

«УТВЕРЖДАЮ»
Ректор Российского Химико-Технологического Университета
имени Д.И. Менделеева,
профессор, д.т.н.  Колесников В.А.



19 февраля 2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации

на диссертационную работу и автореферат Иванова Романа Александровича на тему «Коллоидно-химические свойства смесей лизоцим-ПАВ в системе водный раствор/октан», представленные на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.11 – коллоидная химия

Изучение адсорбции биологически-активных веществ, в частности, белков на различных границах раздела фаз представляет собой интересную и важную задачу, поскольку литературных данных, посвященных этому вопросу, крайне недостаточно. Раскрытие механизмов адсорбции белков актуально с точки зрения более глубокого понимания ряда химических и биохимических процессов, протекающих в живых организмах. Проблема существенно усложняется в том случае, когда рассматриваются смеси белок-ПАВ, которые зачастую обладают синергетическим эффектом и усиливают действие друг друга. Интерес к изучению таких смесей связан с их широким использованием в медицине, фармацевтике, косметике и т.д.

В данной работе автор предлагает довольно нестандартный метод изучения адсорбции компонентов – метод сцинтиллирующей фазы с мечеными тритием веществами. Однако этот метод открывает широкие возможности получения надежных данных о величинах адсорбции как на границе раствор-воздух, так и на границе жидкость-жидкость, а также позволяет количественно оценить синергетический эффект в выбранной смеси белок-ПАВ. Дополнительным достоинством выбранного метода является и тот факт, что он дает возможность проводить количественные измерения в области предельно низких концентраций. Необходимо отметить, что в работе, наряду с методом сцинтиллирующей фазы представлен широкий круг физико-химических методов исследования, что свидетельствует о высоком научном уровне проведенных исследований.

Актуальность и целесообразность диссертации не вызывают сомнений, поскольку она направлена на раскрытие механизмов совместного влияния компонентов смеси ПАВ-белок на коллоидно-химические свойства двухфазных систем водный раствор-органическая жидкость. Рассмотренные в диссертации научные подходы представляют большой интерес для совершенствования технологий получения новых медицинских, косметических и фармацевтических препаратов широкого спектра действия.

Цель работы заключалась в установлении механизма адсорбции и распределения компонентов смесей лизоцима и ПАВ различной природы в системе двух несмешивающихся жидкостей и установлении влияния взаимодействия белка и ПАВ на коллоидно-химические свойства водный раствор смеси лизоцим-ПАВ/октан.

Реализация поставленной цели достигалась решением ряда последовательно усложняющихся задач.

Первый комплекс задач был посвящен отработке методики применения метода сцинтиллирующей фазы для изучения адсорбции белка и ПАВ различной природы на разных границах раздела фаз. При этом автором впервые была разработана методика получения меченого тритием цвиттерионного ПАВ – кокоамидопропилбетаина. Автором были получены количественные характеристики адсорбции лизоцима и ряда ПАВ,

определены параметры адсорбционных слоев, рассчитаны коэффициенты распределения лизоцима на границе вода-октан.

Второй комплекс задач касался сопоставления результатов адсорбционных измерений методом сцинтиллирующей фазы с данными, полученными обработкой изотерм поверхностного и межфазного натяжения по уравнению Шишковского. Автором показана вполне удовлетворительная сходимость результатов (в определенном интервале концентраций белка и ПАВ), что позволило рекомендовать использование метода сцинтиллирующей фазы для исследования адсорбции белков и ПАВ.

Третий комплекс задач позволил оценить ферментативную активность лизоцима в присутствии ПАВ, а также оценить устойчивость смачивающих пленок, стабилизированных смесями лизоцим-ПАВ.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные в работе результаты могут быть использованы для развития новых биохимических технологий и позволят оптимизировать состав композиций, использующихся для создания дисперсных систем, стабилизированных смесями белок-ПАВ.

