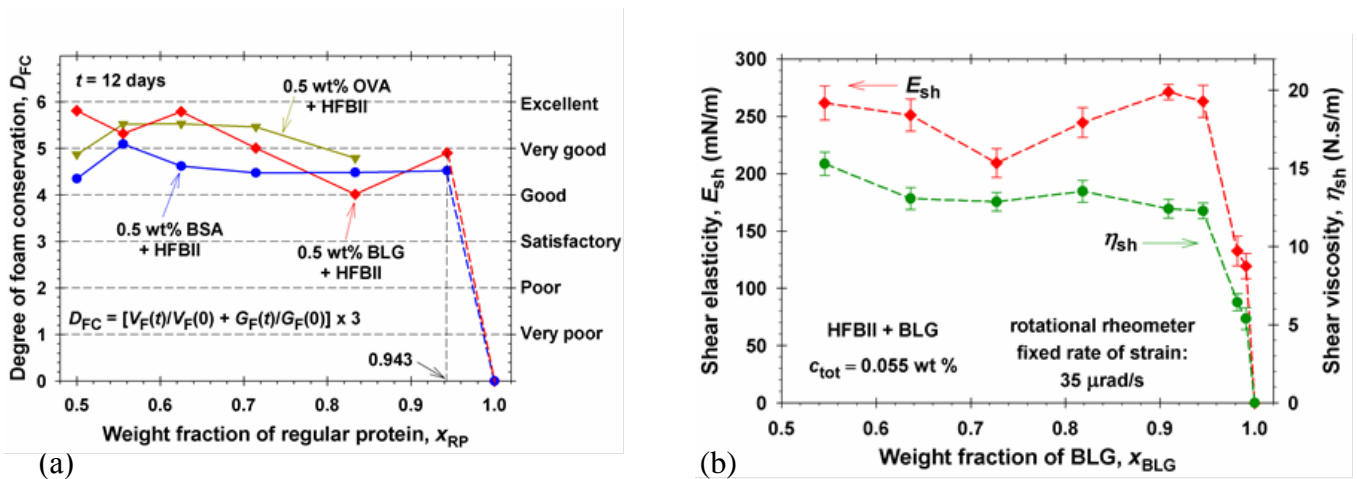
За смесените разтвори на НFBII с регулярните протеини BLG и OVA при тегловно съотношение 50:50 RP/НFBII кратността е по-голяма, около 8. Пените от смесени разтвори на протеини са получени, чрез последователно разбъркване с миксери №1 и №2. Кратността на пяната е по-висока отколкото, кратността за пените стабилизирани само с хидрофобин и получени при разбъркване само с миксер №1 (Фиг. 3.8b). Изследванията на тънки течни филми и повърхностна реология на адсорбционни слоеве от смесени разтвори на НFBII с BLG и OVA [Danov et al., 2015a], показват че повърхностният слой на границата въздух/вода е зает изцяло от НFBII, докато другите глобуларни протеини образуват втори слой, както е илюстрирано на Фиг. 3.9а за случай на BLG. (Най-вероятно молекулите на BLG се закрепват към хидрофобинвата молекула в областта на отвора на хидрофобния джоб на BLG [Adams et al., 2006], както е скицирано на Фиг. 3.9а.)



Фиг. 3.9 (а) При достатъчно висока концентрация, НFBII образува плътен адсорбционен слой на границата вода/въздух, а регулярният протеин (в случая BLG) се адсорбира под него под формата на втори слой. (b) При по-ниски концентрации на НFBII се образува смесен адсорбционен слой от двата протеина. Хидрофобната и хидрофилната части на НFBII молекула са показани с различен цвят за да може да се представи техният характер на янус-частици.

3.4.2. Стабилност на пени от смесени разтвори на протеини

На Фиг. 3.11а е показана степента на пенната стабилност, $D_{FC}(t)$.



Фиг. 3.11. Ефект от състава на разтвора върху степента на пenna стабилност, $D_{FC}(t)$, и върху еластичността и вискозитета при прехлъзване на повърхностния адсорбционен слой, E_{sh} и η_{sh} . (a) Резултатите за D_{FC} от Фиг. 5 са нанесени като функция на тегловната част на регулярен протеин (BLG, BSA or OVA), x_{RP} , в сместа с HFBII. (b) Резултати от статията на Danov et al., 2015, за E_{sh} and η_{sh} при адсорбционните слоеве от смесени разтвори на HFBII + BLG нанесени като функция на тегловната част на BLG, x_{BLG} , при постоянна обща концентрация на протеин, $c_{tot} = 0.055$ wt %.

Експерименталните точки в интервала $0.5 \leq x_{RP} \leq 0.943$ съответстват на стабилни пени. Най-висока стабилност се наблюдава при пените стабилизирани с BLG и OVA (точките с $D_{FC} > 5$). Оказва се, че можем да заменим 94 % от HFBII с регулярен протеин, без значително влошаване на качеството и стабилността на получените пени. Обаче, при $x_{RP} > 0.943$ пените стават нестабилни.

Фиг. 3.11 показва наличие на корелация между пенната стабилност и повърхностните еластичност и вискозитет при прехлъзване, E_{sh} и η_{sh} , за адсорбционни слоеве при смесени разтвори на HFBII и BLG. За реологичните измервания е използван ротационен реометър Bohlin Gemini (Malvern Instruments, UK) при много ниска ъглова скорост, $35 \mu\text{rad/s}$. Използваният реометър е подходящ за адсорбционни слоеве с по-силен реологичен отклик, като тези от хидрофобин. За използваните регулярни протеини (без HFBII) този реометър регистрира нулев реологичен отклик, което води и до нулеви стойности на E_{sh} и η_{sh} , при $x_{BLG} = 1$ (Фиг. 3.11b). [За измерването на еластичността на адсорбционни слоеве от регулярен протеин трябва да се използва по-чувствителен реометър; вж. например статиите на [Bljidenstein et al., 2010, Krägel et al., 2008, Jordens et al., 2014].

В нашите експерименти със смесени разтвори на HFBII и BLG беше променяна тегловната част на BLG (в сместа с HFBII) в интервала $0.5 \leq x_{BLG} \leq 1$ при фиксирана обща концентрация на протеин, 0.055 wt%. Както вече стана дума, при $x_{BLG} = 1$ (в отсъствие на хидрофобин) E_{sh} и η_{sh} са равни на нула в рамките на точността на използвания реометър. Резултатите показват, че преходът от еластичен към флуиден адсорбционен слой става при $x_{BLG} \approx 0.94$ (Фиг. 3.11b) и отлично съвпада с пенната стабилност (Фиг. 3.10a-виж в дисертацията).

Нашите резултати са в съгласие със статията на Tcholakova et al. 2011, където е показано, че добавянето на амфифилни молекули (като лауринова и миристинова киселини, които предизвикват повърхностен фазов преход) води до съществено потискане на оствалдовото зреене. Тези автори стигат до извода, че основната причина за понижаването на скоростта на оствалдово зреене в системи с висок повърхностен модул е непроницаемостта на образувания плътен адсорбционен слой за дифузионен пренос на газови молекули. Образването на такъв плътен адсорбционен слой може да бъде установено чрез измерване на повърхностните модули при деформации на разтягане [Danov et al., 2016, Alexandrov et al., 2012, Tcholakova et al., 2011] и прехлъзване [Blijdenstein et al., 2010, Radulova et al., 2012, Danov et al., 2012, Danov et al., 2015a, Radulova et al., 2014]. И двата модула имат по-високи стойности за плътни повърхостни слоеве, поради страничното слепване на адсорбираните молекули. В частност, критерият за втвърдяване на адсорбционния слой е наличието на ненулев повърхностен еластичен модул при прехлъзване $E_{sh} > 0$, вж. Фиг. 3.11b.

3.5. Резюме на основните резултати в Глава 3

Хидрофобините са известни като отлични пеностабилизатори [Cox et al., 2004]. В Глава 3 е изследвана пенливостта, размера на мехурчетата и стабилността на пяната от водни разтвори на хидрофобин при различно рН на средата и при добавяне на други протеини. Получените стабилни пени са съставени от мехурчетата с радиус по-малък от 40 μm , които имат логнормално разпределение. Кратността на получените пени е в интервала от 5 до 8, което е индикация за добра пенливост на изследваните разтвори. Пенната стабилност е характеризирана от експерименталните зависимости на обема на пяната и теглото ѝ като функции на времето. В частност, теглото на пяната е индикатор за съдържанието на вода в нея. Предложена е комбинирана количествена характеристика, наречена *степен на пенна стабилност*, D_{FC} ; вж. ур. (3.1) и Фиг. 3.5. Наблюдава се слабо намаляване на обемната част и теглото на пяната през първите три дена от периода на съхранение на пяната. През следващите 12–17 дена нямаше значителна промяна в стабилността на получените пени. Това се дължи на образуването на плътен адсорбционен слой от хидрофобин, който е непроницаем за преноса на газ от по-малките към по-големите мехурчета т.е. оствалдовото зреене е блокирано. Освен това, наличието на по-малки мехурчета измежду по-големите (1) спира изтичането вода през каналите на Плато; (2) повишава обемната част на въздух в пяната и (3) и подобрява стабилността на пяната с времето. Промяната на рН в интервала от 4.3 до 10.1 не оказва съществено влияние върху пенливостта и стабилността на пените, което може да се дължи на доминиращата хидрофобна (а не електростатична) сила на взаимодействие между мехурчетата покрити с НФВІІ [Basheva et al. 2011b]. Добавянето на регулярен протеин, като BLG, OVA и BAS към разтворите на НФВІІ не води до промяна в качеството и стабилността на получените пени при обемна част на регулярния протеин, която не превишава 94 wt%.

