

**Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk**

ul. Niezapominajek 8
30-239 Kraków, Polska
(nazwa i dane adresowe podmiotu habilitującego,
wybranego do przeprowadzenia postępowania)

za pośrednictwem:
Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Georgi Gochev
(imię i nazwisko wnioskodawcy)

**Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk**
(miejsce pracy/jednostka naukowa)

Wniosek

z dnia **21.12.2021**

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie **nauk ścisłych i przyrodniczych** w dyscyplinie **nauki chemiczne**.

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Kompleksowy, teoretyczno-eksperymentalny opis wpływu warunków fizykochemicznych na stabilność pian stabilizowanych cząstkami białek

Wnoszę – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **jawnym**.

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Załączniki:

- Załącznik 1) Dane wnioskodawcy.
- Załącznik 2) Autoreferat.
- Załącznik 3) Wykaz osiągnięć naukowych.

Załącznik 4) Skany: dyplom doktorski, oryginał w języku bułgarskim oraz zalegalizowana kopia w języku angielskim.

Załącznik 5) Skany: Oświadczeń współautorów o ich wkładzie w publikacje.

Pliki H1–H9 to elektroniczne kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.



PODPIS ZAUFANY

GEORGI
GOCHEV

21.12.2021 17:29:01 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym



...
(podpis wnioskodawcy)

Autoreferat

Georgi G. Gochev

19 Grudzień 2021

Spis treści

Wykaz symboli i skrótów często używanych w Autoreferacie	2
1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2. Publikacje naukowe będące podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego	4
4.3. Cel naukowy, wyniki i dyskusja	5
4.3.1. Wprowadzenie	5
4.3.2. Motywacja i podejście badawcze	10
4.3.3. Metody i materiały	13
4.3.4. Wyniki i dyskusja	18
4.3.4.1. Elektrostatyka warstw adsorpcyjnych β -laktoglobuliny	19
4.3.4.2. Kinetyka, termodynamika i reologia dylatacyjna warstw adsorpcyjnych β -laktoglobuliny	21
4.3.4.3. Struktura warstw adsorpcyjnych β -laktoglobuliny	26
4.3.4.4. Cienkie filmy piankowe i pianki stabilizowane β -laktoglobuliną	29
4.3.5. Podsumowanie	34
5. Bibliografia	36
6. Krótki opis pozostałych osiągnięć naukowych	40

Wykaz symboli i skrótów często używanych w Autoreferacie

Symboli (w dowolnej kolejności)	Prosta definicja	Jednostki
Litery greckie		
Γ	pokrycie adsorpcyjne	mg/m ²
Π	ciśnienie powierzchniowe	$\Pi = \gamma_0 - \gamma$ mN/m
γ	napięcie powierzchniowe	mN/m
γ_0	napięcie powierzchniowe rozpuszczalnika (woda, elektrolit)	mN/m
ω	obszar powierzchni na molekułę	nm ² /molecule
θ	ułamkowe pokrycie powierzchni	$\theta = \omega\Gamma$
Π	ciśnienie rozdzielające	–
Π_{el}	elektrostatyczne ciśnienie rozdzielające	Pa
Π_{vw}	dyspersyjne ciśnienie rozdzielające van der Waalsa	Pa
Π_{st}	steryczne ciśnienie rozdzielające	Pa
Π_{cr}	krytyczne ciśnienie rozdzielające pęknięcia TLF	Pa
κ^{-1}	długość Debye'a	Pa
ϕ	kąt fazowy	nm
ρ	gęstość długości rozpraszania neutronów	Å ⁻²
Litery łacińskie		
A	obszar powierzchniowy	mm ² ...
A_0	stały obszar powierzchniowy	
E	zespolony moduł lepkości dylatacji powierzchni	$E = -d\Pi/d\ln A$ mN/m
E'	liczba rzeczywista modułu E (elastyczność dylatacyjna)	$E' = E \cos \phi$ mN/m
E''	jednostką urojona modułu E	$E'' = E \sin \phi$ mN/m
E_0	elastyczność limitująca Gibbsa	$E_0 = d\Pi/d\ln \Gamma$ mN/m
L	Odległość	mm, cm, m
P_c	ciśnienie kapilarne	Pa
U_L	prędkość lokalna wznoszącego się pęcherzyka	cm/s
I	siła jonowa	mM
T	temperatura	K
$ Z $	ładunek elektryczny netto białka	e
c	stężenie białka w roztworze	nM, μ M
c_{BF}	krytyczne stężenie białka stabilnego czarnego filmu	nM, μ M
c_{buff}	stężenie elektrolitu buforowego	mM
t	Czas	s, min, h
d	grubość warstwy międzyfazowej	nm
h	grubość filmu	nm
h_w	„ekwiwalentna” grubość filmu	nm
h_{NBF}	grubość czarnego filmu Newtona	$h_{NBF} \approx h_w$ nm
n	współczynnik załamania światła	–
n_{NBF}	współczynnik załamania światła czarnego filmu Newtona	–
f	częstotliwość oscylacji obszaru powierzchni	Hz
g	amplituda oscylacji obszaru powierzchni	$g = \Delta A/A_0$ (x 100) %
Skróty (w dowolnej kolejności)		
BLG	β -lactoglobulina (pI $\approx$ 5.1)	
BSA	albumina surowicy bydłowej (pI $\approx$ 5.2)	
W/A	woda/powietrze (z angielskiego <i>water/air</i>)	
TLF	cieńki film ciekły (z angielskiego <i>thin liquid film</i>)	
CTF	cieńki film zwyczajny (z angielskiego <i>common thin film</i>)	
CBF	cieńki film czarny (z angielskiego <i>common black film</i>)	
NBF	film czarny Newtona (z angielskiego <i>Newton black film</i>)	
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek	
SFG	spektroskopia generowania sumarycznych częstotliwości wibracyjnych	
NR	reflektometria neutronowa	
DAL	dynamiczna warstwa adsorpcyjna	

1. Imię i nazwisko

Georgi Gochev

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe (dziedzina naukowa, instytucja przyznająca, miejsce, kraj, „tytuł pracy”, promotor)

- Stopień naukowy doktora nauk chemicznych, PhD (chemia fizyczna, Instytut Chemii Fizycznej – Bułgarska Akademia Nauk, Sofia, Bułgaria, “*Thin emulsion films from aqueous solutions of polymeric surfactants*”, Prof. Dotchi Exerowa, członek Bułgarskiej Akademii Nauk)
- Dyplom magistra chemii, MSc (chemia, Wydział Chemii Uniwersytetu Sofijskiego „St. Kliment Ohridski”, Sofia, Bułgaria, “*Surface tension of aqueous solutions of pharmaceutical substances based on pulmonary surfactant*”, Prof. Christian Vassilieff oraz Prof. Zdravko Lalchev)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- od 12.2019: adiunkt, Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN, Kraków, Polska.
- od 01.2011: adiunkt, Instytut Chemii Fizycznej – Bułgarska Akademia Nauk, Sofia, Bułgaria; zakład [Powierzchni i Koloidów](#)
- 09.2017 – 1.2019: III staż podoktorski (umowa, projekt: Structure-Property Relations in Aqueous Foam and Their Control on a Molecular Level, [ERC-638278](#)), [grupa](#) Prof. B. Braunschweig, WWU Münster, Münster, Niemcy
- 05.2017 – 07.2017: gościnny staż badawczy, Instytut Koloidów i Powierzchni Międzyfazowych im. Maxa Plancka (Zakład Biomateriałów), Poczdam, Niemcy
- 04.2015 – 03.2017: II staż podoktorski (umowa, projekt: The Physics of Non-Specific Interactions between Biomembranes, [DFG-256222543](#)), [grupa](#) Dr. E. Schneck, Instytut Koloidów i Powierzchni Międzyfazowych im. Maxa Plancka (Zakład Biomateriałów), Poczdam, Niemcy
- 10.2014 – 12.2014: badacz (stypendium), Instytut Koloidów i Powierzchni Międzyfazowych im. Maxa Plancka (Zakład Biomateriałów), Poczdam, Niemcy
- 08.2011 – 07.2014: I staż podoktorski (umowa, projekt tandemowy: Influence of proteins on the formation and stability of foams, [DFG-199448917](#), w klastrze: Protein foams in food production, [DFG/AiF-Cluster 5](#)), [grupa](#) dr hab. R. Miller, Instytut Koloidów i Powierzchni Międzyfazowych im. Maxa Plancka (Zakład Powierzchni), Poczdam, Niemcy
- Nov.2010 – Jul.2011: badacz (stypendium), Instytut Koloidów i Powierzchni Międzyfazowych im. Maxa Plancka (Zakład Biomateriałów), Poczdam, Niemcy
- Jul.2007 – Oct.2010: badacz (umowa), Instytut Chemii Fizycznej – Bułgarska Akademia Nauk, Sofia, Bułgaria; zakład Powierzchni i Koloidy
- Jan.2004 – Jun.2007: doktorant (stypendium), Instytut Chemii Fizycznej – Bułgarska Akademia Nauk, Sofia, Bułgaria; zakład Powierzchni i Koloidy

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Kompleksowy, teoretyczno-eksperymentalny opis wpływu warunków fizykochemicznych na stabilność pian stabilizowanych cząstkami białek

4.2. Publikacje naukowe będące podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego: *

- H1** Gochev G.,✉ Retzlaff I., Aksenenko E.V., Fainerman V.B., Miller, R. Adsorption isotherm and equation of state for β -Lactoglobulin layers at the air/water surface. *Colloids Surfaces A* **2013**, 422, 33-38.
Konceptualizacja: Gochev i Miller; badanie: Retzlaff i Gochev; analiza danych: Gochev, Aksenenko i Fainerman; oryginalny manuskrypt: Gochev; historia publikacji: drobna korekta przez Gochev. Mój wkład oceniam na 70%.
- H2** Engelhardt K., Lexis M., Gochev G., Konnerth C., Miller, R., Willenbacher N., Peukert W., Braunschweig B.✉ pH effects on the molecular structure of β -lactoglobulin modified air-water interfaces and its impact on foam rheology. *Langmuir* **2013**, 29, 11646-11655.
Konceptualizacja: Braunschweig; badanie: Engelhardt, Lexis, Gochev, Konnerth; analiza danych: Engelhardt, Lexis i Gochev; oryginalny manuskrypt: Engelhardt, Lexis i Braunschweig. historia publikacji: drobna korekta przez Braunschweig. Mój wkład oceniam na 10%.
- H3** Gochev G.,✉ Retzlaff I., Exerowa D., Miller R. Electrostatic stabilization of foam films from β -lactoglobulin solutions. *Colloids Surfaces A* **2014**, 460, 272-279.
Konceptualizacja: Gochev; badanie: Gochev i Retzlaff; analiza danych: Gochev; oryginalny manuskrypt: Gochev; historia publikacji: drobna korekta przez Gochev. Mój wkład oceniam na 80%.
- H4** Ulaganathan, V.,✉ Gochev, G., Gehin-Delval, C., Leser, M.E., Gunes, D.Z., Miller, R. Effect of pH and electrolyte concentration on rising air bubbles in β -lactoglobulin solutions. *Colloids Surfaces A* **2016**, 505, 165–170.
Konceptualizacja: Ulaganathan i Gochev; badanie: Ulaganathan; analiza danych: Ulaganathan i Gochev; oryginalny manuskrypt: Ulaganathan i Gochev; historia publikacji: drobna korekta przez Ulaganathan i Gochev. Mój wkład oceniam na 25%.
- H5** Ulaganathan V., Retzlaff I., Won J.Y., Gochev G.,✉ Gehin-Delval C., Leser M., Noskov B.A., Miller R. β -Lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface: 1. Adsorption kinetics and surface pressure isotherm: Effect of pH and ionic strength. *Colloids Surfaces A* **2017**, 519, 153-156.
Konceptualizacja: Gochev; badanie: Ulaganathan, Retzlaff i Won; analiza danych: Ulaganathan, Gochev i Noskov; oryginalny manuskrypt: Ulaganathan i Gochev; historia publikacji: drobna korekta przez Gochev. Mój wkład oceniam na 60%.

* W kolejności od daty publikacji; ✉: autor korespondencyjny; wyjaśnienie mojego wkładu merytorycznego do każdego artykułu znajduje się w dziale I w Załączniku 3. Pełne teksty są zebrane w Załączniku 4 jako kopie skanów oryginalnych artykułów.

- H6** Ulaganathan V., Retzlaff I., Won J.Y., **Gochev G.**, Gunes D.Z., Gehin-Delval C., Leser M., Noskov B.A., Miller R. β -Lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface: 2. Dilational rheology: Effect of pH and ionic strength. *Colloids Surfaces A* **2017**, 521, 167-176.
Konceptualizacja: **Gochev**; badanie: Ulaganathan, Retzlaff i Won; analiza danych: Ulaganathan, **Gochev** i Noskov; oryginalny manuskrypt: Ulaganathan i **Gochev**; historia publikacji: drobna korekta przez **Gochev**. Mój wkład oceniam na 60%.
- H7** **Gochev G.**, Scoppola E., Campbell R.A., Noskov B.A., Miller R., Schneck E. β -lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface: 3. Neutron Reflectivity Study on the Effect of pH. *J. Phys. Chem. B* **2019**, 123, 10877-10889.
Konceptualizacja: **Gochev**, Campbell i Schneck; badanie: **Gochev** i Campbell; analiza danych: **Gochev**, Scoppola, Campbell i Schneck; oryginalny manuskrypt: **Gochev**; historia publikacji: poważna korekta przez wszystkich współautorów. Mój wkład oceniam na 50%.
- H8** **Gochev G.**, Ulaganathan V., Retzlaff I., Gehin-Delval C., Gunes D.Z., Leser M., Kulozik U., Miller R., Braunschweig B. β -lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface: 4. Impact on the Stability of Foam Films and Foams. *Minerals* **2020**, 10, 636.
Konceptualizacja: **Gochev**, Ulaganathan i Miller; badanie: **Gochev**, Ulaganathan i Retzlaff; analiza danych: **Gochev** i Ulaganathan; oryginalny manuskrypt: **Gochev** i Ulaganathan; historia publikacji: drobna korekta przez **Gochev**. Mój wkład oceniam na 65%.
- H9** **Gochev G.**, Kovalchuk V.I., Aksenenko E.V., Fainerman V.B., Miller, R. β -Lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface: 5. Adsorption isotherm and equation of state revisited, impact of pH. *Colloids Interfaces* **2021**, 5, 14.
Konceptualizacja: **Gochev** i Miller; badanie: **Gochev**; analiza danych: **Gochev**, Kovalchuk, Aksenenko i Fainerman; oryginalny manuskrypt: **Gochev**; historia publikacji: drobna korekta przez **Gochev**. Mój wkład oceniam na 80%.

4.3. Cel naukowy, wyniki i dyskusja *

4.3.1. Wprowadzenie

Przez ponad sto lat podejmowano wysiłki naukowe, mające na celu zrozumienie roli substancji powierzchniowo czynnych (potocznie zwanych „surfaktantami”) w utrzymaniu stabilności ciekłych układów zdyspergowanych, *tzn.* Koloidów. Główną cechą identyfikacyjną koloidów jest ich duża powierzchnia międzyfazowa, w związku z tym kluczową rolę w zachowaniu i właściwościach koloidów odgrywają zjawiska międzyfazowe.^{1,2}

Pianki,^{3,4,A5} jako miękkie koloidy zawierające granice faz ciecz/gaz – dalej w tekście nazywane powierzchniami W/A (woda/powietrze, z angielskiego *water/air*) – są materiałami makroskopowymi o hierarchicznej strukturze, a ich ogólne właściwości i stabilność są determinowane przez zjawiska i procesy zachodzące w różnych skalach długości. Pianki są wykorzystywane w wielu procesach i produktach

* Odniesienia w rozdziałach 4.3 oraz 6 obejmują przede wszystkim publikacje z wykazu referencyjnych w rozdział 5 (ułożone w kolejności pojawiania się w tekście); zauważ, że niektóre z tych odniesień mogą zawierać kilka publikacji oznaczonych małymi literami (^{a,b,...}). Jednak niektóre odniesienia, użyte tylko raz, ze względu na dokładność, są umieszczane w przypisach (^{i,ii,...}) na każdej stronie. Publikacje z wykazów w sekcjach I.2 i II.4 w Załączniku 3 są również uwzględnione jako odnośniki (opatrzone odpowiednimi przedrostkami A lub B) i mogą pojawiać się w tekście losowo.

przemysłowych (np. flotacja, żywność, produkty higieny osobistej, itp.) a także w zastosowaniach biotechnologicznych, farmaceutycznych i medycznych.^{4,5,i,ii} Właściwości i stabilność pianek są w dużej mierze zdeterminowane przez właściwości i stabilność cienkich filmów ciekłych (z angielskiego *thin liquid film*, TLF), które tworzą się pomiędzy pęcherzykami pianki.^{3,B20,iii} Pęknięcie TLF powoduje proces koalescencji pęcherzyków, który jest jednym z głównych mechanizmów destabilizacji w piankach.^{3,A5,iv} Ważnym parametrem będącym miarą stabilności TLF jest krytyczne ciśnienie rozdzielające (Π_{cr}) pęknięcia filmu. Wielkość tę można z powodzeniem wykorzystać do przewidywania stabilności pianek.^{3,4,B20}

Niewątpliwie białka mają ogromne znaczenie w różnych procesach biologicznych i technologicznych, dlatego są przedmiotem intensywnych badań prowadzonych w ramach wielu dyscyplin naukowych. Białka są doskonałymi biokompatybilnymi stabilizatorami pianek i emulsji.^{3,4,6-8} Zdolność białek do akumulacji (adsorpcji) na każdym rodzaju powierzchni roztworów wodnych cieszy się dużym zainteresowaniem przyrodników, chemików, fizyków, biologów i innych naukowców od ponad wieku. Pomimo tego faktu badania tego zjawiska są nadal aktualne.^{1,9-12,v}

Oczywistym jest, że pianki białkowe – będące złożonymi biokompatybilnymi materiałami o wyjątkowych właściwościach – są ważne dla ludzkości i stanowią obiekt intensywnych badań naukowych. Jednak wciąż istnieją otwarte pytania dotyczące tego, jaki jest dokładny mechanizm stabilizacji pianek przez białka i jak można go kontrolować, aby zaprojektować pianki białkowe o regulowanych właściwościach i stabilności. Odpowiedź na te pytania była celem moich badań przedstawionych w niniejszej rozprawie habilitacyjnej. Poniżej przedstawiam krótki przegląd tego problemu naukowego (stan faktyczny w 2011 roku).

Adsorpcja białek na powierzchni międzyfazowej W/A

W XIX wieku kilku naukowców zauważyło, że białka mogą koagulować na granicy faz.^v Plateau (1873)^{1,B21} jest prawdopodobnie pierwszym naukowcem, który zbadał niektóre aspekty zachowanie białek na granicy faz. Przedmiotem jego badań była powierzchnia roztworów albuminy oraz właściwości TLF utworzonych z tych roztworów. W swojej pracy Plateau powiązał stabilność TLF ze zdolnością albuminy do zmniejszania napięcia powierzchniowego roztworu oraz wytwarzania „osobliwej lepkości powierzchniowej”. Na samym początku XX wieku Devaux (1903/1904) oraz Metcalf (1905) po raz pierwszy zbadali pewne właściwości fizyczne warstw białek rozłożonych w pobliżu warstwy przypowierzchniowej (z angielskiego *subphase*) fazy wodnej.^{vi} Powiązane badania w latach 20. i 30. XX wieku,⁹⁻¹¹ w tym prace Langmuira,^{10b} podsumowano na przykład w obszernym artykule przeglądowym autorstwa Neuratha i Bulla (1938).¹¹ Najważniejsze wnioski, jakie wypłynęły z tych wczesnych badań to:

- o Białka zachowują się na miękkich powierzchniach w zupełnie inny sposób niż „proste” surfaktanty;

ⁱ Vignes-Adler M. Historical Perspectives of Foams. In: *lok. cyt.* [4], chapter 8.

ⁱⁱ <https://foodcrumbles.com/science-of-foams-in-food/>

ⁱⁱⁱ Khristov Khr. Role of Foam Films in Foam Stability. In: *lok. cyt.* [4], chapter 12.

^{iv} Langevin D. Foam Stabilization Mechanisms. In: *lok. cyt.* [4], chapter 11.

^v Ascherson FM. *Arch Anat Physiol* **1840**; pp. 44. * Melsens LHF. *Compt Rend* **1851**,33,247; *Ann Chim Phys* **1851**,[3]33,170. * Smee AH. In: *Proc Royal Soc (London)* A **1863**,12,399; **1864**,13,350. * Ramsden W. *Arch Anat Physiol* **1894**, pp. 1517; *Proc Royal Soc (London)* A **1903**,72,156; *Z Physik Chem* **1904**,47,336.

^{vi} Devaux, H. *Proc. Verb SOC des Sci Phys et Nat Bordeaux* **1903**, November; *J Phys Theor Appl* **1904**,3,450. * Metcalf WV. *Z physik Chem* **1905**,61,1.

- o Warstwy powierzchniowe białka, otrzymane przez rozprowadzanie lub przez spontaniczną adsorpcję z roztworu, mogą wykazywać wyraźną lepkość powierzchniową, jak również pewną elastyczność powierzchniową;
- o Wydaje się bardzo prawdopodobne, że białka globularne przyjmują konformacje molekularne na granicach faz, które różnią się od konformacji natywnej w objętości roztworu, co jest spowodowane nieodwracalną denaturacją (rozfałdowaniem) globulek białkowych wywołaną przez interakcję z granicą faz.

Zbadanie dynamiki procesu spontanicznej adsorpcji białek z objętości fazy wodnej na granicy faz oraz właściwości reologicznych i struktury utworzonej warstwy adsorpcyjnej pozostaje w ścisłym związku z mechanizmami powstawania i stabilnością piany. Główne odkrycia dokonane w na przestrzeni lat pięćdziesiątych, sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX wieku podsumować można następująco:¹³⁻²¹

- o Proces adsorpcji białka może przebiegać w trzech głównych etapach: dyfuzja w kierunku powierzchni międzyfazowej, indukowane przez interfejs rozwijanie i rozprzestrzenianie się molekuly (białka kuliste) oraz koagulacja powierzchniowa przy dużym pokryciu powierzchni;^{13-15,19a}
- o Po dyfuzji w kierunku powierzchni międzyfazowej, białka mogą doświadczać bariery energetycznej dla adsorpcji ze względu na ciśnienie powierzchniowe i/lub oddziaływania elektrostatyczne;¹⁵
- o Adsorpcja i właściwości reologiczne powierzchni (elastyczność i lepkość) są maksymalne w obszarze pH wokół pI białka;^{13,14}
- o Stopień indukowanej powierzchniowo denaturacji kuleczek białkowych maleje wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego Π warstwy adsorpcyjnej;¹⁷
- o Monowarstwa białka utworzona w trakcie adsorpcji dominuje nad izotermą $\Pi(c)$ niemniej jednak adsorpcja białka może być kontynuowana poprzez wielowarstwowe tworzenie cząsteczek odwracalnie zaadsorbowanych, co wykrywa się, wyznaczając izotermy pokrycia adsorpcyjnego $\Gamma(c)$;^{18,19b}
- o Klasyczne równania adsorpcji słabo pasują do eksperymentalnych izoterm;^{17-19b}
- o Dodatkowe metody, takie jak technika powierzchniowych radioznacznikówⁱ i elipsometria,ⁱⁱ oraz powierzchniowa reometria dylatacyjnaⁱⁱⁱ pozwoliły na uzyskanie danych eksperymentalnych dla Γ i powierzchniowego modułu dylatacyjnego E , co w połączeniu z danymi tensjometrycznymi umożliwia pomiar równania stanu powierzchni w postaci $\Pi(\Gamma)$ i/lub $E(\Pi)$.^{16b,18,19b}
- o Właściwości elektryczne białkowych warstw międzyfazowych monitorowano poprzez pomiary potencjału powierzchniowego ΔV .^{9a,11,19b,20,21,iv}

Chociaż dostępne wyniki eksperymentalne i teoretyczne pozwoliły postawić hipotezę dotyczącą struktury molekularnej warstw międzyfazowych białek,^{9a,11,13,18,19c} jednoznacznych informacji w tym zakresie pod koniec XX wieku wciąż brakowało.