Научная новизна работы заключается в том, что на основании сопоставления данных методов сцинтиллирующей фазы, тензиометрии, статического и динамического светорассеяния, определения ферментативной активности установлены основные стадии перераспределения компонентов между контактирующими фазами и межфазным адсорбционным слоем. Выявлены концентрации, при которых формируются гидрофильные и гидрофобные комплексы – белок-ПАВ и показано их влияние на ферментативную активность и устойчивость смачивающих пленок.

Структура работы традиционная – введение, обзор литературы, экспериментальная часть, обсуждение результатов, выводы и приложения. Работа изложена на 135 страницах машинописного текста, содержит 54 рисунка и 6 таблиц.

Во *введении* четко обозначены цель и задачи исследования, отражены актуальность и значимость работы.

Литературный обзор полно отражает современные проблемы исследований взаимодействий белок-ПАВ, выполнен на 35 страницах машинописного текста и базируется на 182 литературных источниках, включая работы 2011-2013 годов.

В *экспериментальной части* представлены четко обоснованный выбор объектов исследования и их описание, приведены используемые в работе методы исследования.

В разделе *результаты и обсуждение* приводятся полученные экспериментальные результаты, их обработка и анализ. Раздел 3.1. посвящен взаимному влиянию лизоцима и ПАВ различной природы на распределение их в системе вода/октан. Показано, что коэффициенты распределения лизоцима в присутствии катионного и анионного ПАВ возрастают на 40% и 60%, соответственно, по сравнению с отсутствием ПАВ в системе. Данный факт может быть объяснен формированием гидрофобных комплексов белок-ПАВ, больше растворимых в октане, чем белок. Аналогичным образом выявлено, что и присутствие белка также оказывает влияние на коэффициенты распределения ПАВ в органической среде. С другой стороны, присутствие цвитерионного ПАВ практически не оказывает существенного влияния на коэффициенты распределения белка, хотя само ПАВ переходит в органическую фазу в присутствии белка заметно лучше. Необходимо отметить, что указанные закономерности соблюдаются только в определенных концентрациях и соотношениях белок-ПАВ.

В разделах 3.2 – 3.3 обсуждаются результаты тензиометрических исследований индивидуальных соединений и смесей белок-ПАВ, полученные обработкой изотерм поверхностного и межфазного натяжений растворов в рамках уравнения Шишковского. Обнаружено, что в области разбавленных растворов наблюдается хорошая сходимость результатов тензиометрических исследований и метода сцинтиллирующей фазы. Раздел 3.4 посвящен определению констант взаимодействия белок – ПАВ в смешанных адсорбционных слоях. Показана применимость модели Файнермана. Установлено, что

межфазные слои на границе вода-октан обогащены молекулами ПАВ; мольная доля ПАВ возрастает в ряду катионное ПАВ < анионное ПАВ < цвиттерионное ПАВ.

В разделе 3.5 определены размеры формирующихся комплексов, обнаружены интервалы концентраций и соотношения компонентов, при которых происходит агрегация частиц. Наличие крупных агрегатов подтверждено методом флуоресценции в разделе 3.6. В заключительной части работы автор приводит исследования по ферментативной активности лизоцима в присутствии ПАВ. Автором впервые установлено снижение ферментативной активности лизоцима при добавлении цвиттерионного ПАВ с концентрацией свыше 10^{-5} М. Последний раздел 3.8. касается исследованию избирательного смачивания в системе белок-ПАВ/октан/гидрофобизированное стекло. Обнаружено, что на устойчивость пленок в основном влияет ПАВ, а не белок; растекание капель в условиях избирательного смачивания происходит в режиме граничной кинетики.

В заключение работы автором сформулированы *выводы*, четко и полно отражающие новизну полученных результатов.

Достоверность полученных в работе результатов не вызывает сомнений, поскольку экспериментальная часть базируется на использовании современных физико-химических методах анализа, а выводы основаны на результатах четко спланированного и аккуратно выполненного эксперимента и подтверждены в ряде случаев опубликованными литературными данными.

Диссертация написана ясным, четким научным языком, аккуратно оформлена, прекрасно иллюстрирована и практически не содержит опечаток и грамматических ошибок.

