

УДК 577.151.3

**СТРУКТУРА И СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ α -ХИМОТРИПСИНА
С ГИДРОКСИЛСОДЕРЖАЩИМИ ГЕМИНАЛЬНЫМИ ДИКАТИОННЫМИ ПАВ
С ВАРЬИРУЕМОЙ ДЛИНОЙ СПЕЙСЕРНОГО ФРАГМЕНТА****Ю.А. Валиуллина¹, Е.А. Ермакова¹, Д.А. Файзуллин¹, А.Б. Миргородская², Ю.Ф. Зуев^{1,3}**¹Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Россия

E-mail: valiullina@mail.knc.ru

²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Россия³Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия

Статья поступила 31 марта 2014 г.

Исследована структура и свойства супрамолекулярных комплексов α -химотрипсина с гидроксилсодержащими геминальными алкиламмонийными поверхностно-активными веществами (ГПАВ) — дибромидами α,ω -алканедил-бис-(гидроксиэтилметилцетиламмония) с полиметиленовым спейсером варьированной длины. Результаты ИК спектроскопических исследований и данные триптофановой флуоресценции показывают, что взаимодействие ГПАВ с α -химотрипсином вызывает различные по интенсивности изменения в структурном состоянии белков. Методом молекулярного докинга охарактеризованы наиболее вероятные комплексы ферментов с ГПАВ. Обнаружена корреляция между активностью α -химотрипсина и длиной спейсерного фрагмента ГПАВ. Установлено, что активность фермента коррелирует с изменением концентрации субстрата в водной фазе мицеллярного раствора ПАВ.

Ключевые слова: α -химотрипсин, геминальные ПАВ, комплексы, структура, каталитическая активность.

В последнее время все большее внимание привлекает комплексообразование белков с различными малыми молекулами, которые модулируют структуру и функциональную активность биомолекул [1—6]. Взаимодействия белков с поверхностно-активными веществами (ПАВ) являются предметом многолетнего интереса исследователей, поскольку комплексы белок—ПАВ находят применение в самых разнообразных областях — в аналитической молекулярной биологии [7], в пищевых, фармакологических и косметических производствах [8—10], в доставке лекарств [11, 12], при создании нанокапсул [13], конструировании каталитических [14] и сенсорных систем [15]. Установлено, что свойства супрамолекулярных комплексов ПАВ/белок зависят от различных характеристик ПАВ, среди которых заряд и размер полярной головной группы, длина алифатических радикалов и концентрация ПАВ [16—20].

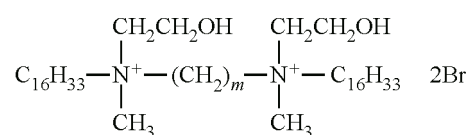
Большинство работ по изучению комплексов ПАВ/белок посвящено классическим одноцепочечным ПАВ. Димерные (геминальные) ПАВ (ГПАВ), молекула которых содержит два гидрофобных радикала, соединенных спейсером через полярные головные группы или вблизи них, позволяет расширить границы регулируемых свойств комплексов. ГПАВ существенно превосходят свои одноцепочечные аналоги по ряду характеристик. Например, у них более низкие значения температуры Крафта и критической концентрации мицеллообразования (ККМ) [21—25]. Специфика гидроксилсодержащих ГПАВ дополнительно заключается в возможности водородного связывания между молекулами ГПАВ, что может дополнительно модифицировать струк-

туру и свойства мицеллярных агрегатов, например, таких как солубилизационная емкость мицелл. Работ, в которых изучали взаимодействие ГПАВ с белками, сравнительно немного. Установлено, что длина спейсера оказывает влияние на взаимодействие геминальных ПАВ с бычьим сывороточным альбумином [26, 27], желатином [27], РНКазой А [28] и гемоглобином [29].

В настоящей работе в качестве белкового компонента комплекса мы выбрали α -химотрипсин (ХТ), поскольку его структура и механизм действия хорошо изучены. Сериновые протеазы, к которым относится ХТ, являются удобными модельными объектами для изучения взаимодействия белок—лиганд и регуляторного действия различных лигандов на структуру и функциональную активность ферментов. Исследование посвящено изучению влияния алкиламмонийных ГПАВ с гидроксилсодержащими фрагментами в головной группе и с полиметиленовым спейсером различной длины на структуру и каталитическую активность ХТ. Для характеристики комплексов ПАВ—белок использовали методы динамического светорассеяния, флуоресценции, ИК спектроскопии и молекулярного докинга. ГПАВ были синтезированы в Лаборатории высокоорганизованных сред Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН. Работа включает в себя характеристику комплексов белок—ПАВ и сравнительный анализ структуры и каталитической активности α -химотрипсина в составе комплексов. Все исследования выполнены для мицеллярных растворов ПАВ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали алкиламмонийные геминальные поверхностно-активные вещества (ГПАВ) — дибромиды α, ω -алканедил-бис-(гидроксиэтилметилцетиламмония) с полиметиленовым спейсером n -(CH₂)_{*m*}, где $m = 4, 6, 8, 10, 12$ (в тексте обозначаются как 16-4(OH), 16-6(OH) и т.д.), общей формулы



