

**Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

*На правах рукописи*

**Магсумов Тимур Ильнурович**

**ПОДАВЛЕНИЕ ГИДРОФОБНОГО ЭФФЕКТА  
ОРГАНИЧЕСКИМИ СОРАСТВОРИТЕЛЯМИ**

1.4.4. Физическая химия

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук, доцент  
Седов Игорь Алексеевич

Казань – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	11
ГЛАВА 1. ГИДРОФОБНЫЙ ЭФФЕКТ И ЕГО ПРОЯВЛЕНИЯ.....	11
1.1 Термодинамические функции растворения и сольватации .....	11
1.2 Сольватация малополярных соединений в воде .....	12
1.3 Концепция образования полости и процесс сольватации.....	15
1.4 Соотношения между термодинамическими функциями сольватации в воде .....	17
1.5 Проявление гидрофобного эффекта в различных процессах .....	19
1.5.1 Самосборка амфифильных молекул .....	19
1.5.2 Фолдинг белков .....	21
1.5.3 Белок-лигандные взаимодействия.....	23
ГЛАВА 2. ПОДАВЛЕНИЕ ГИДРОФОБНОГО ЭФФЕКТА В ПРИСУТСТВИИ ОРГАНИЧЕСКОГО СОРАСТВОРИТЕЛЯ.....	25
2.1 Сольватация малополярных соединений в водно-органических смесях .....	26
2.1.1 Растворимость, коэффициенты активности и энергии Гиббса сольватации малополярных соединений в водно-органических смесях.....	26
2.1.1.1 Предпочтительная сольватация.....	30
2.1.2 Энтальпии сольватации малополярных соединений в водно-органических смесях .....	34
2.1.3 Теоретические исследования процесса сольватации неполярных соединений в водно-органических смесях с использованием молекулярного моделирования.....	39
2.2 Стабильность белков в водно-органических смесях .....	46
2.2.1 Влияние добавления органического растворителя на термическую стабильность белков .....	46
2.2.2 Теоретические исследования разрушения нативной структуры белков..	53
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	56

ГЛАВА 3. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	56
3.1 Объекты исследования.....	56
3.2 Определение энергий Гиббса растворения и сольватации методом газохроматографического анализа равновесного пара .....	56
3.3 Определение энтальпий растворения и сольватации методом калориметрии растворения .....	59
3.4 Расчет термодинамических функций образования полости в водно-органических смесях .....	60
3.5 Определение температуры и энтальпии денатурации лизоцима методом дифференциальной сканирующей калориметрии.....	65
3.6 Изучение термической стабильности вторичной и третичной структуры лизоцима методом спектроскопии кругового дихроизма.....	67
3.7 Изучение термической стабильности лизоцима методом флуоресцентной спектроскопии.....	68
3.8 Определение кинетических параметров денатурации лизоцима методами остановленной струи и флуоресцентной спектроскопии.....	69
3.9 Молекулярно-динамическое моделирование разрушения нативной структуры лизоцима .....	69
ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	72
ГЛАВА 4. СОЛЬВАТАЦИЯ НЕПОЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ СМЕСЯХ.....	72
4.1 Термодинамические функции сольватации неполярных соединений в водно-органических смесях .....	72
4.2 Соотношения между энергией Гиббса и энтальпией сольватации неполярных соединений в водно-органических смесях .....	84
4.3 Термодинамические функции образования полости в водно-органических смесях .....	87
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКОГО РАСТВОРИТЕЛЯ НА ПРОЦЕСС ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ .....	98

5.1 Влияние органического соразтворителя на термическую стабильность лизоцима.....	98
5.2 Денатурирующая способность и сольватационные свойства водно-органических смесей.....	108
5.3 Энтальпии денатурации лизоцима в водно-органических смесях.....	111
5.4 Влияние органического соразтворителя на механизм термического разрушения нативной структуры лизоцима .....	112
5.4.1 Термическая стабильность третичной структуры лизоцима в водно-органических смесях.....	112
5.4.2 Термическая стабильность вторичной структуры лизоцима в водно-органических смесях.....	116
5.5 Механизм денатурации лизоцима в водно-органических смесях.....	119
5.5.1 Одно- или многостадийный механизм?.....	119
5.5.2 Влияние органического соразтворителя на кинетику разрушения нативной структуры лизоцима.....	122
5.6 Молекулярно-динамическое моделирование разрушения нативной структуры лизоцима в воде и в смесях диметилсульфоксид-вода.....	128
5.6.1 Выбор параметров, характеризующих изменение структуры лизоцима при разворачивании.....	128
5.6.2 Скорость разрушения третичной структуры лизоцима .....	130
5.6.3 Скорость разрушения вторичной структуры лизоцима.....	133
5.6.4 Разворачивание из частично развернутой структуры .....	134
5.6.5 Гистограммы состояний лизоцима, образующихся в ходе разворачивания .....	136
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	141
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	143

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Низкая растворимость малополярных соединений, устойчивость трехмерной структуры белков, образование мицелл и бислоев и многие другие физико-химические феномены в водных растворах связаны с проявлениями гидрофобного эффекта. Добавление смешивающихся с водой органических растворителей обычно вызывает ослабление его влияния. Это приводит, в частности, к увеличению растворимости малополярных соединений, разрушению мицелл и понижению стабильности нативной структуры белков вплоть до их денатурации.

Водно-органические смеси используются в процессах разделения и экстракции различных веществ как в лабораторном, так и в промышленном масштабе, что объясняет необходимость детального изучения их сольватационных свойств. В водно-органических смесях могут быть хорошо растворимы как малополярные органические молекулы, так и неорганические соли, что делает их средами, пригодными для проведения химических синтезов в гомогенных условиях. Кроме того, использование водно-органических смесей позволяет изменять селективность ферментов, а также проводить ферментативные реакции с плохо растворимыми в воде субстратами. Однако при этом следует учитывать снижение стабильности и каталитической активности белка. Поэтому исследование влияния различных растворителей на процессы денатурации белков также является актуальной задачей.

**Цель работы.** Основной целью работы является установление закономерностей подавления гидрофобного эффекта в водно-органических смесях в зависимости от природы и концентрации органического соразтворителя на примере процессов сольватации неполярных соединений и снижения термической стабильности белков. Для реализации этой цели были поставлены следующие задачи:

получение новых экспериментальных данных по коэффициентам активности и энтальпиям растворения малополярных соединений в водно-органических смесях;

разработка молекулярных моделей изучаемых водно-органических смесей и расчет термодинамических функций образования полости с использованием метода молекулярной динамики;

получение новых экспериментальных данных по термической стабильности белков в водно-органических смесях различного состава;

установление связи между термической стабильностью белков в водно-органических смесях, сольватационными свойствами этих смесей и подавлением гидрофобного эффекта;

исследование влияния органических растворителей на механизм термически индуцированного разрушения нативной структуры белка экспериментальными и теоретическими методами.

**Научная новизна.** В работе измерены ранее неизвестные величины термодинамических функций растворения и сольватации неполярных соединений в смесях воды с различными органическими соразтворителями в широком диапазоне составов смесей. Показано, что добавление даже небольших количеств органического растворителя приводит к подавлению гидрофобного эффекта.

На основе рассчитанных значений термодинамических функций образования полости в водно-органических смесях показано, что подавление гидрофобного эффекта обусловлено изменением термодинамических параметров процесса образования полости при добавлении органического растворителя.

Изучена термическая стабильность модельного белка лизоцима в смесях воды с различными органическими растворителями при однородных условиях проведения эксперимента. Впервые предложен ряд растворителей по их денатурирующей способности, мерой которой выступает величина изменения температуры денатурации белка.

Показана связь между денатурирующей способностью водно-органических смесей и их сольватационными свойствами по отношению к малополярным соединениям.

Показано, что в присутствии различных органических растворителей не только снижается термическая стабильность лизоцима, но и изменяется механизм

термически индуцированного разрушения его нативной структуры. Во многих случаях при этом разрушение элементов вторичной структуры продолжается после исчезновения нативной третичной структуры, в то время как в чистой воде эти процессы происходят синхронно.

### **Теоретическая и практическая значимость.**

Полученные значения коэффициентов активности и энтальпий растворения, а также термодинамические функции образования полости могут быть использованы для параметризации расчетных моделей растворимости.

Полученные данные о денатурирующей способности растворителей могут быть использованы для выбора наиболее подходящего растворителя при проведении ферментативных реакций.

Фундаментальное значение имеют выводы о связи между подавлением гидрофобного эффекта различными растворителями, их влиянием на термодинамику сольватации низкомолекулярных малополярных соединений и процесс денатурации белков в водно-органических смесях.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

Новые экспериментальные данные по термодинамическим функциям сольватации углеводов в смесях воды с различными органическими соразтворителями;

новые данные о термодинамических функциях образования полостей в различных растворителях;

определяющая роль вклада образования полости в подавлении гидрофобного эффекта в водно-органических смесях;

шкала органических растворителей по денатурирующей способности;

связь между денатурирующей способностью и сольватационными свойствами смесей органических растворителей с водой;

частичное сохранение вторичной структуры белка после разрушения третичной при термической денатурации белков в водно-органических смесях;

неодностадийный механизм денатурации лизоцима.

### **Методология и методы исследования.**

Значения термодинамических функций растворения и сольватации углеводов в водно-органических смесях были получены с помощью метода газохроматографического анализа равновесного пара и изотермической титрационной калориметрии.

Денатурация модельного белка лизоцима в воде и ее смесях с органическими соразтворителями была изучена методами дифференциальной сканирующей калориметрии, спектроскопии кругового дихроизма и комбинацией флуоресцентной спектроскопии и метода остановленной струи.

В теоретических исследованиях расчет термодинамических функций сольватации одноатомных газов и твердых сфер был проведен с использованием методов молекулярной динамики и вставки пробных частиц Видома. Разрушение нативной структуры белка в смесях различного состава также было изучено с помощью метода молекулярной динамики.

**Достоверность результатов** подтверждается использованием современного оборудования и апробированных методик исследования, воспроизводимостью полученных экспериментальных и расчетных данных и их согласованностью с описанными ранее в литературе результатами.

**Личный вклад автора.** Автором получены все экспериментальные данные, представленные в работе; проведены анализ литературы, математическая обработка экспериментальных и литературных данных; расчеты методом молекулярной динамики; анализ и обобщение полученных результатов.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на XX Международной конференции по химической термодинамике в России (Нижний Новгород, 2015), XXIII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016» (Москва, 2016), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016), XIII и XIV Международных конференциях «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах» (Суздаль, 2018 и Иваново, 2021), 14-й Международной конференции по фундаментальным и прикладным аспектам физической химии (Белград, Сербия, 2018), 4- и 5-ой Центрально- и Восточно-



Европейской конференциях по термическому анализу и калориметрии (Кишинев, Молдавия, 2017 и Рим, Италия, 2019), X и XI Международных конференциях молодых ученых по химии «Менделеев-2017» и «Менделеев-2019» (Санкт-Петербург, 2017 и 2019), XII Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Иваново, 2019), а также на научных конференциях Казанского федерального университета (2015 и 2017).

**Публикации.** Основные результаты диссертационного исследования изложены в 9 статьях [1–9] в рецензируемых научных журналах, индексируемых в WoS и Scopus, а также в 13 тезисах докладов на международных и российских научных конференциях.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, 5 глав, перечня основных результатов и выводов, списка литературы из 277 источников. Работа изложена на 173 страницах, содержит 17 таблиц и 50 рисунков.

Литературный обзор состоит из двух глав. Первая глава посвящена накопленным знаниям о гидрофобном эффекте и его проявлениям в различных процессах. Во второй главе обсуждаются полученные ранее результаты, связанные с подавлением гидрофобного эффекта органическими соразтворителями, прежде всего с точки зрения термодинамики сольватации малополярных соединений и денатурации белков. Методики, использованные при проведении экспериментов и расчетов, описываются в третьей главе. В четвертой главе приводится обсуждение результатов исследования процесса сольватации в водно-органических смесях. Пятая глава посвящена анализу влияния органических соразтворителей на процесс денатурации белков.

**Работа выполнена** на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» при поддержке гранта РФФИ по проекту № 19-33-90185 «Характеристика сольватационных свойств индивидуальных и смешанных растворителей на основе термодинамических функций образования полости», а

также программы повышения конкурентоспособности Казанского Федерального университета.

## ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## Глава 1. Гидрофобный эффект и его проявления

Под гидрофобным эффектом обычно понимают низкую растворимость и тенденцию к агрегации неполярных соединений в воде. Самым простым и известным примером проявления гидрофобного эффекта является несмешиваемость масла и воды [10–13]. Гидрофобный эффект влияет на множество различных процессов, протекающих в водных растворах. Примерами таких процессов могут быть образование мицелл и липидных мембран, супрамолекулярная самосборка, сворачивание (фолдинг) и агрегация белков [12–18]. Ниже будет более детально рассмотрено как термодинамическое описание гидрофобного эффекта в водных растворах индивидуальных веществ, так и его роль в сложных системах.

## 1.1 Термодинамические функции растворения и сольватации

Для характеристики и сравнения процессов растворения и сольватации в различных растворителях используются изменения термодинамических функций при переносе вещества  $A$  из стандартного состояния при 298 К и давлении 1 бар (растворение)  $\Delta_{soln} f^{A/S}$  или из газовой фазы при 298 К и давлении 1 бар (сольватация)  $\Delta_{solv} f^{A/S}$  в бесконечно разбавленный раствор в растворителе  $S$ . В качестве стандартного состояния во многих исследованиях и в настоящей работе используется гипотетический предельно разбавленный раствор с единичной мольной долей растворенного вещества. При выборе такого стандартного состояния рассматриваемые изменения термодинамических функций  $\Delta f$  соответствуют избыточным термодинамическим функциям при предельном разбавлении. Альтернативой является использование гипотетического предельно разбавленного раствора с концентрацией 1М.

Термодинамические функции растворения  $\Delta_{soln} f^{A/S}$  и сольватации  $\Delta_{solv} f^{A/S}$  связаны соотношением:

$$\Delta_{\text{soln}} f^{A/S} = \Delta_{\text{soln}} f^{A/S} - \Delta_{\text{vap}} f^A, \quad (1.1)$$

где  $\Delta_{\text{vap}} f^A$  – стандартная термодинамическая функция парообразования вещества  $A$  при 298 К.

## 1.2 Сольватация малополярных соединений в воде

Наиболее простыми процессами, в которых проявляются отличия свойств воды от других растворителей, являются растворение и сольватация небольших малополярных (т.н. гидрофобных) молекул. К ним относят инертные газы, углеводороды и их галогенпроизводные.

Процессы растворения и сольватации малополярных соединений в воде характеризуются высокими значениями энергий Гиббса, что означает низкую растворимость этих веществ [11, 13, 19]. Энергии Гиббса сольватации, например, в ряду алканов, линейно зависят от величины молекулярного объема вещества (рисунок 1.1а). Для крупных неполярных частиц с различным потенциалами взаимодействия, например, потенциалом Леннарда-Джонса, расчетные методы предсказывают линейную зависимость энергии Гиббса сольватации от площади поверхности (рисунок 1.1б) [16, 20]. В макроскопическом пределе эта зависимость соответствует работе увеличения площади раздела фаз между неполярным телом и водой, равной  $\gamma S$ . Таким образом, сумма энергий Гиббса сольватации отдельных небольших молекул может быть больше, чем для их кластеров, что и является движущей силой процесса агрегации в воде.

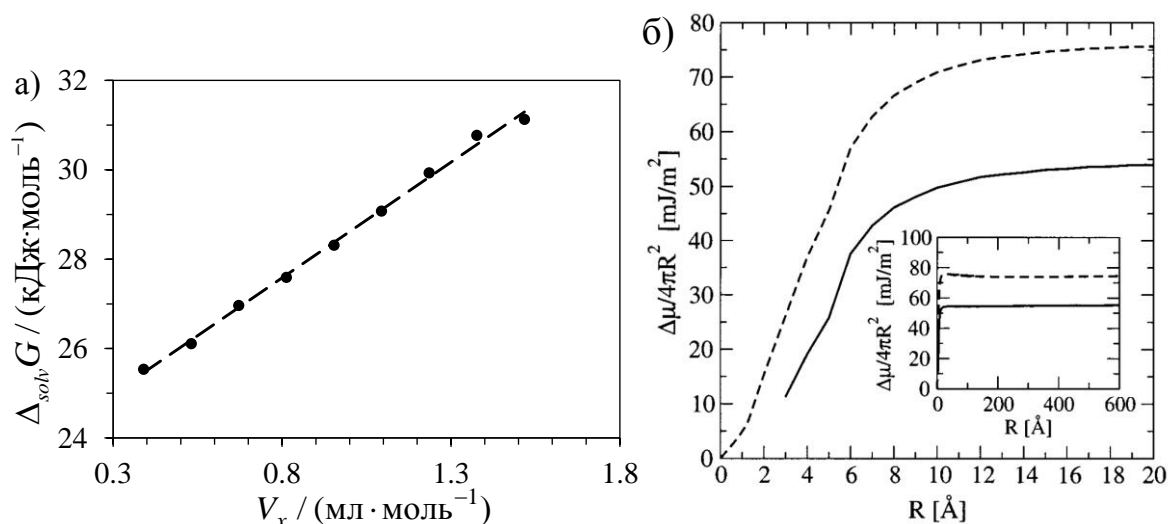


Рисунок 1.1. а) Зависимость энергии Гиббса сольватации *n*-алканов в воде от характеристического молекулярного объема МакГована  $V_x$ . б) Зависимость избыточного химического потенциала гидратации, отнесенного к единице площади поверхности, частицы с потенциалом взаимодействия Леннарда-Джонса (сплошная линия) от ее размеров радиуса при 298 К [20]. Рисунок (б) взят из работы [20].

Процессы растворения и сольватации малополярных соединений характеризуются также низкими значениями энтропии, высокими значениями теплоемкости и более низкими по сравнению с другими растворителями значениями энтальпии [11, 13, 19]. Энтальпии и энтропии растворения и сольватации сильно зависят от температуры (рисунок 1.2). При температурах, близких к 298 К, высокие значения энергии Гиббса этих процессов обусловлены энтропийным вкладом, а при более высоких температурах существенную роль играет также и энтальпийный.

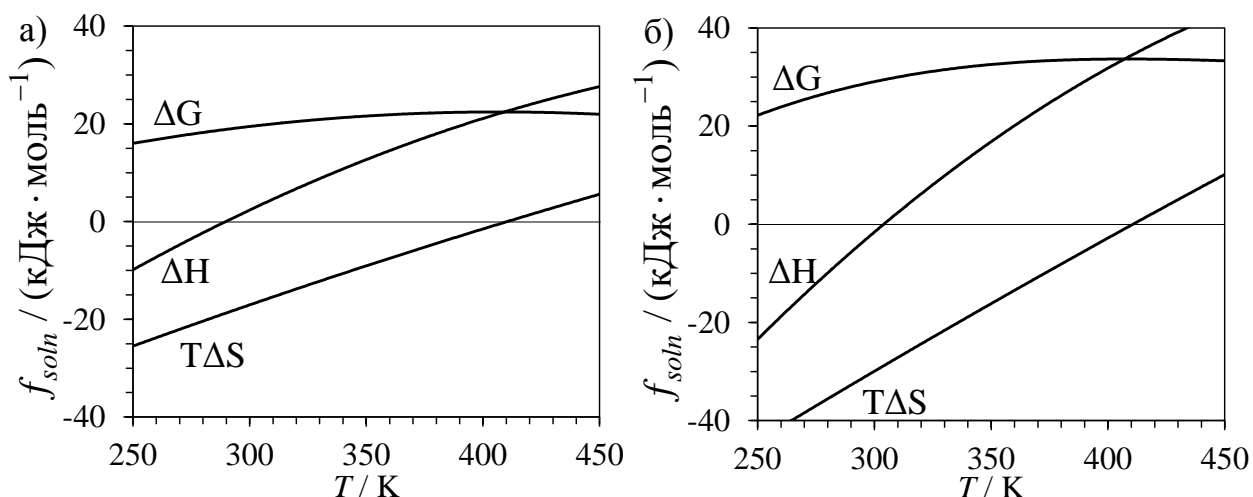


Рисунок 1.2. Температурные зависимости термодинамических функций растворения а) бензола и б) пентана в воде [21].

Достаточно долго для объяснения наблюдаемых особенностей процесса сольватации в воде использовалась гипотеза, предложенная Франком и Эвансом в 1945 году [22]. Согласно этой теории вокруг растворенной неполярной частицы образуется упорядоченная сетка из молекул воды. Образование таких структур позволяет минимизировать энергетические затраты от разрыва водородных связей при размещении молекулы растворенного вещества. Образование подобных упорядоченных структур должно привести к потере поступательных и вращательных степеней свободы молекул воды, сконцентрированных вокруг растворенного вещества. Это объясняет низкие значения энтропий сольватации. При сближении растворенных молекул «структурированная» вода в области между ними «освобождается» и переходит в объем раствора, что также означает энтропийный выигрыш. Теория Франка и Эванса позволяла объяснить и наблюдаемые температурные зависимости энтропии, энтальпии и теплоемкости сольватации неполярных молекул в воде.

Намного позже, используя данные, полученные с помощью ряда экспериментальных и теоретических методов, был сделан вывод о том [23], что нет никаких оснований предполагать усиление водородных связей вокруг молекулы растворенного вещества, а низкие значения энтальпии гидратации неполярных соединений объясняются величинами ван-дер-ваальсовых взаимодействий между водой и растворенным веществом. В экспериментах по исследованию структуры

воды методом нейтронного рассеяния вблизи неполярных растворенных веществ не наблюдалось упорядочивания, описанного Франком и Эвансом [24, 25]. Было высказано предположение [23], что гидрофобные взаимодействия являются не столько результатом особых структурных свойств гидрофобной гидратной оболочки неполярных соединений, сколько отражают ограниченную способность размещать неполярные растворенные вещества в воде и при этом сохранять сетку водородных связей воды.

### 1.3 Концепция образования полости и процесс сольватации

При теоретическом исследовании процессов сольватации широко используется концепция образования полости в растворителе [26–32]. Согласно этой концепции, процесс сольватации разделяют на две гипотетические стадии: 1) стадия образования полости, соответствующей по размеру и форме молекуле растворенного вещества, и 2) последующий перенос растворенного вещества в эту полость, задействующий взаимодействия растворенное вещество-растворитель. Полное изменение любой из термодинамических функций системы при сольватации будет складываться из вкладов образования полости и взаимодействия.

В конце 1950-х годов была разработана теория масштабных частиц [33, 34], описывающая поведение жидкости из твердых сфер заданного размера. В теории масштабных частиц получено выражение для энергии Гиббса образования полости  $\Delta_{cav}G$  в такой жидкости. Величина  $\Delta_{cav}G$  определяется диаметром сферы  $d_1$ , моделирующей растворитель, диаметром полости  $d_2$  и мольным объемом жидкости  $V_m$ :

$$\Delta_{cav}G = RT \left( -\ln(1-y) + \frac{3y}{1-y} \frac{d_2}{d_1} + \left( \frac{3y}{1-y} + \frac{9}{2} \left( \frac{y}{1-y} \right)^2 \right) \left( \frac{d_2}{d_1} \right)^2 + \frac{yP}{\rho RT} \left( \frac{d_2}{d_1} \right)^3 \right), \quad (1.2)$$

где  $y = \pi \rho d_1^3 / 6$  – плотность упаковки растворителя,  $\rho = \frac{N_A}{V_m}$  – число молекул растворителя в единице объема,  $P$  – давление.

Дополнение теории масштабных частиц выражениями для расчета энергии взаимодействия растворенного вещества с растворителем позволило достаточно точно предсказывать экспериментальные значения термодинамических функций сольватации газообразных веществ в воде, присвоив каждому растворителю определенное значение твердосферного радиуса [26, 33]. Однако очевидно, что представление всех растворителей в виде твердых сфер является очень грубым приближением. Различные органические растворители имеют разный углеродный скелет, функциональные заместители, распределение заряда на атомах. Более того, результаты расчетов теории масштабных частиц сильно зависят от выбора диаметра твердой сферы молекулы растворителя, который нельзя напрямую определить ни в каких экспериментах [35].

Важным результатом, полученным с помощью теории масштабных частиц, является сравнение энергий Гиббса образования полости в воде и других растворителях. Расчет по теории масштабных частиц показал более высокие значения энергии Гиббса и более низкие значения энтропии образования полости в воде по сравнению с различными органическими растворителями [26, 27, 33]. Этот результат является основой современной интерпретации гидрофобного эффекта.

Термодинамические функции образования полости могут также быть определены на основе статистического анализа траекторий, полученных с помощью компьютерного моделирования (молекулярная динамика или Монте-Карло) растворителя. В этом случае, в отличие от теории масштабных частиц, используются более точные полноатомные модели растворителей. К настоящему времени процесс образования полости широко изучен в водных растворах с использованием различных методов и моделей воды, при разных температурах, для полостей разного размера и формы [36–45]. Однако лишь в небольшом количестве работ были определены термодинамические функции образования полости в неводных растворителях с помощью компьютерного моделирования. Одно из первых таких исследований было проведено Погориллом и Праттом [31]. Они сравнили энергию Гиббса образования полости для моделей воды, хлороформа,



четырёххлористого углерода, ундеканола и алканов. Было продемонстрировано расхождение с предсказаниями теории масштабных частиц. Также было показано, что небольшие полости в воде образуются даже легче, чем в органических растворителях, но при увеличении радиуса полости наблюдается резкое увеличение энергии Гиббса. Результаты, полученные в этой работе, были ограничены малыми размерами полостей.

Используя метод вставки тестовых частиц Видома, Водак и сотр. [35, 46] и Эшбах и Прагг [47] показали, что в воде по сравнению с н-гексаном затраты энергии Гиббса на образование полости выше, а энтропии более отрицательны, что подчеркивает связь между гидрофобным эффектом и термодинамикой образования полости. Используя тот же метод, Зедлмейер и сотр. [45] охарактеризовали температурные зависимости энергии Гиббса, энтальпии, энтропии и изобарной теплоемкости образования полости в воде SPC/E для полостей, соответствующих атомам благородных газов и молекуле метана. Термодинамические функции образования полости воспроизводили общие признаки гидрофобного эффекта, наблюдаемого для водных растворов неполярных соединений, такие как отрицательная энтропия, становящаяся положительной при повышении температуры, и положительное изменение теплоемкости. Таким образом, на основе полученных расчетными методами результатов общепринято считать, что гидрофобный эффект и сильные различия между термодинамическими функциями сольватации неполярных соединений в воде и других растворителях обусловлены вкладом процесса образования полости.

#### 1.4 Соотношения между термодинамическими функциями сольватации в воде

Для описания связи между различными физическими величинами часто используют так называемые экстратермодинамические соотношения, то есть соотношения, которые не вытекают из начал термодинамики [48–51]. Их нельзя обосновать строго теоретически, но они хорошо описывают экспериментально измеряемые величины и часто используются для предсказания физических

величин. Известным примером таких соотношений является уравнение Гаммета, которое связывает реакционную способность со структурой соединения [52, 53]. Получено множество корреляционных соотношений для различных свойств или физико-химических процессов, например, мицеллообразования [54], адсорбции [55], диффузии [56], токсичности веществ [57, 58] и т.д. Наиболее универсальным экстратермодинамическим соотношением для многих процессов является энтальпийно-энтропийная компенсация [51, 59, 60].

Для процесса сольватации также наблюдается наличие энтальпийно-энтропийной компенсации. В работе Баркляя и Батлера 1938 года [61] было показано наличие линейного соотношения между энтальпией и энтропией испарения (процесс, обратный сольватации) различных веществ из неассоциированных растворителей (бензол, ацетон, хлорбензол, тетрахлорметан и метилацетат). Для процесса испарения из спиртов наблюдалось отклонение от этого соотношения, которое авторы объясняли «аномальными поверхностными энтропиями полостей в этих жидкостях». Позже Франком и Эвансом [22] для процесса испарения из водных растворов было показано несоблюдение энтальпийно-энтропийной компенсации, полученной Баркляем и Батлером, которое авторы связывали с гидрофобным эффектом и рассматривали как аргумент в пользу своей теории образования «айсбергов» вокруг молекул растворенного вещества.

Исследование энтальпийно-энтропийной компенсации для процесса сольватации в различных растворителях было продолжено в работах Седова и Соломонова [62–64]. При постоянной температуре при линейном соотношении между энтальпией и энтропией также выполняется линейное соотношение между энергией Гиббса и энтальпией. Использование этого соотношения было сочтено авторами более предпочтительным, так как энтропия для многих процессов определяется из экспериментальных значений энергии Гиббса и энтальпии, и погрешности двух измерений для энтропии складываются. Было показано, что для различных соединений в большом числе неассоциированных растворителей

соблюдается линейное соотношение между энергиями Гиббса и энтальпиями сольватации, которое описывается эмпирическим уравнением:

$$\Delta_{solv} G = 0,627 \Delta_{solv} H + 16,3. \quad (1.3)$$

Для воды и других ассоциированных растворителей наблюдается отклонение от этой линейной корреляции (рисунок 1.3). Авторы предложили использовать отклонение как качественный критерий проявления сольвофобного (в случае воды – гидрофобного) эффекта, а величину отклонения – как его количественную характеристику. Таким образом, данный подход может быть также использован при рассмотрении подавления гидрофобного эффекта.

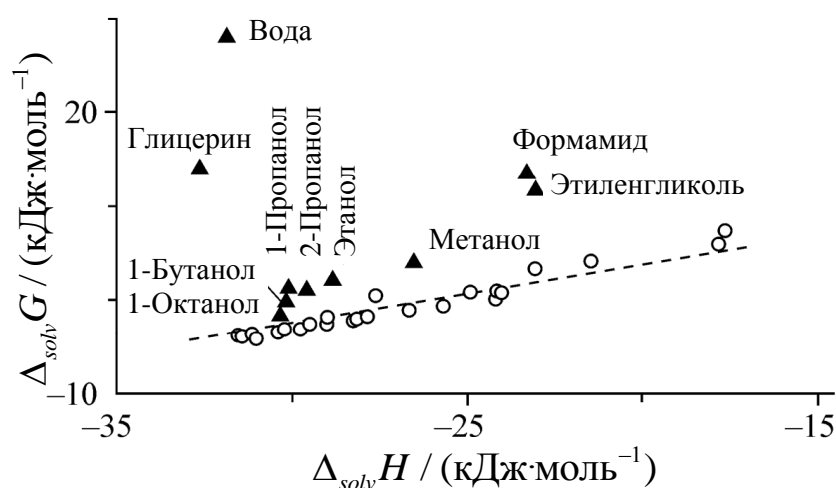


Рисунок 1.3. Соотношения между энергией Гиббса и энтальпией сольватации н-гексана в неассоциированных растворителях (кружки), воде и других ассоциированных растворителях (треугольники) [63]. Сплошная линия соответствует уравнению (1.3). Подписи на рисунке переведены, оригинал взят из работы [63].

## 1.5 Проявление гидрофобного эффекта в различных процессах

### 1.5.1 Самосборка амфифильных молекул

Гидрофобный эффект играет ключевую роль в таком процессе, как самосборка, или агрегация, амфифильных молекул, состоящих из гидрофильной полярной и гидрофобной (липофильной) неполярной частей. Как правило, гидрофобная часть молекулы представляет собой длинный углеводородный

остаток (так называемый «хвост»), а гидрофильная часть может быть как ионной, так и неионной группой («голова» молекулы). Вследствие гидрофобного эффекта при самосборке амфифильных молекул углеводородные остатки стремятся оказаться внутри образующихся агрегатов, избегая контактов с водой, а гидрофильные полярные группы – на их поверхности. В стабилизации образующихся агрегатов, помимо гидрофобного эффекта, принимают участие также водородные связи и электростатические взаимодействия между полярными группами и молекулами воды.

Самопроизвольная агрегация амфифильных молекул происходит выше определенной концентрации – критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Она сильно зависит от природы амфифильной молекулы и внешних условий. Одной из закономерностей является уменьшение ККМ при увеличении длины гидрофобного «хвоста» амфифильной молекулы [16]. Величина ККМ может достигать 1 М для соединений с короткими гексильными остатками и быть меньше  $10^{-9}$  М для некоторых фосфолипидов, встречающихся в организме человека [12].

В зависимости от строения амфифильных молекул и их концентрации, а также температуры, рН, ионной силы среды могут образовываться агрегаты различного строения. Примерами таких агрегатов являются сферические и цилиндрические мицеллы, двухслойные везикулы, ламеллярные и прочие структуры (рисунок 1.4) [65].

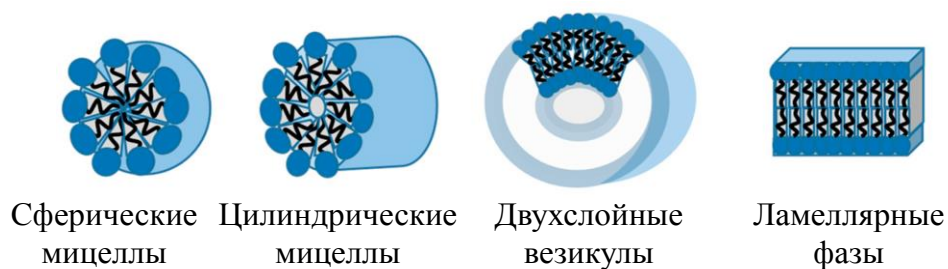


Рисунок 1.4. Примеры самоорганизованных структур амфифильных молекул. Исходные изображения взяты из работы [66].

Примерами самосборки амфифильных молекул в живых системах являются клеточные мембраны и везикулы, организованные в виде бислоев из фосфолипидов, содержащих в своей молекуле два гидрофобных хвоста.

## 1.5.2 Фолдинг белков

Нативная биологически активная трехмерная структура белков стабилизируется комбинацией взаимодействий с участием полярных (гидрофильных) и неполярных (гидрофобных) участков в молекуле белка. Пептидная цепь сама по себе является гидрофильной. Однако при образовании водородных связей между амидными группами, например, при формировании вторичной структуры ( $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур), частично теряется возможность участия этих групп в водородных связях с водой [13].

При сворачивании (фолдинге) белков и стабилизации их нативной структуры играют свою роль различные типы взаимодействий: гидрофобные, ван-дер-ваальсовы и электростатические, водородные связи, дисульфидные мостики. Часто утверждается, что именно гидрофобный эффект играет при этом ключевую роль [67–70]. В нативной структуре глобулярных белков существенная часть гидрофобных боковых цепей аминокислотных остатков обычно находятся внутри глобулы (рисунок 1.5). Образующаяся структура оказывается энергетически более выгодной по сравнению с конформациями, в которых гидрофобные участки «открыты» растворителю.

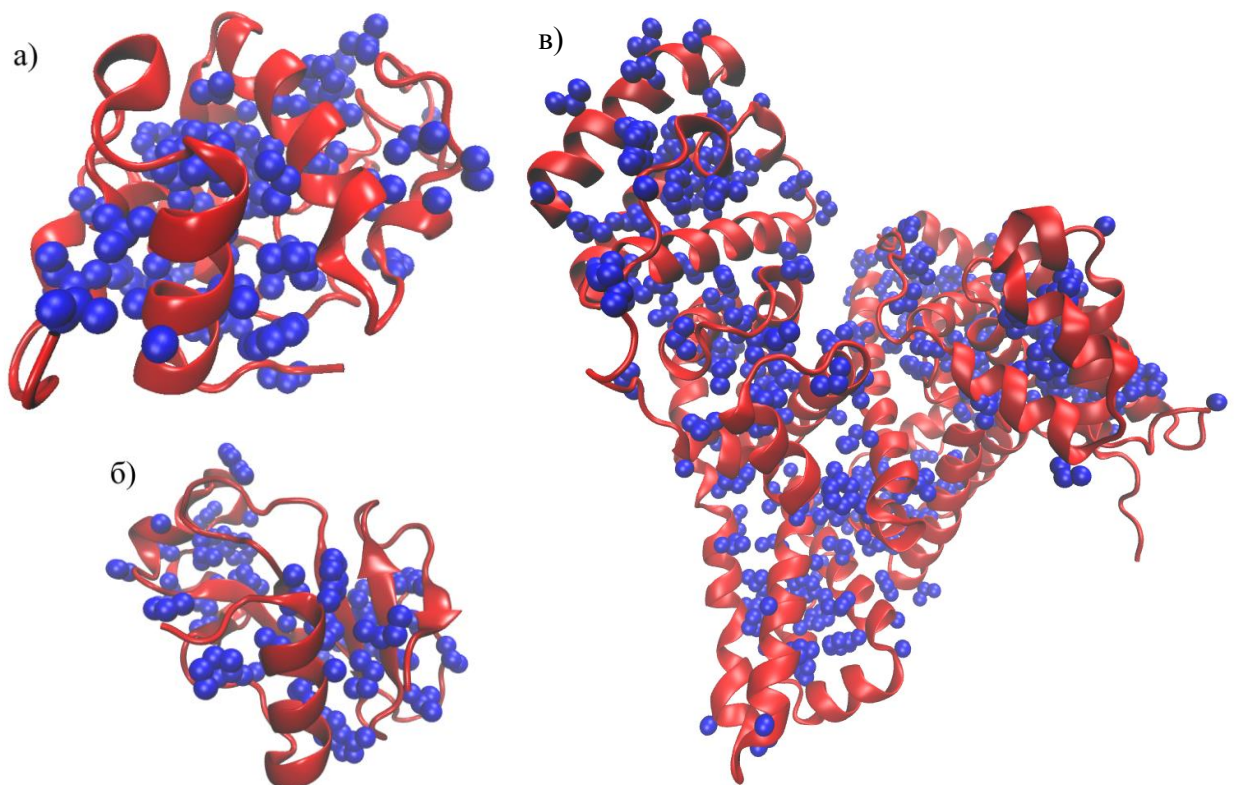


Рисунок 1.5. Трехмерная структура различных белков: а) лизоцима куриного яичного белка (PDB: 193L), б) барназа (PDB: 1A2P), в) бычий сывороточный альбумин (PDB: 4F5S). Красным цветом показана основная белковая цепочка, синими сферами – боковые остатки гидрофобных аминокислот (аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан).

Отмечается, что точечная мутация аминокислотных остатков, находящихся внутри трехмерной структуры белка, может приводить к изменению стабильности нативной структуры белка. Например, было показано, что замена изолейцина-96 на аланин в барназе приводит к снижению стабильности глобулярной структуры [71], что объясняется уменьшением гидрофобности аминокислотного остатка. Аналогичным образом влияет и замена ряда других неполярных остатков в этом белке на более полярные [72, 73]. Критическая роль неполярных аминокислотных остатков для стабильности нативной структуры характерна и для многих других глобулярных белков [70, 74, 75].

В то же время необходимо отметить, что нативная структура белков устроена сложно, и увеличение гидрофобности внутренних аминокислотных остатков не всегда приводит к повышению стабильности белка, так как при таких заменах может нарушаться упаковка трехмерной структуры в целом [76].

Пространственная структура белка может подвергаться изменениям под действием различных факторов: при изменении температуры, pH, ионной силы, при добавлении различных веществ. Нативная структура может полностью разрушиться, образуя неупорядоченные случайные клубки полипептидной цепи (random coils) [77]. Разрушение нативной структуры может также привести к промежуточному состоянию с частично сохраненными элементами нативной вторичной структуры, которое часто называют «расплавленной глобулой» [78]. Для крупных белков со значительным гидрофобным ядром потеря нативной структуры может сопровождаться сохранением компактности молекулы белка [79, 80]. Механизм разрушения нативной структуры зависит от природы белка и внешних условий.

### 1.5.3 Белок-лигандные взаимодействия

Как уже было сказано, в нативной конформации белка большая часть гидрофобных остатков аминокислот расположена внутри его трехмерной структуры. Образующиеся гидрофобные ядра могут взаимодействовать с небольшими малополярными молекулами. Это является одним из факторов, обуславливающих возможность белков связывать различные лиганды.

Одной из стратегий, используемых в медицинской химии для улучшения связывания лигандов с белками, является увеличение гидрофобности лигандов [81]. Например, было показано, что энергия Гиббса связывания гетероциклических ароматических сульфониламидов с человеческой карбоангидразой II растет при увеличении гидрофобной поверхности лиганда [82].

Гаспари и сотр. [83], используя экспериментальные (поверхностный плазмонный резонанс) и теоретические (молекулярная динамика, квантовохимические DFT-расчеты) методы, показали, что гидрофобность лиганда влияет также на кинетику связывания. Анализируя данные о связывании различных лигандов с термолизинном, полученные методом изотермической титрационной калориметрии, Биела и сотр. пришли к выводу, что гидрофобный эффект может влиять как на энтальпийный, так и энтропийный вклад связывания лигандов [81].

Вкладу гидрофобного эффекта в процесс связывания лигандов с белками уделяют внимание и в методе молекулярного докинга, который используется для предсказания положения лиганда в центре связывания и оценки энергии взаимодействия лиганда с белком. Этот вклад является одной из составляющих многих оценочных функций, характеризующей сродство лиганда к белку [84–87].

Взаимодействие лигандов с белками тесно связано с их ферментативной активностью. Поэтому неудивительно, что гидрофобный эффект может оказывать влияние и на кинетику ферментативного катализа. Изменение активного центра фермента может приводить к изменению его активности. Например, замена глицина на аминокислотные остатки с неполярными боковыми радикалами в

активном центре субтилизина приводит к увеличению (до 16 раз) его каталитической эффективности [15].

Рассмотренные процессы представляют собой примеры множества явлений, в которых общепринято выделять ключевую роль гидрофобного эффекта. Очевидно, что изменение свойств водных растворов и подавление гидрофобного эффекта должно влиять на эти процессы, что и представляет большой интерес.



## Глава 2. Подавление гидрофобного эффекта в присутствии органического соразтворителя

В предыдущей главе были кратко описаны явления и закономерности, ключевую роль в которых играет гидрофобный эффект.

Свойства смесей, получаемых при добавлении даже небольших количеств различных органических соединений к воде, могут сильно отличаться от свойств чистой воды. Значительный интерес представляют бинарные водно-органические растворители, которые состоят из воды и неограниченно смешивающихся с ней органических растворителей. Свойства таких смесей можно варьировать путем изменения концентраций соразтворителей. Использование водно-органических смесей позволяет добиться значительной растворимости как неполярных органических соединений, плохо растворимых в воде, так и неорганических солей, плохо растворимых в органическом компоненте смеси. Контроль сольватационных свойств смесей может открывать широкие возможности для их применения в качестве сред для проведения различных реакций и физико-химических процессов, в том числе в промышленном масштабе.

Настоящая глава посвящена результатам исследований сольватационных свойств водно-органических смесей и подавления гидрофобного эффекта при добавлении органических растворителей. Основное внимание будет уделено сольватации малополярных соединений в водно-органических смесях и вопросу стабильности нативной структуры белков в присутствии органических соразтворителей.

## 2.1 Сольватация малополярных соединений в водно-органических смесях

### 2.1.1 Растворимость, коэффициенты активности и энергии Гиббса сольватации малополярных соединений в водно-органических смесях

Добавление органического растворителя к воде приводит к увеличению растворимости малополярных соединений и снижению коэффициентов активности при предельном разбавлении, т.е. более низким величинам химических потенциалов малополярных соединений в этих смесях по сравнению с водой. Часто даже небольших добавок органического растворителя достаточно для существенного роста растворимости, например, алифатических и ароматических углеводородов, инертных газов (рисунок 2.1).

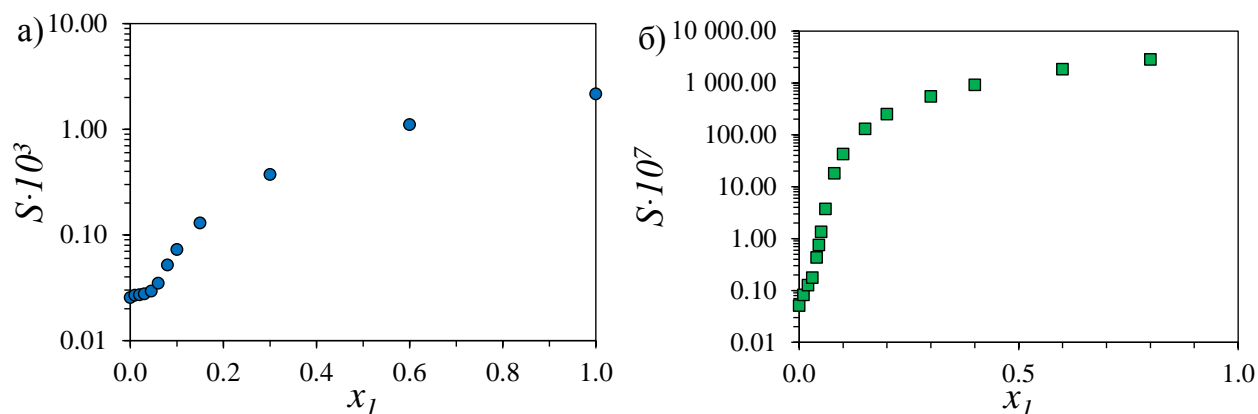


Рисунок 2.1. Зависимость растворимости (мольная доля) а) аргона [88] и б) антрацена [89] в смесях трет-бутанол-вода от мольной доли спирта.

В ряде работ были экспериментально определены величины растворимости инертных газов и метана в небольшом числе водно-органических смесей [88, 90–95]. Эти данные представляют большой интерес для верификации и параметризации моделей смешанных растворителей и растворов, используемых в расчетных методах. К сожалению, объем полученных данных по растворимости газов в водно-органических смесях не идет ни в какое сравнение с числом аналогичных измерений в чистых растворителях.

Кроме того, в литературе имеются данные по растворимости, коэффициентам распределения между неполярной фазой и смесью или коэффициентам активности при предельном разбавлении бензола, толуола, нафталина, антрацена и некоторых

других малополярных соединений в смесях воды с органическими растворителями [89, 96–103]. В частности, довольно большое количество экспериментальных значений по предельным коэффициентам активности бензола и его алкильных гомологов в серии водно-органических смесей были получены Карром и сотр. методом парофазного анализа [96].

Коэффициенты активности, растворимости или энергии Гиббса растворения алканов в водно-органических смесях были измерены для очень небольшого числа систем. В работе Абрахама и сотр. [104] приводятся энергии Гиббса переноса  $\Delta_r G$  неопентана из воды в смеси воды с метанолом, этанолом, 1,4-диоксаном и ацетоном. Объемная концентрация воды в этих смесях варьировалась от 10 до 90%. Абрахамом и сотр. были также рассчитаны  $\Delta_r G$  в смеси воды с диметилформамидом (5-50% об. % воды) и этиленгликолем (5-40% об. % воды) для н-гексана, н-гептана и н-октана из данных газохроматографического анализа.

Большое внимание уделено также изучению растворимости биологически активных соединений в смесях воды с различными органическими растворителями [105–115]. Целью этих исследований является не только поиск смесей, которые могли бы использоваться для солубилизации лекарственных средств, но и получение новых экспериментальных данных для создания, проверки и совершенствования моделей, предсказывающих растворимость соединений в водно-органических смесях [116]. Видимо, поэтому в некоторых работах в качестве органического компонента смешанного растворителя выступают токсичные вещества, которые не могут использоваться для солубилизации лекарств на практике, например, 1,4-диоксан и метанол [114, 115].

Вид зависимости растворимости от содержания органического соразтворителя определяется наличием полярных и неполярных фрагментов в молекуле растворенного вещества. Если вещество содержит большое количество гидроксильных и карбоксильных групп или имеет заряженные группы, то растворимость обычно уменьшается с увеличением доли органического соразтворителя. Это наблюдается, например, для сульфата оксфеницина (4-гидрокси-L-фенилглицина) в смесях воды с органическими соразтворителями

[117]. Для большинства же рассмотренных лекарственных соединений наблюдается обратная картина – растворимость растет с увеличением доли органического соразтворителя (рисунок 2.2).

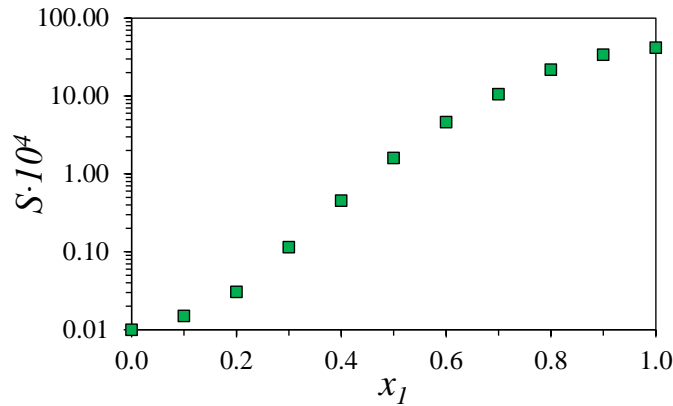


Рисунок 2.2. Зависимость растворимости индометацина в смесях этанол-вода от мольной доли спирта [118].

Для некоторых систем наблюдается выраженный максимум растворимости при определенной концентрации органического соразтворителя (рисунок 2.3). Например, для парацетамола [119], сульфаниламида [120] и оксалиновой кислоты [121] в смесях воды с этанолом максимум растворимости наблюдается при примерно 80%-ном по объему содержании органического компонента. Это означает, что растворимость в смеси с таким составом превышает не только растворимость в чистой воде, но и растворимость в чистом органическом растворителе.

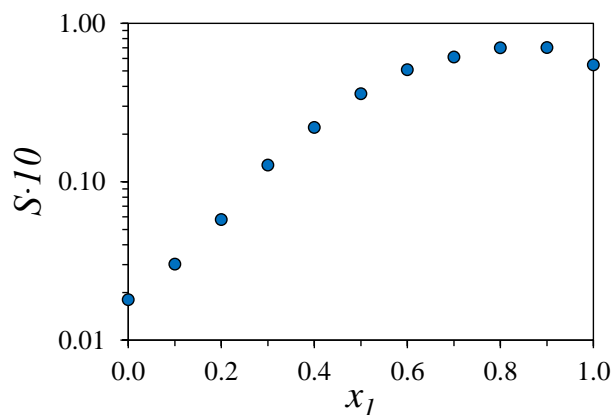


Рисунок 2.3. Зависимость растворимости парацетамола в смесях этанол-вода от мольной доли спирта [119].