Достоинства работы заключаются в получении автором интересных результатов о взаимном влиянии белка и ПАВ различной природы на адсорбцию, смачивание и перераспределение компонентов на различных границах раздела фаз, установлении параметров смешанных адсорбционных слоев, а также в доказательстве применимости метода сцинтиллюющей фазы для изучения адсорбции белков.

Автореферат и публикации полно отражают основное содержание диссертации.

По содержанию и оформлению диссертации имеется ряд вопросов и замечаний.

Вопросы.

- 1) Почему в качестве органической фазы выбран октан?
- 2) На каком основании выбран интервал концентраций лизоцима 0,01-0,1 г/л?
- 3) Почему изотермы поверхностного натяжения обрываются до выхода на плато? В частности, на рисунке 27 (стр. 75). Величины ККМ, представленные в таблице 2 (стр. 74) определены по этим изотермам?
- 4) Какими количественными параметрами характеризуется гидрофобность (гидрофильность) комплексов белок-ПАВ? В работе говорится о лучшей растворимости гидрофобного комплекса в органической среде, однако, это никак не подтверждается ни литературными, ни собственными исследованиями.

Замечания.

По оформлению:

- 1) Подписи под рисунками, в частности (23, 24, 25 и ряд других) сделаны небрежно – не указаны концентрации и соотношения компонентов, граница раздела фаз (раствор-воздух или жидкость-жидкость), что затрудняет восприятие материала. При необходимости обращения к этим рисункам, приходится читать практически весь раздел, чтобы разобраться и сопоставить результаты, описанные в тексте и в таблицах с точками на рисунках.

- 2) Не корректно использовать термин «натяжение» вместо «поверхностного натяжения» (автореферат, стр. 15).
- 3) Довольно сложно воспринимается раздел 3.9. По-видимому, требовалось бы более подробное объяснение рисунков I-IV, соответствующих разным интервалам концентраций белок-ПАВ.
- 4) Разделы 3.8 и 3.9. следовало бы поменять местами, чтобы вопросы смачивания и пленок обсуждались в самом конце работы.

По содержанию:

1). В литературном обзоре следовало бы, помимо указанных литературных источников, сослаться на работы В.Н. Измайловой, посвященные исследованию растворов белков. Это классические работы по коллоидной химии растворов белков, выполненные на кафедре коллоидной химии МГУ, где и сделана рецензируемая диссертация. В работе не рассматривается влияние pH, ионной силы, температуры и других параметров на конформационное состояние лизоцима. Согласно современным представлениям исследуемые системы относятся к лиофильным коллоидам, что должно оказывать существенно влияние на взаимодействие белок-ПАВ, что никак не обсуждается автором.

2). Результаты, касающиеся определения величин гиббсовской адсорбции методом скинтиллирующей фазы (рис. 20, стр. 67) для катионного и анионного ПАВ не совпадают с результатами таблицы 2 (стр. 74), рассчитанными по уравнению Шишковского. В частности, изотермы для индивидуальных ПАВ (черная линия, «ромбики»): для катионного ПАВ (DTAB) – изотерма выходит на плато при $\Gamma = 1,3-1,5$ мкмоль/л (в таблице $\Gamma_{\max} = 2,71$ мкмоль/л); для анионного ПАВ – по изотерме выход на плато происходит при $\Gamma = 1,0-1,2$ мкмоль/л (в таблице $\Gamma_{\max} = 4,5$ мкмоль/л). По-видимому, такое несоответствие наблюдается не во всем интервале концентраций ПАВ, однако, в работе оптимальный интервал концентраций не указан.

3). Вызывает сомнение указанный в работе тот факт, что ионы хлора могут вызвать перезарядку глобулы белка за счет специфической адсорбции. Этот вывод не убедителен еще и потому, что самим автором не представлена зависимость электрокинетического потенциала глобул лизоцима в зависимости от концентрации ионов хлора. Скорее всего, если перезарядка и возможна, то за счет многозарядного фосфат-иона (PO_4^{3-}), присутствующего в среде в качестве компонента фосфатного буферного раствора.