В качестве соединения сравнения использован одноцепочечный аналог — бромид цетилгидроксиэтилдиметиламмония (ЦГАБ). Образцы ГПАВ были синтезированы при взаимодействии гидроксиэтилметилгексадециламина с соответствующим α, β -дибром- n -алканом в среде ацетонитрила с последующей двукратной перекристаллизацией продукта из этилового спирта по аналогии с опубликованной методикой [30]. Строение полученных соединений подтверждено данными элементного анализа, ИК и ЯМР спектроскопии. Образец ЦГАБ синтезирован при взаимодействии 2-диметиламиноэтанола с цетилбромидом в этиловом спирте. В работе использовали α -химотрипсин (ХТ) из поджелудочной железы быка (КФ 3.4.21.1) фирмы Sigma. В качестве субстрата при кинетических исследованиях использовали *para*-нитроанилид *N*-бензоил-*L*-тирозина (БТНА) фирмы Sigma.

Исследование солубилизационной емкости растворов ГПАВ проводили по известной методике [31]. В качестве зонда использовали БТНА. Солубилизационную емкость растворов ГПАВ определяли как отношение растворимости субстратов БТНА в исследуемом растворе ГПАВ к его растворимости в воде. Для этого растворы ГПАВ с избыточным содержанием БТНА выдерживали при 25 °С в течение 5 ч при постоянном перемешивании. По истечении указанного времени растворы отфильтровывали для удаления нерастворившегося зонда. Концентрацию БТНА определяли по его поглощению на длине волны 323 нм.

Активность ХТ контролировали по реакции гидролиза специфического субстрата БТНА. Для приготовления растворов ПАВ использовали 0,05 М *трис*-HCl-буфер pH 7,6. Измерения начальной скорости ферментативной реакции выполняли при температуре 25 °С. Значение pH выбрано в соответствии с максимумом активности фермента в этих условиях. Кинетику реакции регистрировали на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, США). Раствор инкубиро-

вали при заданной температуре в течение 10 мин. Реакцию инициировали введением субстрата. Концентрация ХТ в реакционной смеси составляла 1 мкМ, концентрация субстрата 0,03—1,0 мМ. За скоростью гидролиза БТНА следили по изменению оптического поглощения на длине волны 390 нм. Начальную скорость реакции V_0 определяли по наклону линейной части кривой накопления продукта во времени в течение 1 мин после начала реакции и рассчитывали по формуле $V_0 = \Delta D / \Delta \varepsilon / \Delta t$. Концентрацию фермента определяли по поглощению на длине волны 283 нм, используя коэффициент поглощения $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 20$ [32]. Величины максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса определяли из зависимостей начальных скоростей гидролиза от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера—Берка.

Эксперименты по динамическому светорассеянию исследуемых систем ХТ/ГПАВ проводили на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Растворы предварительно отфильтровывали и термостатировали при заданной температуре (25 °С) в течение 10 мин. Концентрация ПАВ составляла 1 мМ, концентрация белка — 0,2 мг/мл. Анализ данных проводили с использованием встроенного программного обеспечения (Malvern DTS software, версия 5.0). Каждое полученное значение среднего гидродинамического диаметра частиц являлось средним из десяти измерений.

Регистрацию флуоресценции триптофановых остатков, входящих в состав белка, выполняли на спектрофлуориметре Флюорат-02-Панорама (ЛЮМЕКС, Россия) в диапазоне длин волн 310—400 нм при длине волны возбуждения 295 нм. Во всех экспериментах учитывали фоновый спектр буфера без добавления белка. Концентрация белка в исследуемых образцах составляла 20 мкМ. Концентрацию ПАВ варьировали в интервале 0,03—1,0 мМ.