Зависимости энергии Гиббса растворения и сольватации<sup>1</sup> малополярных соединений, рассчитанные из растворимости или коэффициентов активности при предельном разбавлении, от состава водно-органической смеси, как правило, являются нелинейными (рисунок 2.4).

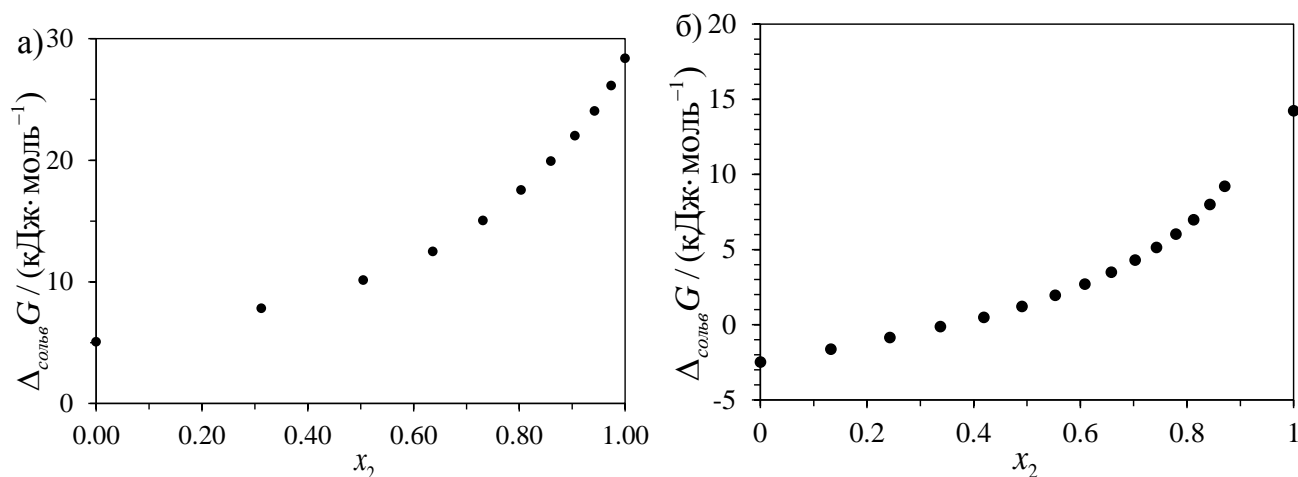


Рисунок 2.4. Зависимость энергии Гиббса сольватации а) неопентана в смесях ацетон-вода [104] и б) бензола в смесях ацетонитрил-вода [96] от мольной доли воды.

Для зависимостей энергии Гиббса сольватации неполярных соединений в водно-органических смесях можно отметить несколько закономерностей. Во-первых, значения энергий Гиббса сольватации в смесях лежат ниже прямой линии, соединяющей значения в чистых растворителях. Во-вторых, для серии гомологичных растворителей, например, для нормальных первичных спиртов, отклонения от этой прямой ( $\Delta\Delta_{\text{solv}} G$ ) увеличиваются при увеличении длины алкильного радикала растворителя (рисунок 2.5а). Отклонения  $\Delta\Delta_{\text{solv}} G$  также растут при увеличении длины алкильного радикала для серии гомологичных растворяемых веществ, например, для алкилбензолов (рисунок 2.5б).

<sup>1</sup> Далее будут обсуждаться только термодинамические функции сольватации. Закономерности, справедливые для термодинамических функций сольватации, справедливы также и для термодинамических функций растворения.

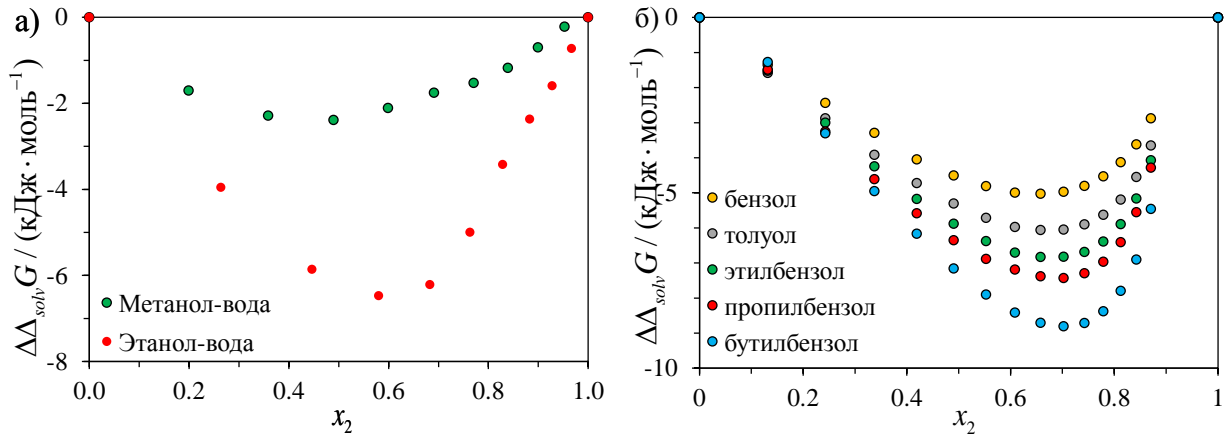


Рисунок 2.5. Отклонения  $\Delta\Delta_{solv}G$  для а) неопентана в смесях воды с метанолом и этанолом [104] и б) алкилбензолов в смесях ацетонитрил-вода [96].  $x_2$  – мольная доля воды.

Такое поведение энергий Гиббса сольватации может быть интерпретировано как влияние предпочтительной сольватации растворенного вещества органическим соразтворителем [122]. При случайном распределении молекул растворителя в растворе можно было бы ожидать величин энергии Гиббса сольватации в смеси, лежащих на линии, соединяющей значения в чистых растворителях ( $\Delta_{solv}G^{\text{B смеси}} = \Delta_{solv}G^1 x_1 + \Delta_{solv}G^2 x_2$ ). В смешанном растворителе молекулы растворенного вещества могут быть преимущественно окружены молекулами одного из растворителя, и состав сольватной оболочки в таком случае будет отличаться от состава смеси.

#### 2.1.1.1 Предпочтительная сольватация

Предпочтительная сольватация наблюдается не только для тройных систем (растворитель 1 + растворитель 2 + растворенное вещество 3), но также и для бинарных смесей (растворитель 1 + растворитель 2). Как для двойных, так и для тройных систем в качестве количественной характеристики предпочтительной сольватации используют различие состава сольватной оболочки компонента и общего состава смеси. Для оценки предпочтительной сольватации могут быть использованы различные теоретические подходы, наиболее популярными из

которых являются метод обратных интегралов Кирквуда-Баффа (КВИ) [123, 124] и квазирешеточная квазихимическая модель (QLQC) [125, 126].

В методе обратных интегралов Кирквуда-Баффа, предложенном Бен-Наимом [123, 124], расчет отличий состава сольватной оболочки растворенного вещества 3 и среднего состава растворителя  $\delta x_{1,3}$  производится согласно следующим уравнениям:

$$\delta x_{1,3} = x_{1,3}^L - x_1 = x_1 x_2 (G_{1,3} - G_{2,3}) / [x_1 G_{1,3} + x_2 G_{2,3} + V_{cor}], \quad (2.1)$$

$$G_{1,3} = RT\kappa_T - V_3 + x_2 V_2 D / Q, \quad (2.2)$$

$$G_{2,3} = RT\kappa_T - V_3 + x_1 V_1 D / Q, \quad (2.3)$$

$$V_{cor} = 2522,5 \left[ r_3 + 0,1363 \{ x_1^L V_1 + (1 - x_1^L) V_2 \}^{1/3} - 0,085 \right]^3, \quad (2.4)$$

$$D = d\Delta_i G^\infty(3,1 \rightarrow 1+2) / dx_2, \quad (2.5)$$

$$Q = RT + x_1 x_2 d^2 G_{1,2}^E / dx_2^2. \quad (2.6)$$

Здесь  $x_{1,3}^L$  и  $x_1$  – локальная (в сольватной оболочке вещества 3) и средняя молярные доли растворителя 1, соответственно,  $G_{1,3}$  и  $G_{2,3}$  – интегралы Кирквуда-Баффа (в  $\text{см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$ ),  $V_{cor}$  – корреляционный объем вокруг растворенного вещества 3, в пределах которого происходит предпочтительная сольватация.  $\kappa_T$  – изотермическая сжимаемость смеси (в  $\text{ГПа}^{-1}$ ),  $V_1$ ,  $V_2$  и  $V_3$  – парциальные молярные объемы растворителей 1 и 2 и растворенного вещества 3 (в  $\text{см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$ ),  $\Delta_i G^\infty(3,1 \rightarrow 1+2)$  – энергия Гиббса переноса вещества 3 из чистого растворителя 1 в смесь растворителей 1+2 в условиях предельного разбавления,  $G_{1,2}^E$  – избыточная молярная энергия Гиббса смешения компонентов растворителя. Используются два допущения: 1) сжимаемость для смеси рассчитывается по линейному уравнению  $\kappa_T = x_1 \kappa_{T1} + x_2 \kappa_{T2}$ ; 2) парциальные молярные объемы заменяются молярными объемами чистых веществ.

В методе QLQC, предложенном Маркусом [125, 126], разность между локальной молярной долей растворителя 1 вокруг растворенного вещества 3 и

средней мольной долей растворителя в растворе рассчитывается по следующим формулами:

$$\delta x_{1,3} = x_{1,3}^L - x_1 = \frac{1}{1 + (N_{22} / N_{11})^{1/2} \exp(\Delta E_{12,3} / 2RT)} - x_1 \quad (2.7)$$

$$\frac{N_{22}}{N_{11}} = \frac{x_2 - N_{12} / Z(N_1 + N_2)}{x_1 - N_{12} / Z(N_1 + N_2)} \quad (2.8)$$

$$\frac{N_{12}}{Z(N_1 + N_2)} = \frac{1 - \{1 - 4x_1x_2(1 - \exp(-\Delta E_{12} / RT))\}^{1/2}}{2(1 - \exp(-\Delta E_{12} / RT))} \quad (2.9)$$

$$\Delta E_{12,3} = \frac{\Delta_i G^\infty(3,2 \rightarrow 1)}{Z} \quad (2.10)$$

$$\exp\left(\frac{\Delta E_{12}}{RT}\right) = \left[ \left\{ 2 \exp\left(\frac{-G_{12,0.5}^E}{ZRT}\right) - 1 \right\} \right]^2 \quad (2.11)$$

В этих уравнениях  $N_i$  и  $N_{ij}$  – количество молекул компонента  $i$  в объеме раствора и количество ближайших соседей в квазирешетке молекул  $i$  и  $j$ ,  $\Delta E_{12}$  – молярная энергия взаимодействия молекул 1 и 2 на соседних узлах квазирешетки,  $\Delta E_{12,3}$  – разность молярных энергий взаимодействия растворенного вещества 3 с соседними молекулами растворителей 1 и 2,  $Z$  – параметр квазирешетки (обычно от 8 до 12). Исходными данными для расчета служат экспериментальная стандартная молярная энергия Гиббса переноса растворенного вещества 3 из чистого растворителя 2 в чистый растворитель 1 при температуре  $T$  в условия предельного разбавления ( $\Delta_i G^\infty(3,2 \rightarrow 1)$ ) и избыточная молярная энергия Гиббса смешения двух компонентов растворителя при эквимолярном составе также при температуре  $T$  ( $G_{12,0.5}^E$ ).

Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки. Метод ИКВИ позволяет рассчитывать состав сольватной оболочке в пределах корреляционного объема  $V_{cor}$  вокруг молекулы растворенного вещества. Основная проблема метода ИКВИ заключается в необходимости наличия точных экспериментальных значений функций  $G_{1,2}^E$  и  $\Delta_i G^\infty(3,1 \rightarrow 1+2)$  во всем диапазоне составов для точного расчета



производных. Другой проблемой является определение величины корреляционного объема  $V_{cor}$ , который сам зависит от локального состава сольватной оболочки и поэтому рассчитывается итерационно (уравнение 2.4).

Преимущество метода QLQC заключается в том, что для его использования требуется наличие точных экспериментальных значений функций  $G_{1,2}^E$  и  $\Delta_i G^\infty(3,1 \rightarrow 1+2)$  не для всех составов смеси, а только для  $x_2 = 0,5$  и  $1$ , соответственно. Это же является и недостатком метода, поскольку он не способен описывать предпочтительную сольватацию во всем диапазоне составов. Также в методе QLQC произвольно выбирается параметр  $Z$  квазирешетки, по узлам которой распределены молекулы растворенного вещества и компонентов растворителя. Учитываются энергии только парных взаимодействия на соседних узлах решетки, которые принимаются независимыми от других соседних молекул. Тем не менее, оба подхода, QLQC и ИКВИ, дают в целом согласующиеся результаты для предпочтительной сольватации  $\delta x_{1,3}$ , а различия могут заключаться в некоторых деталях вида кривой зависимости  $\delta x_{1,3}$  от состава.

Оба метода использовались для оценки предпочтительной сольватации различных соединений (как правило, лекарственных средств) в бинарных растворителях, в том числе в водно-органических смесях [127–132]. Например, согласно расчетам методами ИКВИ и QLQC, в случае растворов бензокаина в смесях этанол-вода и парацетамола, фенацетина и налидиксовой кислоты в смесях диоксан-вода во всем диапазоне составов наблюдается предпочтительная сольватация веществ органическим соразтворителем (рисунок 2.6) [128].

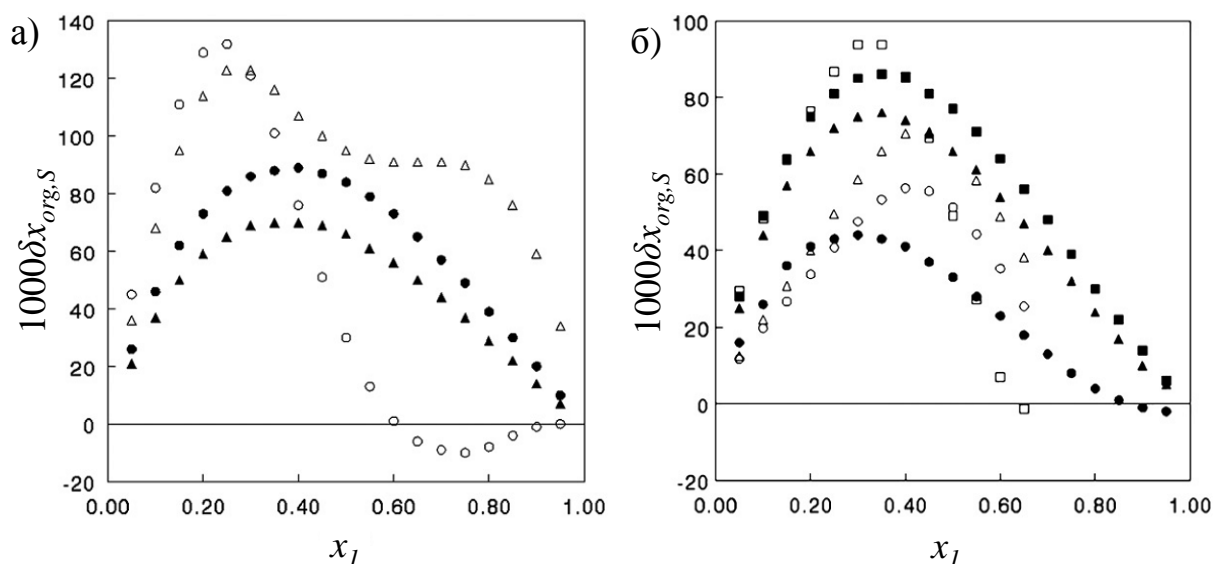


Рисунок 2.6. Предпочтительная сольватация растворенного вещества органическим растворителем  $\delta x_{org,S}$ , рассчитанная методами QLQC (закрашенные символы) и ИКВИ (незакрашенные символы): а) диазепам (кружки) и бензокаин (треугольники) в смесях этанол-вода; б) парацетамол (кружки), фенацетин (треугольники) и налидиксовая кислота (квадраты) в смесях диоксан-вода.  $x_1$  – мольная доля органического соразтворителя. Графики взяты из работы [128].

К сожалению, расчеты состава сольватной оболочки растворенного вещества методами ИКВИ и QLQC не сопоставлялись с результатами моделирования методом молекулярной динамики.

### 2.1.2 Энтальпии сольватации малополярных соединений в водно-органических смесях

Энтальпии растворения и сольватации определяют либо с помощью калориметрии растворения, либо по температурной зависимости энергии Гиббса растворения (растворимости, коэффициентов активности при предельном разбавлении). При определении энтальпий растворения малополярных соединений в водно-органических смесях существует та же проблема, что и при измерении растворимости и коэффициентов активности: низкая растворимость малополярных соединений в смесях с высокой концентрацией воды. Исследования зависимости

энтальпии растворения от состава смеси, как правило, проводились для полярных соединений, таких как спирты, фенол [133], ацетонитрил [134], аминокислоты [135], дипептиды [136], краун-эфиры [137], анилин [138, 139].

Большое количество экспериментальных данных по энтальпиям растворения различных, в том числе неполярных и малополярных, соединений в водно-органических смесях было получено сотрудниками Института химии растворов (г. Иваново). В работах Батова и Королева получены данные по энтальпиям растворения *n*-алканов в смесях воды со спиртами [140] и апротонными растворителями (1,4-диоксан, ацетон) [141, 142]. Результаты получены в диапазоне составов от 1 до 0,6 мольных долей апротонных растворителей и от 1 до 0,8 мольных долей спиртов. Проведенные авторами расчеты предсказывают максимумы для энтальпии растворения алканов в смесях воды со спиртами при мольной доле спирта в пределах 0,2-0,4, а в случае апротонных растворителей – незначительные максимумы при мольной доле органического соразтворителя 0,2-0,3 (рисунок 2.7). Однако экспериментальные данные по энтальпиям растворения для алканов в этих областях концентраций органического соразтворителя отсутствуют.

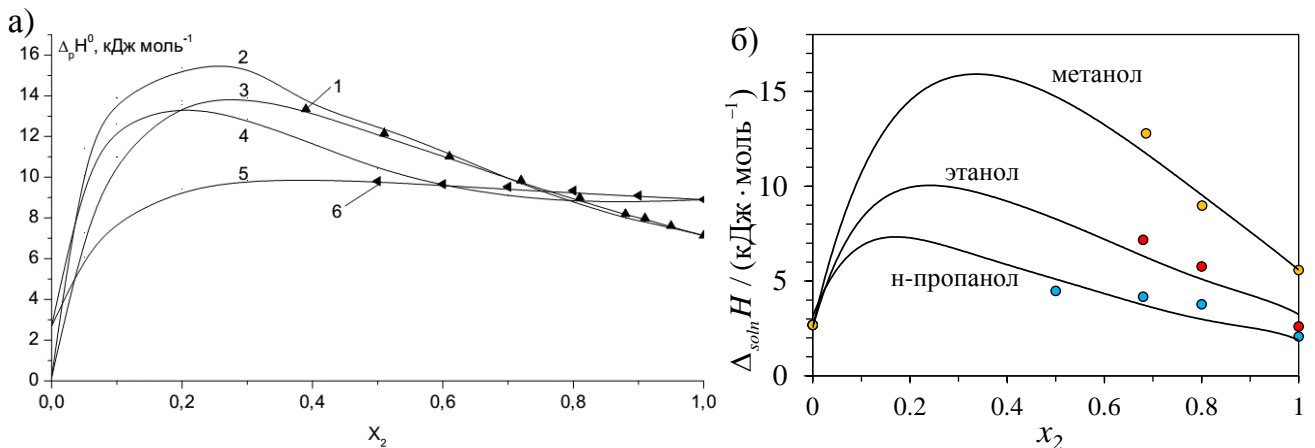


Рисунок 2.7. Зависимости экспериментальных (точки) и расчетных (линии) энтальпий растворения *n*-алканов от мольной доли органического соразтворителя при 298 К [143]. а) *n*-гексан (1) в смесях вода-ацетон и гептана (6) в смесях вода-диоксан; б) *n*-гептана в смесях воды со спиртами. Рисунок (а) взят из работы [143].

В другой работе Батова и сотр. были определены энтальпии растворения бензола в смесях воды с апротонными растворителями – диметилсульфоксидом, ацетоном, 1,4-диоксаном [144]. Авторами отмечено наличие эндотермического максимума при содержании органического соразтворителя около 10-20% по молям (рисунок 2.8), который они связывают со «структурной стабилизацией» раствора. Высота и положение максимума определяются природой органического соразтворителя. При увеличении в его молекуле числа гидрофобных групп, таких как  $\text{CH}_3$  и  $\text{CH}_2$ , как правило, увеличивается высота максимума и происходит его смещение в область с большим содержанием воды.

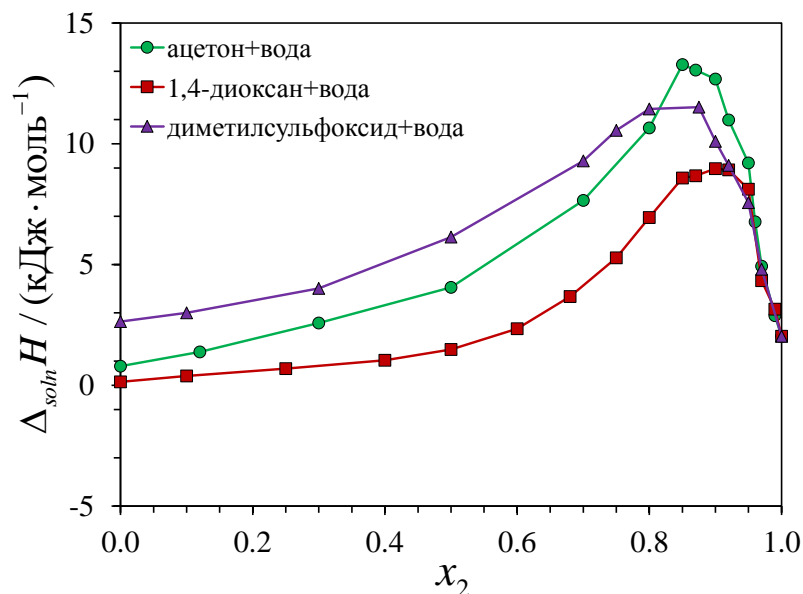


Рисунок 2.8. Зависимости энтальпии растворения бензола в смесях органический растворитель – вода от их состава при 298 К [144].  $x_2$  – мольная доля органического соразтворителя.

Для калориметрии растворения бензола в смесях воды с метанолом, изопропанолом и трет-бутанолом наблюдаются схожие тенденции [145–147]. С увеличением длины гидрофобного углеводородного радикала органического соразтворителя максимум зависимости энтальпии от состава смеси смещается в область более низких концентраций органического соразтворителя, а максимальное значение энтальпии растет (рисунок 2.9).

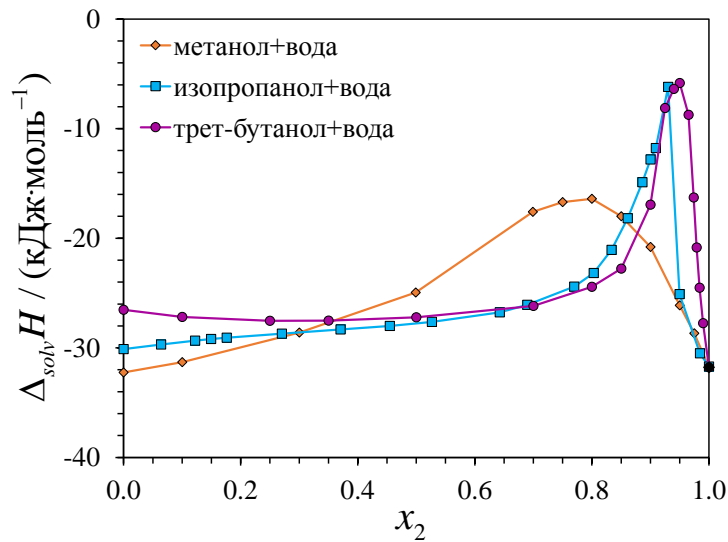


Рисунок 2.9. Зависимость энтальпии сольватации бензола в смесях спирт – вода от мольной доли воды при 298 К [145–147].

В работах [88, 140, 143, 148–150] изучались энтальпии растворения благородных газов (как прямым калориметрическим методом, так и по зависимости растворимости от температуры) в смесях воды с различными спиртами. Для ксенона и аргона в смесях воды с метанолом, этанолом, пропанолом, пропиленгликолем и трет-бутанолом наблюдается максимум в диапазоне концентраций спирта от 0,1 до 0,6 мольных долей (рисунок 2.10). При растворении ксенона в смеси воды с этиленгликолем максимума не наблюдается, а происходит плавное нелинейное уменьшение энтальпии сольватации при увеличении доли воды в смеси.

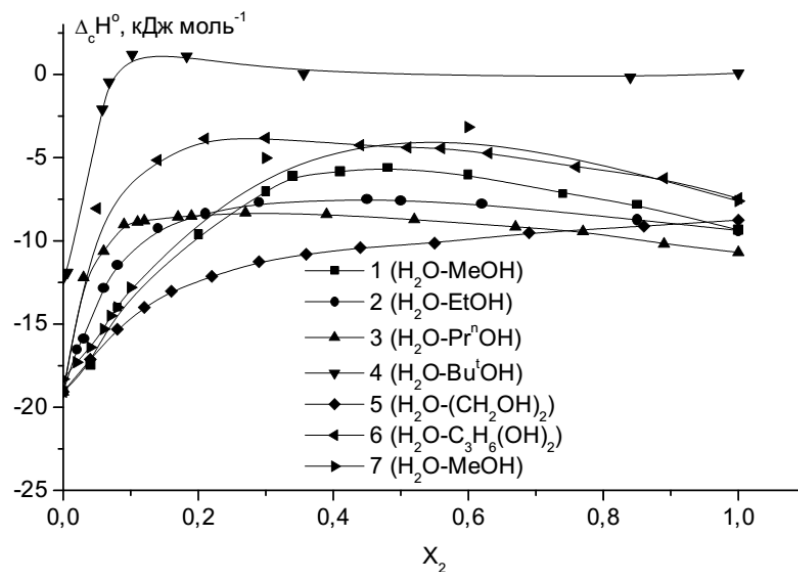


Рисунок 2.10. Зависимости энтальпии сольватации Хе и Аг (4) в смесях воды со спиртами от мольной доли спирта. 1-3, 5, 6 – термохимические данные; 4, 7 – рассчитано из растворимости. Рисунок взят из работы [143].

На основании полученных и проанализированных результатов Батовым был сделан вывод, что в случае алканов величина энтальпии растворения неполярного неэлектролита определяется величиной избыточной плотности энергии когезии смешанного водно-органического растворителя, рассчитанной в атермическом приближении [143]. Особенности зависимости энтальпии растворения бензола в водно-органических от состава связывали со способностью бензола к слабым специфическим взаимодействиям.

Энтальпия растворения в водно-органических смесях некоторых лекарственных веществ определена по температурной зависимости растворимости [115, 118, 151–154]. Недостатком метода является низкая точность, что нужно учитывать при интерпретации результатов. Вид зависимости энтальпии растворения от состава смеси зависит от количества гидрофобных и гидрофильных групп, а также от структуры молекулы органического соразтворителя. Для некоторых полярных соединений также наблюдается максимум в смесях, обогащенных водой [118, 151, 153–155] (рисунок 2.11).

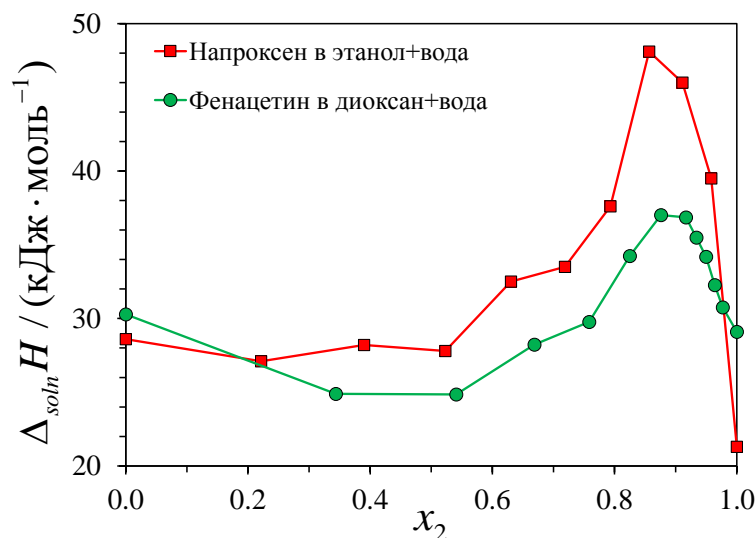


Рисунок 2.11. Зависимости энтальпии растворения напроксена в смеси этанол – вода [155] и фенацетина в смеси 1,4-диоксан – вода [151] при 298 К от мольной доли воды.

### 2.1.3 Теоретические исследования процесса сольватации неполярных соединений в водно-органических смесях с использованием молекулярного моделирования

Как уже было отмечено в разделе 1.3, результаты множества теоретических исследований водных растворов привели к выводу, что гидрофобный эффект связан со спецификой процесса образования полости в воде. Поэтому большой интерес представляет рассмотрение сольватации в водно-органических смесях и подавления гидрофобного эффекта при добавлении органического соразтворителя с использованием концепции образования полости в растворителе. Однако число теоретических исследований, посвященных сольватации в водно-органических смесях, в целом не очень велико, а концепция образования полости используется лишь в нескольких работах.

В работе Шаха и Робертса [156], используя методы молекулярной динамики и вставки тестовых частиц Видома, были рассчитаны энергии Гиббса сольватации метана ( $\Delta_{solv}G$ ) и твердой сферы ( $\Delta_{cav}G$ ) в смесях воды с метанолом. Их расчет показал, что при низких концентрациях спирта (мольная доля  $\approx 0,1$ ) имеется максимум для зависимостей  $\Delta_{solv}G$  и  $\Delta_{cav}G$  от состава смеси, после которого происходит монотонное снижение энергий Гиббса при увеличении концентрации спирта. Полученный результат отличается от экспериментальных зависимостей от состава энергий Гиббса сольватации аргона в смесях метанол-вода [104]: они не имеют максимума, и  $\Delta_{solv}G$  снижается во всем диапазоне составов при увеличении концентрации спирта. Расхождение с экспериментально полученными зависимостями может быть связано, например, с параметрами силового поля, использование которого плохо отражает свойства реальных смесей.

Раджамани и сотр., которые также использовали методы молекулярной динамики и вставки тестовых частиц Видома, было показано [157], что добавление этанола к воде приводит к снижению энергии Гиббса образования полости  $\Delta_{cav}G$ . Расчеты  $\Delta_{cav}G$  были проведены только для чистой воды и смесей вода-этанол с мольной долей спирта  $x_1$  0,2 и 0,4. Для смеси с мольной долей этанола 0,4 было также показано, что добавление спирта приводит к увеличению энтальпии и

энтропии образования полости. Зависимости термодинамических функции образования полости от состава не были получены.

Кроме исследований, в которых проводился расчет термодинамических функций образования полости, следует отметить серию работ ван дер Вегта и сотр. При рассмотрении процесса сольватации в водно-органических смесях они используют подход, основанный на работах Гийо и Гуссейни [158], Ю и Карплуса [159], который заменяет концепцию образования полости в растворителе до помещения в него растворенной молекулы концепцией реорганизации растворителя вокруг уже помещенной в него молекулы. В рамках этого подхода изменение внутренней энергии в ходе сольватации разделяется на две составляющие: вклад от взаимодействий растворенной молекулы с растворителем ( $f_{uv}$ ), который рассчитывается путем усреднения энергии по всем возможным положениям молекулы в ячейке с растворителем, и вклад реорганизации растворителя ( $f_{vv}$ ). Несмотря на некоторую схожесть, вклад реорганизации растворителя  $f_{vv}$  при вставке молекулы в общем случае не равен вкладу образования полости  $f_{cav}$ , определенному по методу Видома. Они будут совпадать только для сольватации твердой сферы. Термодинамические функции сольватации  $f_S^*$ , взаимодействия растворенного вещества с растворителем  $f_{uv}$  и реорганизации растворителя  $f_{vv}$  определяются следующими соотношениями [160]:

$$\Delta H_S^* = \Delta U_S^* + P\Delta V_S^* \approx \Delta U_S^*, \quad (2.12)$$

$$\Delta U_S^* = \Delta U_{uv}^* + \Delta U_{vv}^*, \quad (2.13)$$

$$\begin{aligned} \Delta U_S^* &= \langle U_{N+1} \rangle_{N+1PT} - \langle U_N \rangle_{NPT} = \langle U_N + B_S \rangle_{N+1PT} - \langle U_N \rangle_{NPT} = \\ &= \langle B_S \rangle_{N+1PT} + \left[ \langle U_N \rangle_{N+1PT} - \langle U_N \rangle_{NPT} \right]. \end{aligned} \quad (2.14)$$

Величина  $P\Delta V_S^*$  обычно на два порядка меньше  $\Delta U_S^*$ , и при дальнейших расчетах авторы пренебрегают ею. Здесь  $B_S$  – это потенциальная энергия взаимодействия растворенного вещества с растворителем, возникающая при вставке частицы  $S$  в произвольную точку мгновенной конфигурации растворителя



из  $N$  частиц, т.е.  $B_S = U_{N+1} - U_N \cdot \langle \dots \rangle_{N+1PT}$  среднее по изобарно-изотермическому ансамблю из  $(N + 1)$  частиц (растворитель и растворенное вещество), а  $\langle \dots \rangle_{NPT}$  – среднее по изобарно-изотермическому ансамблю из  $N$  частиц (только растворитель). Таким образом,

$$\Delta U_{uv}^* = \langle B_S \rangle_{N+1PT} = \frac{\langle B_S V e^{-B_S/RT} \rangle_{NPT}}{\langle V e^{-B_S/RT} \rangle_{NPT}}, \quad (2.15)$$

$$\Delta U_{vv}^* = \langle U_N \rangle_{N+1PT} - \langle U_N \rangle_{NPT} = \frac{\langle \delta U_N V e^{-B_S/RT} \rangle_{NPT}}{\langle V e^{-B_S/RT} \rangle_{NPT}}, \quad (2.16)$$

где  $\delta U_N = U_N - \langle U_N \rangle_{NPT}$ . Величина  $\Delta U_{vv}^*$ , в отличие от  $\Delta U_{uv}^*$ , не может быть достаточно точно рассчитана из МД-траектории и обычно определяется по разности рассчитанной из температурной зависимости  $\Delta G_S^*$  величины  $\Delta U_S^*$  и расчетного значения  $\Delta U_{uv}^*$ . Ю и Карплусом [159] величина энергии Гиббса сольватации  $\Delta G_S^*$  рассчитывалась согласно уравнению 2.17:

$$\Delta G_S^* = \Delta H_{uv}^* - T \Delta S_{uv}^* \simeq \Delta U_{uv}^* - T \Delta S_{uv}^*. \quad (2.17)$$

Вклад энергии реорганизации растворителя во внутреннюю энергию сольватации  $\Delta U_{vv}^*$  в рамках данного подхода компенсируется вкладом от энтропии реорганизации ( $\Delta S_{vv}^* = \Delta U_{vv}^* / T$ ).

В работах ван дер Вегта и сотр. был изучен процесс сольватации небольших неполярных соединений, в основном инертных газов и метана, в смесях воды с ацетоном, диметисульфоксидом и трет-бутанолом [160–162]. Для смесей воды с ацетоном и диметилсульфоксидом были рассмотрены зависимости энергии Гиббса сольватации, внутренней энергии и энтропии взаимодействия растворенного вещества с растворителем от состава растворителя (рисунки 2.12).

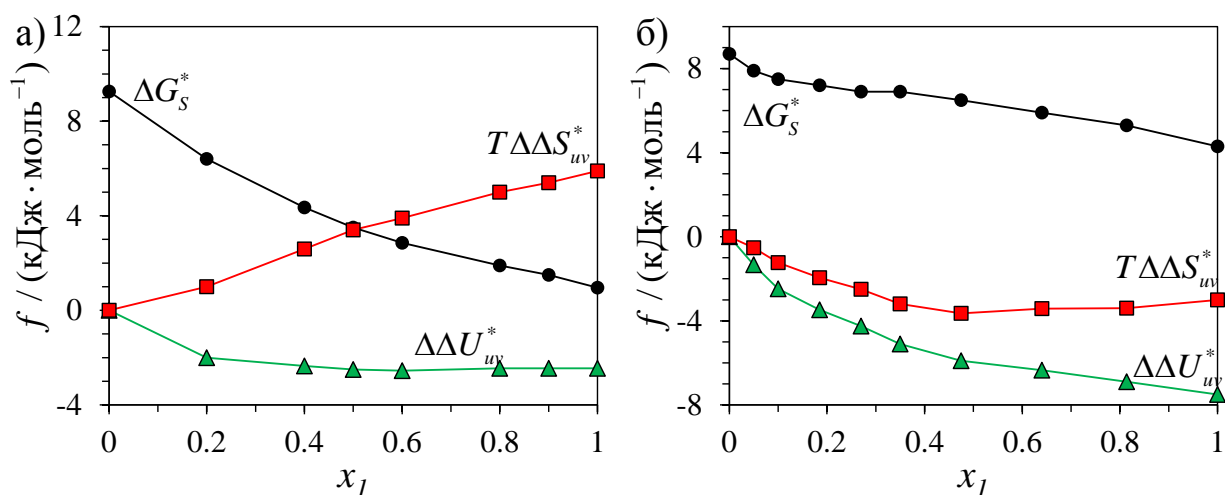


Рисунок 2.12. Энергии Гиббса сольватации  $\Delta G_S^*$  метана, внутренняя энергия  $\Delta\Delta U_{uv}^*$  и энтропия  $T\Delta\Delta S_{uv}^*$  взаимодействия (по отношению к чистой воде) в смесях воды с: а) ацетоном; б) диметилсульфоксидом [160].  $x_1$  – мольная доля органического соразтворителя. Значения приведены в молярной шкале.

Рассчитанные значения энергии Гиббса сольватации во всех случаях уменьшаются при увеличении концентрации органического соразтворителя. Однако поведение зависимостей термодинамических функций взаимодействия растворенного вещества с растворителем от состава отличаются в разных смесях. При увеличении концентрации ацетона наблюдается монотонный рост энтропии во всем диапазоне составов, а для внутренней энергии – небольшое уменьшение (в пределах  $2,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) до мольной доли ацетона 0,6. Для диметилсульфоксида наблюдается несколько иные зависимости: при увеличении концентрации органического соразтворителя внутренняя энергия взаимодействия уменьшается во всем диапазоне составов, а энтропия – уменьшается до мольной доли ДМСО 0,5.

Авторы трактуют такое различное поведение смесей с двумя органическими соразтворителями следующим образом. Ацетон, который слабо взаимодействует с водой по сравнению с самими молекулами воды, предпочтительно сольватирует гидрофобные растворенные вещества, повышая их растворимость. Этот процесс обусловлен сниженными энтропийными затратами на создание полостей молекулярного размера вблизи метильных фрагментов ацетона. Диметилсульфоксид сильно гидратирован, поэтому энтропийный вклад

препятствует введению гидрофобных растворенных веществ даже сильнее, чем в чистой воде. Однако за счет выигрыша в энергии при взаимодействии метильных групп диметилсульфоксида с гидрофобным растворенным веществом происходит снижение энергии Гиббса сольватации.

Наиболее интересный результат получился при расчете значений термодинамических функций сольватации метана в смесях воды с трет-бутанолом (рисунок 2.13) [162]. Для процесса сольватации метана в этой смеси также наблюдается монотонное повышение энергии Гиббса с ростом мольной доли воды, но для зависимости энтальпии сольватации от состава имеется максимум при низкой концентрации трет-бутанола (мольная доля  $\approx 0,1$ ), что согласуется с экспериментальными данными, полученными Вангом и сотр. [90]. Энтропия сольватации увеличивается до мольной доли органического соразтворителя 0,1-0,2, после чего остается примерно постоянной.

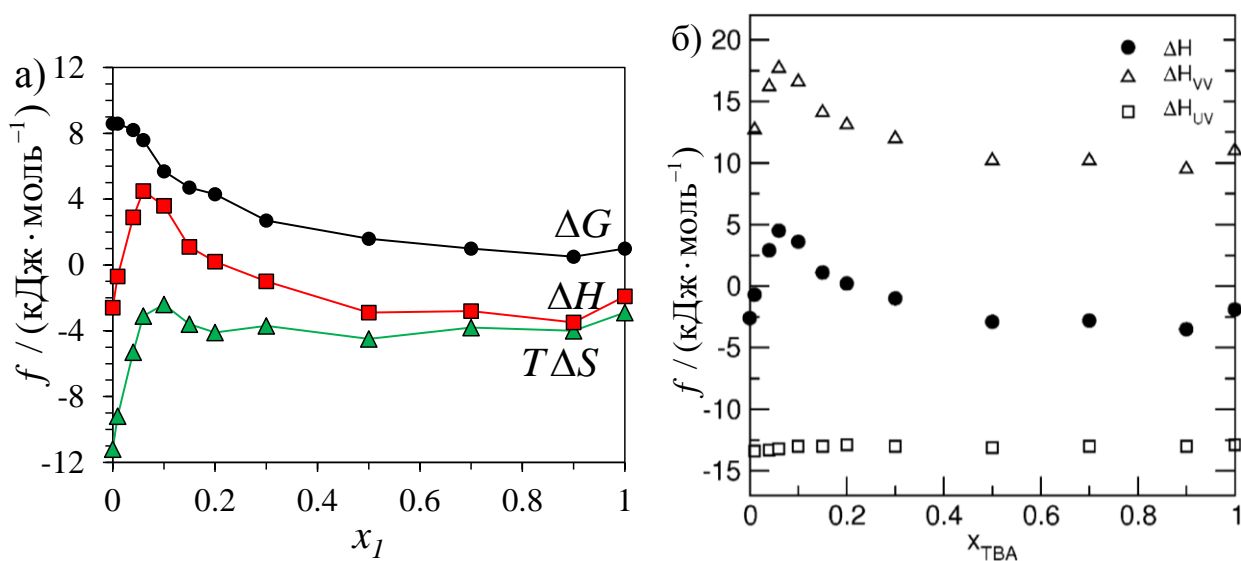


Рисунок 2.13. а) Энергии Гиббса  $\Delta G$ , энтальпии  $\Delta H$  и энтропии  $T\Delta S$  сольватации метана в смесях воды с трет-бутанолом и б) сравнении вкладов  $\Delta H_{uv}^*$  и  $\Delta H_{vv}^*$  в  $\Delta H$  энтальпию сольватации [162].  $x_1$  – мольная доля трет-бутанола. Значения приведены в молярной шкале. Рисунок (б) взят из работы [162].

По разности энтальпий сольватации и взаимодействия растворенного вещества с растворителем были найдены значения энтальпии реорганизации растворителя  $\Delta H_{vv}^*$  для сольватации метана. Оказалось, что вид концентрационной

зависимости энтальпии реорганизации растворителя полностью аналогичен таковому для энтальпии сольватации, т.е. присутствует характерный максимум в области низкой концентрации трет-бутанола (рисунок 2.13б). Авторы показали наличие предпочтительной сольватации метана гидратированными кластерами спирта при мольной доле трет-бутанола ниже 0,2. Наличие эндотермического максимума объясняется тем, что метан вытесняет молекулы воды из своей сольватной оболочки, вследствие чего значительная энергия затрачивается на реорганизацию растворителя.

На наш взгляд, использованный в работах ван дер Вегта подход Ю и Карплуса [159] не может заменить концепцию образования полости. Во-первых, для каждого растворенного вещества необходимо по отдельности проводить расчет вклада реорганизации растворителя, в то время как вклад образования полости в растворителе может быть описан как функция радиуса полости для сферических полостей, и эта функция не будет зависеть от природы вещества. Во-вторых, концепция образования полости широко применяется в континуальных моделях сольватации и не может быть заменена там концепцией реорганизации растворителя. Подход, использованный ван дер Вегтом и сотр., позволяет получить представление о вкладе реорганизации смешанного растворителя в процесс сольватации. Их результаты интересно было бы сравнить с результатами, полученными в рамках традиционной концепции образования полости.

Подводя итог, отметим, что в ранее проведенных исследованиях термодинамических функций образования полости в водно-органических смесях, во-первых, рассматривались только смеси воды с метанолом и этанолом. Для этих систем был изучен не весь диапазон концентраций спирта, а лишь несколько составов смесей. Во-вторых, в этих работах основное внимание уделено энергиям Гиббса образования полости и практически не рассматриваются энтропии и энтальпии. Таким образом, интерес представляет расчет термодинамических функций (энергии Гиббса, энтропии и энтальпии) образования полостей в смесях воды с различными органическими соразтворителями. Полученные результаты и закономерности могут быть использованы при теоретическом рассмотрении

сольватационных свойств водно-органических смесей. Кроме того, рассчитанные значения термодинамических функций образования полости в дальнейшем могут быть использованы в континуальных моделях сольватации.

## 2.2 Стабильность белков в водно-органических смесях

### 2.2.1 Влияние добавления органического растворителя на термическую стабильность белков

Как уже было сказано в разделе 1.5.2, гидрофобный эффект и гидрофобные взаимодействия играют ключевую роль в формировании нативной структуры белка. Добавление даже небольших количеств большинства смешивающихся с водой органических растворителей может приводить к значительному ослаблению гидрофобного эффекта и, как следствие, более низкой термостабильности белков в их присутствии по сравнению с растворами в чистой воде [163, 164]. Таким образом, большинство органических соразтворителей могут действовать как денатуранты. При достаточно высокой концентрации органического соразтворителя нативная структура белка может стать термодинамически невыгодной даже при комнатной температуре.

Исследования стабильности белков в различных условиях важны для биотехнологии. Добавление органических соразтворителей может способствовать увеличению растворимости низкополярных субстратов. Более того, реакции, катализируемые ферментами, часто проводят при достаточно высоких концентрациях органических субстратов, которые сами по себе могут влиять на стабильность фермента. Условия проведения реакции следует выбирать так, чтобы фермент оставался в каталитически активном состоянии.

Как правило, исследования влияния различных факторов на нативную структуру белков и ее стабильность проводятся с использованием модельных белков, которые обладают глобулярной третичной структурой и различными элементами вторичной структуры, относительно стабильны при комнатной температуре и, что немаловажно, являются доступными. Чаще всего модельным белком выступает лизоцим куриного яичного белка, также используются бычий и человеческий сывороточный альбумин, лактоглобулин, бычья рибонуклеаза А, химотрипсиноген А и др.

Для изучения термической стабильности белков могут быть использованы различные экспериментальные методы: дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), флуоресцентная спектроскопия и дифференциальная сканирующая флуориметрия, УФ- и ИК-спектроскопии, спектроскопия кругового дихроизма. Предложенная Приваловым и сотр. [165, 166] схема высокочувствительного дифференциального сканирующего калориметра (микрокалориметра) открыла широкие возможности для изучения термостабильности биологических объектов, в том числе белков. Преимуществами метода микрокалориметрии, благодаря которым он получил широкое распространение, являются крайне высокая чувствительность и, как следствие, сравнительно малое количество необходимого для анализа образца. Спектральные методы имеют ограничения, обусловленные поглощением некоторых растворителей в области сигнала спектра белка. Дифференциальная сканирующая калориметрия таких ограничений не имеет.

В ряде работ сравнивалось влияние различных органических соразтворителей на стабильность белков. Было изучено влияние алифатических спиртов на температуру денатурации лизоцима куриного яичного белка [167–170], бактериальной липазы [171], бычьей рибонуклеазы А [172] и химотрипсина А [172]. При одной и той же концентрации спирта увеличение длины алкильного радикала спирта приводит к значительному снижению температуры денатурации (рисунок 2.14а). Фуджита и сотр. [167] объясняли такое поведение связыванием молекул спирта с неполярными группами белка. Связывание спиртов с неполярными боковыми цепями белков приводит к ослаблению гидрофобного взаимодействия между ними, что благоприятствует денатурированному состоянию. Увеличение разветвленности алкильного радикала приводит к уменьшению дестабилизирующего эффекта (рисунок 2.14б) [167, 173].

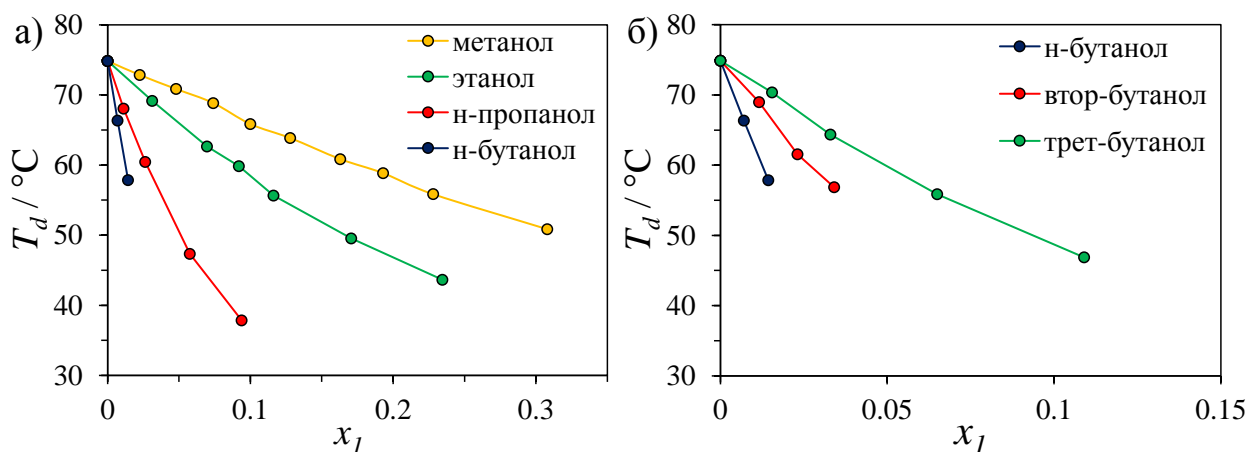


Рисунок 2.14. Зависимость температуры денатурации  $T_d$  лизоцима куриного яичного белка в смесях воды с различными спиртами от мольной доли спирта [167].