При по-висока тегловна част на регулярния протеин, пените стават нестабилни и протичат процеси на коалесценция и оствалдово зреене. В този случай, количеството на хидрофобин не е достатъчно за да образува плътен адсорбционен слой (Фиг. 3.9b), който да спре преноса на газ през пените филми и да предотврати разрушаването на пените. Фактът, че еластичността и вискозитетът при прехлъзване на повърхностния адсорбционен слой от HFВII корелират добре със стабилността на пените (Фиг. 3.11) означава, че повърхностната реология може да служи като индикатор за стабилността на пените. Резултатите и изводите от настоящето изследване могат да бъдат полезни при приложението на HFВII, като пеностабилизатор.

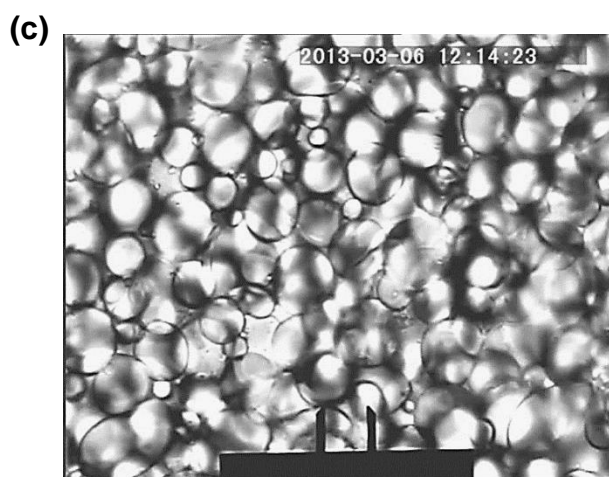
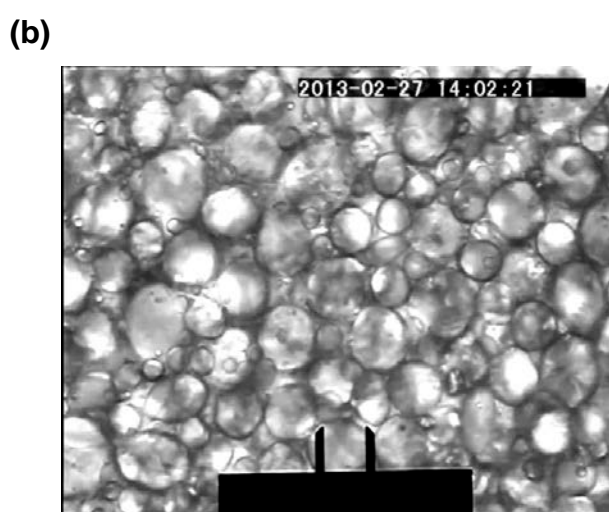
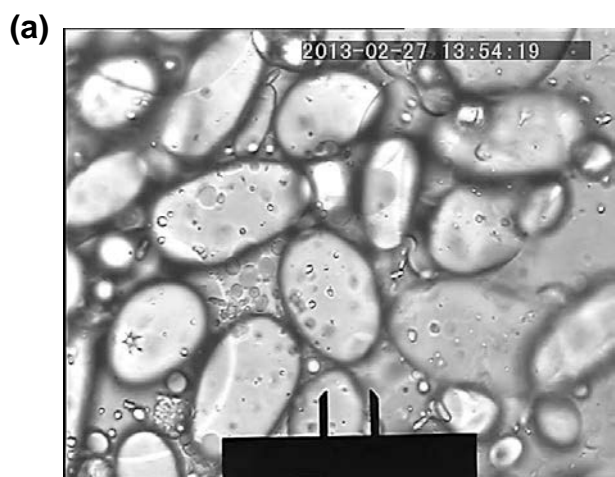
Глава 4. Коалесценция и оствалдово зреене в емулсии стабилизирани с HFВII, млечни протеини и ПАВ

В Глава 4 от дисертацията показваме, че HFВII е не само отличен стабилизатор на пени, но може да служи и като отличен емулгатор. Адсорбционният слой от хидрофобин на междуфазовата граница вода/масло се втвърдява бързо, подобно на този на границата вода/въздух. Изследвахме разпределението на капките в емулсия тип масло-във-вода при различни концентрации на протеин и обемни части на маслената фаза. Анализът на данните показва, че в зависимост от експерименталните условия емулгирането може да протича или в режим на Колмогоров, или в режим на ограничена коалесценция. Емулсиите с HFВII са много стабилни – при съхранение за 50 дни в покой не бяха наблюдавани никакви съществени изменения в размера на капките. Обаче, тези емулсии се оказаха нестабилни при разбъркване, когато те са подложени на действието на хидродинамични напрежения. Тази нестабилност може да се премахне като капките се покрият с втори адсорбционен слой от регулярен протеин, като β -лактоглобулин. Плътният повърхностен слой от HFВII потиска оствалдовото зреене в случаите, когато дисперсната фаза е въглеродород със забележима разтворимост във вода, напр. ксилен или лимонен. Това свойство на HFВII прави възможно неговото приложение за стабилизация на микрокапсули от ароматизатори, овкусители, оцветители или консерванти в храните или активни субстанции в лекарствени продукти.

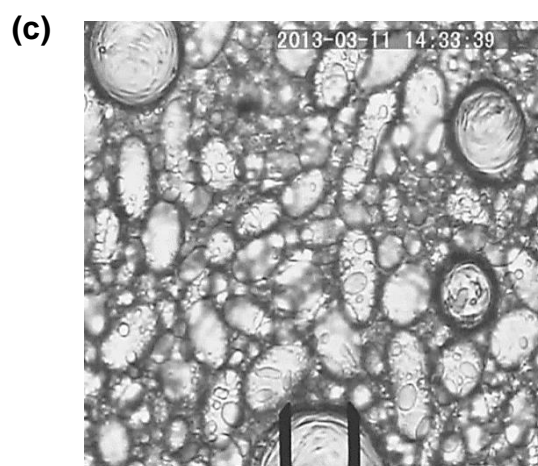
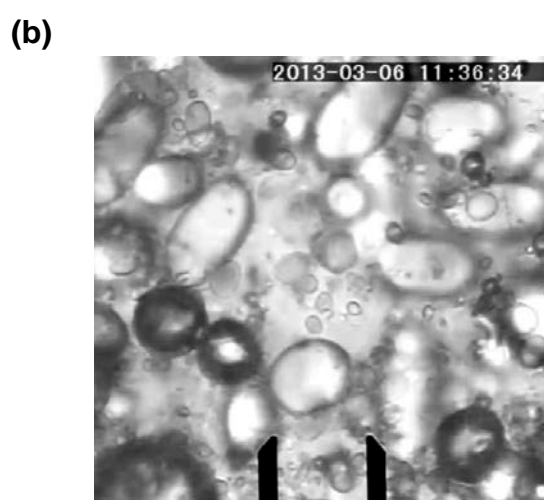
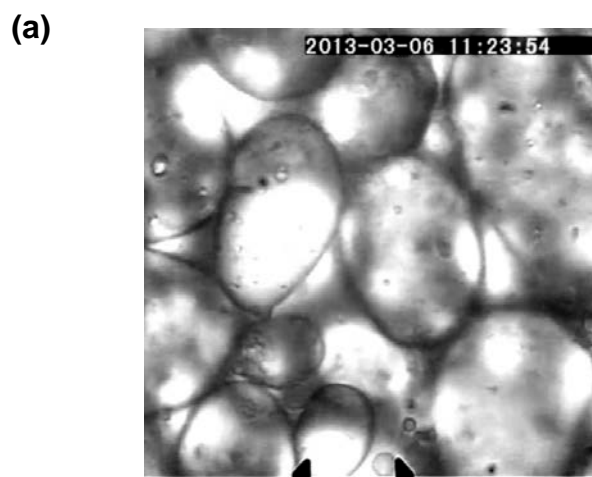
4.3. Емулсии SBO-във-вода стабилизирани с HFВII

4.3.1. Снимки на капките в получените емулсии

Емулсиите SBO-във-вода получихме при три различни обемни части на маслената, $\Phi_{oil} = 0.10, 0.30$ и 0.50 при концентрация на протеин във водната фаза, $C_{HFВII}$, между 0.05 и 7 wt% HFВII. Като илюстрация, по-долу сравняваме снимки на емулсията при $\Phi_{oil} = 0.30$ и $C_{HFВII} = 0.1$ wt% показани на Фиг. 4.4 с аналогични снимки на емулсия при $\Phi_{oil} = 0.10$ и $C_{HFВII} = 0.5$ wt% показани на Фиг. 4.5.



Фиг. 4.4. $\Phi_{oil} = 0.30$, $C_{HFVII} = 0.1$ wt%. Снимки на емулсия SBO-във-вода получена по следния начин: (a) След хомогенизиране за 3 min при 12 000 rpm. (b) След второ хомогенизиране за 5 min при 24 000 rpm. (c) След съхранение за 7 дни в хладилник при 4°C. (Белег = 20 μ m)



Фиг. 4.5. $\Phi_{oil} = 0.10$, $C_{HFVII} = 0.5$ wt%. Снимки на емулсия SBO-във-вода получена по следния начин: (a) След хомогенизиране за 3 min при 12 000 rpm. (b) След второ хомогенизиране за 5 min при 24 000 rpm. (c) След съхранение за 5 дни в хладилник при 4°C. (Белег = 20 μ m)

След първото хомогенизиране за 3 мин. при 12 000 rpm много от образувалите се маслени капки са елипсоидни с размер по-голям от 20 μm , виж Фиг. 4.4а и 4.5а. След второто емулгиране за 5 мин. при 24 000 rpm средният размер на капките е значително по-малък. При $\Phi_{\text{oil}} = 0.30$, капките са *сферични* (Фиг. 4.4b), докато при $\Phi_{\text{oil}} = 0.10$, капките са *елипсоидни* (Фиг. 4.5b). Не се наблюдават значителни промени в структурата на емулсиите след съхранение за няколко дена: емулсионните капки са запазили формата и размера си (Фиг. 4.4с и 4.5с). В частност, при $\Phi_{\text{oil}} = 0.10$ капките са останали елипсоидни и малките капки са залепнали към по-големите (Фиг. 4.5с).