Для снятия ИК спектров проводили обмен доступных протонов в ХТ и ПАВ на дейтероны. Для этого белок и ПАВ растворяли в 50 мМ трис DCI буфере, приготовленном на D₂O, рD 7,6. После 3 ч инкубации растворов при комнатной температуре белок и ПАВ лиофилизировали. После этого белок, ПАВ и смеси (ХТ и ГПАВ) растворяли в дейтерированной воде, доводя растворы до требуемой концентрации: 0,1 мМ для белка и 4 мМ для ПАВ. Весовая концентрация белка в растворах составляла 2,5 мг/мл. Спектры ИК регистрировали на спектрофотометре Tensor 27 (Bruker, Германия), спектральное разрешение 4 см⁻¹, 128 сканов. Исследуемые растворы помещали в термостатируемую кювету из CaF₂ с толщиной слоя 100 или 10 мкм. Из спектров растворов вычитали спектры растворителя, снятые при тех же температурах, и спектры паров атмосферной воды. Сглаживания спектров не проводили. Отнесение компонент в спектре нативного ХТ выполнено на основе литературных данных [33, 34].

Анализ вероятности образования комплексов белок—ГПАВ выполняли методом молекулярного докинга с использованием компьютерной программы Autodock 4.2 [35]. Расчет полной энергии взаимодействия ΔG осуществляли с учетом электростатических (ΔG_{elec}) и ван-дер-ваальсовых взаимодействий (ΔG_{vdw}), водородных связей (ΔG_{Hbond}), эффекта сольватации (ΔG_{sol}) и торсионной энтропии (ΔG_{tor}). Для поиска конфигурации комплекса белок—лиганд с минимальной свободной энергией в программе Autodock использовали специальный алгоритм (Lamarckian genetic algorithm). Белок рассматривали как жесткую структуру, в то время как в ПАВ было разрешено вращение вокруг одинарных связей. Структуру и распределение зарядов для всех ПАВ предварительно оптимизировали с помощью метода РМЗ, общий заряд лиганда задавали равным нулю. Структура белка (4CHA.PDB) была взята из Protein Data Bank [36], распределение зарядов в белке соответствовало значению рН 7. Считалось, что аминокислотный остаток белка образует комплекс с молекулой ГПАВ, если расстояние между ним и любым атомом ПАВ становилось меньше 4 Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из методов, примененных в данной работе к оценке комплексообразования ГПАВ с белком, было динамическое светорассеяние. Динамическое светорассеяние (фотонная корреляционная спектроскопия) — один из наиболее простых и распространенных методов определения размеров частиц в водных растворах, применимый для систем с размерами частиц от

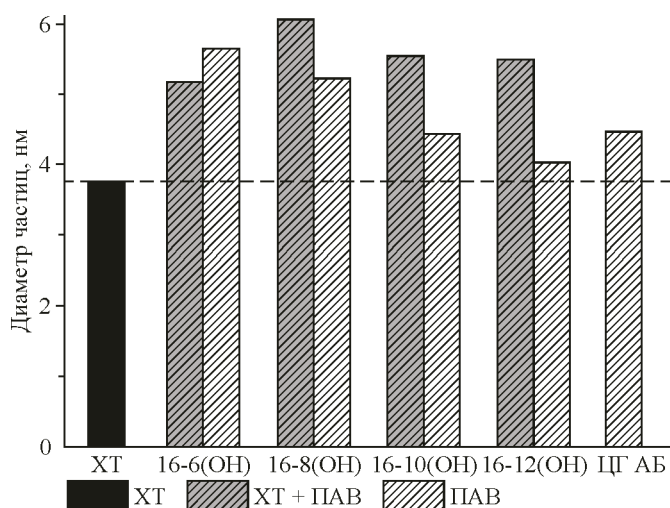


Рис. 1. Средний гидродинамический диаметр агрегатов белка с ПАВ

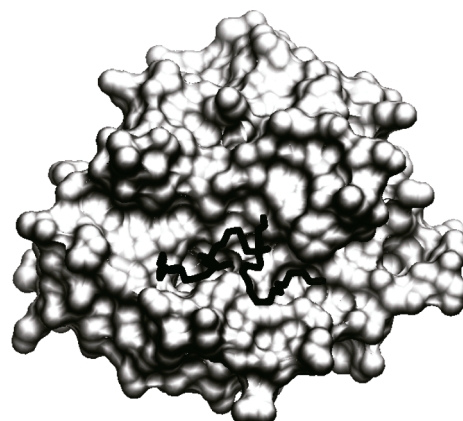


Рис. 2. Комплекс 16-6(OH)-ХТ по данным молекулярного докинга

единиц нанометров до нескольких микрометров [37, 38], который по флуктуации интенсивности рассеянного излучения позволяет получить коэффициент самодиффузии частиц и рассчитать их гидродинамический диаметр. Из данных, представленных на рис. 1, следует, что ГПАВ в водном растворе существуют в виде ассоциатов или мицелл [25], размеры которых уменьшаются с ростом длины спейсера [39]. При этом средний гидродинамический диаметр комплексов ГПАВ—белок на 15—25 % превышает размер мицелл и до полутора раз размер молекулы белка.