Добавление многоатомных спиртов к водным растворам белков, напротив, увеличивает их стабильность, что было показано для лизоцима [167] и рибонуклеазы А [169]. Увеличение числа гидроксильных групп приводит к большей стабилизации: этот эффект очень слабо выражен для этиленгликоля, но проявляется сильно для других многоатомных спиртов (рисунок 2.15). Герлсма и Стур предположили [169], что непосредственного энергетически выгодного взаимодействия между молекулами белка и многоатомного спирта нет. Это означает, что стабилизация белка возникает в основном за счет не прямых воздействий, а именно, усиления полярных взаимодействий за счет снижения диэлектрической проницаемости, увеличения энтальпии денатурации и/или усиления гидрофобных взаимодействий в белке из-за изменения структуры среды [167, 169].

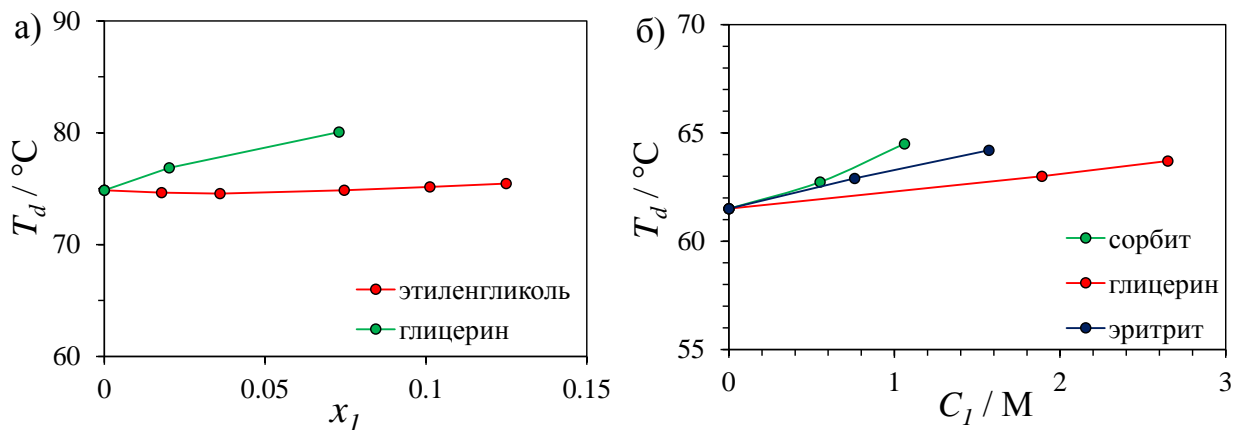




Рисунок 2.15. Температуры денатурации а) лизоцима куриного яичного белка [167] и б) рибонуклеазы А [169] в присутствии различных многоатомных спиртов.  $x_1$  и  $C_1$  – мольная доля и молярная концентрация спирта.

Аналогичное влияние длины алкильного радикала на термическую стабильность лизоцима было показано для гомологичных алкилсульфоксидов [174, 175]. Интересно, что несмотря на снижение термической стабильности, лизоцим сохраняет значительную часть своей каталитической активности (до 80-94 %) после выдерживания при 90 °С в течение 15 минут в присутствии 10-25% (по массе) диметил-, диэтил- или дипропилсульфоксида [174]. В тех же условиях в чистой воде сохраняется лишь 60% каталитической активности лизоцима. В присутствии диэтилсульфоксида сохраняется  $\geq 90\%$  каталитической активности при всех изученных концентрациях, что является наилучшим результатом среди рассмотренных гомологичных сульфоксидов.

В работах Фуджиты и сотр. [163] было рассмотрено влияние растворителей, принадлежащих к разным классам органических соединений, на денатурацию лизоцима. Температура денатурации при одинаковой концентрации органического соразтворителя снижается в ряду ацетон > диметилформаид > диметилацетаид > 1,4-диоксан (рисунок 2.16). Авторы считают, что помимо взаимодействия молекул растворителя с неполярными группами, дестабилизация лизоцима может быть связана с искажением структуры воды, что приводит к ослаблению гидрофобных взаимодействий белка и снижению стабильности его нативной структуры.

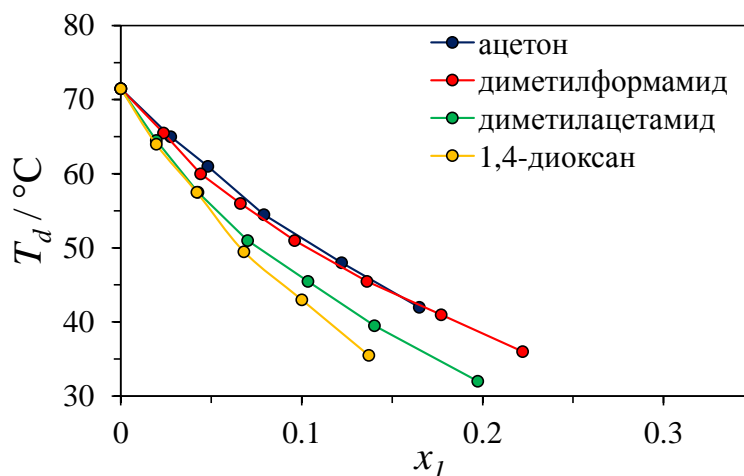


Рисунок 2.16. Температуры денатурации лизоцима куриного яичного белка в смесях воды с различными органическими соразтворителями [163].

Джейкобсон и Тёрнер на примере денатурации рибонуклеазы А показали [176], что 1,4-диоксан является более сильным денатурантом, чем диметилсульфоксид. Кроме того, в отличие от диметилсульфоксида, денатурация в смесях воды с 1,4-диоксаном протекает необратимо уже при мольной доле 1,4-диоксана 0,023 и частично обратимо лишь в смесях с крайне низкой концентрацией 1,4-диоксана, 0,005 мольных долей.

В отличие от приведенных ранее работ, Хамагучи и Сакай для изучения влияния органического соразтворителя на стабильность нативной структуры белка в своих исследованиях использовали не дифференциальную сканирующую калориметрию, а спектральный метод – измерение дисперсии оптического вращения [177]. Было показано, что при одной той же объемной концентрации органического соразтворителя температура, при которой происходят изменения нативной структуры лизоцима, уменьшается в ряду этиленгликоль > диметилсульфоксид > 1,4-диоксан.

В работе Мияваки и Тацуно [172] для анализа влияния различных спиртов на термическую стабильность лизоцима, рибонуклеазы А и химотрипсिनогена А также использовался спектральный метод, но измерялась оптическая плотность раствора. Были показаны те же закономерности, что и в других работах, а именно, снижение термической стабильности при увеличении длины и уменьшении разветвленности алкильного радикала спирта.

Мияваки и Тацуно также оценили величину параметра  $m$  для изученных спиртов. Этот параметр часто используется при изучении влияния концентрации различных веществ на стабильность белков при постоянной температуре путем измерения какой-либо физической величины, например, спектрального сигнала при определенной длине волны. Проведя нормировку сигнала в пределах значений для нативного исходного состояния белка и конечного состояния, соответствующего высокой концентрации денатурирующей добавки, можно

оценить доли нативной  $f_N$  и денатурированной  $f_U$  форм, из соотношения которых рассчитываются константа равновесия  $K_d(T, c)$  и энергия Гиббса  $\Delta_d G(T, c)$  денатурации при каждой концентрации добавки:

$$K_d(T, c) = \frac{f_N}{f_U}, \quad (2.18)$$

$$\Delta_d G(T, c) = -RT \ln K_d(T, c). \quad (2.19)$$

Гриин и Пасе [178, 179] предложили использовать линейную эмпирическую модель:

$$\Delta \Delta G = \Delta_d G(T, c) - \Delta_d G(T, 0) = -mc, \quad (2.20)$$

в которой параметр  $m$  показывает стабилизирующий/дестабилизирующий эффект добавки. При записи выражения в данной форме (с минусом перед  $m$ ) параметр  $m$  будет положительным для денатурантов (мочевина, хлорид гуанидиния) и отрицательным для веществ, стабилизирующих нативную структуру (N-оксид триметиламина, глицерин). Пример использования такой модели представлен на рисунке 2.17.

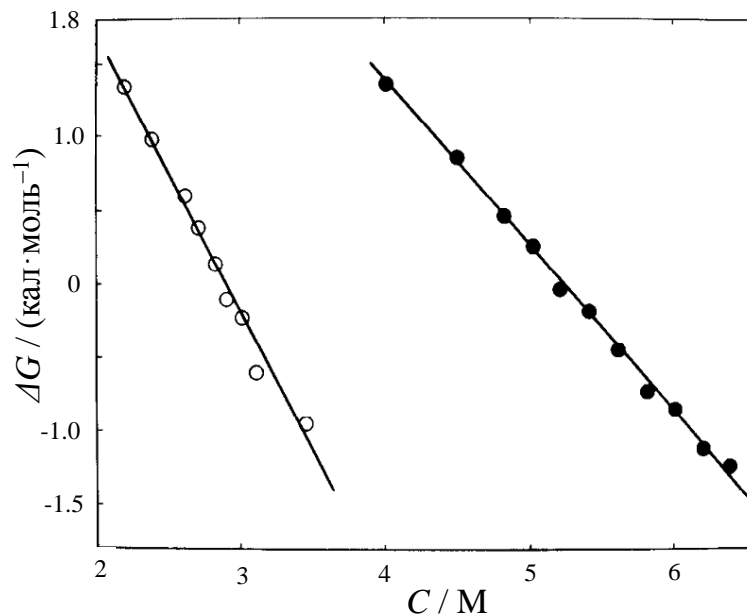


Рисунок 2.17. Зависимость энергии Гиббса денатурации лизоцима в присутствии мочевины (закрашенные кружки) и гуанидиния хлорида (пустые кружки) от молярной концентрации добавки [178]. Оригинал рисунка взят из работы [178].

Параметр  $m$  определен для мочевины и хлорида гуанидиния для различных белков [178–181], но, за исключением работы Мияваки и Тацуно [172], для органических растворителей данный параметр не определялся.

Внимания заслуживает работа Хмельницкого и сотр. [182], использовавшие альтернативный подход для определения «денатурирующей способности» растворителей и их ранжирования. В своей работе они связывали «денатурирующую способность» растворителя с их способностью инактивировать ферменты. Исследования были проведены для  $\alpha$ -химотрипсина, лакказы, химотрипсиногена, цитохрома с, трипсина и миоглобина. Интересно, что этот параметр не всегда коррелирует со сдвигом температуры денатурации белка, вызванным соразтворителем. Например, оказалось, что этот параметр выше для глицерина, как известно, увеличивающего термостабильность белков [169, 183, 184], чем для формамида, который снижает температуру их денатурации в водном растворе [185]. Следует отметить, что снижение ферментативной активности может быть вызвано не только денатурацией белка-фермента, но также за счет сольватации активного центра и/или субстрата.

Таким образом, несмотря на проведенные ранее сравнения температур денатурации белков в отдельных растворителях и установление определенных закономерностей, не было предложено общей шкалы растворителей по их денатурирующей способности, влиянию на термическую стабильность белков. Сравнение результатов по температурам денатурации белков в присутствии органических соразтворителей, полученных разными авторами, осложняется различиями в условиях проведения экспериментов (рН, наличие или отсутствие буфера, ионная сила, природа и источник белка, концентрация белка, метод и методика эксперимента). Шкала растворителей по их способности снижать стабильность нативной структуры белков может быть полезна при выборе среды при проведении ферментативных реакций. Интерес представляет также сравнение денатурирующей способности растворителей и сольватационных свойств их смесей с водой.

## 2.2.2 Теоретические исследования разрушения нативной структуры белков

Для изучения процесса разрушения или стабилизации нативной структуры белков под действием различных факторов широко используется метод молекулярной динамики (МД). МД позволяет получить представление о возможном молекулярном механизме разворачивания белка и влиянии на него денатурирующих агентов. Недостатком метода является то, что для полноатомного моделирования денатурации в явно заданном растворителе при экспериментальных температурах денатурации требуются очень длинные траектории и большие вычислительные мощности. Выходом может являться проведение моделирования при более высоких температурах, порядка 400-500 К, использование методов ускоренного сэмпинга, отказ от явного задания растворителя. Высокая температура при моделировании может существенно сказаться на результатах, тем не менее, такой подход активно используется и позволяет воспроизводить некоторые явления, наблюдаемые экспериментально [186–188]. Необходимо отметить, что сравнивать результаты молекулярного моделирования наиболее корректно при одних и тех же параметрах симуляций (силовое поле, условия, ограничения, модели белка и растворителей). Работы по моделированию белков в водно-органических средах очень малочисленны. Следует отметить, что для проведения расчетов модель органического растворителя должна быть тщательно параметризована, чтобы обеспечить хорошее согласие с экспериментальными свойствами его смесей с водой.

В работе Роя и сотр. [189] было проведено молекулярно-динамическое моделирование лизоцима при 300 К в смесях, содержащих от 0 до 40 мольных процентов диметилсульфоксида. Авторы делали заключение о влиянии диметилсульфоксида на процесс разрушения нативной структуры лизоцима по незначительному изменению (до  $3\text{Å}$ ) среднеквадратичного отклонения  $\alpha$ -углеродов пептидной цепи ( $C\alpha$ -RMSD) для симуляций длиной 100 нс. Существенных изменений в структуре белков при таких температуре и длине

траектории не происходит. Непосредственно процесс разворачивания при такой температуре авторами не наблюдался.

На примере сворачивания коротких олигопептидов, используя метод REMD, было показано [190], что добавление метанола приводит к снижению барьера энергии Гиббса сворачивания. Метанол способствует образованию как  $\alpha$ -спиралей, так и  $\beta$ -шпилек. Похожий результат был показан в работе Шао и сотр. [191] для модельного олигопептида BBA5 (PDB: 1T8J) в смесях воды с метанолом, трифторэтанолом, этиленгликолем и глицерином с объемной концентрацией спирта 30-40%. Метанол и трифторэтанол нарушают гидрофобные взаимодействия и в целом дестабилизируют структуру полипептида. Этиленгликоль и глицерин, наоборот, стабилизируют сборку  $\alpha$ - и  $\beta$ -доменов. В то же время при добавлении всех спиртов увеличивается количество водородных связей в основной цепи олигопептида, что, по мнению авторов, свидетельствует об увеличении стабильности элементов вторичной структуры в присутствии изученных спиртов.

В работе Саркара и сотр. [192] влияние этанола на структуру лизоцима было изучено методом молекулярной динамики В моделировании, используя метод зонтичной выборки, были получены профили свободной энергии от радиуса инерции ( $R_g$ ). Анализ результатов молекулярной динамики показал, что изменение среднего размера молекулы лизоцима в смесях воды с этанолом имеет немонотонный характер. При добавлении небольшого количества этанола ( $x = 0,07$ ) размер молекулы сначала увеличивается, а затем снова уменьшается (при  $x = 0,2$ ), становясь почти аналогичным размеру нативной структуры. Дальнейшее увеличение концентрации этанола приводит к разворачиванию (при  $x = 0,5$ ) и последующему рефолдингу (при  $x = 0,7$ ). Дестабилизацию структуры лизоцима авторы объясняют предпочтительной сольватацией гидрофобного ядра лизоцима этанолом, а рефолдинг при высокой концентрации спирта – агрегацией этанола и уменьшением его влияния на белок. Полученный результат был сопоставлен с данными спектроскопии кругового дихроизма в смесях при 25°C. Наблюдается схожая с моделированием тенденция. Сигнал вторичной структуры изменяется немонотонно при варьировании состава растворителя: по мере увеличения

концентрации этанола уменьшение сигнала сменяется его ростом и последующем резким падением до нуля.

Метод молекулярной динамики позволяет рассмотреть процесс разрушения нативной структуры белка на молекулярном уровне и лучше понять процессы, происходящие при разворачивании белковых молекул. Большой интерес представляет анализ возможного влияния органического соразтворителя на механизм разрушения нативной структуры и сопоставление результатов эксперимента и моделирования.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

## Глава 3. Объекты и методы исследования

## 3.1 Объекты исследования

Были исследованы свойства растворов белков и термодинамические функции сольватации неполярных соединений при 298 К в водно-органических бинарных смесях. В качестве вторых компонентов смесей использовались неограниченно смешивающиеся с водой органические растворители. Растворяемыми веществами в экспериментах по определению термодинамических функций растворения и сольватации являлись бензол, октан и толуол. Все растворяемые вещества и растворители, использованные в работе, представляли собой коммерческие продукты с чистотой не менее 99%. Несмотря на это, реактивы дополнительно проверялись на наличие примесей с помощью газохроматографического анализа. Содержание воды определялось с помощью титрования по Карлу Фишеру с использованием автоматического титратора. При необходимости проводилась дополнительная очистка реактивов по стандартным методиками [193].

Диализированный лиофилизированный лизоцим из куриного яичного белка (HEWL, Sigma Aldrich) использовался без предварительной очистки. Все эксперименты с белком были проведены с использованием деионизированной воды.

### 3.2 Определение энергий Гиббса растворения и сольватации методом газохроматографического анализа равновесного пара

Энергии Гиббса растворения определялись из экспериментальных данных по коэффициентам активности при предельном разбавлении:

$$\Delta_{soln} G^{A/S} = RT \ln \gamma^{\infty}. \quad (3.1)$$

Коэффициенты активности были определены с помощью газохроматографического анализа равновесного пара над раствором. В эксперименте с помощью шприца отбирается небольшая проба пара над раствором.



После этого проба с потоком газа-носителя, который проходит через линию инъекции, переносится и разделяется на газохроматографической колонке и анализируется на детекторе. При одинаковых условиях проведения эксперимента с различными растворами одного и того же вещества площадь пика этого вещества на хроматограмме  $S$  будет пропорциональна давлению пара вещества над раствором  $p$ . Используя это и зная концентрацию растворенного вещества, можно рассчитать коэффициент активности вещества в растворе с помощью закона Рауля:

$$p^A = p_{sat}^A x_A^{A/S} \gamma^{A/S} \Rightarrow \gamma^{A/S} = \frac{p^A}{p_{sat}^A x_A^{A/S}} = \frac{S}{S_0 x_A^{A/S}}. \quad (3.2)$$

В этом уравнении  $S_0$  и  $S$  – площади пиков на хроматограмме, получаемые при анализе пара над чистым веществом  $A$  и раствором вещества  $A$  в растворителе  $S$ ,  $x_A^{A/S}$  – мольная доля вещества  $A$  в растворе,  $p_{sat}^A$  – давление насыщенного пара вещества  $A$ .

В случае веществ, обладающих высокой летучестью, необходимо вводить поправку для концентрации растворенного вещества  $A$ , которая позволяет учесть количество испарившегося вещества:

$$x^{A/S} = x_0 - \frac{Sp_{sat}^A V_{free}}{S_0 RT v}, \quad (3.3)$$

где  $V_{free}$  – объем свободного пространства над раствором,  $v$  – суммарное количество молей компонентов раствора (растворенное вещество+растворитель).

Эксперименты были проведены на газовом хроматографе PerkinElmer Clarus 580, совмещенном с приставкой для парофазного анализа TurboMatrix HS-16.

Для определения коэффициентов активности в виалы объемом 22 мл помещалось 5 или 10 мл растворителя или чистого вещества. В случае определения коэффициентов активности в водно-органических смесях каждый компонент смеси добавлялся дозатором по отдельности. Далее в растворитель с помощью микрошприца вводилось от 2 до 50 мкл растворяемого вещества в зависимости от его растворимости. После этого виала герметизировалась с помощью одноразовых крышек с тефлоновой прокладкой (септой). Виалы с раствором выдерживались на шейкеры в течение 30 минут.

Виалы с приготовленными растворами помещались в автосэмплер приставки для парофазного анализа. Каждый раствор термостатировался в течение 5 минут, после чего тефлоновая септа прокалывалась нагретой до 100°C полый иглой и под избыточным давлением 1,5 атм подавался газ-носитель (азот). После этого виала термостатировалась еще 10 минут (всего суммарно 15 минут). Дозирование паровой фазы осуществляется при открытии клапана в течение 0,03 минуты за счет разности давления в виале (2,5 атм) и инжекторе приставки (1 атм). Отобранная проба направляется газом-носителем через нагреваемую до 110°C трансфер-линию в капиллярную колонку хроматографа. Во всех экспериментах использовалась капиллярная колонка длиной 30 м с неполярной неподвижной фазой HP-5 из полидиметилсилоксана, содержащего 5% фенильных групп (производитель Macherey-Nagel). После разделения на колонке компоненты пробы анализировались на пламенно-ионизационном детекторе. Измерение площади пиков на полученных хроматограммах проводилось в программе TotalChrom (PerkinElmer).

Для каждой системы растворитель-растворенное вещество эксперимент проводился 4 раза с разными концентрациями растворенного вещества. Во всех экспериментах мольная доля растворенного вещества не превышала 0,005. Для всех изученных пар растворитель-растворенное вещество в пределах этой мольной доли результат эксперимента не зависел от концентрации растворенного вещества, что означает достижение условия предельного разбавления. Значения полученных коэффициентов активности усреднялись и использовались для расчета энергии Гиббса растворения по формуле 3.1. Из полученных значения энергий Гиббса растворения и величин энергий Гиббса испарения были рассчитаны энергии Гиббса сольватации по формуле:

$$\Delta_{solv}G^{A/S} = \Delta_{soln}G^{A/S} - \Delta_{vap}G^A. \quad (3.4)$$

Энергии Гиббса испарения рассчитывались из литературных данных по давлению насыщенного пара чистого вещества  $p_{sat}^A$  при 298,15 К [194] по формуле:

$$\Delta_{vap}G^A = -RT \ln p_{sat}^A. \quad (3.5)$$

### 3.3 Определение энтальпий растворения и сольватации методом калориметрии растворения

Для измерения энтальпий растворения использовался прецизионный калориметр ТАМ III от TA Instruments. Калориметр состоит из термостата, измерительной ячейки и блока управления. Термостат позволяет поддерживать заданную температуру в течение 24 часов со стабильностью  $\pm 100$  мК, что дает возможность изучать медленно протекающие процессы растворения. Измерительная ячейка объемом 25 или 100 мл оснащена нагревателем, терморезистором, мешалкой из инертного материала. Подача растворяемого жидкого вещества производилась через 90-сантиметровый металлический капилляр (канюля), один конец которого вставлялся в ячейку через специальный выход и опускался в растворитель. Другой конец капилляра был соединен с помещенным в автоматический дозатор микрошприцом на 100 или 250 мкл. Использование микрошприца и автоматического дозатора позволяет дозировать растворяемое вещество с точностью до 0,01 мкл. Объем порции растворяемого вещества составлял от 6 до 10 мкл. Всего производилось 6-12 инъекций.

Для каждой системы растворитель-растворяемое вещество эксперимент проводился минимум два раза с новыми порциями растворителя. Перед началом эксперимента температура растворителя в ячейке доводилась примерно до 24,9 °С. Каждый эксперимент включал в себя уравнивание и запись базовой линии в течение 180-240 минут, две калибровки до растворения вещества, 6-12 инъекций растворяемого вещества с 5-15-минутными базовыми линиями после каждого ввода и две калибровки после эксперимента по растворению. Последовательность действий задавалась в программе SolCal (TA Instruments). Обработка полученных калориметрических кривых также проводилась в программе SolCal. Из полученных значений тепловых эффектов растворения были рассчитаны энтальпии растворения веществ по формуле:

$$\Delta_{soln} H^{A/S} = \frac{q^{A/S} V_m^A}{V^A}, \quad (3.6)$$

где  $q^{A/S}$  – тепловой эффект растворения пробы вещества  $A$  в растворителе  $S$ ,  $V^A$  – объем пробы вещества  $A$ ,  $V_m^A$  – мольный объем вещества  $A$ .

Для летучих и малорастворимых растворяемых веществ вводилась поправка на испарение вещества в свободное пространство ячейки. Доля испарившегося вещества рассчитывалась по формуле:

$$\varphi = \frac{1}{1 + RTv_s / (p_{sat}^A \gamma_{\infty}^{A/S} V_{free})}, \quad (3.7)$$

где  $V_{free}$  – объем свободного пространства внутри ячейки соответственно,  $v_s$  – количество растворителя в ячейке в молях. Величина поправки при растворении в смесях, как правило, не превышает  $0,2 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$  и лишь для смесей, обогащенных водой, достигает  $0,7 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ . С учетом этой поправки и известной величины энтальпии испарения  $\Delta_{vap} H^A$  можно найти энтальпию растворения:

$$\Delta_{soln} H^{A/S} = \frac{\Delta_{exp} H - \varphi \Delta_{vap} H^A}{(1 - \varphi)}. \quad (3.8)$$

Энтальпия сольватации рассчитывалась из полученных значений энтальпий растворения и известных значений энтальпий испарения при  $298,15 \text{ К}$  [195] по формуле:

$$\Delta_{sov} H^{A/S} = \Delta_{soln} H^{A/S} - \Delta_{vap} H^A. \quad (3.9)$$

### 3.4 Расчет термодинамических функций образования полости в водно-органических смесях

Для расчета энергий Гиббса образования полости и сольватации одноатомных частиц использовался метод вставки пробных частиц Видома [196]. В этом методе выполняется большое количество вставок частиц с известным потенциалом взаимодействия с каждым из атомов растворителя в случайные точки пространства внутри ячейки с растворителем. Для вставок используются мгновенные конфигурации из моделирования молекулярной динамики,

отбираемые через определенные интервалы времени. Для нахождения избыточного по сравнению с идеальной газовой фазой химического потенциала  $\Delta\mu$  проводится усреднение по всем вставкам во все конфигурации. В случае  $NPT$ -ансамбля формула для расчета имеет вид:

$$\Delta\mu = -RT \ln \left( \frac{\langle V e^{-\Delta U/k_B T} \rangle}{\langle V \rangle} \right), \quad (3.10)$$

где  $\Delta U$  – изменение потенциальной энергии при каждой вставке частицы, вызванное ее взаимодействием с атомами растворителя,  $V$  – объем системы. Точность расчета возрастает с увеличением количества вставок и конфигураций.

Уравнение (3.10) также может быть использовано для расчета энергии Гиббса образования полости, если в ячейку растворителя производится вставка твердой сферы. Эти твердые сферы должны иметь бесконечный потенциал взаимодействия с атомами растворителя, если расстояние между их центрами меньше определенного значения  $R$ . Если расстояние больше, чем значение  $R$ , то потенциал взаимодействия  $\Delta U$  равен нулю. Таким образом, если сфера перекрывается хотя бы с одним атомом растворителя, то величина  $e^{-\Delta U/k_B T}$  равна нулю, в противном случае – единице. В большинстве работ при вставке не учитывается взаимодействие с атомами водорода, и они считаются объединенными с соседним тяжелым атомом. Такой же подход использовался и в данной работе.

Расчеты методом молекулярной динамики были выполнены с помощью программы GROMACS 5.1. Во всех симуляциях использовалась модель воды SPC/E [197]. Для каждого соразтворителя из литературы были выбраны такие силовые поля, чтобы в симуляциях наилучшим образом воспроизводились экспериментальные свойства смесей с водой, в первую очередь их плотности, а также не происходило разделения растворителя на фазы. Список силовых полей представлен в таблице 3.1. Во всех случаях использовались стандартные для данного силового поля параметры связей, углов и двугранных углов. Сочетание использованных моделей воды и органических растворителей хорошо воспроизводит свойства смесей во всем диапазоне концентраций. Плотности смесей представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.1. Силовые поля, использованные для моделирования органических соразтворителей.

Органический соразтворитель	Силовое поле	Модель атомов*	Ссылка
Тетрагидрофуран	TraPPE	UA	[198]
Ацетон	KBFF	UA	[199]
Ацетонитрил	AMBER	AA	[200]
Диметилсульфоксид	OPLS	UA	[201]

\*UA – модель с объединенными с водородами псевдо-атомами углерода, отражающими взаимодействие группы атомов типа  $\text{CH}_n$ , AA – модель с явно заданными атомами водорода.

Таблица 3.2. Экспериментальные и полученные в молекулярно-динамических расчетах плотности водно-органических смесей при температуре 298,15 К.

$x_2$	Диметил-сульфоксид		Ацетон		Ацетонитрил		Тетрагидро-фуран	
	$\rho$ (MD), г/мл	$\rho$ (exp) [202], г/мл	$\rho$ (MD), г/мл	$\rho$ (exp) [203], г/мл	$\rho$ (MD), г/мл	$\rho$ (exp) [204], г/мл	$\rho$ (MD), г/мл	$\rho$ (exp) [205], г/мл
0,0	0,997	0,998						
0,1	1,038	1,042	0,963	0,957	0,957	0,991	0,980	0,978
0,2	1,060	1,072	0,931	0,925	0,919	0,983	0,963	0,959
0,3	1,074	1,088	0,905	0,898	0,890	0,967	0,947	0,943
0,4	1,083	1,095	0,884	0,874	0,865	0,936	0,933	0,929
0,5	1,088	1,097	0,866	0,853	0,844	0,912	0,921	0,918
0,6	1,090	1,096	0,850	0,835	0,827	0,890	0,910	0,908
0,7	1,092	1,095	0,837	0,820	0,812	0,866	0,901	0,899
0,8	1,092	1,096	0,827	0,807	0,799	0,843	0,894	0,893
0,9	1,093	1,096	0,817	0,795	0,788	0,819	0,888	0,887
1,0	1,095	1,096	0,810	0,785	0,779	0,796	0,884	0,883

Для каждого органического соразтворителя было подготовлено 10 кубических ячеек с периодическими граничными условиями с мольной долей воды  $x_2$  от 0 до 1 с шагом 0,1. В каждом моделировании 1000 молекул растворителя

(вода+органический соразтворитель) помещались в кубическую ячейку с периодическими граничными условиями. Радиус отсечения для ближних кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий составлял 1,0 нм. Для расчета энергии электростатических взаимодействий на больших расстояниях использовался метод Эвальда (PME). Длины связей с атомами водорода были зафиксированы с помощью алгоритма LINCS. Шаг интегрирования составлял 2 фс. Постоянная температура поддерживалась с помощью термостата с масштабируемыми скоростями (*v-rescale*), постоянное давление – баростатом Парринелло-Рахмана. Для каждого состава было проведено семь запусков при температурах от 283 до 313 К с шагом 5 К. При каждом запуске система сначала минимизировалась, уравнивалась в течение 200 пс при постоянном объеме и 2 нс при постоянном давлении 1 бар. Затем записывалась траектория длительностью 10 нс (давление 1 бар), которая использовалась для проведения расчета энергий Гиббса образования полости и сольватации одноатомных газов.

Расчеты энергий Гиббса образования полости и сольватации одноатомных газов на основе метода Видома были выполнены в программе GROMACS 5.1 [206]. Параметры невалентных взаимодействий для благородных газов были взяты из работы Гийо [158] (таблица 3.3). Для описания взаимодействия вставляемой твердой сферы с атомами растворителя при расчете энергии Гиббса образования полости использовались табулированные потенциалы, в которых прописывались значения потенциала взаимодействия (отталкивания) с атомами растворителя до радиуса  $R$  и нулевой потенциал больше этого радиуса. Значение потенциала задавалось настолько большим, чтобы дальнейшие его изменения не влияли на значение энергии Гиббса вставки частицы.

Таблица 3.3. Параметры потенциала Леннарда-Джонса для инертных газов.

Растворяемое вещество	$\sigma$ / нм	$\varepsilon$ / кДж·моль <sup>-1</sup>
Ne	0,3035	0,15431
Xe	0,3975	1,78502

Расчет энергии Гиббса сольватации проводился для неона и ксенона, а расчет энергии Гиббса образования полости – для твердых сфер радиусом 0,28 и 0,345 нм, соответствующих размеру полостей, необходимых для размещения в растворителе атомов неона и ксенона [207]. Вставка производилась  $10^5$  раз для каждой из 10000 конфигураций растворителя, записанных каждую 1 пс. Таким образом, всего производилось  $10^9$  вставок для каждой системы растворитель-вставляемая частица. Рассчитанные программой значения  $\Delta\mu$  в молярной шкале для сравнения с экспериментальными данными по сольватации были пересчитаны в мольно-долевую шкалу:

$$\Delta G = \Delta\mu + RT \ln(RT / p^\circ V_m). \quad (3.11)$$

Энтропии и энтальпии сольватации газов и образования полости были вычислены из температурной зависимости энергии Гиббса:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (3.12)$$

$$\Delta S = -\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial T}\right)_p, \quad (3.13)$$

$$\Delta H = T\Delta S + \Delta G. \quad (3.14)$$

На практике в небольшом температурном интервале рассчитанные значения энергии Гиббса сольватации или полости с хорошей точностью описываются линейной зависимостью от температуры  $\Delta G = a + cT$ . В этом случае наклон прямой равен  $-\Delta S$ , а свободный член равен  $\Delta H$ .

Рассчитанные значения энергий Гиббса сольватации для неона и ксенона в воде и в чистых органических растворителях хорошо согласуются с экспериментальными данными (таблица 3.4).



Таблица 3.4. Рассчитанные и экспериментальные значения энергий Гиббса сольватации (в кДж·моль<sup>-1</sup>) неона и ксенона в чистых растворителях при 298,15 К.

Растворитель	Ne		Xe	
	$\Delta_{sol}G^{MD}$	$\Delta_{sol}G^{exp}$	$\Delta_{sol}G^{MD}$	$\Delta_{sol}G^{exp}$
Ацетон	22,5	21,7 [208]	14,4	11,5 [208]
Ацетонитрил	24,6	–	15,4	14,1 [209]
Диметилсульфоксид	26,7	25,3 [208]	17,3	15,8 [208]
Тетрагидрофуран	22,4	22,7 [210]	13,6	10,9 [210]
Вода	29,6	29,1 [211]	26,2	23,3 [211]

### 3.5 Определение температуры и энтальпии денатурации лизоцима методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Температуры и энтальпии денатурации лизоцима из куриного яйца были определены с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Измерения проводились с использованием капиллярного дифференциального сканирующего калориметра TA Instruments NanoDSC. Измерительная ячейка (и ячейка сравнения) представляет собой проточную платиновую капиллярную кювету объемом 300 мкл. Данный прибор обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью базового сигнала. Воспроизводимость сигнала базовой линии при скорости сканирования 1 °С·мин<sup>-1</sup> составляет ±0,4 мкал·°С. Заполнение кювет осуществляется автосэмплером, который отбирает раствор с белком и раствор сравнения из термостатируемых луночных планшетов (4-10 °С).

Растворы белка готовили растворением навески лизоцима в необходимом количестве чистой воды или предварительно приготовленной смеси воды и органического соразтворителя определенного состава. Перед приготовлением смеси вода и органический соразтворитель дегазировались при пониженном давлении в течение 15 минут. Приготовленный раствор белка также дегазировался

в течение 5 минут. Дегазация необходима для предотвращения артефактов на ДСК-кривых, связанных с появлением и схлопыванием пузырей в капилляре калориметра. Во всех экспериментах использовалась деионизированная вода без буфера или иных добавок, чтобы избежать нежелательных эффектов при смешивании с органическим соразтворителем, таких как осаждение компонентов буфера или расслоение. Концентрация лизоцима составляла 2-5 мг·мл<sup>-1</sup>. Для всех изученных растворов лизоцима уменьшение концентрации с 5 до 0,5 мг·мл<sup>-1</sup> при той же скорости сканирования не меняет положения максимума пика, что было проверено в отдельном эксперименте. Таким образом, можно сравнивать калориметрические данные с результатами, полученными спектроскопическими методами при более низких концентрациях лизоцима. Концентрация водного раствора лизоцима была подтверждена путем измерения оптической плотности на длине волны 280 нм (коэффициент экстинкции лизоцима равен 2,65 мг·мл<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>).

ДСК-эксперименты для всех смесей органический соразтворитель-вода проводились при скоростях сканирования 0,5 и 2 К·мин<sup>-1</sup>. Для раствора белка в чистой воде эксперимент проводился при скоростях сканирования 0,1, 0,25, 0,5, 1 и 2 К·мин<sup>-1</sup>. В ходе ДСК-эксперимента раствор белка нагревался от 0 °С до 80-110 °С при повышенном давлении (3 бар), за исключением смесей с трет-бутанолом, для которых начальная температура составляла 5 °С, чтобы избежать кристаллизации [212]. Конечная температура при нагревании выбиралась исходя из температуры кипения растворителя. Полученные зависимости теплового потока от температуры (кривые ДСК) были переведены в зависимости молярной теплоемкости от температуры. При обработке полученных термограмм в программе NanoAnalyze (TA Instruments) были получены температуры максимумов пиков денатурации  $T_d$  и величины энтальпий денатурации лизоцима  $\Delta_d H$ , вычисленные интегрированием пика денатурации.

### 3.6 Изучение термической стабильности вторичной и третичной структуры лизоцима методом спектроскопии кругового дихроизма

Изменение вторичной и третичной структуры лизоцима при нагревании в присутствии органического растворителя было изучено методом спектроскопии кругового дихроизма (КД). Регистрация сигнала КД производилась с помощью спектрофотометра кругового дихроизма Jasco J-1500. Прибор оснащен кюветодержателем с Пельтье-нагревателем, датчиком для измерения температуры и магнитной мешалкой. Эксперимент проводился в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Скорость нагревания во время эксперимента составляла 0,5 К·мин<sup>-1</sup>. Стартовая температура составляла 10 °С. Однородность температуры внутри кюветы и отсутствие температурного запаздывания были подтверждены в отдельных экспериментах с внешними термодарами, помещенными в раствор. Конечная температура для каждого измерения определялась температурой кипения органического соразтворителя. Раствор лизоцима в водно-органической смеси для КД-эксперимента готовился смешением необходимых объемов органического соразтворителя, воды и водного раствора лизоцима.

Изменения третичной структуры белков проявляются в изменении спектров КД в ближнем УФ-диапазоне (250–310 нм). Для изучения изменений, происходящих с третичной структурой при нагревании в водно-органических смесях, проводилось измерение сигнала КД на длине волны 290 нм. Концентрация лизоцима при измерении сигнала КД в ближнем УФ-диапазоне составляла 0,5 мг·мл<sup>-1</sup>. Долю молекул лизоцима  $f_U$ , утративших нативную третичную структуру при различных температурах, можно рассчитать из измеренных значений сигнала КД по следующей формуле:

$$f_U = \frac{\theta - (\theta_N + m_N T)}{(\theta_U + m_U T) - (\theta_N + m_N T)}, \quad (3.15)$$

где  $\theta$  – это измеренное значение сигнала КД при температуре  $T$ , а  $(\theta_N + m_N T)$  и  $(\theta_U + m_U T)$  являются линейными аппроксимациями базовых линий для нативной и развернутой форм белка, соответственно.

Вторичная структура белков дает сигнал кругового дихроизма в дальней УФ-области (ниже 250 нм). Температурные изменения вторичной структуры отслеживались по сигналу КД при 222 нм. На этой длине волны сигнал КД в основном обусловлен  $\alpha$ -спиралями белка. Из-за высокой интенсивности сигнала концентрация лизоцима в этих экспериментах была значительно ниже ( $0,025 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ), чем в экспериментах в ближнем УФ.

### 3.7 Изучение термической стабильности лизоцима методом флуоресцентной спектроскопии

Лизоцим из куриного яйца имеет сигнал собственной флуоресценции, обусловленный присутствием в его пептидной цепи флуоресцирующих аминокислотных остатков. При разрушении нативной структуры сигнал флуоресценции изменяется из-за изменения окружения флуорофоров. Для изучения изменения сигнала собственной флуоресценции лизоцима при денатурации использовался флуоресцентный спектрофотометр Cary Eclipse (Agilent). Кюветодержатель спектрофотометра оснащен Пельтье-нагревателем, мешалкой и термопарой. Интенсивность флуоресценции раствора лизоцима при различных температурах измеряли после нескольких минут уравнивания. Однородность температуры внутри кюветы и отсутствие температурного запаздывания были подтверждены в отдельных экспериментах с внешними термопарами, помещенными в раствор. Длина волны возбуждения составляла 280 нм, интенсивность излучения измерялась в диапазоне 320-380 нм. Эксперимент проводили для растворов лизоцима в смесях вода-ДМСО с мольными долями ДМСО 0,25 и 0,30. Концентрация лизоцима в экспериментах составляла  $0,01 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ .

### 3.8 Определение кинетических параметров денатурации лизоцима методами остановленной струи и флуоресцентной спектроскопии

Для изучения кинетики разрушения нативной структуры лизоцима в смесях вода-диметилсульфоксид использовались приставка быстрого смешения SFA-20 (Hi-Tech Scientific) и флуоресцентный спектрофотометр Cary Eclipse (Agilent). Мертвое время приставки составляет 8 мс. В ходе эксперимента водный раствор лизоцима смешивался с водным раствором диметилсульфоксида необходимого состава. Перед смешиванием растворы термостатировались в капиллярах подачи с помощью водяной рубашки. После смешивания температура кюветы поддерживалась с помощью Пельтье-нагревателя кюветодержателя спектрофотометра. Смешивание раствора лизоцима и раствора ДМСО происходило в соотношении 1:20. Концентрация лизоцима в исходном водном растворе составляла  $0,21 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ , в растворе после смешивания –  $0,01 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  ( $7 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ ). Эксперимент проводился для смесей с мольной долей ДМСО 0,25, 0,30 и 0,35. Длина волны возбуждения составляла 280 нм, длина волны эмиссии – 345 нм. Эксперимент проводился в температурных интервалах, соответствующих температуре изменения третичной структуры по данным КД-спектроскопии. Для каждой температуры измерения проводились минимум три раза.

### 3.9 Молекулярно-динамическое моделирование разрушения нативной структуры лизоцима

Молекулярно-динамическое моделирование разрушения нативной структуры (анфолдинга) лизоцима в смесях вода-диметилсульфоксид проводилось в программе GROMACS 5.1 [206]. Для проведения расчетов использовалось силовое поле OPLS и модель воды SPC/E. Для диметилсульфоксида использовалась та же модель, что и для расчета термодинамических функций образования полости, а именно OPLS с объединенными атомами углерода и водорода [201]. В молекуле белка все атомы водорода были заданы в явном виде.

Во время моделирования все связи были зафиксированы с помощью алгоритма LINCS. Отсечка для короткодействующих электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий составляла 1,0 нм. Для расчета электростатических взаимодействий на больших расстояниях использовался метод Эвальда (PME). Постоянная температура поддерживалась с помощью термостата с масштабируемыми скоростями (*v-rescale*), постоянное давление – баростатом Парринелло-Рахмана.

В качестве исходной структуры лизоцима использовалась рентгеновская структура из Protein Data Bank (193L) [213]. Молекула белка была помещена вместе с 10000 молекул воды и 8 ионами  $\text{Cl}^-$  (для соблюдения условия электронейтральности) в кубическую ячейку с периодическими граничными условиями. Систему минимизировали и уравнивали при 298,15 К и давлении 1 бар сначала в течение 100 пс с ограничениями положения тяжелых атомов белка, затем в течение 1 нс без ограничений. Полученная структура белка была вырезана и использована в дальнейших моделированиях.

Процесс разворачивания лизоцима изучали в аналогичных периодических ячейках, содержащих в сумме 10000 молекул растворителя (как ДМСО, так и воды). Мольная доля ДМСО  $x_1$  варьировалась от 0 до 0,30 с шагом 0,05, от 0,30 до 0,60 с шагом 0,10 и от 0,60 до 1 с шагом 0,20. При 298,15 К или слегка более высокой температуре разворачивание идет медленно, и требуется огромное количество вычислительного времени, чтобы зафиксировать изменения в структуре белка. Поэтому в качестве альтернативы мы провели моделирование при 450 К для всех указанных концентраций ДМСО, используя в качестве начальной структуры нативное состояние. Кроме того, также были проведены моделирования для частично развернутой структуры при 400 К и  $x_1$  от 0 до 0,30 с шагом 0,05.

Температура в моделировании была выше температуры кипения воды SPC/E при давлении 1 бар (397 К [214]). Несмотря на то, что смеси, содержащие ДМСО, могут не кипеть при температуре моделирования и давлении 1 бар, их плотность уменьшается очень значительно по сравнению с таковой при 330-350 К. Альтернативой является сохранение плотности такой же, как при низкой

температуре при проведении моделирования при постоянном объеме (NVT), но в этом случае давление настолько велико, что может влиять на ход процесса разворачивания [215]. Наш подход предлагает компромисс между высоким давлением и низкой плотностью: каждая ячейка была минимизирована и нагрета до 400 К и уравновешена в течение 10 пс в NVT-ансамбле и 200 пс при постоянном давлении (NPT) 1 бар с фиксированным положением белка. Затем фиксировали объем ячейки, нагревали ее в NVT-ансамбле до 450 К (или оставляли при 400 К в экспериментах с частично развернутой структурой) и уравнивали при этой температуре в течение 1 нс. После этого ограничения положения белка были отключены, и проводилось моделирование в NVT-ансамбле. Повторные расчеты для одной и той же системы начинались с конфигурации, полученной после уравнивания в NPT-ансамбле при 400 К. Длина траектории составляла 130 нс при моделировании в чистой воде и 30 нс – для смесей.

## ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

## Глава 4. Сольватация неполярных соединений в водно-органических смесях

Настоящий раздел посвящен вопросам зависимости сольватационных свойств водно-органических смесей от их состава. Как уже было отмечено в главе 1, гидрофобный эффект играет важную роль во многих физико-химических явлениях в водных растворах. Одним из самых распространенных примеров проявления гидрофобного эффекта является низкая растворимость малополярных соединений, возрастающая в присутствии органических соразтворителей. Поэтому подавление гидрофобного эффекта органическими соразтворителями имеет смысл изучать на примере зависимостей сольватационных свойств растворов неполярных соединений от состава бинарного растворителя.

## 4.1 Термодинамические функции сольватации неполярных соединений в водно-органических смесях

Значения полученных нами коэффициентов активности при предельном разбавлении и рассчитанных из них значений энергий Гиббса растворения и сольватации приведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1. Экспериментальные значения предельных коэффициентов активности  $\gamma_{\infty}^{A/S}$  и их стандартные погрешности  $u(\gamma_{\infty}^{A/S})$ , значения энергий Гиббса растворения  $\Delta_{soln} G^{A/S}$  и сольватации  $\Delta_{solv} G^{A/S}$  для бензола, октана и толуола в бинарных смесях органических растворителей (1) с водой (2) при 298,15 К.