W ostatnich dziesięcioleciach stale pojawiają się badania nad adsorpcją białek na miękkich powierzchniach międzyfazowych, przyczyniając się do pogłębiania wiedzy na ten temat.²²⁻³⁵ Badanie nowych aspektów adsorpcji białek wiązało się z zastosowaniem nowych metod eksperymentalnych i teoretycznych w celu uzyskania różnych rodzajów informacji uzupełniających.

ⁱ Dixon JK i in. *Nature* **1949**,163,845.

ⁱⁱ de Feijter JA i in. *Biopolym* **1978**,17,1759.

ⁱⁱⁱ Lucassen J, van den Tempel M. *Chem Eng Sci* **1972**,27,1283; *J Colloid Interface Sci* **1972**,41,491.

^{iv} Dogan MZ, Glazer J. *Nature* **1952**,170,417. * Glazer J, Dogan MZ. *Trans Faraday Soc* **1953**,49,448.

Elipsometrię wykorzystano do pomiarów *in situ* grubości d warstw międzyfazowych, co jednak nie pozwoliło na uzyskanie jednoznacznego wyniku ze względu na niepewność co do dokładnego współczynnika załamania światła warstwy międzyfazowej, niezbędnego do obliczenia d .^{22,23} Z tego względu, do eksperymentów *in situ* na powierzchniach W/A przystosowana została reflektometria neutronowa (NR), którą wykorzystano do precyzyjnych pomiarów grubości warstw białkowych.²⁴⁻²⁶ Niektóre metody spektroskopowe, na przykład spektroskopia odbiciowo-absorpcyjna w podczerwieni, zostały również przystosowane do sondowania *in situ* powierzchni międzyfazowej W/A.²⁷ Spektroskopia generowania sumarycznych częstotliwości wibracyjnych (SFG) okazała się bardzo przydatną techniką rozwiązywania szczegółów strukturalnych i orientacji zaadsorbowanych cząsteczek, jak również ogólnego stanu naładowania powierzchni.²⁸

Eksperymentalne techniki reometrii powierzchniowej (ścianania i dylatacji) zostały dobrze przysposobione do sondowania powierzchni międzyfazowej W/A.^{17-19de,22,23,29-33} Zasadniczo, białka globularne silnie adsorbują się na miękkich powierzchniach międzyfazowych i przy dużym pokryciu powierzchni tworzą dwuwymiarową lepkosprężystą sieć żelową, która w większości przypadków jest raczej bardziej elastyczna niż lepka. Zależności kinetyczne modułu lepkosprężystości powierzchni (moduł dylatacyjny $E(t)$ i moduł ścianania $G(t)$) pozwoliły uzyskać wiele pouczających informacji na temat głównych etapów tworzenia warstwy adsorpcyjnej białka i powiązanych cech mechanicznych i strukturalnych warstw.^{32,33}

Dane eksperymentalne dotyczące podstawowych parametrów powierzchni Π oraz Γ umożliwiają termodynamiczną analizę zjawiska adsorpcji białek. Jak zauważono powyżej, klasyczne formalizmy – takie jak teorie Gibbsa i Langmuira – wydają się nie mieć zastosowania do warstw międzyfazowych białek, głównie ze względu na nieodwracalność procesu adsorpcji białek i złożoność wynikającą z ich konformacji molekularnych, reorientacji i agregacji na miękkich powierzchniach międzyfazowych.^{17-19b,22} Najważniejszym postępowaniem w tym kierunku było postawienie hipotezy, że zaadsorbowane cząsteczki białka mogą istnieć w różnych stanach konformacyjnych na powierzchniach międzyfazowych (nieidealność entropii).ⁱ Z drugiej strony należy również wziąć pod uwagę ciepło mieszania białka i wody na powierzchniach międzyfazowych oraz oddziaływania międzycząsteczkowe, *tzn.* nieidealność entalpii. Odpowiednie podejścia, które można wykorzystać do opisu adsorpcji białek, zaproponowali Frumkin (1925)ⁱⁱ oraz Singer (1948).ⁱⁱⁱ Posłużyły one następnie jako podstawa do rozwoju nowoczesnych teorii (krótki przegląd znajduje się we wstępie do artykułu [H9]), które uwzględniają nieidealność entropii i entalpii.^{32,34,xiii}

Wszystkie powyższe rozważania dotyczą osiągnięć eksperymentalnych i teoretycznych dotyczących powierzchni stacjonarnych (albo powierzchni płaskiej, albo powierzchni unieruchomionej kropli/pęcherzyka). Adsorpcję białka można również monitorować na niestacjonarnej powierzchni, takiej jak *np.* powierzchnia pęcherzyka wznoszącego się w roztworze.³⁵ Badania takie mogą być bezpośrednio powiązane z dynamiką tworzenia się piany.^{iv}

Przez wiele lat badano międzyfazowe zachowanie wielu białek, w tym białek nieuporządkowanych i różnych białek kulistych pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego, oraz enzymów proteolitycznych).^{7-12,13,14-35} W 2011

ⁱ Joos P, Serrien G. *J Colloid Interface Sci* **1991**,145,291. * Lucassen-Reynders EH. *Colloids Surfaces A* **1994**,91,79.

ⁱⁱ Frumkin A. *Z Physik Chem (Leipzig)* **1925**,116,466.

ⁱⁱⁱ Singer SJ. *J Chem Phys* **1948**,16,872.

^{iv} Małysa K, Lunkenheimer K. *Curr Opin Colloids Interface Sci* **2008**,13,150.

roku z literatury naukowej wynikało, że efekty wywołane ładunkiem wydają się być głównymi czynnikami determinującymi aktywność międzyfazową białek i właściwości powstałych warstw adsorpcyjnych.

Białka w cienkich filmach ciekłych

Zjawisko powstawania „cienkiego filmu ciekłego” było intensywnie badane od czasu, gdy przyciągnęło uwagę naukowców w XVII wieku.^{1,B21} Teoretyczny opis stabilności TLF został znacznie rozwinięty dzięki pracom Gibbsa na temat elastyczności TLF, a badania te nabrały rozpędu wraz z definicją ciśnienia rozdzielającego Π , zdefiniowanego przez Derjaguinaⁱ w latach 30. XX wieku, co zaowocowało powstaniem słynnej teorii DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) w latach 40. XX wieku.^{ii,iii}

Najpopularniejszymi metodami tworzenia i badania tradycyjnie znanych „filmów mydlanych” były proste układy, takie jak wolna bańka mydlana lub film mydlany w ramce.^{1,B21,iv} Różne metody badania TLF były opracowywane od drugiej połowy XX wieku do chwili obecnej (więcej informacji można znaleźć w niedawno opublikowanym artykule przeglądowym autorstwa Chatzigiannakis i in.^v).^{3,4} Jednak najbardziej popularną i stanowiącą potężne narzędzie naukowe jest tak zwana technika „mikrointerferometryczna” wprowadzona przez Scheludko (1957).^{3b,4,36a,37ab}

Poniżej podaję krótki przegląd (na podstawie mojego artykułu z 2014 roku [H3] dotyczącego filmów piankowych BLG) na temat cienkich filmów piankowych otrzymywanych z roztworów białek, z naciskiem na najciekawszy przypadek najcieńszych filmów, zwanych „czarnymi” (ponieważ odbijają bardzo mało światła i wyglądają jak czarny obszar pod mikroskopem).^{31,35,41-50}

Musselwhite i Kitchener (1967)⁴¹ stwierdzili, że graniczna grubość czarnego filmu przed pęknięciem, który utworzony został w roztworze albuminy surowicy bydlęcej (BSA) wynosi około 3–4 nm. Autorzy otworzyli pytanie o związek między graniczną grubością filmu a wymiarami geometrycznymi cząsteczek białka w objętości roztworu i na powierzchni filmu. Stabilne czarne filmy białkowe zostały po raz pierwszy uzyskane przez Yampolskaya i in. (1977).⁴² Później szczegółowo zbadano cienkie filmy piankowe z roztworów białek.^{31,35,43-49}

Badania ciekłych filmów piankowych w celce „Scheludko”^{3b,4,36a,37ab} wykazały, że głównymi czynnikami determinującymi powstawanie i stabilność czarnych filmów są pH, siła jonowa I oraz stężenie białka c w roztworze, z którego powstaje film. Warunki konieczne do powstania czarnego filmu to: I) $\text{pH} \rightarrow \text{pI}$;^{31,35,42,43a,44,45} lub II) dostatecznie wysokie I gdy $\text{pH} \neq \text{pI}$;^{43a-c,45} oraz III) stężenie białka powinno być odpowiednio wysokie, ale uwaga – niezbyt wysokie.³¹

Powyższe rozważania dotyczą obserwacji wizualnych TLF oraz pomiarów grubości filmu h pod stałym ciśnieniem, które jest stosunkowo niskie (rzędu 100 Pa). W stosowanych piankach ciśnienie kapilarne między pęcherzykami może być o kilka rzędów wielkości wyższe, głównie w zależności od wielkości pęcherzyków. Badania TLF przy różnych ciśnieniach są możliwe dzięki tak zwanej technice „Thin-Film-Pressure-Balance”, w której wykorzystuje się celkę z porowatą płytką, i która pozwala zmierzyć izotermę ciśnień rozdzielających $\Pi(h)$.^{3b,4,37cd}

ⁱ Derjaguin BV. *Trans Faraday Soc* **1940**,35,203.

ⁱⁱ Derjaguin BV, Landau LD. *Acta Physicochim URSS* **1941**,14,633.

ⁱⁱⁱ Verwey EJW, Overbeek JThG. *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Elsevier, **1948**.

^{iv} Mysels KJ, Shinoda C, Frankel S. *Soap films: studies on their thinning*. Pergamon, **1959**.

^v Chatzigiannakis E i in. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2021**,53,101441.

Eksperymentalna izoterma ciśnienia rozdzielającego $\Pi(h)$ pozwala zinterpretować: 1) stabilność filmu pod względem krytycznego ciśnienia rozłączającego Π_{cr} oraz odpowiedniej grubości, przy której film pęka; a także 2) uzyskać bezpośrednie informacje o oddziaływaniach powierzchniowych działających w filmie. Dalsza analiza danych eksperymentalnych $\Pi(h)$ jest możliwa poprzez porównanie wyników z odpowiednimi teoriami. Wraz z obszernymi badaniami $\Pi(h)$ dla roztworów surfaktantów i polimerów, przeprowadzono kilka badań także z białkami.^{44-46,47b,48,49b}

Porównanie danych eksperymentalnych $\Pi(h)$ z teorią DLVO wykazało słuszność teorii dla filmów białkowych o silnym Π_{el} obecnym w układzie.⁴⁶ Jednakże, gdy film był cieńszy niż 25 nm zaobserwowano wyraźne odchylenia od przewidywań teoretycznych, co sugerowało istnienie w filmach oddziaływań powierzchniowych o stosunkowo dalekim zasięgu (nie przewidywalnych na podstawie teorii DLVO). Szczegóły dotyczące takich specyficznych oddziaływań nie są w pełni wyjaśnione, ale uważa się, że pochodzą one z oddziaływań sterycznych i powstają w wyniku istnienia agregatów białkowych znajdujących się na dwóch przeciwległych powierzchniach filmu.⁴⁶

Izotermy $\Pi(h)$ dla czarnych filmów białkowych ujawniły, że h maleje wraz ze wzrostem Π i przy pewnej wartości granicznej staje się praktycznie niezależne od Π .^{44,45,49} Takie zachowanie sugeruje tworzenie się czarnego filmu Newtona (NBF) z białka, analogicznie do typowego NBF z surfaktantów, który jest dwuwarstwą surfaktantów ($h < 6$ nm).^{3b,4,37b,38-40} Tworzenie białkowych NBF nawet przy niskim Π , jak w celce „Scheludko”, zostało stwierdzone w kilku badaniach nad filmami piankowymi i emulsyjnymi wykonanymi przy $pH \rightarrow pI$.^{46b,49,50} Niezależnie od warunków ciśnieniowych wymaganych do ustalenia takiego stanu doniesiono, że graniczna grubość czarnych filmów z białek oscyluje w zakresie 5–11 nm. Grubości te w porównaniu z wymiarami poszczególnych kuleczek białkowych sugerują osobliwości w budowie najcieńszych czarnych filmów białkowych – przypadek czarnych filmów BLG zostanie szczegółowo omówiony w rozdziale 4.3.4.4.

Podsumowując, można stwierdzić, że zrozumienie mechanizmów stabilizacji TLF przez białka i, co ważne, zmiany struktury molekularnej w czarnych filmach białkowych pod wpływem pH , było w 2014 roku niepełne, głównie ze względu na ograniczone informacje na temat szczegółowej struktury warstw białkowych oraz jej wpływ na wartość ciśnienia rozłączającego i strukturę TLF.

4.3.2. Motywacja i podejście badawcze

Badania nad zachowaniem białek na powierzchniach międzyfazowych, o których wspomniano we wstępie, są jedynie przykładami z wielu badań dostępnych w literaturze. Niemniej jednak zdobyta wiedza do lat 2011–2014 wydawała się wciąż niewystarczająca do pełnego opisu fizykochemicznego (na poziomie molekularnym) mechanizmów stabilizacji pianek białkowych na podstawie charakterystyki elementów budulcowych pianki – warstw adsorpcyjnych oraz TLF. Sytuacja ta wydawała się być spowodowana tym, że wiele badań dotyczyło, choć zwykle szczegółowo, fragmentarycznych problemów, które można było rozwiązać przy pomocy ograniczonej liczby narzędzi eksperymentalnych i teoretycznych. W swoim obszernym artykule przeglądowym na temat reologii powierzchni roztworów białkowych, Bos i van Vliet (2001)³⁰ podkreślili:

“However, in most studies dealing with proteins and surfactants at fluid-fluid interfaces, one technique is used and the data are compared with those obtained by other authors using the same technique. There is a lack of studies in which several techniques are combined to give information on a well-defined system... Besides the great need for studies in which several techniques are combined, there is an at least equal need for sound

physical models describing the various processes of importance. Real progress will only be possible if both are combined in an innovative way.”

Co więcej, w tamtym czasie (2014) dostępnych było tylko kilka badań dotyczących stabilności TLF w roztworach białek, które co prawda dostarczały cennych informacji, ale pozostawiały jednocześnie kilka ważnych otwartych pytań: na przykład, w jaki sposób ładunek elektryczny netto białka oraz heterogeniczna (wielowarstwowa) struktura międzyfazowa wpływa na stabilność TLF.

Moim zdaniem, w obecnym stanie wiedzy na temat pianek białkowych wciąż brakowało wyraźnych powiązań – z jednej strony między właściwościami białkowych warstw międzyfazowych a stabilnością odpowiedniej TLF; a z drugiej strony między stabilnością TLF a odpowiednimi piankami; *tzn. poprzez hierarchiczny łańcuch skali długości: **powierzchnia–TLF–pianka makroskopowa***.

W 2011 roku, kiedy rozpoczynałem pracę naukową z białkami, brałem udział w projekcie tandemowym „Pianki Białkowe” współprowadzonym przez dr hab. R. Miller w Instytucie Koloidów i Powierzchni Międzyfazowych im. Maxa Plancka (MPICI) w Poczdamie, w Niemczech oraz prof. W. Peukert i dr (obecnie prof.) B. Braunschweig w FAU Erlangen-Nürnberg, Erlangen, w Niemczech. Do moich obowiązków należało stworzenie strategii naukowej programu badawczego w MPICI, a także nadzorowanie i wspieranie doktorantów V. Ulaganathana i J.Y. Wona, oraz magister I. Retzlaff. Innym ważnym moim zadaniem było nawiązanie ścisłej współpracy z grupą w Erlangen w celu połączenia wysiłków w ramach wspólnego planu badawczego.

W tym czasie uzyskano już znaczną wiedzę na temat adsorpcji białek na miękkich powierzchniach międzyfazowych, co podsumowano we wstępie. Stało się coraz bardziej oczywiste, że efekty wywołane ładunkiem elektrycznym są głównym czynnikiem determinującym zachowanie białek na powierzchniach międzyfazowych, jednak kilka głównych punktów zostało tylko częściowo zrozumianych, w szczególności:

- o Zakres rozfałdowania (częściowego lub całkowitego) globularnych białek po adsorpcji na powierzchniach międzyfazowych był nadal kwestią dyskusyjną;
- o Istniały rzeczywiście pewne dowody na to, że białka mogą tworzyć wielowarstwowe struktury powierzchniowe, ale takich informacji było niewiele, a zrozumienie tego zjawiska było niepełne;
- o Nadal nie było jasne, w jaki sposób efekty wywołane ładunkiem elektrycznym oraz wielowarstwowe struktury mogą wpływać na fundamentalne właściwości powierzchni, a w konsekwencji na właściwości i stabilność TLF;

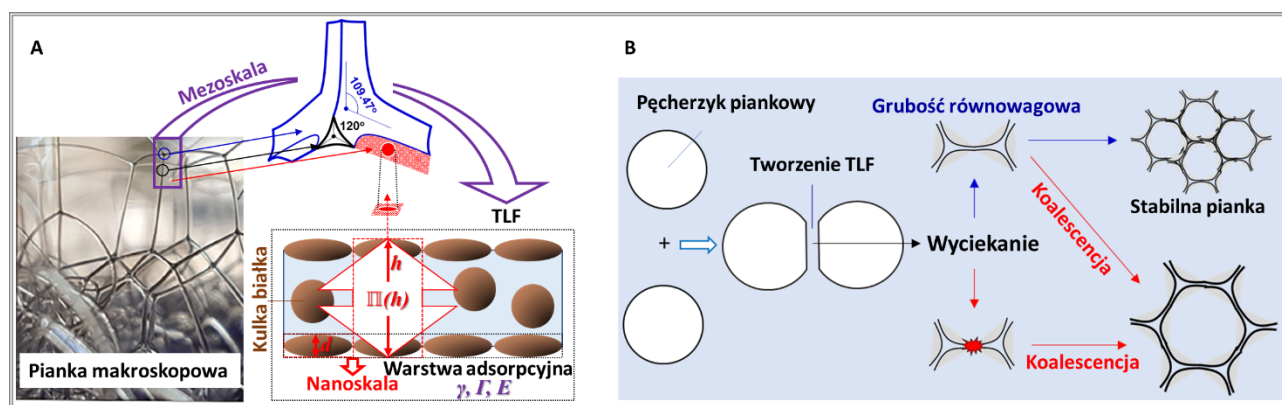
Najwyraźniej, w literaturze naukowej brakowało systematycznych badań nad silnym wpływem pH na ogólne cechy zachowania białek na powierzchniach międzyfazowych oraz w TLF. Zdałem sobie sprawę, że takie badanie powinno wiązać się z następującymi wymaganiami:

- I. Dobrze zdefiniowaną problematyką, której badania mogą wypełnić luki w obecnym stanie wiedzy na ten temat, a tym samym wyrzucić nowy wpływ na naukę;
- II. Połączeniem różnych narzędzi eksperymentalnych do pozyskiwania uzupełniających się rodzajów informacji;
- III. Odpowiednimi narzędziami eksperymentalnymi;
- IV. Odpowiednimi modelami do teoretycznego opisu danych eksperymentalnych.

Z tego względu, badania nad wpływem pH na zachowanie białek globularnych w obrębie hierarchicznego łańcucha *powierzchnia W/A – cienki film piankowy – pianka*, stały się wiodącym kierunkiem moich badań nad piankami białkowymi. Opracowane podejście badawcze schematycznie

przedstawiono na Rys. 1. Obejmuje ono trzy typy systemów modelowych: 1) pojedyncza powierzchnia; 2) pojedynczy film piankowy; oraz 3) pianka makroskopowa.

Dostępne metody eksperymentalne w laboratoriach w Poczdamie i Erlangen, a także w laboratorium w Sofii (z którym jestem na stałe związany) stanowiły doskonałą podstawę do zaplanowanych badań, takich jak: dynamika adsorpcji i reologia powierzchni (Poczdami, później także Münster); SFG (Erlangen, później także Münster); elipsometria (Poczdami, Erlangen); cienkie filmy płynne (Sofia, później także Münster); oraz badania stabilności piany (Erlangen, później także Münster, oraz we współpracy z kolegami z Politechniki Berlińskiej). Model teoretyczny adsorpcji białek opracowany w grupie w Poczdamie był łatwo dostępny. W Poczdamie we współpracy z kolegami z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera w Krakowie opracowano układ do eksperymentów z wznoszącym pęcherzykiem w roztworze. Ponadto, podczas drugiego stażu podoktorskiego, kiedy pracowałem z dr (obecnie Prof.) E. Schnekiem, przeprowadziłem eksperymenty z reflektometrią neutronową w Instytucie Laue-Langevin (ILL) w Grenoble we Francji, a uzyskane wyniki okazały się kluczowe dla rozwiązania problemu struktury badanych warstw adsorpcyjnych BLG na poziomie molekularnym.



Rys. 1. Panel A. Zdjęcie pianki makroskopowej (zaczepnięte z Ref.^{5c}) oraz schematyczne przedstawienie hierarchicznych elementów budulcowych pianki w skali mezoskopowej i nanoskopowej: cienki film ciekły pomiędzy dwoma pęcherzykami pianki i warstwa adsorpcyjna na powierzchni filmu zbudowana przez rozciągnięte kuleczki białkowe. Parametry γ , Γ oraz E (odpowiednio napięcie powierzchniowe, pokrycie adsorpcyjne oraz moduł lepkości sprężystości dylatacyjnej) charakteryzują właściwości mezoskopowe warstwy adsorpcyjnej. Parametry d oraz h charakteryzują odpowiednio skończone nanoskopowe grubości warstwy adsorpcyjnej oraz TLF; Π to ciśnienie rozdzielające działające przy danej h . **Panel B.** Schematyczne przedstawienie powstawania cienkiego filmu ciekłego w pianie i jego ewolucji w odniesieniu do stabilności piany.

Ponieważ przedmiotem zainteresowania w/w projektu tandemowego były pianki białkowe, najodpowiedniejszymi układami modelowymi do badań były powierzchnie W/A oraz cienkie filmy piankowe. Grupa badawcza prof. U. Kulozika z Politechniki Monachijskiej, pracująca w ramach tego samego klastra projektowego, opracowała nowatorską metodę frakcjonowania białek w skali pilotażowej, co pozwoliła na produkcję izolowanej i oczyszczonej α -laktoalbuminy oraz BLG z izolatu białka serwatkowego.ⁱ BLG jest jednym z najczęściej badanych białek w nauce o koloidach i powierzchniach międzyfazowych, stąd dobra podstawa wyników literaturowych stanowiła punkt wyjścia, a BLG wybrano jako białko modelowe. Próbkę BLG zostały przekazane przez grupę z Monachium.

ⁱ Toro-Sierra J i in. *Food Bioprocess Technol* **2013**,6,1032.