Метод молекулярного докинга применяли для исследования комплексов ХТ с мономерами ГПАВ. Программа Autodock позволила определить геометрию наиболее энергетически выгодных комплексов (рис. 2) и рассчитать энергию взаимодействия макромолекул (табл. 1). Анализ вероятности комплексообразования ПАВ с различными аминокислотными остатками белка показал, что все исследованные ГПАВ образуют энергетически выгодные комплексы с молекулой белка, в которых углеводородные радикалы ГПАВ располагаются на поверхности белковой глобулы. Усредненная энергия взаимодействия ГПАВ с ХТ, приведенная в табл. 1, свидетельствует об образовании устойчивых комплексов белок—ПАВ. Анализ был сделан для 50 наиболее энергетически выгодных комплексов. Для ХТ характерно достаточно равномерное распределение молекул ПАВ по поверхности белка, включая контакты с аминокислотными остатками активного центра ХТ His57 и Ser195 (рис. 3).

Для определения влияния ГПАВ на структуру белка были изучены спектры внутренней (триптофановой) флуоресценции. На рис. 4 показано относительное изменение интенсивности триптофановой флуоресценции ХТ в растворах ГПАВ. С увеличением концентрации ГПАВ происходит рост интенсивности триптофановой флуоресценции ХТ примерно в равной мере для всех исследованных соединений. Одновременно наблюдается сдвиг максимума флуоресценции триптофана в область более высоких длин волн (не приводится). В состав молекулы ХТ входят 8 остатков триптофана, из которых 6 являются внутренними, а 2 наполовину экспонированы в растворитель [40]. Большое число триптофановых остатков и их различная доступность

Т а б л и ц а 1

Энергия взаимодействия ГПАВ с химотрипсином

Тип комплекса	Средняя энергия, ккал/моль
ХТ-16-6(OH)	-4,60±1,5
ХТ-16-10(OH)	-4,84±1,5

для растворителя не позволяют дать однозначную интерпретацию наблюдаемых изменений параметров флуоресценции. Увеличение интенсивности флуоресценции может быть обусловлено как частичным разворачиванием белка и увеличением расстояния между хромофорами и группами-тушителями, так и переходом части

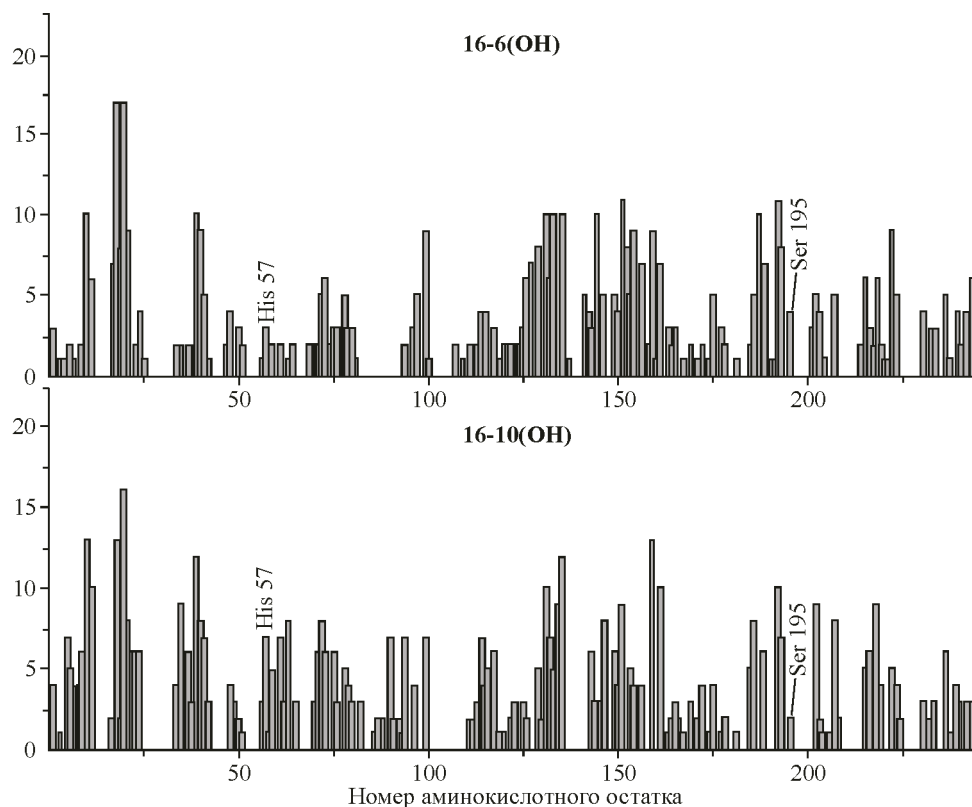


Рис. 3. Количество контактов образованных аминокислотными остатками ХТ с молекулами 16-6(OH) и 16-10(OH). Анализ сделан для 50 наиболее энергетически выгодных комплексов

