

УДК 544.77

ВЛИЯНИЕ БИООРГАНИЧЕСКИХ ДОБАВОК РАЗНОЙ ПРИРОДЫ НА АГРЕГАТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ТЕМПЕРАТУРУ ПОМУТНЕНИЯ БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ НЕИОННЫХ ПАВ TERGITOL NP-7 И TRITON X-114

© 2019 г. Ю. А. Ануфриков¹, П. С. Кондрахина¹, А. С. Конева¹, Е. А. Сафонова^{1, *}

¹Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетская набережная, 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: e.a.safonova@spbu.ru

Поступила в редакцию 25.04.2019 г.

После доработки 23.05.2019 г.

Принята к публикации 27.05.2019 г.

Водные двухфазные системы, содержащие этоксилированные неионные ПАВ, перспективны в качестве среды для проведения некоторых биохимических реакций. При этом необходимость комплексного исследования фазового и агрегативного поведения таких мицеллярных систем, а также влияния природы и концентрации биодобавок, pH среды и температуры очевидны. Изучено влияние солевого фона (фосфатный буфер), pH и температуры, а также биоорганических добавок на температуру помутнения и структурно-термодинамические характеристики (ККМ и числа агрегации) мицеллярных растворов неионных ПАВ Triton X-114 и Tergitol NP-7 в воде и буферах с pH 6.8, 4.3, 2.7. В качестве добавок использованы компоненты биокаталитической реакции гидролиза пенициллина G – калиевая соль пенициллина G, фенилуксусная кислота и 6-аминопенициллановая кислота. Обсуждается различное влияние компонентов биореакции на температуру помутнения и величину ККМ Triton X-114 в буферной среде с pH 4.3. Показано уменьшение значений ККМ и числа агрегации Triton X-114 в буферных растворах (эффект высаливания) и рост ККМ при повышении температуры до 37°C (характерный для этоксилированных неионных ПАВ). Добавка фенилуксусной кислоты (10 мМ) приводит к уменьшению числа агрегации Triton X-114 при pH 4.3; другие биодобавки практически не оказывают эффекта. Таким образом, исследованные биодобавки оказывают разное влияние на структуру и фазовое поведение исследуемых мицеллярных растворов, а это – важный аспект при выборе экстракционной системы для проведения биореакции.

DOI: 10.1134/S0023291219060028

1. ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день актуальным является использование экологичных мицеллярных систем для удаления продукта *in situ* с целью увеличения конверсии в процессах биокатализа и биотрансформации [1, 2]. Использование двухфазных водных систем, содержащих неионные поверхностно-активные вещества (НПАВ), позволяет проводить процесс в “мягких” условиях, что особенно важно при экстракции биомолекул, чувствительных к органическим средам и высокой температуре. Отсутствие органических растворителей также создает благоприятную среду для большинства биокатализаторов. Биокаталитические реакции в некоторых мицеллярных системах исследованы, и, в частности, Вангом с сотр. [3, 4] показана необходимость комплексного изучения фазового поведения мицеллярных систем, а также кинетики протекающих в них биокаталитических реакций.

Определение структурных характеристик самоорганизующихся систем в присутствии добавок разной природы важно для улучшения предсказаний термодинамических моделей, таких как COSMOmic [5].

НПАВ, водные растворы которых в определенном концентрационно-температурном интервале характеризуются наличием области помутнения, широко применяются для экстракции и очистки сточных вод от ионов металлов, белков, биоматериалов, органических веществ, включая токсичные ароматические [6, 7], методом экстракции в точке помутнения (“cloud-point extraction”).

Весьма перспективными представителями обозначенного круга НПАВ являются этоксилированные Tergitol NP-7 и Triton X-114 (рис. 1). Двухфазные водные системы, содержащие указанные НПАВ, изучены в качестве сред для про-