Органический соразтворитель	$x_2$	$\gamma_{\infty}^{A/S}$	$u(\gamma_{\infty}^{A/S})$	$\Delta_{soln} G^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta_{solv} G^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
Бензол					
1,4-диоксан	0,1	1,31	0,05	0,7	-4,5
1,4-диоксан	0,25	1,83	0,07	1,5	-3,6
1,4-диоксан	0,4	2,97	0,18	2,7	-2,4



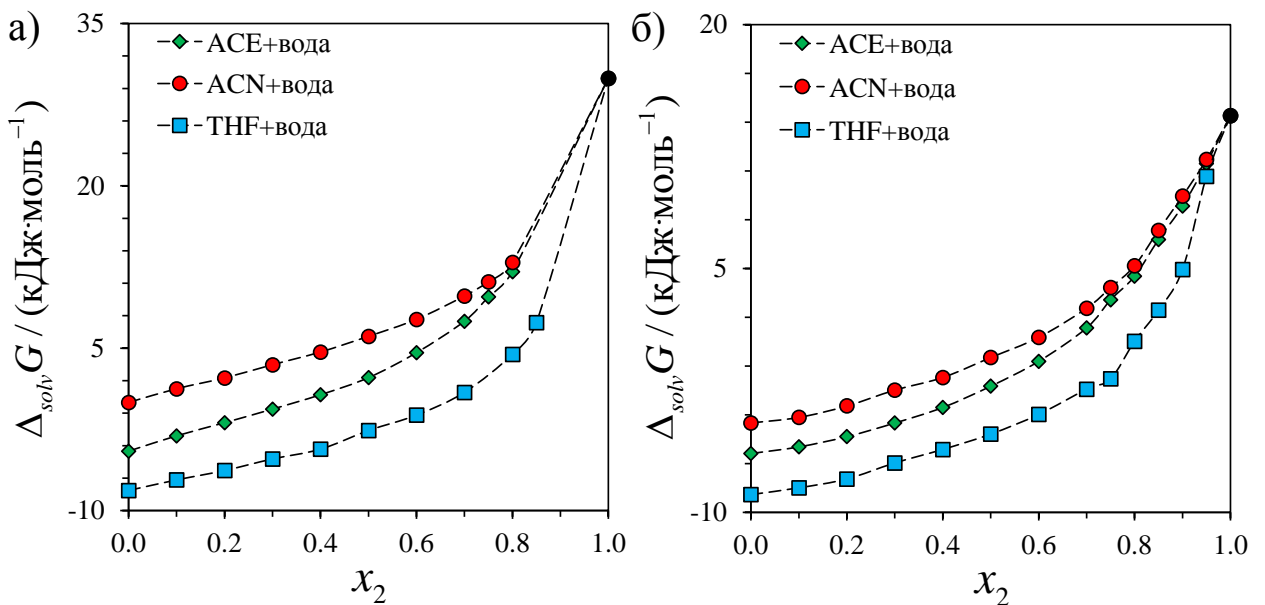
Органический соразтворитель	$x_2$	$\gamma_\infty^{A/S}$	$u(\gamma_\infty^{A/S})$	$\Delta_{soln} G^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta_{solv} G^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
1,4-диоксан	0,5	4,22	0,17	3,6	-1,6
1,4-диоксан	0,6	8,08	0,69	5,2	0,1
1,4-диоксан	0,68	14,0	0,56	6,5	1,4
1,4-диоксан	0,75	26,3	1,0	8,1	3,0
1,4-диоксан	0,8	46,5	2,3	9,5	4,4
1,4-диоксан	0,85	103	4,2	11,5	6,4
1,4-диоксан	0,9	243	9,7	13,6	8,5
1,4-диоксан	0,925	508	20	15,4	10,3
1,4-диоксан	0,95	795	39	16,6	11,4
1,4-диоксан	0,975	1144	46	17,5	12,3
1,4-диоксан	0,99	2052	94	18,9	13,8
N-метилформаид	0,1	5,71	0,1	4,3	-0,8
N-метилформаид	0,2	7,44	0,2	5,0	-0,2
N-метилформаид	0,3	10,3	0,3	5,8	0,7
N-метилформаид	0,4	15,4	0,5	6,8	1,7
N-метилформаид	0,5	24,9	0,8	8,0	2,9
N-метилформаид	0,6	43,4	1,1	9,3	4,2
N-метилформаид	0,7	91,1	1,5	11,2	6,1
Ацетон	0,12	2,00	0,08	1,7	-3,4
Ацетон	0,3	3,37	0,14	3,0	-2,1
Ацетон	0,5	7,76	0,31	5,1	-0,1
Ацетон	0,7	28,8	1,2	8,3	3,2
Ацетон	0,8	82,6	3,3	10,9	5,8
Ацетон	0,85	168	10	12,7	7,6
Ацетон	0,9	380	15	14,7	9,6
Диметилсульфоксид	0,1	3,75	0,15	3,3	-1,9
Диметилсульфоксид	0,3	8,56	0,34	5,3	0,2
Диметилсульфоксид	0,5	24,6	0,95	7,9	2,8

Органический соразтворитель	$x_2$	$\gamma_\infty^{A/S}$	$u(\gamma_\infty^{A/S})$	$\Delta_{soln} G^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta_{solv} G^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
Диметилсульфоксид	0,7	91,9	4,5	11,2	6,1
Диметилсульфоксид	0,75	160	6,4	12,6	7,5
Диметилсульфоксид	0,8	203	9,4	13,2	8,1
Диметилсульфоксид	0,85	334	13	14,4	9,3
Диметилсульфоксид	0,9	547	29	15,6	10,5
Диметилсульфоксид	0,95	974	40	17,1	11,9
трет-бутанол	0,1	3,99	0,16	3,4	-1,7
трет-бутанол	0,25	5,05	0,20	4,0	-1,1
трет-бутанол	0,35	6,29	0,25	4,6	-0,6
трет-бутанол	0,5	9,48	0,38	5,6	0,5
трет-бутанол	0,7	21,4	0,85	7,6	2,5
трет-бутанол	0,8	42,9	1,7	9,3	4,2
трет-бутанол	0,85	77,2	5,3	10,8	5,7
трет-бутанол	0,9	173	6,9	12,8	7,7
трет-бутанол	0,925	371	15	14,7	9,5
трет-бутанол	0,95	940	99	17,0	11,8
Октан					
Ацетон	0,1	15,2	0,6	6,7	-3,1
Ацетон	0,2	24,9	1,0	8,0	-1,9
Ацетон	0,3	41,3	1,7	9,2	-0,6
Ацетон	0,4	70,5	2,8	10,5	0,7
Ацетон	0,5	133	5	12,1	2,3
Ацетон	0,6	338	14	14,4	4,6
Ацетон	0,7	1092	44	17,3	7,5
Ацетон	0,75	2700	153	19,6	9,7
Ацетон	0,8	6930	625	21,9	12,1
Ацетонитрил	0,1	87,1	3,5	11,1	1,3
Ацетонитрил	0,2	130	5	12,1	2,3

Органический сорастворитель	$x_2$	$\gamma_\infty^{A/S}$	$u(\gamma_\infty^{A/S})$	$\Delta_{soln} G^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta_{solv} G^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
Ацетонитрил	0,3	214	9	13,3	3,5
Ацетонитрил	0,4	343	15	14,5	4,6
Ацетонитрил	0,5	616	24	15,9	6,1
Ацетонитрил	0,6	1160	48	17,5	7,7
Ацетонитрил	0,7	2774	111	19,7	9,8
Ацетонитрил	0,75	4727	190	21,0	11,1
Ацетонитрил	0,8	9781	1000	22,8	12,9
Тетрагидрофуран	0,1	2,96	0,12	2,7	-7,2
Тетрагидрофуран	0,2	4,20	0,17	3,6	-6,3
Тетрагидрофуран	0,3	6,46	0,26	4,6	-5,2
Тетрагидрофуран	0,4	9,30	0,37	5,5	-4,3
Тетрагидрофуран	0,5	18,5	0,7	7,2	-2,6
Тетрагидрофуран	0,6	33,1	1,3	8,7	-1,2
Тетрагидрофуран	0,7	77,1	3,1	10,8	0,9
Тетрагидрофуран	0,8	318	13	14,3	4,4
Тетрагидрофуран	0,85	1037	56	17,2	7,4
Толуол					
Ацетон	0,1	2,37	0,09	2,1	-6,0
Ацетон	0,2	3,06	0,12	2,8	-5,3
Ацетон	0,3	4,29	0,17	3,6	-4,5
Ацетон	0,4	6,30	0,25	4,6	-3,5
Ацетон	0,5	10,7	0,4	5,9	-2,2
Ацетон	0,6	19,8	0,8	7,4	-0,7
Ацетон	0,7	45,4	1,8	9,5	1,3
Ацетон	0,75	91,1	3,6	11,2	3,1
Ацетон	0,8	163	7	12,6	4,5
Ацетон	0,85	407	16	14,9	6,8
Ацетон	0,9	934	37	17,0	8,8

Органический соразтворитель	$x_2$	$\gamma_\infty^{A/S}$	$u(\gamma_\infty^{A/S})$	$\Delta_{soln} G^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta_{solv} G^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
Ацетон	0,95	2679	189	19,6	11,5
Ацетонитрил	0,1	4,87	0,17	3,9	-4,2
Ацетонитрил	0,2	6,48	0,27	4,6	-3,5
Ацетонитрил	0,3	9,60	0,37	5,6	-2,5
Ацетонитрил	0,4	13,1	0,7	6,4	-1,7
Ацетонитрил	0,5	21,6	0,9	7,6	-0,5
Ацетонитрил	0,6	35,6	1,4	8,9	0,8
Ацетонитрил	0,7	73,5	3,1	10,7	2,6
Ацетонитрил	0,75	123	5	11,9	3,8
Ацетонитрил	0,8	211	12	13,3	5,2
Ацетонитрил	0,85	509	20	15,4	7,3
Ацетонитрил	0,9	1192	48	17,6	9,5
Ацетонитрил	0,95	2958	117	19,8	11,7
Тетрагидрофуран	0,1	0,86	0,09	-0,4	-8,5
Тетрагидрофуран	0,2	1,07	0,08	0,2	-8,0
Тетрагидрофуран	0,3	1,59	0,08	1,1	-7,0
Тетрагидрофуран	0,4	2,22	0,12	2,0	-6,1
Тетрагидрофуран	0,5	3,24	0,15	2,9	-5,2
Тетрагидрофуран	0,6	5,29	0,21	4,1	-4,0
Тетрагидрофуран	0,7	9,9	0,4	5,7	-2,4
Тетрагидрофуран	0,75	12,8	0,5	6,3	-1,8
Тетрагидрофуран	0,8	32,5	1,3	8,6	0,5
Тетрагидрофуран	0,85	70,5	6,2	10,5	2,4
Тетрагидрофуран	0,9	193	34	13,0	4,9
Тетрагидрофуран	0,95	1945	214	18,8	10,7

Полученные данные были дополнены литературными значениями коэффициентов активности при предельном разбавлении углеводов в чистой воде и бензола в смесях воды с метанолом, изопропанолом и ацетонитрилом [96]. Зависимости энергии Гиббса сольватации от состава водно-органической смеси (рисунок 4.1) для всех смесей имеют нелинейный вид. При случайном распределении молекул соразтворителей вокруг молекулы растворенного вещества следует ожидать близкой к линейной зависимости энергии Гиббса сольватации от состава смеси. Наблюдаемые нами (рисунок 4.1) выпуклые вниз зависимости означают, что во всех случаях значения энергии Гиббса сольватации ближе к значениям в чистом органическом соразтворителе, чем в воде. Следует предположить, что это связано с обогащением органическим соразтворителем сольватной оболочки растворенного вещества, т.е. предпочтительной сольватацией. Из рассмотренных растворителей наименьшие отклонения от линейности проявляются для смесей воды с метанолом, который имеет близкий к воде размер и, скорее всего, легче встраивается в сетку водородных связей воды. Наибольшие отклонения наблюдаются для смесей воды с тетрагидрофураном, 1,4-диоксаном, изопропанолом и трет-бутанолом.



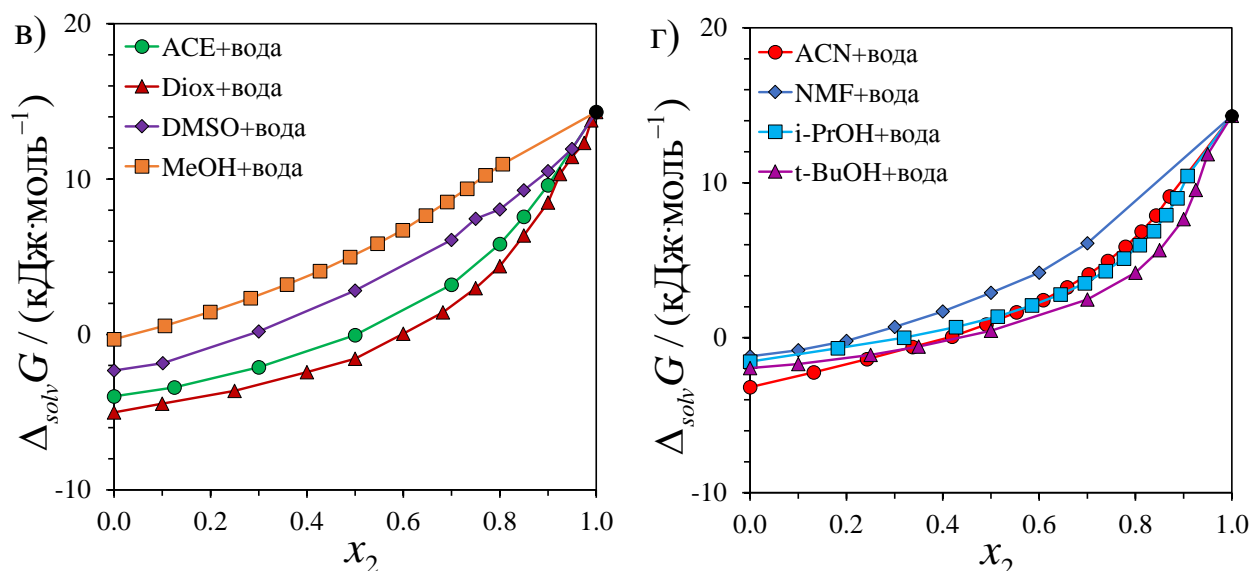


Рисунок 4.1. Энергии Гиббса сольватации октана (а), толуола (б) и бензола (в-г) в водно-органических смесях при 298,15 К. Здесь и далее сокращения обозначают: ACN – ацетонитрил, ACE – ацетон, THF – тетрагидрофуран, Diок – диоксан, DMSO – диметилсульфоксид, NMF – N-метилформамид, MeOH – метанол, i-PrOH – изопропанол, t-BuOH – трет-бутанол.  $x_2$  соответствует мольной доле воды.

Значения энтальпий растворения и сольватации приведены в таблице 4.2. Полученные нами величины были дополнены литературными данными для бензола, октана и толуола в чистой воде [216] и для бензола в смесях воды с ацетоном [144], диметилсульфоксидом [144], 1,4-диоксаном [144], метанолом [145], ацетонитрилом [217], изопропанолом [146] и трет-бутанолом [147].

Таблица 4.2. Экспериментальные значения энтальпий растворения  $\Delta_{soln} H^{A/S}$  со стандартными погрешностями и энтальпии сольватации  $\Delta_{solv} H^{A/S}$  для бензола, октана и толуола в бинарных смесях органических растворителей (1) с водой (2) при 298,15 К.

Органический соразтворитель	$x_2$	$\Delta_{soln} H^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$u(\Delta_{soln} H^{A/S})$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta_{solv} H^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
Бензол				
N-метилформамид	0,1	1,36	0,05	-32,4
N-метилформамид	0,2	1,75	0,05	-32,1
N-метилформамид	0,3	2,01	0,05	-31,8

Органический сорастворитель	$x_2$	$\Delta_{soln} H^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$u(\Delta_{soln} H^{A/S})$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta_{solv} H^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
N-метилформамид	0,4	2,62	0,1	-31,2
N-метилформамид	0,5	3,08	0,3	-30,7
N-метилформамид	0,6	4,61	0,2	-29,2
N-метилформамид	0,7	5,81	0,4	-28,2
Октан				
Ацетон	0,1	10,2	0,2	-31,3
Ацетон	0,2	11,0	0,1	-30,5
Ацетон	0,3	11,9	0,1	-29,6
Ацетон	0,33	12,5	0,2	-29,0
Ацетон	0,4	12,8	0,2	-28,7
Ацетон	0,5	14,4	0,1	-27,1
Ацетон	0,6	16,5	0,2	-25,0
Ацетон	0,67	18,8	0,3	-22,7
Ацетон	0,7	20,3	0,3	-21,2
Ацетон	0,75	22,8	0,3	-18,7
Ацетон	0,8	22,0	0,3	-19,6
Ацетонитрил	0,1	13,9	0,1	-27,6
Ацетонитрил	0,2	14,1	0,1	-27,4
Ацетонитрил	0,25	14,1	0,3	-27,4
Ацетонитрил	0,3	14,0	0,1	-27,5
Ацетонитрил	0,33	14,0	0,3	-27,5
Ацетонитрил	0,4	12,8	0,4	-28,7
Ацетонитрил	0,5	11,9	0,3	-29,6
Ацетонитрил	0,6	10,7	0,5	-30,8
Ацетонитрил	0,67	10,3	0,4	-32,2
Ацетонитрил	0,7	10,5	0,5	-31,0
Ацетонитрил	0,75	11,0	0,2	-30,5
Ацетонитрил	0,8	12,1	0,7	-29,4

Органический сорастворитель	$x_2$	$\Delta_{soln} H^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$u(\Delta_{soln} H^{A/S})$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta_{soln} H^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
Тетрагидрофуран	0,1	4,5	0,1	-37,0
Тетрагидрофуран	0,2	4,8	0,1	-36,7
Тетрагидрофуран	0,3	5,5	0,1	-36,0
Тетрагидрофуран	0,4	5,9	0,2	-35,6
Тетрагидрофуран	0,5	6,6	0,3	-34,9
Тетрагидрофуран	0,6	8,9	0,2	-32,6
Тетрагидрофуран	0,7	13,2	0,3	-28,3
Тетрагидрофуран	0,75	16,0	0,4	-25,5
Тетрагидрофуран	0,8	21,1	0,4	-20,4
Тетрагидрофуран	0,85	24,6	1,5	-16,9
Толуол				
Ацетон	0,1	1,7	0,1	-36,3
Ацетон	0,2	2,2	0,1	-35,8
Ацетон	0,3	3,3	0,1	-34,7
Ацетон	0,4	3,6	0,1	-34,4
Ацетон	0,5	4,8	0,1	-33,2
Ацетон	0,6	6,3	0,1	-31,8
Ацетон	0,7	8,6	0,1	-29,4
Ацетон	0,75	10,3	0,2	-27,7
Ацетон	0,8	11,9	0,1	-26,1
Ацетон	0,9	14,2	0,5	-23,8
Ацетонитрил	0,1	3,7	0,1	-34,3
Ацетонитрил	0,2	4,0	0,1	-34,0
Ацетонитрил	0,3	4,2	0,1	-33,8
Ацетонитрил	0,4	4,2	0,1	-33,8
Ацетонитрил	0,5	4,0	0,1	-34,0
Ацетонитрил	0,6	3,7	0,1	-34,3
Ацетонитрил	0,7	4,0	0,1	-34,0



Органический сорастворитель	$x_2$	$\Delta_{soln} H^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$u(\Delta_{soln} H^{A/S})$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta_{solv} H^{A/S}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
Ацетонитрил	0,8	6,2	0,1	-31,8
Ацетонитрил	0,85	8,9	0,1	-29,1
Ацетонитрил	0,9	11,7	0,4	-26,3
Тетрагидрофуран	0,1	-1,0	0,1	-39,0
Тетрагидрофуран	0,2	-0,7	0,1	-38,7
Тетрагидрофуран	0,3	-0,4	0,1	-38,4
Тетрагидрофуран	0,4	0,0	0,1	-38,0
Тетрагидрофуран	0,5	0,9	0,1	-37,1
Тетрагидрофуран	0,6	2,1	0,1	-35,9
Тетрагидрофуран	0,7	4,5	0,1	-33,5
Тетрагидрофуран	0,8	10,0	0,4	-28,0
Тетрагидрофуран	0,9	19,0	0,2	-19,0
Тетрагидрофуран	0,95	17,4	2,0	-20,6

Для зависимостей энтальпий сольватации от состава водно-органических смесей (рисунок 4.2) практически во всех системах растворенное вещество-растворитель наблюдается схожая тенденция: при увеличении концентрации воды в смеси происходит медленный рост энтальпии сольватации, которая достигает максимума при высоких концентрациях воды, порядка 0,8-0,95 мольных долей. После достижения максимума энтальпии сольватации стремятся к значениям энтальпий сольватации в чистой воде. Для смеси ацетонитрил-вода зависимости имеют несколько иной вид: для них также наблюдаются максимумы при  $x_2 = 0,8-0,9$ , но им предшествует снижение величины энтальпии сольватации (небольшое для аренов и значительное для октана) при мольной доле воды 0,4-0,7.

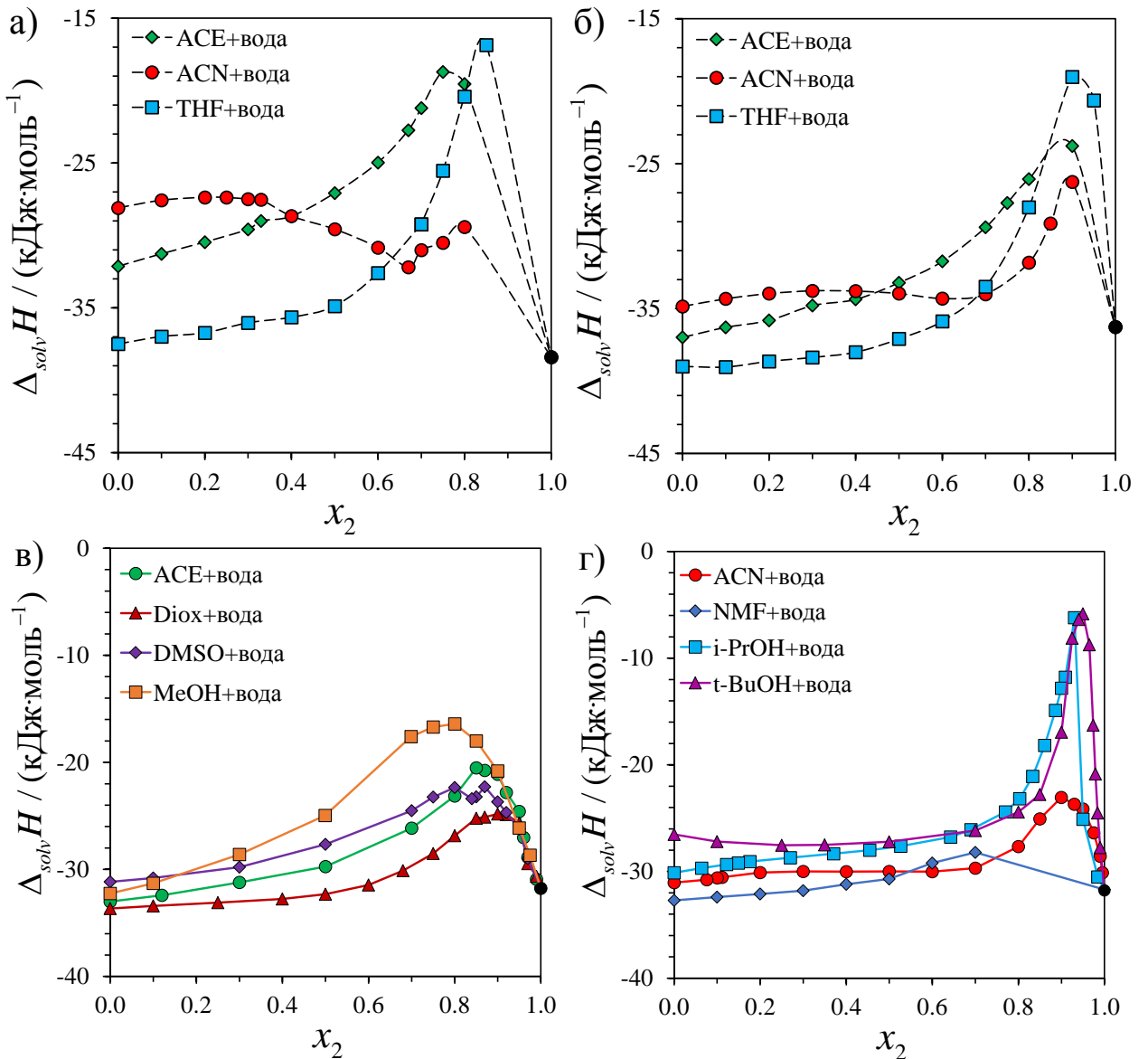
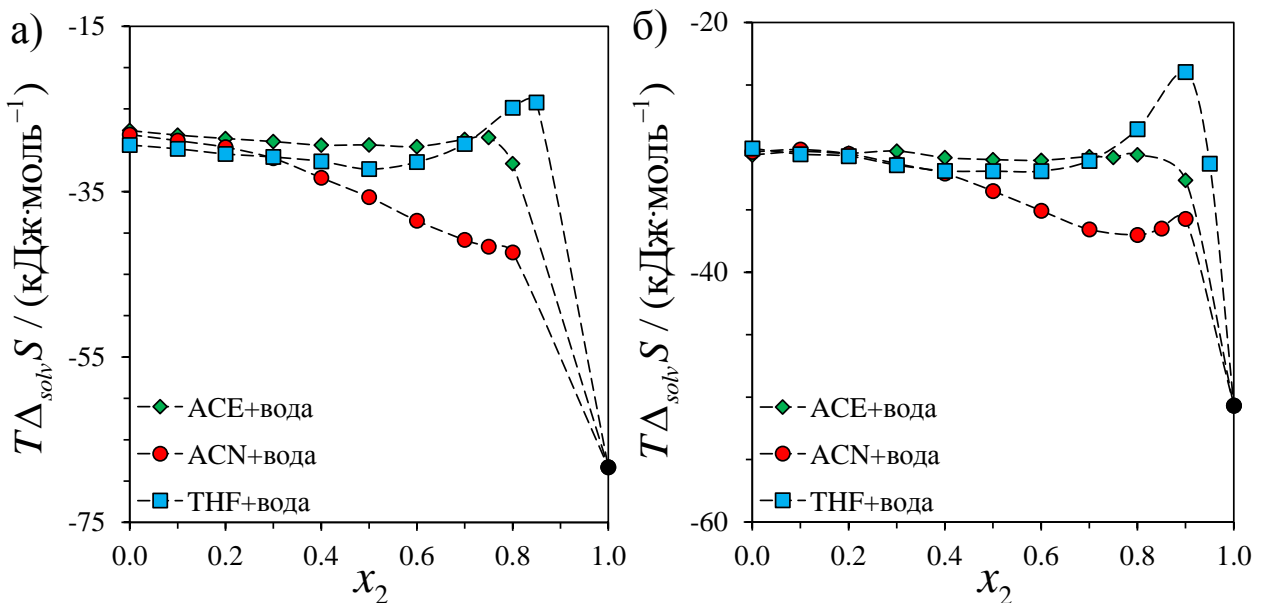


Рисунок 4.2. Энтальпии сольватации октана (а), толуола (б) и бензола (в-г) в водно-органических смесях при 298,15 К.  $x_2$  соответствует мольной доле воды.

Наличие максимумов для энтальпий растворения бензола в водно-органических смесях было ранее показано в работах Батова и сотр. [144, 145, 147] (их результаты учтены на рисунках 4.2в-г). Однако для углеводородов (н-гексана и н-гептана) имевшиеся ранее данные по энтальпиям растворения ограничивались смесями с мольной долей воды не более 0,6, что связано со сложностью измерений в смесях с высоким содержанием воды из-за низкой растворимости неполярных соединений. Поэтому наличие таких максимумов для углеводородов экспериментально ранее не было подтверждено, а предложенные экстраполяции предсказывали либо слабо выраженные максимумы, либо их отсутствие, т.е.

практически постоянные значения энтальпии сольватации в широком диапазоне составов смеси и постепенное снижение до значений в чистой воде. Таким образом, наличие максимумов для зависимости энтальпии сольватации углеводов от состава водно-органических смесей было экспериментально доказано впервые.

На основе данных по энергиям Гиббса и энтальпиям сольватации были рассчитаны значения энтропий сольватации (рисунок 4.3). Для большинства изученных смесей увеличение концентрации воды до 80-95 мольных процентов не приводит к существенному уменьшению энтропии сольватации, т.е. не приближает энтропию сольватации к значениям в чистой воде. Лишь в случае смеси ацетонитрил-вода наблюдается медленное снижение значений энтропии, начиная с мольной доли воды 0,4-0,5. Для смесей воды с тетрагидрофураном, изопропанолом и трет-бутанолом при высоких концентрациях воды ( $x_2 = 0,9-0,95$ ) снижению энтропии до значений в чистой воде предшествует резкий рост. Хорошо известно, что низкие значения энтропии сольватации связаны с гидрофобным эффектом. Тот факт, что в водно-органических смесях энтропии сольватации мало изменяются или даже растут с увеличением концентрации воды, свидетельствует о подавлении гидрофобного эффекта.



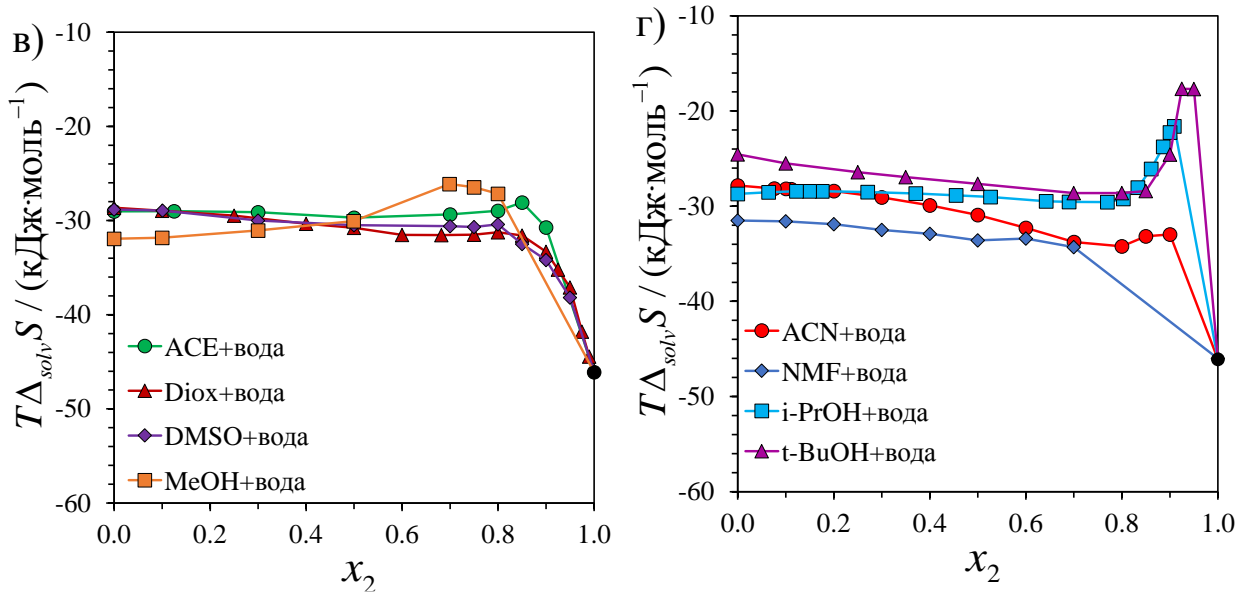


Рисунок 4.3. Энтропии сольватации октана (а), толуола (б) и бензола (в-г) в водно-органических смесях при 298,15 К.  $x_2$  соответствует мольной доли воды.

#### 4.2 Соотношения между энергией Гиббса и энтальпией сольватации неполярных соединений в водно-органических смесях

Для многих физических и химических процессов установлено существование энтальпийно-энтропийной компенсации [51, 59, 60]. Суть этого явления заключается в наличии линейной (в редких случаях нелинейной) корреляции между энтальпией и энтропией (либо энтальпией и энергией Гиббса) процесса. В серии работ Седова и др. была обнаружена линейная корреляция между энергией Гиббса и энтальпией сольватации различных соединений в неассоциированных растворителях [62–64] (уравнение 1.3:  $\Delta_{solv}G = 0,627\Delta_{solv}H + 16,3$ ).

Как уже было сказано в разделе 1.4, для ассоциированных растворителей, таких как вода, этиленгликоль, формамид и др., термодинамические функции сольватации отклоняются от этой корреляции. Отклонение от корреляции было предложено считать качественным критерием, а его величину – количественной мерой силы сольвофобных и, в частности, гидрофобного эффектов. Поэтому при рассмотрении проявления гидрофобного эффекта в водно-органических смесях помимо зависимостей термодинамических функций сольватации от состава смеси

интерес представляет рассмотрение соотношений между энергией Гиббса и энтальпией сольватации (рисунок 4.4).

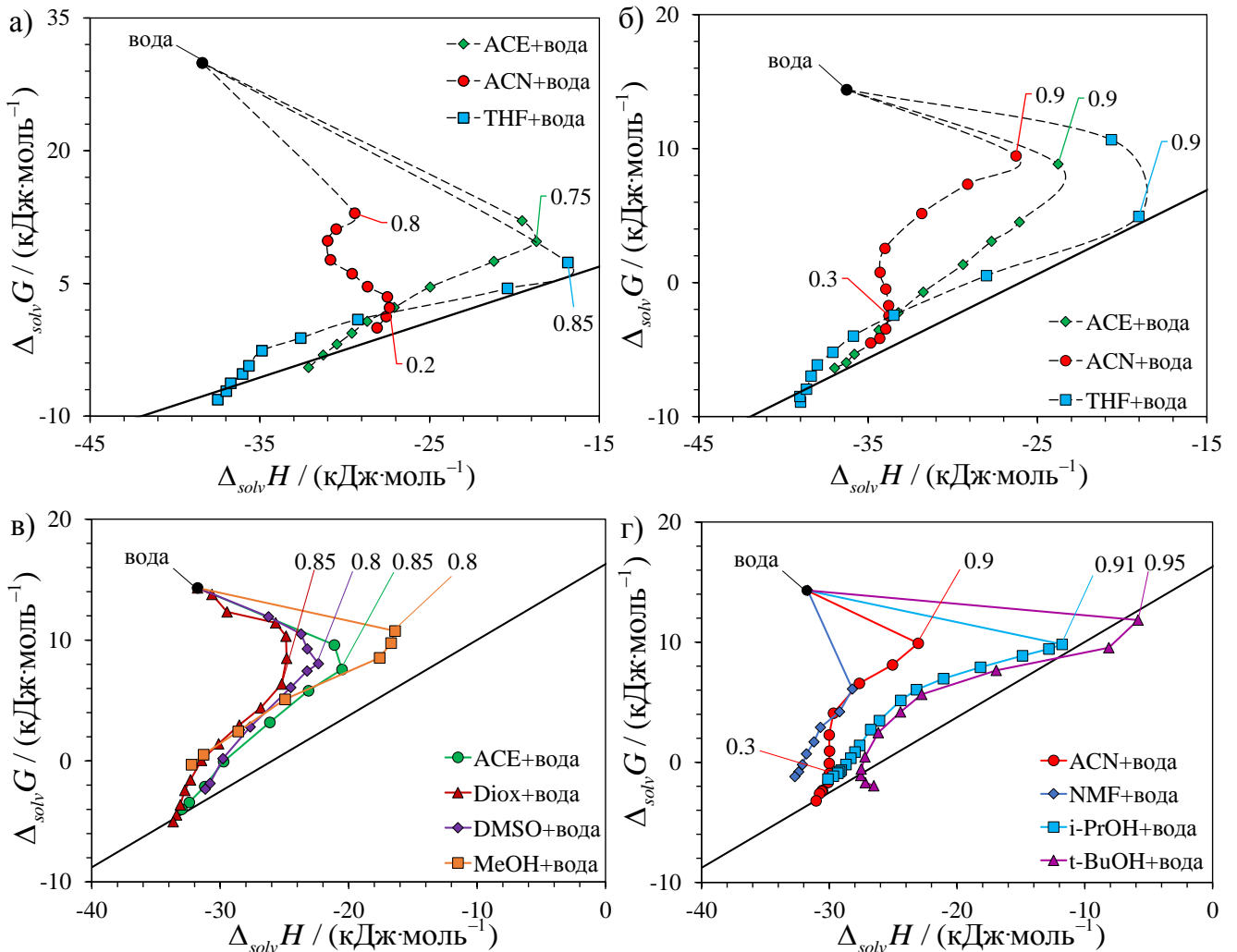


Рисунок 4.4. Соотношения между энергией Гиббса и энтальпией сольватации октана (а), толуола (б) и бензола (в-г) в водно-органических смесях при 298,15 К. Сплошная черная линия соответствует линейной корреляции для апротонных растворителей (1.3). Числами обозначены мольные доли воды в смесях.

Значения энергий Гиббса и энтальпий сольватации углеводородов в апротонных органических растворителях соответствуют линейной корреляции для неассоциированных растворителей (уравнение 1.3). Протонные растворители, например, N-метилформамид и метанол проявляют слабые сольвофобные эффекты и немного отклоняются от прямой [64]. Добавление воды к органическому растворителю должно приводить к увеличению смещения термодинамических функций сольватации от корреляции в сторону более высоких энергий Гиббса. Тем

не менее, для большинства смесей это смещение если и наблюдается, то остается незначительным в широком диапазоне составов смеси. Лишь при высоких концентрациях воды происходит загиб в сторону точки, соответствующей значениям термодинамических функций сольватации в чистой воде. Сохранение линейной корреляции между энергией Гиббса и энтальпией означает, что в присутствии органического растворителя происходит подавление гидрофобного эффекта. При этом растворители подавляют гидрофобный эффект с различной эффективностью. Об этом можно судить как по величине отклонения термодинамических функций сольватации от корреляции, так и по различным значениям концентрации органического соразтворителя, при которой происходит загиб. Так, в случае сольватации бензола в водно-органических смесях достаточно всего 5 мольных % трет-бутанола или 9% изопропанола для возвращения на корреляцию для апротонных растворителей. Причиной столь сильного подавления гидрофобного эффекта может быть наличие микрогетерогенности в водных растворах изопропанола и трет-бутанола [146, 218–220]. За счет образования неполярных кластеров органического компонента сольватация неполярных молекул растворяемого вещества становится термодинамически выгодной.

Слабое подавление гидрофобного эффекта вполне ожидаемо проявляется в смесях воды с метилформамидом, который склонен к самоассоциации и сам проявляет сольвофобный эффект. В то же время метанол, несмотря на способность к самоассоциации, сильнее подавляет гидрофобный эффект. С другой стороны, слабо подавляет гидрофобный эффект ацетонитрил, способность к самоассоциации которого является дискуссионным вопросом. Энтальпия сольватации в смесях ацетонитрил-вода изменяется очень незначительно при мольной доле воды от 0 до 0,7, в то время как энергия Гиббса сольватации растет в той же степени, что и в смесях с другими апротонными растворителями. Такое поведение смесей с ацетонитрилом может быть связано с образованием кластеров воды и разрушением кластеров ацетонитрила при низкой концентрации воды [221].

### 4.3 Термодинамические функции образования полости в водно-органических смесях

Для интерпретации закономерностей, наблюдаемых для термодинамических функций сольватации, можно привлечь методы полноатомного компьютерного моделирования. Как уже отмечалось в разделе 1.3, процесс сольватации часто разделяют на два гипотетических этапа: 1) образование в растворителе полости, способной вместить молекулу растворяемого вещества, и 2) перенос молекулы растворяемого вещества из газовой фазы в эту полость с последующим «включением» взаимодействий растворитель-растворяемое вещество. Вклад процесса образования полости учитывает только взаимодействия между молекулами растворителя. Расчет вклада процесса образования полости может быть использован для характеристики сольватационных свойств растворителя и в особенности гидрофобного и сольвофобных эффектов, которые напрямую связаны с высокими затратами энергии Гиббса на образование полости в ассоциированных растворителях.

Для воды и широкого спектра органических растворителей, имеющих различное строение молекул, полярность и способность к образованию водородных связей, были рассчитаны энергии Гиббса, энтропии и энтальпии образования полости в чистом растворителе. Для полостей одного и того же размера энергии Гиббса образования полости  $\Delta_{cav}G$  в протонных растворителях с сеткой межмолекулярных водородных связей, таких как формамид, этиленгликоль, глицерин и вода, имеют более высокие значения по сравнению с апротонными неассоциированными растворителями. Протонные растворители характеризуются более низкой энтропией образования полости  $\Delta_{cav}S$  по сравнению с апротонными, а вода имеет самое низкое значение  $\Delta_{cav}S$  среди всех изученных растворителей. Мы считаем, что это является основной причиной возникновения гидрофобных и, в общем случае, сольвофобных эффектов. На графиках  $\Delta_{cav}G$  против  $\Delta_{cav}H$  термодинамические функции образования полости в ассоциированных растворителях лежат выше таковых в апротонных растворителях, а также выше

линейной корреляции для процесса сольватации реальных молекул в апротонных растворителях (уравнение 1.3). Вклад образования полости по большей части определяет разницу в термодинамических функциях сольватации небольших неполярных молекул, например, инертных газов, в разных растворителях.

В случае водно-органических смесей увеличение содержания органического соразтворителя приводит к снижению величин энергии Гиббса образования полости и сольватации инертных газов (рисунок 4.5). Значения энергий Гиббса образования полости лежат ниже линии, соединяющей величины термодинамических функций в чистых растворителях. Как и в случае с сольватацией реальных молекул, напрашивается вывод об образовании полости преимущественно в обогащенных органическим соразтворителем областях пространства.

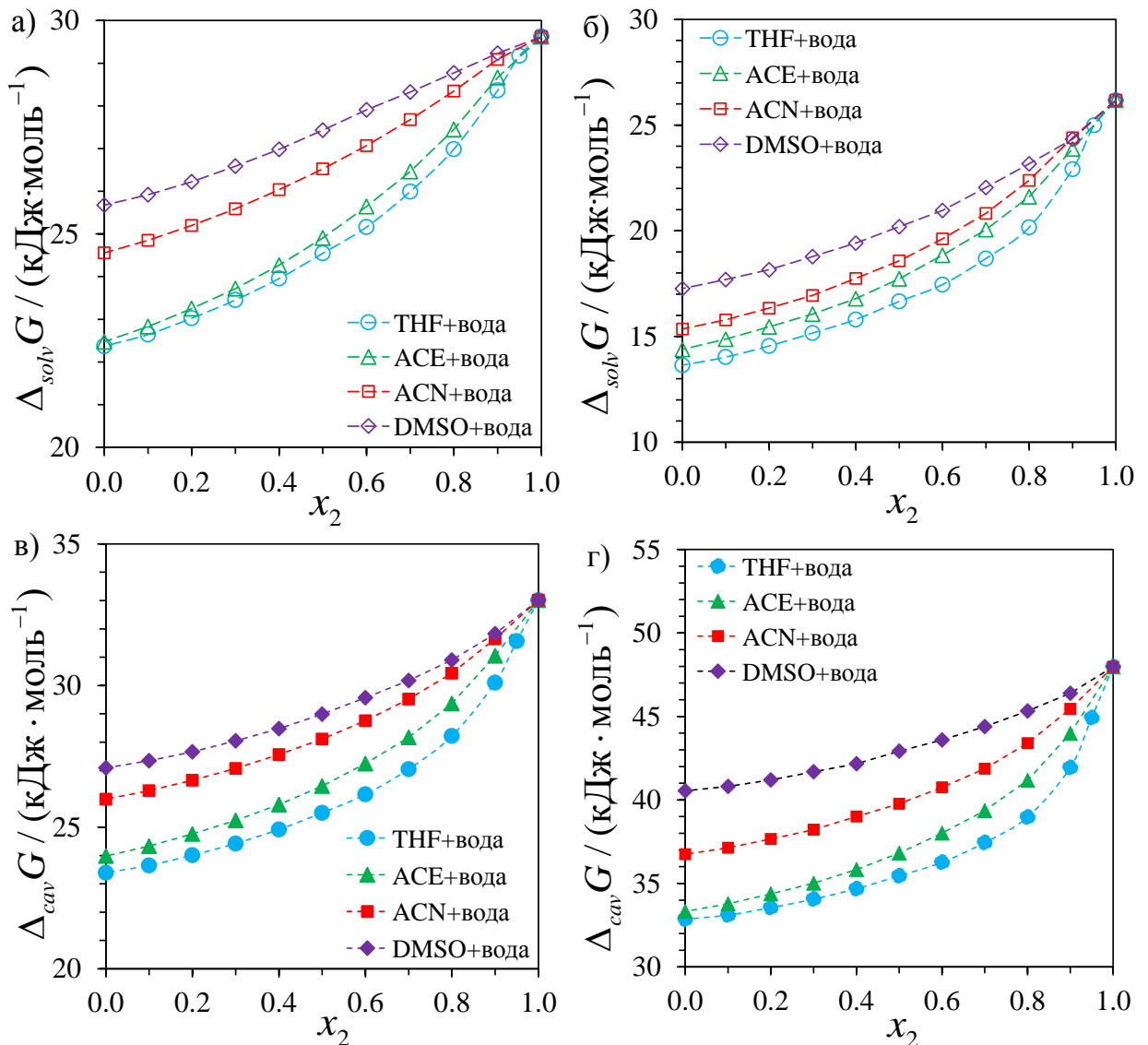




Рисунок 4.5. Зависимости расчетных значений энергии Гиббса сольватации неона (а), ксенона (б), образования полостей радиусом 0,28 нм (в) и 0,345 нм (г) в водно-органических смесях от их состава при 298 К.  $x_2$  соответствует мольной доле воды.

Для проверки этого вывода нами были рассчитаны вероятности образования полости в водно-органической смеси в различных областях ячейки – около молекул воды и около молекул органического соразтворителя. Расчет проводился согласно следующей методике. При каждой вставке твердой сферы в случайную точку ячейки определяется атом какой молекулы является ближайшим к этой точке – воды или органического соразтворителя. Количество успешных и неуспешных вставок для каждого варианта суммируется по всей траектории. Таким образом, можно рассчитать долю успешных вставок в областях ячейки рядом с каждым из соразтворителей, которая показывает вероятность образования полости  $p$  в этой области, а также долю всех вставок, успешных и неуспешных, в каждой области. Последняя величина представляет собой долю объема  $\varphi$  ячейки, занятого каждым соразтворителем. Такой расчет является довольно грубым, но в то же время простым. Он позволяет получить представление о том, в каких областях преимущественно происходит образование полости.

Смешанный растворитель был также рассмотрен как состоящий из неполярных и полярных областей. Первые включают неполярные группы органического соразтворителя ( $\text{CH}_3$ -,  $-\text{CH}_2$ -,  $\text{CH}$ -группы), вторые – молекулы воды и остальные атомы органического соразтворителя. По методике, аналогичной приведенной выше, были рассчитаны доли успешных вставок в неполярных и полярных областях. Результаты двух расчетов для смесей различного состава приведены в таблице 4.3.

Таблица 4.3. Доли *успешных* вставок твердой сферы в область ячейки рядом с органическим соразтворителем ( $p_{орг}$ ) и в неполярную область ( $p_{непол}$ ) от общего числа *успешных* вставок, доли объема ячейки, занятого органическим соразтворителем ( $\varphi_{орг}$ ) и неполярными группами ( $\varphi_{непол}$ ) для смесей воды с органическими соразтворителями.

Органический соразтворитель	$x_1$	$x_2$	$p_{орг}$	$\varphi_{орг}$	$p_{непол}$	$\varphi_{непол}$	$\frac{p_{непол}}{p_{орг}}$	$\frac{\varphi_{непол}}{\varphi_{орг}}$
Ацетон	0,1	0,9	0,51	0,27	0,41	0,18	0,81	0,65
	0,2	0,8	0,73	0,46	0,56	0,30	0,77	0,65
	0,5	0,5	0,90	0,77	0,70	0,50	0,78	0,65
Ацетонитрил	0,1	0,9	0,40	0,21	0,20	0,09	0,50	0,43
	0,2	0,8	0,58	0,38	0,28	0,16	0,49	0,43
	0,5	0,5	0,82	0,71	0,40	0,30	0,48	0,42
Диметилсульфоксид	0,1	0,9	0,37	0,28	0,27	0,17	0,73	0,61
	0,2	0,8	0,60	0,47	0,43	0,28	0,72	0,61
	0,5	0,5	0,85	0,78	0,64	0,47	0,75	0,60
Тetraгидрофуран	0,1	0,9	0,69	0,29	0,64	0,25	0,92	0,85
	0,2	0,8	0,82	0,49	0,76	0,41	0,93	0,85
	0,5	0,5	0,92	0,79	0,85	0,67	0,92	0,84

Практически во всех рассмотренных смесях большинство успешных вставок происходит в области раствора рядом с органическим растворителем, на который приходится существенно меньшая часть объема раствора. Сильнее всего это проявляется для смеси ТГФ-вода с мольной долей воды  $x_2 = 0,9$ : на тетрагидрофуран, который занимает лишь 29% объема раствора, приходится 69% успешных вставок. Даже для смесей воды с ацетонитрилом с  $x_2 = 0,9$  40% успешных вставок приходится на ацетонитрил, который занимает только 21% объема раствора. «Избирательность успешной вставки» менее выражена для смесей воды с диметилсульфоксидом.

Кроме того, интересно сравнить величины  $\frac{P_{непол}}{P_{орг}}$  и  $\frac{\Phi_{непол}}{\Phi_{орг}}$ , которые показывают вклад от неполярных групп в успешные вставки и в объем занимаемый органическим соразтворителем. Во всех случаях величина  $\frac{P_{непол}}{P_{орг}}$  больше, чем  $\frac{\Phi_{непол}}{\Phi_{орг}}$ , то есть вклад неполярных групп растворителя в успешные вставки превышает их вклад в объем растворителя. Это означает, что успешные вставки преимущественно происходят рядом с неполярными группами.

Результат расчета можно рассматривать в качестве подтверждения того, что полости легче образуются в областях, обогащенных органическим растворителем, рядом с его неполярными группами.

Для сравнения нами также было проведено молекулярно-динамическое моделирование ксенона в смесях с различным содержанием органического соразтворителя и рассчитан состав его сольватной оболочки (таблица 4.4). Практически во всех изученных смесях доля молекул органического соразтворителя в сольватном окружении ксенона ( $x_{орг}^{сольв}$ ) превышает средний состав растворителя. Только в смесях воды с диметилсульфоксидом состав сольватной оболочки ксенона и средний состав растворителя совпадают. Полученный результат хорошо коррелирует с результатами вставки полости. Таким образом, ксенон в большинстве случаев оказывается преимущественно сольватирован органическим соразтворителем.

Таблица 4.4. Состав сольватной оболочки ксенона  $x^{сольв}$  в пределах 0,6 нм в смесях воды с органическими растворителями различного состава.

Органический соразтворитель	$x_1$	$x_2$	$x_{орг}^{сольв}$	$x_{вода}^{сольв}$
Ацетон	0,1	0,9	0,19	0,81
	0,2	0,8	0,32	0,68
	0,5	0,5	0,69	0,31

Органический соразтворитель	$x_1$	$x_2$	$x_{орг}^{сольв}$	$x_{вода}^{сольв}$
Ацетонитрил	0,1	0,9	0,13	0,87
	0,2	0,8	0,29	0,71
	0,5	0,5	0,58	0,42
Диметилсульфоксид	0,1	0,9	0,1	0,9
	0,2	0,8	0,2	0,8
	0,5	0,5	0,5	0,5
Тетрагидрофуран	0,1	0,9	0,26	0,74
	0,2	0,8	0,45	0,55
	0,5	0,5	0,71	0,29

Зависимости энтропий образования полости от состава смеси (рисунок 4.6) также проявляют схожую тенденцию с экспериментальными энтропиями сольватации: небольшие изменения при низких концентрациях воды и резкий спад при высоких. Для ксенона и полости большого размера (0,345 нм) энтропии остаются практически неизменными в смесях воды со всеми изученными органическими соразтворителями. Наиболее ярко это выражено для смесей воды с ацетоном и тетрагидрофураном: в них энтропии остаются неизменными в очень широком диапазоне концентраций, вплоть до мольной доли воды 0,7-0,9. Низкие энтропии образования полости являются характерными для ассоциированных растворителей, проявляющих сольвофобные эффекты. Резкий рост энтропии образования полости при добавлении органического соразтворителя говорит об изменении термодинамики процесса образования полости и подавлении гидрофобного эффекта.