поверхностных триптофановых остатков в более гидрофобное окружение. Увеличение длины волны флуоресценции может быть связано с увеличением доступности воде внутренних триптофанов при разворачивании глобулы и изменением состояния поверхностных триптофановых остатков. Следует отметить, что одновременный рост интенсивности и длины волны триптофановой флуоресценции часто связывают с денатурацией белка [40].

В качестве еще одного метода оценки структуры ХТ в составе комплексов с молекулами ГПАВ использовали метод ИК спектроскопии. На рис. 5 приведены спектры поглощения ХТ в растворах ГПАВ с различной длиной спейсерного фрагмента. Там же для сравнения приведен спектр белка, подвергнувшегося частичному автолизу в результате 24 ч инкубации в буфере при 25 °С. Интенсивность в максимуме полосы амид-1 белка, денатурированного автолизом, значительно понижается за счет уширения полосы в результате уменьшения содержания нативной β -структуры (1636 см^{-1}) и роста неупорядоченных структур (1646 и 1670 см^{-1}). Одновременно происходит увеличение числа концевых СОО-групп, что проявляется в росте интенсивности поглощения на частоте 1590 см^{-1} [41]. Сравнение спектров поглощения ХТ в присутствии 4 мМ ГПАВ со спектром белка, денатурированного автолизом, показы-

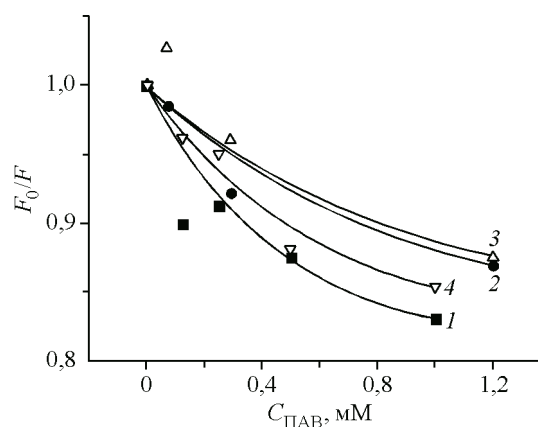


Рис. 4. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции ХТ от концентрации ГПАВ: 16-4(OH) (1), 16-6(OH) (2), 16-10(OH) (3), 16-12(OH) (4).

F_0 — интенсивность триптофановой флуоресценции в буфере, F — в растворе ГПАВ

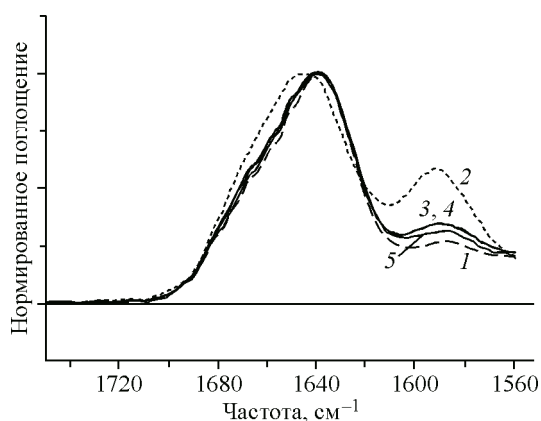


Рис. 5. Инфракрасные спектры поглощения химотрипсина в буферном растворе и растворах ГПАВ: нативный ХТ (1), ХТ денатурированный автолизом (2); 16-8(OH) (3); 16-10(OH) (4); 16-12(OH) (5). Спектры нормированы по максимуму полосы амид-I