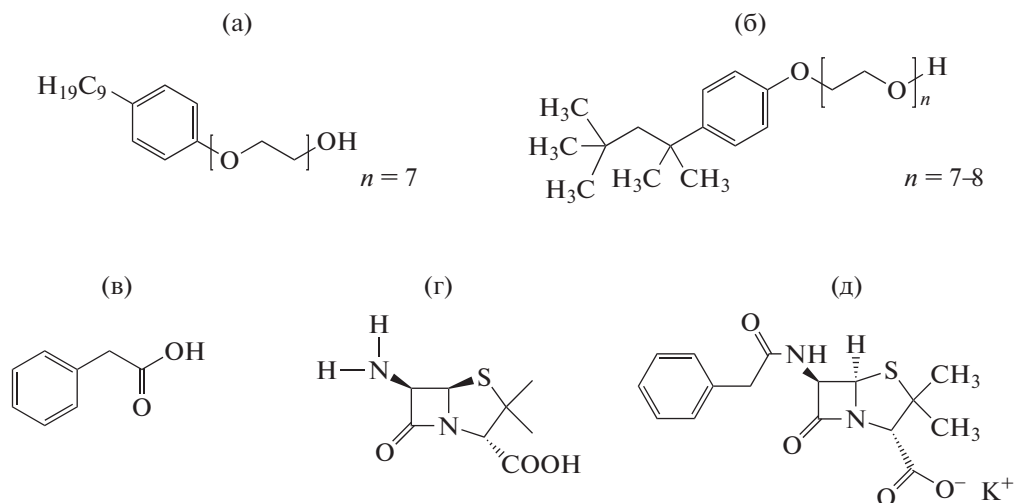


Рис. 1. Структурные формулы НПАВ Tergitol NP-7 (а) и Triton X-114 (б), а также веществ – участников биореакции: РАА (в), АРА (г) и Pen G (д).

ведения модельной целевой биореакции ферментативного гидролиза пенициллина G (**Pen G**) [3] с образованием 6-аминопенициллановой и фенилуксусной кислот (**АРА** и **РАА** соответственно, рис. 1).

Для оптимального проектирования промышленных процессов с участием названных НПАВ необходимы надежные экспериментальные данные об агрегативном и фазовом поведении их водных и водно-солевых (буферных) растворов при варьировании температуры и рН среды, а также в присутствии биодобавок разной природы.

Нами систематически исследованы структурно-термодинамические характеристики растворов Tergitol NP-7 и Triton X-114 в среде фосфатного буфера при температуре 25 и 37°C: определены значения критической концентрации мицеллообразования (**ККМ**) и числа агрегации ($N_{\text{агр}}$). Отметим, что температура 37°C, с одной стороны, является физиологической, а с другой – обеспечивает наибольшую скорость ферментативной реакции гидролиза Pen G. Таким образом, изучение биохимических объектов при данных условиях представляет практический интерес.

Определение характеристик агрегации проведено как для псевдобинарных систем НПАВ–растворитель, так и для более сложных смесей, содержащих добавки Pen G, а также органических кислот АРА и РАА. Полученные новые данные о влиянии этих добавок на рассматриваемые характеристики сопоставлены с данными о температуре помутнения изучаемых растворов.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Реактивы

В работе использовали Triton X-114 (Carl Roth, Германия), Tergitol NP-7 (содержание воды <0.1 мас. %, Sigma–Aldrich), безводные дигидрофосфат и гидрофосфат калия (>99%, Sigma–Aldrich), пирен (>99%, Fluka) и бромид гексадецилпиридиния (**СРурBr**, ≥97%, Sigma–Aldrich). Биоорганическими добавками служили калиевая соль Pen G ($pK_a = 2.5$ [8], Alfa Aesar, Германия), РАА ($pK_a = 4.3$ [8], “х. ч.”, Ленреактив) и АРА (pK_a сопряженной кислоты = 2.5, pK_a карбоксильной группы = 4.9 [8], $pI = 4.3$ [9], >98 мас. %, Absc, Германия).

Все растворы готовили с использованием бидистиллированной воды. Буферные растворы готовили из дигидрофосфата и гидрофосфата калия ($C = 50$ мМ), подкисляя при необходимости соляной кислотой. Величину рН контролировали потенциометрически с использованием стеклянного рН-чувствительного электрода, при этом величину ЭДС измеряли с помощью милливольтметра рН-150.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Метод тензиометрии. Для определения ККМ измеряли поверхностное натяжение σ серии растворов с различной концентрацией ПАВ с помощью тензиометра SIGMA 702 (KSV Instruments, Финляндия). Непосредственно определяемой в ходе эксперимента величиной является усилие в момент отрыва платинового кольца Дю Нуи от поверхности жидкости. Для каждой концентрационной точки проводили по три параллельных опыта, результаты которых усредняли.