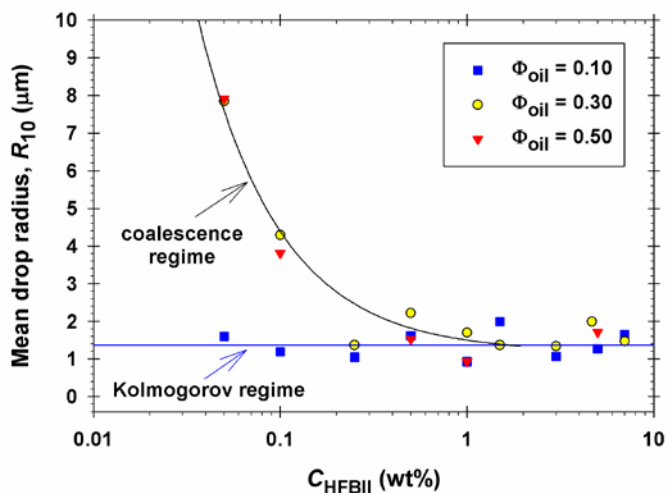
По време на емулгирането може да се образува неголямо количество мехурчета. Под действие на подемната сила, мехурчетата се издигат на повърхността на емулсията, където те се наблюдават като по-тъмни обекти в прясната емулсия (Фиг. 4.4b), или като сбръчкани сфероидни обекти след по-дълго съхранение на емулсията (Фиг. 4.4с); виж. също статията на Cox et al, 2007.

4.3.2. Разпределения на капките по размери и тяхната интерпретация

От разпределението на капките по размери може да получим информация за режима на емулгиране

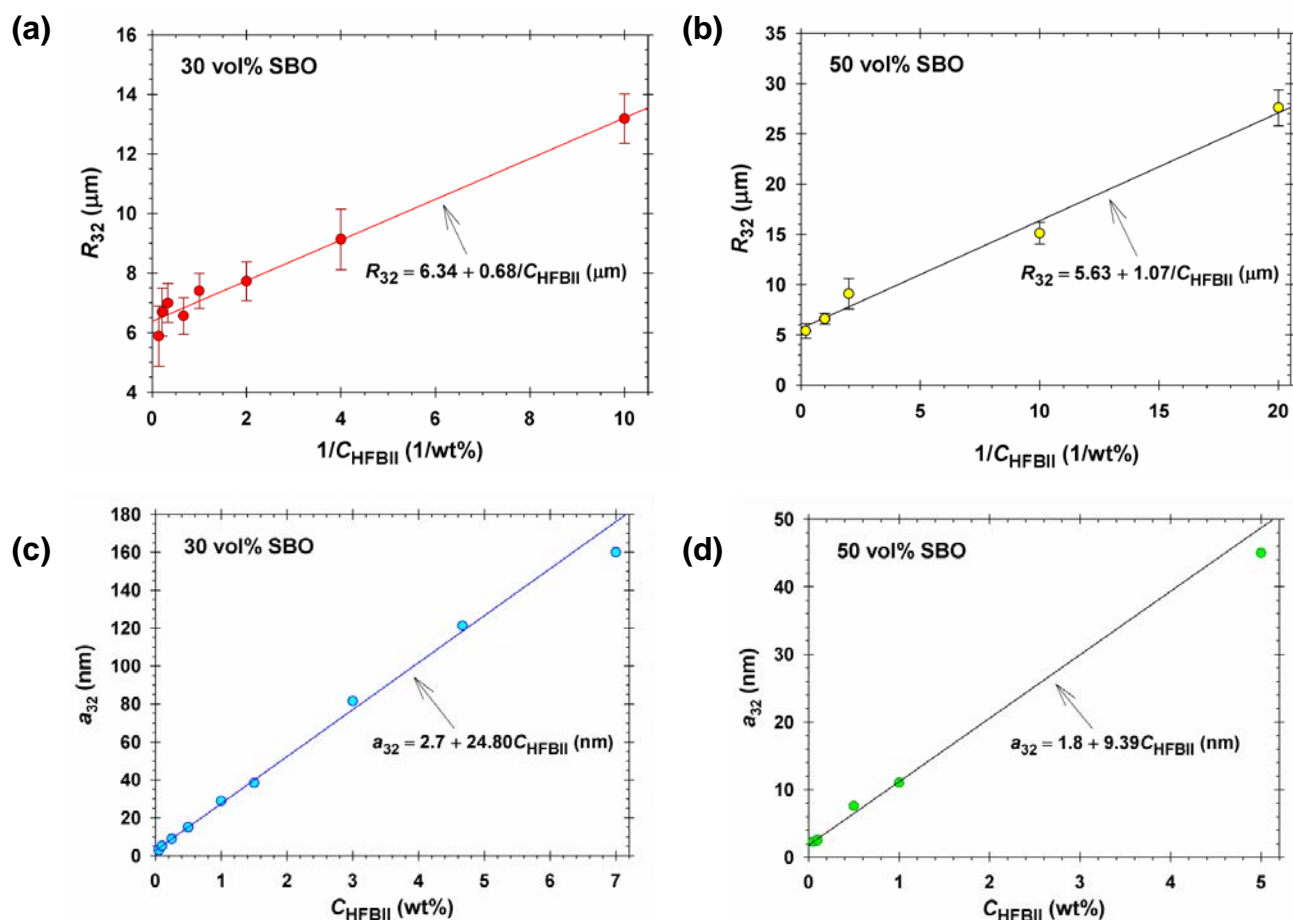
На Фиг. 4.8 е показана графиката за R_{10} като функция от концентрацията на HFBII във водната фаза, C_{HFBII} , при три различни обемни части на маслената фаза: $\Phi_{\text{oil}} = 0.10, 0.30$ и 0.50 . Всяка точка на Фиг. 4.8 съответства на стойност на R_{10} изчислена от измерените радиуси на не по-малко от 1000 капки за съответна емулсия

Както се вижда от Фиг. 4.8, при $\Phi_{\text{oil}} = 0.10$ средният радиус на капките не зависи от концентрацията на протеин. Това е индикация за емулгиране в Колмогоров режим. С други думи, броят на маслените капки образувани в турбулентното течение е достатъчно малък така, че концентрацията на протеин е достатъчна за да се образува плътен адсорбционен слой върху междуфазовата граница. При този режим капките са защитени срещу коалесценция, а R_{10} се определя от механичната мощност на хомогенизатора отнесена към единица обем от емулсията. За очакване е, емулгирането да е в инерционен режим на Колмогоров, понеже експерименталните условия, размерът на капките и вискозитетът на маслото са близки до тези в статията на Tcholakova, 2006, където е установено, че режимът е инерционен.



Фиг. 4.8. Средният радиус R_{10} като функция на концентрацията на хидрофобин във водната фаза, C_{HFBI} , при три различни стойности на обемната част на маслената фаза, Φ_{oil} , показани на фигурата.

За $\Phi_{\text{oil}} = 0.30$ и 0.50 , при по-високите концентрации ($C_{\text{HFBI}} \geq 0.5$ wt%), средният радиус R_{10} е постоянен и има практически същата стойност както при емулсиите с обемна част $\Phi_{\text{oil}} = 0.10$ (Фиг. 4.8). Това отново е индикация за емулгиране в Колмогоров режим. Обаче, при по-ниските концентрация на протеин, $C_{\text{HFBI}} \leq 0.1$ wt%, стойностите на R_{10} са значително по-големи, което показва, че емулгирането е в режим на ограничена коалесценция (limited coalescence).



Фиг. 4.9. Графики на R_{32} като функция на $1/C_{\text{HFBI}}$ for (a) $\Phi_{\text{oil}} = 0.30$ и (b) $\Phi_{\text{oil}} = 0.50$, и графики на a_{32} като функция на C_{HFBI} за (c) $\Phi_{\text{oil}} = 0.30$ и (d) $\Phi_{\text{oil}} = 0.50$.

За да проверим наличието на режим на ограничена коалесценция, от разпределенията по размер изчислихме R_{32} използвайки ур. (1). На Фиг. 4.9а и b, получените стойности на R_{32} са нанесени като функция на $1/C_{\text{HFBI}}$ в съответствие с ур. (8). Графиките показват, че зависимостта на R_{32} от $1/C_{\text{HFBI}}$ е линейна с *ненулев* отрез. Предвид ур. (2.9), такава зависимост може да съществува, ако средният размер на протеиновите *агрегати* нараства линейно с концентрацията на протеин:

$$a_{32} = a_1 + a_2 C_{\text{HFBI}} \quad (4.3)$$

Тогава, ур. (2.9) придобива следния вид:

$$R_{32} = \frac{4\rho_{\text{HFBI}}}{\rho_{\text{sol}}} \frac{\Phi_{\text{oil}}}{1 - \Phi_{\text{oil}}} \left(a_2 + \frac{a_1}{C_{\text{HFBI}}} \right) \quad (4.4)$$

Параметрите a_1 и a_2 определени от напасването на данните на Фиг. 4.9а и 4.9b с линейна регресия са показани в Таблица 4.4. Получените стойности на a_1 са от порядъка на радиуса на HFBI молекула или олигомер, както би трябвало да се очаква от физически съображения. За да илюстрираме нарастването на размера на агрегатите с концентрацията на протеин, на Фиг. 4.9c и 4.9d нанесохме стойностите на a_{32} получени от съответното R_{32} в ур. (2.9), като непрекъснатите линии представляват графично ур. (4.3) с стойности на параметрите a_1 и a_2 от Таблица 4.4.

Таблица 4.4. Стойности на параметрите a_1 и a_2 в Ур. (4.3) получени от напасването на данните Фиг. 4.8а и 4.8b с линейна регресия в съответствие с ур. (4.4).