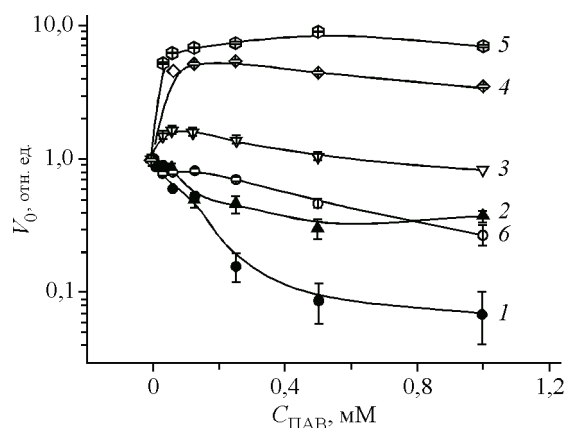


Рис. 6. Зависимость относительного изменения скорости реакции ферментативного гидролиза БТНА от концентрации 16-4(OH) (1), 16-6(OH) (2), 16-8(OH) (3), 16-10(OH) (4), 16-12(OH) (5), ЦГАБ (6). Начальная скорость реакции в буферном растворе $7 \cdot 10^{-8}$ М/с

вает качественное сходство наблюдаемых изменений. В то же время денатурирующее действие ГПАВ сравнительно невелико.

Исследование ферментативной активности ХТ показало, что в присутствии всего ряда изученных ГПАВ наблюдается изменение каталитической активности химотрипсина (рис. 6). При этом наблюдается корреляция между активностью ХТ и длиной спейсерного фрагмента ГПАВ. Интересно отметить, что для 16-10(OH) и 16-12(OH) наблюдается ускорение реакции в 5–8 раз по сравнению с реакцией в буфере, в то время как для ГПАВ с более короткими спейсерами наблюдается ее ингибирование. В табл. 2 приведены кинетические параметры реакции ферментативного гидролиза БТНА: V_{\max} — максимальная скорость реакции, K_M — константа Михаэлиса, k_{cat} — каталитическая константа реакции и k_{cat}/K_M — эффективность катализа в присутствии 16-10(OH) и 16-6(OH), для которых наблюдаются активирующий и ингибирующий эффекты соответственно. Из приведенных данных видно, что сродство фермента к субстрату, характеризуемое величиной K_M , имеет близкие значения как в буфере, так и в присутствии ГПАВ диаметрально противоположного действия. Это может быть основанием для предположения, что мы не наблюдаем ни существенного нарушения структуры фермента, ни блокировки его активного центра в присутствии ГПАВ. В то же время по сравнению с контролем (буферный раствор) наблюдается существенное уменьшение (16-6(OH)) или увеличение (16-10(OH)) эффективности катализа.

Известно [42], что реакция ферментативного гидролиза с участием сериновых протеаз проходит в три стадии: образование фермент-субстратного комплекса, ацилирование активного

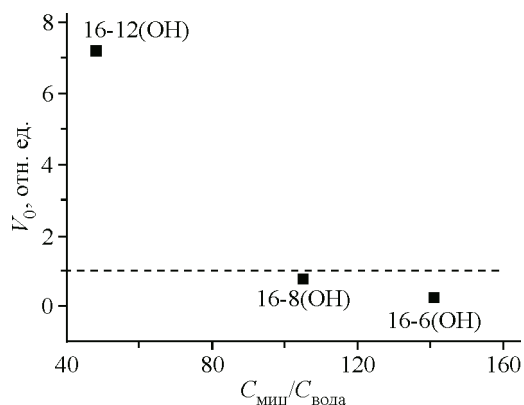
Т а б л и ц а 2

Кинетические параметры ферментативной реакции*

Система	$V_{\max} \cdot 10^{-7}, \text{М} \cdot \text{с}^{-1}$	$K_M \cdot 10^{-4}, \text{М}$	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_M, \text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$
ХТ	1,5±0,1	0,7	0,15	2143
ХТ+16-10(OH)	5±0,5	0,5	0,5	10000
ХТ+16-6(OH)	0,4±0,05	0,83	0,04	482

* Концентрация ХТ 1 мкМ; концентрация ГПАВ 1 мМ.

Рис. 7. Зависимость скорости гидролиза БТНА в системе ХТ/ГПАВ относительно буферного раствора от коэффициента распределения субстрата между мицеллярной и водной фазами в 1 мМ растворах ПАВ



центра фермента и гидролиз ацил-ферментного комплекса. Анализ кинетических данных (см. табл. 2) показывает, что константа Михаэлиса K_M , характеризующая сродство субстрата с ферментом, мало меняется в мицеллярных системах по сравнению с буферным раствором. В то время как каталитическая константа k_{cat} , определяемая скоростью образования и распада ацил-ферментного комплекса, уменьшается в присутствии 16-6(OH) и увеличивается в присутствии 16-10(OH). По нашему мнению, изменение скоростей образования и распада ацил-ферментного комплекса может быть вызвано изменением подвижности аминокислотных остатков активного центра белка или изменением доступности активного центра для молекул воды как результат модуляции структуры фермента при взаимодействии с ПАВ. Более глубокий анализ изменения активности фермента в присутствии исследованных ГПАВ требует более детального исследования.