Относительная погрешность измерения не превышала 0.4%.

Полученные значения поверхностного натяжения строили в виде зависимости от натурального логарифма концентрации ПАВ [10]. В домицеллярной области увеличение концентрации ПАВ в растворе вызывает значительное уменьшение σ , по достижении ККМ значение σ практически не изменяется. Если данные о поверхностном натяжении в системе в областях ниже и выше ККМ аппроксимировать линейными зависимостями, то пересечение полученных прямых можно трактовать как величину, соответствующую ККМ. Погрешность определения ККМ методом тензиометрии составила $\pm 5\%$.

2.2.2. Спектрофлуориметрический метод определения ККМ. С целью проверки надежности данных о ККМ, получаемых методом тензиометрии, для некоторых из рассматриваемых систем значения ККМ были независимо определены методом флуоресцентного зонда [11, 12]. В качестве такового был выбран пирен, который эффективно сольбилизируется в ядрах мицелл. Готовили серию растворов с различной концентрацией НПАВ и постоянной, гораздо меньшей, концентрацией пирена. В ходе эксперимента измеряли спектры флуоресценции пирена для каждого из растворов и анализировали соотношение интенсивностей пиков 1 и 3 в спектре (рис. 2), характеризующее микрополярность среды, в которой находится зонд. Погрешность определения ККМ составила $\pm 10\%$.

2.2.3. Спектрофлуориметрический метод определения чисел агрегации. Для определения чисел агрегации ($N_{\text{агр}}$) НПАВ в изучаемых системах также использовалась общепринятая разновидность флуоресцентной спектроскопии [11, 12]. Основа методики заключается в изучении закономерности тушения люминесценции вещества-люминофора вводимым в систему соединением – тушителем люминесценции. В качестве люминофора также был взят пирен, а в роли тушителя выступал $\text{C}_{\text{Py}}\text{Br}$.

Данный метод позволяет успешно определять $N_{\text{агр}}$, только если выполняются следующие условия: 1) люминофор и тушитель эффективно сольбилизируются мицеллами, 2) скорость поглощения люминесцентного излучения тушителем значительно выше той, с которой происходит затухание люминесценции, 3) известно распределение молекул люминофора и тушителя по мицеллам (на практике пользуются распределением Пуассона). Выбранные нами люминофор и тушитель удовлетворяют перечисленным условиям.

Исследуемая система содержит мицеллы (М), люминофор и тушитель (Q). При выполнении третьего из указанных выше условий для соотно-

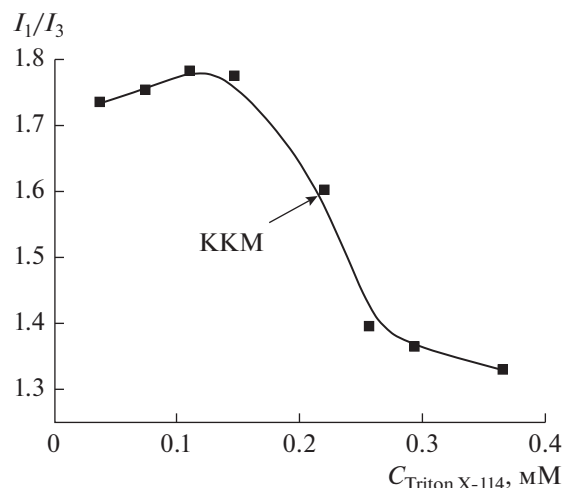


Рис. 2. Пример зависимости соотношения пиков 1 и 3 в спектре флуоресценции пирена от концентрации Triton X-114 при температуре 37°C.

шения интенсивностей люминесценции в присутствии Q и в его отсутствие (I/I_0) можно записать:

$$I/I_0 = \exp(-[Q]/[M]). \quad (1)$$

Простота этого выражения определяется допущением, что люминесцируют только те молекулы зонда, которые находятся в свободных от тушителя мицеллах.