Wreszcie, mając pod ręką wysokiej jakości białko, dostęp do kilku metod eksperymentalnych i teoretycznych oraz jasny temat naukowy, miałem doskonałą okazję do przeprowadzenia obiecujących badań nad wpływem pH na różne właściwości warstw białkowych, cienkich filmów piankowych oraz pianek.

4.3.3. Metody i materiały

Metod powierzchniowych do badania warstw adsorpcyjnych na miękkich powierzchniach międzyfazowych jest niewiele, a najbardziej znane zostały wymienione we wstępie. W swoich badaniach nad warstwami adsorpcyjnymi BLG zastosowałem kilka metod eksperymentalnych i teoretycznych:

Tensjometria i reometria dylatacyjna powierzchni. Zastosowano technikę analizy profilu kropla/pęcherzyk^{A6,B11} do precyzyjnych pomiarów zmienności dynamicznego napięcia powierzchniowego $\gamma(t)$, które bezpośrednio można wyrazić ciśnieniem powierzchniowym $\Pi(t) = \gamma_0 - \gamma(t)$, gdzie γ_0 jest napięciem powierzchniowym czystego rozpuszczalnika. Dodatkowo można zastosować drgania harmoniczne powierzchni pęcherzyka o zadanej częstotliwości f oraz amplitudzie g , co pozwala na ocenę modułu dylatacyjnego powierzchni E . Moduł $E(i f) = E'(f) + i E''(f)$ składa się z dwóch składowych: rzeczywistej E' (wkład sprężysty reprezentujący zachowanie energii) oraz urojonej E'' (lepki wkład reprezentujący rozpraszanie energii).^{22,30-33}

Wyniki badań warstw adsorpcyjnych BLG badanych za pomocą tensjometrii, wykorzystującej analizę kształtu pęcherzyków przedstawiono w artykułach [H1,H2,H5,H6,H9], a za pomocą powierzchniowej reometrii dylatacyjnej w artykułach [H1,H2,H6,H9]. Eksperymenty przeprowadzono w Instytucie Koloidów i Powierzchni Międzyfazowych im. Maxa Plancka w Poczdamie w Niemczech oraz w WWU Münster w Münster w Niemczech.

Model teoretyczny adsorpcji białek. Do analizy danych eksperymentalnych wykorzystano wyprowadzony wcześniej model termodynamiczny adsorpcji białek na miękkich powierzchniach międzyfazowych.³⁴ Wykorzystano go w pracy [H1] do analizy izoterm ciśnienia powierzchniowego $\Pi(c)$ oraz modułu dylatacyjnego $E(c)$ dla roztworów BLG o pH 7. Później po raz pierwszy model porównano jednocześnie z kilkoma zależnościami eksperymentalnymi, w tym izotermą adsorpcji $\Gamma(c)$, w celu uzyskania najlepszego dopasowania między teorią a eksperymentem z wysoką niezawodnością i dokładnością. Podejście to zastosowano do danych eksperymentalnych dla warstw adsorpcyjnych BLG przy różnych wartościach pH (3, 5 oraz 7). Wyniki przedstawiono w artykule [H9], a model jest szczegółowo wyjaśniony w informacji uzupełniającej tej samej publikacji.

Metoda wznoszącego się pęcherzyka. Adsorpcja substancji powierzchniowo czynnych na powierzchniach międzyfazowych może być różna w zależności od hydrodynamiki układu międzyfazowego. Należy zauważyć, że ma to ogromne znaczenie w niektórych procesach, jak choćby flotacja.^{5a,A5} W wielu sposobach tworzenia piany nowopowstające pęcherzyki unoszą się w ciekłym ośrodku pod wpływem siły wyporu.^{A3,A5} W warunkach silnie hydrodynamicznych na powierzchni pęcherzyka tworzy się *dynamiczna warstwa adsorpcyjna* (DAL), a jej opis fizykochemiczny jest inny niż w przypadku warstwy adsorpcyjnej na nieruchomej powierzchniach międzyfazowych.^{35,B18,i} Metodologia ta jest potężnym narzędziem do badania DAL poprzez pomiary lokalnej prędkości pęcherzyka U_L .^{35,A3,A5,B18,i}

ⁱ Małyś K, Zawala J, Krzan M, Krasowska M. Bubbles rising in solutions; local and terminal velocities, shape variations and collisions with free surface. In: *Bubble and Drop Interfaces* (Miller R & Liggieri L editors), Brill, 2011, [Chapter 11](#).

Metoda ta została wykorzystana w artykule [H4] do zbadania wpływu pH na prędkości wznoszących się pęcherzyków w roztworach BLG. Eksperymenty przeprowadzono w Instytucie Koloidów i Powierzchni Międzyfazowych im. Maxa Plancka (MPICI), Poczdam, Niemcy. Należy wspomnieć, że urządzenie w tym instytucie zostało zbudowane przez doktoranta V. Ulaganathana przy pewnym wsparciu z mojej strony. Wcześniej V. Ulaganathan szkolił się w tej technice w ramach wizyt badawczych w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN w Krakowie.

Spektroskopia generowania sumarycznych częstotliwości wibracyjnych (SFG). SFG to koherentna nieliniowa metoda optyczna drugiego rzędu, która z natury jest specyficzna dla materiałów o symetrii inwersyjnej. W takim eksperymencie dwie wiązki laserowe nakładają się w czasie i przestrzeni, generując w ten sposób trzecią wiązkę o sumarycznej częstotliwości dwóch padających fal świetlnych. Szczegóły dotyczące metody można znaleźć w Refs.^{28, B29} oraz na przykład w artykułach przeglądowych Engelhardta i in. (2014)ⁱ oraz Hosseinpoura i in. (2020)ⁱⁱ. W celu określenia stanu naładowania elektrycznego takich powierzchni analizowany jest szeroki zakres cech od 3100 cm^{-1} do 3800 cm^{-1} . Występowania tych pasm jest spowodowane drganiami rozciągającymi OH poczwórnie skoordynowanych molekuły wody międzyfazowej i wskazują na silne zmiany zależnego od pH ładunku zaadsorbowanych cząsteczek białka. Międzyfazowe pole elektryczne prowadzi do silnych zmian w natężeniu SFG, szczególnie w przypadku małych i wysoce polaryzowalnych molekuł, takich jak H_2O . W rezultacie, zależne od pH zmiany drgań rozciągających pasm OH można zastosować do określenia względnych zmian natężenia międzyfazowego pola elektrycznego. Z tego powodu lokalne minima całkowitych natężeń SFG (pasma OH) można przypisać brakowi silnego pola elektrycznego, a tym samym punktowi izoelektrycznemu powierzchni.

Technika SFG została wykorzystana w artykule [H2] do zbadania wpływu pH roztworu na stan naładowania elektrycznego warstw adsorpcyjnych BLG. Eksperymenty przeprowadzono w FAU Erlangen–Nürnberg, Erlangen, Niemcy.

Elipsometria i reflektometria neutronowa (NR). Obie metody opierają się na odbiciu od powierzchni i dostarczają informacji o rozkładzie gęstości materii w kierunku z prostopadłym do powierzchni zgodnie ze schematem: roztwór fazy ciekłej – warstwa adsorpcyjna – przeciwna faza płynna (gazowa lub ciekła). Główna różnica w podstawach tych metod polega na wielkości mierzonej, która daje dostęp profili gęstości: elipsometria działa z odbiciem wiązki światła (zwykle lasera) i analizuje profil współczynnika załamania światła $n(z)$, natomiast NR działa z odbiciem wiązki neutronów i analizuje profil gęstości długości rozpraszania neutronów $\rho(z)$.ⁱⁱⁱ

Obie metody dobrze nadają się do jednoznacznego oszacowania pokrycia adsorpcyjnego Γ . W elipsometrii, Γ jest związane z iloczynem współczynnika załamania światła i grubości warstwy (nd), stąd dla danej wartości Γ , uzyskanie wartości dla jednej z tych sprzężonych wielkości wymaga znajomości wartości dla drugiej. Pod tym względem, reflektometria neutronowa może być bardziej użyteczna, ponieważ daje bezpośredni dostęp do wartości ρ_{ads} oraz d badanej warstwy adsorpcyjnej, zwłaszcza gdy eksperymenty NR są przeprowadzane w środowisku wodnym z odpowiednim kontrastem izotopowym. W artykule [H7] eksperymenty NR przeprowadzono w dwóch wodnych kontrastach izotopowych:

ⁱ Engelhardt K i in. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2014**,19,207.

ⁱⁱ Hosseinpour i in. *Chem Rev* **2020**,120,3420.

ⁱⁱⁱ Hayter JB i in. *J Chem Soc, Faraday Trans 1* **1981**,77,1437.

- o Woda dopasowana do kontrastu powietrza (z angielskiego *air-contrast-matched-water*, ACMW 8.1% v/v D₂O w H₂O), która ma taką samą gęstość długości rozpraszania jak powietrze, $\rho_{\text{ACMW}} = \rho_{\text{air}} = 0$. Następnie, każdy materiał powierzchniowo czynny o $\rho_{\text{ads}} \neq 0$ który adsorbuje się na powierzchnia, daje sygnał odbicia, który jest proporcjonalny do Γ poprzez zmierzone wartości ρ_{ads} ;
- o D₂O. W tym przypadku warunek $\rho_{\text{D}_2\text{O}} \neq \rho_{\text{ads}} \neq 0$ wyznacza dobrze zdefiniowany profil $\rho(z)$ który jest bardzo wrażliwy na grubość warstwy d .

Analiza współdoprecyzowania dwóch zestawów danych reflektometrycznych daje wartości dla Γ oraz d z dużą dokładnością. Ponadto na podstawie tych danych można w prosty sposób obliczyć obszar powierzchni na cząsteczkę ω .

W artykułach [H2,H7] zastosowano elipsometrię, a w artykule [H7] technikę NR do zbadania wpływu pH roztworu na kinetykę adsorpcji $\Gamma(t)$ oraz strukturę molekularną warstw adsorpcyjnych BLG pod względem d . Eksperymenty elipsometryczne przeprowadzono w FAU Erlangen–Nürnberg, Erlangen, Niemcy (artykuł [H2]) oraz w Instytucie Koloidów i Powierzchni Międzyfazowych im. Maxa Plancka, Poczdam, Niemcy (artykuł [H7]). Eksperymenty NR przeprowadzono na reflektrometrze neutronowym „Figaro”ⁱ w Instytucie Laue-Langevin (ILL), Grenoble, Francja w ramach dwóch wizyt badawczychⁱⁱ przyznanych na podstawie zatwierdzonych wniosków badawczych, których byłem głównym autorem.

Metodologia cienkiego filmu ciekłego. Technika „mikrointerferometryczna”^{3b,4,36a,37ab} pozwala na równoczesny pomiar ciśnienia rozłączającego Π oraz grubości h pojedynczej TLF.

W celce „Scheludko” wewnątrz kropli roztworu uwięzionej w szklanym uchwycie tworzy się mikroskopijny, wolnostojący, płasko-równoległy film piankowy. W takim układzie film jest połączony z meniskiem kropli i w stanie równowagi ciśnienie rozłączające filmu jest równe ciśnieniu kapilarnemu w menisku, $\Pi = P_c = \text{const}$.

W celce, w której zamiast szklanego uchwytu wykorzystano porowatą płytkę (celka „Exerowa-Scheludko”,^{3b,4,36a,37cd}) można zastosować dodatkowe ciśnienie $P_{\text{appl}} = \Pi$ na powierzchni filmu. Pozwala to zmierzyć izotermę ciśnienia rozłączającego $\Pi(h)$, która jest właściwie równaniem stanu równowagi TLF.

Ciśnienie rozłączające w równowagowym TLF jest sumą co najmniej trzech głównych niezależnych składników:^{3b,4,36}

$$\Pi = -\Pi_{\text{VW}} + \Pi_{\text{el}} + \Pi_{\text{st}} > 0$$

uwzględniających różne rodzaje oddziaływań powierzchniowych:

- o Π_{VW} (DLVO) – oddziaływania Keesoma, Debye’a oraz Londona (dyspersyjne); w symetrycznym TLF, Π_{VW} jest zawsze przyciągające;
- o Π_{el} (DLVO) – odpychanie elektrostatyczne między naładowanymi powierzchniami w medium elektrolitycznym. Dla danego potencjału podwójnej warstwy elektrycznej φ_0 , na powierzchniach filmu, to oddziaływanie jest modulowane przez długość Debye’a κ^{-1} . Przy niskiej sile jonowej I , κ^{-1} jest ma większą wartość, dlatego uzyskuje się cienki film zwykły o stosunkowo dużej grubości (z angielskiego *Common Thin Film*, CTF, $h > 30$ nm) który wygląda jasno w świetle odbitym. Każdy wzrost I powoduje spadek wartości κ^{-1}

ⁱ Campbell RA i in. *Eur Phys J Plus* **2011**,126,107.

ⁱⁱ <https://doi.ill.fr/10.5291/ILL-DATA.9-13-640> * <https://doi.ill.fr/10.5291/ILL-DATA.9-13-728>

¹, a tym samym zmniejszenie całkowitej grubości filmu ze względu na zmniejszenie grubości rdzenia wodnego filmu $h_{\text{core}} \approx 2\kappa^{-1}$. Prowadzi to do powstania czarnego filmu zwykłego (z angielskiego *Common Black Film*, CBF, $h < 30$ nm), który jest nadal stabilizowany siłami elektrostatycznymi.

- o Π_{st} (nie DLVO) – oddziaływania odpychające pochodzenia sterycznego wynikające z fizycznego kontaktu między warstwami adsorpcyjnymi na powierzchni filmu. Brak odpychania elektrostatycznego prowadzi do powstania najcieńszego czarnego filmu tzw. czarnego filmu Newtona (z angielskiego *Newton Black Film*, NBF). Taki film to błona amfifilowa składająca się z dwóch warstw adsorpcyjnych, podzielonych jedynie ograniczoną ilością wody hydratacyjnej; taka dwuwarstwa jest stabilizowana przez siły steryczne bliskiego zasięgu; grubość NBF z surfaktantów o małej masie cząsteczkowej może wynosić zaledwie $h < 6$ nm.³⁸⁻⁴⁰

Grubość TLF zmierzona interferometrycznie to tak zwana „grubość ekwiwalentna” (z angielskiego *equivalent thickness*, h_w), która odpowiada filmom o pewnym jednorodnym współczynniku załamania światła n równym współczynnikowi załamania światła roztworu, z którego utworzony jest film (zwykle bliskim współczynnikowi wody $n_w \approx 1.33$). Jednak, h_w różni się od rzeczywistej fizycznej grubości filmu h ze względu na znacznie wyższy współczynnik załamania światła warstw adsorpcyjnych n_{ads} . Zależność między h_w oraz h została wyprowadzona przez Duyvisaⁱ i polega na zastosowaniu modelu struktury filmu.^{3b,36a} Najczęściej stosowanym modelem jest trójwarstwowy model sandwiczowy, który zakłada dwie równe warstwy adsorpcyjne o grubości d i współczynniku załamania światła n_{ads} , oraz rdzeń wodny filmu o grubości h_{core} i jednorodnym współczynniku załamania światła n_{core} ($n_{\text{core}} \approx n_w \approx 1.33$), stąd:

$$h = h_{\text{core}} + 2d.$$

W przypadku cienkiego filmu piankowego (dla powietrza $n_p = 1$), stosując „optyczny” współczynnik $p \equiv \frac{n_{\text{ads}}^2 - 1}{n_{\text{core}}^2 - 1}$ jako poprawkę do zmierzonej h_w , grubość filmu to:

$$h = h_w - 2d(p - 1).$$

Oczywistym jest, że właściwa analiza pomiarów interferometrycznych wymaga wartości parametrów warstw adsorpcyjnych d oraz n_{ads} , które nie zawsze są dostępne. W NBF praktycznie brakuje rdzenia wodnego, a jakakolwiek woda jest prezentowana jedynie jako powłoka hydratacyjna hydrofilowych grup wzajemnie zaadsorbowanych warstw powierzchniowych filmu.³⁸⁻⁴⁰ W takiej sytuacji, NBF można bezpiecznie przybliżyć za pomocą pojedynczej płytki o wspólnym współczynniku załamania światła n_{NBF} który jest bardzo zbliżony do n_{ads} .⁵⁰ W związku z tym powszechnie przyjmuje się następujące przybliżenie:

$$h_{\text{NBF}} \approx h_w$$

obliczone z odpowiednią wartością n_{NBF} .

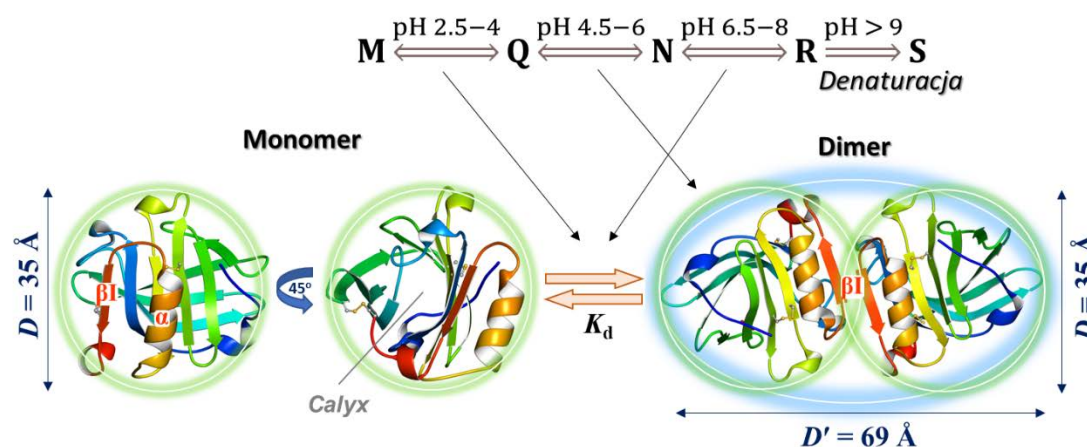
Technikę TLF wykorzystano w artykułach [H3,H8] do zbadania wpływu pH roztworu na ciśnienie rozłączające Π oraz grubość h , a także na stabilność filmów piankowych otrzymanych z roztworów BLG. Eksperymenty przeprowadzono w Instytucie Chemii Fizycznej – Bułgarskiej Akademii Nauk w Sofii w Bułgarii oraz w WWU Münster w Münster w Niemczech.

ⁱ Duyvis EM. *The Equilibrium Thickness of Free Liquid Films*. PhD thesis: Utrecht, 1962.

Pianki. Stabilność makroskopowych pianek została zbadana w artykule [H8]. Szybkość zanikania piany w czasie mierzono w szklanej kolumnie za pomocą komercyjnego przyrządu DFA-100, Krüss, Niemcy. Dalsze szczegóły dotyczące procedur eksperymentalnych i analizy danych podano w artykule [H8] a także w Ref.^{A5}. Eksperymenty przeprowadzono we współpracy z kolegami z Politechniki Berlińskiej.

Materiały. Do wszystkich eksperymentów opisanych w artykułach [H1-H9] użyto próbek białek o tym samym pochodzeniu. W trakcie prac eksperymentalnych (2011–2019) wysokiej jakości bydlęcy BLG (w postaci liofilizowanego proszku) został przekazany przez prof. U. Kulozik (Politechnika Monachium, Niemcy) w kilku dostawach świeżego materiału. Próbkę BLG zazwyczaj charakteryzują się zawartością białka całkowitego $\approx 98.9\%$ (w tym zawartość BLG $>99\%$), soli $\approx 0.7\%$, oraz śladowymi ilościami laktozy ($<0.05\%$). Roztwory wodne BLG oczyszczano węglem drzewnym zgodnie z wcześniej proponowaną procedurą.^{52a} Ten etap zastosowano ze względu na fakt, że wyizolowane białka mogą być zanieczyszczone silnie powierzchniowo czynnymi cząsteczkami o niskiej masie cząsteczkowej (*np.* kwasy tłuszczowe, glicerydy, lipidy itp.) jak wykazano w literaturze w badaniach porównawczych z natywnymi i oczyszczonymi roztworami handlowych próbek BLG oraz α -laktoalbuminy.⁵²

BLG jest stosunkowo hydrofobowym białkiem mającym dwa mostki dwusiarczkowe.⁵³ Trójwymiarowe struktury molekularne są dostępne w Internecie i są pokazane na Rys. 2. Zgodnie z danymi dotyczącymi promienia bezwładności BLG uzyskanymi z eksperymentów z małym kątem rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS) i neutronowego (SANS), jednostki BLG w roztworze można aproksymować jako: (globuły monomerycznej) kulki o średnicy $D \approx 3.5$ nm; (dimery) wydłużone elipsoidy o krótkiej i długiej osi odpowiednio $D \approx 3.5$ nm i $D' \approx 6.9$ nm, składające się z dwóch oddziałujących sfer monomeru.ⁱ



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie monomeru oraz dimeru bydlęcej β -laktoglobuliny. Struktury krystalograficzne pochodzą z <Protein Data Bank> źródło ID: 1BEB.ⁱⁱ β 1 oznacza β -nić I, α oznacza α -helisę.

Zidentyfikowano kilka przemian konformacyjnych zależnych od pH w strukturach trzeciorzędowych i czwartorzędowych wodnego BLG (Rys. 2):^{53,iii}

- o M $\leftrightarrow$ Q (odwracalne): przejście monomer-dimer;
- o Q $\leftrightarrow$ N (odwracalne): przejście od mniej zwartej, kwasowej formy Q do bardziej zwartej, natywnej formy N;

ⁱ Witz J i in. *J Am Chem Soc* **1964**,86,168. * Vogtt K i in. *Soft Matter* **2011**,7,3906.

ⁱⁱ <https://pdbe.org/mine/summary/1BEB>

ⁱⁱⁱ Timasheff SN i in. *J Biol Chem* **1966**,241,2496. * Taulier N, Chalikian TV. *J Mol Biol* **2001**,314,873. * Sakurai K, Goto Y. *PNAS* **2007**,104,15346.

- o $N \leftrightarrow R$ (przejście Tanforda, odwracalne): forma R charakteryzuje się wystawieniem ukrytej Glu68 na działanie rozpuszczalnika, czemu towarzyszy ogólny wzrost uwodnienia białka i rozluźnienie wewnętrznego upakowania cząsteczki;
- o $R \rightarrow S$ (nieodwracalny): denaturacja alkaliczna prowadząca do niesfałdowanych monomerów o wysokim ujemnym ładunku elektrycznym netto.

Punkt izoelektryczny wodnego BLG wyznaczony z pomiarów miareczkowania jonami wodorowymi,⁵⁴ i z pomiarów elektroforetycznych jako odpowiednio $pI = 5.2\text{--}5.4$ oraz $pI \approx 5.1$, i przedstawiono w artykule [H2] (Rys. 3). Stwierdzono, że ładunek elektryczny netto globulek BLG jest dodatni przy $pH < pI$ i ujemny przy $pH > pI$. W roztworach wodnych o $pH < 4$ lub $pH > 5.2$ BLG występuje w dynamicznej równowadze monomer-dimer, która charakteryzuje się stałymi dysocjacji $K_d(pH)_{c,I,T}$ zależnymi od pH , które z kolei są również zależne od stężenia białka c , siły jonowej I oraz temperatury T . W temperaturze pokojowej, w „wysokich” stężeniach białka oraz warunkach pH zbliżonych do neutralnego ($pH \approx 7$), BLG jest głównie dimeryczne, tymczasem przy $pH < 3.5$ stężenie frakcji monomerów staje się większe. W zakresie pH od 4 do 5.2, cztery dimery mogą łączyć się w sześcienny oktamer, którego stała dysocjacji silnie wzrasta wraz z temperaturą, a w temperaturze pokojowej udział oktameru staje się nieistotny. Stąd przy $pH \approx 5$ BLG istnieje prawie wyłącznie jako dimer w temperaturze pokojowej.