Участие ПАВ в различных физико-химических и биологических процессах во многом зависит от их агрегатного состояния, которое определяется концентрацией ПАВ в растворе. Значения ККМ исследованных ПАВ лежат в диапазоне 1,8—3,7 мкМ [39], т.е. в условиях эксперимента все ГПАВ находились в мицеллизованном состоянии. Следует отметить, что ККМ гидроксиэтильных ГПАВ на 1-2 порядка ниже, чем у их нефункционализованных аналогов. Это может быть отражением возможных специфических взаимодействий (водородного связывания) между молекулами ГПАВ, облегчающих процессы мицеллообразования. Водородное связывание может отражаться и на солюбилизации реагентов, а также регулировать скорость их взаимодействия. Доступность субстрата ферменту может уменьшаться в результате солюбилизации субстрата в мицеллах ГПАВ. Наши исследования показали, что гидрофобный субстрат, каковым является БТНА, активно солюбилизируется в мицеллах ГПАВ, и коэффициент его распределения между водой и мицеллярным раствором резко уменьшается с ростом длины спейсера. На рис. 7 сопоставлены изменения начальной скорости реакции, катализируемой ХТ, с коэффициентом распределения БТНА между мицеллярной и водной фазами растворов ПАВ. Если для систем 16-6(OH) и 16-8(OH) перераспределение субстрата между водной и мицеллярной фазами сопровождается понижением скорости реакции относительно ее уровня в буфере, то в системе 16-12(OH) имеет место повышение скорости реакции относительно буфера. Из приведенной зависимости следует, что с уменьшением длины спейсера в ряду изученных ГПАВ резко уменьшается концентрация субстрата в водной фазе системы, что, очевидно, является основным фактором, приводящим к уменьшению активности ХТ.

Таким образом, в настоящей работе показано, что изменение длины спейсерного фрагмента алкиламмонийных гидроксилсодержащих геминальных ПАВ существенно изменяет структуру супрамолекулярных комплексов ПАВ/белок и отражается на каталитической активности супрамолекулярной системы, что открывает перспективы для исследования регуляторного действия описанных геминальных ПАВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 12-03-01085-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zuev Yu., Faizullin D., Idiyatullin B., Mukhitova F., Chobert J.-M., Fedotov V., Haertle T. // *Colloid Polymer Sci.* – 2004. – **282**. – P. 264 – 269.
2. Lampe J.N., Atkins W.M. // *Biochemistry.* – 2006. – **45**. – P. 12204 – 12215.