Φ_{oil}	a_1 (nm)	a_2 (nm/wt%)
0.30	2.7 ± 1.5	24.8 ± 0.6
0.50	1.8 ± 0.2	9.4 ± 1.0

Напомняме, че a_{32} е средният радиус на протеиновите агрегати, които са се *адсорбирали на повърхността на капката*. Не е изненадващо, че стойността a_2 е по-малка при по-високата обемна част, $\Phi_{\text{oil}} = 0.50$. Обяснението е следното. По време на емулгирането, турбулентностите водят до удари капка/агрегат и агрегат/агрегат. Първият вид удари води до адсорбция на агрегат върху повърхността на капката, докато вторият вид удари води до образуването на по-големи агрегати. При по-висока обемна част на маслото, Φ_{oil} , има повече капки и адсорбцията на протеинови агрегати върху тях е по вероятна, което намалява

концентрацията на свободните агрегати и вероятността те да флокулират при удар и да увеличат размера си.

4.3.3. Стабилност на емулсиите с HFBI

При съхранението на емулсиите до 50 дни (в хладилник при 4 °C), в различни моменти от време определихме разпределението по размери на капките в емулсиите. Резултатите показват, че за дадена емулсия разпределението по размери не се променя по време на съхранението. HFBI осигурява висока стабилност на емулсиите при съхранение. Ако капките на емулсиите с HFBI в началото имат несферична форма, тяхната форма не релаксира до сферична, дори и след съхранение за 50 дни.

И така, емулсиите с HFBI са стабилни при съхранение в покой. Обаче, ако подобна емулсия бъде подложена на разбъркване, наблюдава се коалесценция на капките и емулсията се разрушава. Например, ако диспергираме капките на концентрирана емулсия стабилизирана с HFBI в чиста вода, тя се разрушава, дори при леко разбъркване. Например, ако част от кремообразната емулсия се постави в кювета пълна с вода и се разклати 4–5 пъти леко с ръка, това води до нейното пълно разрушаване и разделяне на маслената от водната фази, което става бързо, за около 30 s.

4.4. Емулсии от смесени разтвори на HFBI и BLG

В тези експерименти, обемната част на SBO беше $\Phi_{oil} = 0.30$, а общата концентрация на протеин бе 0.25 wt% за всички изследвани емулсии. Във водата едновременно разтваряхме протеините, HFBI и BLG, а след това добавяхме соевото масло и хомогенизирахме сместа.

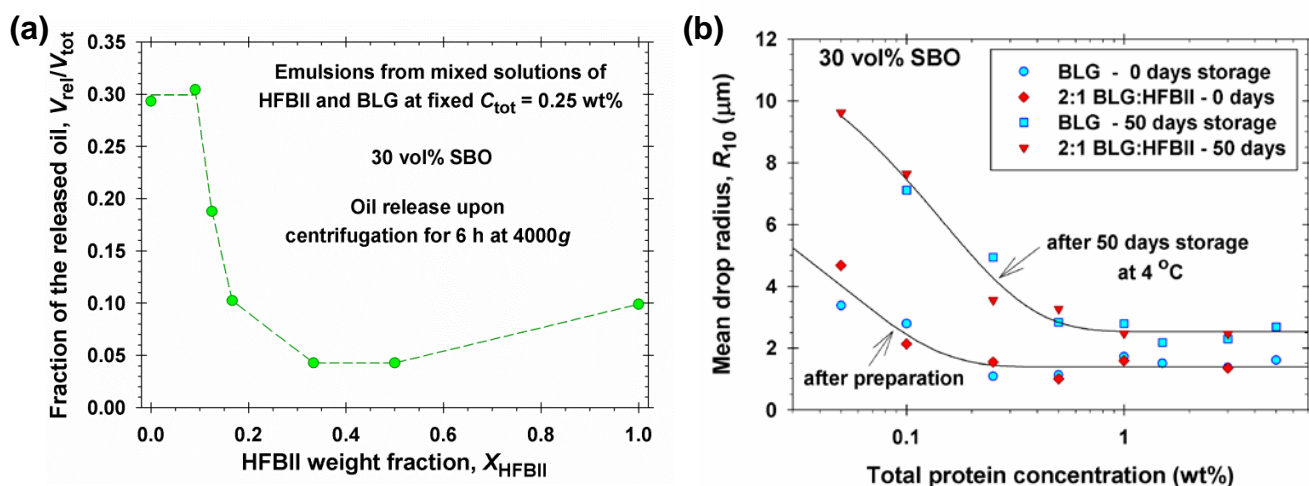
4.4.1. Стабилност на емулсиите при центрофугиране

За да ускорим коалесценцията на капки (ако има такава), изследваните емулсии бяха подложени на центрофугиране при 4000g за 6 часа при стайна температура 25 °C. С електронен микрометър измервахме дебелината на слоя масло, което се отделя на повърхността на емулсията.

На Фиг. 4.10а, е показана графично зависимостта на обема на отделеното масло, V_{rel} , отнесено спрямо общия обем на маслената фаза, V_{tot} , като функция на тегловната част на HFBI в смесения протеинов разтвор с BLG:

$$X_{HFBI} = \frac{w_{HFBI}}{w_{HFBI} + w_{BLG}} \quad (4.5)$$

където w_{HFBII} (w_{BLG}) е тегловната част HFBII (BLG) разтворени във водната фаза. Както се вижда на Фиг. 4.10а, за $X_{\text{HFBII}} \leq 0.1$ се отделя около 30 % от маслото. С други думи, когато BLG е преобладаващият компонент в протеиновата смес, получените емулсии са най-нестабилни. В обратния случай, при емулсии стабилизирани само с HFBII ($X_{\text{HFBII}} = 1$) обемът отделило се масло е 10 % от цялото количество SBO. Най-стабилни (при центрофугиране) са емулсиите попадащи в интервала $0.33 \leq X_{\text{HFBII}} \leq 0.50$, където само 4.3 % от маслото се отделя на повърхността на емулсиите. В това отношение, смесването на HFBII и BLG има синергичен ефект.



Фиг. 4.10. Резултати за емулсии SBO-във-вода при $\Phi_{\text{oil}} = 0.30$. (а) Обемът на отделеното масло отнесено спрямо пълния обем масло, $V_{\text{rel}}/V_{\text{tot}}$, като функция от тегловната част на HFBII в смесени водни разтвори на HFBII и BLG при фиксирана обща концентрация на протеин, 0.25 wt%. (б) Средният радиус, R_{10} като функция на общата концентрация на протеин – сравнение на резултатите за емулсии стабилизирани само с BLG и с 2:1 BLG/HFBII веднага след получаването им и след 50 дни съхранение при 4 °C.

4.4.2. Стабилност на емулсиите при разбъркване

Проведохме експерименти с емулсии стабилизирани от HFBII и BLG при тегловна част на хидрофобина $X_{\text{HFBII}} = 0.33$. След като получихме емулсията, част от нея поставихме в кювета на Епендорф пълна с чиста вода и я диспергирахме чрез разбъркване. Получената разрежена емулсия бе *стабилна*. (Напомниме, че при $X_{\text{HFBII}} = 1$ подобно разреждане и разбъркване води до дестабилизация на емулсията; вж. Раздел 4.3.3.) На Фиг. 4.11 са показани снимки на разредената емулсия стабилизирана с BLG и HFBII в отношение 2:1. Виждат се доста несферични капки, което е индикация за втвърдена повърхност.



Фиг. 4.11. Снимки на разредената емулсия SBO-във-вода (първоначално получена при обемна част на маслото $\Phi_{oil} = 0.30$ и 2:1 BLG/HFBII във водната фаза при 0.25 wt% пълна концентрация на протеин). Референтният белег е 20 μm .

В статията на Danov et al., 2015a, е установено, че по-повърхностно активният HFBII се адсорбира първи на междуфазовата граница, докато BLG образува втори адсорбционен слой върху монослоя от хидрофобин. В такъв случай, взаимодействието между емулсионните капки покрити с BLG би било много по-слабо. И наистина, контактният ъгъл на тънък филм стабилизирани с HFBII (при два прилепнали хидрофобинови адсорбционни слоя) може да достигне 51° , докато за регулярен протеин, като BLG, контактният ъгъл не надвишава 7° (виж. например Vasheva et al., 2011b), т.е. вторият адсорбционен слой от BLG може да предотврати силната адхезия на капките една към друга. Също така, вторият слой от BLG може да служи като източник на протеинови молекули, които да запълват пукнатините и празнините в твърдия адсорбционен слой от HFBII, които се получават при разбъркване на емулсията. С това може да се обясни синергичният (стабилизиращ) ефект от смесването на HFBII и BLG (Фиг. 4.10a).

Възможна причина за образуването на втори адсорбционен слой от BLG, който е залепнал за адсорбционния слой от HFBII, може да бъде на наличието на сили на привличане между *противоположно заредени участъци* от повърхностите на молекулите на BLG и HFBII. При колоидни частици такова електростатично привличане е наречено "patch-charge attraction"; виж. [Pora et al, 2009]. Има индикации, че подобни сили на привличане има и между молекулите на BLG във водни разтвори. С тяхното действие може да се обясни фактът, че се наблюдава помътняване (агрегиране) в разтворите на BLG при ниска йонна сила, докато тези разтвори се избистрят при по-висока йонна сила [Majhi et al., 2006]. В нашия случай, формирането на бислоен адсорбционен филм от молекули на HFBII и BLG показва, че привличането между молекулите на BLG и HFBII е по-слабо от привличането на две молекули от HFBII на междуфазовата граница. (Иначе би се образувал смесен слой от HFBII и BLG, и всички капки на Фиг. 4.11 биха били сферични.)