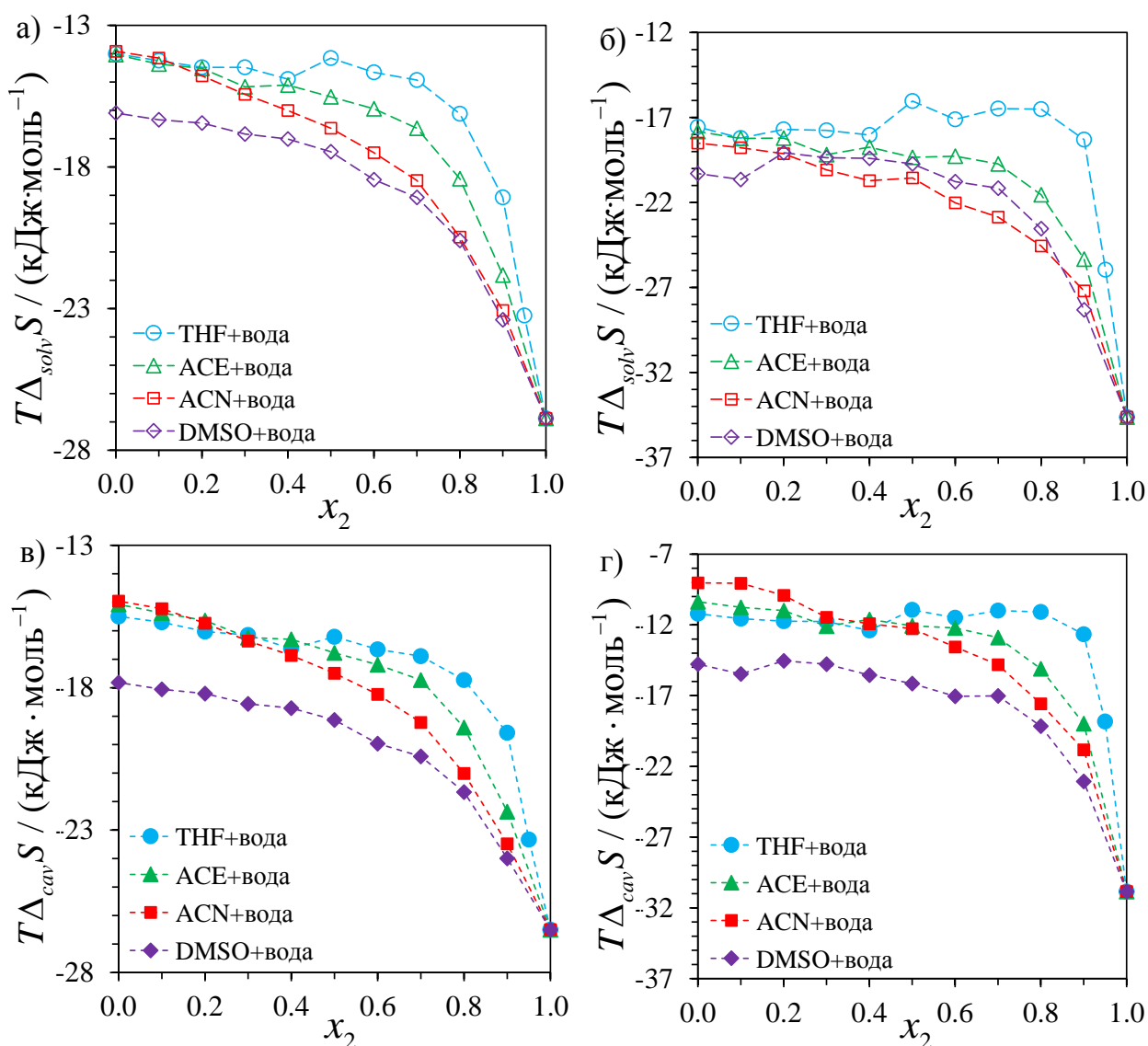


Рисунок 4.6. Зависимости расчетных значений энтропии сольватации неона (а), ксенона (б), образования полостей радиусом 0,28 нм (в) и 0,345 нм (г) в водно-органических смесях от их состава при 298 К.  $x_2$  соответствует мольной доле воды.

Для смесей воды с ацетоном и тетрагидрофураном зависимости энтальпий образования полости и сольватации инертных газов от состава (рисунок 4.7) имеют ярко выраженные максимумы при высоких концентрациях воды. Для смесей диметилсульфоксид-вода максимумы выражены слабо, а для смесей воды с ацетонитрилом они вообще отсутствуют. Таким образом, наблюдается аналогия с поведением экспериментальных энтальпий сольватации углеводородов. Наличие небольших максимумов энтальпий сольватации аргона и ксенона смесях воды с метанолом и трет-бутанолом ранее было показано экспериментально [143].

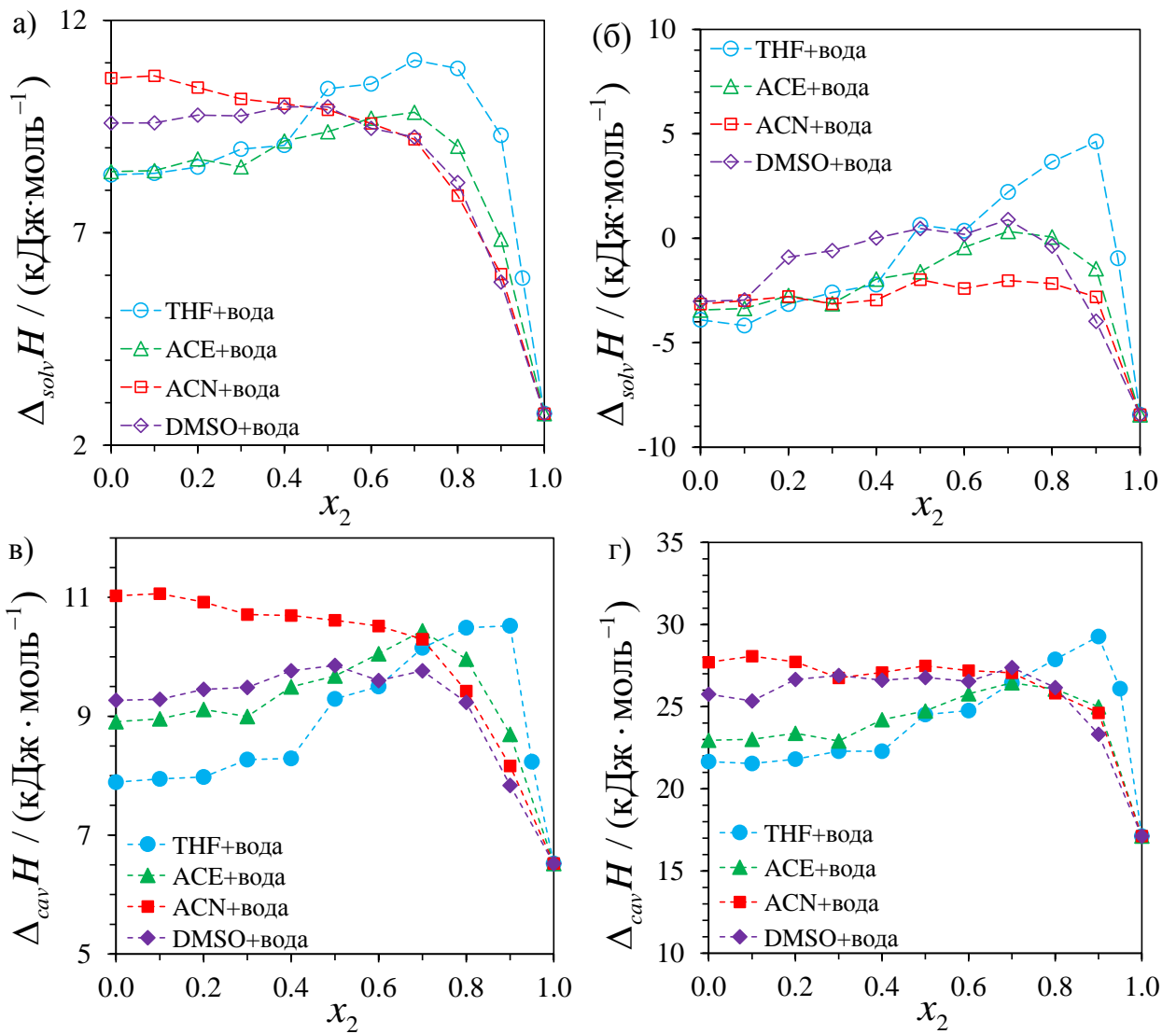


Рисунок 4.7. Зависимости расчетных значений энтальпий сольватации неона (а), ксенона (б), образования полостей радиусом 0,28 нм (в) и 0,345 нм (г) в водно-органических смесях от их состава при 298 К.  $x_2$  соответствует мольной доле воды.

Высокие значения (максимумы) энтальпий образования полости и сольватации, наблюдаемые для смесей с высоким содержанием воды, могут быть объяснены с точки зрения энергетических затрат на реорганизацию растворителя вокруг полости или растворенной молекулы. Движущей силой такой реорганизации является снижение энергии Гиббса за счет преимущественной сольватации растворенного вещества органическим соразтворителем. В ходе реорганизации происходит нарушение водородных связей между молекулами воды, что приводит к высоким положительным изменениям энтальпии.

Значения энтальпий образования полости одного и того же размера хорошо коррелируют с внутренним давлением водно-органических смесей  $P_i$  (рисунок 4.8). Эта величина отражает изменение внутренней энергии растворителя с ростом его объема при постоянной температуре:

$$P_i = \left( \frac{\partial U}{\partial V} \right)_T \quad (4.1)$$

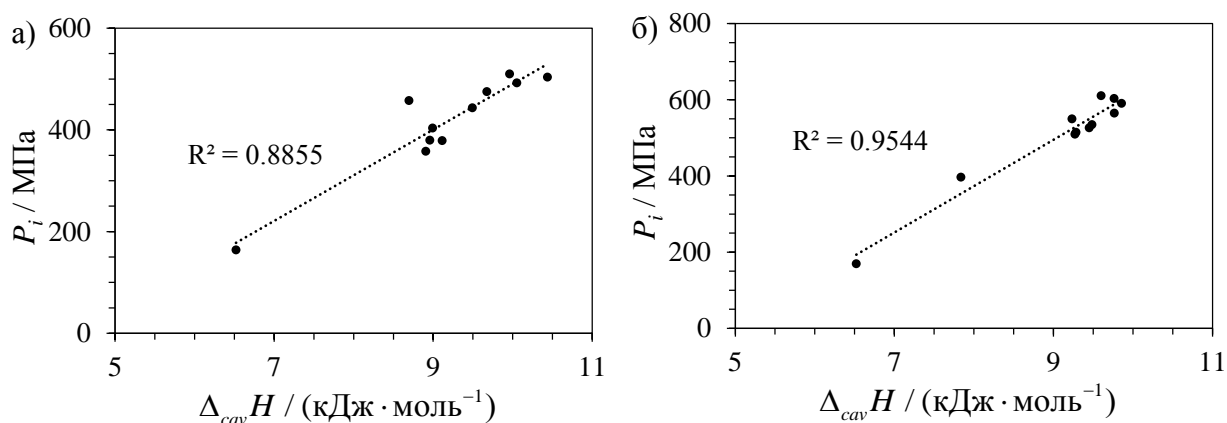


Рисунок 4.8. Соотношения между величиной внутреннего давления и энтальпией образования полости ( $r = 0,28$  нм) для смесей воды с: а) ацетоном, б) диметилсульфоксидом при 298 К. Величины внутреннего давления для смесей различного состава взяты из работ [222, 223].

Связь между поведением экспериментальных термодинамических функций сольватации в водно-органических смесях и расчетных значений термодинамических функций образования полости хорошо прослеживается на графиках  $\Delta G$  против  $\Delta H$  (рисунок 4.9, срав. рисунок 4.4). Для смесей воды с тетрагидрофураном и ацетоном в широком диапазоне составов увеличение концентрации воды не приводит к значительному смещению термодинамических функций образования полости и сольватации инертного газа к их значениям в чистой воде – сохраняется компенсация между энергией Гиббса и энтальпией образования полости, справедливая для процесса сольватации неполярных соединений в апротонных растворителях. Для смесей диметилсульфоксид-вода линейная корреляция между энергией Гиббса и энтальпией образования полости сохраняется в более узком диапазоне составов, а в случае смесей воды с

ацетонитрилом корреляция наблюдается лишь при концентрации воды 10-30 мол. %.

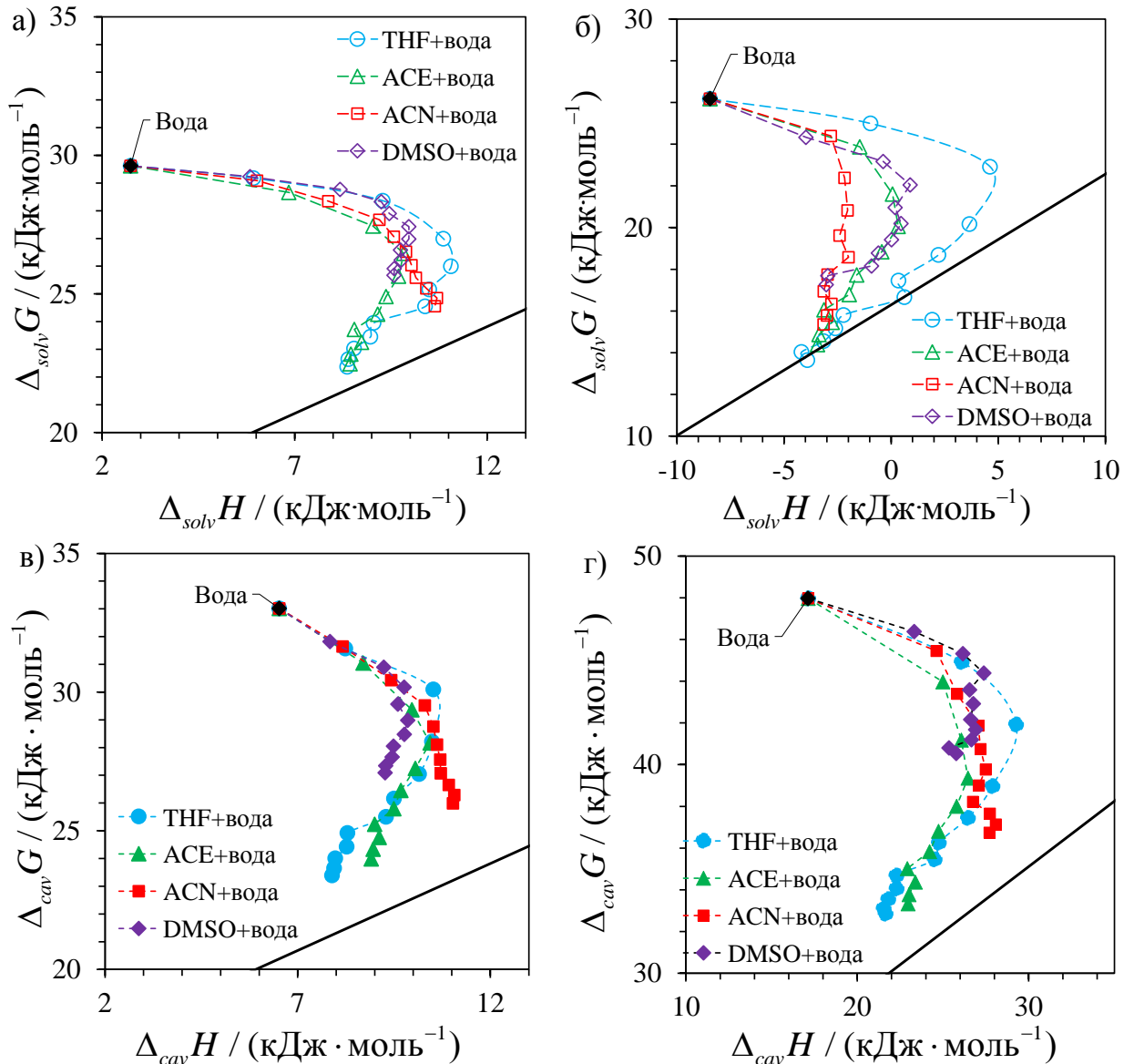


Рисунок 4.9. Графики соотношений между  $\Delta_{sol\nu}G$  и  $\Delta_{sol\nu}H$  для неона (а) и ксенона (б) и соотношений между  $\Delta_{cav}G$  и  $\Delta_{cav}H$  для полостей радиусом 0,28 нм (в) и 0,345 нм (г) в водно-органических смесях при 298 К. Прямая линия соответствует экспериментальной линейной корреляции для процесса сольватации в апротонных растворителях (уравнение 1.3).

Таким образом, полученные методом Видома данные по термодинамическим функциям образования полости, а также данные о сольватном окружении инертных газов и полостей в водно-органических смесях показывают, что подавление



гидрофобного эффекта в основном обусловлено изменением величин энергетических вкладов процесса образования полости. Рост растворимости малополярных соединений, наблюдаемый в эксперименте при добавлении даже небольших количеств органического соразтворителя, связан с уменьшением затрат энергии Гиббса на образование полости, соответствующей по размеру растворяемому веществу.

По результатам исследования подавления гидрофобного эффекта в растворах малополярных низкомолекулярных соединений в водно-органических смесях можно сделать следующие выводы:

1. Наблюдаются хорошо выраженные максимумы энтальпии сольватации малополярных соединений, в том числе алканов, в бинарных смесях с высоким содержанием воды.
2. Добавление небольшого количества органического растворителя к воде приводит к резкому ослаблению гидрофобного эффекта.
3. Ослабление гидрофобного эффекта при добавлении органического растворителя связано с изменением термодинамики процесса образования полости – уменьшением энергии Гиббса и увеличением энтальпии за счет реорганизации растворителя вокруг полости.
4. Образование полостей и сольватация неполярных молекул преимущественно происходит в кластерах, обогащенных органическим соразтворителем.

## Глава 5. Влияние органического растворителя на процесс денатурации белков

5.1 Влияние органического соразтворителя на термическую стабильность  
лизоцима

Все исследованные нами органические соразтворители, а именно, ацетон, ацетонитрил, 1,4-диоксан, диметилсульфоксид, диметилформамид, метанол, изопропанол, трет-бутанол и тетрагидрофуран, действуют как денатурирующие агенты, снижая температуру денатурации лизоцима  $T_d$ . Увеличение концентрации органического соразтворителя всегда приводит к большему снижению температуры денатурации, что проявляется в виде смещения пиков денатурации лизоцима на кривой ДСК в сторону более низких температур (рисунок 5.1).

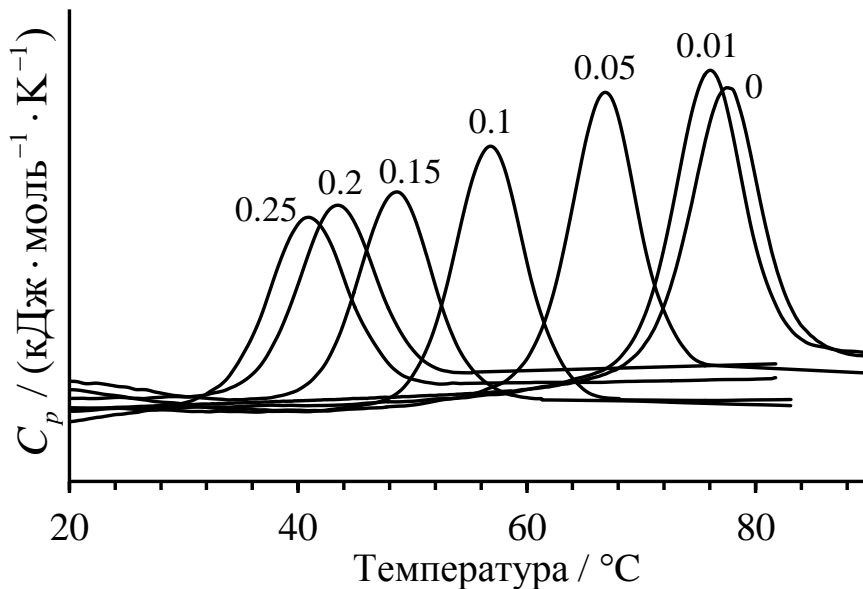


Рисунок 5.1. ДСК-термограммы лизоцима в смесях ацетонитрил-вода различного состава. Мольная доля ацетонитрила в смеси показана над соответствующими пиками денатурации. Скорость нагревания  $0,5 \text{ К} \cdot \text{мин}^{-1}$ .

Значения  $T_d$ , соответствующие максимумам пиков денатурации лизоцима при скоростях нагревания  $0,5$  и  $2 \text{ К} \cdot \text{мин}^{-1}$ , а также калориметрические (полученные интегрированием калориметрических пиков) энтальпии денатурации  $\Delta_d H$  лизоцима во всех исследованных водно-органических смесях приведены в таблице 5.1.

Таблица 5.1. Экспериментальные значения температур денатурации  $T_d$  (температура максимума пика) и энтальпий денатурации лизоцима  $\Delta_d H$  в смесях воды с органическими растворителями ( $x_1$  – мольная доля органического растворителя).

$x_1$	$T_d$ при $0,5 \text{ К}\cdot\text{мин}^{-1}$ , °С	$T_d$ при $2 \text{ К}\cdot\text{мин}^{-1}$ , °С	$\Delta_d H$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
Ацетонитрил			
0,01	75,7	76,6	495
0,05	66,7	67,4	505
0,10	56,8	57,2	460
0,15	48,2	49,2	390
0,20	43,4	44,0	340
0,25	41,0	41,2	306
Ацетон			
0,01	75,0	75,9	495
0,05	65,4	66,0	504
0,10	56,3	56,9	495
0,15	50,0	50,6	460
0,20	44,2	45,0	402
0,25	40,0	40,5	329
1,4-диоксан			
0,01	73,6	74,8	479
0,05	60,8	61,7	427
0,1	49,7	49,9	382
0,15	39,2	39,4	286
Диметилсульфоксид			
0,05	74,1	75,0	539
0,10	70,8	72,1	569
0,20	63,4	65,0	508
0,25	57,1	59,8	476

$x_1$	$T_d$ при $0,5 \text{ К} \cdot \text{мин}^{-1}$ , °С	$T_d$ при $2 \text{ К} \cdot \text{мин}^{-1}$ , °С	$\Delta_d H$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
0,30	51,3	54,1	415
0,35	43,0	–	337
Диметилформаид			
0,05	64,6	65,7	496
0,10	56,4	57,6	455
0,15	50,5	51,7	430
0,20	46,3	46,9	412
0,25	40,4	41,0	382
Метанол			
0,05	73,1	74,0	503
0,10	68,4	69,0	527
0,15	63,3	63,8	499
0,20	60,0	60,4	481
0,30	51,8	52,1	447
0,40	45,0	45,3	404
Изопропанол			
0,01	74,2	74,8	498
0,05	62,5	62,9	506
0,10	51,1	51,6	435
0,15	43,9	44,4	390
0,20	39,2	40,2	343
трет-бутанол			
0,01	72,8	73,4	512
0,05	55,5	56,7	430
0,10	46,6	47,5	325
0,15	42,0	43,5	290
0,20	38,5	40,7	280

$x_1$	$T_d$ при $0,5 \text{ К} \cdot \text{мин}^{-1}$ , °С	$T_d$ при $2 \text{ К} \cdot \text{мин}^{-1}$ , °С	$\Delta_d H$ , кДж·моль <sup>-1</sup>
Тетрагидрофуран			
0,01	72,8	73,2	501
0,03	61,4	61,5	441
0,05	50,5	50,7	417
0,08	38,3	38,5	334

Ошибка определения температуры не превышает  $0,25 \text{ }^\circ\text{C}$ , энтальпии денатурации –  $10 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ .

Смещение пика в сторону более высоких температур с увеличением скорости нагревания связано с кинетикой процесса денатурации [224]. При достаточно низких скоростях нагревания равновесие между нативной и денатурированной формой будет устанавливаться при всех температурах в ходе сканирования. Максимум пика при таких скоростях сканирования очень близок к температуре, при которой константа равновесия процесса денатурации (разворачивания, анфолдинга)  $K = \frac{k_1}{k_{-1}} = 1$ , где  $k_1$  и  $k_{-1}$  – константы скорости денатурации и ренатурации (сворачивания, фолдинга или рефолдинга), соответственно. При увеличении скорости сканирования пик будет сдвигаться в сторону более высоких температур, поскольку равновесие не будет успевать устанавливаться. В таблице 5.2 показано влияние скорости сканирования на температуру максимума пика на примере денатурации лизоцима в чистой воде и в смесях диметилсульфоксид-вода.

Таблица 5.2. Экспериментальные значения температур максимума пика денатурации  $T_d$  при различных скоростях сканирования в воде и в смесях диметилсульфоксид-вода различного состава ( $x_1$  – мольная доля диметилсульфоксида).

$x_1$	Скорость сканирования, $\text{К} \cdot \text{мин}^{-1}$	$T_d$ , °С
0	0,1	77,3
	0,25	77,3
	0,5	77,5

$x_l$	Скорость сканирования, К·мин <sup>-1</sup>	$T_d$ , °С
	1,0	77,9
	2,0	78,3
0,05	0,5	74,1
	1,0	74,5
	2,0	75,0
0,10	0,5	70,8
	1,0	71,6
	2,0	72,1
0,20	0,5	63,4
	1,0	64,1
	2,0	65,0
0,25	0,5	57,1
	1,0	58,2
	2,0	59,8
0,30	0,5	51,3
	1,0	52,9
	2,0	54,1
0,35	0,5	43,0
	1,0	46,3

Из приведенных данных следует, что значения  $T_d$  при 0,5 К·мин<sup>-1</sup> наиболее близки к равновесной температуре денатурации. Они использовались для дальнейшего анализа.

Органические растворители сильно различаются по своему влиянию на термическую стабильность лизоцима (рисунок 5.2). Добавление всего 5 мольных процентов тетрагидрофурана или трет-бутанола приводит к снижению значения температуры денатурации на 20-25 °С, тогда как та же мольная доля метанола или диметилсульфоксида изменяет  $T_d$  всего на 3-5 °С.

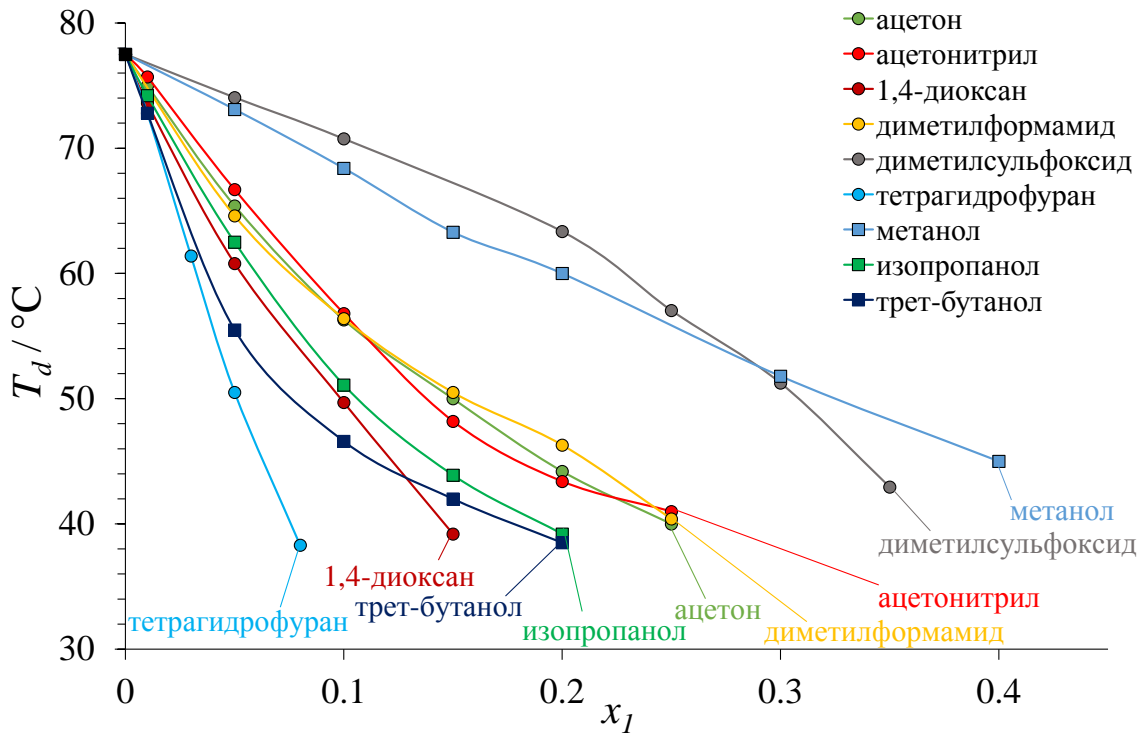


Рисунок 5.2. Зависимость температуры денатурации лизоцима  $T_d$  в водно-органических смесях от мольной доли органического соразтворителя  $x_1$  по данным дифференциальной сканирующей калориметрии при скорости нагревания  $0,5 \text{ К}\cdot\text{мин}^{-1}$ . Линии приведены для наглядности.

Величина изменения температуры денатурации при добавлении органического соразтворителя к воде отражает денатурирующую способность этого соразтворителя. Из рисунка 5.2 видно, что начальный участок зависимости  $T_d$  от мольной доли органического соразтворителя при низких значениях  $x_1$  в первом приближении можно описать линейным уравнением:

$$T_d = T_d(\text{вода}) - k \cdot x_1, \quad (5.1)$$

где  $T_d(\text{вода})$  — температура денатурации лизоцима в чистой воде. Угловой

коэффициент этой прямой  $k = -\left(\frac{\partial T_d}{\partial x_1}\right)_{x_1 \rightarrow 0}$  (5.2) является мерой денатурирующей

способности соразтворителя по отношению к белку. Значения  $-\left(\frac{\partial T_d}{\partial x_1}\right)_{x_1 \rightarrow 0}$  для

исследованных соразтворителей приведены в таблице 5.3. При высоких концентрациях соразтворителя зависимости  $T_d$  от  $x_1$  могут иметь значительную положительную или отрицательную кривизну, что далее не обсуждается.

Таблица 5.3. Денатурирующая способность органических растворителей, определенная как величина углового коэффициента начального участка зависимости температуры денатурации лизоцима  $T_d$  от мольной доли органического соразтворителя  $x_1$ .

Растворитель	$-\left(\frac{\partial T_d}{\partial x_1}\right)_{x_1 \rightarrow 0}$	$-\left(\frac{\partial T_d}{\partial x_1}\right)_{x_1 \rightarrow 0}$ (литературные данные)
Диметилсульфоксид	71	74 <sup>а</sup> [225], 41 <sup>в</sup> [175]
Метанол	91	86 <sup>б</sup> [167], 86 <sup>д</sup> [168]
Ацетонитрил	209	—
Диметилформамид	211	214 <sup>г</sup> [163]
Ацетон	213	214 <sup>г</sup> [163]
Изопропанол	264	251 <sup>б</sup> [167]
1,4-диоксан	277	285 <sup>г</sup> [163]
трет-бутанол	312	294 <sup>б</sup> [167], 469 <sup>б</sup> [170]
Тетрагидрофуран	500	—

<sup>а</sup> без буфера; <sup>б</sup> 0,1 М глициновый буфер, рН 3; <sup>в</sup> 0,1 М глициновый буфер с 0,1 М NaCl, рН 3; <sup>г</sup> 0,05 М глициновый буфер, рН 3; <sup>д</sup> 0,04 М глициновый буфер, рН 2.

Мы также рассчитали значения  $-\left(\frac{\partial T_d}{\partial x_1}\right)_{x_1 \rightarrow 0}$  по данным ДСК для денатурации

лизоцима в исследуемых водно-органических смесях, имеющимся в литературе [163, 167, 168, 170, 175, 225]. Эксперименты проводились при различных условиях (буфер, рН, ионная сила, иногда высокая скорость сканирования до 10 К·мин<sup>-1</sup>). Однако рассчитанные значения в целом согласуются с нашими данными.

Таким образом, рассматриваемые соразтворители по относительной денатурирующей способности можно расположить в следующий ряд:

диметилсульфоксид < метанол < ацетонитрил, диметилформамид, ацетон <  
 изопропанол < 1,4-диоксан < трет-бутанол < тетрагидрофуран



Если пренебречь влиянием буферов и солей, эту серию можно дополнить несколькими другими сорастворителями, изученными ранее в литературе (таблица 5.4).

Таблица 5.4. Денатурирующая способность сорастворителей, определенная как величина углового коэффициента начального участка зависимости температуры денатурации лизоцима  $T_d$  от мольной доли органического сорастворителя  $x_1$  (на основе только литературных данных).

Растворитель	$-\left(\frac{\partial T_d}{\partial x_1}\right)_{x_1 \rightarrow 0}$
Этанол	163 <sup>a</sup> [167], 165 <sup>a</sup> [170], 150 <sup>b</sup> [168]
1-пропанол	391 <sup>a</sup> [167], 473 <sup>b</sup> [168]
2-бутанол	540 <sup>a</sup> [167]
1-бутанол	1185 <sup>a</sup> [167]
Формаид	190 <sup>г</sup> [226]
Этиленгликоль	-14 <sup>б</sup> [184]
Глицерин	-85 <sup>б</sup> [184]

<sup>a</sup> 0,1 М глициновый буфер, pH 3; <sup>б</sup> 0,1 М глициновый буфер с 0,1 М NaCl, pH 2; <sup>в</sup> 0,04 М глициновый буфер, pH 2; <sup>г</sup> без буфера.

Расширенный ряд растворителей по относительной денатурирующей способности выглядит следующим образом:

глицерин < этиленгликоль < вода < диметилсульфоксид < метанол < этанол < формаид < ацетонитрил, диметилформаид, ацетон < изопропанол < 1,4-диоксан < трет-бутанол < 1-пропанол < тетрагидрофуран < 2-бутанол < 1-бутанол.

Аналогичные последовательности наблюдались и для других белков, однако данных для них очень мало. Например, ряд спиртов по их влиянию на термостабильность бычьей рибонуклеазы А и бычьего химотрипсиногена А [172] совпадает с представленным выше. Для бычьей рибонуклеазы А 1,4-диоксан оказался более сильным денатурирующим агентом, чем ДМСО [176]. Результат

также хорошо согласуется с ранее полученными данными Фуджиты и сотр. для денатурации лизоцима в смесях воды с ацетоном, диметилформамидом и 1,4-диоксаном [163].

Полученные с помощью метода ДСК результаты также можно сравнить с исследованиями денатурации белков при постоянной температуре в присутствии денатурантов в различных концентрациях. Влияние органических денатурантов на энергию Гиббса денатурации белка часто описывается уравнением [178]:

$$\Delta_d G(T, c) = \Delta_d G(T, 0) - mc, \quad (5.3)$$

где  $c$  – концентрация денатуранта в молярной или моляльной шкале ( $c \approx \frac{x_1}{V_m(\text{H}_2\text{O})} = 55,6x_1$  при высоком разбавлении),  $\Delta_d G(T, c)$  – энергия Гиббса

денатурации при данном значении  $c$  и температуре  $T$ , а  $m$  – эмпирический параметр, отражающий «денатурирующую способность» денатуранта. Значения  $m$  были определены для денатурации многих белков в присутствии мочевины и хлорида гуанидиния [178] и коррелировали с разностью между площадями поверхности развернутого и свернутого белка. Эквивалентной формой уравнения (5.3) является выражение углового коэффициента  $m$  через производную:

$$m = - \left( \frac{\partial \Delta_d G}{\partial c} \right)_T. \quad (5.4)$$

Предполагая, что  $m$  не зависит от температуры, мы можем связать его со значениями  $\frac{\partial T_d}{\partial x}$  при  $x \rightarrow 0$ , полученными в наших (неизотермических) экспериментах:

$$\frac{\partial T_d}{\partial x} = \left( \frac{\partial T}{\partial x} \right)_{\Delta_d G=0} = - \left( \frac{\partial T}{\partial \Delta_d G} \right)_x \left( \frac{\partial \Delta_d G}{\partial x} \right)_T = - \frac{55,6m}{\Delta_d S} = - \frac{55,6mT_d}{\Delta_d H}, \quad (5.5)$$

$$m = - \frac{\frac{\partial T_d}{\partial x} \Delta_d H}{55,6T_d}. \quad (5.6)$$

Поскольку  $x \rightarrow 0$ , для вычисления используются значения  $\Delta_d H$  и  $T_d$  (К) для белка в чистой воде. Таким образом, величина  $m$  оказывается пропорциональна

$\frac{\partial T_d}{\partial x}$ . В таблице 5.5 показаны значения  $m$  для лизоцима в водно-органических смесях, рассчитанные по формуле (5.6) на основе зависимостей температуры денатурации от концентрации органического соразтворителя. Для соразтворителей, не исследованных нами, было взято среднее значение  $-\frac{\partial T_d}{\partial x_1}$  из таблицы 5.4. Мы видим, что для смесей, содержащих спирты, рассчитанные значения  $m$  изменяются в том же порядке, что и ранее полученные величины  $m$  в эксперименте с рибонуклеазой А [172].

Таблица 5.5. Значения  $m$  для исследуемых соразтворителей, рассчитанные по уравнению 5.6 для денатурации лизоцима, а также взятые из работы [172] для денатурации рибонуклеазы А (ацетатный буфер, pH 5,5).

Растворитель	$m$ (лизоцим)	$m$ (рибонуклеаза А [172])
Глицерин	-2,2	-1,18
Этиленгликоль	-0,4	
Диметилсульфоксид	1,8	
Метанол	2,3	1,73
Этанол	4,0	2,73
Формаид	4,8	
Ацетонитрил	5,3	
Диметилформаид	5,3	
Ацетон	5,4	
Изопропанол	6,7	5,08
1,4-диоксан	7,0	
трет-бутанол	7,9	6,44
1-пропанол	10,9	8,17
Тетрагидрофуран	12,7	
2-бутанол	13,7	10,22
1-бутанол	30,0	18,44

## 5.2 Денатурирующая способность и сольватационные свойства водно-органических смесей

Нативная структура белков зависит от многочисленных внутри- и межмолекулярных взаимодействий. Добавление органического соразтворителя изменяет баланс этих взаимодействий. Гидрофобный эффект общепризнан как ключевой фактор стабильности нативной пространственной структуры глобулярных белков [70, 227]. В качестве доказательства многочисленные исследования выявили сходные тенденции между термодинамическими функциями разворачивания различных белков в воде и термодинамическими функциями растворения углеводов в воде [67, 68]. Неоднократно подчеркивалась связь между снижением стабильности нативной структуры белка и ослаблением гидрофобного эффекта в присутствии органических соразтворителей [168, 228]. Процесс разворачивания глобулярного белка сопровождается воздействием соразтворителя на неполярные боковые цепи аминокислотных остатков [229–232]. Поэтому представляет интерес сравнить денатурирующую способность органических соразтворителей с термодинамическими свойствами растворов неполярных соединений в бинарных водно-органических смесях, которые напрямую зависят от способности соразтворителя подавлять гидрофобный эффект. Следует понимать, что денатурация затрагивает большое количество водородных связей, электростатических и других взаимодействий, причем органические соразтворители влияют на все эти взаимодействия. Общие тенденции для термодинамических функций денатурации и сольватации не могут быть использованы для построения теорий о гидрофобном эффекте как единственном факторе, регулирующем сворачивание белка, а просто подчеркивают его важную роль.

В разделе 4.1 подробно обсуждалась термодинамика сольватации углеводов в различных водно-органических смесях. Было показано, что энергия Гиббса сольватации  $\Delta_{solv}G$  углеводов быстро уменьшается при

увеличении содержания органического соразтворителя из-за подавления гидрофобного эффекта. При малых значениях мольной доли органического соразтворителя  $x_1$  (до 0,1–0,15) зависимость  $\Delta_{solv}G$  от  $x_1$  близка к линейной:

$$\Delta_{solv}G(x_1) = \Delta_{solv}G(0) - ax_1, \quad (5.7)$$

где  $\Delta_{solv}G(x_1)$  и  $\Delta_{solv}G(0)$  – энергии Гиббса сольватации в смеси с мольной долей органического соразтворителя  $x_1$  и в чистой воде, соответственно. Следовательно,

угловой коэффициент этой зависимости  $a$  равен  $-\left(\frac{\partial\Delta_{solv}G}{\partial x_1}\right)_T$ . Из всех

углеводородов больше всего экспериментальных данных получено по энергиям Гиббса сольватации бензола в различных водно-органических смесях (раздел 4.1 и

работы [96]). В таблице 5.6 показаны значения  $-\left(\frac{\partial\Delta_{solv}G}{\partial x_1}\right)_T$  для бензола и

различных соразтворителей при 298 К. Сравнение значений  $-\left(\frac{\partial\Delta_{solv}G}{\partial x_1}\right)_T$  и  $m$  из

таблицы 5.5 представлено на рисунке 5.3.

Таблица 5.6. Значения  $-\left(\frac{\partial\Delta_{solv}G}{\partial x_1}\right)_T$  для бензола в различных водно-органических

смесях при 298 К.

Растворитель	$-\left(\frac{\partial\Delta_{solv}G}{\partial x_1}\right)_T$
Диметилсульфоксид <sup>а</sup>	27
Метанол <sup>б</sup>	21
Ацетонитрил <sup>б</sup>	40
Ацетон <sup>а</sup>	43
Изопропанол <sup>б</sup>	57
1,4-диоксан <sup>а</sup>	55
трет-бутанол <sup>а</sup>	62
Тетрагидрофуран <sup>в</sup>	81

<sup>а</sup>из наших экспериментальных данных, <sup>б</sup>из работы [96], <sup>в</sup>экстраполированные данные по значениям для гомологичных аренов из работы [96].

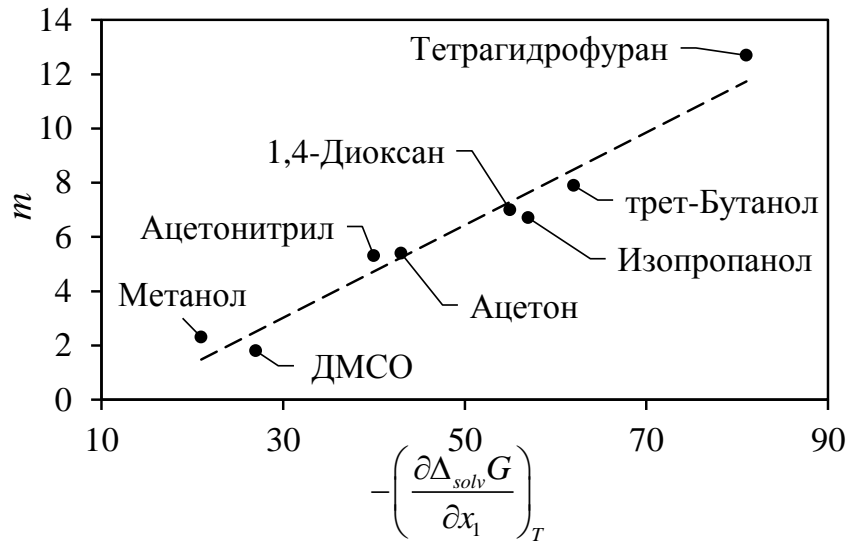


Рисунок 5.3. Соотношение между величиной  $m = -\left(\frac{\partial \Delta_d G}{\partial c}\right)_T$  для лизоцима и величиной  $-\left(\frac{\partial \Delta_{solv} G}{\partial x_1}\right)_T$  для бензола в присутствии различных органических соразтворителей.

Линейный тренд на рисунке 5.3 означает, что процессы сольватации неполярных остатков вносят большой вклад в энергию Гиббса денатурации. Следует подчеркнуть, что органические соразтворители способны к предпочтительной сольватации неполярных фрагментов, что приводит к образованию вокруг них сольватной оболочки, обогащенной молекулами органического соразтворителя. Этот эффект более выражен для соразтворителей с более крупными алкильными группами, таких как изомерные бутанола [233, 234]. Те же соразтворители оказываются наиболее сильными денатурирующими агентами из-за благоприятной предпочтительной сольватации неполярных боковых цепей белка. Предположение о доминирующей роли в дестабилизации нативной белковой структуры взаимодействия поверхности белка с органическим соразтворителем ранее также было высказано Ковригиным и сотр. [235].

### 5.3 Энтальпии денатурации лизоцима в водно-органических смесях

Во всех смесях, кроме смесей с 1,4-диоксаном и диметилформамидом, добавление небольших количеств органического соразтворителя приводит к заметному увеличению энтальпий денатурации лизоцима с максимумом в диапазоне 0,01–0,1. При добавлении большего количества соразтворителя происходит монотонное уменьшение энтальпии денатурации. Максимумы энтальпий денатурации лизоцима в водно-органических смесях ранее наблюдались в нескольких работах [163, 167, 170, 174, 225]. Авторы объясняли их изменением структуры белков в смесях [174], предпочтительной сольватацией лизоцима органическими соразтворителями [225], изменением структурных свойств водных растворов при добавлении органических соразтворителей [163]. Следует понимать, что энтальпии денатурации в смесях с разными  $x_1$  относятся к разным температурам денатурации  $T_d$ . Для обсуждения закономерностей влияния растворителя на энтальпии денатурации они должны быть сначала приведены к единой температуре с помощью данных об изменении теплоемкости в ходе денатурации. На наш взгляд, значительные погрешности в величинах энтальпий и теплоемкостей делают количественный анализ бесполезным. Однако очевидно, что энтальпии денатурации, приведенные к  $T_d$  в чистой воде путем добавления положительного вклада  $\Delta_d C_p \cdot \Delta T_d$ , будут демонстрировать еще более заметный рост при малых значениях  $x_1$ , в отличие от энергий Гиббса денатурации, монотонно уменьшающихся с увеличением концентрации соразтворителя. Это коррелирует с резким ростом энтальпий сольватации углеводов в водно-органических смесях при добавлении до 10-20 мольных процентов органического соразтворителя (см. раздел 4.1), что также обусловлено эффектами предпочтительной сольватации. Таким образом, на вид зависимости энтальпий денатурации от концентрации соразтворителя-денатуранта большое влияние оказывает вклад сольватации неполярных боковых цепей, которые в ходе денатурации становятся доступны растворителю.

#### 5.4 Влияние органического соразтворителя на механизм термического разрушения нативной структуры лизоцима

Как уже обсуждалось в разделе 5.1, добавление органического растворителя к водному раствору белка в целом снижает термическую стабильность нативной структуры. При анализе экспериментальных данных было обнаружено, что различные методы, такие как дифференциальная сканирующая калориметрия, флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма в ближнем и дальнем УФ-диапазоне, могут приводить к различным значениям  $T_d$  для одной и той же системы. Это можно объяснить тем, что разные конформационные изменения белка могут вносить разный вклад в регистрируемые величины сигналов. Существуют отдельные свидетельства того, что в присутствии органических соразтворителей стабильность вторичной и третичной структур белка может изменяться по-разному [236–238]. В настоящем разделе обсуждается влияние различных органических растворителей на термическую стабильность вторичной и третичной структуры лизоцима.

##### 5.4.1 Термическая стабильность третичной структуры лизоцима в водно-органических смесях

Нарушение третичной структуры белков во время денатурации вызывает изменения спектров кругового дихроизма в диапазоне длин волн 250-300 нм. На примере диметилсульфоксида нами была изучена термическая стабильность третичной структуры лизоцима при различных концентрациях органического соразтворителя. При 20 °С лизоцим имеет схожие спектры КД в ближнем УФ-диапазоне в смесях, содержащих менее 37,5 мольных процентов (70 объемных %) ДМСО [239], что указывает на сохранение нативной третичной структуры лизоцима во всех исследованных смесях с ДМСО при низкой температуре. Развернутая форма имеет малоинтенсивный и малоинформативный сигнал КД, что не позволяет сделать выводы о различиях структур этой формы в разных смесях.



Температурные зависимости доли развернутых молекул лизоцима  $f_U$  в смесях воды с ДМСО различного состава показаны на рисунке 5.4. Полученные кривые можно сравнить с температурными зависимостями степени превращения белка  $\alpha$ , выраженной как доля поглощенного тепла при денатурации в ДСК-эксперименте при минимальной скорости нагревания ( $0,5 \text{ К}\cdot\text{мин}^{-1}$ ) при температуре  $T$ . Эти зависимости также показаны на рисунке 5.4.