Концентрация мицелл [M] связана с концентрацией ПАВ [ПАВ] и средним числом агрегации, $N_{\text{агр}}$, следующим образом:

$$[M] = ([\text{ПАВ}] - [\text{свободный мономер}])/N_{\text{агр}}, \quad (2)$$

где концентрация свободных мономеров ПАВ, находящихся в равновесии с мицеллярными агрегатами, приблизительно равна ККМ. Комбинируя выражения (1) и (2), получаем

$$\ln(I_0/I) = [Q]N_{\text{агр}}/([\text{ПАВ}] - \text{ККМ}). \quad (3)$$

Примеры спектров флуоресценции пирена в зависимости от концентрации тушителя представлены на рис. 3.

Для нахождения $N_{\text{агр}}$ строят зависимость $\ln(I_0/I)$ от $[Q]/([\text{ПАВ}] - \text{ККМ})$, характерный пример которой представлен на рис. 4. Тангенс угла наклона полученной линейной зависимости соответствует числу агрегации ПАВ в исследуемой системе, что следует из уравнения (3).

Спектрофлуориметрические эксперименты по определению ККМ и чисел агрегации выполнены с использованием спектрофлуориметра FLUORAT-02 PANORAMA (Люмэкс, Россия).

2.2.4. Определение температуры помутнения растворов. Температуру помутнения (CP) определяли визуальным политермическим методом в ячейке, снабженной магнитной мешалкой и тер-

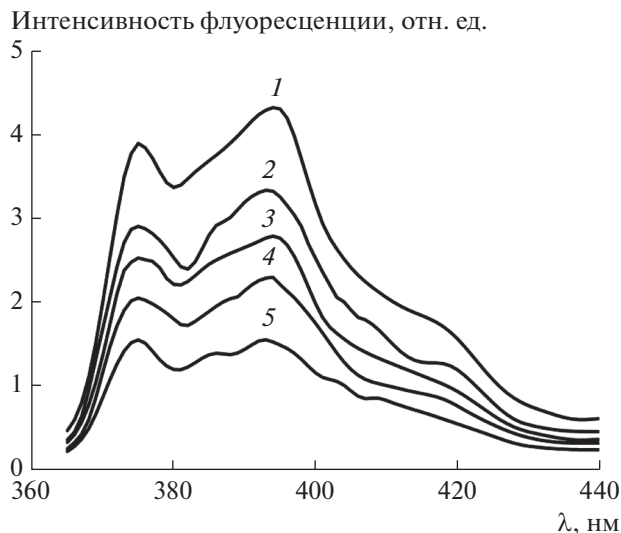


Рис. 3. Спектры флуоресценции пирена в водных растворах Triton X-114 в отсутствие тушителя (I) и по мере увеличения его концентрации (2–5) при 25°C.

мостатируемой с помощью водяного циркуляционного термостата LOIP LT-400 (ЛОИП, Россия), обеспечивающего точность поддержания температуры $\pm 0.01^\circ\text{C}$ с погрешностью не более $\pm 0.02^\circ\text{C}$.

Приготовленные растворы медленно нагревали (0.1 град/мин); за СР принимали температуру, при которой исследуемый раствор становился непрозрачным. Эксперимент повторяли трижды для каждого раствора. Погрешность определения СР составила 0.1°C .

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние биоорганических добавок (РАА, АРА, Pen G) на температуру помутнения растворов Triton X-114 в воде и в 50 мМ буферном растворе $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ с рН 4.3 изучали при концентрации этого НПАВ, равной 4 мас. %. Концентрация добавленного вещества составляла 10 и 50 мМ в случае РАА и Pen G и 10 мМ – в случае

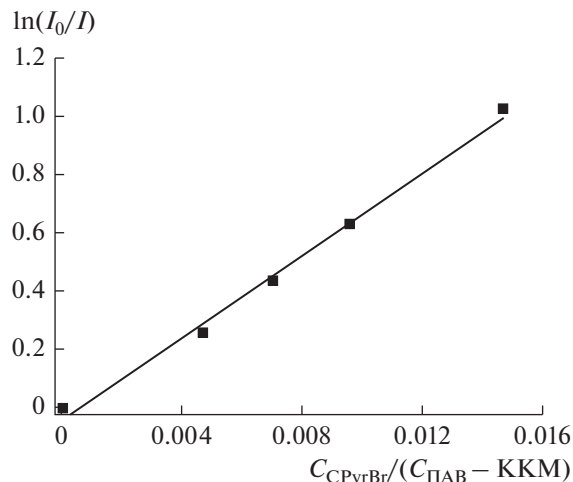


Рис. 4. Зависимость отношения интенсивностей флуоресценции пирена без тушителя (I_0) и в его присутствии (I) от приведенной концентрации тушителя ($C_{\text{СрBr}}/(C_{\text{ПАВ}} - \text{ККМ})$) в водных растворах Triton X-114 при 37°C.