Jest oczywiste, że dynamika wodnych roztworów BLG jest silnie zależna od pH , co powinno mieć wpływ na właściwości międzyfazowe takich roztworów.

4.3.4. Wyniki i dyskusja

Streszczenie. Artykuły [H1,H2] mają charakter wprowadzający. W artykule [H1] wykorzystano literaturowy model termodynamiczny³⁴ do opisu uzyskanych danych eksperymentalnych dotyczących właściwości adsorpcyjnych oraz lepkosprężystych warstw BLG na powierzchni W/A ($pH \approx 7$), a co najważniejsze do zbadania zdolności modelu do odzwierciedlania zjawiska tworzenia wielowarstwowej struktury międzyfazowej przy wysokich stężeniach białka. Artykuł [H2] przedstawia zbiór wyników eksperymentalnych uzyskanych przez trzy współpracujące grupy (Poczdami, Erlangen i Karlsruhe). Opisano w nim wpływ pH na różne właściwości międzyfazowe BLG (dynamika absorpcji, reologia powierzchni, elektrostatyka i struktura). Ten artykuł był ważny nie tylko ze względu na nowatorskie wyniki, ale także dlatego, że otworzył kilka nowych istotnych pytań (omówionych poniżej). Dążenie do znalezienia odpowiedzi na te pytania było motywacją do dalszych prac badawczych. W kolejnych badaniach [H3–H9], zastosowano podobny schemat badawczy jak w [H2], ale zrealizowano go bardziej szczegółowo i co ważne, pozwoliło to włączyć w badania cienkie filmy piankowe [H3,H8] jako brakujące ogniwo w łańcuchu hierarchicznym: **powierzchnia W/A – cienki film piankowy – pianka**. Artykuł [H3] dotyczy cienkich filmów piankowych i przedstawia wyniki dotyczące warunków otrzymywania różnych rodzajów filmów (CTF, CBF oraz NBF). W tym artykule przedstawiono dwa istotne ustalenia: 1) grubość otrzymanego NBF jest praktycznie niezależna od pH ; oraz 2) NBF otrzymane z kwaśnych roztworów BLG ($pH \approx 3$) są wyjątkowo niestabilne. Oba te ustalenia były nieco zaskakujące, mając na uwadze odpowiednie wyniki z pracy [H2]: 1) znacznie większa grubość warstwy adsorpcyjnej BLG w pobliżu pI ; oraz 2) prawie „symetryczne” właściwości warstw adsorpcyjnych po obu stronach pI . Było oczywiste, że do rozwiązania tych problemów potrzebne są bardziej szczegółowe badania. Po opublikowaniu artykułu [H4], który opisuje

dynamikę ruchu pęcherzyków wznoszących się w roztworach BLG, zorganizowałem cykl uzupełniających się prac eksperymentalnych i teoretycznych, które zostały opublikowane w dedykowanej serii pięciu artykułów [H5–H9]. Pierwsze dwa artykuły [H5,H6] z tej serii prezentują dużą ilość danych eksperymentalnych dotyczących kinetycznych zależności ciśnienia powierzchniowego $\Pi(t)$ oraz modułu lepkości dylatacyjnej $E(t)$ dla warstw BLG dla szerokiego zakresu stężeń białka i przy różnym pH. Dane te dostarczyły „dynamicznych” zależności pomiędzy $E(\Pi(t))$ oraz pH, które okazały się bardzo informacyjne. W trzecim artykule z tej serii [H7] przedstawiono dane eksperymentalne z pomiarów elipsometrycznych i z NR w zakresie kinetyki adsorpcji $\Gamma(t)$ oraz grubości warstwy d . Grubość warstwy podano z rozdzielczością sub-nanometrową. Najważniejszym odkryciem w tej pracy jest szczegółowy opis wielowarstwowej struktury warstw adsorpcyjnych BLG otrzymanych przy $\text{pH } 5 \rightarrow \text{pI}$ – takie warstwy są niejednorodne i posiadają dyskretną strukturę dwuwarstwową, na którą składa się gęsta monowarstwa pierwotna i luźna podwarstwa wtórna. Mając dostęp do takiego zestawu nowych informacji na temat wpływu pH na różne właściwości warstw międzyfazowych BLG, kolejnym krokiem było zbadanie zależnej od pH stabilności odpowiednich filmów piankowych oraz pianek. Artykuł [H8] ujawnił bardzo dobrą korelację pomiędzy krytycznym ciśnieniem rozdzielającym pękania filmu Π_{cr} , a okresem połowicznego zaniku pianki $t_{1/2}$. Na podstawie uzyskanych wyników udało się stwierdzić, że trwałość pianek BLG jest w dużym stopniu zdeterminowana stabilnością odpowiednich czarnych filmów. Ostatni artykuł [H9] z tej serii dotyczył teoretycznej analizy dużego zestawu danych eksperymentalnych dla warstw adsorpcyjnych BLG, dostarczając ilościowej informacji o niektórych cechach tych warstw, które są niedostępne eksperymentalnie.

4.3.4.1. Elektrostatyka warstw adsorpcyjnych β -laktoglobuliny

Informacje o stanie izoelektrycznym powierzchni międzyfazowej, *tzn.* o elektroneutralnej warstwie adsorpcyjnej białek, są dostępne jedynie pośrednio tradycyjną metodą pomiaru potencjału ΔV i takie informacje można uzyskać dopiero po zastosowaniu modeli teoretycznych do rozróżniania wkładu dipolarnego i jonizacyjnego.^{20,21} Krzywe danych $\Delta V(\text{pH})$ interpretuje się zwykle przez uwzględnienie znanych wartości punktu izoelektrycznego badanego białka.^{20,21} Rozwój nieliniowych metod optycznych, takich jak generacja drugiej harmonicznejⁱ, a w szczególności SFG,²⁸ najwyraźniej daje możliwości bezpośredniego pomiaru wielkości pola elektrycznego na powierzchniach W/A.

We współpracy z kolegami z grupy w Erlangen użyliśmy SFG do zbadania stanu naładowania powierzchni W/A zaadsorbowanymi cząsteczkami BLG w funkcji pH. Rys. 3A przedstawia wyniki SFG z artykułu [H2], które są porównywane z właściwościami objętości roztworów (cząsteczkowy ładunek netto Z oraz potencjał zeta ζ). Zmierzony sygnał SFG, modulowany przez pH roztworu, przedstawiono w postaci amplitud symetrycznych drgań rozciągających OH $|A|_{3200}$ przy 3200 cm^{-1} oraz $|A|_{3450}$ przy 3450 cm^{-1} uzyskany z pełnych widm (patrz Rys. 3B). Minimum w zależnościach $|A|(\text{pH})$ praktycznie pokrywa się z punktem izoelektrycznym ($\text{pI} \approx 5.1$).

Należy wspomnieć, że taki mechanizm zgodności stanów naładowania BLG w fazie objętościowej i na granicy roztworów był już wcześniej kwestionowany w literaturze przez Bashevę i in. (2006).^{46b} Autorzy ci twierdzili, że film piankowy uzyskany z roztworu $\approx 11 \text{ }\mu\text{M}$ BLG o pH 5.2 ma dobrze naładowane powierzchnie,

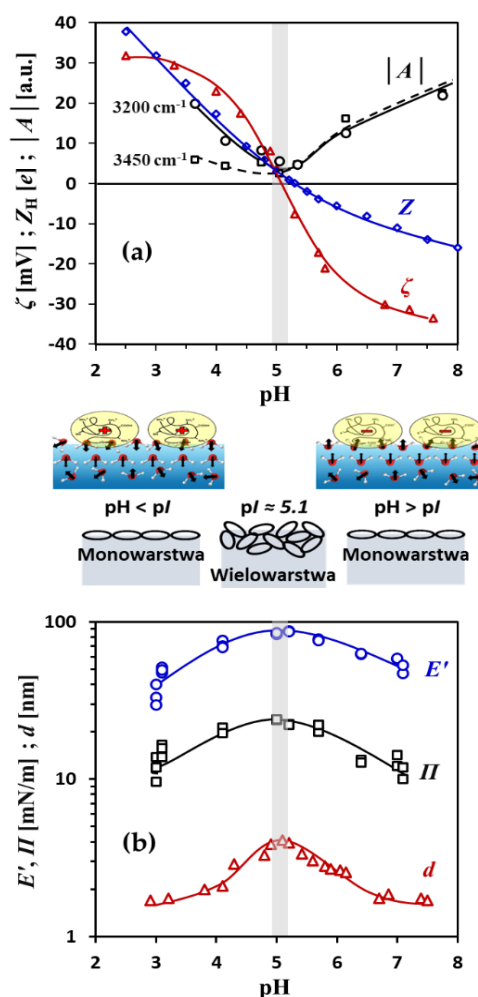
ⁱ Zhao X i in. [Chem Phys Lett 1993,202,513](#).

co jest sprzeczne z wynikami Rys. 3a, a także z wynikami dotyczącymi filmów piankowych z artykułów [H3,H8]. Basheva i in. zaproponowała, że ładunek elektryczny warstwy międzyfazowej BLG może być związany ze zmianami konformacyjnymi zaadsorbowanych cząsteczek BLG, które modyfikują stan izoelektryczny białka uzyskany w fazie objętościowej roztworu. Rzeczywiście, jest to rozsądny argument, który jednak jest nieco kontrowersyjny przez fakt, że punkty izoelektryczne jednostek BLG, takich jak segmenty peptydowe oraz włókienka amyloidu (które w porównaniu z natywnym BLG są inne pod względem struktury drugorzędowej i nie mają w ogóle struktury trzeciorzędowej), są prawie takie same jak dla natywnego BLG.ⁱ Z drugiej strony Clark i in.^{52a} wykazali, że czarne filmy piankowe z oczyszczonych roztworów BLG mają mniejszą grubość (≈ 20 nm) niż grubość (≈ 33 nm) filmów piankowych z nieoczyszczonych roztworów BLG (pH 7, $c_{\text{buff}} = 10$ mM), co oznacza, że powierzchnie filmu posiadają dodatkowy ładunek ujemny w przypadku nieoczyszczonego BLG, co najprawdopodobniej wynika z obecności współadsorbowanych surfaktantów jonowych (np. kwasów tłuszczowych) jako zanieczyszczeń w komercyjnej próbce BLG. Dlatego możliwą przyczyną obserwacji Bashevy i in. wydaje się być obecność zanieczyszczeń (surfaktantów jonowych) w próbce białka.

❖ **Fakt, że stan naładowania elektrycznego warstwy adsorpcyjnej białka jest determinowany przez ładunek netto białka w roztworze – co zostało *a priori* przyjęte w literaturze – zostało bezpośrednio potwierdzone eksperymentalnymi dowodami wynikającymi z wyników SFG w artykule [H2].**

Według mojej najlepszej wiedzy, taka korelacja została pośrednio udowodniona tylko w jednym badaniu, jednak na podstawie obliczeń modelowych.ⁱⁱ Później ta korelacja została potwierdzona dla kilku innych białek, ponownie przez pomiary SFG.ⁱⁱⁱ

Artykuł [H2] przedstawia również dodatkowe ważne informacje. Dane eksperymentalne dotyczące ciśnienia powierzchniowego Π , dylatacyjnej sprężystości powierzchniowej E' oraz grubości warstwy adsorpcyjnej d (z pomiarów elipsometrycznych) wykazały wyraźne maksimum ze środkiem przy pI w odpowiednich zależnościach od pH (Rys. 3b).



Rys. 3. Roztwory β -laktoglobuliny o różnym pH. (a) Molekularny ładunek elektryczny netto Z .⁵⁴ Potencjał zeta ζ z pomiarów elektroforetycznych oraz amplitudy drgań rozciągających OH $|A|_{3200}$ (○) oraz $|A|_{3450}$ (□) z pomiarów SFG na powierzchniach W/A.^{H2} (b) Dylatacyjny moduł sprężystości E' , ciśnienie powierzchniowe Π oraz grubość warstwy d (z elipsometrii) w funkcji pH ($c = 15$ μ M).^{H2} Należy zauważyć, że przedstawione tu wartości d są przeliczone z oryginalnych pomiarów elipsometrycznych^{H2} przy użyciu $n_{\text{ads}} = 1.57$ (oszacowany w artykule [H7]) zamiast $n_{\text{ads}} = 1.40$ jak w artykule [H2]). Wszystkie linie są drogowskazami do oka. Obszar zacieniony na szaro wskazuje na wąski obszar pH wokół pI, gdzie warstwy adsorpcyjne są (blisko)elektroneutralne.

ⁱ Kroes-Nijboer A i in. *Faraday Discuss.* **2012**,158,125.

ⁱⁱ Birdi KS, Nikolov A. *J Phys Chem* **1979**,83,365.

ⁱⁱⁱ Guckeisen T i in. *Langmuir* **2019**,35,5004.

❖ **Wniosek jest taki, że w pobliżu punktu izoelektrycznego BLG w roztworze, na powierzchni powstaje wielowarstwa elektroobojętna, natomiast monowarstwa naładowana przy $\text{pH} \neq \text{pI}$.**

Rzeczywiście, wpływ pH na właściwości i strukturę warstw adsorpcyjnych BLG^{14,24c,26b,55-57} oraz innych białek,^{11,14,19,22,24c,25bcd,26a,33,57-61,i} badano do 2013 r. Niemniej jednak często różne rodzaje wyników były przedmiotem różnych niezależnych badań prowadzonych przez różne grupy badawcze z wykorzystaniem różnych próbek BLG. W artykule [H2] po raz pierwszy przedstawiono taki zestaw wyników uzyskanych w **pojedynczym badaniu i z tą samą próbką białka.**

Podsumowując, wartym podkreślenia jest fakt, że artykuł [H2] otworzył kilka intuicyjnych, a moim zdaniem bardzo ważnych, pytań:

- ✓ Czy BLG może tworzyć wielowarstwy międzyfazowe przy $\text{pH} \neq \text{pI}$?
- ✓ Czy monowarstwy BLG różnią się właściwościami w zależności od pH?
- ✓ Jakie są szczegółowe struktury monowarstw i wielowarstw BLG na poziomie molekularnym?
- ✓ Jak monowarstwy i wielowarstwy BLG wpływają na różne właściwości powierzchni W/A?
- ✓ Jak w/w parametry wpływają na właściwości i stabilność TLF oraz pianek?

Kolejne badania po 2013 roku koncentrowały się na odpowiedzi na te pytania.

4.3.4.2. Kinetyka, termodynamika i reologia dylatacyjna warstw adsorpcyjnych β -laktoglobuliny

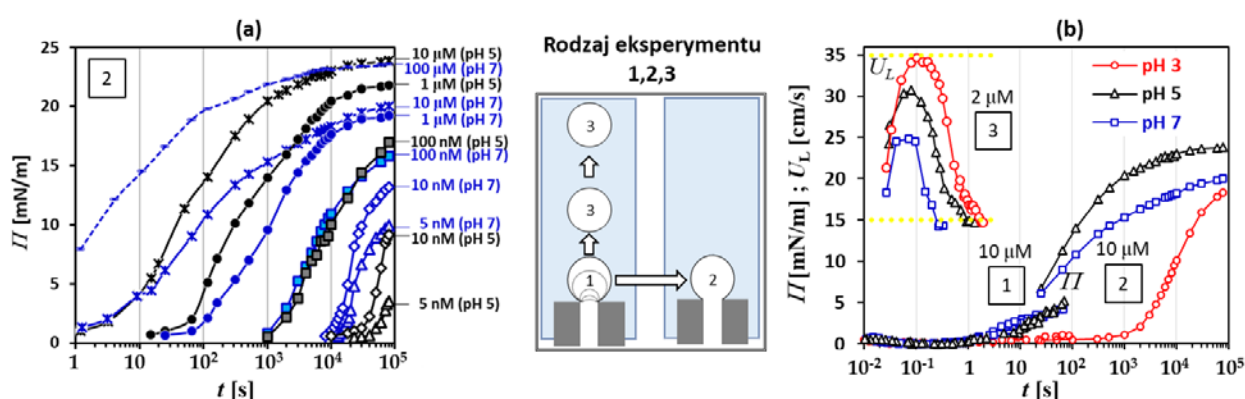
Na pierwsze z powyższych pytań właściwie odpowiadał artykuł [H1]. W pracy przedstawiono porównanie danych eksperymentalnych dotyczących warstw adsorpcyjnych BLG z teoretycznymi symulacjami opartymi na modelu termodynamicznym uwzględniającym nieidealności zarówno entalpii, jak i entropii.³⁴ Dane eksperymentalne obejmowały izotermy ciśnienia powierzchniowego $\Pi(c)$ oraz sprężystości dylatacyjnej $E'(c)$ zmierzone przy pH 7. Uzyskano dobre dopasowanie między tymi danymi a modelem. Możliwe było obliczenie różnych zależności parametrów podstawowych i reologicznych, w tym równania stanu $\Pi(T)$ oraz zależności nadmiaru powierzchniowego sprężystości dylatacyjnej $E'(T)$ i elastyczności granicznej Gibbsa $E_0(T)$; proszę zauważyć, że ten ostatni parametr jest eksperymentalnie niedostępny. Elastyczność Gibbsa E_0 jest wielkością termodynamiczną, która opisuje idealnie sprężyste zachowanie dylatacyjne warstwy międzyfazowej.⁶⁰ Z drugiej strony dobrze wiadomo, że moduł lepkosprężystości E białkowych warstw międzyfazowych jest zdominowany przez człon elastyczności E' , ponieważ składnik lepkości E'' jest zwykle o rząd wielkości mniejszy, tzn. $E' \gg E''$ i $E' \rightarrow E$.^{22,30-33} Porównanie teoretycznych zależności $E'(T)$ oraz $E_0(T)$ wykazało że początkowo nachodzą one na siebie przy niskim T , ale poza pewną wartością krytyczną $T_\#$ rozdzielają się (patrz Rysunek 7 w artykule [H2]). Oznacza to, że zachowanie reologiczne międzyfazowych warstw BLG jest bliskie idealnie sprężystemu przy $T < T_\#$ przy badanych częstotliwościach oscylacji ($f = 0.01\text{--}0.2$ Hz), podczas gdy przy $T > T_\#$ elastyczność E' odbiega od E_0 . Takie odchylenie od zachowania niemal idealnie sprężystego można przypisać działaniu procesów relaksacji, które były związane z tworzeniem się struktury wielowarstwowej. Jednak charakter procesów relaksacji w istniejącym układzie nie jest jeszcze jasny.

❖ **Artykuł [H2] dowodzi, że wielowarstwowa struktura międzyfazowa zaadsorbowanego BLG jest możliwa w warunkach $\text{pH} \neq \text{pI}$ i jest wykrywalna teoretyczną analizą pomiarów powierzchniowego modułu dylatacyjnego E .**

ⁱ Engelhardt K i in. [Langmuir 2012,28,7780](#).

Należy jednak zauważyć, że zastosowanie tego modelu może być w pewnym stopniu spekulacyjne ze względu na liczbę dowolnie regulowanych parametrów. Później ograniczenie to udało się ominąć w artykule [H9], dopasowując model do większego zestawu danych eksperymentalnych, co zwiększyło adekwatność i wiarygodność uzyskanych wyników (omówionych w dalszej części tego rozdziału).

Kinetyka adsorpcji białek globularnych na powierzchni W/A została dokładnie zbadana pod kątem dynamicznego ciśnienia powierzchniowego $\Pi(t)$ lub dynamicznego pokrycia adsorpcyjnego $\Gamma(t)$.^{9,12,15,19a,22,33,55-61,i} Niemniej jednak tylko niektóre z tych badań dotyczyły wpływu pH na kinetykę adsorpcji w przypadku kilku białek.^{22,33,55-57,60,61} W większości tych badań monitorowano tylko jeden lub kilka stężeń białka; również stosowane wartości pH rzadko obejmują szeroki zakres, który nie zawsze przekracza pI. Jednak głównym wnioskiem z odpowiednich badań jest to, że w warunkach zbliżonych do pI kinetyka adsorpcji jest szybsza, a wartości Π oraz Γ w stanie ustalonym są maksymalne.



Rys. 4. Kinetyka adsorpcji w roztworach β -laktoglobuliny z 10 mM buforem i różnym pH. Szkic pomiędzy wykresami przedstawia schematycznie trzy rodzaje eksperymentów: 1. Dynamiczne ciśnienie powierzchniowe $\Pi(t)$ dla rosnącego pęcherzyka (technika maksymalnego ciśnienia pęcherzyka)^{A3,A5,B11} przy $c = 10 \mu\text{M}$ (a);^{H9} 2. $\Pi(t)$ dane dla stacjonarnego pęcherzyka (technika analizy profilu pęcherzyka)^{35,A5,B11} przy $c = 5 \text{ nM} - 100 \mu\text{M}$ (a) oraz $c = 10 \mu\text{M}$ (b).^{H5} 3. Lokalne profile prędkości $U_L(t)$ dla wznoszącego się pęcherzyka przy $c = 2 \mu\text{M}$ (b).^{H4} Linie przechodzące przez symbole dodano dla ułatwienia śledzenia trendów; żółte poziome kropkowane linie w (b) pokazują warunki graniczne dla U_L .

Wyniki opublikowane w artykule [H5] wykazały, że aktywność powierzchniowa BLG jest niższa przy pH 3 niż przy pH 5 oraz pH 7, co przypisuje się wyższej barierze adsorpcyjnej (elektrostatycznej) ze względu na wyższy ładunek elektryczny netto białka.^{15c,ii} Rys. 4a przedstawia dane $\Pi(t)$ dla szerokiego zakresu stężeń BLG mierzonych przy pH 5 oraz pH 7 (w 10 mM buforze) zaczerpnięte z zestawu danych w artykule [H5]. Oczywiście jest, że kierunek wpływu pH na dynamiczne ciśnienie powierzchniowe i na końcowe wartości Π w stanie ustalonym odwraca się przy charakterystycznym stężeniu (około 100 nM) oznaczonym jako c_{cross} . Przy $c < c_{\text{cross}}$, BLG jest „anomalnie” mniej powierzchniowo aktywne przy pH 5 niż przy pH 7, podczas gdy przy $c > c_{\text{cross}}$ i pH 5 staje się bardziej powierzchniowo aktywne, jak należało oczekiwać. Odkrycie to zostało dodatkowo potwierdzone pomiarami $\Gamma(t)$ za pomocą NR i elipsometrii w artykule [H7]. Taki trend zależnego od pH zachowania się BLG na powierzchni W/A prowadzi do krzyżowania obu typów izoterm $\Pi(c)$ oraz $\Gamma(c)$ dla pH 7 oraz pH 5 (patrz Rys. 6 poniżej).

ⁱ Tripp BC i in. *J Colloid Interface Sci* **1995**,173,16.

ⁱⁱ Wierenga PE i in. *J Phys Chem B* **2005**,109,16946.

- ❖ Artykuł [H5] pokazuje po raz pierwszy, że wpływ pH na zachowanie adsorpcyjne BLG na powierzchni W/A jest zależny od stężenia BLG, a znana zasada, że aktywność powierzchniowa białek jest maksymalna w pobliżu pI obowiązuje dla BLG tylko do pewnego stężenia. Na razie nie są mi znane inne prace pokazujące, czy inne białka kuliste zachowują się podobnie w dwuwymiarowej przestrzeni parametrów {pH, c}.