3. Косинский Ю.А., Пыркков Т.В., Луценко С.В., Ефремов Р.Г. // Рос. хим. журн. – 2006. – **L**, № 2. – С. 36 – 44.
4. Mandal G., Bardhan M., Ganguly T. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2010. – **81**. – P. 178 – 184.
5. Zhu J., Li D., Jin J., Wu L. // Spectrochim. Acta, A: Mol. Biomol. Spectroscopy. – 2007. – **68**. – P. 354 – 359.
6. Zhu J., Zhang X., Li D., Jin J., Wu L. // J. Molec. Struct. – 2007. – **843**. – P. 38 – 44.
7. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. – М.: МЦНМО, 2002.
8. Friberg S.E., Larsson K., Sjöblom J. Eds. Food Emulsions. – Taylor & Francis e-Library, 2005.
9. Sekhon B.S. // J. Pharm. Technol., Research and Management. – 2013. – **1**. – P. 11 – 36.
10. Teglia A., Secchi G. // Int. J. Cosmetic Sci. – 1994. – **16**. – P. 235 – 246.
11. Nielsen H.M., Fano M., Müllertz A. // J. Pharm. Sci. – 2013. – **102**. – P. 2689 – 2698.
12. Asker D., Weiss J., McClements D.J. // J. Agric. Food Chem. – 2011. – **59**. – P. 1041 – 1049.
13. Magdassi S., Kamyshny A. Surface and Functional Properties of Proteins. In: Surface Activity of Proteins: Chemical and Physicochemical Modifications / Ed. S. Magdassi. – NY: Marcel Dekker Inc., 1996. – P. 1 – 38.
14. (a) Stupishina E.A., Faizullin D.A., Zakhartchenko N.L., Fedotov V.D., Zuev Yu.F. // Mendeleev Comm. – 2001. – N 6. – P. 237 – 240. (b) Mao Y., Wei W., Zhang J., Zhang S. // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2002. – **52**. – P. 19 – 29.
15. Pradines V., Fainerman V.B., Aksenenko E.V., Kragel J., Wustneck R., Miller R. // Langmuir. – 2011. – **27**. – P. 965 – 971.
16. Moore P.N., Puvvada S., Blankschtein D. // Langmuir. – 2003. – **19**. – P. 1009 – 1016.
17. Ospinal-Jiménez M., Pozzo D.C. // Langmuir. – 2014. – **30**. – P. 1351 – 1360.
18. Stenstam A., Khan A., Wennerström H. // Langmuir. – 2004. – **20**. – P. 7760 – 7765.
19. Zuev Yu.F., Vylegzhanina N.N., Zakhartchenko N.L. // Appl. Magn. Reson. – 2003. – **25**. – P. 29 – 42.
20. McGregor C., Perrin C., Monck M., Camilleri P., Kirby A.J. // J. Amer. Chem. Soc. – 2001. – **123**. – P. 6215 – 6220.
21. Zana R. // Adv. Colloid Interface Sci. – 2002. – **97**. – P. 205 – 253.
22. Li Y., Li P., Dong C., Wang X., Wang Y., Yan H., Thomas R.K. // Langmuir. – 2006. – **22**. – P. 42 – 45.
23. Yoshimura T., Sakato A., Tsuchiya K., Ohkubo T., Sakai H., Abe M., Esumi K.J. // Colloid Interface Sci. – 2007. – **308**. – P. 466 – 473.
24. Вылегжанина Н.Н., Миргородская А.Б., Панкратов В.А., Зуев Ю.Ф. // Коллоид. журн. – 2010. – **72**. – С. 162 – 170.
25. Faustino C.M.C., Calado A.R.T., Garcia-Rio L. // Biomacromolecules. – 2009. – **10**. – P. 2508 – 2514.
26. Amiri R., Bordbar A., Garcia-Mayoral M., Khosropour A.R., Mohammadpour-Baltork I., Menéndez M., Laurents D.V. // J. Colloid Interface Sci. – 2012. – **369**. – P. 245 – 255.
27. Amiri R., Bordbar A., Laurents D.V., Khosropour A.R., Mohammadpour-Baltork I. // Int. J. Biological Macromol. – 2012. – **50**. – P. 1151 – 1157.
28. Wang Y., Guo R., Xi J. // J. Colloid and Interface Sci. – 2009. – **331**. – P. 470 – 475.
29. Миргородская А.Б., Кудрявцева Л.А., Панкратов В.А., Лукашенко С.С., Ризванова Л.З., Коновалов А.И. // Журн. общ. химии. – 2006. – **76**. – С. 1696 – 1702.
30. Богданова Л.Р., Гнездилов О.И., Идиятуллин Б.И., Курбанов Р.Х., Зуев Ю.Ф., Усъяров О.Г. // Коллоид. журн. – 2012. – **74**. – С. 3 – 9.
31. Бреслер С.Е., Шампань М., Френкель С.Я. // Биохимия. – 1961. – **26**. – С. 909 – 915.
32. Celej M.S., D'Andrea M.G., Sampara P.T., Fidelio G.D., Bianconi M.L. // Biochem. J. – 2004. – **378**. – P. 1059 – 1066.
33. Barth A. // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 2000. – **74**. – P. 141 – 173.
34. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. // J. Comput. Chem. – 2009. – **30**. – P. 2785 – 2791.
35. Bernstein F.S., Koetzle T.F., Williams G.J., Meyer E.F.Jr., Brice M.D., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. // J. Mol. Biol. – 1977. – **112**. – P. 535 – 542.
36. Alexander M., Dalglish D.G. // Food Biophysics. – 2006. – **1**. – P. 2 – 13.
37. Gangnard S., Zuev Yu., Gaudin J.-C., Fedotov V., Choiset Y., Axelos M.A.V., Chobert J.-M., Haertle Th. // Food Hydrocolloids. – 2007. – **21**. – P. 180 – 190.
38. Sharma V., Borse M., Aswal V.K., Pokhriyal N.K., Joshi J.V., Goyal P.S., Devi S. // J. Coll. Interface Sci. – 2004. – **277**. – P. 450 – 455.
39. Решетняк Я.К., Бурштейн Э.А. // Биофизика. – 1997. – **42**. – 785 – 798.
40. Barth A. // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 2000. – **74**. – P. 141 – 173.
41. Hedstrom L. // Chem. Rev. – 2002. – **102**. – P. 4501 – 4523.