4.4.3. Устойчивост на емулсиите при съхранение

Проведохме и изследвания на промените, които настъпват с течение на времето в емулсии SBO-във-вода стабилизирани с BLG (вместо HFВІІ). Оптични наблюдения бяха извършени веднага след емулсирането, а също така и след 4, 7, 17, 25, 35 и 50 дни на съхранение на емулсиите в хладилник при 4 °С. Капките в емулсиите с BLG бяха сферични (ниска повърхностна еластичност при прехлъзване), за разлика от емулсиите с HFВІІ, където наблюдавахме елипсовидни капки (виж по-горе). При всички изследвани емулсии, с концентрация на BLG от 0.05 до 5 wt%, след съхранение за 7 дни наблюдавахме отделяне на масло под формата на лещи или като разтечен слой. С други думи, емулсиите с BLG са по-нестабилни в сравнение с тези стабилизирани само с HFВІІ. (При последните изобщо не бе наблюдавано отделяне на масло след съхранение за 50 дни при покой.)

Определихме и разпределенията по размер на капките, както и техните средни радиуси R_{10} и R_{32} , след различни периоди на съхранение. На Фиг. 4.10b е показана зависимостта на R_{10} от общата концентрация на протеин веднага след емулгирането и след съхранение за 50 дни. Разсейването на експерименталните точки се дължи на невъзпроизводимостта на резултата от емулгирането.

Наклонената и хоризонталната части на долната крива (при $t = 0$) на Фиг. 4.10b отговарят, съответно, на “ограничена коалесценция” и на режим на “Колмогоров”, аналогично на данните показани на Фиг. 4.8.

След $t = 50$ дни, радиусът R_{10} е значително по-голям отколкото в началото, при $t = 0$ (Фиг. 4.10b). Това е индикация за *коалесценция*, която протича по време на съхраняването на емулсиите с BLG, дори и при по-високите концентрации, $BLG \geq 1$ wt%. (Както е известно, соевото масло е практически неразтворимо във вода така, че нарастването на R_{10} с времето не би могло да се дължи на оствалдово зреене). При емулсиите стабилизирани с HFВІІ, такава коалесценция липсва (виж по-горе). Това е още едно уникално свойство на HFВІІ.

Аналогични експерименти бяха проведени с емулсии SBO-във-вода стабилизирани с BLG и HFВІІ в отношение 2:1 ($X_{HFВІІ} \approx 0.33$). Оптични наблюдения бяха извършени веднага след емулсирането, а също така и след 4, 7, 17, 25, 35 и 50 дни на съхранение на емулсиите в

хладилник при 4 °C. Определени бяха разпределенията по размер на капките, както и техните средни радиуси R_{10} и R_{32} , след различни периоди на съхранение. На 50-тия ден наблюдавахме отделяне на маслени лещи или на маслен слой на повърхността на емулсиите при всички концентрации на смесените разтвори на BLG+HFBI. За емулсиите само с BLG, отделянето настъпва на 7-мия ден, докато за емулсиите само с HFBI не се наблюдава такова отделяне на масло дори на 50-тия ден. Следователно, емулсиите с 2:1 BLG/HFBI имат междинна стабилност, между емулсиите стабилизирани само с BLG и тези стабилизирани само с HFBI.

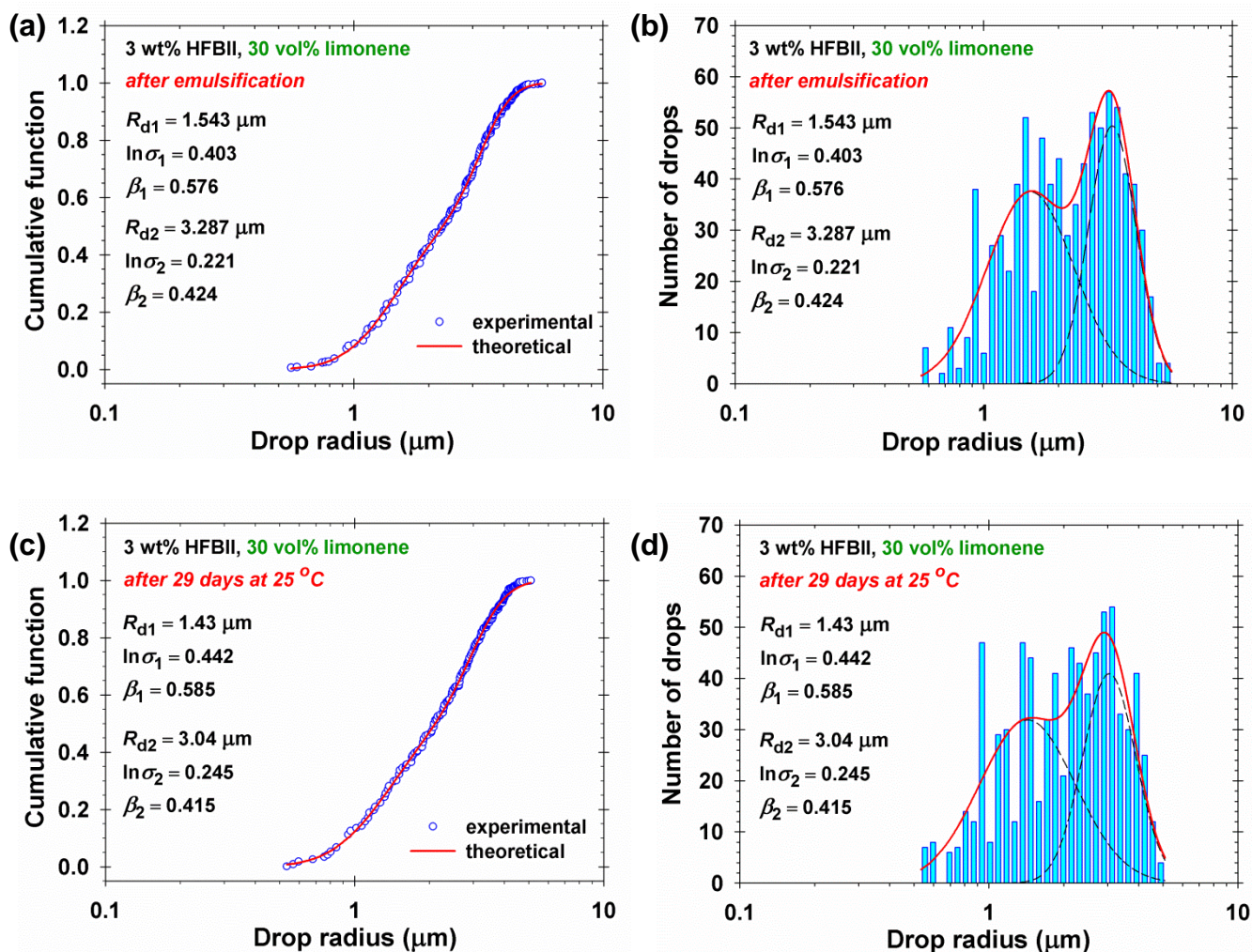
Нарастването на средния радиус, R_{10} , след съхранение на емулсията за 50 дни е почти същото като за емулсиите стабилизирани само с BLG и 2:1 BLG/HFBI (Фиг. 4.10b), но такова повишаване на R_{10} отсъства в случая на емулсии стабилизирани само с HFBI.

4.5. Оствалдово зреене в емулсии стабилизирани с HFBI и други емулгатори

4.5.1. Емулсии лимонен-във-вода

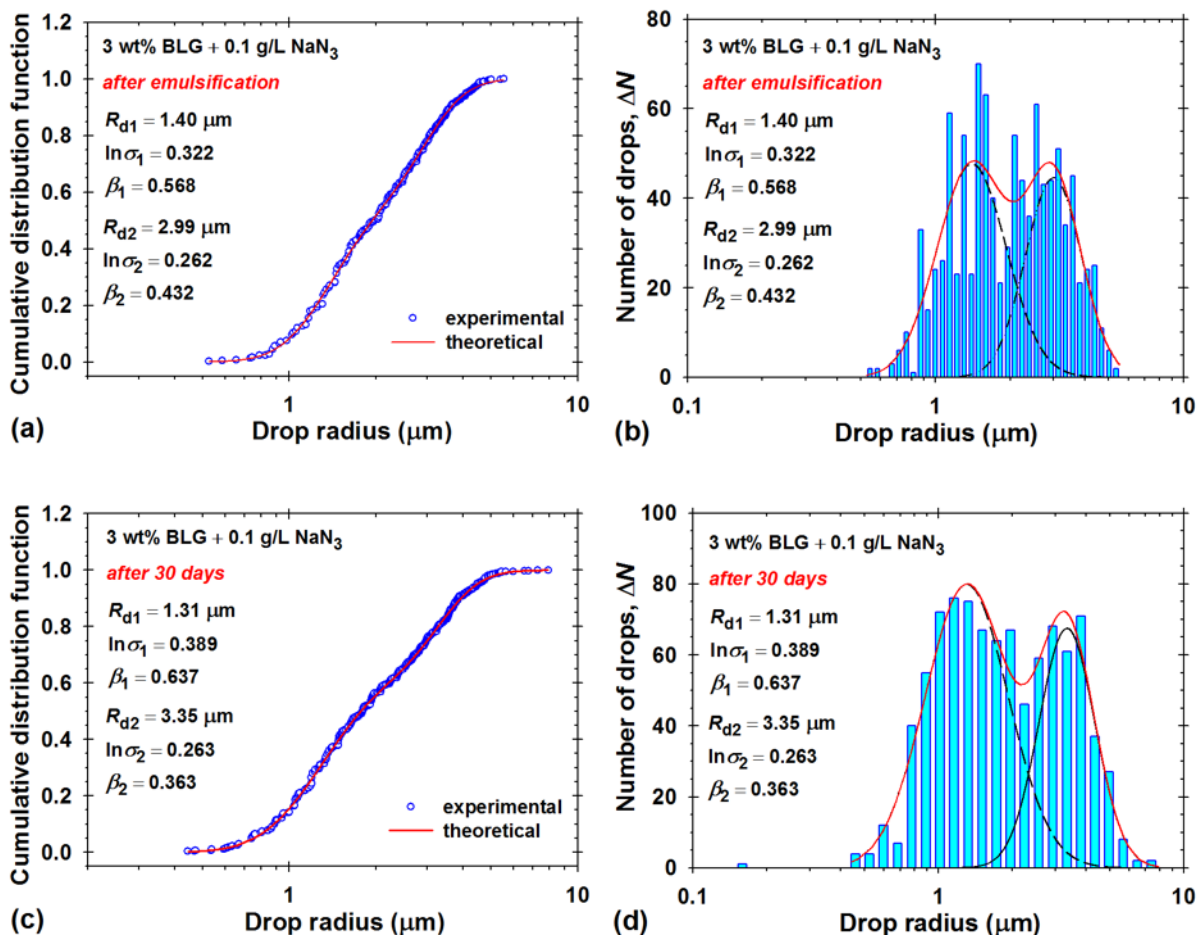
(a) *HFBI*: Изследвахме емулсии лимонен-във-вода при три концентрации на протеин 0.1, 1 и 3 wt% HFBI и обемна част на маслената фаза, $\Phi_{oil} = 0.30$. Поради относително високата разтворимост на лимонена във водата (13.8 mg/L), би могло да се наблюдава оствалдово зреене. Капките в емулсиите с лимонен са подобни по размер и форма (несферични) като тези със SBO, което означава, че лимоненът не пречи на втвърдяването на хидрофобиновия адсорбционен слой.