Powszechnie wiadomo, że aktywność powierzchniowa białek wzrasta wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu I .^{56,i} Efekt ten jest związany z postępującym ekranowaniem międzycząsteczkowego odpychania elektrostatycznego poprzez wzrost I i działa, gdy białko przenosi pewne ładunek elektryczny netto, tzn. przy $\text{pH} \neq \text{pI}$. Artykuł [H5] pokazuje, że efekt ten jest również słuszny w przypadku BLG ($c_{\text{buff}} = 1\text{--}100\text{ mM}$). Co ważne, artykuł [H5] dostarcza dowodu, że taki efekt ekranowania jest nieistotny dla warstw BLG przy $\text{pH } 5 \rightarrow \text{pI}$ (patrz Rysunki 7 oraz 8 w artykule [H5]). Dlatego charakterystyczne stężenie c_{cross} znalezione w izotermach $\Pi(c)$ oraz $\Gamma(c)$ dla $\text{pH } 7$ oraz $\text{pH } 5$ musi zależeć od I . Izotermie te nie były badane przy różnych wartościach I , i kwestia ta stanowi plan przyszłych prac badawczych.

Wpływ pH na adsorpcję BLG badano również na powierzchniach niestacjonarnych, takich jak rosnący pęcherzyk na kapilarze (artykuł [H8]) oraz wznoszący się pęcherzyk w roztworze (artykuł [H4]). Tego typu eksperymenty zapewniają pomiary w zakresie od milisekund do kilkudziesięciu sekund i można je uznać za ściśle związane ze skalą czasową procesu powstawania piany. Niektóre wyniki przedstawia Rys. 4b. Dane dla krótkiej skali czasowej $\Pi(t)$ dla rosnącego pęcherzyka ujawniają znikomy wpływ pH (z wyłączeniem danych przy $\text{pH } 3$), co jest sprzeczne z danymi obejmującymi szerszą skalę czasową $\Pi(t)$ dla stacjonarnego pęcherzyka. To odkrycie – które według mojej najlepszej wiedzy nie zostało opisane w literaturze – sugeruje, że niezależnie od jakichkolwiek zmian aktywności powierzchniowej BLG, cząsteczki białka są w stanie szybko adsorbować na powierzchni rosnącego pęcherzyka, co najmniej przy $3 < \text{pH} \leq 7$, co stanowi typowy zakres pH w zastosowaniach spożywczych.

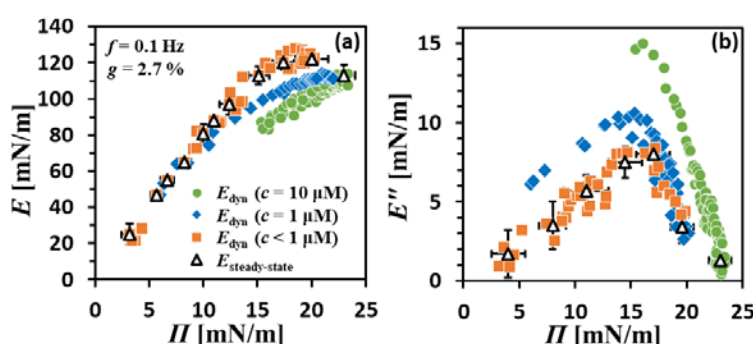
Niemniej jednak, gdy rosnący pęcherzyk odrywa się od kapilary i zaczyna unosić się w roztworze, jego ruch staje się silnie zależny od pH co ilustrują profile $U_L(t)$ na Rys. 4b. Zdolność BLG do tworzenia gęstej dynamicznej warstwy adsorpcyjnej (DAL), a tym samym do osiągnięcia prędkości końcowej U_T , jest najsłabsza przy $\text{pH } 3$. Fakt ten jest w pełni skorelowany z wynikami $\Pi(t)$ uzyskanymi zarówno dla krótkiej jak i długiej skali czasowej oraz potwierdza twierdzenie, że BLG jest najmniej aktywny powierzchniowo przy $\text{pH } 3$ w porównaniu z $\text{pH } 5$ i $\text{pH } 7$. Co zaskakujące, dane $U_L(t)$ ujawniają szybsze tworzenie się BLG-DAL przy $\text{pH } 7$ niż przy $\text{pH } 5$ – ten sam „anomalny” trend jak też obserwowany w długookresowych wynikach $\Pi(t)$ przy $c < c_{\text{cross}}$ (Rys. 4a). Należy zauważyć, że w przypadku wznoszącego się w roztworze pęcherzyka trend ten utrzymuje się dla całego dostępnego zakresu stężeń BLG (ok. $c = 0.5\text{--}5\text{ }\mu\text{M}$, patrz Rysunki 2–5 w artykule [H4]). Stąd też można stwierdzić, że trend zależnego od pH zachowania BLG-DAL nie jest „anomalny”, tylko ogólny.

W artykule [H6] przedstawiono wyniki dotyczące reologii dylatacyjnej powierzchni warstw adsorpcyjnych BLG uzyskane w tym samym zestawie eksperymentów przedstawionych w artykule [H5]. Zmierzono parametry reologiczne E' oraz E'' w funkcji czasu, a następnie otrzymano dynamiczne zależności $E'(\Pi(t))$ oraz $E''(\Pi(t))$ (Rysunki 2–5 w artykule [H6]). Badania urojonej części modułu E'' są niezwykle rzadkie i tylko nieliczne dane

ⁱ Pal P i in. [Surface Rev Lett 2011,18,267](#).

eksperymentalne zostały udokumentowane w literaturze.^{22,i} Sytuacja ta wynika najprawdopodobniej z faktu, że lepki wkład E'' do modułu dylatacyjnego E jest znacznie słabszy niż sprężysty E' , jak wspomniano powyżej, stąd badacze zwykle pomijają takie pomiary zakładając $E \approx E'$. Badania warstw adsorpcyjnych białek globularnych na powierzchni W/A, uzyskane wcześniej przez innych autorów, wykazały monotoniczny przebieg rosnącego E (lub E') w czasie i odpowiednio z $\Pi(t)$.^{22,32,33} Ponadto, badania te ujawniły, że zależności $E(\Pi(t))$ dla różnych stężeń danego białka kulistego (przy stałym pH oraz I) nakładają się na krzywą „wzorcową” $E(\Pi(t))$. Artykuł [H6] pokazuje, że ta zasada jest tylko częściowo ważna w przypadku BLG. W związku z tym sformułowano następujące wnioski:

- o Eksperymentalne dane dotyczące lepkości sprężystości dylatacyjnej dla BLG są zależne od pH i dla każdej z badanych wartości (pH 3, 5 oraz 7; patrz Rysunek 4 w artykule [H6] oraz Rysunki 5 i 7 w artykule [H9]) znaleziono „wzorcowe” krzywe $E(\Pi(t))_{\text{pH}}$. Według mojej najlepszej wiedzy taki efekt nigdy nie został dostrzeżony w literaturze. W swojej pracy doktorskiej Benjamins²³ założył, że ewentualny wpływ pH na właściwości lepkości sprężyste warstw adsorpcyjnych białek jest podobny dla wielu białek globularnych; podał wyniki dla albuminy jaja kurzego, które pokazują, że taki efekt jest bardzo słaby. Wręcz przeciwnie, dane eksperymentalne dotyczące BLG w artykule [H6] oraz teoretyczne analizy przedstawione w artykule [H9], wyraźnie wykazały silny wpływ pH na lepkości sprężyste zachowanie warstw adsorpcyjnych BLG.
- o Dane eksperymentalne dla BLG przy pH 5 zaczynają wyraźnie odbiegać od krzywej „wzorcowej” $E(\Pi(t))_{\text{pH5}}$ przy wysokich stężeniach BLG (Rys. 5a), sugerując specyficzne etapy tworzenia warstw adsorpcyjnych.
- o Zgodnie z moją najlepszą wiedzą po raz pierwszy podano obszernie dane eksperymentalne dotyczące urojonej części modułu dylatacyjnego $E''(\Pi(t))_{\text{pH}}$. Dla wysokich stężeń BLG dane te wykazują lokalne maksimum (Rys. 5b). Oznacza to, że w początkowym okresie w trakcie adsorpcji, warstwy BLG stają się bardziej lepkie, co prowadzi do lokalnego spadku sprężystości dylatacyjnej, ale z czasem E'' silnie maleje, a E odpowiednio dalej wzrasta, choć tylko nieznacznie. Taki przejściowy etap tworzenia się warstw adsorpcyjnych BLG przy pH 5 omówiono w artykule [H9] na podstawie struktury warstwy adsorpcyjnej badanej w artykule [H7]. Wyjaśniono to mechanizmem szybkiej adsorpcji dimerów BLG i tworzeniem nieuporządkowanej struktury międzyfazowej, która charakteryzuje się znaczną powierzchniową lepkością dylatacyjną. Taka interpretacja sugeruje, że przy niższych stężeniach białka, *tzn.* przy wolniejszych szybkościach adsorpcji, dimery BLG mają wystarczająco dużo czasu na relaksację na powierzchni W/A i wytworzenie wysokiej elastyczności dylatacyjnej. Podobne zachowanie zaobserwowano również dla pH 7, ale



Rys. 5. Warstwy adsorpcyjne β -laktoglobuliny w buforze 10 mM pH 5 i różnych stężeniach (5 nM – 10 μ M). Eksperymentalne zależności: (a) dynamicznego modułu dylatacyjnego $E(\Pi(t))$, dane z artykułu [H9]; oraz (b) jego części urojonej $E''(\Pi(t))$ - dane niepublikowane. Indeksy 'dyn' oraz 'steady-state' oznaczają odpowiednio stan dynamiczny (w trakcie adsorpcji) i stan ustalony (po ~22 godzinach adsorpcji).

ⁱ Ridout MJ i in. [J Agric Food Chem 2004,16,3930](#).

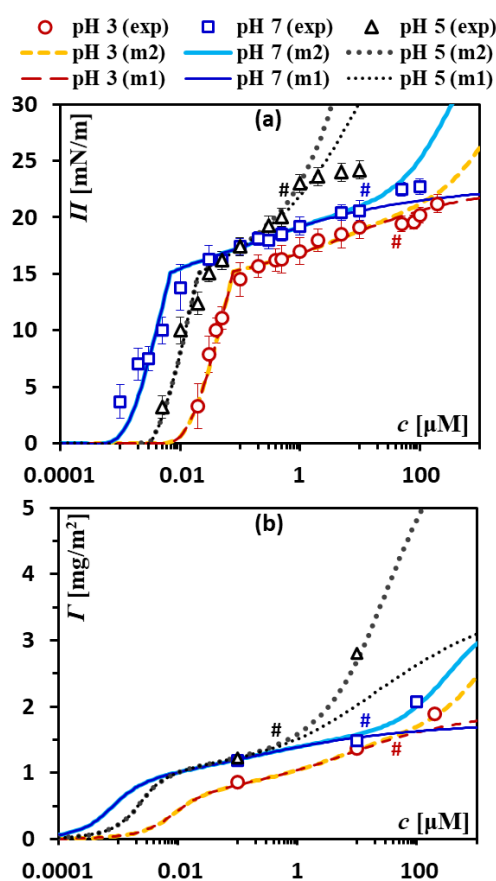
tylko przy bardzo wysokich stężeniach BLG (ok. 100 μM , patrz Rysunek 4 w artykule [H6]). Dla pH 3, efekt ten jest słaby.

Wpływ pH na właściwości międzyfazowe BLG był dalej badany poprzez pomiary NR pokrycia adsorpcyjnego $\Gamma(c)_{\text{pH}}$ w artykule [H7] oraz poprzez teoretyczną analizę danych eksperymentalnych w artykule [H9]. Procedury obliczeniowe w symulacjach modelu termodynamicznego i uzyskane wyniki zostały szczegółowo wyjaśnione w artykule [H9], dlatego nie będę ich tutaj ponownie omawiał. W porównaniu do artykułu [H1], tym razem procedury obliczeniowe zostały rozszerzone o kilka dodatkowych warunków:

- o Model dopasowano do większego zestawu dostępnych danych eksperymentalnych, w tym do nowych wyników $\Gamma(c)_{\text{pH}}$ z artykułu [H7], które okazały się niezwykle istotne dla optymalizacji jakości dopasowania (Rys. 6).
- o Nowe dane eksperymentalne dotyczące modułu dylatacyjnego $E(c)_{\text{pH}}$ zostały zmierzone ściśle w liniowym reżimie lepkości (przy $g < g_{\text{tr}}$, gdzie $g_{\text{tr}} \approx 4\%$ ^{H7,i} jest amplitudą przejścia do nieliniowego reżimu lepkości), w przeciwieństwie do danych przedstawionych w artykule [H1], które zostały zmierzone przy $g \approx 7\% > g_{\text{tr}}$.
- o Model zastosowano w dwóch trybach uwzględniających strukturę międzyfazową jednowarstwową (m1) lub dwuwarstwową (m2). To nowe podejście pozwoliło przewidzieć początek tworzenia się warstwy wtórnej, co odpowiada podziałowi obliczonych krzywych danych m1 oraz m2 dla izoterm $\Pi(c)_{\text{pH}}$ oraz $\Gamma(c)_{\text{pH}}$, które występują przy charakterystycznym stężeniu BLG $c_{\#}$ dla danego pH ($c_{\#}^{\text{pH5}} < c_{\#}^{\text{pH7}} < c_{\#}^{\text{pH3}}$). W ten sposób można było zidentyfikować pewne zależne od pH wartości charakterystyczne kilku podstawowych parametrów, takich jak Π , Γ oraz ω (obszar powierzchni na molekułę).

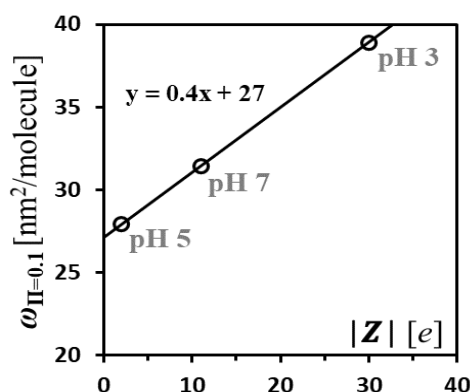
Rys. 7 przedstawia obliczone charakterystyczne wartości $\omega_{\Pi=0.1}$ obszaru powierzchni na molekułę BLG w nieskompresowanej monowarstwie na początku mierzanego ciśnienia powierzchniowego (wartość tę przyjęto jako $\Pi = 0.1$

mN/m) w funkcji ładunku elektrycznego netto BLG $|Z|$. Należy zauważyć, że chociaż ciśnienie powierzchniowe jest niezwykle niskie, na powierzchnia już zaadsorbowana jest znaczna ilość cząsteczek białka. Jest to dobrze znane zjawisko,^{15a,19b} które odpowiada przesunięciu początkowych części izoterm $\Gamma(c)_{\text{pH}}$ do niższych stężeń

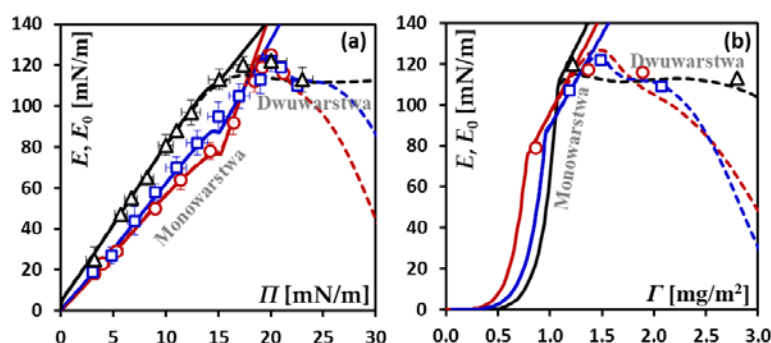


Rys. 6. Eksperymentalne i teoretyczne izotermy $\Pi(c)_{\text{pH}}$ (a) oraz $\Gamma(c)_{\text{pH}}$ (b) dla warstw adsorpcyjnych β -laktoglobuliny na powierzchni W/A ($C_{\text{buff}} = 10 \text{ mM}$).^{H9} Symbole są danymi eksperymentalnymi (exp), linie to najlepsze dopasowania do modelu jednowarstwowego (m1) lub dwuwarstwowego (m2); '#' wskazuje wartości charakterystyczne $\Pi_{\#}$ oraz $\Gamma_{\#}$ przy charakterystycznych stężeniach $c_{\#}$ początku tworzenia warstwy wtórnej.

ⁱ Fainerman VB i in. [Langmuir 2018,34,6678](#).



Rys. 7. Charakterystyczny obszar powierzchni na molekułę $\omega_{\Pi=0.1}$ przy minimalnym ściśnięciu monowarstwy ($\Pi = 0.1$ mN/m) w funkcji ładunku elektrycznego netto β -laktoglobuliny $|Z|$.^{H9}



Rys. 8. Zależności eksperymentalne i teoretyczne $E(\Pi)_{pH}$ (a) oraz $E(\Gamma)_{pH}$ (b) dla warstw adsorpcyjnych β -laktoglobuliny na powierzchni W/A.^{H9} Symbole są danymi eksperymentalnymi; linie są najlepsze dopasowania do modelu (m2), E_0 (—) oraz E (- - -).

białka w porównaniu z odpowiadającymi im izotermami $\Pi(c)_{pH}$ (Rys. 6). Źródłem takiego zachowania jest dwuwymiarowe przejście fazowe pierwszego rzędu z fazy „gazowej” do fazy „ciekło-rozprężonej”, które zachodzi przy ekstremalnie niskim Π .¹ Stąd, wyniki w Rys. 7 wskazują, że skłonność cząsteczek BLG do rozwijania się w „gazowych” monowarstwach na powierzchni W/A wzrasta wraz ze wzrostem $|Z|$, czyli w kolejności $pH\ 5 < pH\ 7 < pH\ 3$ (patrz również Rysunek 2b w artykule [H9]), co jest doskonale skorelowane z trendem spadku zawartości trzeciorzędowej struktury molekularnej BLG: najbardziej zwarta forma natywna N ($pH\ 4.5\text{--}6$), mniej zwarta forma R ($pH\ 6.5\text{--}8$) i luźniejsza forma Q ($pH\ 2.5\text{--}4$).

Rys. 8 przedstawia wyniki z obliczeń modelowych zależności $E(\Pi)_{pH}$ oraz $E(\Gamma)_{pH}$ reprezentujących równanie stanu warstwy adsorpcyjnej białek. Początkowe części zależności $E(\Pi)_{pH}$ odpowiadają krzywym „wzorcowym” w danych dynamicznych $E(\Pi(t))_{pH}$ (omówionych powyżej). Odchylenia E od obliczonych danych dla E_0 wskazują na tworzenie dwuwarstwowej struktury międzyfazowej, która jest szczegółowo omówiona w następnym rozdziale.

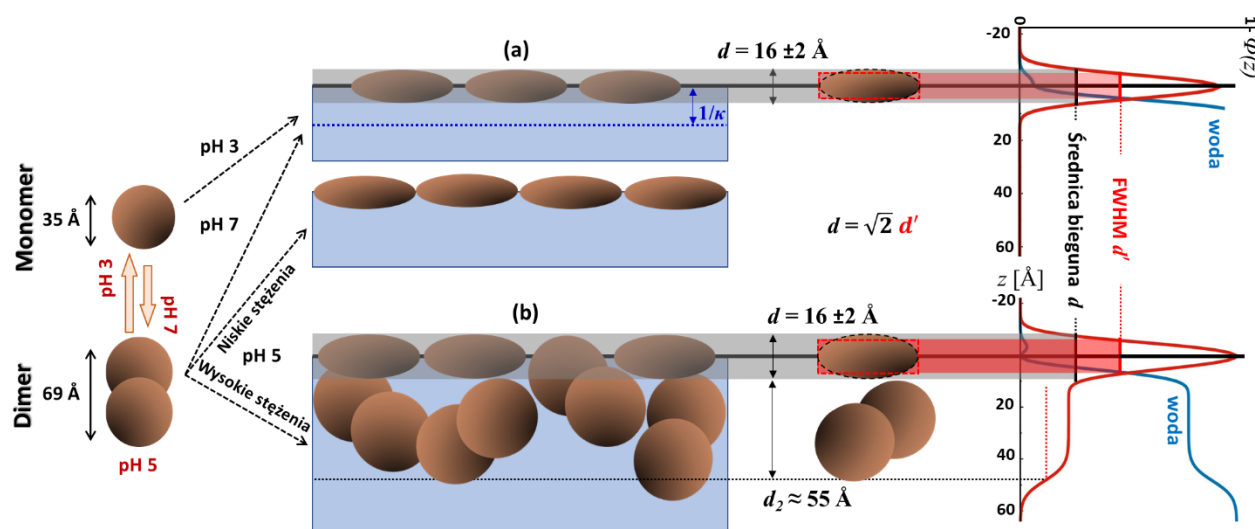
❖ Artykuły [H1,H4–H6] dostarczyły nowych ustaleń na temat wpływu pH na dynamikę adsorpcji i reologię dylatacyjną warstw adsorpcyjnych BLG na powierzchni W/A, wśród których: 1) równanie stanu w zakresie $\Pi(\Gamma)$ lub $E(\Pi)$ jest zależne od pH – ten nowy wynik można uznać za osiągnięcie o fundamentalnym znaczeniu; 2) stopień rozwinięcia cząsteczek BLG po adsorpcji jest określony przez ładunek elektryczny netto białka i koreluje ze zawartością struktury trzeciorzędowego białka utrzymywanej w fazie objętościowej roztworu; 3) eksperymentalna i teoretyczna analiza powierzchniowego modułu dylatacyjnego może być wykorzystana do wykrywania tworzenia się wielowarstwowej struktury białkowej na powierzchni W/A; 4) tworzenie wielowarstwowej struktury międzyfazowej następuje poprzez etap przejściowy charakteryzujący się lokalnym spadkiem dylatacyjnej sprężystości na skutek chwilowego wzrostu lepkości dylatacyjnej.

4.3.4.3. Struktura warstw adsorpcyjnych β -laktoglobuliny

W 2016 roku, kiedy odkryłem, że reflektometria neutronowa jest w stanie wyjaśnić strukturę zaadsorbowanych warstw na poziomie molekularnym, takie dane dla warstw BLG istniały już w literaturze.^{24cd,26b,63-66} Było jednak oczywiste, że podane wyniki nie zawierały wystarczających informacji, aby wywnioskować z nich ogólny trend wpływu pH na strukturę molekularną warstw adsorpcyjnych BLG. Moim

ⁱ Sundaram S i in. [Langmuir 1998,14,1208](#). * Erickson J i in. [Langmuir 2000,16,5072](#).

zdaniem były trzy główne przyczyny takiej sytuacji: 1) badano różne składy roztworów BLG (w odniesieniu do c , pH oraz I); 2) dyskusyjna była kwestia, czy warstwy międzyfazowe BLG są jednorodne czy niejednorodne; a co najważniejsze 3) brakowało odpowiednich danych przy $\text{pH} \rightarrow \text{pI}$. We współpracy z trzema ekspertami w tej dziedzinie (R. Campbell, E. Schneck i E. Scoppola) zainicjowałem eksperymenty NR z warstwami adsorpcyjnymi BLG o stałej sile jonowej ($c_{\text{buff}} = 10 \text{ mM}$) i różnym pH (3, 5 oraz 7) dla różnych stężeń BLG. Oczekiwano, że takie zmiany w składzie roztworu spowodują tworzenie monowarstw lub wielowarstw, jak mogły wynikać z analizy przedstawionej powyżej. Wyniki przedstawiono schematycznie w Rys. 9 i zostaną omówione poniżej.