АРА (табл. 1). Значения СР растворов без/с изучаемыми добавками определяли также при значениях рН 2.7 и 6.8 (табл. 2).

При рассмотрении влияния природы добавок (РАА, АРА или Pen G) на СР водных растворов Triton X-114 при рН 4.3 (табл. 1) отмечены следующие эффекты: значение СР в присутствии гидрофильной добавки АРА ($pI = 4.3$) не изменяется (22.5°C), тогда как при добавлении Pen G имеет место существенное повышение СР. При этом увеличение концентрации Pen G усиливает данный эффект. Повышение СР водных растворов Triton X-114 в присутствии Pen G показано в работе [4] для некоторого интервала концентрации этого НПАВ. Как известно, изменения СР растворов НПАВ существенно зависят от природы и концентрации добавок в силу специфики роли последних (от со-ПАВ до соразтворителя) [13].

Таблица 1. Значения ККМ, полученные методом тензиометрии, и числа агрегации Triton X-114 в фосфатном буфере (рН 4.3) при 37°C в присутствии биоорганических добавок. Значения $N_{\text{агр}}$ определены при концентрации ПАВ, равной примерно 2.5 ККМ, значения СР – при его концентрации 4 мас. %

Добавка	ККМ $\times 10^2$, мМ	$N_{\text{агр}}$	СР, °C
–	21/22*	43 ± 4	22.4
АРА (10 мМ)	25	52 ± 5	22.5
РАА (10 мМ)	19	31 ± 3	17.3
РАА (50 мМ)	5.4	–	<14
Pen G (10 мМ)	17	59 ± 6	26.7
Pen G (50 мМ)	7.1	–	38.4

*Данные флуориметрии.

Таблица 2. Значения температуры помутнения ($^{\circ}\text{C}$) растворов Triton X-114 (4 мас. %) без биоорганических добавок и в их присутствии в воде и буферах с pH 2.7 и 6.8

Среда	Без добавок	10 мМ РАА	50 мМ РАА	10 мМ АРА	10 мМ Pen G	50 мМ Pen G
H_2O	25.2	21.2	<12	24.8	31.8	44.1
Буфер (pH 2.7)	22.7	17.6	<14	22.8	23.4	31.3
Буфер (pH 6.8)	22.0	23.6	<14	22.6	30.7	>50

Присутствие 10 мМ РАА (pK_a 4.3) иначе влияет на СР растворов Triton X-114 – наблюдается значительное понижение СР как водного, так и буферного раствора с pH 4.3 (“высаливающее” действие) (табл. 1, 2). При этом в фосфатном буферном растворе (pH 6.8) высаливающее действие диссоциированной формы РАА не обнаружено. Значения СР растворов, содержащих 50 мМ РАА, – ниже 14°C для всех исследуемых систем.

Таким образом, обнаружено наибольшее влияние добавки РАА при pH 4.3, тогда как добавка Pen G в этих условиях не столь существенно увеличивает СР, как при pH 6.8. Дальнейшее исследование агрегативного поведения проведено для буферных растворов Triton X-114 при pH 4.3.

Важно отметить аналогичное влияние изучаемых биоорганических добавок на СР водного раствора Triton X-114 (табл. 2). Кроме того, та же картина наблюдается для водных растворов, содержащих 4 мас. % Tergitol NP-7 [14].