При концентрации 0.1, 1 и 3 wt% HFBI всички емулсии бяха стабилни за период от един месец на съхранение при температура 25 °C. При 0.1 wt% HFBI, емулсиите бяха относително монодисперсни със среден радиус на капките 2.2 μm ; мономодално логнормално разпределение, виж ур. (2.14) и (2.15). При по високите концентрации, експерименталните данни за капките се описват с бимодално логнормално разпределение, виж ур. (2.17) и (2.18). Средните радиуси, $R_{d1} \approx 1.5 \mu\text{m}$ и $R_{d2} \approx 3.5 \mu\text{m}$, на практика бяха постоянни за всички изследвани емулсии съхранявани за различен период време; виж Фиг. 4.12. HFBI спира (блокира) оствалдовото зреене и при трите изследвани концентрации.



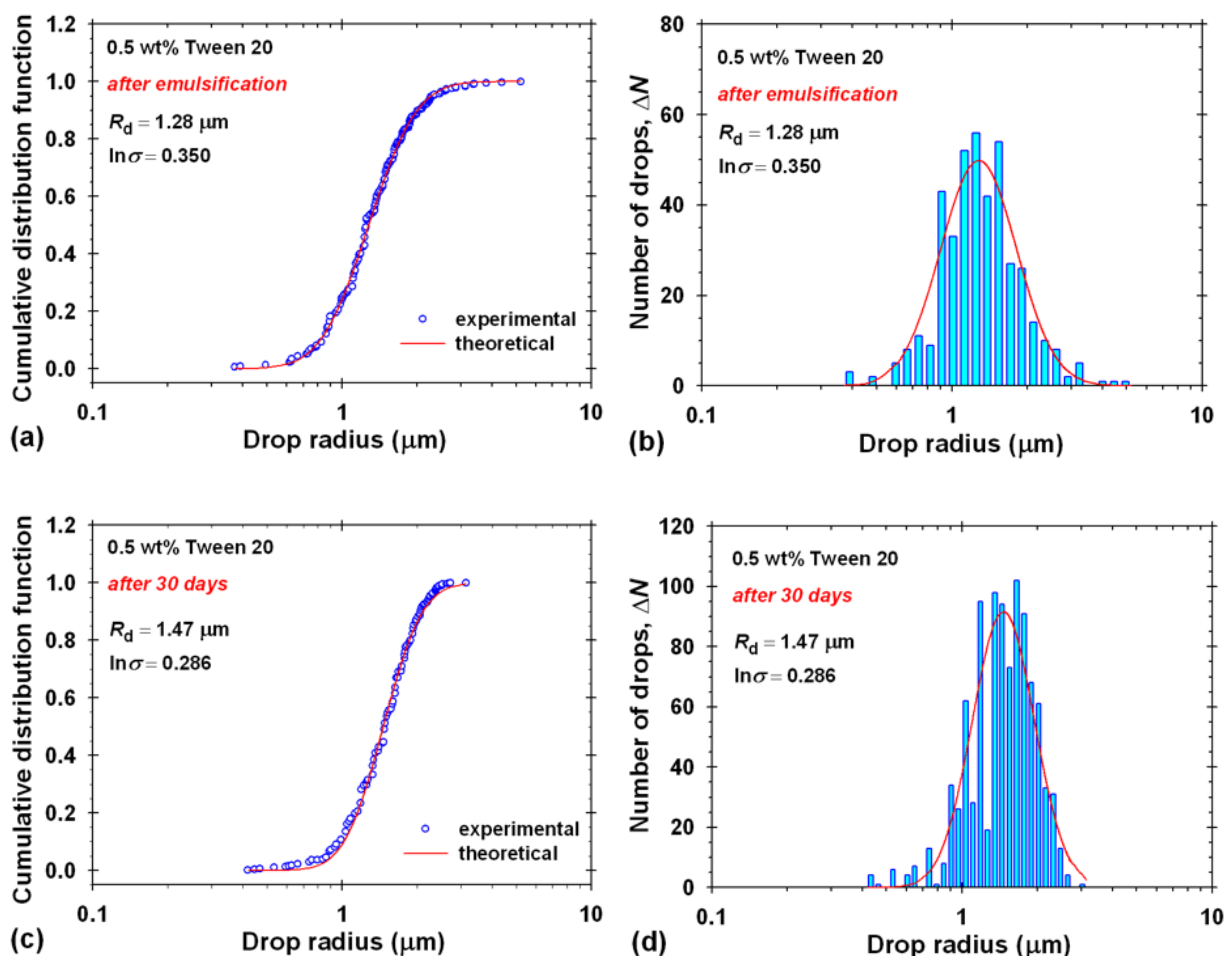
Фиг. 4.12. Данни за емулсии лимонен-във-вода ($\Phi_{\text{oil}} = 0.30$) стабилизирани с 3 wt% HFBIИ във водната фаза. (a,c) Графики на кумулативната функция и (b,d) на разпределението на капките по размери. Непрекъснатата линия съответства на най-доброто напасване с бимодално логнормално разпределение за данните получени след съхранение на емулсията за 0 и 29 дни при 25 °C. Прекъснатите линии съответстват на двете съставлящи унимодални разпределения. Няма индикации за оствалдово зреене.

(c) *BLG*: Емулсиите стабилизирани с 0.1 и 1 wt% BLG бяха нестабилни поради наличието на бавна коалесценция. Наблюдавахме, отделяне на маслени лещи на повърхностна на емулсиите след съхранение за 2 и 7 дни. При най-високата изследвана концентрация, 3 wt% BLG, емулсиите бяха стабилни поне за месец. На Фиг.4.15 са показани експерименталните данни и теоретичните криви. Вижда се, че BLG почти спира оствалдовото зреене при 3 wt% BLG, но тази концентрация е 30 пъти по-висока от най-ниската изследвана концентрация на HFBIИ, при която емулсиите са стабилни (0.1 wt%).



Фиг. 4.15. Данни за емулсии лимонен-във-вода ($\Phi_{oil} = 0.30$) стабилизирани с 3 wt% BLG във водната фаза. (а,с) Графики на кумулативната функция и (b,d) на разпределението на капките по размери. Непрекъснатата линия съответства на най-доброто напасване с бимодално логнормално разпределение на данните получени след съхранение на емулсията за 0 и 30 дни при 25 °C. Прекъснатите линии съответстват на двете съставлящи унимодални разпределения. Има слаби индикации за оствалдово зреене.

(d) *Tween 20*: Емулсиите с 0.016 wt% Tween 20 бяха нестабилни – от направените видео-записи се видя, че има бавна коалесценция. При по-високите концентрации, 0.16 и 0.50 wt% Tween 20, емулсиите имаха монодисперсни капки и бяха стабилни за повече от един месец при температура 25 °C. Средният радиус на капките намалява от 2 μm до 1.3 μm с увеличението на концентрацията на ПАВ. Tween 20 блокира оствалдовото зреене при концентрации ≥ 0.16 wt%, което се вижда от Фиг. 4.16.