Rys. 9. Struktura warstw adsorpcyjnych β -laktoglobuliny na powierzchni W/A przy różnych warunkach pH i stężenia. ^{H7} (a) monowarstwy przy pH 3 i 7 oraz elektroneutralnych (pH 5). (b) Dwuwarstwy przy pH 5. Wykresy po prawej stronie przedstawiają profile frakcji wolumenowej $\Phi(z)$ ocenione na podstawie danych eksperymentalnych NR (wyjaśnione szczegółowo w artykule [H7]); FWHM to szerokość połowkowa rozkładów Gaussa dostarczających wartości grubości monowarstwy d' , a d to rzeczywista grubość fizyczna uwzględniająca rozkład materii niejednorodnej; d_2 to grubość warstwy wtórnej.

Z podsumowania powyższych danych literaturowych^{24cd,26b,63-66} wynika, że podane wartości grubości badanych warstw adsorpcyjnych BLG różnią się w zakresie od 1.7 nm do 4.0 nm w zależności od c , I oraz pH ($\text{pH} \neq \text{pI}$). Wspólną cechą wszystkich tych wyników jest to, że ich interpretacja sugeruje jednowarstwową strukturę na powierzchni W/A (Rys. 9a). Niestety obserwowanych zmienności wartości d nie można uporządkować w ściśle określone trendy zgodnie z zmiennością danych czynników determinujących, ponieważ w różnych badaniach (lub nawet w jednym i tym samym doniesieniu literaturowym) stwierdzano istnienie stosunkowo dużych różnic w grubości monowarstwy dla bardzo podobnych (lub nawet takich samych) składów roztworów BLG. Na przykład w roztworach bez soli o pH 2, 2.6 oraz 7 i dowolnym stężeniu w zakresie 27–270 μM , wartości d oscylowały między 1.7 nm oraz 3.3 nm bez korelacji ze zmianami c lub/i pH.^{26b,66} Ten zakres d jest znacznie szerszy niż zwykle odchylenie standardowe ($< 1 \text{ nm}$) w eksperymentach NR i faktycznie utrudnia interpretację wyników w odniesieniu do rozwijania globulek BLG po adsorpcji na powierzchni W/A. Pragnę tutaj przypomnieć, że w środowisku roztworu średnica kulki BLG i krótka oś dimeru to $D = 3.5 \text{ nm}$. Stąd, $d = 3.3 \text{ nm}$ oznaczałoby znaczące zachowanie natywnej globularnej struktury BLG po adsorpcji (jako monomer lub dimer adsorbowany swoją krótką osią prostopadle do powierzchni), podczas gdy $d = 1.7 \text{ nm}$ oznaczałoby (częściowe) indukowane powierzchnią rozwijanie i rozciąganie globulek na powierzchni W/A.

Ten drugi scenariusz, sugerowany we wcześniejszej literaturze,^{9-11,13-19} został potwierdzony wynikami w artykule [H7], gdzie stwierdzono, że wartość $d = 1.6 \pm 0.2$ nm dla monowarstw BLG przy pH 3 lub pH 7 i stężeniu BLG do $c = 10 \mu\text{M}$ (Rys. 9a). Grubość tej warstwy jest doskonale zgodna z uzyskanymi niezależnie przez grupę Fischera i współpracowników $d = 1.4\text{--}2.0$ nm (przy pH 3.2, 3.6, 6.6 oraz 7) zgłoszonymi we wcześniejszych,⁶⁵ równoległychⁱ oraz późniejszychⁱⁱ badaniach w odniesieniu do artykułu [H7]. Należy podkreślić, że te eksperymenty NR, jak i nasze badania, zostały wykonane w D₂O jako fazie wodnej, co gwarantuje wyższą dokładność pomiarów w porównaniu z tradycyjnymi pomiarami w wodzie z kontrastem powietrza jak wykonano w wyżej omówionych pracach.^{24cd,26b,63,64,66}

Pragnę zwrócić uwagę na nowatorski charakter wyników uzyskanych w artykule [H7], który dotyczy w szczególności danych przy pH 5. Co ciekawe, jednowarstwową lub wielowarstwową strukturę warstw adsorpcyjnych BLG można uzyskać przy pH 5 w zależności od stężenia BLG. Przy $c = 100$ nM stwierdzono występowanie monowarstwy ($d = 1.4$ nm), podczas gdy przy $c = 10 \mu\text{M}$ obecność bardziej skomplikowanej struktury dwuwarstwowej, odpowiadającej bimodalnemu rozkładowi ułamka objętościowego $\Phi(z)$ (patrz Rys. 9b). Wyniki te zostały uwzględnione w rozważaniach teoretycznych w artykule [H9] (patrz Rys. 6 oraz odpowiednie omówienie). W artykule [H7] znajdują się dwa główne punkty, o istotnym, nowatorskim wpływie na naukę i istniejący stan wiedzy, którym jest:

- o Odkrycie, że cienka monowarstwa elektrycznie neutralna może być wytwarzana przy pH 5 $\rightarrow$ pI jest nowością w literaturze. Jednak taka monowarstwa jest obserwowana tylko przy „niskich” stężeniach BLG ($c < c_{\#}$). Moim zdaniem jest to ważne dla ogólnego zrozumienia procesu adsorpcji białek na powierzchni W/A. Taka cienka monowarstwa powstaje z dimerów BLG adsorbujących się z fazy objętościowej roztworu. Oznacza to, że taki dimer odkształca się podczas adsorpcji i najprawdopodobniej dysocjuje na monomery w trakcie lub przed procesem częściowego rozwijania globulek BLG na granicy faz. Stałe szybkości takich „reakcji powierzchniowych” są obecnie nieznane. Hipoteza dysocjacji dimeru BLG na powierzchni W/A jest uzasadniona, jak sugerował wcześniej Mackie i in.⁶⁷ Siłą napędową dimeryzacji BLG w roztworze jest efekt hydrofobowy,ⁱⁱⁱ co oznacza, że wewnętrzny obszar kontaktu pomiędzy monomerami w dimerze jest silnie hydrofobowy i podatny na kontakt z hydrofobową powierzchnią rozdziału.
- o Przy $c > c_{\#}$ (pH 5 $\rightarrow$ pI), na powierzchni W/A tworzy się dwuwarstwa elektrycznie neutralna. Jak stwierdzono powyżej, taką dwuwarstwową strukturę uzyskuje się poprzez przejściowy etap adsorpcji dimerów, które są początkowo nieuporządkowane na powierzchni. Jednak z artykułu [H7] wynika, że po pewnym czasie struktura rozluźnionej warstwy międzyfazowej BLG zawiera monowarstwę pierwotną o grubości porównywalnej z jakąkolwiek inną monowarstwą BLG prezentowaną na Rys. 9b. Oznacza to, że rozwijanie i rozciąganie globul BLG na powierzchni W/A jest korzystne, co z termodynamicznego punktu widzenia powinno odpowiadać stanowi minimalnej swobodnej energii międzyfazowej. Ten fakt z kolei dodatkowo wspiera hipotezę, że dimery BLG dysocjują po adsorpcji. W konsekwencji wysokie stężenie BLG powoduje dalszą akumulację dimerów BLG pod podstawową monowarstwą. Dimery te nie doświadczają bezpośredniego wpływu powierzchni W/A i zachowują swoją strukturę typową dla objętości roztworu. Siły

ⁱ Bertsch P i in. [Soft Matter 2019,15,6362](#).

ⁱⁱ Bergfreund J i in. [Soft Matter 2021,17,1692](#).

ⁱⁱⁱ Sakurai K et al. [Prot Sci 2001,10,2325](#).

napędowej „adsorpcji” dimerów na monowarstwie pierwotnej nie można jednoznacznie określić na podstawie istniejących wyników – najprawdopodobniej adsorpcja związana jest z oddziaływaniami hydrofobowymi. Grubość warstwy wtórnej ($d_2 \approx 5.5$ nm) jest pośrednia pomiędzy długościami krótkiej i długiej osi (odpowiednio 3.5 nm i 6.9 nm) dimeru, co sugeruje, że struktura molekularna tak luźnej podwarstwy składa się nieuporządkowanych dimerów.

W artykułach [H2,H9] opisano wyniki badań nad powstawaniem warstwy wtórnej przy $\text{pH} \neq \text{pI}$, ale niestety nie udało się zweryfikować tego zjawiska eksperymentami NR. Pomiary przy stosunkowo wysokich stężeniach BLG ($c^{\text{pH}7} = 100 \mu\text{M} > c_{\#}^{\text{pH}7}$ i $c^{\text{pH}3} = 200 \mu\text{M} > c_{\#}^{\text{pH}3}$) rzeczywiście przeprowadzono i uzyskano wartości Γ (które były niezwykle ważne dla analizy teoretycznej w artykule [H9]). Niestety, ze względu na problemy techniczne na linii neutronowej zmierzone dane dotyczące rozpraszania neutronów dla roztworów D_2O były niedostatecznej jakości i nie pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych profili ułamka objętościowego $\Phi(z)$ potrzebnych do rozwiązania struktury międzyfazowej.

❖ **Artykuł [H7] dostarczył nowych i szczegółowych informacji na temat struktury molekularnej warstw adsorpcyjnych BLG na powierzchni W/A w zależności od pH. Jest oczywiste, że tworzenie gęstej monowarstwy na powierzchni W/A jest ogólną cechą zachowania adsorpcyjnego BLG. Powstawanie warstwy wtórnej najwyraźniej wpływa tylko w niewielkim stopniu na właściwości monowarstwy.**

Te odkrycia były kluczowe dla interpretacji wyników eksperymentów z filmami piankowymi i piankami, które omówiono poniżej.

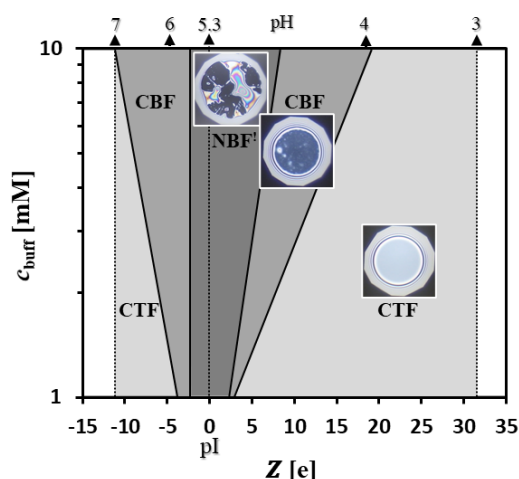
4.3.4.4. Cienkie filmy piankowe i pianki stabilizowane β -laktoglobuliną

TLF w roztworze białka jest stabilizowany przez odpychające elektrostatyczne ciśnienie rozdzielające Π_{el} , gdy powierzchnie filmu są naładowane elektrycznie ($\text{pH} \neq \text{pI}$), a wielkość Π_{el} może być modulowana przez zmianę warunków rozpuszczalnika pH i/lub I , jak pokazano w badaniach fragmentarycznych, gdzie uzyskano CTF lub CBF.^{43a-c,45,46,48} Ten mechanizm stabilizacji został zademonstrowany w artykule [H3] dla filmów piankowych w roztworach BLG, poprzez szczegółowe pomiary zależności grubości h_w od pH oraz c_{buff} przy stałym stężeniu białka i ciśnieniu kapilarnym (odpowiednio $h_w(\text{pH})_{c,P,c_{\text{buff}}}$ oraz $h_w(c_{\text{buff}})_{c,P,\text{pH}}$) dla szerokiego zakresu pH (patrz Rysunek 4 w artykule [H3]). Wyniki wskazują na stopniowy spadek h_w wraz ze zbliżaniem się pH do pI ($c_{\text{buff}} = \text{const}$), co jest zgodne ze zmniejszaniem się Π_{el} na skutek zmniejszenia ładunku powierzchni filmu wraz ze spadkiem $|Z|(\text{pH})$ adsorbujących cząsteczek BLG (patrz Rys. 3a). Uzyskane dane pozwoliły na określenie dokładnych warunków rozpuszczalnikowych wymaganych do tworzenia różnych typów filmów w zależności od ich grubości. Rys. 10 przedstawia diagram stanów w przestrzeni parametrów $\{Z(\text{pH}), c_{\text{buff}}\}_{c,P_c}$ skonstruowany zgodnie z grubością równowagową $h_w(\text{pH})$ badanych filmów piankowych. Wartości $Z(\text{pH})$ oszacowano na podstawie danych z Rys. 3a.⁵⁴

❖ **Wyniki w artykule [H3] dostarczają bezpośredniego eksperymentalnego dowodu, że Π_{el} w filmach piankowych w roztworach BLG jest determinowany przez zależne od pH wielkość ładunku elektrycznego netto białka $|Z|$ w roztworze i jest modulowane przez efekt ekranowania stężenia elektrolitu.**

Oczywistym jest, że najcieńszy NBF można uzyskać nie tylko ściśle przy pI, ale w wąskim zakresie pH wokół pI, a zakres ten poszerza się w pewnym stopniu wraz ze wzrostem mocy ekranowania elektrolitu, co jest

jakościowo zgodne z teorią DLVO. NBF są niestabilne, najwyraźniej dlatego, że zastosowane stężenie BLG jest poniżej krytycznego stężenia c_{BF} wymaganego do uzyskania stabilnego NBF z BLG przy zastosowanym eksperymentalnym Π (później w artykule [H8], stwierdziłem, że $10 \mu\text{M} < c_{BF} < 30 \mu\text{M}$). Należy zauważyć, że użyty tutaj termin „stabilność” jest zdefiniowany przez czas życia filmu przy danym $\Pi = \text{const}$.



Rys. 10. Diagram stanów w przestrzeni parametrów $\{Z(\text{pH}), c_{\text{buff}}\}_{c,P_c}$ dla filmów piankowych z roztworów β -lactoglobulinu ($c = 10 \mu\text{M}$), uzyskany w celce „Scheludko” przy $P_c \approx 100 \text{ Pa}$. Na wykresie przedstawiono także mikrografie różnych rodzajów filmów piankowych. Legenda:

CTF – cienki film zwykły ($h_w > 30 \text{ nm}$),

CBF – czarny film zwykły ($h_w < 30 \text{ nm}$),

NBF – czarny film Newtona ($h_w = 6.5 \pm 0.5 \text{ nm}$);

Grubość ekwiwalentna h_w obliczona ze współczynnikiem załamania światła filmu równym współczynnikowi rozpręgnięcia roztworu wodnego ($n \approx 1.33$).

¹ Niestabilne filmy o krótkim czasie życia (1–2 min).

Pianki w praktyce są zwykle polidyspersyjne, a pęcherzyki o różnej wielkości determinują różne lokalne ciśnienia kapilarne w piance. W takiej sytuacji indywidualne cienkie filmy w piance występują w różnych warunkach ciśnienia. Pod tym względem izoterma ciśnienia rozłączającego $\Pi(h_w)$ dla danej TLF dostarcza najważniejszych informacji, ujawniając zmienność grubości filmu z Π oraz ogólną stabilność cienkiego filmu pod względem krytycznego ciśnienia rozdzielającego Π_{cr} pęknięcia filmu. W dalszej części termin „stabilność filmu” będzie używany zgodnie z definicją Π_{cr} .

Jeśli chodzi o stabilność pianki, to stabilność TLF – a nie jego grubość – wydaje się być ważniejszym czynnikiem. Na przykład, Wierenga i in. (2009)⁴⁸ wykazali, że izotermy $\Pi(h_w)$ dla filmów piankowych z różnych pochodnych lizozymu praktycznie się pokrywają, ale zmierzone wartości Π_{cr} były zupełnie inne! Ponadto w innym moim badaniu^{B20} wykazano, że stabilność filmy BLG modulowana obecnością jonów Ca^{2+} , determinuje stabilność odpowiednich pianek. Dlatego, aby wyjaśnić wpływ pH na stabilność pianek BLG, w artykule [H8] wykonałem pomiary Π_{cr} dla CBF oraz NBF otrzymanych z roztworów BLG o różnym pH ($c_{\text{buff}} = \text{const} = 10 \text{ mM}$), dla dwóch stężeń białka $10 \mu\text{M}$ (jak na Rys. 10) i $100 \mu\text{M}$. Jeśli chodzi o wyższe stężenie BLG, które jest bardziej istotne w zastosowaniach pianek, w artykułach [H3,H8] należy podkreślić kilka głównych obserwacji:

- o Izotermy ciśnienia rozłączającego $\Pi(h_w)$ wykazały, że: 1) CTF (przy „niskim” c_{buff}) wycieka do CBF, który pęka bez tworzenia NBF; 2) CBF (przy „wysokim” c_{buff}) wycieka do NBF, którego stabilność jest silnie zależna od pH.
- o Stabilność NBF jest wyjątkowo niska przy pH 3, pośrednia przy pH 4 oraz pH 5, a najwyższa przy pH 6 oraz pH 7.
- ❖ **Najwyraźniej zależny od pH trend stabilności czarnych filmów piankowych w roztworach BLG jest koncepcyjnie różny od odpowiednich trendów dla wielu parametrów międzyfazowych warstw adsorpcyjnych BLG, które wykazują ekstremalne wartości w warunkach zbliżonych do pI!**
- ❖ **Artykuł [H8] ujawnił, że trend stabilności pianek z BLG zależny od pH koreluje bardzo dobrze z trendem dla filmów piankowych, tzn. stabilność piany wzrasta wraz ze wzrostem pH w taki sam**

sposób jak stabilność filmu – taka korelacja w przypadku filmów piankowych i pianek z białek została po raz pierwszy bezpośrednio udokumentowana w literaturze.

Niezależne badania nad wpływem pH na właściwości i stabilność filmów piankowych oraz pianek z roztworów BLG przeprowadził Lech i in. (2016).⁶⁸ Badanie to wykazało bardzo zbliżone wyniki dotyczące stabilności pianek BLG do przedstawionego w artykule [H8]. Co ważne, autorzy podkreślili, że stabilność pianek przy pH 3 jest nadal bardzo niska, nawet dla stężenia BLG tak wysokiego jak $c \approx 1100 \mu\text{M}$ ($\approx 2\%$ w/w). Dla porównania, stabilność tych pianek jest znacznie niższa niż stabilność pianki przy prawie dwóch rzędach wielkości niższym stężeniu BLG, ale przy pH 7. Stąd, słaba zdolność BLG do stabilizacji pianek i filmów piankowych przy pH 3 okazuje się cechą ogólną. Jednak, chociaż Lech i in. bardzo szczegółowo badali pianki BLG i mierzyli grubość odpowiadających im filmów piankowych (przy niskich ciśnieniach kapilarnych w celce „Scheludko”), nie monitorowali Π_{cr} i stąd nie potrafili wyjaśnić przyczyn obserwowanych znaczących różnic w stabilności piany w zależności od pH.

Mając na uwadze zakres ciśnień kapilarnych w piankach BLG, określony typowymi średnimi rozmiarami pęcherzyków piany,^{68,i} w piance otrzymanej z roztworu BLG o dowolnym pH w zakresie 3–7 i sile jonowej co najmniej 10 mM, oczekuje się, że większość filmów piankowych pomiędzy pęcherzykami będzie miała charakter NBF (jak pokazano w artykule [H8]). Dlatego też przyczyny obserwowanych dużych różnic stabilności pianek wywołanych przez pH powinny być związane ze stabilnością NBF. Analiza stabilności NBF z białek nie jest trywialnym zadaniem. Na przykład stabilność dwuwarstw amfifilowych (NBF oraz dwuwarstwowych błon lipidowych) tworzonych przez „małe” molekuly amfifilowe została opisana przez teorię zarodkowania dziur, która wiąże stabilność NBF ze stężeniem cząsteczek.⁴⁰ Zgodnie z moją najlepszą wiedzą, teoria ta nie została zastosowana do NBF z makrocząsteczek, co jest zrozumiałe, biorąc pod uwagę bardziej złożoną dynamikę międzyfazową makrocząsteczek.

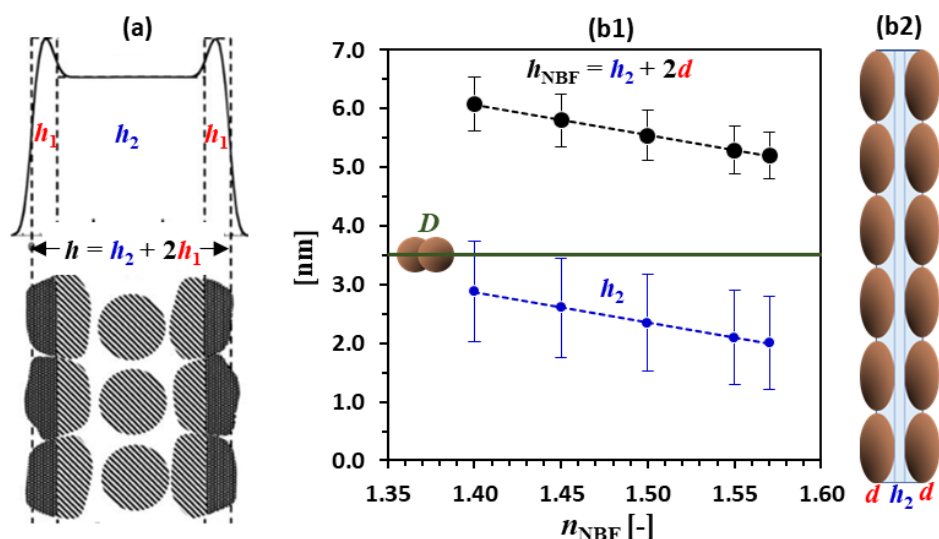
Wgląd w przyczyny niezwyklego wpływu pH na stabilność BLG-NBF można uzyskać, rozpatrując jego strukturę na poziomie molekularnym. Najbardziej informacyjnym parametrem do tego celu jest grubość filmu.

Benattar i współpracownicy (2003, 2006)⁶⁹ wykorzystali pomiary odbicia promieniowania rentgenowskiego na powierzchni pionowego makroskopowego filmu piankowego umieszczonego w ramie i zmierzili grubość takiego filmu otrzymanego z roztworów BLG o pH 5.3. Autorzy twierdzili, że otrzymany film czarny jest NBF, a jego całkowita grubość wynosi $h \approx 11.3 \text{ nm}$ ($c \approx 14 \mu\text{M}$)^{69a} lub $h \approx 15.2 \text{ nm}$ ($c \approx 55 \mu\text{M}$)^{69b} jak zmierzono w dwóch oddzielnych badaniach. Wyniki te wykazały, że badane czarne filmy składają się z dwóch równoważnych cienkich płytek ($h_1 \approx 1.3 \text{ nm}$) wyśrodkowanych na powierzchniach filmu oraz płytki rdzenia o znacznie większej grubości h_2 (Rys. 11a): $h_2 \approx 8.7 \text{ nm}$ ^{69a} lub $h_2 \approx 12.6 \text{ nm}$ ^{69b}. Różnica między tymi dwoma ostatnimi wartościami jest porównywalna z wielkością kulki BLG w roztworze, dlatego interpretacja tych wyników grubości filmu pod kątem struktury molekularnej czarnego filmu nie może być jednoznaczna.