В работе [14] получены данные о значительном влиянии pH на коэффициент распределения РАА (важнейшую характеристику эффективности биоэкстракции этого компонента) между жидкими фазами водной двухфазной системы, содержащей Tergitol NP-7, при 37°C . Авторами показано, что коэффициенты распределения растворенных биоком-

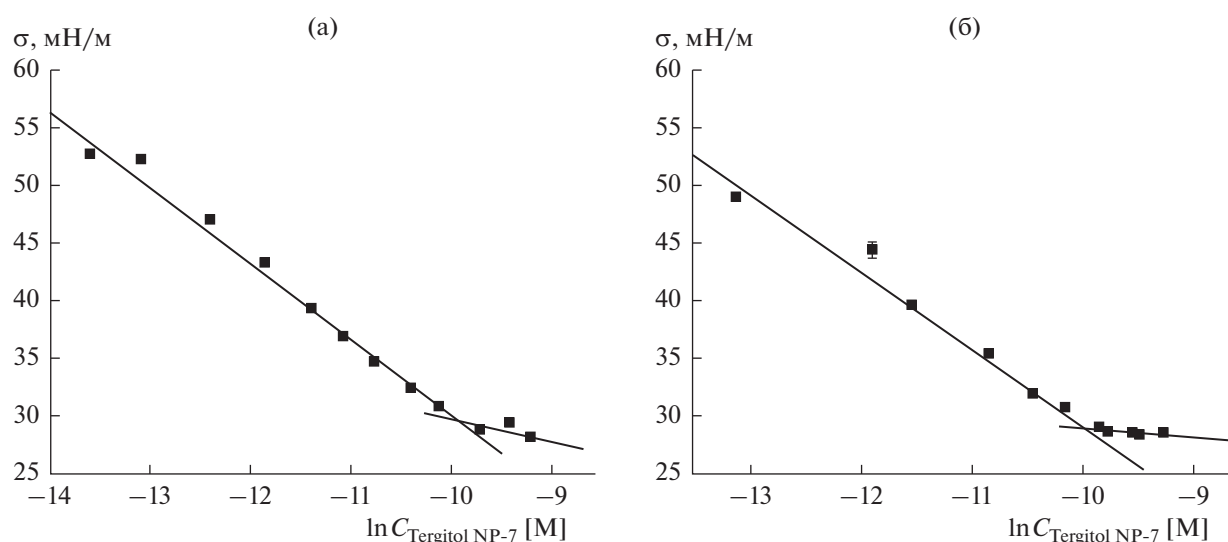
понентов АРА и Pen G слабо возрастают при увеличении pH. В связи с этим интерес представляет изучение агрегативных характеристик Tergitol NP-7 при “предельных” значениях pH 2.7 и 6.8.

На рис. 5 представлены результаты измерения поверхностного натяжения растворов Tergitol NP-7 при 37°C в фосфатном буфере ($C = 50$ мМ) при pH 2.7 и 6.8.

На рис. 6 приведены данные о поверхностном натяжении растворов Triton X-114 при 37°C в фосфатном буфере ($C = 50$ мМ) при pH 4.3 в присутствии различных добавок.

Определенные в настоящей работе значения ККМ и числа агрегации НПАВ в растворах на основе Triton X-114 и Tergitol NP-7 представлены в табл. 1 и 3 соответственно. Значения ККМ, полученные методом флуориметрии, несколько больше определенных методом тензиометрии, но сопоставимы с ними. Последний метод, благодаря большей точности, позволяет выявить небольшие по величине температурные эффекты, а также тенденции влияния солевого фона и значения pH среды на величину ККМ.

Для систем, содержащих Tergitol NP-7, с понижением pH величина ККМ уменьшается, что можно объяснить усилением гидрофобного эффек-