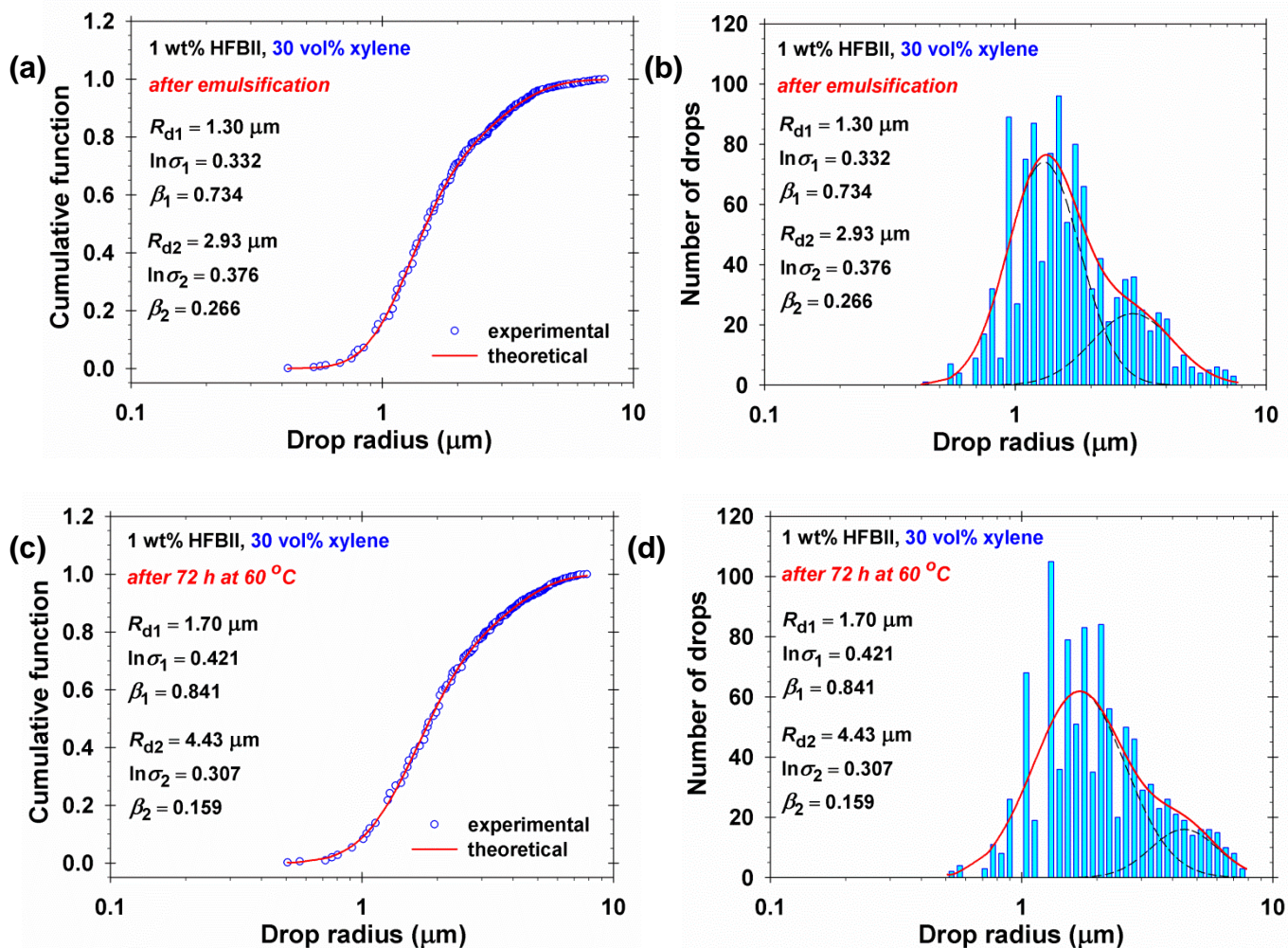


Фиг. 4.16. Данни за емулсии лимонен-във-вода ($\Phi_{oil} = 0.30$) стабилизирани с 0.5 wt% Tween 20 във водната фаза. (a,c) Графики на кумулативната функция и (b,d) на разпределението на капките по размери. Непрекъснатата линия съответства на най-доброто напасване с логнормално разпределение на данните получени след съхранение на емулсията за 0 и 30 дни при 25 °C. Няма индикации за оствалдово зреене.

4.5.2. Емулсии ксилен-във-вода

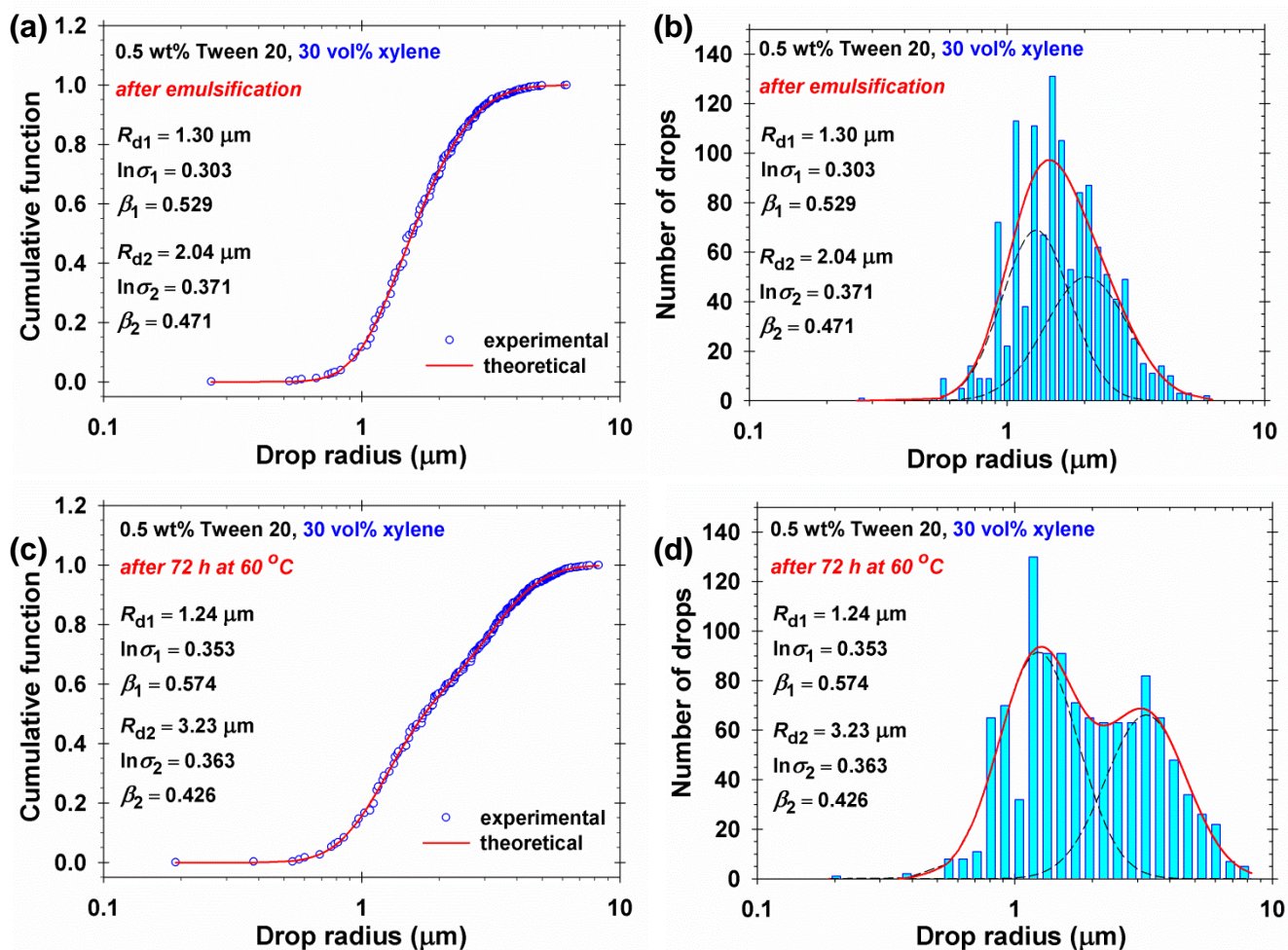
При 25 °C, разтворимостта на ксилен във вода е около 12 пъти по-висока от тази на лимонена. За да ускорим процеса на оствалдово зреене, работихме с ксилен при температура 60 °C, при която разтворимостта му във вода се повишава 1.5 пъти (Yalkowsky et al., 2010). Обемната част на маслото беше $\Phi_{oil} = 0.30$, както при емулсиите с лимонен.

(a) *HFBI*: При 0.1 wt% HFBI, получените емулсии не бяха напълно стабилни – след 1 час при 60 °C наблюдавахме отделяне на маслени лещи. При 1 wt% HFBI след 72 часа при 60 °C отново наблюдавахме отделяне на маслени лещи – индикация за протичане на коалесценция на капки. При 3 wt% HFBI, получената емулсията беше напълно стабилна след 72 часа при 60 °C. При концентрации 1 и 3 wt% HFBI отсъстват ясни индикации за оствалдово зреене; виж Фиг. 4.17.



Фиг. 4.17. Данни за емулсии ксилен-във-вода ($\Phi_{oil} = 0.30$) стабилизирани с 1 wt% HFBII във водната фаза. (a,c) Графики на кумулативната функция и (b,d) на разпределението на капките по размери. Непрекъснатата линия съответства на най-доброто напасване с бимодално логнормално разпределение на данните получени след съхранение на емулсията за 0 и 72 часа при 25 °C. Прекъснатите линии съответстват на двете съставляващи унимодални разпределения. Отсъстват изразени индикации за оствалдово зреене.

(b) *Tween 20*: Разпределението по размери на капките в емулсии стабилизирани с Tween 20 беше бимодално. В случай на 0.016 wt% и 0.16 wt% Tween 20, емулсиите не бяха напълно стабилни след 1 час при 60 °C поради коалесценция на маслени капки (отделяне на маслени лещи). Емулсията с 0.5 wt% Tween 20 беше стабилна относно коалесценция за 72 часа при 60 °C – отсъстваше отделено масло. Обаче, разпределението по размери на капките в тази емулсия показва индикации за оствалдово зреене (Фиг. 4.18). С други думи, Tween 20 не може да спре оствалдовото зреене в емулсиите ксилен-във-вода при 60 °C дори при най-високата изследвана концентрация, 0.5 wt%.



Фиг. 4.18. Данни за емулсии ксилен-във-вода ($\Phi_{oil} = 0.30$) стабилизирани с 0.5 wt% Tween 20 във водната фаза. (a,c) Графики на кумулативната функция и (b,d) на разпределението на капките по размери. Непрекъснатата линия съответства на най-доброто напасване с бимодално логнормално разпределение на данните получени след съхранение на емулсията за 0 и 72 часа при 25 °C. Прекъснатите линии съответстват на двете съставляващи унимодални разпределения. Има индикации за оствалдово зреене.

4.6. Резюме на основните резултати в Глава 4

Представените в Глава 4 резултати представляват първото подробно и системно изследване на свойствата на HFVII като емулгатор, включително на режима на емулгиране и емулсионната стабилност.