Delahaije i in. (2013)⁵⁰ podali zakres grubości wynoszący 5–9 nm dla NBF otrzymanego z roztworów BLG o pH 7 i przy 100 mM NaCl zmierzony techniką „Mikrointerferometrii”. Niestety autorzy nie podali wartości współczynnika załamania światła użytego do oceny grubości filmu. Jednak niezależnie od skali bezwzględnej, względna różnica w tych wartościach grubości jest szersza niż typowe odchylenie standardowe ($<1 \text{ nm}$) tej

ⁱ Lexis M, Willenbacher N. [Colloids Surfaces A 2014,459,177.](#)

techniki, ale autorzy nie skomentowali tej kwestii. Ponownie, taka zmienność grubości filmu jest porównywalna z wielkością kulki BLG w roztworze, co utrudnia interpretację wyników.



Rys. 11. Czarne filmy piankowe z roztworów β -laktoglobuliny w warunkach zbliżonych do pI. **(a)** pomiary odbicia promieniowania rentgenowskiego w celu wyznaczenia całkowitej grubości h pionowego makroskopowego filmu piankowego w ramie (pH 5.3);⁶⁹ $h_1 \approx 1.3$ nm, $h_2 \approx 8.7$ nm^{69a} lub $h_2 \approx 12.6$ nm^{69b}. **(b1)** Zmienność grubości h_{NBF} mikroskopijnego poziomego NBF (pH 5) obliczona jako funkcja współczynnika załamania światła n_{NBF} na podstawie pomiarów interferometrycznych ekwiwalentnej grubości filmu $h_w \approx h_{\text{NBF}}$; linia pozioma wskazuje długość krótkiej osi dimeru D ; $d = 1.6 \pm 0.2$ nm to grubość warstwy adsorpcyjnej (artykuł [H7]); słupki błędów (± 0.8 nm) w danych dla h_2 awierają odchylenia standardowe zarówno dla h_w jak i d . **(b2)** Najbardziej prawdopodobna struktura BLG-NBF zgodnie z danymi w (b1).

Poniżej szczegółowo omówię dotychczasowe wyniki dotyczące struktury czarnych filmów piankowych z BLG. Należy zauważyć, że poniższa analiza nie była dotychczas publikowana i opiera się na grubościach warstw adsorpcyjnych podanych w artykule [H7] (2019). Nowe wnioski z tej analizy są zawarte w nadchodzącym artykule przeglądowym autorstwa Gocheva i in. (2022)ⁱ poświęconym zachowaniu BLG na granicy faz.

Zmierzona interferometrycznie grubość BLG-NBF opisana w artykule [H3] (2014) wynosi $h_{\text{NBF}} = 6.0 \pm 0.4$ nm jak obliczono przy użyciu współczynnika załamania światła $n_{\text{NBF}} = 1.40$. W artykule [H7] komentowano, że współczynnik załamania światła warstw adsorpcyjnych BLG jest najwyraźniej wyższy przy wartości granicznej $n \approx 1.57$ (w H_2O). Zakłada się, że NBF ma zwartą strukturę, która jest ściśle ograniczona między powierzchniami filmu.³⁸⁻⁴⁰ Dlatego można założyć, że NBF ma jednorodny współczynnik załamania światła,⁵⁰ który w przypadku BLG-NBF jest wyraźnie ograniczony w zakres $1.40 < n_{\text{NBF}} \leq 1.57$, a zatem odpowiednia zmiana grubości filmu wynosi $6.0 > h_{\text{NBF}} \geq 5.2$ (Rys. 11b1).

Basheva i in. (2011ab)⁴⁹ stwierdzili, że NBF z globularnego białka hydrofobiny ma grubość ≈ 6 nm, co zinterpretowano jako wartość odpowiadającą dwuwarstwie cząsteczek hydrofobiny. W artykule [H3] również założyłem, że BLG-NBF jest dwuwarstwą białkową. Jednak po stwierdzeniu, że grubość heterogenicznej warstwy adsorpcyjnej BLG przy pH 5 wynosi $d \approx 7$ nm (artykuł H7), staje się oczywiste, że struktura BLG-NBF jest inna niż hipotetyczna struktura składająca się po prostu z dwóch takich warstw adsorpcyjnych sklejonych ze sobą.

ⁱ Gochev, G., Miller, R., Braunschweig, B. β -Lactoglobulin adsorption layers at liquid interfaces. *Zostanie przesłany do Adv Colloid Interface Sci* 2022.

❖ Z tego względu postawiłem hipotezę, że tworzenie BLG-NBF odbywa się poprzez wypychanie dimerów z luźnych warstw wtórnych z wnętrza filmu i późniejszą wzajemną kohezję gęstych pierwotnych monowarstw, które są nieodwracalnie adsorbowane na powierzchniach filmu.

W artykule [H3] wykazałem, że powstawanie BLG-NBF charakteryzuje się działaniem silnych kohezyjnych oddziaływań między powierzchniami filmu – gdy czarne plamy NBF pojawiają się w całym filmie o niejednorodnej grubości, progresywnie rozszerzają się, usuwając wszelkie grubsze części filmu.ⁱ Takie siły kohezyjne zostały również udowodnione w przypadku NBF z hydrofobiny.⁴⁹ Pochodzenie tych kohezyjnych oddziaływań jest działaniem silnego przyciągającego ciśnienia rozłączającego van der Waalsa Π_{vw} przy małych grubościach filmu odpowiadających minimum pierwotnemu w izotermie ciśnienia rozłączającego DLVO.^{3b,4,36,38,40a} Dlatego powyższa hipoteza wydaje się uzasadniona. Ponadto, jeśli ta hipoteza jest prawdziwa, wówczas BLG-NBF powinien mieć strukturę składającą się z dwóch monowarstw, a zatem grubość takiej dwuwarstwy nie powinna przekraczać 4 nm. Oczywiście tak nie jest. W takim razie, odejmując grubość dwóch monowarstw ($2d \approx 3.2 \pm 0.4$ nm) od grubości NBF otrzymujemy grubość rdzenia filmu $h_2 = 2.9\text{--}2.0 \pm 0.8$ nm w zależności od niepewności związanej ze współczynnikiem załamania światła $n_{NBF} = 1.4\text{--}1.57$ (Rys. 11b1). Oczywiście grubość rdzenia filmu jest prawdopodobnie mniejsza niż średnica monomeru (lub krótsza oś dimeru) $D = 3.5$ nm.

Badania NBF z „małych” surfaktantów wykazały, że rdzeń takiej dwuwarstwy składa się z bardzo cienkiej warstwy cząsteczek wody i jonów pierwotnie obecnych w roztworze filmotwórczym. Jednak stan takiego ściśniętego „roztworu elektrolitu” różni się od stanu makroskopowej fazy objętościowej tego samego roztworu. Zakłada się, że taki ściśnięty „roztwór elektrolitu” ma strukturę ciekłokrystaliczną składającą się z uwodnionych jonów. Silne odpychające Π_{st} bliskiego zasięgu – które faktycznie stabilizuje NBF w stosunku do sił kohezji – przypisuje się wysokiej energii swobodnej potrzebnej do usunięcia wody hydratacyjnej z NBF.³⁸ Oszacowano, że grubość rdzenia NBF mieści się w zakresie $h_2 = 0.4\text{--}2$ nm dla filmotwórczych roztworów surfaktantów zawierających jednowartościowe sole alkaliczne (NaCl, LiCl, NaBr).^{38,39} Badany tutaj układ BLG zawiera większe jony buforowe, dlatego można założyć, że rdzeń BLG-NBF ma grubość rzędu górnej części z wyżej wymienionego zakresu grubości, a nawet większą. Rzeczywiście, szacowaną grubość rdzenia można rozsądnie przyjąć jako grubość ciekłokrystalicznego „roztworu buforowego” wolnego od cząsteczek białka..

O ile wyniki Delahaije i in.⁵⁰ lepiej zgadzają się z moją analizą, o tyle wyniki Benattara i współpracowników⁶⁹ pokazują uderzającą różnicę. Grubości czarnego filmu – który ostatni autorzy określają jako NBF – są dość duże, 3–4 razy większe niż wymiary kulki BLG. Pierwsza wartość (≈ 11.3 nm)^{69a} mogłaby być w jakiś sposób zaakceptowana jako odpowiadająca strukturze trzech listków cząsteczek BLG, które są w natywnym stanie kulistym (co jest mało prawdopodobne dla cząsteczek zaadsorbowanych na powierzchni filmu) i posiadają ciekłokrystaliczny roztwór elektrolitu pomiędzy nimi. Druga wartość (≈ 15.2 nm)^{69b} wydaje się po prostu niewystarczająca do opisu NBF z kuleczek białkowych o takich wymiarach. Ponieważ autorzy twierdzą, że zgodnie ze zmierzonymi profilami gęstości elektronowej w rdzeniu filmu nie ma wolnej wody, te czarne filmy nie są CBF (jak oczekiwano ze względu na brak Π_{el}). Z drugiej strony jest oczywiste, że te czarne filmy nie są typowymi NBF (dwuwarstwy). Jest bardzo prawdopodobne, że rdzeń takich filmów ma strukturę stratyfikowaną składającą się z oddzielnych listków natywnych dimerów BLG, które z jakiegoś powodu nie zostały usunięte z

ⁱ Wideo “[β-lactoglobulin NBF \(pH 5, 10 μM\)](#)”

filmu podczas jego wyciekania. Rzeczywiście, taka struktura stratyfikowana została znaleziona dla czarnych filmów z hydrofobiny, ponieważ grubość listków stratyfikacji jest porównywalna z wymiarami molekularnymi hydrofobiny.⁴⁹ W tym samym świetle, czarne filmy BLG badane przez Benattara i współpracowników mogą być filmami stratyfikowanymi zawierającymi dwa ($h_2 \approx 8.7$ nm)^{69a} lub trzy ($h_2 \approx 12.6$ nm)^{69b} listki stratyfikacyjne natywnych cząsteczek BLG. Kończąc dyskusję na tym stanie wiedzy należy stwierdzić, że kwestię ta pozostaje otwarta, ponieważ jej wyjaśnienie wymaga dalszych szczegółowych badań eksperymentalnych. W moich badaniach czarne filmy BLG najwyraźniej osiągają najcieńszy stan, który można określić jako NBF.

- **BLG-NBF ma całkowitą grubość 5–6 nm, a jego strukturę opisują trzy płytki składające się z dwóch warstw adsorpcyjnych rozwiniętych kuleczek na powierzchni filmu i centralnego rdzenia z ciekło-krystalicznego roztworu buforowego (Rys. 11b2).**

Izotermy ciśnienia rozłączającego $\Pi(h_w)$ dla filmów piankowych z BLG przy dowolnym pH ujawniają powstawanie NBF (artykuł [H3]); przy $pH \neq pI$ tworzenie NBF następuje po pokonaniu bariery ciśnienia elektrostatycznego (określonego przez Π_{el}). Stabilność BLG-NBF determinuje stabilność odpowiednich pianek, ponieważ oba te układy są w dużym stopniu zależne od pH (artykuł [H8]).

4.3.5. Podsumowanie

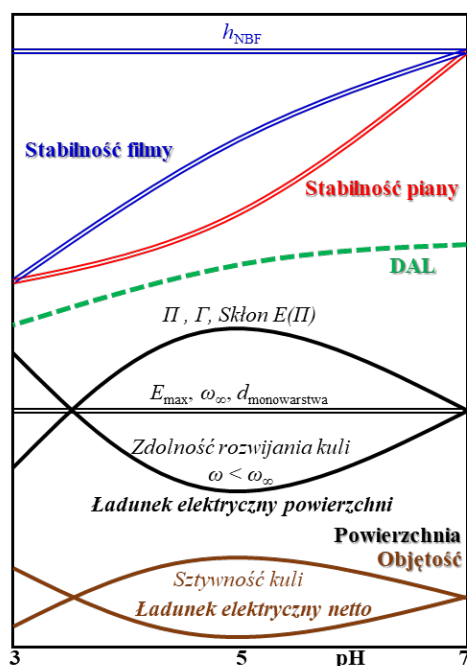
Historyczny rozwój tematu białek na granicy faz ciecz/gaz do 2011 roku pokazuje, że obserwowany wpływ pH na właściwości międzyfazowe białek jest słabo rozumiany, zwłaszcza na poziomie molekularnym. W literaturze powszechnie przyjmowano, że dane białko osiąga najwyższą aktywność powierzchniową w pobliżu pI , co skutkuje maksymalnym pokryciem powierzchni i grubymi warstwami międzyfazowymi, które miały być wystarczającym warunkiem do wytworzenia najbardziej stabilnej piany dla danego białka, w odniesieniu do zmian pH. Przedstawiona rozprawa habilitacyjna koncentruje się na wyjaśnieniu, w jaki sposób pH wpływa na mechanizmy stabilizacji pianek z modelowego białka BLG oraz na potwierdzeniu lub uzasadnieniu tej zasady. Badania eksperymentalne i teoretyczne wyjaśnione w powiązanych artykułach składających się na osiągnięcie naukowe [H1–H9] dostarczyły następujących informacji o charakterze nowatorskim:

- Za pomocą rozległych eksperymentów wykazałem, że cząsteczkowy ładunek elektryczny netto $|Z|(pH)$ kuleczek BLG w roztworze jest głównym czynnikiem, który determinuje właściwości odpowiednich warstw adsorpcyjnych na granicy faz W/A roztworu [H2,H4-H7,H9] oraz grubość cienkich filmów piankowych.
- Wykazałem, że przyjęta *a priori* korelacja między stanem naładowania warstwy adsorpcyjnej białka a $Z(pH)$ została bezpośrednio udowodniona w przypadku BLG za pomocą czułych pomiarów spektroskopowych [H2].
- Wykazałem, że równanie stanu warstw adsorpcyjnych BLG jest silnie zależne od $|Z|(pH)$ [H9], a fakt ten można uznać za mający fundamentalne znaczenie.
- Wykazałem, że rozwijanie się globulek BLG po adsorpcji jest silnie zależne od $|Z|(pH)$ i koreluje z zwartością globulek w środowisku objętościowym roztworu [H9].
- Strukturę molekularną warstw adsorpcyjnych BLG rozwiązałem z rozdzielczością subnanometryczną, ujawniając że heterogeniczne warstwy międzyfazowe BLG mają dyskretną strukturę wielocząsteczkową [H7].

- Wykazałem, że tworzenie podwarstwy wtórnej może zachodzić nie tylko przy $\text{pH} \rightarrow \text{pI}$, ale również przy $\text{pH} \neq \text{pI}$, a moduł dylatacyjny E może być dogodnie wykorzystany do detekcji tego zjawiska [H1,H9].
- Udowodniłem, że podstawowa monowarstwa ma grubość ≈ 1.6 nm, która jest praktycznie niezależna od pH [H7]!
- Udowodniłem, że wtórna podwarstwa nie odgrywa roli w tworzeniu i strukturze BLG-NBF [H3]!
- Wykazałem, że BLG-NBF ma grubość 5–6 nm i składa się z dwóch przylegających monowarstw BLG oddzielonych roztworem elektrolitu ciekłokrystalicznego [analiza niepublikowana].
- Wykazałem, że stabilność BLG-NBF określa stabilność pianki BLG [H8].

Należy podkreślić, że ustalenie współzależności dobrze skorelowanych stabilności filmów piankowych i pianek z właściwościami warstw adsorpcyjnych okazuje się skomplikowane. Wahania molekularnego ładunku netto BLG $|Z|(\text{pH})$ prowadzą do różnych trendów monitorowanych zależności pH wielu badanych parametrów. Niektóre z tych zależności zostały schematycznie zilustrowane na Rys. 11 (rysunek zawiera również informacje o niektórych właściwościach BLG w środowisku objętościowym roztworu). Ustalono trzy główne typy trendów zależnych od pH:

- ✓ **Trendy niemonotoniczne.** Takie zależności pH są typowe dla większości właściwości warstw adsorpcyjnych i wykazują ekstremum przy pI (elektrononeutralne warstwy adsorpcyjne BLG) [H2,H5-H7,H9].
- ✓ **Trendy monotoniczne.** Takimi zależnościami od pH są te charakteryzujące tworzenie się DAL na powierzchni wznoszącego się pęcherzyka w roztworze BLG [H4], a także te dotyczące stabilności cienkich filmów i pianek [H3,H8].
- ✓ **Co zaskakujące, kilka kluczowych parametrów zachowuje się praktycznie niezależnie od pH.** Do tych parametrów należą E_{max} , ω_{∞} i $d_{\text{monolayer}}$ (charakteryzujące nasyconą monowarstwę adsorpcyjną), jak również grubość h_{NBF} filmu BLG-NBF.



Rys. 12. Schematyczny wykres trendów zmienności różnych parametrów charakteryzujących właściwości objętościowe i międzyfazowe BLG oraz stabilności pianek i filmów piankowych w funkcji pH. Wykres jest zgodny z zachowaniem BLG przy stężeniach $c > 100$ nM (poza skrzyżowaniem izoterm $\Pi(c)_{\text{pH}}$ i $\Gamma(c)_{\text{pH}}$ przy pH 5 oraz pH 7) które są istotne dla tworzenia pianek i filmów piankowych. E_{max} oraz ω_{∞} odnoszą się odpowiednio do maksymalnego modułu dylatacyjnego i minimalnego obszaru na cząsteczkę, przy czym oba odpowiadają nasyconej monowarstwie o grubości $d_{\text{monowarstwa}}$.

Ten rozstrzygający przegląd pokazuje, że wyjaśnienie wzajemnych zależności pomiędzy badanymi właściwościami fizykochemicznymi układów w hierarchicznym łańcuchu *powierzchnia W/A – cienki film piankowy – pianka* nie jest proste. Okazuje się, że badania dotyczące tylko powierzchni międzyfazowych W/A z zaadsorbowanymi białkami mogą być niewystarczające do pełnego opisu (i możliwości przewidywania) stabilności odpowiednich pianek białkowych. W tym zakresie kluczowa jest wiedza na temat właściwości i stabilności odpowiednich cienkich filmów piankowych, o czym świadczy bardzo dobra korelacja stabilności filmów piankowych i pianek [H8].

5. Bibliografia

- 1 Plateau JAF. *Statique experimentale et theoryque des liquides soumis aux seules forces moleculaires* (Eng.: [Experimental and theoretical statics of liquids subject to molecular forces only](#)); Paris, Gauthier - Villars; London, Trübner & Co.; Gand et Leipzig: F. Clemm.; **1873**.
- 2 Lyklema H (Editor) *Fundamentals of interface and colloid science*; Academic Press:
 - ^a Vol. I: *Fundamentals*, **1991**;
 - ^b Vol. II: *Solid-liquid interfaces*, **1995**;
 - ^c Vol. III: *Liquid-fluid interfaces*, **2000**;
 - ^d Vol. IV: *Particulate colloids*, **2005**;
 - ^e Vol. V: *Soft colloids*, **2005**.
- 3 ^a Bikerman JJ. [Foams](#). Springer, **1973**;
- ^b Exerowa D, Kruglyakov PM. [Foam and foam films](#). Elsevier, **1998**;
- ^c Cantat I et al. [Foams: Structure and Dynamics](#). Oxford University Press, **2013**;
- ^d Pugh R. [Bubble and foam chemistry](#). Cambridge University Press, **2016**.
- 4 Exerowa D, Gochev G, Platikanov D, Liggieri L, Miller R (editors), [Foam films and foams: fundamentals and applications](#); CRC Press, **2018**.
- 5 ^a Gao Z, Zawala J, Kowalczyk PB. Editorial: surface chemistry of flotation. [Front Mater](#) **2020**,*7*,595146;
- ^b Parsa M, Trybala A, Malik DJ, Starov V. Foam in pharmaceutical and medical applications. [Curr Opin Colloid Interface Sci](#) **2019**,*44*,153;
- ^c Hoc D, Haznar-Garbacz D. Foams as unique drug delivery systems. [Eur J Pharm Biopharm](#) **2021**,*167*,73.
- 6 ^a Thuman WC, McBain JW, Brown AG. Studies of protein foams obtained by bubbling. [J Am Chem Soc](#) **1949**,*71*,3129;
- ^b Cumper CWN. The stabilization of foams by proteins. [Trans Faraday Soc](#) **1953**,*49*,1360.
- 7 ^a Kinsella JE, Melachouris N. Functional properties of proteins in foods: A survey. [Crit Rev Food Sci Nutr](#) **1976**,*7*,219;
- ^b Hailing PJ, Wasltra P. Protein-stabilized foams and emulsions. [Crit Rev Food Sci Nutr](#) **1981**,*15*,155;
- ^c Zayas JF. [Functionality of Proteins in Food](#); Springer, **1997**, Chapter 3: Emulsifying properties of proteins, Chapter 5: Foaming properties of proteins;
- ^d Damodaran S. Protein stabilization of emulsions and foams. [J Food Sci](#) **2005**,*70*,R54.
- 8 ^a Wierenga PA, Gruppen H. New views on foams from protein solutions. [Curr Opin Colloid Interface Sci](#) **2010**,*15*,365;
- ^b Narsimhan GX, Xiang N. Role of proteins on formation, drainage, and stability of liquid food foams. [Ann Rev Food Sci Technol](#) **2018**,*25*,45.
- 9 du Noüy PL:
 - ^a Spontaneous decrease of the surface tension of serum. [J Exper Med](#) **1922**,*35*,575;
 - ^b A note on the surface viscosity of colloidal solutions. [Science](#) **1925**,*61*,117;
 - ^c *Surface equilibria of biological and organic colloids*. ACS Monograph № 27, The Chemical Catalog Company Inc., **1926**.
- 10 ^a Hughes AH, Rideal EK. On protein Monolayers. [Proc Roy Soc A](#) **1932**,*137*,62.
- ^b Langmuir I, Schaefer VJ. Properties and structure of protein monolayers. [Chem Rev](#) **1939**,*24*,181.
- 11 Neurath H, Bull HB. The surface activity of proteins. [Chem Rev](#) **1938**,*23*,391.
- 12 ^a Macritchie F. Proteins at Interfaces. [Adv Prot Chem](#) **1978**,*32*,283;
- ^b Zhou B, Tobin JT, Drusch S, Hogan SA. Interfacial properties of milk proteins: A review. [Adv Colloid Interface Sci](#) **2020**,*295*,102347;
- ^c Bergfreund J, Bertsch P, Fischer P. Effect of the hydrophobic phase on interfacial phenomena of surfactants, proteins, and particles at fluid interfaces. [Curr Opin Colloid Interface Sci](#) **2021**,*56*,101509.