**Рис. 5.** Данные о поверхностном натяжении растворов Tergitol NP-7 в буфере с pH 2.7 (а) и с pH 6.8 (б) при 37°C .

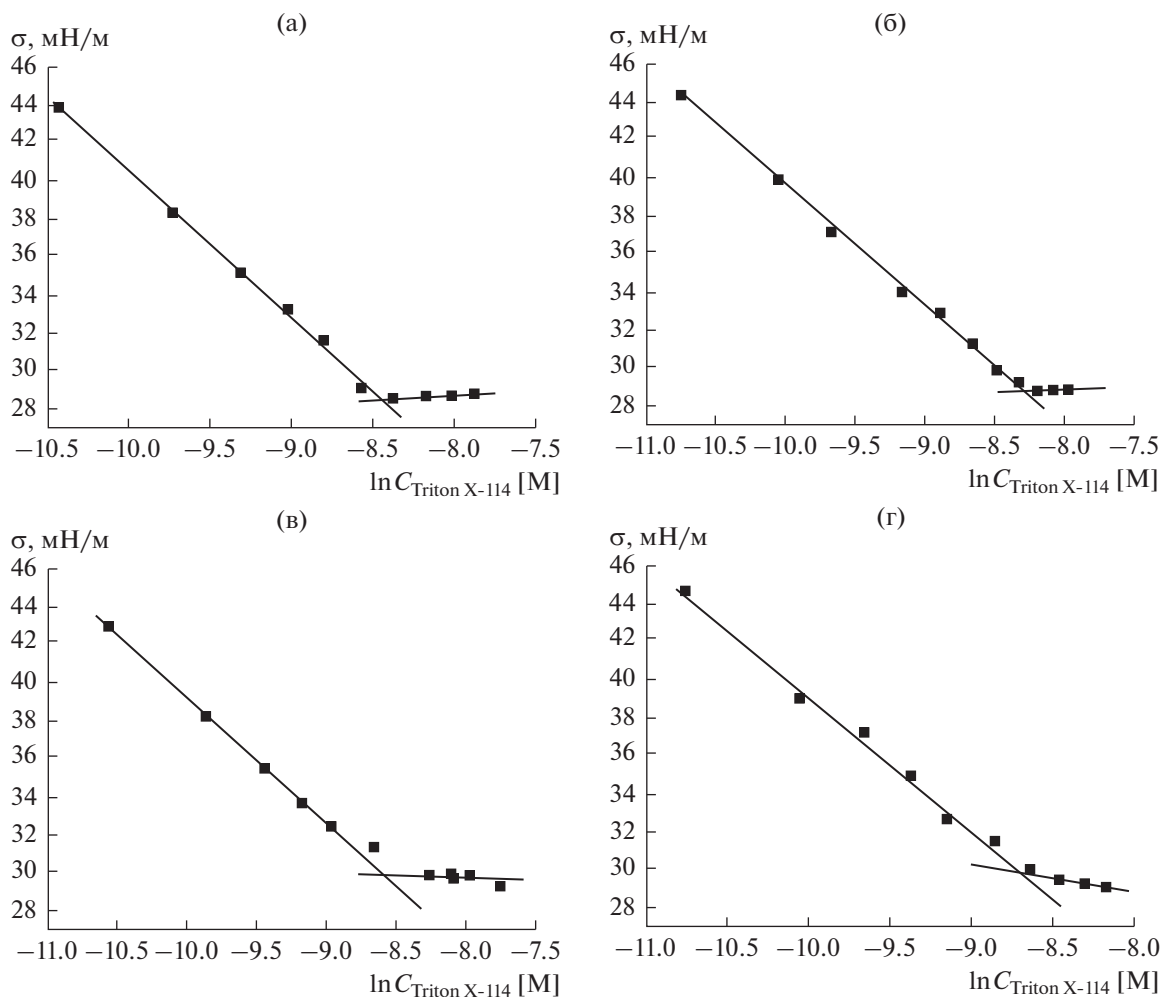


Рис. 6. Данные о поверхностном натяжении растворов Triton X-114 при 37°C и pH 4.3 в отсутствие добавок (а) и в присутствии 10 mM ARA (б), PAA (в) или Pen G (г).

та с ростом полярности среды (табл. 3). Повышение температуры, напротив, способствует увеличению ККМ, что характерно для многих этоксилированных НПВ. При 37°C влияние электролита менее выражено, чем при 25°C.

Добавка ARA способствует небольшому повышению ККМ Triton X-114 в фосфатном буфере с pH 4.3 (табл. 1). Поскольку ARA характеризуется изоэлектрической точкой $pI = 4.3$, полярность среды в ее присутствии практически не изменяет-

Таблица 3. Значения ККМ и числа агрегации Tergitol NP-7 в различных средах. N_{agr} определены при концентрации ПАВ, равной примерно 2.5 ККМ

Среда	$T, ^\circ C$	ККМ $\times 10^2$, мМ		N_{agr}
		тензиометрия	флуориметрия	
Вода	25	5.9	6.5	7 ± 2
	37	6.6	7.0	9 ± 2
Буфер (pH 2.7)	25	4.1	—	8 ± 2
	37	4.9	—	8 ± 2
Буфер (pH 6.8)	25	4.6	6.5	9 ± 2
	37	4.9	6.5	8 ± 2

ся, что и приводит к слабо выраженному эффекту увеличения ККМ.