Емулсии SBO-във-вода бяха получени при различни концентрации на HFVII. Чрез обработка на видео-кадри заснети с оптичен микроскоп бяха определени разпределенията по размери на емулсионите капки. От тях бе определена зависимостта на средния радиус R_{10} от концентрацията на протеин. Установено бе, че при по-високи концентрации на HFVII и по-ниска обемна част на маслото емулгирането е в *режим на Колмогоров*, т.е. размерът на капките се определя мощността на хомогенизатора. За разлика от това, при по-ниски

концентрации на HFBI и по-високи обемни части на масло емулгирането е в *режим на ограничена коалесценция*, т.е. капките претърпяват няколко цикъла на коалесценция, преди да се достигне значително покритие от протеин върху тяхната повърхност, което да блокира по-нататъшната им коалесценция (Фиг. 4.8). Образуването на по-големи протеинови агрегати с увеличението на концентрацията на протеин също влияе върху процеса на ограничена коалесценция;

При съхранение, при концентрации на HFBI по-високи от 0.05 wt% получените емулсии SBO-във-вода бяха стабилни поне за 50 дни, без никаква индикация за коалесценция. Предвид това, докладваните от други автори резултати, че емулсии стабилизирани с HFBI се разрушават напълно в рамките на 24 часа [Askolin et al., 2006], се дължат на използваната от тези автори ниска концентрация, 0.01 wt% HFBI.

Емулсиите с HFBI са нестабилни при разбъркване. Този факт показва, че втвърдените хидрофобинови адсорбционни слоеве върху повърхността на капките са крехки и могат да се разрушат под действието на приложени механични напрежения. Ние установихме, че ако покритите с хидрофобин капки се „облекат“ с втори адсорбционен слой от BLG, нестабилността при разбъркване се премахва (Раздел 4.4.2). Слой от BLG не само предотвратява залепването на капките, но може да служи и като източник на протеинови молекули, които да запълнят пукнатините и празнините в слоя от HFBI, които се появяват при деформация на капките под действието на механични напрежения. Смесването на BLG и HFBI има синергичен ефект по отношение на стабилността на емулсиите при центрофугиране (Фиг. 4.10a). Обаче, добавянето на BLG влошава дълговременната стабилност на емулсиите с HFBI (Фиг. 4.10b).

Накрая, изследвахме емулсионната стабилност спрямо оствалдово зреене в случай на летливи масла (лимонен и ксилен), които имат относително висока разтворимост във вода. При концентрации по-високи от 0.1 wt%, HFBI напълно блокира Оствалдовото зреене в емулсиите на лимонен във вода (Фиг. 4.12). В сравнителни експерименти, най-лоша бе стабилността на емулсиите със SMP, при които наблюдавахме добре изразено оствалдово зреене (Фиг. 4.13-виж в дисертацията). BLG и Tween 20 също могат да блокират оствалдовото зреене, но при по-високи концентрации. В това отношение, HFBI има предимството, че не само потиска преноса на маслени молекули между капките (в случай на оствалдово зреене), но и образува *твърди* капсули, които могат да бъдат използвани за задържането на разтворими и/или летливи съединения (като аромати, овкусители, оцветители и консерванти) във водна фаза [Khalesi et al., 2015]. Адсорбционните слоеве от HFBI са непроницаеми за преноса на летливи маслени молекули дори и при по-висока температура, 60 °C, което бе установено в нашите експериментите с емулсии на ксилен във вода (Фиг. 4.17).

Основни научни приноси в дисертацията

- 1) Получени са високо-стабилни пени с хидрофобин HFBIII състоящи се от мехурчета с радиус $\leq 40 \mu\text{m}$, които имат логнормално разпределение и са стабилни поне за 15-17 дни. Резултатите показват, че HFBIII повишава дълготрайността на пените поне по три начина: (i) стабилизира пенните филми и предотвратява *коалесценцията* на мехурчета; (ii) образува плътни адсорбционни слоеве, които блокират преноса на газ и предотвратяват *оствалдовото зреене* и (iii) стабилизира микронни мехурчета и протеинови агрегати, които запушват каналите на Плато и предотвратяват *синерезиса* (изтичането на вода от пените).
- 2) Установено е, че стабилността на пените с HFBIII не е чувствителна към pH на разтвора. Показано е, че заместването до 94% от HFBIII с „регулярен“ протеин, BLG, BSA или OVA, който сам по себе си е лош пеностабилизатор, не нарушава стабилността на пените с хидрофобин. Установено е, че е налице корелация между повърхностните еластичност и вискозитет при прехлъзване, от една страна, и стабилността на пените с протеин, от друга страна; т.е. повърхностната реология може да бъде индикатор за пеностабилност.
- 3) Установено е, че хидрофобин HFBIII е отличен емулгатор, като в емулсиите стабилизирани с него не се наблюдават съществени изменения при съхранение поне за 50 дни в покой.
- 4) Чрез изследване на разпределенията на капките по размери в емулсии стабилизирани с HFBIII са идентифицирани режимите на Колмогоров и на „ограничена коалесценция“. В последния режим, зависимостта на средния размер на капките от концентрацията на емулгатора е различна от тази при пикеринговите емулсии. Дадена е количествена интерпретация на тази зависимост, като е отчетено нарастването на размера на протеиновите агрегати с повишението на концентрацията на HFBIII.
- 5) Установено е, че стабилните при покой емулсии с HFBIII се разрушават при разбъркване, поради крехкостта на втвърдените адсорбционни слоеве от хидрофобин. Показано е, че разрушаването на тези емулсии може да се предотврати като се добави млечният протеин BLG.
- 6) При въгледороди с по-висока разтворимост във вода, лимонен и ксилен, при които е възможно оствалдово зреене, е проведено сравнително изследване на еволюцията на разпределението на емулсионните капки за четири различни емулгатора: HFBIII, SMP, BLG и Tween 20. Установено е, че от всички тях HFBIII най-добре блокира оствалдовото зреене и може напълно да капсулира летливия въгледород в капките, докато при SMP се наблюдава най-добре изразено оствалдово зреене.

Публикации по дисертацията

По дисертацията са публикувани две статии, [Д1] и [Д2], в международното списание *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (Elsevier), което има импакт фактор 2.760. На уебсайта на списанието, първата статия бе публикувана на 15.06.2016 г., а втората – на 16.09.2016 г. Досега, не са забелязани цитати на тези две статии, които излязоха съвсем неотдавна. Статия [Д1] отразява нашите резултати за пени (Глава 3 в дисертацията), а [Д2] – за емулсии (Глава 4).

[Д1] L.M. Dimitrova, P.V. Petkov, P.A. Kralchevsky, S.D. Stoyanov, E.G. Pelan, Production and characterization of stable foams with fine bubbles from solutions of hydrophobin HFBI and its mixtures with other proteins. *Colloids Surf. A*, (2016) [doi:10.1016/j.colsurfa.2016.06.018](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.06.018)

[Д2] L.M. Dimitrova, M.P. Boneva, K.D. Danov, P.A. Kralchevsky, E.S. Basheva, K.G. Marinova, J.T. Petkov, S.D. Stoyanov, Limited coalescence and Ostwald ripening in emulsions stabilized by hydrophobin HFBI and milk proteins. *Colloids Surf. A*, 509 (2016) 521–538. [doi:10.1016/j.colsurfa.2016.09.066](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.09.066)

Доклади и постери представени на конференции

1. L.M. Dimitrova, M.P. Boneva, K.D. Danov, P.A. Kralchevsky, E.S. Basheva, K.G. Marinova, J.T. Petkov, S.D. Stoyanov, Limited coalescence and Ostwald ripening in emulsions stabilized by hydrophobin HFBI and milk proteins, 9th National Conference on Chemistry, Sofia, 29 September – 01 October 2016 – Poster.
2. Л.М. Димитрова, П.В. Петков, П.А. Кралчевски, С.Д. Стоянов, Е.Г. Пилън, Свойства на пени, получени от водни разтвори на хидрофобин и негови смеси с други протеини, 15 Национална конференция по химия за студенти и докторанти, София, 18–20 май 2016 г. – Доклад.
3. Л.М. Димитрова, М.П. Бонева, К.Д. Данов, П.А. Кралчевски. Емулсии стабилизирани с HFBI: ефекти от масло-разтворими ПАВ. Годишен научен семинар на катедра Инженерна химия и фармацевтично инженерство при ФХФ, СУ; Станция Гьолечица, 4–8 март 2015 г. – Доклад.
4. L.M. Dimitrova, P.V. Petkov, P.A. Kralchevsky, S.D. Stoyanov, E.G. Pelan, Stable foams with fine bubbles stabilized by the unique protein hydrophobin and its mixtures with milk and egg proteins. 20th SIS – Surfactants in Solution Symposium, Coimbra, Portugal, 22 – 27 June 2014 – Poster.
5. L.M. Dimitrova, K.D. Danov, P.A. Kralchevsky, G.S. Georgieva, K.P. Anantha- padmanabhan, pH of solutions of long-chain (C16, C18) carboxylates and their interpretation in terms of precipitation and micellization. 27th Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS), Sofia, Bulgaria, 1–6 September 2013 – Poster.
6. Л.М. Димитрова, П.В. Петков, П.А. Кралчевски. Получаване на стабилна пяна с фини мехурчета от HFBI в присъствие на протеини. Годишен научен семинар на катедра Инженерна химия при ФХФ, СУ; Станция Гьолечица, 25–28 март 2013 г. – Доклад.

Дисертацията съдържа общо 43 фигури, повечето от които с два и повече панела; 10 таблици; 28 уравнения; цитирани са общо 102 литературни източника. Докторантката е представила резултатите от изследванията си на 6 научни форума (3 доклада и 3 постера) – виж списъка приложен в края на дисертацията. Глава 2 дава описание на използваните материали и методи. Глави 3 и 4, съответно, представят резултатите за пени и емулсии. Накрая, в раздел „Основни приноси в дисертацията“ са сумирани най-важните от получените резултати.

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