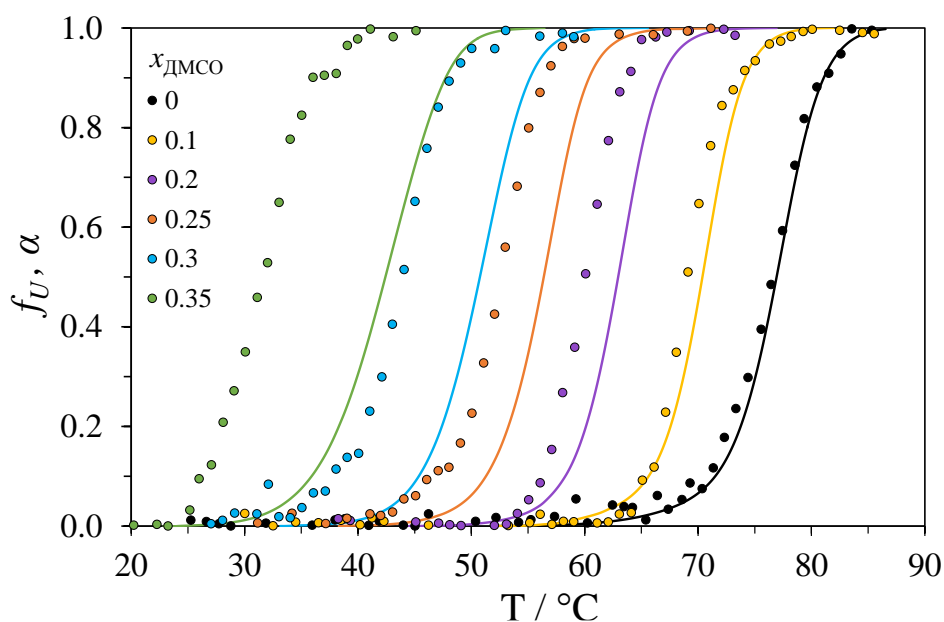


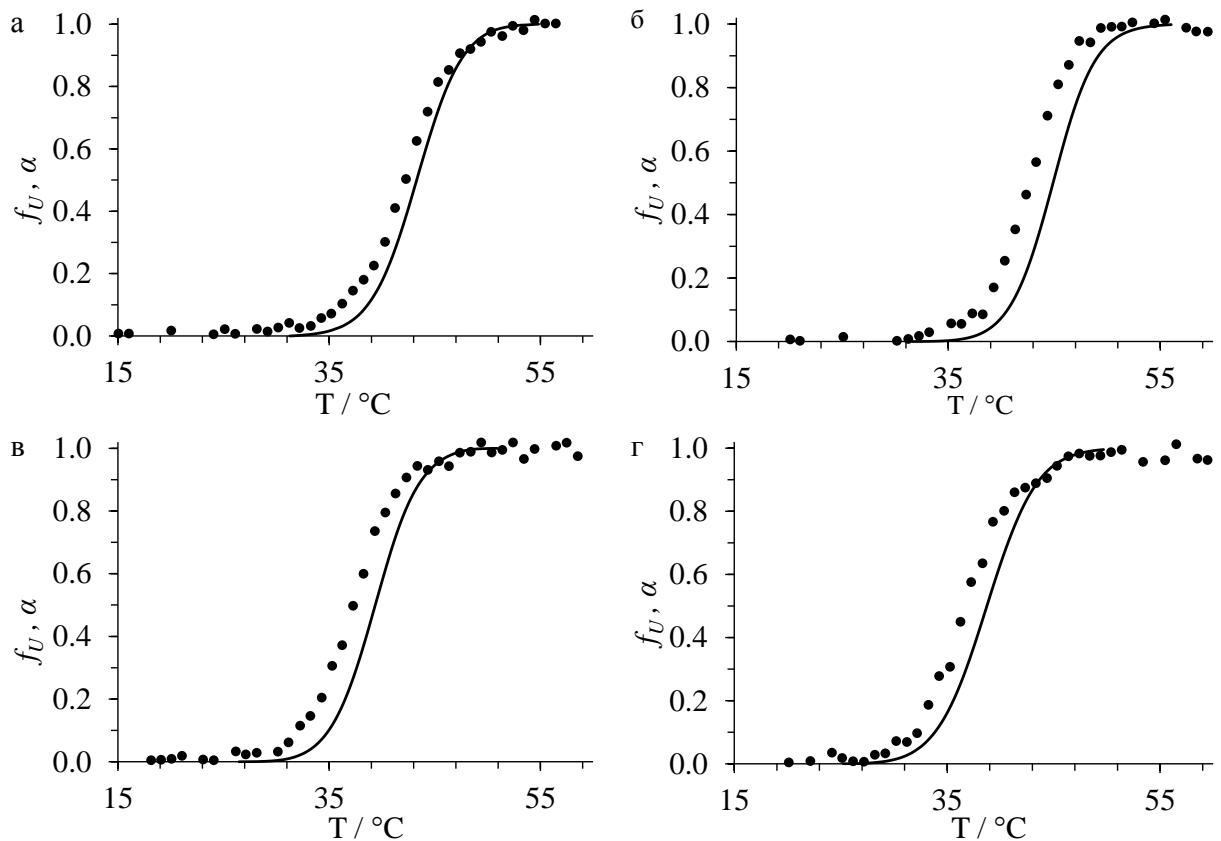
Рисунок 5.4. Температурные зависимости доли молекул лизоцима с утраченной третичной структурой по данным КД ( $f_U$ , кружки) и степени превращения лизоцима по данным ДСК при скорости нагревания  $0,5 \text{ К}\cdot\text{мин}^{-1}$  ( $\alpha$ , сплошные линии) в смесях воды с ДМСО. Данные для смесей с разными мольными долями ДМСО  $x_l$  показаны разным цветом.

Для всех исследованных смесей ДМСО-вода разности между температурой  $T_d$  максимума пика ДСК (при скорости нагрева  $0,5 \text{ К}\cdot\text{мин}^{-1}$ ) и температурой  $T_{CD}$ , соответствующей максимуму производной  $\frac{df_U}{dT}$ , приведены в таблице 5.7. Для денатурации лизоцима в воде  $T_{CD}$  примерно равна  $T_d$ . С увеличением концентрации ДМСО  $T_{CD}$  все больше отличается от  $T_d$ .

Таблица 5.7. Разность между температурой  $T_d$  максимума пика ДСК (при скорости нагревания  $0,5 \text{ K} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) и температурой  $T_{CD}$  для смесей ДМСО – вода с различным содержанием ДМСО  $x_1$ .

$x_1$	$T_d - T_{CD}, ^\circ\text{C}$
0	0,6
0,1	1,7
0,2	3,6
0,25	4,4
0,3	7,3
0,35	11,7

Сравнение результатов двух методов было также проведено для более широкого круга растворителей. На рисунке 5.5 сравниваются степень изменения третичной структуры  $f_U$  по данным КД и степень превращения лизоцима  $\alpha$  по данным ДСК в различных водно-органических смесях. Концентрация соразтворителей была выбрана таким образом, чтобы денатурация наблюдалась в удобном для измерений диапазоне температур 35-50  $^\circ\text{C}$ .



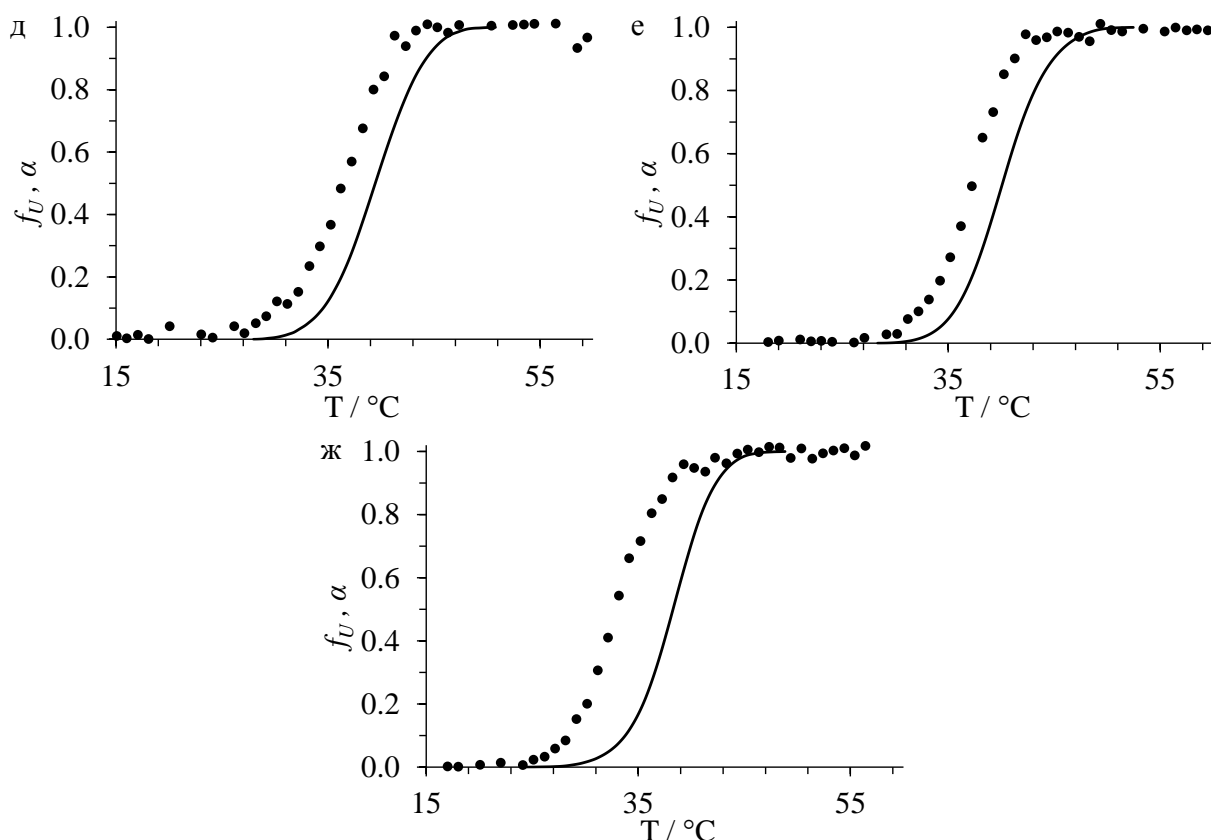


Рисунок 5.5. Температурные зависимости доли молекул лизоцима с утраченной третичной структурой  $f_U$  по данным КД (кружки) и степени превращения  $\alpha$  лизоцима по данным ДСК (сплошная линия) в смесях, содержащих: а) ацетонитрил (20 мол. %), б) метанол (40%), в) изопропанол (20%), г) трет-бутанол (20%), д) 1,4-диоксан (15%), е) диметилформамид (25%), ж) тетрагидрофуран (8 %).

Расхождение между  $T_{CD}$  и  $T_d$  варьируется в зависимости от природы соразтворителя. В случае смесей с ацетонитрилом эти две температуры почти одинаковы. Небольшая разница  $T_d - T_{CD}$  (от 2 до 3 °С) наблюдается для смесей, содержащих метанол, изопропанол, трет-бутанол, 1,4-диоксан и диметилформамид. Разница  $T_d - T_{CD}$  достигает 5,5 °С для смеси, содержащей 8 мол. % тетрагидрофурана.

Ранее различия между  $T_d$  из ДСК-экспериментов и  $T_{CD}$  из КД-экспериментов наблюдалась для разворачивания  $\beta$ -лактоглобулина А в кислом растворе [240] и некоторых других системах [241]. В смесях, для которых температуры денатурации из КД и ДСК различаются, только часть общего тепла денатурации поглощается при достижении  $T_{CD}$  (рисунки 5.4 и 5.5). Это означает, что процессы, вызывающие

изменение сигнала КД на длине волны 290 нм, могут сопровождаться небольшими тепловыми эффектами. Изменения спектров КД в ближнем УФ-диапазоне связано с нарушениями третичной структуры белков. На ранней стадии разворачивания сорастворители могут проникать в определенные области нативного белка и нарушать взаимодействия между хромофорами [242, 243], которые влияют на сигнал КД. Для смесей с ДМСО значения  $T_d$  из калориметрических экспериментов близки к температурам разрушения вторичной структуры лизоцима в смесях ДМСО-вода, полученным из анализа ИК-Фурье-спектров [244]. При увеличении концентрации ДМСО и тетрагидрофурана можно ожидать ускорения проникновения их молекул в белковые глобулы, что приводит к появлению пика КД задолго до того, как произойдет полная денатурация молекулы лизоцима.

#### 5.4.2 Термическая стабильность вторичной структуры лизоцима в водно-органических смесях

Возможное различие в термической стабильности третичной и вторичной структуры лизоцима может быть выявлено путем сравнения температурных зависимостей сигналов КД в дальнем и ближнем УФ диапазонах. Изменение вторичной структуры белков можно отслеживать по изменению сигнала эллиптичности в дальней УФ-области (длины волн меньше 250 нм). К сожалению, многие из исследованных сорастворителей (ацетон, диметилсульфоксид, диметилформамид и диоксан) обладают высоким поглощением в дальней УФ-области, что не позволяет нам наблюдать изменения сигнала спектроскопии кругового дихроизма в этой области. Более того, если денатурация в чистой воде приводит к значительному изменению интенсивности сигнала КД в дальнем УФ-диапазоне (рисунок 5.6а), то в водно-органических смесях изменения часто выражены слабо. Кроме того, базовый уровень сигнала КД в дальнем УФ-диапазоне сильно изменяется в зависимости от температуры. Результаты для смесей, содержащих спирты или тетрагидрофуран (рисунки 5.6б–5.6д), показывают, что уменьшение абсолютного значения эллиптичности, которое

отражает потерю вторичной структуры (а точнее  $\alpha$ -спиралей), продолжается выше температуры, при которой заканчивается скачок сигнала третичной структуры.

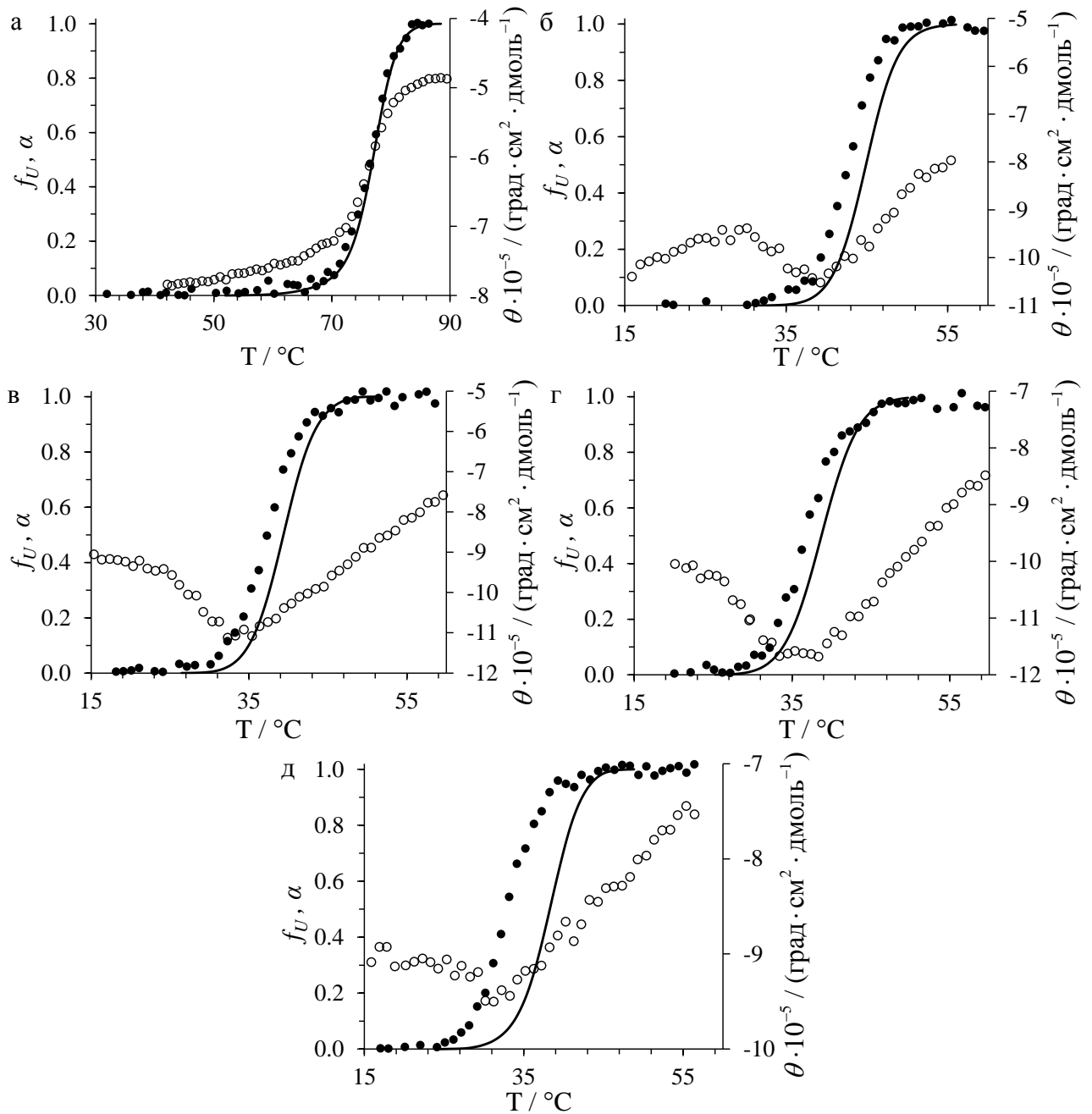


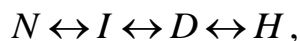
Рисунок 5.6. Сравнение температурных зависимостей сигнала КД при 222 нм, отражающего изменения вторичной структуры лизоцима (пустые кружки), доли молекул лизоцима с утраченной третичной структурой  $f_U$  (темные кружки) и степени превращения  $\alpha$  из экспериментов ДСК (сплошная линия) в а) воде и смесях, содержащих б) метанол (40 мол.%), в) изопропанол (20%), г) трет-бутанол (20%), д) тетрагидрофуран (8%).

Это наблюдение говорит в пользу гипотезы о более высокой термической стабильности вторичной структуры по сравнению с третичной в водно-органических смесях. Изменения вторичной структуры происходят в широком диапазоне температур выше  $T_{CD}$ . На термограммах ДСК нет отдельного пика, характеризующего поглощения теплоты в результате этих изменений, так как непрерывное поглощение тепла будет выглядеть так же, как изменение базовой линии. Максимум пика ДСК ( $T_d$ ) смещается в сторону более высоких температур от  $T_{CD}$ , но в большинстве случаев остается довольно близким к нему. В водно-спиртовых смесях скачку из-за нарушения вторичной структуры на температурной зависимости сигнала КД при 222 нм предшествует другой скачок ниже  $T_{CD}$ , который приводит к максимуму абсолютного значения эллиптичности при 222 нм около  $T_{CD}$  и указывает на увеличение доли  $\alpha$ -спиральных элементов вблизи температуры денатурации.

Ранее в исследованиях денатурации различных белков под воздействием высоких концентраций спиртов при комнатной температуре [238, 245, 246] наблюдалось денатурированное состояние с высоким содержанием  $\alpha$ -спиралей. Более высокая термическая стабильность по сравнению с третичной структурой была продемонстрирована для вторичной структуры лизоцима в глицерине [237, 247], рибонуклеазы А в смеси воды с метанолом [236] и в присутствии мочевины и ее алкильных производных [248]. Более того, в изотермических экспериментах разрушение третичной структуры происходит при более низкой концентрации различных органических соразтворителей, чем изменения во вторичной структуре [238, 245, 249], что свидетельствует о наличии промежуточного состояния (расплавленной глобулы). Расплавленные глобулы также образуются для многих белков при низком рН и могут быть стабильными в довольно широком диапазоне температур [250–256].

Схожий результат был ранее также показан для процесса денатурации  $\alpha$ -лактальбумина в смесях этанол-вода в изотермических условиях [257]. Увеличение концентрации спирта приводит к разрушению третичной структуры и увеличению доли  $\alpha$ -спиралей в лактальбумине. Кроме того, при экстраполяции результатов ДСК

на изотермические условия оказалось, что изменения сигнала вторичной структуры в КД-спектроскопии и сигнала ДСК происходят при близких концентрациях этанола. Авторами была предложена следующая схема структурных изменений, происходящих в белке:



где  $N$  и  $D$  – нативное и денатурированное состояния,  $I$  и  $H$  – состояния, детектируемые в ближней и дальней УФ-областях КД, соответственно. Однако, как и в наших экспериментах, в воде и смесях с этанолом авторы наблюдали только один пик ДСК, соответствующий единственному одностадийному переходу. Было высказано предположение, что состояния  $N$  и  $I$  являются глобулярными конформациями, близкими по энергии. У состояний  $D$  и  $H$ , отличающихся вторичной структурой, тоже предполагаются близкие значения энергии. Отсутствие ДСК-пика денатурации наблюдалось ранее для частично развернутого состояния  $\alpha$ -лактальбумина, полученного в кислых условиях [258].

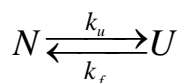
Наши результаты показывают, что во время термической денатурации лизоцима в присутствии органических соразтворителей весьма вероятно образование расплавленной глобулы с нарушенными третичными контактами и увеличенной спиральной структурой. Дальнейшее нагревание приводит к разрушению вторичной структуры расплавленной глобулы.

## 5.5 Механизм денатурации лизоцима в водно-органических смесях

### 5.5.1 Одно- или многостадийный механизм?

Возможность существования промежуточных состояний белка при денатурации является ключевой проблемой для анализа экспериментальных данных, связанных с кинетикой денатурации белков. В ряде работ [237, 241, 259–261] доказывалось, что термически индуцированное разворачивание лизоцима в воде представляет собой одностадийный обратимый процесс перехода из

нативного ( $N$ ) в полностью развернутое (денатурированное) состояние ( $U$ ), без участия интермедиатов:



где  $k_u$  и  $k_f$  – константы скорости разворачивания и сворачивания соответственно. Константа равновесия для такого процесса определяется выражением:

$$K = \frac{[U]}{[N]} = \frac{k_u}{k_f}. \quad (5.8)$$

Ряд других работ ставят под сомнение эту точку зрения, предполагая существование промежуточного состояния или состояний [262–266]. Как показано в предыдущем разделе, разрушение нативной структуры лизоцима в воде и ее смесях с органическими соразтворителями происходит по разному. В чистой воде вторичные и третичные структуры разрушаются одновременно при определенной температуре. В водно-органических механизм разрушения нативной структуры зависит от природы растворителя и его содержания. Во многих случаях третичные контакты практически полностью разрываются до разрушения вторичной структуры. Разница температур пиков КД и ДСК увеличивается с увеличением концентрации денатуранта. Поэтому совершенно очевидно, что мы не можем рассматривать денатурацию лизоцима в присутствии многих органических растворителей, например, ДМСО или тетрагидрофурана, как одностадийный процесс. Следует различать как минимум две стадии разворачивания. Вторая стадия, сопровождающаяся полным разрушением нативной структуры, протекает значительно медленнее и происходит при более высоких температурах. Однако полученные данные не могут исключить необходимости использования более сложной кинетической схемы с несколькими стадиями.

Вероятно, что даже в чистой воде разворачивание лизоцима нельзя рассматривать как одностадийный процесс. Аргументом в пользу многоступенчатого механизма является зависимость положения пика ДСК от скорости сканирования. Очевидно, что в экспериментах ДСК при достаточно низких скоростях нагревания равновесие разворачивания будет устанавливаться



при всех температурах во время сканирования. Максимум пика при таких скоростях сканирования очень близок (но не в точности равен из-за асимметрии пика) температуре, при которой  $K = 1$ . При увеличении скорости сканирования пик будет сдвигаться в сторону более высоких температур, поскольку равновесие больше не будет устанавливаться [224]. На рисунке 5.7 представлены результаты численного моделирования кривых ДСК для гипотетического обратимого одностадийного процесса денатурации в чистой воде. Для моделирования мы предположили, что нижний предел константы скорости разворачивания лизоцима в чистой воде при  $T_d = 77$  °С равен  $20 \text{ мин}^{-1}$  [259], энергия активации разворачивания составляет  $259 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ , а энергия активации ренатурации равна  $56 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$  [267]. Смещение максимума пика при увеличении скорости нагревания от  $0,5$  до  $2 \text{ К}\cdot\text{мин}^{-1}$  не превышало  $0,02 \text{ К}$ .

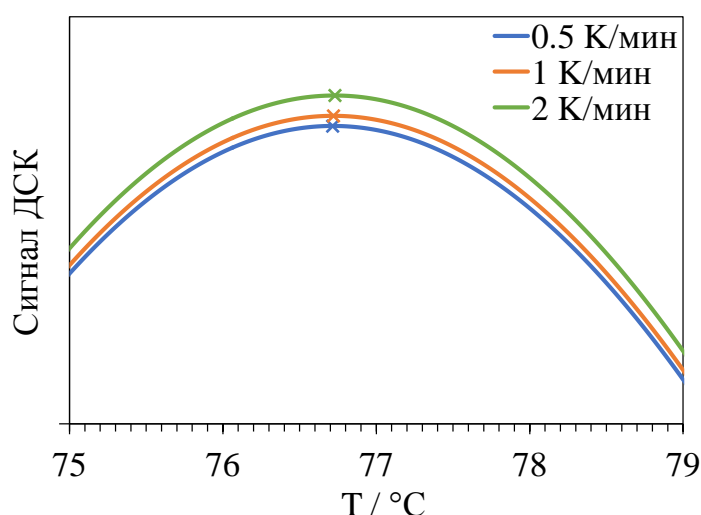


Рисунок 5.7. Результаты численного моделирования кривых ДСК при скоростях нагревания  $0,5$ ,  $1$  и  $2 \text{ К}\cdot\text{мин}^{-1}$  для гипотетического обратимого одноступенчатого процесса денатурации в чистой воде.

Экспериментально наблюдаемый сдвиг пика более чем на  $1$  °С (раздел 5.1, таблицы 5.1 и 5.2) наблюдался бы, если бы константа скорости разворачивания была значительно ниже или если бы разница между энергиями активации прямого и обратного процессов была небольшой, что возможно только при низкой энтальпии денатурации и не соответствует реальному положению дел. В случае

двух- или многоступенчатого развертывания наличие ступени, удовлетворяющей одному из этих условий, может привести к наблюдаемому сдвигу.

Возможность существования интермедиата при разворачивании лизоцима впервые была обсуждена Приваловым [263]. В более поздней работе Привалов пришел к выводу, что форма пика денатурации ДСК лучше описывается моделью с тремя состояниями, чем моделью денатурации с двумя состояниями [262]. Аналогичный вывод был недавно сделан Мазуренко и др. [264]. В работе [268] было обнаружено, что спектры комбинационного рассеяния боковых групп лизоцима изменяются при более низкой температуре, чем полоса амид I остова белка. Это было связано с предшествующими изменениями в третичной структуре без разрушения вторичной структуры. Моделирование разворачивания лизоцима в воде при высоких температурах (раздел 5.6. и работа [266]) также показывает возможное существование промежуточного состояния с частично нарушенными нативными контактами, которое сохраняет компактную структуру. Полученные нами результаты дают еще больше доказательств неодностадийного механизма разворачивания.

#### 5.5.2 Влияние органического соразтворителя на кинетику разрушения нативной структуры лизоцима

На примере смесей с высоким содержанием диметилсульфоксида было изучено влияние органического соразтворителя на кинетику разрушения нативной структуры лизоцима. При денатурации лизоцима в смесях ДМСО-вода происходит увеличение интенсивности его флуоресценции (рисунок 5.8а) из-за изменения окружения фрагментов флуорофора в молекуле белка. Интенсивность флуоресценции начинает резко возрастать при приближении к температуре денатурации белка, достигает максимального значения, а затем уменьшается при более высоких температурах, что, вероятно, связано с температурным гашением флуоресценции. Пример температурной зависимости интенсивности флуоресценции лизоцима в смеси воды с 30 мол.% ДМСО показан на рисунке 5.8б.

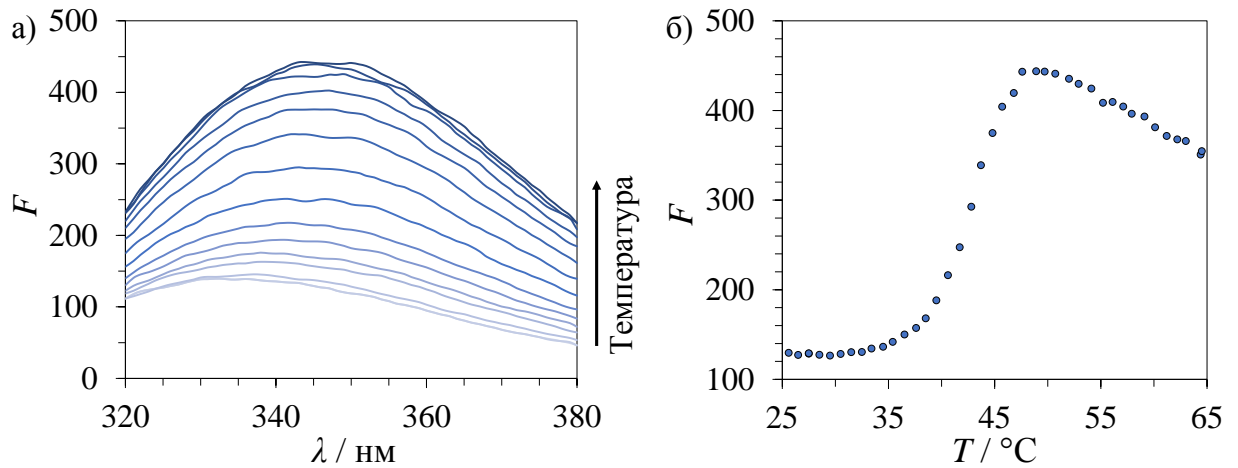


Рисунок 5.8. а) Изменение спектра флуоресценции и б) сигнала флуоресценции при длине волны 345 нм лизоцима в смесях ДМСО-вода при нагревании. Мольная доля ДМСО равна 0,30.

Степень разворачивания белка по спектрофлуориметрическим данным можно охарактеризовать уравнением, аналогичным уравнению (3.15), используемому при изучении денатурации методом КД:

$$f'_U = \frac{F - (F_N + n_N T)}{(F_U + n_U T) - (F_N + n_N T)}, \quad (5.9)$$

где  $F$  – измеренная интенсивность флуоресценции на выбранной длине волны, а  $F_N + n_N T$  и  $F_U + n_U T$  – линейные аппроксимации базовых линий для нативной и развернутой форм белка, соответственно. Температурная зависимость  $f'_U$  для лизоцима в смеси, содержащей 30 мол.% ДМСО, показана на рисунке 5.9.

Температуры, соответствующие максимуму производной  $\frac{df'_U}{dT}$ , очень близки к значениям  $T_{CD}$  для той же смеси, т.е. скачок интенсивности флуоресценции связан с началом нарушения третичной структуры лизоцима. Таким образом, кинетику разрушения третичной структуры можно изучить, проследив зависимость интенсивности флуоресценции лизоцима от времени при постоянной температуре. Сигнал флуоресценции не содержит шумов и стабилен по сравнению с сигналом КД, что позволяет проводить более точные измерения, включая оценку энергии активации по температурным зависимостям констант скорости.

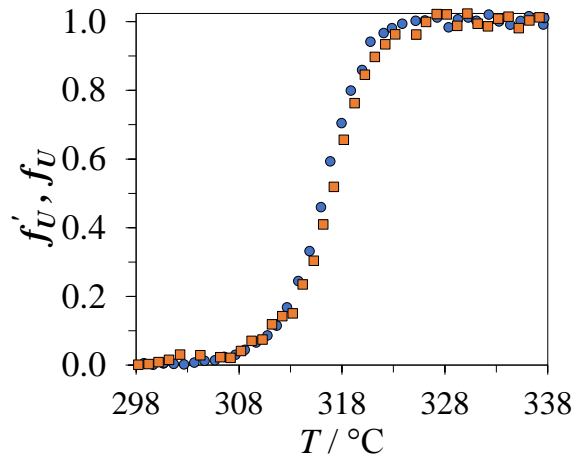


Рисунок 5.9. Температурная зависимость степени разворачивания лизоцима  $f_U'$ , определенная по данным флуоресценции (кружки) и КД при 290 нм (квадраты) в смеси ДМСО-вода с мольной долей ДМСО  $x_1 = 0,30$ .

В соответствии с приведенными выше данными, изучение изменения интенсивности флуоресценции лизоцима во времени в смесях ДМСО-вода может дать информацию только о кинетике начальной стадии процесса разворачивания, сопровождающейся разрывом по крайней мере части третичных контактов в нативной структуре лизоцима. Если мы рассмотрим эту стадию как обратимый переход нативного состояния  $N$  в разворачивающийся интермедиат  $I$  по схеме  $N \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} I$ , где как прямой, так и обратный процессы относятся к первому порядку, и предположим, что каждое состояние независимо вносит вклад в общую флуоресценцию пропорционально своей концентрации, то интенсивность флуоресценции изменяется со временем в соответствии со следующим уравнением:

$$F(t) = F(\infty) - (F(\infty) - F(0)) \exp(-(k_1 + k_{-1})t), \quad (5.10)$$

где  $F(0)$ ,  $F(\infty)$  и  $F(t)$  – интенсивности флуоресценции в начальный момент времени, после длительного уравнивания и в момент времени  $t$ , соответственно. Следовательно, описание зависимости интенсивности флуоресценции от времени экспоненциальной функцией позволяет найти сумму констант скорости прямого и обратного процессов. Пример графика зависимости

интенсивности флуоресценции лизоцима от времени, записанный при постоянной температуре выше  $T_{CD}$ , показан на рисунке 5.10.

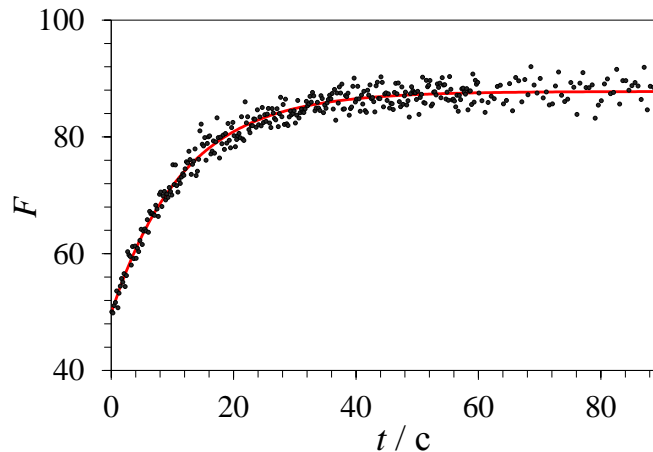


Рисунок 5.10. Изменение интенсивности флуоресценции во времени при разворачивании лизоцима в смеси ДМСО-вода с мольной долей ДМСО  $x_l = 0,25$  при постоянной температуре  $54^\circ\text{C}$  ( $327\text{ K}$ ). Красная линия соответствует экспоненциальной аппроксимации по уравнению (5.10).

Отношение  $k_1 / k_{-1}$  будет расти с температурой и должно достигать 1 при равных количествах нативной и денатурированной формы белка. При более высоких температурах  $k_{-1}$  становится меньше  $k_1$ . Кажущаяся энергия активации в общем случае будет рассчитываться согласно следующему уравнению:

$$E_a = -R \frac{d \ln(k_1 + k_{-1})}{d(1/T)} = \frac{k_1 E_1 + k_{-1} E_{-1}}{k_1 + k_{-1}}. \quad (5.11)$$

Величина экспериментальной энергии активации  $E_a$  будет изменяться с повышением температуры от энергии активации обратной процесса  $E_{-1}$  при  $k_1 / k_{-1} \ll 1$  до энергии активации прямого процесса  $E_1$  при  $k_1 / k_{-1} \gg 1$ . На рисунке 5.11 приведен пример численного моделирования температурной зависимости  $(k_1 + k_{-1})$  для процесса разворачивания лизоцима в чистой воде с использованием значений константы скорости  $k_1 = k_{-1} = 20 \text{ мин}^{-1}$  при  $T = 350 \text{ K}$ , энергии активации  $E_1 = 259 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$  и  $E_{-1} = 56 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ . Точка перегиба соответствует  $350 \text{ K}$ .

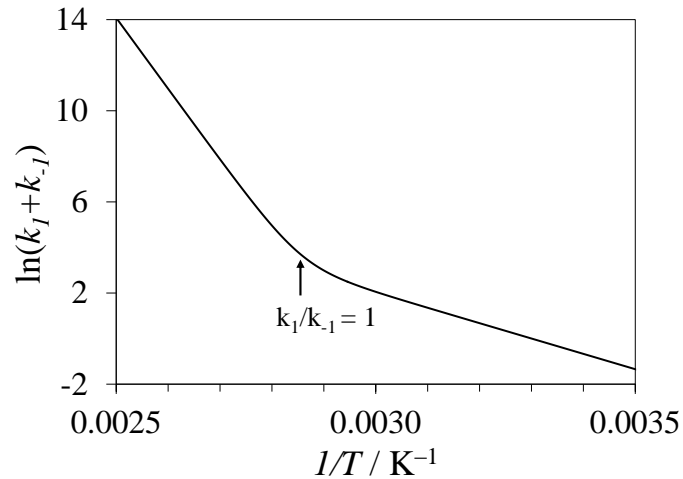


Рисунок 5.11. Результаты численного моделирования одностадийного обратимого процесса разрушения третичной структуры лизоцима в чистой воде: зависимость логарифма суммы констант скорости прямого и обратного процессов от  $1/T$ .

Следовательно, для определения энергии активации разрушения третичной структуры  $E_1$  следует учитывать только значения  $k_1 + k_{-1}$ , измеренные выше  $T_{CD}$ . Ниже  $T_{CD}$  изменения флуоресценции небольшие, так как степень разворачивания мала. Поэтому с помощью этого метода нельзя точно определить константы скорости и величину  $E_{-1}$ . Полученные зависимости кажущихся констант скорости  $k_1 + k_{-1}$  от обратной температуры  $1/T$  показаны на рисунке 5.12.

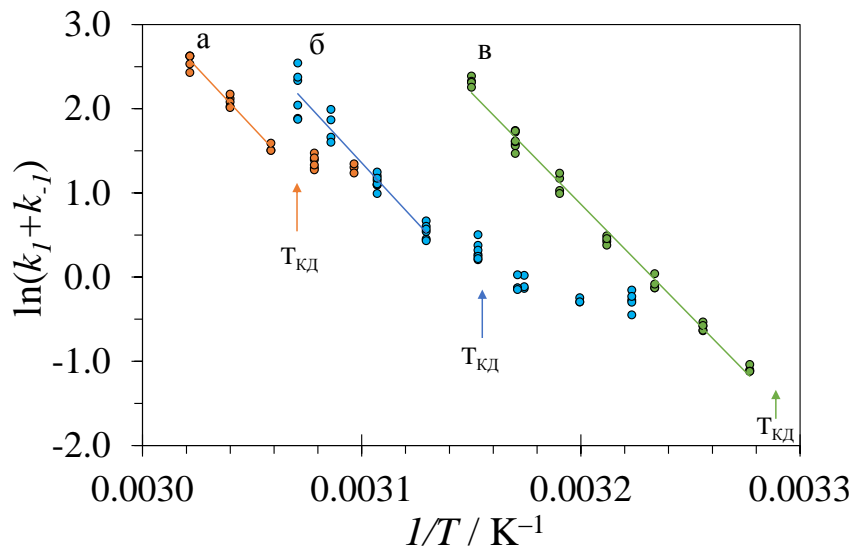


Рисунок 5.12. Графики Аррениуса для процесса разрушения третичной структуры лизоцима в смесях ДМСО-вода различного состава (а –  $x_1 = 0,25$ , б –  $x_1 = 0,30$  и в –  $x_1 = 0,35$ ).

Линейные зависимости  $\ln(k_1 + k_{-1})$  от  $1/T$  выше  $T_{CD}$  были использованы для определения энергий активации разрушения третичной структуры  $E_1$  и предэкспоненциального множителя  $A_1$ :

$$\ln(k_1 + k_{-1}) \approx \ln k_1 (\text{если } T > T_{CD}) = \ln A_1 - \frac{E_1}{RT}. \quad (5.12)$$

Энергии активации (таблица 5.8), полученные при различных высоких концентрациях ДМСО, близки друг к другу и значению в чистой воде [269, 270]. Это означает, что разница между энергиями переходного и нативного состояний не зависит от концентрации ДМСО. Сходные значения энергий активации были получены и для разрушения третичной структуры лизоцима в смесях вода-изопропанол при  $\text{pH} = 2$  [259].

Таблица 5.8. Энергии активации и предэкспоненциальные множители для процесса разрушения третичной структуры лизоцима в смесях ДМСО – вода с различной мольной долей ДМСО  $x_1$ .

$x_1$	$E_1$ (кДж·моль <sup>-1</sup> )	$\ln(A_1/\text{мин}^{-1})$
0,25	$231 \pm 20$	$87 \pm 4$
0,30	$233 \pm 18$	$88 \pm 4$
0,35	$222 \pm 15$	$86 \pm 2$

Таким образом, вероятно, что пространственная структура первого переходного состояния денатурации и состав его сольватной оболочки останутся близкими к таковым в нативном состоянии. Механизм дальнейшего процесса денатурации, как было показано выше, различается в воде и водно-органических смесях. Полностью денатурированное состояние при высоком содержании ДМСО становится более энергетически выгодным по сравнению с нативным состоянием из-за подавления гидрофобного эффекта и предпочтительной сольватации неполярных аминокислотных остатков органическим соразтворителем.

## 5.6 Молекулярно-динамическое моделирование разрушения нативной структуры лизоцима в воде и в смесях диметилсульфоксид-вода

### 5.6.1 Выбор параметров, характеризующих изменение структуры лизоцима при разворачивании

Главное различие между разворачиванием лизоцима в чистой воде и в ее смесях с диметилсульфоксидом отчетливо видно даже при визуальном анализе траекторий. Во всех симуляциях в смесях (10 повторных запусков для каждого состава смеси) даже при 5% ДМСО белок терял свою компактную структуру менее чем за 30 нс и приходил в состояние со значительно менее плотной упаковкой. При более высоких концентрациях ДМСО траектории длительностью 30 нс заканчиваются неупорядоченной структурой. Во всех симуляциях в воде, напротив, компактная структура лизоцима сохранялась в течение всего времени моделирования, равного 130 нс. Однако вторичная структура и третичные контакты нарушались, хоть и не так быстро, как в присутствии ДМСО.

Для сравнения скорости разворачивания лизоцима в смесях различного состава было использовано время разворачивания, усредненное по 10 отдельным запускам ( $\langle t_u \rangle$ ). Такой подход сопряжен с рядом трудностей. Переход между свернутой и развернутой формами занимает значительное время, и трудно точно сказать, когда именно белок станет развернутым. Можно только сказать, когда изменения станут заметными, используя различные допущения и критические значения структурных параметров. Третичная и вторичная структуры могут исчезать с разной скоростью (как в случае с расплавленными глобулами). Вторичная структура часто теряется лишь частично, с разной скоростью для разных частей молекулы или для разных типов структур, и определенные элементы часто образуются снова после их разрушения. Также следует понимать, что потеря компактности всегда означает потерю третичной (но не вторичной) структуры, в то время как обратное неверно: белок может потерять третичные контакты, но оставаться в компактном глобулярном состоянии.



Для определения и подсчета числа аминокислотных остатков, участвующих в образовании элементов вторичной структуры в лизоциме, использовался алгоритм DSSP, основанный на анализе водородных связей внутри молекулы белка. В качестве критерия нарушения третичной структуры можно предложить множество различных параметров. Мы сравнили несколько из них, а именно: общее среднеквадратичное отклонение  $\alpha$ -углеродов ( $C\alpha$ -RMSD), радиус инерции ( $R_g$ ), площадь доступной растворителю гидрофобной поверхности ( $hSASA$ ) и долю нативных контактов ( $FNC$ ). Кроме того, визуальный анализ траекторий моделирования показывает, что на ранних стадиях процесса разворачивания в смесях теряется контакт между двумя  $\alpha$ -спиралями в молекуле лизоцима (рисунок 5.13). Это приводит к значительному увеличению радиуса инерции и  $hSASA$  из-за потери компактности и быстрого разрушения спиралей. После этого белок имеет низкую вероятность свернуться обратно. Таким образом, мы можем рассматривать потерю контакта между остатками 6-21 и 89-100 лизоцима как критическое событие для перехода от глобулярного состояния к развернутой форме. Поэтому в качестве еще одного критерия разрушения третичной структуры была использована сумма  $D = d_1 + d_2$ , где  $d_1$  – это расстояние между  $C\alpha$ -атомами в остатках His15 и Thr89, а  $d_2$  – расстояние между  $C\alpha$ -атомами в остатках Arg21 и Ser100.

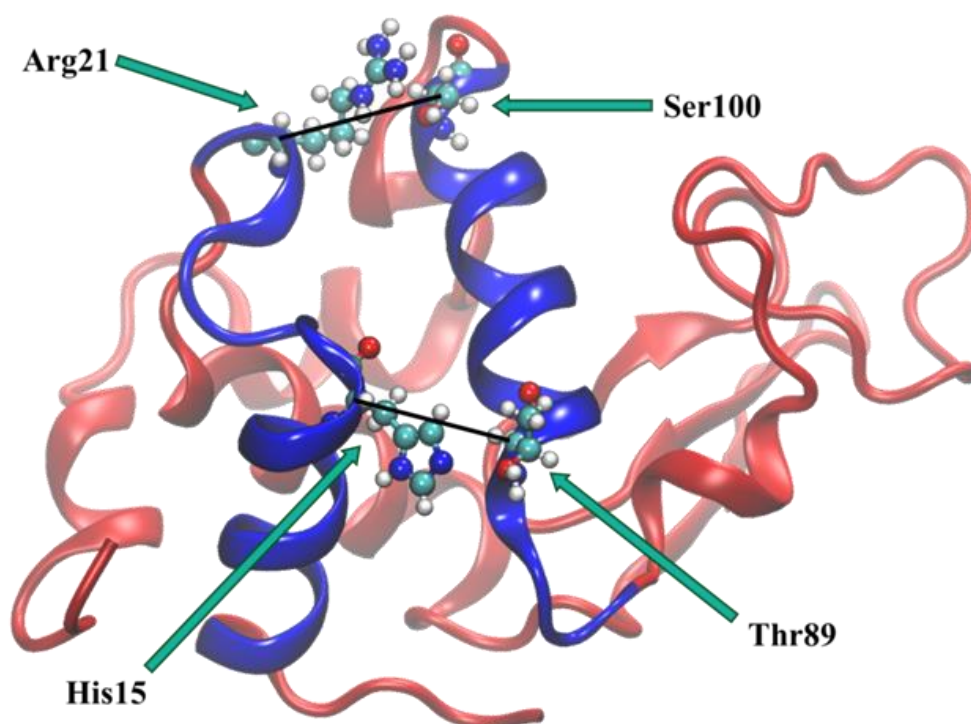


Рисунок 5.13. Нативная структура лизоцима и аминокислотные остатки, которые использовались для определения времени разворачивания.

### 5.6.2 Скорость разрушения третичной структуры лизоцима

Для определения времени (начала значительного) разрушения третичной структуры  $t_u$  использовались следующие критические значения: 0,7 нм для  $C\alpha$ - $RMSD$ , 1,6 нм для  $R_g$ , 36 нм<sup>2</sup> для  $hSASA$ , 3,15 нм для  $D$ , 0,75 для  $FNC$ . Величина критического значения параметра приблизительно равна половине суммы средних значений параметра для нативной структуры и полностью развернутого состояния, полученного после длительного моделирования. Критическое значение  $D$  соответствует удвоенной сумме расстояний His15–Thr89 и Arg21–Ser100 в нативной структуре. Все параметры рассчитывались каждые 2 пс и усреднялись за 200 пс, чтобы минимизировать случайные флуктуации. Времена разворачивания, определенные с использованием каждого метода расчета и усредненные по 10 моделированиям для каждого состава растворителя, приведены в таблице 5.9.

Таблица 5.9. Средние времена  $\langle t_u \rangle$  (нс) разрушения третичной структуры лизоцима в смесях диметилсульфоксида (1) с водой (2), определенные с использованием различных параметров по результатам моделирования.

$x_1$	<i>hSASA</i>	<i>D</i>	<i>C<math>\alpha</math>-RMSD</i>	<i>R<sub>g</sub></i>	<i>FNC</i>
0,05	20,1±5,5	16,2±5,3	16,0±5,7	19,0±5,5	15,9±4,6
0,1	11,3±3,7	10,5±2,7	10,8±2,8	10,6±3,6	10,4±2,6
0,15	9,5±2,8	8,6±2,3	9,7±2,4	8,8±2,1	10,3±3,1
0,2	7,9±1,8	7,0±2,2	8,5±2,2	7,5±2	8,3±1,9
0,25	7,8±1,4	9,0±2,6	8,0±1,7	7,4±1,6	7,9±1,3
0,3	7,8±1,8	6,7±1,3	7,7±1,3	6,8±1,2	8,2±1,9
0,4	7,0±1,4	7,5±2,9	7,6±2,1	6,6±1,7	8,2±1,9
0,5	8,0±1,3	8,2±3,2	9,3±2,1	8,0±1,7	8,7±1,6
0,6	7,0±2,2	6,5±2	8,6±2,6	7,0±2,3	8,3±2,3
0,8	7,7±0,9	6,9±1,6	10,5±2,4	8,2±1,8	10,4±2,2
1,0	7,4±3	9,1±2,9	8,8±3,3	7,0±2,9	8,8±3,2

Результаты различных методов в целом согласуются друг с другом (рисунок 5.14). Время разворачивания уменьшается с увеличением доли ДМСО до 0,2–0,3 и существенно не изменяется в смесях с большим содержанием ДМСО.