В присутствии РАА ($pK_a = 4.3$) или Pen G ($pK_a = 2.5$) ионная сила и полярность среды являются наиболее высокими (в пределах круга систем, рассматриваемых в работе), в результате чего наблюдается более значительное снижение ККМ Triton X-114, особенно, при больших концентрациях этих добавок. Так, в присутствии 50 мМ РАА получено самое низкое значение ККМ. Большее влияние РАА по сравнению с Pen G обусловлено, в силу достаточной гидрофобности этой кислоты (коэффициент распределения октанол/вода $\lg P^{ow} = 1.41$), более глубоким проникновением ее молекул в мицеллы НПАВ [15].

В целом, влияние биоорганических добавок на ККМ аналогично их влиянию на температуру помутнения исследуемых растворов – имеет место значительное изменение рассматриваемых характеристик в присутствии РАА или Pen G и минимальный эффект при добавлении АРА.

Другую важную характеристику агрегации, $N_{ар}$, определяли при фиксированной концентрации ПАВ, равной 2.5 ККМ (табл. 1, 3).

Для Tergitol NP-7 число агрегации значительно меньше (его значения составляют от 7 до 9) и не зависят от pH и температуры (табл. 3). Полученные невысокие значения $N_{ар}$ Tergitol NP-7 характеризуют указанное НПАВ как менее перспективное для эффективной экстракции в точке помутнения [14].

Полученные значения $N_{ар}$ Triton X-114 в исследованных системах лежат в диапазоне от 30 до 60 (табл. 1). В присутствии 50 мМ РАА и Pen G определить $N_{ар}$ не удалось из-за тушения люминесценции пирена.

В работе [12] приводятся данные о числе агрегации Triton X-114, полученные в интервале концентрации этого НПАВ 2.5–40 мМ, и показано, что значение $N_{ар}$ в таких разбавленных растворах не зависит от концентрации Triton X-114. Данные нашей работы о числе агрегации Triton X-114 в воде находятся в хорошем согласии с литературными данными (значения $N_{ар}$ составляют 71 и 68 соответственно). В буферном растворе при pH 4.3 число агрегации Triton X-114 составило 43 ± 4 , а в

присутствии 10 мМ РАА – 31 ± 3 . Влияние других биоорганических добавок на значение $N_{ар}$ незначительно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и DFG в рамках научного проекта № 16-53-12029 ННИО_а.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Z. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 75. P. 1.
2. Wang Z. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 89. P. 523.
3. Wang L., Wang Z., Xu J.-H., Bao D., Qi H. // Bioproc. Biosyst. Eng. 2006. V. 29. P. 157.
4. Wang Z., Guo Y., Bao D., Qi H. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2006. V. 81. P. 560.
5. Ritter E., Yordanova D., Gerlach T., Smirnova I., Jakobtorweihen S. // Fluid Phase Equilib. 2016. V. 422. P. 43.
6. Amid M., Manap M.Y., Hussin M., Mustafa S. // Molecules. 2015. V. 20. P. 11184.
7. Lopes A.M., Santos-Ebinuma V.C., Pessoa Júnior A., Rangel-Yagui C.O. // Brazilian J. Chem. Eng. 2014. V. 31. P. 1057.
8. Diender M.B., Straathof A.J.J., Heijnen J.J. // Biocatal. Biotransformation. 1998. V. 16. P. 275.
9. Rao B.R. // Indian J. Chem. 2002. V. 41B. P. 1697.
10. Русанов А.И. Мицеллообразование в растворах поверхностно-активных веществ. СПб: Химия, 1992.
11. Селиванова Н.М., Кузовкова М.А., Галяметдинов Ю.Г. // Вестник Казанского технологического университета. 2013. Т. 16. № 4. С. 85.
12. Wolszczak M., Miller J. // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2002. V. 147. P. 45.
13. Hinze W.L., Pramauro E. // Crit. Rev. Anal. Chem. 1993. V. 24. P. 133.
14. Ritter E., Smirnova I. // Chemie Ing. Tech. 2018. V. 90. P. 348.
15. Koneva A.S., Ritter E., Lezov A.A., Klestova A.O., Smirnova N.A., Safonova E.A., Smirnova I. // Colloids Surf. A. 2018. V. 538. P. 45.