4). Данные по размеру глобул (3,5 нм), определенному методом динамического рассеяния света, полезно было бы сопоставить с результатами определения гидродинамических параметров другими методами, например, вискозиметрией. Это важно потому, что определение параметров клубков (глобул) макромолекул методом светорассеяния на приборе Zeta Trac теоретически мало обосновано. Это также относится и к определению ζ -потенциала этим же методом.

5). Учитывая, что все исследования проводились в буферных растворах, где ионная сила достаточно высока, нельзя не учитывать то, что в солевых растворах катионные и анионные свойства ионных ПАВ выражены менее сильно, чем в воде. Об этом же упоминает сам автор работы. По-видимому, некоторые выводы, базирующиеся на экспериментах, зависящих от природы ПАВ, можно было подтвердить и экспериментами в дистиллированной воде, где степень диссоциации ПАВ максимальна.

6). Контроль содержания воды в органической фазе можно было бы определить более простым способом, в частности, титрованием по К.Фишеру.

7). Принимая во внимание то, что выбранное цвиттерионное ПАВ (кокоамидопропилбетаин – CAPB) не является индивидуальным веществом (хотя и широко используемым в настоящее время), можно было бы в качестве сравнения выбрать еще одно индивидуальное амфотерное ПАВ (для подтверждения результатов, полученных для CAPB).

Указанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы.
Результаты диссертации опубликованы в 4 статьях в журналах, рекомендованных ВАК, в 1 статье в Сборнике научных трудов, содержание диссертации обсуждалось на российских и международных конференциях, по результатам которых опубликовано 7 тезисов.

Результаты диссертационной работы и ее выводы рекомендуется использовать в учебном процессе в ВУЗах, в научно-исследовательских и отраслевых организациях, таких как, Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Российский государственный университет нефти и газа имени И.М. Губкина, 2-й Московский государственный институт им. Н.И. Пирогова, Российский государственный университет дружбы народов (кафедра физической и коллоидной химии), Санкт-Петербургский государственный технологический институт.

Заключение.

Сочетание тематики диссертации, формулировок ее цели и задач, научной новизны и практической значимости, используемых методов и ее общей направленности на установление коллоидно-химических закономерностей в смешанных системах белок-ПАВ подтверждают соответствие формуле и области исследования паспорта специальности (1-поверхностные силы, устойчивость коллоидных систем, смачивание и адсорбция; 2-теоретические основы действия ПАВ на границах раздела фаз, теория мицеллообразования и соллобилизации в растворах ПАВ), по которой диссертация представлена к защите – 00.02.11 – коллоидная химия.

Считаем, что диссертационная работа Р.А. Иванова «Коллоидно-химические свойства смесей лизоцим-ПАВ в системе водный раствор/октан» представляет собой законченное научное исследование и соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842); а ее автор – Роман Александрович Иванов – заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.11 – коллоидная химия.

Доклад соискателя заслушан на научном коллоквиуме кафедры коллоидной химии 3 февраля 2015 года. Отзыв ведущей организации подготовлен д.х.н., проф. Шабановой Н.А. и к.х.н., доц. Киенской К.И., рассмотрен и одобрен на заседании кафедры коллоидной химии Российского Химико-Технологического Университета им. Д.И. Менделеева (протокол № 3 от 19 февраля 2015 года).

Профессор кафедры коллоидной химии РХТУ им. Д.И.Менделеева,
доктор химических наук /Н.А. Шабанова/
Доцент кафедры коллоидной химии РХТУ им. Д.И.Менделеева,
кандидат химических наук /К.И. Киенская/

РХТУ им. Д.И Менделеева, Москва, 125047, Миусская пл., д.9
Тел. 8-499-972-44-38; nash@muctr.ru

Подписи Шабановой Н.А. и Киенской К.И. удостоверяю

Ученый секретарь РХТУ им. Д.И. Менделеева /Т.В. Гусева/