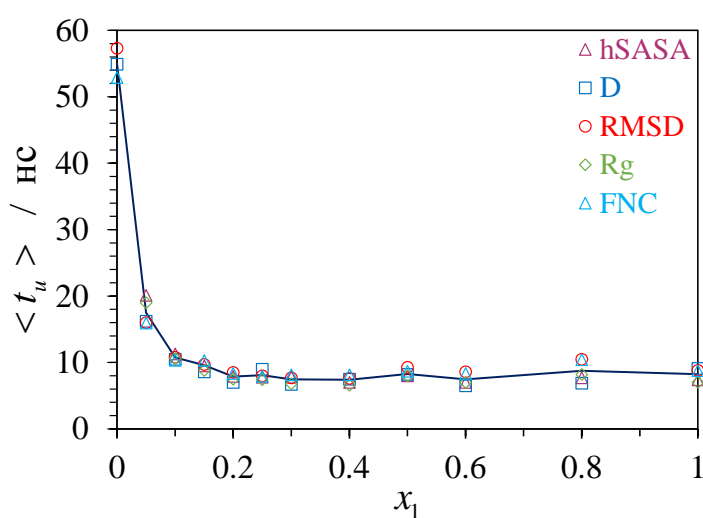
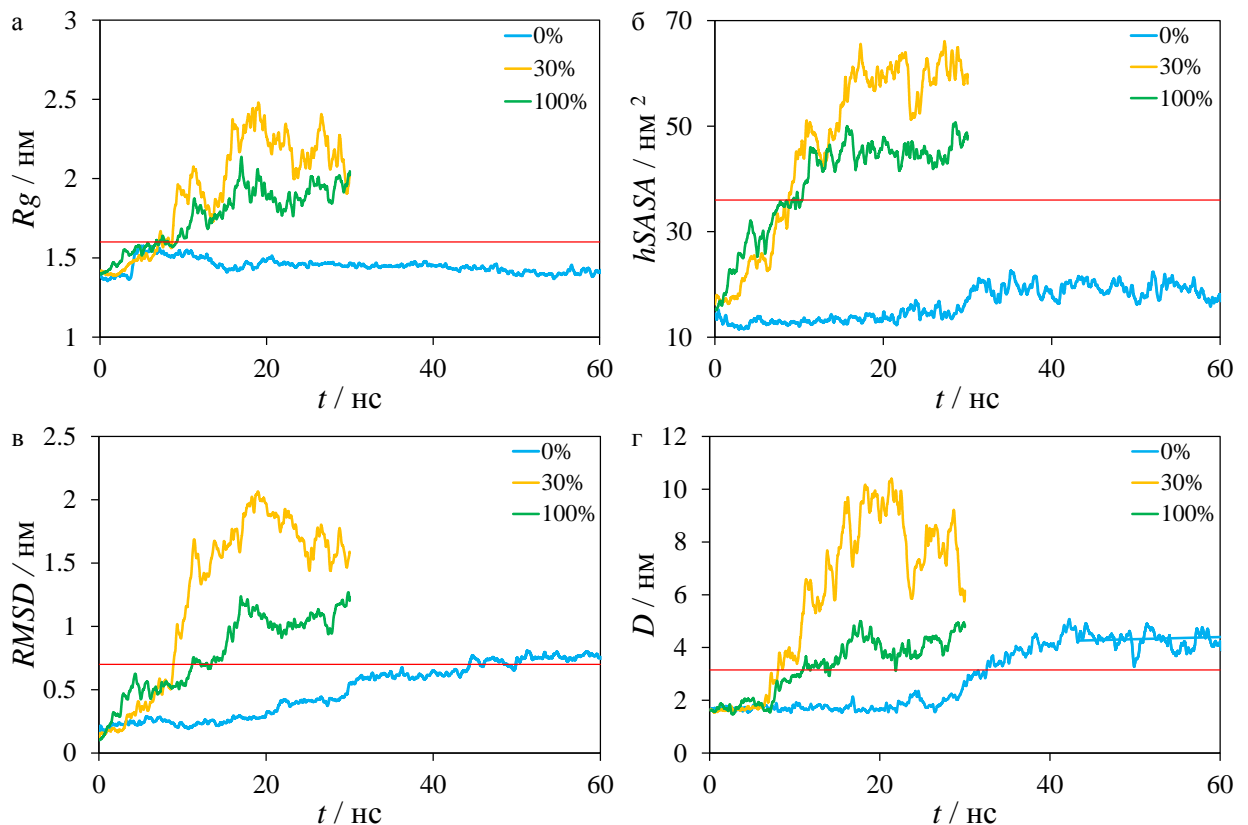


Рисунок 5.14. Зависимости  $\langle t_u \rangle$  от мольной доли ДМСО  $x_1$  в МД-моделировании, определенные с использованием критических значений для различных параметров.

Сплошная линия соединяет средние значения  $\langle t_u \rangle$  для каждой концентрации, усредненные по всем пяти методам расчета.

В чистой воде скорость и механизм разворачивания лизоцима сильно отличаются даже от смеси с самым низким содержанием ДМСО (5 мол.%). На рисунке 5.15 приводится сравнение изменений параметров при моделировании с различными составами растворителя. Критические значения  $hSASA$  и  $R_g$  не достигаются даже после 130 нс моделирования, поскольку глобулярная структура лизоцима сохраняется. В какой-то момент достигается критическое значение  $C\alpha$ - $RMSD$ , в результате чего в среднем  $t_u = 57 \pm 22$  нс, но эта величина чувствительна к изменениям в структуре любой части молекулы белка, включая вторичную структуру. О потере третичных контактов правильнее судить по значениям  $FNC$  или  $D$ , характеризующим только два конкретных контакта. Критические значения, используемые для смесей с ДМСО, приводят к следующему среднему значению  $t_u$  в воде:  $53 \pm 15$  нс (критерий  $FNC$ ) и  $55 \pm 24$  нс (критерий  $D$ ). Это намного выше, чем для любой из смесей.



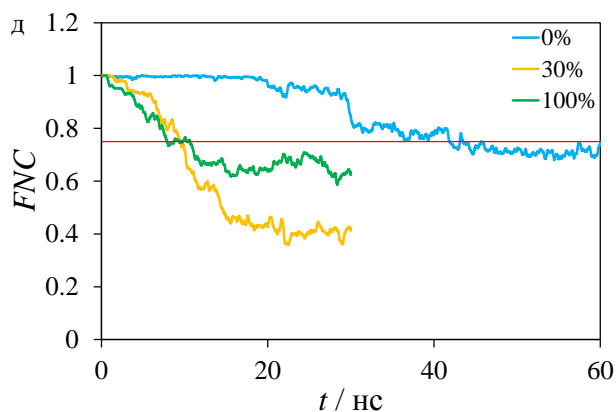


Рисунок 5.15. Зависимости структурных параметров лизоцима от времени моделирования в чистой воде, в смеси с 30 мол.% ДМСО и в чистом ДМСО: а) радиус инерции ( $R_g$ ), б) гидрофобная площадь поверхности  $hSASA$ , в)  $C\alpha$ - $RMSD$ , г) сумма расстояний между парами остатков His15–Thr89 и Arg21–Ser100 ( $D$ ), е) доля нативных контактов ( $FNC$ ). Результат приводится для одной репрезентативной траектории для каждого состава растворителя. Красная линия соответствует выбранным критическим значениям параметров – «границе» между свернутым и развернутым состояниями.

### 5.6.3 Скорость разрушения вторичной структуры лизоцима

Изменения вторичной структуры анализировались по общему содержанию аминокислотных остатков, принадлежащих  $\alpha$ - и  $3_{10}$ -спиралям. Бета-структуры не анализировались, поскольку их содержание изначально в 2 раза ниже, чем у спиральных структур, что делает результаты более чувствительными к колебаниям, а также из-за образования ненативных бета-структур. Как и при анализе параметров третичной структуры, содержание спиралей усреднялось за 200 пс. «Время полураспада» вторичной спиральной структуры  $t_{hel}/2$ , то есть время, когда менее половины исходного числа (43) остатков, принадлежащих спиральям, остается в спиральной конформации, было вычислено и усреднено по всем траекториям для каждого состава растворителя. На рисунке 5.16а представлена зависимость  $\langle t_{hel}/2 \rangle$  от доли ДМСО. Кроме того, для каждой траектории рассчитывалась средняя доля оставшихся спиралей  $\langle f_{hel} \rangle$  в момент времени  $t_u$  (критерий –  $hSASA$ ) (рисунок 5.16б).

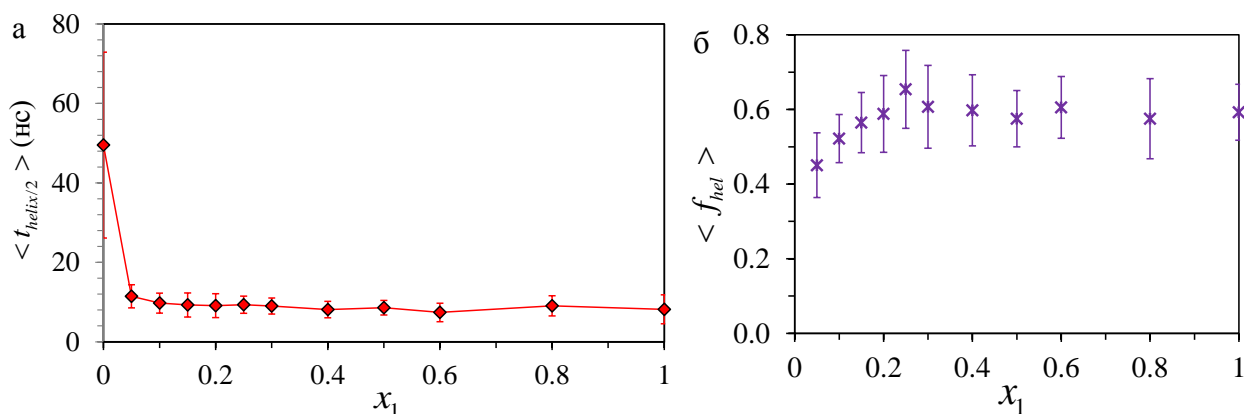


Рисунок 5.16. Зависимости а) среднего «периода полураспада» спиральной структуры лизоцима  $\langle t_{hel}/2 \rangle$  и б) средней доли спиральной структуры  $\langle f_{hel} \rangle$ , которая осталась в момент начала разрушения третичной структуры лизоцима  $t_u$ , от мольной доли ДМСО  $x_1$  в МД-моделировании.

Хорошо видно, что, как и третичная структура, в чистой воде вторичная структура разрушается гораздо медленнее, чем в смесях с ДМСО. Доля спиралей во время  $t_u$  оказывается несколько меньше при более низком, чем при высоком содержании ДМСО. При любом составе растворителя можно сказать, что значительная часть вторичной структуры сохраняется после начала разрушения третичной структуры, а некоторые элементы могут сохраняться как минимум на протяжении всех 30 нс моделирования.

#### 5.6.4 Разворачивание из частично развернутой структуры

Предпочтительно проводить моделирование процесса разворачивания белка при как можно более низкой температуре, потому что в этом случае условия проведения расчетов приближаются к экспериментальным условиям денатурации. Однако с понижением температуры время разворачивания и время расчета моделирования растут. Чтобы подтвердить концентрационную зависимость структурной стабильности лизоцима и показать, что тенденции, наблюдаемые при 450 К, сохраняются при более низких температурах, мы провели моделирование процесса разворачивания при 400 К, используя в качестве стартовой структуры частично развернутое состояние лизоцима (критические значения критериев

разворачивания не достигнуты) из одной из предыдущих симуляций. Эта структура показана на рисунке 5.17 в сравнении с исходной структурой, использованной в расчетах при 450 К. Была проведена серия из 20 расчетов длительностью 10 нс в смесях с мольной долей ДМСО  $x_1$  от 0 до 0,20 с шагом 0,05. Результаты представлены в виде гистограммы времен разворачивания, определенных с использованием критерия *FNC* (рисунок 5.18).

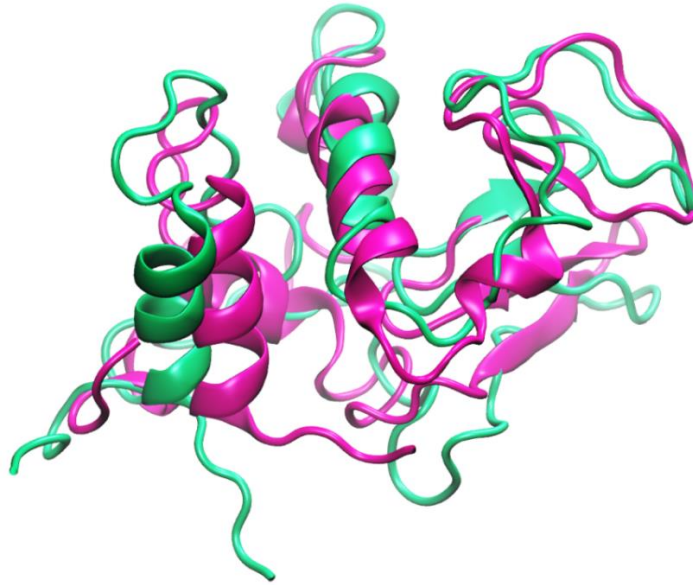


Рисунок 5.17. Сравнение нативной (красная) и частично развернутой (зеленая) структур лизоцима, используемых в качестве исходных при моделировании при 450 и 400 К, соответственно.

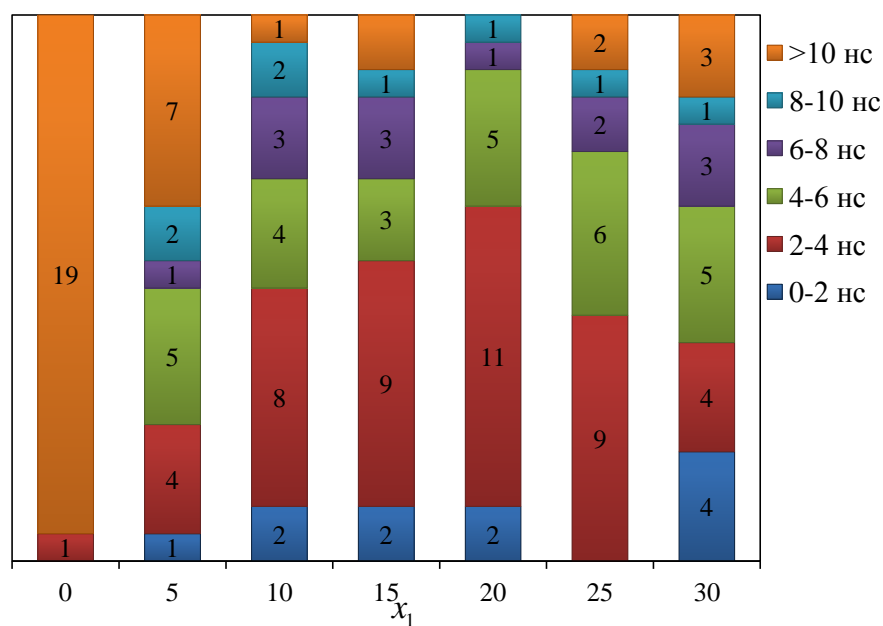


Рисунок 5.18. Гистограмма времен разворачивания лизоцима из частично развернутой структуры при 400 К и при различном содержании ДМСО. Числа показывают количество симуляций, в которых лизоцим разворачивается за определенное время.

Как видно из гистограмм, тенденция снижения времени разворачивания при увеличении концентрации ДМСО сохраняется. Только один из 20 запусков привел к разворачиванию лизоцима в воде, в то время как при 5 процентах ДМСО белок начал разворачиваться за 10 нс в 13 случаях. Количество запусков, в которых белок начинает разворачиваться менее чем за 4 нс, возрастает с 5 до 13, когда доля ДМСО увеличивается с 5 до 20 мольных процентов. Таким образом, можно ожидать, что закономерность снижения времени денатурации при увеличении концентрации ДМСО сохранится и при более низких температурах.

#### 5.6.5 Гистограммы состояний лизоцима, образующихся в ходе разворачивания

Самым очевидным отличием разворачивания лизоцима в чистой воде является, конечно, сохранение его компактного состояния даже после разрыва третичных контактов. В присутствии ДМСО разрушение вторичной структуры и дестабилизация третичных контактов приводят к быстрому разрушению глобулы. Различия в путях разрушения нативной структуры более отчетливо можно показать с помощью двумерных гистограмм, отражающих структурные свойства. Эти гистограммы отражают значения отрицательного логарифма числа фреймов  $-\ln N(p_1, \dots, p_i)$  в пределах траектории(й) моделирования, для которых определенные структурные параметры  $p_1, \dots, p_i$  белка лежат в диапазоне  $[p_1, p_1 + \Delta p_1; \dots; p_i, p_i + \Delta p_i]$ , где  $\Delta p_1, \dots, \Delta p_i$  – величины интервалов для каждого параметра. В результате получается  $(i + 1)$ -мерная гистограмма. (Эти гистограммы аналогичны поверхностям свободной энергии, однако получаемые нами ансамбли конформаций не являются равновесными). Для построения были взяты значения параметров  $FNC$  и  $hSASA$ , определяемые каждые 2 пс во всех запусках при



одинаковой концентрации ДМСО. Полученные графики со значениями  $-\ln N$ , показанными в цветовой шкале, представлены на рисунке 5.19. Мы видим, что пути разворачивания в чистой воде и в присутствии ДМСО различны, а увеличение концентрации ДМСО приводит к ускорению разворачивания без изменения пути.

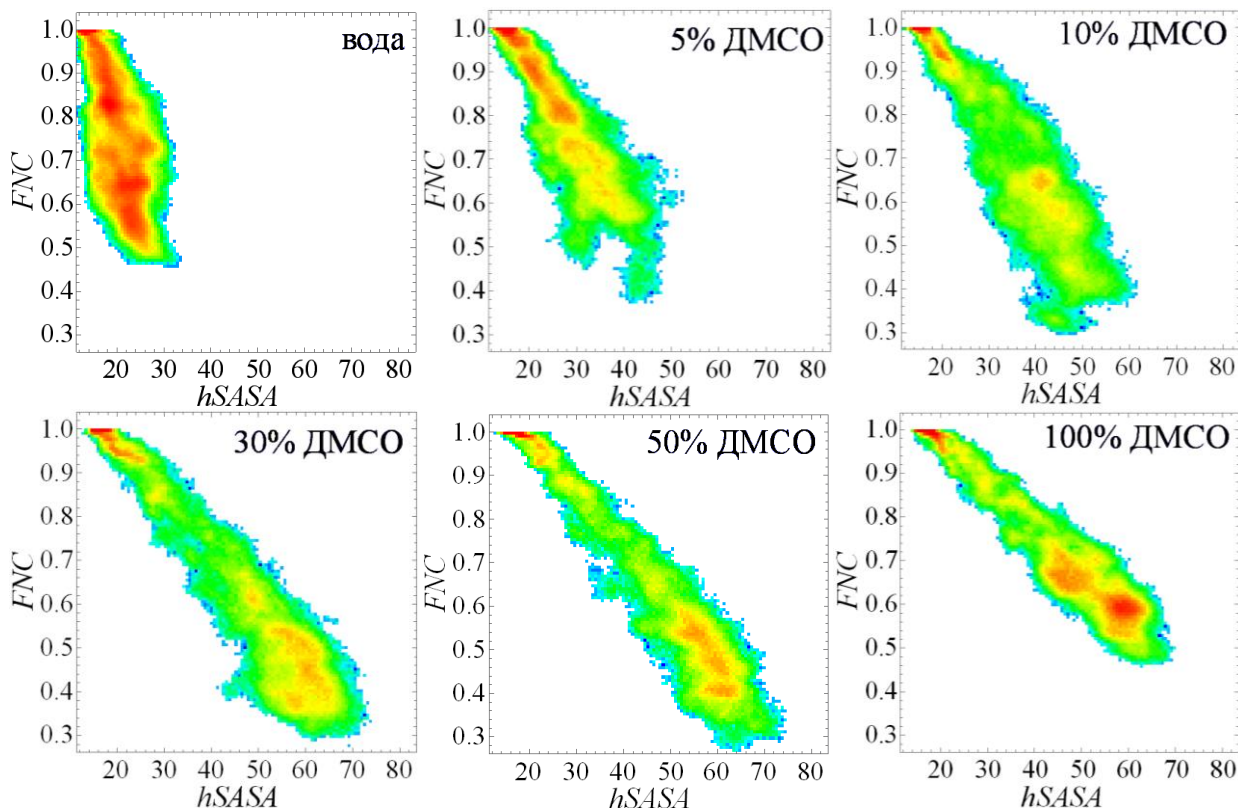


Рисунок 5.19. Двумерные гистограммы структурных свойств для процесса разворачивания лизоцима при различных концентрациях ДМСО. Красным цветом выделены наиболее заселенные состояния, белым – нулевая заселенность состояния.

Из эксперимента известно, что термически денатурированное состояние лизоцима имеет значение радиуса инерции не менее 1,8 нм [271, 272], что намного больше, чем полученное нами для глобул при моделировании в чистой воде. Таким образом, можно предположить, что в моделировании наблюдается кинетически стабильный интермедиат, который через некоторое время должен потерять компактность. В подтверждение этому предположению можно добавить, что в проведенных моделированиях в воде при 600 К белок разворачивался из нативой структуры в случайные состояния с большим радиусом инерции в течение 5 нс.

Ранее проведенные моделирования разворачивания лизоцима в воде также показали относительную стабильность глобулы и разрушение значительной части спиральной структуры в течение 10 нс в NPT-ансамбле с использованием силового поля CHARMM [272] при 500 К. Однако конечные значения  $R_g$  (1,52–1,68 нм) были значительно больше, чем в нашем исследовании. Различие, вероятно, объясняется большей кинетической стабильностью нативного состояния в силовом поле OPLS [273]. Моделирование химической денатурации лизоцима в 8М мочеvine (силовое поле CHARMM) [274] показало быструю потерю компактного состояния даже при 310 К. Силовые поля GROMOS способствуют разворачиванию даже в большей степени, чем CHARMM, что приводит к увеличению  $R_g$  лизоцима до 1,6 нм даже после 100 пс моделирования при 500 К [275, 276].

Наиболее прямое объяснение более высокой термодинамической стабильности компактной глобулярной структуры в воде, чем в смесях с ДМСО, состоит в том, что ее разрушение увеличивает площадь гидрофобной поверхности, что невыгодно в водных растворах, в то время как ДМСО может предпочтительно сольватировать гидрофобные боковые цепи. Увеличение предпочтительной сольватации переходного состояния в процессе разворачивания молекулами ДМСО по сравнению с исходным нативным состоянием также может объяснить его эффект ускорения разворачивания. Рост количества ДМСО в сольватной оболочке лизоцима при тепловой денатурации в смесях ДМСО-вода наблюдался экспериментально [277]. Увеличение предпочтительной сольватации молекулами ДМСО переходного состояния в процессе разворачивания по сравнению с исходным нативным состоянием также может объяснить кинетический эффект ускорения денатурации в присутствии ДМСО.

Мы проанализировали составы сольватных оболочек нативного состояния, частично развернутого состояния, трех развернутых состояний, образовавшихся после 30 нс моделирования в смеси ДМСО-вода, и трех компактных состояний с нарушенными нативными контактами, образовавшихся после 130 нс моделирования в чистой воде. Для каждого из этих состояний мы провели моделирование длительностью 10 нс в эквимолярной смеси ДМСО-вода с

фиксированными тяжелыми атомами белка при 450 К, записывая конфигурации каждые 2 пс. Мольная доля ДМСО в сольватной оболочке лизоцима радиусом 0,5 нм, усредненная по всем конфигурациям, составила 0,387 для нативного состояния, 0,462 для частично развернутого состояния, 0,515, 0,508, 0,522 для трех развернутых состояний из смесей ДМСО-вода и 0,391, 0,407, 0,400 для трех компактных состояний из моделирования в воде. Доля воды в сольватной оболочке уменьшается в процессе разворачивания в ряду «нативное» > «частично развернутое» > «развернутое состояние в смеси», в то время как сольватация с ДМСО становится более предпочтительной при увеличении доступности гидрофобной поверхности. Промежуточное компактное состояние, образованное в воде, взаимодействует с ДМСО относительно неблагоприятным образом и не образуется в смесях ДМСО-вода в процессе разворачивания.

В целом полученные методом молекулярной динамики результаты хорошо согласуются с данными эксперимента, приведенные в разделах 5.1-5.5. Как и в эксперименте, увеличение концентрации органического соразтворителя (ДМСО) приводит к дестабилизации нативной структуры белка и ускорению процесса разворачивания. Также согласуются выводы о более высокой стабильности вторичной структуры лизоцима по сравнению с третичной в смесях с высоким содержанием ДМСО.

На основе полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Получен ряд органических растворителей по их денатурирующей способности: диметилсульфоксид < метанол < этанол < формамид < ацетонитрил, диметилформамид, ацетон < изопропанол < 1,4-диоксан < трет-бутанол < 1-пропанол < тетрагидрофуран < 2-бутанол < 1-бутанол.
2. Показана связь между подавлением гидрофобного эффекта при добавлении органического растворителя, сольватационными свойствами водно-органических смесей и термической стабильностью лизоцима в этих смесях.

3. Изменения в третичной структуре лизоцима в некоторых смесях с высоким содержанием органических сорастворителей происходят при несколько более низких температурах, чем температура пика денатурация в ДСК.
4. В водно-органических смесях разрушение вторичной структуры белка может происходить асинхронно. При нагревании белка образуются расплавленные глобулы с сохраненной вторичной структурой, которая разрушается при более высоких температурах.
5. Обнаружено, что даже высокие концентрации диметилсульфоксида существенно не меняют энергию активации начальной стадии разворачивания, связанной с нарушением третичной структуры.
6. Моделирование методом молекулярной динамики показало, что в чистой воде долго сохраняется компактное глобулярное состояние даже при нарушенных нативных контактах и вторичной структуре лизоцима, в то время как в смесях диметилсульфоксид-вода наблюдается быстрая потеря компактной структуры белка. При этом в смесях переход от нативной структуры к денатурированной сопровождается увеличением предпочтительной сольватации молекулы лизоцима диметилсульфоксидом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Методами газовой хроматографии и калориметрии растворения экспериментально изучен процесс сольватации в водно-органических смесях различного состава. Получены неизвестные ранее значения энергий Гиббса и энтальпий сольватации ряда малополярных соединений в смесях воды с органическими растворителями в широком диапазоне концентраций. Показано, что различные органические растворители подавляют гидрофобный эффект с разной силой.
2. Методами молекулярной динамики и вставки частиц Видома получены новые данные о значениях термодинамических функций образования полостей в различных водно-органических смесях. Показано, что ослабление гидрофобного эффекта при добавлении органического растворителя связано с изменением термодинамики процесса образования полости – уменьшением энергии Гиббса и увеличением энтальпии за счет реорганизации растворителя вокруг полости.
3. На основе результатов исследования термической стабильности лизоцима в смесях воды с различными органическими растворителями впервые предложен ряд растворителей по их денатурирующей способности, мерой которой выступает величина изменения температуры денатурации белка при добавлении растворителя.
4. Показана корреляция между денатурирующей способностью органических соразтворителей и их сольватационными свойствами. Предпочтительная сольватация неполярных остатков органическим соразтворителем играет важную роль в стабилизации денатурированного состояния и снижении термической стабильности белков.
5. Комплексом экспериментальных методов изучено влияние органических соразтворителей на механизм денатурации лизоцима. При термической денатурации в присутствии органического соразтворителя третичная структура белка разрушается раньше, чем вторичная, в то время как в воде эти процессы происходят синхронно.

6. На примере смесей ДМСО-вода показано, что даже большие концентрации органического денатуранта не приводят к значительным изменениям энергии активации разрушения третичной структуры.
7. Методом молекулярной динамики показано, что при денатурации в чистой воде достаточно долго сохраняется компактное глобулярное состояние лизоцима, а в присутствии органического растворителя (ДМСО) наблюдается быстрое разрушение третичной глобулярной структуры. Продемонстрировано, что в ходе разрушения глобулярной структуры вместе с увеличением площади гидрофобной поверхности увеличивается доля ДМСО в сольватном окружении белка.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sedov, I.A. Thermodynamic Functions of Solvation of Hydrocarbons, Noble Gases, and Hard Spheres in Tetrahydrofuran–Water Mixtures / I.A. Sedov, T.I. Magsumov // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2015. – Vol. 119. – № 28. – P. 8773-8780.
2. Sedov, I.A. Solvation of hydrocarbons in aqueous-organic mixtures / I.A. Sedov, T.I. Magsumov, B.N. Solomonov // *The Journal of Chemical Thermodynamics*. – 2016. – Vol. 96. – P. 153-160.
3. Sedov, I.A. Thermodynamic functions of solvation of benzene in various binary aqueous-organic solvents / I.A. Sedov, T.I. Magsumov, B.N. Solomonov // *Journal of Molecular Liquids*. – 2016. – Vol. 224. – P. 1205-1209.
4. Sedov, I.A. Standard molar Gibbs free energy and enthalpy of solvation of low polar solutes in formamide derivatives at 298K / I.A. Sedov, T.I. Magsumov, M.A. Stolov, B.N. Solomonov // *Thermochimica Acta*. – 2016. – Vol. 623. – P. 9-14.
5. Sedov, I.A. Molecular dynamics study of unfolding of lysozyme in water and its mixtures with dimethyl sulfoxide / I.A. Sedov, T.I. Magsumov // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2017. – Vol. 76. – P. 466-474.
6. Magsumov, T. The Effect of Dimethyl Sulfoxide on the Lysozyme Unfolding Kinetics, Thermodynamics, and Mechanism / T. Magsumov, A. Fatkhutdinova, T. Mukhametzyanov, I. Sedov // *Biomolecules*. – 2019. – Vol. 9. – № 10. – P. 547.
7. Magsumov, T. Comparative study of the protein denaturing ability of different organic cosolvents / T. Magsumov, L. Ziyang, I. Sedov // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 160. – P. 880-888.
8. Sedov, I. The Gibbs free energy of cavity formation in a diverse set of solvents / I. Sedov, T. Magsumov // *The Journal of Chemical Physics*. – 2020. – Vol. 153. – № 13. – P. 134501.
9. Magsumov, T. Thermodynamics of cavity formation in different solvents: Enthalpy, entropy, and the solvophobic effects / T. Magsumov, I. Sedov // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – Vol. 331. – P. 115738.

10. Chandler, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly / D. Chandler // *Nature*. – 2005. – Vol. 437. – № 7059. – P. 640-647.
11. Southall, N.T. A View of the Hydrophobic Effect / N.T. Southall, K.A. Dill, A.D.J. Haymet // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2002. – Vol. 106. – № 3. – P. 521-533.
12. Tanford, C. The Hydrophobic Effect and the Organization of Living Matter / C. Tanford // *Science*. – 1978. – Vol. 200. – № 4345. – P. 1012-1018.
13. Tanford, C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. The hydrophobic effect / C. Tanford. – New York: Wiley, 1980. – 233 c.
14. Kinoshita, M. Molecular origin of the hydrophobic effect: Analysis using the angle-dependent integral equation theory / M. Kinoshita // *The Journal of Chemical Physics*. – 2008. – Vol. 128. – № 2. – P. 24507.
15. Estell, D.A. Probing Steric and Hydrophobic Effects on Enzyme-Substrate Interactions by Protein Engineering / D.A. Estell, T.P. Graycar, J.V. Miller, D.B. Powers, J.A. Wells, J.P. Burnier, P.G. Ng // *Science*. – 1986. – Vol. 233. – № 4764. – P. 659-663.
16. Maibaum, L. Micelle Formation and the Hydrophobic Effect / L. Maibaum, A.R. Dinner, D. Chandler // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2004. – Vol. 108. – № 21. – P. 6778-6781.
17. Lins, L. The hydrophobic effect in protein folding / L. Lins, R. Brasseur // *The FASEB Journal*. – 1995. – Vol. 9. – № 7. – P. 535-540.
18. Gils, J.H.M. van. The hydrophobic effect characterises the thermodynamic signature of amyloid fibril growth / J.H.M. van Gils, E. van Dijk, A. Peduzzo, A. Hofmann, N. Vettore, M.P. Schützmann, G. Groth, H. Mouhib, D.E. Otzen, A.K. Buell, S. Abeln // *PLOS Computational Biology*. – 2020. – Vol. 16. – № 5. – P. e1007767.
19. Hillyer, M.B. Molecular Shape and the Hydrophobic Effect / M.B. Hillyer, B.C. Gibb // *Annual Review of Physical Chemistry*. – 2016. – Vol. 67. – № 1. – P. 307-329.
20. Huang, D.M. The Hydrophobic Effect and the Influence of Solute–Solvent Attractions / D.M. Huang, D. Chandler // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2002. – Vol. 106. – № 8. – P. 2047-2053.



21. Privalov, P.L. Stability of Protein Structure and Hydrophobic Interaction / P.L. Privalov, S.J. Gill // *Advances in Protein Chemistry* / DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60377-0. – Elsevier, 1988. – Vol. 39. – P. 191-234.
22. Frank, H.S. Free Volume and Entropy in Condensed Systems III. Entropy in Binary Liquid Mixtures; Partial Molal Entropy in Dilute Solutions; Structure and Thermodynamics in Aqueous Electrolytes / H.S. Frank, M.W. Evans // *The Journal of Chemical Physics*. – 1945. – Vol. 13. – № 11. – P. 507-532.
23. Blokzijl, W. Hydrophobic Effects. Opinions and Facts / W. Blokzijl, J.B.F.N. Engberts // *Angewandte Chemie International Edition in English*. – 1993. – Vol. 32. – № 11. – P. 1545-1579.
24. Turner, J. A neutron-diffraction study of tetramethylammonium chloride in aqueous solution / J. Turner, A.K. Soper, J.L. Finney // *Molecular Physics*. – 1990. – Vol. 70. – № 4. – P. 679-700.
25. Buchanan, P. Decreased structure on dissolving methane in water / P. Buchanan, N. Aldiwan, A.K. Soper, J.L. Creek, C.A. Koh // *Chemical Physics Letters*. – 2005. – Vol. 415. – № 1-3. – P. 89-93.
26. Pierotti, R.A. Aqueous Solutions of Nonpolar Gases <sup>1</sup> / R.A. Pierotti // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1965. – Vol. 69. – № 1. – P. 281-288.
27. Ben-Naim, A. Statistical Mechanical Study of Hydrophobic Interaction. I. Interaction between Two Identical Nonpolar Solute Particles / A. Ben-Naim // *The Journal of Chemical Physics*. – 1971. – Vol. 54. – № 3. – P. 1387-1404.
28. Wilhelm, E. On Solvophobic Interaction / E. Wilhelm, R. Battino // *The Journal of Chemical Physics*. – 1972. – Vol. 56. – № 1. – P. 563-566.
29. Pratt, L.R. Theory of the hydrophobic effect / L.R. Pratt, D. Chandler // *The Journal of Chemical Physics*. – 1977. – Vol. 67. – № 8. – P. 3683-3704.
30. Lee, B. The physical origin of the low solubility of nonpolar solutes in water / B. Lee // *Biopolymers*. – 1985. – Vol. 24. – № 5. – P. 813-823.
31. Pohorille, A. Cavities in molecular liquids and the theory of hydrophobic solubilities / A. Pohorille, L.R. Pratt // *Journal of the American Chemical Society*. – 1990. – Vol. 112. – № 13. – P. 5066-5074.

32. Langlet, J. Improvements of the continuum model. 1. Application to the calculation of the vaporization thermodynamic quantities of nonassociated liquids / J. Langlet, P. Claverie, J. Caillet, A. Pullman // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1988. – Vol. 92. – № 6. – P. 1617-1631.
33. Pierotti, R.A. A scaled particle theory of aqueous and nonaqueous solutions / R.A. Pierotti // *Chemical Reviews*. – 1976. – Vol. 76. – № 6. – P. 717-726.
34. Reiss, H. Statistical Mechanics of Rigid Spheres / H. Reiss, H.L. Frisch, J.L. Lebowitz // *The Journal of Chemical Physics*. – 1959. – Vol. 31. – № 2. – P. 369-380.
35. Tomás-Oliveira, I. Thermodynamics of cavity formation in water and *n*-hexane using the Widom particle insertion method / I. Tomás-Oliveira, S.J. Wodak // *The Journal of Chemical Physics*. – 1999. – Vol. 111. – № 18. – P. 8576-8587.
36. Floris, F.M. Free energy and entropy for inserting cavities in water: Comparison of Monte Carlo simulation and scaled particle theory results / F.M. Floris, M. Selmi, A. Tani, J. Tomasi // *The Journal of Chemical Physics*. – 1997. – Vol. 107. – № 16. – P. 6353-6365.
37. Postma, J.P.M. Thermodynamics of cavity formation in water. A molecular dynamics study / J.P.M. Postma, H.J.C. Berendsen, J.R. Haak // *Faraday Symposia of the Chemical Society*. – 1982. – Vol. 17. – P. 55.
38. Madan, B. Role of hydrogen bonds in hydrophobicity: the free energy of cavity formation in water models with and without the hydrogen bonds / B. Madan, B. Lee // *Biophysical Chemistry*. – 1994. – Vol. 51. – № 2-3. – P. 279-289.
39. Hummer, G. An information theory model of hydrophobic interactions. / G. Hummer, S. Garde, A.E. Garcia, A. Pohorille, L.R. Pratt // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Vol. 93. – № 17. – P. 8951-8955.
40. Ashbaugh, H.S. Effect of Solute Size and Solute–Water Attractive Interactions on Hydration Water Structure around Hydrophobic Solutes / H.S. Ashbaugh, M.E. Paulaitis // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – Vol. 123. – № 43. – P. 10721-10728.

41. Huang, D.M. Scaling of Hydrophobic Solvation Free Energies / D.M. Huang, P.L. Geissler, D. Chandler // *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2001. – Vol. 105. – № 28. – P. 6704-6709.
42. Lum, K. Hydrophobicity at Small and Large Length Scales / K. Lum, D. Chandler, J.D. Weeks // *The Journal of Physical Chemistry B.* – 1999. – Vol. 103. – № 22. – P. 4570-4577.
43. Lynden-bell, R.M. Solvation in modified water models: towards understanding hydrophobic effects / R.M. Lynden-bell, T. Head-gordon // *Molecular Physics.* – 2006. – Vol. 104. – № 22-24. – P. 3593-3605.
44. Grigoriev, F.V. Cavitation Free Energy for Organic Molecules Having Various Sizes and Shapes / F.V. Grigoriev, M.V. Basilevsky, S.N. Gabin, A.N. Romanov, V.B. Sulimov // *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2007. – Vol. 111. – № 49. – P. 13748-13755.
45. Sedlmeier, F. Entropy and enthalpy convergence of hydrophobic solvation beyond the hard-sphere limit / F. Sedlmeier, D. Horinek, R.R. Netz // *The Journal of Chemical Physics.* – 2011. – Vol. 134. – № 5. – P. 55105.
46. Prévost, M. Free Energy of Cavity Formation in Liquid Water and Hexane / M. Prévost, I.T. Oliveira, J.-P. Kocher, S.J. Wodak // *The Journal of Physical Chemistry.* – 1996. – Vol. 100. – № 7. – P. 2738-2743.
47. Ashbaugh, H.S. Contrasting Nonaqueous against Aqueous Solvation on the Basis of Scaled-Particle Theory / H.S. Ashbaugh, L.R. Pratt // *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2007. – Vol. 111. – № 31. – P. 9330-9336.
48. Pan, A. Enthalpy–Entropy Compensation (EEC) Effect: A Revisit / A. Pan, T. Biswas, A.K. Rakshit, S.P. Moulik // *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2015. – Vol. 119. – № 52. – P. 15876-15884.
49. Khakhel', O.A. One More Type of Extrathermodynamic Relationship / O.A. Khakhel', T.P. Romashko, Y.E. Sakhno // *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2007. – Vol. 111. – № 25. – P. 7331-7335.
50. Bamford, H.A. Using Extrathermodynamic Relationships To Model the Temperature Dependence of Henry's Law Constants of 209 PCB Congeners / H.A.

Bamford, D.L. Poster, R.E. Huie, J.E. Baker // *Environmental Science & Technology*. – 2002. – Vol. 36. – № 20. – P. 4395-4402.

51. Liu, L. Isokinetic Relationship, Isoequilibrium Relationship, and Enthalpy–Entropy Compensation / L. Liu, Q.-X. Guo // *Chemical Reviews*. – 2001. – Vol. 101. – № 3. – P. 673-696.

52. Hammett, L.P. Some Relations between Reaction Rates and Equilibrium Constants. / L.P. Hammett // *Chemical Reviews*. – 1935. – Vol. 17. – № 1. – P. 125-136.

53. Hammett, L.P. The Effect of Structure upon the Reactions of Organic Compounds. Benzene Derivatives / L.P. Hammett // *Journal of the American Chemical Society*. – 1937. – Vol. 59. – № 1. – P. 96-103.

54. Chen, L.-J. Effect of Hydrophobic Chain Length of Surfactants on Enthalpy–Entropy Compensation of Micellization / L.-J. Chen, S.-Y. Lin, C.-C. Huang // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 1998. – Vol. 102. – № 22. – P. 4350-4356.

55. Sugihara, G. Thermodynamic Study on the Langmuir Adsorption of Various Bile Salts Including Taurine and Glycine Conjugates onto Graphite in Water / G. Sugihara, D.-S. Shigematsu, S. Nagadome, S. Lee, Y. Sasaki, H. Igimi // *Langmuir*. – 2000. – Vol. 16. – № 4. – P. 1825-1833.

56. Miyabe, K. Extrathermodynamic Study of Surface Diffusion in Reversed-Phase Liquid Chromatography with Silica Gels Bonded with Alkyl Ligands of Different Chain Lengths / K. Miyabe, G. Guiochon // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2005. – Vol. 109. – № 24. – P. 12038-12048.

57. Coats, E.A. Comparative analysis of the cytotoxicity of substituted [phenylglyoxal bis(4-methyl-3-thiosemicarbazone)]copper(II) chelates. 2. Parabolic correlations and their implications for selective toxicity / E.A. Coats, S.R. Milstein, M.A. Pleiss, J.A. Roesener // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1978. – Vol. 21. – № 8. – P. 804-809.

58. Katritzky, A.R. Theoretical Descriptors for the Correlation of Aquatic Toxicity of Environmental Pollutants by Quantitative Structure-Toxicity Relationships / A.R. Katritzky, D.B. Tatham, U. Maran // *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. – 2001. – Vol. 41. – № 5. – P. 1162-1176.

59. Pan, A. Enthalpy–Entropy Compensation (EEC) Effect: Decisive Role of Free Energy / A. Pan, T. Kar, A.K. Rakshit, S.P. Moulik // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – Vol. 120. – № 40. – P. 10531-10539.
60. Dragan, A.I. Enthalpy–entropy compensation: the role of solvation / A.I. Dragan, C.M. Read, C. Crane-Robinson // *European Biophysics Journal*. – 2017. – Vol. 46. – № 4. – P. 301-308.
61. Barclay, I.M. The entropy of solution / I.M. Barclay, J.A.V. Butler // *Transactions of the Faraday Society*. – 1938. – Vol. 34. – P. 1445.
62. Sedov, I.A. Solvophobic effects and relationships between the Gibbs energy and enthalpy for the solvation process / I.A. Sedov, M.A. Stolov, B.N. Solomonov // *Journal of Physical Organic Chemistry*. – 2011. – Vol. 24. – № 11. – P. 1088-1094.
63. Sedov, I.A. Solvophobic effects: Qualitative determination and quantitative description / I.A. Sedov, B.N. Solomonov // *Journal of Structural Chemistry*. – 2013. – Vol. 54. – № S2. – P. 262-270.
64. Sedov, I.A. tert-Butyl chloride as a probe of the solvophobic effects / I.A. Sedov, M.A. Stolov, B.N. Solomonov // *Fluid Phase Equilibria*. – 2014. – Vol. 382. – P. 164-168.
65. Lombardo, D. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches / D. Lombardo, M.A. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra // *Advances in Condensed Matter Physics*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-22.
66. Lombardo, D. Self-Assembly of Organic Nanomaterials and Biomaterials: The Bottom-Up Approach for Functional Nanostructures Formation and Advanced Applications / D. Lombardo, P. Calandra, L. Pasqua, S. Magazù // *Materials*. – 2020. – Vol. 13. – № 5. – P. 1048.
67. Spolar, R.S. Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins / R.S. Spolar, J.H. Ha, M.T. Record // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1989. – Vol. 86. – № 21. – P. 8382-8385.
68. Murphy, K. Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds / K. Murphy, P. Privalov, S. Gill // *Science*. – 1990. – Vol. 247. – № 4942. – P. 559-561.

69. Dobson, C.M. Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment / C.M. Dobson, A. Šali, M. Karplus // *Angewandte Chemie International Edition*. – 1998. – Vol. 37. – № 7. – P. 868-893.
70. Pace, C.N. Contribution of Hydrophobic Interactions to Protein Stability / C.N. Pace, H. Fu, K.L. Fryar, J. Landua, S.R. Trevino, B.A. Shirley, M.M. Hendricks, S. Iimura, K. Gajiwala, J.M. Scholtz, G.R. Grimsley // *Journal of Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 408. – № 3. – P. 514-528.
71. Prevost, M. Contribution of the hydrophobic effect to protein stability: analysis based on simulations of the Ile-96----Ala mutation in barnase. / M. Prevost, S.J. Wodak, B. Tidor, M. Karplus // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – Vol. 88. – № 23. – P. 10880-10884.
72. Kellis, J.T. Contribution of hydrophobic interactions to protein stability / J.T. Kellis, K. Nyberg, D. Sail, A.R. Fersht // *Nature*. – 1988. – Vol. 333. – № 6175. – P. 784-786.
73. Kellis, J.T. Energetics of complementary side chain packing in a protein hydrophobic core / J.T. Kellis, K. Nyberg, A.R. Fersht // *Biochemistry*. – 1989. – Vol. 28. – № 11. – P. 4914-4922.
74. Matsumura, M. Hydrophobic stabilization in T4 lysozyme determined directly by multiple substitutions of Ile 3 / M. Matsumura, W.J. Becktel, B.W. Matthews // *Nature*. – 1988. – Vol. 334. – № 6181. – P. 406-410.
75. Zhu, B.-Y. Packing and hydrophobicity effects on protein folding and stability: Effects of  $\beta$ -branched amino acids, valine and isoleucine, on the formation and stability of two-stranded  $\alpha$ -helical coiled coils/leucine zippers: Protein folding and stability / B.-Y. Zhu, M.E. Zhou, C.M. Kay, R.S. Hodges // *Protein Science*. – 1993. – Vol. 2. – № 3. – P. 383-394.
76. Sandberg, W.S. Influence of Interior Packing and Hydrophobicity on the Stability of a Protein / W.S. Sandberg, T.C. Terwilliger // *Science*. – 1989. – Vol. 245. – № 4913. – P. 54-57.

77. Smith, L.J. The concept of a random coil: Residual structure in peptides and denatured proteins / L.J. Smith, K.M. Fiebig, H. Schwalbe, C.M. Dobson // *Folding and Design*. – 1996. – Vol. 1. – № 5. – P. R95-R106.
78. Ptitsyn, O.B. Molten Globule and Protein Folding / O.B. Ptitsyn // *Advances in Protein Chemistry* / DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60546-X. – Elsevier, 1995. – Vol. 47. – P. 83-229.
79. Doniach, S. Partially Folded States of Proteins: Characterization by X-ray Scattering / S. Doniach, J. Bascle, T. Garel, H. Orland // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – Vol. 254. – № 5. – P. 960-967.
80. Dobson, C.M. Unfolded proteins, compact states and molten globules / C.M. Dobson // *Current Opinion in Structural Biology*. – 1992. – Vol. 2. – № 1. – P. 6-12.
81. Biela, A. Dissecting the Hydrophobic Effect on the Molecular Level: The Role of Water, Enthalpy, and Entropy in Ligand Binding to Thermolysin / A. Biela, N.N. Nasief, M. Betz, A. Heine, D. Hangauer, G. Klebe // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2013. – Vol. 52. – № 6. – P. 1822-1828.
82. Snyder, P.W. Mechanism of the hydrophobic effect in the biomolecular recognition of arylsulfonamides by carbonic anhydrase / P.W. Snyder, J. Mecinovic, D.T. Moustakas, S.W. Thomas, M. Harder, E.T. Mack, M.R. Lockett, A. Heroux, W. Sherman, G.M. Whitesides // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108. – № 44. – P. 17889-17894.
83. Gaspari, R. Kinetic and Structural Insights into the Mechanism of Binding of Sulfonamides to Human Carbonic Anhydrase by Computational and Experimental Studies / R. Gaspari, C. Rechlin, A. Heine, G. Bottegoni, W. Rocchia, D. Schwarz, J. Bomke, H.-D. Gerber, G. Klebe, A. Cavalli // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 59. – № 9. – P. 4245-4256.
84. Cao, Y. Improved protein–ligand binding affinity prediction by using a curvature-dependent surface-area model / Y. Cao, L. Li // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30. – № 12. – P. 1674-1680.
85. Friesner, R.A. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes / R.A. Friesner, R.B. Murphy,

- M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrín, D.T. Mainz // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – Vol. 49. – № 21. – P. 6177-6196.
86. Kitchen, D.B. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications / D.B. Kitchen, H. Decornez, J.R. Furr, J. Bajorath // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2004. – Vol. 3. – № 11. – P. 935-949.
87. Ferrara, P. Assessing Scoring Functions for Protein–Ligand Interactions / P. Ferrara, H. Gohlke, D.J. Price, G. Klebe, C.L. Brooks // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2004. – Vol. 47. – № 12. – P. 3032-3047.
88. Cargill, R.W. Solubility of argon in water + alcohol systems / R.W. Cargill, T.J. Morrison // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*. – 1975. – Vol. 71. – № 0. – P. 618-624.
89. Zhou, B. Thermodynamic Functions for Transfer of Anthracene from Water to (Water + Alcohol) Mixtures at 298.15 K / B. Zhou, W. Cai, L. Zou // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 2003. – Vol. 48. – № 3. – P. 742-745.
90. Wang, Y. Solubility of CH<sub>4</sub> in the mixed solvent t-butyl alcohol and water / Y. Wang, B. Han, H. Yan, R. Liu // *Thermochimica Acta*. – 1995. – Vol. 253. – P. 327-334.
91. Крестов, Г.А. Растворимость и термодинамика растворения аргона в водных растворах диоксана при 25-70° С / Г.А. Крестов, Б.Е. Неделько // *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. – 1970. – Т. 13. – № 2. – С. 158-161.
92. Крестов, Г.А. Растворимость и термодинамика растворения аргона в водных растворах одноатомных спиртов / Г.А. Крестов, К.М. Пацация // *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. – 1969. – Т. 12. – № 11. – С. 1495-1498.
93. Крестов, Г.А. Растворимость и термодинамика растворения аргона в водных растворах формамида / Г.А. Крестов, Б.Е. Неделько, А.П. Полищук // *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. – 1975. – Т. 18. – № 6. – С. 914-916.
94. Крестов, Г.А. Исследование растворимости аргона в водно-ацетоновых растворах хлорида калия / Г.А. Крестов, Б.Е. Неделько, В.В. Мясоедова // *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. – 1975. – Т. 18. – № 5. – С. 753-756.



95. Крестов, Г.А. Влияние добавок электролита на растворимость аргона в системе вода – диметилформамид / Г.А. Крестов, Б.Е. Неделько, А.П. Полищук // Изв. вузов. Химия и хим. технология. – 1975. – Т. 18. – № 10. – С. 1590-1594.
96. Cheong, W.J. Limiting activity coefficients and gas-liquid partition coefficients of alkylbenzenes in hydro-organic solvents / W.J. Cheong, P.W. Carr // Journal of Chromatography A. – 1990. – Vol. 500. – P. 215-239.
97. Zhou, B. Thermodynamics of transfer of naphthalene and 2-naphthoic acid from water to (water+ethanol) mixtures at T=298.15 K / B. Zhou, W. Cai, L. Zou // The Journal of Chemical Thermodynamics. – 2003. – Vol. 35. – № 9. – P. 1413-1424.
98. Bennett, D. Thermodynamics of solution of naphthalene in various water-ethanol mixtures / D. Bennett, W.J. Canady // Journal of the American Chemical Society. – 1984. – Vol. 106. – № 4. – P. 910-915.
99. Huot, J.-Y. Thermodynamic properties of naphthalene and uric acid in ethylene glycol-water mixtures / J.-Y. Huot, M. Pagé, C. Jolicoeur // Journal of Solution Chemistry. – 1991. – Vol. 20. – № 11. – P. 1093-1112.
100. Schantz, M. (Miller). Partitioning of alkylbenzenes and aliphatic alcohols between hexadecane and methanol-water mixtures. / M. (Miller) Schantz, B.N. Barman, D.E. Martire // Journal of research of the National Bureau of Standards. – 1988. – Vol. 93. – № 2. – P. 161-173.
101. Cox, B.G. Free energies, enthalpies, and entropies of transfer of non-electrolytes from water to mixtures of water and dimethyl sulphoxide, water and acetonitrile, and water and dioxan / B.G. Cox // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2. – 1973. – № 5. – P. 607-610.
102. Datta, J. Transfer thermodynamics of p-nitroaniline in aqueous solutions of some ionic and non-ionic cosolvents and the structuredness of the solvents / J. Datta, K. Kundu // Canadian Journal of Chemistry. – 1983. – Vol. 61. – № 3. – P. 625-631.
103. Morris, K.R. Solubility of aromatic pollutants in mixed solvents / K.R. Morris, R. Abramowitz, R. Pinal, P. Davis, S.H. Yalkowsky // Chemosphere. – 1988. – Vol. 17. – № 2. – P. 285-298.

104. Abraham, M.H. A quantitative measure of solvent solvophobic effect / M.H. Abraham, P.L. Grellier, R.A. McGill // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2.* – 1988. – № 3. – P. 339.
105. Soltanpour, S. Solubility of Clonazepam and Diazepam in Polyethylene Glycol 200, Propylene Glycol, *N*-Methyl Pyrrolidone, Ethanol, and Water at (298.2 to 318.2) K and in Binary and Ternary Mixtures of Polyethylene Glycol 200, Propylene Glycol, and Water at 298.2 K / S. Soltanpour, Z. Bastami, S. Sadeghilar, M. Kouhestani, F. Pouya, A. Jouyban // *Journal of Chemical & Engineering Data.* – 2013. – Vol. 58. – № 2. – P. 307-314.
106. Jain, N. Solubilization of NSC-639829 / N. Jain, G. Yang, S.E. Tabibi, S.H. Yalkowsky // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2001. – Vol. 225. – № 1. – P. 41-47.
107. Kawakami, K. Solubilization behavior of poorly soluble drugs with combined use of Gelucire 44/14 and cosolvent / K. Kawakami, K. Miyoshi, Y. Ida // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2004. – Vol. 93. – № 6. – P. 1471-1479.
108. Ran, Y. Solubilization and Preformulation Studies on PG-300995 (An Anti-HIV Drug) / Y. Ran, A. Jain, S.H. Yalkowsky // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2005. – Vol. 94. – № 2. – P. 297-303.
109. Breon, T.L. Solubility Profiles for Several Barbiturates in Hydroalcoholic Mixtures / T.L. Breon, A.N. Paruta // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 1970. – Vol. 59. – № 9. – P. 1306-1313.
110. Gould, P.L. Investigation of the solubility relationships of polar, semi-polar and non-polar drugs in mixed co-solvent systems / P.L. Gould, M. Goodman, P.A. Hanson // *International Journal of Pharmaceutics.* – 1984. – Vol. 19. – № 2. – P. 149-159.
111. Bustamante, P. Enthalpy–entropy compensation for the solubility of drugs in solvent mixtures: Paracetamol, acetanilide, and nalidixic acid in dioxane–water / P. Bustamante, S. Romero, A. Peña, B. Escalera, A. Reillo // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 1998. – Vol. 87. – № 12. – P. 1590-1596.
112. Jouyban, A. Solubility of Chlordiazepoxide, Diazepam, and Lorazepam in Ethanol + Water Mixtures at 303.2 K / A. Jouyban, J. Shokri, M. Barzegar-Jalali, D. Hassanzadeh,

W.E. Acree, T. Ghafourian, A. Nokhodchi // Journal of Chemical & Engineering Data. – 2009. – Vol. 54. – № 7. – P. 2142-2145.

113. Delgado, D.R. Preferential solvation of some structurally related sulfonamides in 1-propanol + water co-solvent mixtures / D.R. Delgado, F. Martínez // Physics and Chemistry of Liquids. – 2015. – Vol. 53. – № 3. – P. 293-306.

114. Ortíz, C.P. Thermodynamic analysis and preferential solvation of sulfanilamide in different cosolvent mixtures / C.P. Ortíz, R.E. Cardenas-Torres, D.I. Caviedes-Rubio, S.D.J. Polania-Orozco, D.R. Delgado // Physics and Chemistry of Liquids. – 2021. – P. 1-16.

115. Delgado, D.R. Solution thermodynamics and preferential solvation of sulfamethazine in (methanol + water) mixtures / D.R. Delgado, O.A. Almanza, F. Martínez, M.A. Peña, A. Jouyban, W.E. Acree // The Journal of Chemical Thermodynamics. – 2016. – Vol. 97. – P. 264-276.

116. Jouyban, A. Review of the cosolvency models for predicting solubility of drugs in water-cosolvent mixtures / A. Jouyban // Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. – 2008. – Vol. 11. – № 1. – P. 32-58.

117. Ren, G.-B. Solubility of DL - *p* -hydroxyphenylglycine Sulfate in Binary Acetone + Water Solvent Mixtures / G.-B. Ren, J.-K. Wang, Q.-X. Yin, M.-J. Zhang // Journal of Chemical & Engineering Data. – 2004. – Vol. 49. – № 5. – P. 1376-1378.

118. Martínez, F. Thermodynamic analysis and enthalpy–entropy compensation for the solubility of indomethacin in aqueous and non-aqueous mixtures / F. Martínez, M.Á. Peña, P. Bustamante // Fluid Phase Equilibria. – 2011. – Vol. 308. – № 1. – P. 98-106.

119. Jouyban, A. Solubility Prediction of Paracetamol in Binary and Ternary Solvent Mixtures Using Jouyban-Acree Model / A. Jouyban, H.-K. Chan, N.Y.K. Chew, M. Khoubnasabjafari, W.E. Acree, Jr. // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2006. – Vol. 54. – № 4. – P. 428-431.

120. Bustamante, P. Chameleonic Effect of Sulfanilamide and Sulfamethazine in Solvent Mixtures. Solubility Curves with Two Maxima. / P. Bustamante, R. Ochoa, A. Reillo, J.-B. Escalera // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1994. – Vol. 42. – № 5. – P. 1129-1133.

121. Jouyban, A. A Cosolvency Model to Predict Solubility of Drugs at Several Temperatures from a Limited Number of Solubility Measurements / A. Jouyban, S. Romero, H.-K. Chan, B.J. Clark, P. Bustamante // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2002. – Vol. 50. – № 5. – P. 594-599.
122. Marcus, Y. Solvent mixtures: properties and selective solvation. Solvent mixtures / Y. Marcus. – New York: Marcel Dekker, Inc, 2002. – 258 p.
123. Ben-Naim, A. Preferential solvation in two- and in three-component systems / A. Ben-Naim // *Pure and Applied Chemistry*. – 1990. – Vol. 62. – № 1. – P. 25-34.
124. Ben-Naim, A. Theory of preferential solvation of nonelectrolytes / A. Ben-Naim // *Cell Biophysics*. – 1988. – Vol. 12. – № 1. – P. 255-269.
125. Marcus, Y. A quasi-lattice quasi-chemical theory of preferential solvation of ions in mixed solvents / Y. Marcus // *Australian Journal of Chemistry*. – 1983. – Vol. 36. – № 9. – P. 1719.
126. Marcus, Y. Preferential solvation. Part 3.—Binary solvent mixtures / Y. Marcus // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*. – 1989. – Vol. 85. – № 2. – P. 381.
127. Jouyban, A. Preferential Solvation of Fenofibrate in (Ethanol or Acetone) Water Mixtures at 298.15 K / A. Jouyban, F. Martinez, W.E. Acree Jr. // *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*. – 2017. – Vol. 36. – № 4.
128. Marcus, Y. On the preferential solvation of drugs and PAHs in binary solvent mixtures / Y. Marcus // *Journal of Molecular Liquids*. – 2008. – Vol. 140. – № 1-3. – P. 61-67.
129. Martínez, F. Solubility of phenobarbital in aqueous cosolvent mixtures revisited: IKBI preferential solvation analysis / F. Martínez, A. Jouyban, W.E. Acree // *Physics and Chemistry of Liquids*. – 2017. – Vol. 55. – № 4. – P. 432-443.
130. Peña, M.Á. Preferential Solvation of Indomethacin in Some Aqueous Co-Solvent Mixtures / M.Á. Peña, D.R. Delgado, F. Martínez // *Chemical Engineering Communications*. – 2016. – Vol. 203. – № 5. – P. 619-627.
131. Jiménez, D. Preferential Solvation of the Antioxidant Agent Daidzein in some Aqueous Co-Solvent Mixtures according to IKBI and QLQC Methods / D. Jiménez, Z.

Cárdenas, D. Delgado, M. Peña, F. Martínez // *Journal of Applied Solution Chemistry and Modeling*. – 2015. – Vol. 4. – № 2. – P. 110-118.

132. He, Q. Baicalin solubility in aqueous co-solvent mixtures of methanol, ethanol, isopropanol and *n*-propanol revisited: solvent–solvent and solvent–solute interactions and IKBI preferential solvation analysis / Q. He, M. Zheng, H. Zhao // *Physics and Chemistry of Liquids*. – 2020. – Vol. 58. – № 6. – P. 820-832.

133. Zakharov, A.G. The thermochemical characteristics of solution of phenol and benzoic acid in water-dimethylsulfoxide and water-acetonitrile mixtures / A.G. Zakharov, M.I. Voronova, D.V. Batov, K.V. Smirnova // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2011. – Vol. 85. – № 3. – P. 408-412.

134. Behbehani, G.R. Enthalpies of transfer of acetonitrile from water to aqueous methanol, ethanol and dimethylsulphoxide mixtures at 298.15K / G.R. Behbehani, S. Ghammamy, W.E. Waghorne // *Thermochimica Acta*. – 2006. – Vol. 448. – № 1. – P. 37-40.

135. Smirnov, V.I. Influence of the composition of aqueous-amide solvents on enthalpic characteristics of l-proline dissolution at T= 298.15 K / V.I. Smirnov, V.G. Badelin // *Journal of Molecular Liquids*. – 2016. – Vol. 220. – P. 21-25.

136. Smirnov, V.I. Dependence of the enthalpies of alanyl-alanine dissolution on the composition of mixed water + acetone and water + DMSO solvents at 298.15 K / V.I. Smirnov, V.G. Badelin // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2015. – Vol. 89. – № 8. – P. 1311-1315.

137. Józwiak, M. The effect of properties of water–organic solvent mixtures on the solvation enthalpy of 12-crown-4, 15-crown-5, 18-crown-6 and benzo-15-crown-5 ethers at 298.15 K / M. Józwiak // *Thermochimica Acta*. – 2004. – Vol. 417. – № 1. – P. 31-41.

138. Batov, D.V. Thermochemistry of Aniline Solution in Binary Mixtures Water-Aprotic Solvent / D.V. Batov, O.A. Antonova, V.P. Korolev // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2001. – Vol. 71. – № 5. – P. 689-695.

139. Kustov, A.V. Solvation of Aniline in Mixtures of Water with N,N-Dimethylformamide and Acetonitrile / A.V. Kustov, A.V. Bekeneva, O.A. Antonova,

V.P. Korolev // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2002. – Vol. 72. – № 6. – P. 918-923.

140. Батов, Д.В. Особенности сольватации углеводородных радикалов и функциональных групп молекул органических веществ в смесях воды с метанолом, 1-пропанолом и 2-метилпропан-2-олом / Д.В. Батов, О.А. Антонова, В.П. Королев // *Журнал общей химии*. – 1998. – Т. 68. – № 5. – С. 763-769.

141. Куликов, М.В. Влияние добавок воды на энтальпии сольватации н-алканов в смешанных растворителях ацетон – вода и 1,4-диоксан – вода при 298.15 К / М.В. Куликов, М.Ю. Кропотова, В.П. Королев // *Журнал общей химии*. – 1996. – Т. 66. – № 9. – С. 1424-1428.

142. Куликов, М.В. Энтальпии сольватации углеводородов в смесях воды с ацетоном и 1,4-диоксаном при 298.15 К / М.В. Куликов, М.Ю. Кропотова, В.П. Королев // *Журнал общей химии*. – 1997. – Т. 67. – № 12. – С. 1953-1958.

143. Батов, Д.В. Термохимия растворов органических неэлектролитов в смешанных растворителях : доктор химических наук / Д.В. Батов. – Иваново, 2002.

144. Batov, D.V. Thermochemistry of benzene solution in water-aprotic solvent binary mixtures / D.V. Batov, O.A. Antonova, V.P. Korolev // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2001. – Vol. 71. – № 8. – P. 1215-1219.

145. Bushuev, Y.G. Water-methanol-benzene ternary system. Thermochemical experiment and computer simulation / Y.G. Bushuev, V.P. Korolev // *Journal of Structural Chemistry*. – 2006. – Vol. 47. – № S1. – P. S66-S72.

146. Lara, J. Microheterogeneity in aqueous-organic mixtures: thermodynamic transfer functions for benzene from water to 2-propanol aqueous systems at 25 C / J. Lara, L. Avédikian, G. Perron, J.E. Desnoyers // *Journal of Solution Chemistry*. – 1981. – Vol. 10. – № 5. – P. 301-313.

147. Kustov, A.V. Solvation of benzene and its simple mono derivatives in water-tertiary butanol mixtures / A.V. Kustov, O.A. Antonova // *Thermochimica Acta*. – 2013. – Vol. 565. – P. 159-162.

148. Ben-Naim, A. Solubility and thermodynamics of solution of argon in water + ethanol system / A. Ben-Naim, S. Baer // *Transactions of the Faraday Society*. – 1964. – Vol. 60. – P. 1736.
149. Ben-Naim, A. Solubility and thermodynamics of solution of argon in water-methanol system / A. Ben-Naim // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1967. – Vol. 71. – № 12. – P. 4002-4007.
150. Эбаноидзе, М. Растворимость и калориметрия растворения ксенона в одноатомных и много-атомных спиртах, их смесях с водой, водных и метанольных растворах NaI, CsI и  $(\text{CH}_3)_4\text{NI}$  при 278 – 318 К / М. Эбаноидзе. – Иваново, 1989. – 154 с.
151. Bustamante, C. Nonlinear Enthalpy–Entropy Compensation for the Solubility of Phenacetin in Dioxane–Water Solvent Mixtures / C. Bustamante, P. Bustamante // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1996. – Vol. 85. – № 10. – P. 1109-1111.
152. Gantiva, M. Solution Thermodynamics of Ketoprofen in Ethanol + Water Cosolvent Mixtures / M. Gantiva, A. Yurquina, F. Martínez // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 2010. – Vol. 55. – № 1. – P. 113-118.
153. Delgado, D.R. Solubility of sulfapyridine in propylene glycol+water mixtures and correlation with the Jouyban–Acree model / D.R. Delgado, G.A. Rodríguez, A.R. Holguín, F. Martínez, A. Jouyban // *Fluid Phase Equilibria*. – 2013. – Vol. 341. – P. 86-95.
154. Delgado, D.R. Solubility and preferential solvation of sulfadiazine in methanol+water mixtures at several temperatures / D.R. Delgado, F. Martínez // *Fluid Phase Equilibria*. – 2014. – Vol. 379. – P. 128-138.
155. Pacheco, D.P. Thermodynamic analysis of the solubility of naproxen in ethanol + water cosolvent mixtures / D.P. Pacheco, F. Martínez // *Physics and Chemistry of Liquids*. – 2007. – Vol. 45. – № 5. – P. 581-595.
156. Shah, P.P. Molecular Solvation in Water–Methanol and Water–Sorbitol Mixtures: The Roles of Preferential Hydration, Hydrophobicity, and the Equation of State / P.P. Shah, C.J. Roberts // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2007. – Vol. 111. – № 17. – P. 4467-4476.

157. Rajamani, S. Hydrophobic hydration from small to large lengthscales: Understanding and manipulating the crossover / S. Rajamani, T.M. Truskett, S. Garde // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – Vol. 102. – № 27. – P. 9475-9480.
158. Guillot, B. A computer simulation study of the temperature dependence of the hydrophobic hydration / B. Guillot, Y. Guissani // The Journal of Chemical Physics. – 1993. – Vol. 99. – № 10. – P. 8075-8094.
159. Yu, H. A thermodynamic analysis of solvation / H. Yu, M. Karplus // The Journal of Chemical Physics. – 1988. – Vol. 89. – № 4. – P. 2366-2379.
160. Vegt, N.F.A. van der. Entropic Contributions in Cosolvent Binding to Hydrophobic Solutes in Water / N.F.A. van der Vegt, W.F. van Gunsteren // The Journal of Physical Chemistry B. – 2004. – Vol. 108. – № 3. – P. 1056-1064.
161. Özal, T.A. Confusing Cause and Effect: Energy–Entropy Compensation in the Preferential Solvation of a Nonpolar Solute in Dimethyl Sulfoxide/Water Mixtures / T.A. Özal, N.F.A. van der Vegt // The Journal of Physical Chemistry B. – 2006. – Vol. 110. – № 24. – P. 12104-12112.
162. Lee, M.-E. Molecular Thermodynamics of Methane Solvation in *tert* - Butanol–Water Mixtures / M.-E. Lee, N.F.A. Van der Vegt // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2007. – Vol. 3. – № 1. – P. 194-200.
163. Fujita, Y. The Effect of Organic Solvents on the Thermal Denaturation of Lysozyme as Measured by Differential Scanning Calorimetry / Y. Fujita, Y. Noda // Bulletin of the Chemical Society of Japan. – 1983. – Vol. 56. – № 1. – P. 233-237.
164. Griebenow, K. On Protein Denaturation in Aqueous–Organic Mixtures but Not in Pure Organic Solvents / K. Griebenow, A.M. Klibanov // Journal of the American Chemical Society. – 1996. – Vol. 118. – № 47. – P. 11695-11700.
165. Privalov, P.L. Thermal investigations of biopolymer solutions and scanning microcalorimetry / P.L. Privalov // FEBS Letters. – 1974. – Vol. 40. – № S1. – P. S133-S139.



166. Privalov, P.L. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins / P.L. Privalov, S.A. Potekhin // *Methods in Enzymology*. – 1986. – Vol. 131. – P. 4-51.
167. Fujita, Y. Effect of Alcohols on the Thermal Denaturation of Lysozyme as Measured by Differential Scanning Calorimetry / Y. Fujita, A. Miyanaga, Y. Noda // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. – 1979. – Vol. 52. – № 12. – P. 3659-3662.
168. Velicelebi, G. Thermodynamics of the denaturation of lysozyme in alcohol-water mixtures / G. Velicelebi, J.M. Sturtevant // *Biochemistry*. – 1979. – Vol. 18. – № 7. – P. 1180-1186.
169. Gerlsma, S.Y. The Effect of Polyhydric and Monohydric Alcohols on the Heat-Induced Reversible Denaturation of Lysozyme and Ribonuclease / S.Y. Gerlsma, E.R. Stuur // *International Journal of Peptide and Protein Research*. – 1972. – Vol. 4. – № 6. – P. 377-383.
170. Cinelli, S. Effect of Aqueous Alcohol Solutions on the Thermal Transition of Lysozyme: A Calorimetric Study / S. Cinelli, G. Onori, A. Santucci // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 1997. – Vol. 101. – № 40. – P. 8029-8034.
171. Tanaka, A. Differential Scanning Calorimetric Studies on the Thermal Unfolding of *Pseudomonas cepacia* Lipase in the Absence and Presence of Alcohols / A. Tanaka // *Journal of Biochemistry*. – 1998. – Vol. 123. – № 2. – P. 289-293.
172. Miyawaki, O. Thermodynamic analysis of alcohol effect on thermal stability of proteins / O. Miyawaki, M. Tatsuno // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2011. – Vol. 111. – № 2. – P. 198-203.
173. Herskovits, T.T. On the Structural Stability and Solvent Denaturation of Proteins / T.T. Herskovits, B. Gadegbeku, H. Jaillet // *Journal of Biological Chemistry*. – 1970. – Vol. 245. – № 10. – P. 2588-2598.
174. Torreggiani, A. Effect of sulfoxides on the thermal denaturation of hen lysozyme: A calorimetric and Raman study / A. Torreggiani, M. Di Foggia, I. Manco, A. De Maio, S.A. Markarian, S. Bonora // *Journal of Molecular Structure*. – 2008. – Vol. 891. – № 1-3. – P. 115-122.

175. Fujita, Y. Effect of dimethylsulfoxide and its homologues on the thermal denaturation of lysozyme as measured by differential scanning calorimetry / Y. Fujita, S. Izumiguchi, Y. Noda // International Journal of Peptide and Protein Research. – 1982. – Vol. 19. – № 1. – P. 25-31.
176. Jacobson, A.L. Specific solvent effects on the thermal denaturation of ribonuclease. Effect of dimethyl sulfoxide and p-dioxane on thermodynamics of denaturation / A.L. Jacobson, C.L. Turner // Biochemistry. – 1980. – Vol. 19. – № 19. – P. 4534-4538.
177. Hamaguchi, K. Structure of Lysozyme: IX. The Effect of Temperature on the Conformation of Lysozyme\* / K. Hamaguchi, H. Sakai // The Journal of Biochemistry. – 1965. – Vol. 57. – № 6. – P. 721-732.
178. Greene, R.F. Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation of Ribonuclease, Lysozyme,  $\alpha$ -Chymotrypsin, and b-Lactoglobulin / R.F. Greene, C.N. Pace // Journal of Biological Chemistry. – 1974. – Vol. 249. – № 17. – P. 5388-5393.
179. Pace, C.N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves / C.N. Pace // Methods in Enzymology. – 1986. – Vol. 131. – P. 266-280.
180. Wang, Q. Comparison of chemical and thermal protein denaturation by combination of computational and experimental approaches. II / Q. Wang, A. Christiansen, A. Samiotakis, P. Wittung-Stafshede, M.S. Cheung // The Journal of Chemical Physics. – 2011. – Vol. 135. – № 17. – P. 175102.
181. Myers, J.K. Denaturant  $m$  values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding / J.K. Myers, C. Nick Pace, J. Martin Scholtz // Protein Science. – 1995. – Vol. 4. – № 10. – P. 2138-2148.
182. Khmelnitsky, Y.L. Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis / Y.L. Khmelnitsky, V.V. Mozhaev, A.B. Belova, M.V. Sergeeva, K. Martinek // European Journal of Biochemistry. – 1991. – Vol. 198. – № 1. – P. 31-41.
183. Yadav, J.K. Thermal stability of  $\alpha$ -amylase in aqueous cosolvent systems / J.K. Yadav, V. Prakash // Journal of Biosciences. – 2009. – Vol. 34. – № 3. – P. 377-387.

184. Fujita, Y. The Effect of Polyhydric Alcohols on the Thermal Denaturation of Lysozyme as Measured by Differential Scanning Calorimetry / Y. Fujita, Y. Iwasa, Y. Noda // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. – 1982. – Vol. 55. – № 6. – P. 1896-1900.
185. Persson, M. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity / M. Persson, D. Costes, E. Wehtje, P. Adlercreutz // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2002. – Vol. 30. – № 7. – P. 916-923.
186. Chng, C.-P. Thermal Unfolding Simulations of Bacterial Flagellin: Insight into its Refolding Before Assembly / C.-P. Chng, A. Kitao // *Biophysical Journal*. – 2008. – Vol. 94. – № 10. – P. 3858-3871.
187. Dasmeh, P. Unfolding Simulations of Holomyoglobin from Four Mammals: Identification of Intermediates and  $\beta$ -Sheet Formation from Partially Unfolded States / P. Dasmeh, K.P. Kepp // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 12. – P. e80308.
188. Pang, J. Molecular dynamics simulation of thermal unfolding of *Thermatoga maritima* DHFR / J. Pang, R.K. Allemann // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2007. – Vol. 9. – № 6. – P. 711-718.
189. Roy, S. Dimethyl sulfoxide induced structural transformations and non-monotonic concentration dependence of conformational fluctuation around active site of lysozyme / S. Roy, B. Jana, B. Bagchi // *The Journal of Chemical Physics*. – 2012. – Vol. 136. – № 11. – P. 115103.
190. Yu, Y. The effects of organic solvents on the folding pathway and associated thermodynamics of proteins: a microscopic view / Y. Yu, J. Wang, Q. Shao, J. Shi, W. Zhu // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 19500.
191. Shao, Q. From protein denaturant to protectant: Comparative molecular dynamics study of alcohol/protein interactions / Q. Shao, Y. Fan, L. Yang, Y. Qin Gao // *The Journal of Chemical Physics*. – 2012. – Vol. 136. – № 11. – P. 115101.
192. Sarkar, S. Spectroscopic and Molecular Dynamics Simulation Study of Lysozyme in the Aqueous Mixture of Ethanol: Insights into the Nonmonotonic Change of the Structure of Lysozyme / S. Sarkar, B. Biswas, P.C. Singh // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2018. – Vol. 122. – № 32. – P. 7811-7820.

193. Armarego, W.L.F. Purification of laboratory chemicals / W.L.F. Armarego. – Amsterdam Boston Heidelberg London New York Oxford Paris San Diego San Francisco Singapore Sydney Tokyo: BH, Butterworth-Heinemann, an imprint of Elsevier, 2017. – 1176 p.
194. Gharagheizi, F. Determination of Vapor Pressure of Chemical Compounds: A Group Contribution Model for an Extremely Large Database / F. Gharagheizi, A. Eslamimanesh, P. Ilani-Kashkouli, A.H. Mohammadi, D. Richon // Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2012. – Vol. 51. – № 20. – P. 7119-7125.
195. Acree, W. Phase Transition Enthalpy Measurements of Organic and Organometallic Compounds. Sublimation, Vaporization and Fusion Enthalpies From 1880 to 2015. Part 1. C<sub>1</sub> – C<sub>10</sub> / W. Acree, J.S. Chickos // Journal of Physical and Chemical Reference Data. – 2016. – Vol. 45. – № 3. – P. 33101.
196. Widom, B. Some Topics in the Theory of Fluids / B. Widom // The Journal of Chemical Physics. – 1963. – Vol. 39. – № 11. – P. 2808-2812.
197. Berendsen, H.J.C. The missing term in effective pair potentials / H.J.C. Berendsen, J.R. Grigera, T.P. Straatsma // The Journal of Physical Chemistry. – 1987. – Vol. 91. – № 24. – P. 6269-6271.
198. Keasler, S.J. Transferable Potentials for Phase Equilibria—United Atom Description of Five- and Six-Membered Cyclic Alkanes and Ethers / S.J. Keasler, S.M. Charan, C.D. Wick, I.G. Economou, J.I. Siepmann // The Journal of Physical Chemistry B. – 2012. – Vol. 116. – № 36. – P. 11234-11246.
199. Weerasinghe, S. Kirkwood–Buff derived force field for mixtures of acetone and water / S. Weerasinghe, P.E. Smith // The Journal of Chemical Physics. – 2003. – Vol. 118. – № 23. – P. 10663-10670.
200. Nikitin, A.M. New six-site acetonitrile model for simulations of liquid acetonitrile and its aqueous mixtures / A.M. Nikitin, A.P. Lyubartsev // Journal of Computational Chemistry. – 2007. – Vol. 28. – № 12. – P. 2020-2026.
201. Zheng, Y.-J. A Molecular Dynamics and Quantum Mechanics Analysis of the Effect of DMSO on Enzyme Structure and Dynamics: Subtilisin / Y.-J. Zheng, R.L.

Ornstein // *Journal of the American Chemical Society*. – 1996. – Vol. 118. – № 17. – P. 4175-4180.

202. LeBel, R.G. Density, Viscosity, Refractive Index, and Hygroscopicity of Mixtures of Water and Dimethyl Sulfoxide. / R.G. LeBel, D.A.I. Goring // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 1962. – Vol. 7. – № 1. – P. 100-101.

203. Estrada-Baltazar, A. Densities and Excess Molar Volumes for Acetone + Propionic Acid + Water from (283.15 to 323.15) K at Atmospheric Pressure / A. Estrada-Baltazar, F. Tiscareño-Lechuga, G.A. Iglesias-Silva, K.R. Hall // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 2005. – Vol. 50. – № 1. – P. 18-22.

204. Belda Maximino, R. Surface tension and density of binary mixtures of monoalcohols, water and acetonitrile: equation of correlation of the surface tension / R. Belda Maximino // *Physics and Chemistry of Liquids*. – 2009. – Vol. 47. – № 5. – P. 475-486.

205. Aminabhavi, T.M. Density, Viscosity, Refractive Index, and Speed of Sound in Aqueous Mixtures of N,N-Dimethylformamide, Dimethyl Sulfoxide, N,N-Dimethylacetamide, Acetonitrile, Ethylene Glycol, Diethylene Glycol, 1,4-Dioxane, Tetrahydrofuran, 2-Methoxyethanol, and 2-Ethoxyethanol at 298.15 K / T.M. Aminabhavi, B. Gopalakrishna // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 1995. – Vol. 40. – № 4. – P. 856-861.

206. Abraham, M.J. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl // *SoftwareX*. – 2015. – Vols. 1-2. – GROMACS. – P. 19-25.

207. Garde, S. Origin of Entropy Convergence in Hydrophobic Hydration and Protein Folding / S. Garde, G. Hummer, A.E. García, M.E. Paulaitis, L.R. Pratt // *Physical Review Letters*. – 1996. – Vol. 77. – № 24. – P. 4966-4968.

208. Abraham, M.H. Free energies, enthalpies, and entropies of solution of gaseous nonpolar nonelectrolytes in water and nonaqueous solvents. The hydrophobic effect / M.H. Abraham // *Journal of the American Chemical Society*. – 1982. – Vol. 104. – № 8. – P. 2085-2094.

209. Segebarth, N. Novel Method for the Measurement of Xenon Gas Solubility Using  $^{129}\text{Xe}$  NMR Spectroscopy / N. Segebarth, L. Aitjeddig, E. Locci, K. Bartik, M. Luhmer // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2006. – Vol. 110. – № 37. – P. 10770-10776.
210. Gibanel, F. Solubility of nonpolar gases in tetrahydrofuran at 0 to 30 C and 101.33 kPa partial pressure of gas / F. Gibanel, M.C. Lopez, F.M. Royo, J. Santafe, J.S. Urieta // *Journal of Solution Chemistry*. – 1993. – Vol. 22. – № 3. – P. 211-217.
211. Krause, D. The solubility and isotopic fractionation of gases in dilute aqueous solution. IIa. solubilities of the noble gases / D. Krause, B.B. Benson // *Journal of Solution Chemistry*. – 1989. – Vol. 18. – № 9. – P. 823-873.
212. Kasraian, K. Thermal Analysis of the Tertiary Butyl Alcohol-Water System and Its Implications on Freeze-Drying / K. Kasraian, P.P. DeLuca // *Pharmaceutical Research*. – 1995. – Vol. 12. – № 4. – P. 484-490.
213. Vaney, M.C. High-Resolution Structure (1.33 Å) of a HEW Lysozyme Tetragonal Crystal Grown in the APCF Apparatus. Data and Structural Comparison with a Crystal Grown under Microgravity from SpaceHab-01 Mission / M.C. Vaney, S. Maignan, M. Riès-Kautt, A. Ducruix // *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. – 1996. – Vol. 52. – № 3. – P. 505-517.
214. Chen, B. Development of Polarizable Water Force Fields for Phase Equilibrium Calculations / B. Chen, J. Xing, J.I. Siepmann // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2000. – Vol. 104. – № 10. – P. 2391-2401.
215. Walser, R. On the Temperature and Pressure Dependence of a Range of Properties of a Type of Water Model Commonly Used in High-Temperature Protein Unfolding Simulations / R. Walser, A.E. Mark, W.F. van Gunsteren // *Biophysical Journal*. – 2000. – Vol. 78. – № 6. – P. 2752-2760.
216. Plyasunov, A.V. Thermodynamic functions of hydration of hydrocarbons at 298.15 K and 0.1 MPa / A.V. Plyasunov, E.L. Shock // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 2000. – Vol. 64. – № 3. – P. 439-468.
217. Antonova, O.A. Solvation thermodynamics of benzene, nitrobenzene, and aniline in water–acetonitrile mixtures / O.A. Antonova, N.L. Smirnova, A.V. Kustov // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2017. – Vol. 91. – № 9. – P. 1685-1691.

218. Tomza, P. Microheterogeneity in binary mixtures of propyl alcohols with water: NIR spectroscopic, two-dimensional correlation and multivariate curve resolution study / P. Tomza, M.A. Czarnecki // *Journal of Molecular Liquids*. – 2015. – Vol. 209. – P. 115-120.
219. Gazi, H.A.R. Heterogeneity in Binary Mixtures of (Water + Tertiary Butanol): Temperature Dependence Across Mixture Composition / H.A.R. Gazi, R. Biswas // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2011. – Vol. 115. – № 12. – P. 2447-2455.
220. Banerjee, S. Fluctuating micro-heterogeneity in water–tert-butyl alcohol mixtures and lambda-type divergence of the mean cluster size with phase transition-like multiple anomalies / S. Banerjee, J. Furtado, B. Bagchi // *The Journal of Chemical Physics*. – 2014. – Vol. 140. – № 19. – P. 194502.
221. Shin, D.N. On the Origin of Microheterogeneity: Mass Spectrometric Studies of Acetonitrile–Water and Dimethyl Sulfoxide–Water Binary Mixtures (Part 2) / D.N. Shin, J.W. Wijnen, J.B.F.N. Engberts, A. Wakisaka // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2002. – Vol. 106. – № 23. – P. 6014-6020.
222. Egorov, G.I. Volume expansion coefficients of the water-acetone system at temperatures of 278–323.15 K and pressures up to 1000 bar / G.I. Egorov, D.M. Makarov, A.M. Kolker // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2007. – Vol. 81. – № 10. – P. 1576-1581.
223. Macdonald, D.D. The Thermal Pressure and Energy–Volume Coefficients of Dimethyl Sulfoxide – Water Mixtures / D.D. Macdonald, J.B. Hyne // *Canadian Journal of Chemistry*. – 1971. – Vol. 49. – № 4. – P. 611-617.
224. Lepock, J.R. Influence of transition rates and scan rate on kinetic simulations of differential scanning calorimetry profiles of reversible and irreversible protein denaturation / J.R. Lepock, K.P. Ritchie, M.C. Kolios, A.M. Rodahl, K.A. Heinz, J. Kruuv // *Biochemistry*. – 1992. – Vol. 31. – № 50. – P. 12706-12712.
225. Kamiyama, T. Preferential solvation of lysozyme by dimethyl sulfoxide in binary solutions of water and dimethyl sulfoxide / T. Kamiyama, H.L. Liu, T. Kimura // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2009. – Vol. 95. – № 2. – P. 353-359.

226. Matsue, S. Effects of water activity and aqueous solvent ordering on thermal stability of lysozyme,  $\alpha$ -chymotrypsinogen A, and alcohol dehydrogenase / S. Matsue, T. Fujii, O. Miyawaki // International Journal of Biological Macromolecules. – 2001. – Vol. 28. – № 5. – P. 343-349.
227. Nick Pace, C. Forces stabilizing proteins / C. Nick Pace, J.M. Scholtz, G.R. Grimsley // FEBS Letters. – 2014. – Vol. 588. – № 14. – P. 2177-2184.
228. Murphy, K.P. Thermodynamics of Structural Stability and Cooperative Folding Behavior in Proteins / K.P. Murphy, E. Freire // Advances in Protein Chemistry – 1992. – Vol. 43. – P. 313-361.
229. Kauzmann, W. Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation / W. Kauzmann // Advances in Protein Chemistry – 1959. – Vol. 14. – P. 1-63.
230. Livingstone, J.R. Contribution to the thermodynamics of protein folding from the reduction in water-accessible nonpolar surface area / J.R. Livingstone, R.S. Spolar, M.T. Record // Biochemistry. – 1991. – Vol. 30. – № 17. – P. 4237-4244.
231. Gong, H. Assessing the solvent-dependent surface area of unfolded proteins using an ensemble model / H. Gong, G.D. Rose // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 105. – № 9. – P. 3321-3326.
232. Baldwin, R.L. Weak Interactions in Protein Folding: Hydrophobic Free Energy, van der Waals Interactions, Peptide Hydrogen Bonds, and Peptide Solvation / R.L. Baldwin // Protein Folding Handbook / eds. J. Buchner, T. Kiefhaber – Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005. – P. 127-162.
233. Haak, J.R. Solvent polarity and solvation effects in highly aqueous mixed solvents. Application of the Dimroth-Reichardt ET(30) parameter / J.R. Haak, J.B.F.N. Engberts // Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas. – 2010. – Vol. 105. – № 9. – P. 307-311.
234. Kusalik, P.G. Computer Simulation Study of *tert*-Butyl Alcohol. 2. Structure in Aqueous Solution / P.G. Kusalik, A.P. Lyubartsev, D.L. Bergman, A. Laaksonen // The Journal of Physical Chemistry B. – 2000. – Vol. 104. – № 40. – P. 9533-9539.
235. Ковригин, Е.Л. Денатуранты и стабилизаторы структуры белков: Анализ предпочтительной сольватации : кандидат химических наук / Е.Л. Ковригин. – Пушино, 1999. – 127 с.



236. Fink, A.L. Characterization of the unfolding of ribonuclease A in aqueous methanol solvents / A.L. Fink, B. Painter // *Biochemistry*. – 1987. – Vol. 26. – № 6. – P. 1665-1671.
237. Esposito, A. Influence of Glycerol on the Structure and Thermal Stability of Lysozyme: A Dynamic Light Scattering and Circular Dichroism Study / A. Esposito, L. Comez, S. Cinelli, F. Scarponi, G. Onori // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2009. – Vol. 113. – № 51. – P. 16420-16424.
238. Uversky, V.N. Conformational transitions provoked by organic solvents in  $\beta$ -lactoglobulin: can a molten globule like intermediate be induced by the decrease in dielectric constant? / V.N. Uversky, N.V. Narizhneva, S.O. Kirschstein, S. Winter, G. Löber // *Folding and Design*. – 1997. – Vol. 2. – № 3. – P. 163-172.
239. Voets, I.K. DMSO-Induced Denaturation of Hen Egg White Lysozyme / I.K. Voets, W.A. Cruz, C. Moitzi, P. Lindner, E.P.G. Arêas, P. Schurtenberger // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – Vol. 114. – № 36. – P. 11875-11883.
240. García-Hernández, E. Spectroscopic and thermodynamic evidence for a complex denaturation mechanism of bovine  $\beta$ -lactoglobulin A / E. García-Hernández, A. Hernández-Arana, R. Zubillaga, A. Rojo-Domínguez // *IUBMB Life*. – 1998. – Vol. 45. – № 4. – P. 761-768.
241. Seelig, J. Thermal protein unfolding by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy Two-state model *versus* sequential unfolding / J. Seelig, H.-J. Schönfeld // *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 2016. – Vol. 49. – P. e9.
242. Jha, S.K. Kinetic evidence for a two-stage mechanism of protein denaturation by guanidinium chloride / S.K. Jha, S. Marqusee // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – Vol. 111. – № 13. – P. 4856-4861.
243. Newcomer, R.L. Mechanism of Protein Denaturation: Partial Unfolding of the P22 Coat Protein I-Domain by Urea Binding / R.L. Newcomer, L.C.R. Fraser, C.M. Teschke, A.T. Alexandrescu // *Biophysical Journal*. – 2015. – Vol. 109. – № 12. – P. 2666-2677.
244. Giugliarelli, A. Denaturation and Preservation of Globular Proteins: The Role of DMSO / A. Giugliarelli, M. Paolantoni, A. Morresi, P. Sassi // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2012. – Vol. 116. – № 45. – P. 13361-13367.

245. Bonincontro, A. Conformational changes of lysozyme in water-ethanol mixtures / A. Bonincontro, A. De Francesco, M. Matzeu, G. Onori, A. Santucci // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 1997. – Vol. 10. – № 2. – P. 105-111.
246. Matsuo, K. Secondary-structure analysis of alcohol-denatured proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy / K. Matsuo, Y. Sakurada, S. Tate, H. Namatame, M. Taniguchi, K. Gekko // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 80. – № 1. – P. 281-293.
247. Knubovets, T. Structure, thermostability, and conformational flexibility of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol / T. Knubovets, J.J. Osterhout, P.J. Connolly, A.M. Klibanov // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – Vol. 96. – № 4. – P. 1262-1267.
248. Poklar, N. Thermodynamic stability of ribonuclease A in alkylurea solutions and preferential solvation changes accompanying its thermal denaturation: A calorimetric and spectroscopic study / N. Poklar, N. Petrovčič, M. Oblak, G. Vesnaver // *Protein Science*. – 2008. – Vol. 8. – № 4. – P. 832-840.
249. Киркитадзе, М.Д. Частично свернутое состояние лизоцима с развитой вторичной структурой в водно-органической смеси : кандидат биологических наук / М.Д. Киркитадзе. – Пущино, 1998. – 103 с.
250. Nishii, I. Thermodynamic Stability of the Molten Globule States of Apomyoglobin / I. Nishii, M. Kataoka, Y. Goto // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – Vol. 250. – № 2. – P. 223-238.
251. Nakamura, S. Thermodynamic and Structural Properties of the Acid Molten Globule State of Horse Cytochrome *c* / S. Nakamura, Y. Seki, E. Katoh, S. Kidokoro // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50. – № 15. – P. 3116-3126.
252. Redfield, C. Structural characterization of a highly-ordered ‘molten globule’ at low pH / C. Redfield, R.A.G. Smith, C.M. Dobson // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 1994. – Vol. 1. – № 1. – P. 23-29.
253. Rabbani, G. Structural characteristics of thermostable immunogenic outer membrane protein from *Salmonella enterica* serovar Typhi / G. Rabbani, J. Kaur, E.

Ahmad, R.H. Khan, S.K. Jain // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 98. – № 6. – P. 2533-2543.

254. Rabbani, G. Impact of structural stability of cold adapted *Candida antarctica* lipase B (CaLB): in relation to pH, chemical and thermal denaturation / G. Rabbani, E. Ahmad, M.V. Khan, M.T. Ashraf, R. Bhat, R.H. Khan // *RSC Advances*. – 2015. – Vol. 5. – № 26. – P. 20115-20131.

255. Rabbani, G. pH-Dependent Conformational Transitions in Conalbumin (Ovotransferrin), a Metalloproteinase from Hen Egg White / G. Rabbani, E. Ahmad, N. Zaidi, R.H. Khan // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2011. – Vol. 61. – № 3. – P. 551-560.

256. Rabbani, G. pH-Induced Molten Globule State of *Rhizopus niveus* Lipase is More Resistant Against Thermal and Chemical Denaturation Than Its Native State / G. Rabbani, E. Ahmad, N. Zaidi, S. Fatima, R.H. Khan // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2012. – Vol. 62. – № 3. – P. 487-499.

257. Grinberg, V.Y. Ethanol-induced conformational transitions in holo- $\alpha$ -lactalbumin: Spectral and calorimetric studies / V.Y. Grinberg, N.V. Grinberg, T.V. Burova, M. Dalgalarrodo, T. Haertlé // *Biopolymers*. – 1998. – Vol. 46. – № 4. – P. 253-265.

258. Dolgikh, D.A.  $\alpha$ -lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? / D.A. Dolgikh, R.I. Gilmanishin, E.V. Brazhnikov, V.E. Bychkova, G.V. Semisotnov, S.Y. Venyaminov, O.B. Ptitsyn // *FEBS Letters*. – 1981. – Vol. 136. – № 2. – P. 311-315.

259. Segawa, S.-I. Characterization of the transition state of Lysozyme unfolding. I. Effect of protein-solvent interactions on the transition state / S.-I. Segawa, M. Sugihara // *Biopolymers*. – 2007. – Vol. 23. – № 11. – P. 2473-2488.

260. Luo, J.-J. Denaturation Behaviors of Two-State and Non-Two-State Proteins Examined by an Interruption–Incubation Protocol / J.-J. Luo, F.-G. Wu, J.-S. Yu, R. Wang, Z.-W. Yu // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2011. – Vol. 115. – № 28. – P. 8901-8909.

261. Ghosh, S. Structure and dynamics of lysozyme in DMSO–water binary mixture: fluorescence correlation spectroscopy / S. Ghosh, S. Chatteraj, R. Chowdhury, K. Bhattacharyya // *RSC Advances*. – 2014. – Vol. 4. – № 28. – P. 14378.

262. Privalov, G. Precise Scanning Calorimeter for Studying Thermal Properties of Biological Macromolecules in Dilute Solution / G. Privalov, V. Kavina, E. Freire, P.L. Privalov // *Analytical Biochemistry*. – 1995. – Vol. 232. – № 1. – P. 79-85.
263. Privalov, P.L. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study / P.L. Privalov, N.N. Khechinashvili // *Journal of Molecular Biology*. – 1974. – Vol. 86. – № 3. – P. 665-684.
264. Mazurenko, S. Exploration of Protein Unfolding by Modelling Calorimetry Data from Reheating / S. Mazurenko, A. Kunka, K. Beerens, C.M. Johnson, J. Damborsky, Z. Prokop // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 16321.
265. Kiefhaber, T. Kinetic traps in lysozyme folding. / T. Kiefhaber // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – Vol. 92. – № 20. – P. 9029-9033.
266. Muttathukattil, A.N. Role of Disulfide Bonds and Topological Frustration in the Kinetic Partitioning of Lysozyme Folding Pathways / A.N. Muttathukattil, P.C. Singh, G. Reddy // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2019. – Vol. 123. – № 15. – P. 3232-3241.
267. Guise, A.D. Initial protein concentration and residual denaturant concentration strongly affect the batch refolding of hen egg white lysozyme / A.D. Guise, J.B. Chaudhuri // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2001. – Vol. 6. – № 6. – P. 410-418.
268. Xing, L. Multistate Mechanism of Lysozyme Denaturation through Synchronous Analysis of Raman Spectra / L. Xing, K. Lin, X. Zhou, S. Liu, Y. Luo // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – Vol. 120. – № 41. – P. 10660-10667.
269. Mukhametzyanov, T.A. Fast scanning calorimetry of lysozyme unfolding at scanning rates from 5 K/min to 500,000 K/min / T.A. Mukhametzyanov, I.A. Sedov, B.N. Solomonov, C. Schick // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2018. – Vol. 1862. – № 9. – P. 2024-2030.
270. Splinter, R. Fast differential scanning calorimetry of liquid samples with chips / R. Splinter, A.W. van Herwaarden, I.A. van Wetten, A. Pfreundt, W.E. Svendsen // *Thermochimica Acta*. – 2015. – Vol. 603. – P. 162-171.

271. Arai, S. Reversibility and Hierarchy of Thermal Transition of Hen Egg-White Lysozyme Studied by Small-Angle X-Ray Scattering / S. Arai, M. Hirai // *Biophysical Journal*. – 1999. – Vol. 76. – № 4. – P. 2192-2197.
272. Meersman, F. Consistent Picture of the Reversible Thermal Unfolding of Hen Egg-White Lysozyme from Experiment and Molecular Dynamics / F. Meersman, C. Atilgan, A.J. Miles, R. Bader, W. Shang, A. Matagne, B.A. Wallace, M.H.J. Koch // *Biophysical Journal*. – 2010. – Vol. 99. – № 7. – P. 2255-2263.
273. Zhou, R. Massively parallel molecular dynamics simulations of lysozyme unfolding / R. Zhou, M. Eleftheriou, C.-C. Hon, R.S. Germain, A.K. Royyuru, B.J. Berne // *IBM Journal of Research and Development*. – 2008. – Vol. 52. – № 1.2. – P. 19-30.
274. Hua, L. Urea denaturation by stronger dispersion interactions with proteins than water implies a 2-stage unfolding / L. Hua, R. Zhou, D. Thirumalai, B.J. Berne // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – № 44. – P. 16928-16933.
275. Mark, A.E. Simulation of the thermal denaturation of hen egg white lysozyme: trapping the molten globule state / A.E. Mark, W.F. Van Gunsteren // *Biochemistry*. – 1992. – Vol. 31. – № 34. – P. 7745-7748.
276. Hünenberger, P.H. Computational approaches to study protein unfolding: Hen egg white lysozyme as a case study / P.H. Hünenberger, A.E. Mark, W.F. van Gunsteren // *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. – 1995. – Vol. 21. – № 3. – P. 196-213.
277. Kovrigin, E.L. Preferential Solvation Changes upon Lysozyme Heat Denaturation in Mixed Solvents / E.L. Kovrigin, S.A. Potekhin // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36. – № 30. – P. 9195-9199.