- 13 James LK, Augenstein LG. *Adsorption of enzymes at interfaces: film formation and the effect on activity*. In: Nord FF (Editor) *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, Wiley, **1966**, vol. 28, pp. 1-40.
- 14 Cumper CWN, Alexander AE:
 - ^a The surface chemistry of proteins. [Trans Faraday Soc 1950,46,235](#);
 - ^b The surface chemistry of proteins. III. The rigidity of adsorbed films at an air-water interface. [Austral J Chem 1952,5,189](#).
- 15 MacRitchie F, Alexander AE. Kinetics of adsorption of proteins at interfaces. *J Colloid Interface Sci.* **1963**,18:
 - ^a Part I, the role of bulk diffusion in adsorption. [453](#);
 - ^b Part II. The role of pressure barriers in adsorption. [458](#);
 - ^c Part III. The role of electrical barriers in adsorption. [464](#);
 - ^d Gonzales G, MacRitchie F. Equilibrium adsorption of proteins. [J Colloid Interface Sci 1970,32,70](#).
- 16 ^a Mitchell J, Irons L, Palmer GJ. A study of the spread and adsorbed films of milk proteins. [Biochim Biophys Acta 1970,200,138](#);
- ^b Adams DJ, Evans MTA, Mitchell JR, Phillips MC, Rees PM. Adsorption of lysozyme and some acetyl derivatives at the air-water interface. [J Polym Sci C: Polym Symp 1971,34,167](#).
- 17 Joos P. Approach for an equation of state for adsorbed protein surfaces. [Biochim Biophys Acta 1975,375,1](#).
- 18 Benjamins J, de Feijter JA, Evans MTA, Graham DE, Phillips MC. Dynamic and static properties of proteins adsorbed at the air/water interface. [Faraday Discuss Chem Soc 1975,59,218](#).
- 19 Graham DE, Phillips MC. Proteins at liquid interfaces. *J Colloid Interface Sci*:
 - ^a I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. [1979,70,403](#);
 - ^b II. Adsorption isotherms. [1979,70,415](#);
 - ^c III. Molecular structures of adsorbed films. [1979,70,427](#);
 - ^d IV. Dilatational properties. [1980,76,227](#);
 - ^e V. Shear properties. [1980,76,240](#).
- 20 Gosh S, Bull HB. Surface potentials of protein solutions. [Biochem 1963,2,411](#).
- 21 Thomas C, Ter Minassian-Saraga L. Characterization of monolayers of a structural protein from myelin spread at the air/water interface. Effect of pH and ionic strength. [J Colloid Interface Sci 1976,56,412](#).
- 22 Möbius D, Miller R. (Editors) [Proteins at liquid interfaces](#). Elsevier, **1998**.
- 23 Benjamins J. *Static and dynamic properties of proteins adsorbed at liquid interfaces*. Ph.D. Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, **2000** (ISBN 9789058083173).
- 24 ^a Eaglesham A, Herrington TM, Penfold J. A neutron reflectivity study of a spread monolayer of bovine serum albumin. [Colloids Surfaces 1992,65,9](#);
- ^b Dickinson E, Horne DS, Phipps JS, Richardson RM. A neutron reflectivity study of the adsorption of β -casein at fluid interfaces. [Langmuir 1993,9,242](#);
- ^c Atkinson PJ, Dickinson E, Horne DS, Richardson RM. Neutron reflectivity of adsorbed β -casein and β -lactoglobulin at the air/water interface. [J Chem Soc, Faraday Trans 1995,91,2847](#);
- ^d Horne DS, Atkinson PJ, Dickinson E, Pinfield VJ, Richardson RM. Neutron reflectivity study of competitive adsorption of β -lactoglobulin and nonionic surfactant at the air-water interface. [Int Dairy J 1998,8,73](#).
- 25 ^a Lu JR, Su TJ, Thomas RK, Penfold J, Webster J. Structural conformation of lysozyme layers at the air/water interface studied by neutron reflection. [J Chem Soc, Faraday Trans 1998,94,3279](#);
- ^b Lu JR, Su TJ, Thomas RK. Structural conformation of bovine serum albumin layers at the air-water interface studied by neutron reflection. [J Colloid Interface Sci 1999,213,426](#);
- ^c Lu JR, Su TJ, Penfold J. Adsorption of Serum Albumins at the Air/Water Interface. [Langmuir 1999,15,6975](#);
- ^d Lu JR, Su TJ, Howlin BJ. The Effect of Solution pH on the Structural Conformation of Lysozyme Layers Adsorbed on the Surface of Water. [J Phys Chem B 1999,103,5903](#).
- 26 ^a Holt SA, McGillivray DJ, Poon S, White JW. Protein deformation and surfactancy at an interface. [J Phys Chem B 2000,104,7431](#).
- ^b Holt SA, Henderson MJ, White JW. Thermal denaturation of interfacial protein layers. [Aust J Chem 2002,55,449](#).
- 27 ^a Flach CR, Brauner JW, Taylor JW, Baldwin RC, Mendelsohn R. External reflection FTIR of peptide monolayer films in situ at the air/water interface: experimental design, spectra-structure correlations, and effects of hydrogen-deuterium exchange. [Biophys J 1994,67,402](#);
- ^b Meinders MB, van den Bosch GG, de Jongh HHJ. Adsorption properties of proteins at and near the air/water interface from IRRAS spectra of protein solutions. [Eur Biophys J 2001,30,256](#);
- ^c Martin AH, Meinders MJB, Bos MA, Cohen Stuart MA, van Vliet T. Conformational aspects of proteins at the air/water interface studied by infrared reflection-absorption spectroscopy. [Langmuir 2003,19,2922](#);
- ^d Kudryashova EV, Meinders MJB, Visser AJWG, van Hoek A, de Jongh HHJ. Structure and dynamics of egg white ovalbumin adsorbed at the air/water interface. [Eur Biophys J 2003,32,553](#).

- 28 ^a Wang J, Buck SM, Chen Z. Sum frequency generation vibrational spectroscopy studies on protein adsorption. *J Phys Chem B* **2002**,[106,11666](#);
- ^b Chen X, Clarke ML, Wang J, Chen Z. Sum frequency generation vibrational spectroscopy studies on molecular conformation and orientation of biological molecules at interfaces. *Int J Mod Phys B* **2005**,[19,691](#).
- 29 Prins A. Stagnant surface behaviour and its effect on foam and film stability. *Colloids Surfaces A* **1999**,[149,467](#).
- 30 Bos MA, van Vliet T. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Adv Colloids Interface Sci* **2001**,[91,437](#).
- 31 Yampolskaya G, Platikanov D. Proteins at fluid interfaces: Adsorption layers and thin liquid films. *Adv Colloid Interface Sci* **2006**,[128–130,159](#).
- 32 Lucassen-Reynders EH, Benjamins J, Fainerman VB. Dilational rheology of protein films adsorbed at fluid interfaces. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2010**,[15,264](#).
- 33 Noskov BA. Protein conformational transitions at the liquid–gas interface as studied by dilational surface rheology. *Adv Colloid Interface Sci* **2014**,[206,222](#).
- 34 ^a Fainerman VB, Lucassen-Reynders EH, Miller R. Description of the adsorption behaviour of proteins at water/fluid interfaces in the framework of a two-dimensional solution model. *Adv Colloid Interface Sci* **2003**,[106,237](#).
- ^b Fainerman, V.B.; Aksenenko, E.V.; Krägel, J.; Miller, R. Thermodynamics, interfacial pressure isotherms and dilational rheology of mixed protein-surfactant adsorption layers. *Adv Colloid Interface Sci* **2016**,[233,200](#).
- 35 Zawala J, Todorov R, Olszewska A, Exerowa D, Małysa K. Influence of pH of the BSA solutions on velocity of the rising bubbles and stability of the thin liquid films and foams. *Adsorption* **2010**,[16,423](#).
- 36 ^a Ivanov I (editor). *Thin Liquid Films*. Marcel Dekker, **1988**;
- ^b Derjaguin BV. *Theory of stability of colloids and thin liquid films*. Plenum Press, **1989**;
- ^c Israelachvili JN. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, **3rd ed. 2011**.
- 37 Scheludko A:
 - ^a Über das Ausfließen der Lösung aus Schaumfilmen (English translation by author: On the drainage of liquid from foam films). *Kolloid-Z* **1957**,[155,39](#);
 - ^b Thin liquid films. *Adv Colloid Interface Sci* **1967**,[1,391](#);
 - ^c Mysels K, Jones MN. Direct measurement of the variation of double-layer repulsion with distance. *Discuss Faraday Soc* **1966**,[42,42](#);
 - ^d Exerowa D, Scheludko A. Porous plate method for studying microscopic foam and emulsion films. *Compt Rend Acad Bulg Sci* **1971**,[24,47](#).
- 38 ^a Clunie JS, Corkill JM, Goodman JF. Structure of black foam films. *Discuss Faraday Soc* **1966**,[42,34](#).
- ^b Clunie JS, Goodman JF, Ogden CP. Extinction Coefficient of Water at 2.93 μ and Water Content of Black Foam Films. *Nature* **1967**,[216,1203](#);
- ^c Clunie JS, Goodman JF, Symons PC. Solvation Forces in Soap Films. *Nature* **1967**,[216,1203](#).
- 39 ^a B  lorgey O, Benattar JJ. Structural properties of soap black films investigated by x-ray reflectivity. *Phys Rev Lett* **1991**,[66,313](#).
- ^b Benattar JJ, Schalchli A, B  lorgey O. X-ray reflectivity investigation of Newton and common black films. *J Phys I France* **1992**,[2,955](#).
- 40 ^a Exerowa E, Kashchieva D, Platikanov D. Stability and permeability of amphiphile bilayers. *Adv Colloid Interface Sci* **1992**,[40,201](#);
- ^b Exerowa E, Todorov R, Nikolov L. Amphiphile bilayer films from DPPC: bilayer lipid membranes and Newton black films. *Colloids Surfaces A* **2004**,[250,195](#)
- 41 Mussellwhite PR, Kitchener JA. The limiting thickness of protein films. *J Colloid Interface Sci* **1967**,[24,80](#).
- 42 Yampolskaya GP, Rangelova NI, Bobrova LE, Platikanov DN, Izmailova VN. Obtaining black foam protein films. *Biofizika* **1977**,[22,939](#).
- 43 ^a Clark DC, Coke M, Mackie AR, Pinder AC, Wilson DR. Molecular diffusion and thickness measurements of protein-stabilized thin liquid films. *J Colloid Interface Sci* **1990**,[138,207](#);
- ^b Clark DC, Mackie AR, Wilde PJ, Wilson DR. Differences in the structure and dynamics of the adsorbed layers in protein-stabilized model foams and emulsions. *Faraday Discuss* **1994**,[98,253](#);
- ^c Sarker DK, Wilde PJ, Clark DC. Competitive adsorption of l- -lysophosphatidylcholine/ -lactoglobulin mixtures at the interfaces of foams and foam lamellae. *Colloids Surface B* **1995**,[3,349](#);
- ^d Angarska ZhK, Elenskyi AA, Yampolskaya GP, Tachev KD. Foam films from mixed solutions of bovine serum albumin and n-dodecyl- -d-maltoside. *Colloids Surfaces A* **2011**,[382,102](#).
- 44 Sedev R, N  meth Z. Ivanova R, Exerowa D. Surface force measurement in foam films from mixtures of protein and polymeric surfactants. *Colloid Surfaces A* **1999**,[149,141](#).

- 45 Cascão Pereira LG, Johansson C, Radke CJ, Blanch HW. Surface forces and drainage kinetics of protein-stabilized aqueous films. [Langmuir 2003,19,7503](#).
- 46 ^a Dimitrova TD, Leal-Calderon F, Gurkov TD, Campbell B. Disjoining pressure vs thickness isotherms of thin emulsion films stabilized by proteins. [Langmuir 2001,17,8069](#);
^b Basheva ES, Gurkov TD, Christov NC, Campbell B. Interactions in oil/water/oil films stabilized by β -lactoglobulin; role of the surface charge. [Colloids Surface A 2006,282-283,99](#).
- 47 ^a Saint-Jalmes A, Peugeot M-L, Ferraz H, Langevin D. Differences between protein and surfactant foams: microscopic properties, stability and coarsening. [Colloids Surfaces A 2005,263,219](#);
^b Maldonado-Valderrama JL, Langevin D. On the difference between foams stabilized by surfactants and whole casein or β -casein. Comparison of foams, foam films, and liquid surfaces studies. [J Phys Chem B 2008,112,3989](#).
- 48 Wierenga P, van Norél L, Basheva ES. Reconsidering the importance of interfacial properties in foam stability. [Colloids Surfaces A 2009,344,72](#).
- 49 Basheva ES, Kralchevsky PA, (...), Lips A:
^a Unique properties of bubbles and foam films stabilized by HFBII hydrophobin. [Langmuir 2011,27,2382](#);
^b Self-Assembled Bilayers from the protein HFBII hydrophobin: nature of the adhesion energy. [Langmuir 2011,27,4481](#).
- 50 Delahaije RJBM, Wierenga PA, Van Nieuwenhuijzen NH, Giuseppin MLF, Gruppen H. Protein concentration and protein-exposed hydrophobicity as dominant parameters determining the flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. [Langmuir 2013,29,11567](#).
- 51 den Engelsen D, Frens G. Ellipsometric investigation of black soap films. [J Chem Soc, Faraday Trans 1 1974,70,237](#).
- 52 ^a Clark DC, Husband F, Wilde P, Cornec M, Miller R, Krägel J, Wüstneck RJ. Evidence of extraneous surfactant adsorption altering adsorbed layer properties of β -lactoglobulin. [J Chem Soc, Faraday Trans 1995,91,1991](#);
^b Cornec M, Narsimhan G. Effect of Contaminant on Adsorption of Whey Proteins at the Air-Water Interface. [J Agric Food Chem 1998,46, 2490](#).
- 53 Sawyer L. β -Lactoglobulin. In: McSweeney PLH, Fox PF (editors) *Proteins: basic aspects* (4th ed.), Springer, 2013, [Chapter 7](#).
- 54 ^a Nozaki Y, Bunville LG, Tanford C. Hydrogen ion titration curves of β -lactoglobulin. [J Am Chem Soc 1959,81,5523](#);
^b Basch JJ, Timasheff SN. Hydrogen ion equilibria of the genetic variants of bovine β -lactoglobulin. [Arch Biochem Biophys 1967,118,37](#).
- 55 Waniska RD, Kinsella JE. Surface properties of β -lactoglobulin: adsorption and rearrangement during film formation. [J Agric Food Chem 1985,33,6](#).
- 56 Davis JP, Foegeding EA, Hansen FK. Electrostatic effects on the yield stress of whey protein isolate foams. [Colloids Surfaces B 2004,34,13](#).
- 57 Wüstneck R, Krägel J, Miller R, Fainerman VB, Wilde PJ, Sarker DK, Clark DC. Dynamic surface tension and adsorption properties of β -casein and β -lactoglobulin. [Food Hydrocolloids 1996,10,395](#).
- 58 Wüstneck R, Fainerman VB, Aksenenko EV, Kotsmar Cs., Pradines V, Krägel J, Miller R. Surface dilatational behavior of β -casein at the solution/air interface at different pH values. [Colloids Surfaces A 2012,404,17](#).
- 59 Rodríguez Niño MR, Carrera Sánchez C, Ruiz-Henestrosa VP, Rodríguez Patino JM. Milk and soy protein films at the air–water interface. [Food Hydrocolloids 2005,19,417](#).
- 60 Pezennec S, Gauthier F, Alonso C, Graner F, Croguennec T, Brule G, Renault A. The protein net electric charge determines the surface rheological properties of ovalbumin adsorbed at the air–water interface. [Food Hydrocolloids 2000,14,463](#).
- 61 Roberts SA, Kellaway IW, Taylor KMG, Warburton B, Peters K. Combined surface pressure-interfacial shear rheology study of the effect of pH on the adsorption of proteins at the air-water interface. [Langmuir 2005,21,7342](#).
- 62 Lucassen-Reynders EH, Fainerman VB, Miller R. Surface Dilational Modulus or Gibbs' Elasticity of Protein Adsorption Layers. [J Phys Chem B 2004,108,9173](#).
- 63 Perriman AW, Henderson MJ, Holt SA White JW. Effect of the air-water interface on the stability of β -lactoglobulin. [J Phys Chem B 2007,111,13527](#).
- 64 Ganzevles RA, Fokink R, van Vliet T, Cohen Stuart MA, de Jongh HHJ. Structure of mixed β -lactoglobulin/pectin adsorbed layers at air/water interfaces; a spectroscopy study. [J Colloid Interface Sci 2008,317,137](#).
- 65 ^a Scheuble N, Geue T, Windhab EJ, Fischer P. Tailored interfacial rheology for gastric stable adsorption layers. [Biomacromolecules 2014,15,3139](#);
^b Scheuble N, Lussi M, Geue T, Carrière F, Fischer P. Blocking gastric lipase adsorption and displacement processes with viscoelastic biopolymer adsorption layers. [Biomacromolecules 2016,17,3328](#).

-
- 66 Tucker IM, Petkov JT, Penfold J, Thomas RK, Cox AR, Hedges N. Adsorption of hydrophobin-protein mixtures at the air-water interface: The impact of pH and electrolyte. [Langmuir 2015,31,10008](#).
- 67 Mackie AR, Husband FA, Holt C, Wilde PJ. Adsorption of β -lactoglobulin variants A and B to the air-water interface. [Int J Food Sci Technol 1999,34,509](#).
- 68 Lech FJ, Delahaije RJBM, Meinders MJB, Gruppen H, Wierenga PA. Identification of critical concentrations determining foam ability and stability of β -lactoglobulin. [Food Hydrocolloids 2016,57,46](#).
- 69 ^a Petkova V, Sultanem C, Nedyalkov M, Benattar J-J, Leser ME, Schmitt C. Structure of a freestanding film of β -Lactoglobulin. [Langmuir 2003,19,6942](#);
^b Kolodziejczyk E, Petkova V, Benattar J-J, Leser ME, Michel M. Effect of fluorescent labeling of β -lactoglobulin on film and interfacial properties in relation to confocal fluorescence microscopy. [Colloids Surfaces A 2006,279,159](#).
- 70 Tadros Th.F, Vandamme A, Levecke B, Booten K, Stevens CV. Stabilization of emulsions using polymeric surfactants based on inulin. [Adv Colloid Interface Sci 2004,108-109,207](#).
-

6. Krótki opis pozostałych osiągnięć naukowych *

W trakcie studiów doktoranckich oraz w trakcie kolejnych badań po obronie doktoratu (2004–2010) w IPC-BAS w Sofii moja praca związana była głównie z badaniami mechanizmów stabilizacji emulsji olej-w-wodzie (O/W) z polimerów amfifilowych, w odniesieniu do właściwości kosmetyków i produktów higieny osobistej. Głównym wyzwaniem było wyjaśnienie obserwowanej niezwykle wysokiej stabilności takich emulsji wytworzonych przy użyciu nowej klasy biopolimerów, a mianowicie hydrofobowo modyfikowanych kopolimerów szczepionych INUTEC® opartych na naturalnie występującej inulinie (polifruktozie).⁷⁰ Co ciekawe, tak wysoka stabilność emulsji zaobserwowano przy wysokich zawartościach elektrolitów,⁷⁰ co w pewien sposób jest sprzeczne z klasycznym podejściem DLVO. Aby rozwiązać ten problem, szczegółowo zbadałem odpychające siły oddziaływania, które stabilizują odpowiednie filmy emulsyjne O/W z biopolimerów INUTEC®.^{B1,B2,B6,B9,A1} Stwierdziłem, że przy braku Π_{el} otrzymane czarne filmy emulsyjne są stabilizowane silnymi oddziaływaniami non-DLVO, które mają charakter oddziaływań sterycznych (Π_{st}). Równolegle badałem filmy emulsyjne O/W z syntetycznych kopolimerów triblokowych PEO-PPO-PEO z serii Pluronic®.^{B7,B8} Dwa badania były poświęcone porównaniu tych dwóch typów makrocząsteczek pod względem stabilności filmów emulsyjnych.^{B3,B5} Podsumowując, stwierdziłem, że stabilność badanych emulsji jest determinowana przez stabilność odpowiednich czarnych filmów emulsyjnych. Wykazałem, na podstawie teoretycznej analizy eksperymentalnych izoterm $\Pi(h)$, że czarne filmy emulsyjne Pluronic® są stabilizowane przez oddziaływania steryczne typu „brush-do-brush” de Gennesa,^{B7,B8} W przypadku biopolimerów INUTEC® czarne filmy emulsyjne (a także filmy piankowe)^{B9} są stabilizowane podobnym rodzajem sił sterycznych, które nazwaliśmy siłami typu „loop-to-loop”. Taki rodzaj oddziaływań sterycznych został po raz pierwszy opisany w literaturze. Wykazałem, że siła oddziaływań „loop-to-loop” Π_{st} może być kontrolowana przez stopień modyfikacji hydrofobowej, to jest przez rozmiar pętli (z angielskiego *loop*) inuliny utworzonych między sąsiednimi szczepionymi łańcuchami alkilowymi (zilustrowane na przykład na Rysunku 1 w Ref.^{B9}),^{B4,B9} podobnie jak w przypadku polimerów Pluronic®, gdzie Π_{st} jest skalowany z grubością „pędzla” (z angielskiego *brush*)^{B8}. Wreszcie moje badania wykazały, że biopolimery INUTEC® są lepszymi emulgatorami niż syntetyczne polimery Pluronic®.^{B3,B5} Te nowe odkrycia pozwalają lepiej zrozumieć stabilizację emulsji przez polimery i mają znaczenie dla rozwoju zastosowań ekologicznych. Później badałem również pianki z biopolimerów INUTEC®.^{B10}

* Odniesienia w tym rozdziale są zgodne z zasadami wyjaśnionymi w przypisie na stronie 5.

W latach 2011–2017 pracowałem jako adiunkt w Instytucie Koloidów i Powierzchni Międzyfazowych im. Maxa Plancka (MPICI) w Poczdamie w Niemczech. Moja działalność naukowa zaowocowała 17 artykułami w czasopiśmie^{B11-B27} (w tym 5 artykułami przeglądowymi na tematy warstw międzyfazowych^{B11,B12,B18} i cienkich filmów ciekłych^{B16,B21}) oraz 5 rozdziałami w książkach^{A2-A6}.

W grupie dr hab. R. Millera zdobyłem solidne doświadczenie w zakresie dynamiki i reologii warstw adsorpcyjnych na granicy faz ciecz/płyn. Byłem zaangażowany w badania nad białkami,^{B15,B20,B23-B25} surfaktantami^{B19} i cząstkami stałymi,^{B27} oraz mieszaninami białko/surfaktant^{B17} lub białko/polimer^{B26}. Byłem również zaangażowany w opracowanie instrumentu do badania zdarzeń i koalescencji między dwoma pęcherzykami lub dwiema kroplami; za pomocą tego instrumentu badaliśmy koalescencję pęcherzyków w roztworach BLG.^{B13,B14}

W grupie dr E. Schnecka zdobyłem doświadczenie w metodach powierzchniowo czułych opartych na rozpraszaniu neutronów i promieniowania rentgenowskiego. Oprócz badań warstw adsorpcyjnych BLG metodą NR,^{H7} zastosowaliśmy również współczynnik odbicia promieniowania rentgenowskiego i fluorescencję rentgenowską fali stojącej (SWXF) do badania monowarstw i dwuwarstw biomolekularnych (złożonych z lipidów i lipopolimerów) na nośnikach stałych jako modeli powierzchni błon biologicznych.^{B22} Badania te przeprowadzono na próbkach wystawionych na działanie powietrza atmosferycznego lub pary wodnej, czyli badaliśmy granicę faz ciało stałe/gaz. Celem badania było zastosowanie po raz pierwszy techniki SWXF do biologicznie istotnych dwuwarstw oraz ilościowe wyjaśnienie ich pęcznienia i natury oddziaływań międzycząsteczkowych w funkcji wilgotności otoczenia, w celu przetestowania eksperymentalnego podejścia SWXF. Oczywiście jest to tylko uproszczony system modelowy, który został wykorzystany jako pierwszy krok badawczy. W tej publikacji przedstawiliśmy pierwsze określenie rozkładu punktu końcowego ograniczonych, oddziałujących szczotek polimerowych (z zastosowanego lipopolimeru). W naszych wynikach pojawiły się pewne niejasności i omówiliśmy perspektywy poprawy metodologii, które jednak stanowią dowód koncepcji i jasno pokazują potencjał SWXF w przypadku optymalizacji kluczowych parametrów. Bardziej realistycznym podejściem jest badanie takich architektur biomolekularnych w środowisku wodnym. Właściwie moją główną rolą w tym projekcie (patrz rozdział 3) było zaprojektowanie eksperymentalnej celki do tego celu. Cel ten udało mi się osiągnąć. Następnie przetestowaliśmy nową celkę SWXF w cyklu kilku wizyt pomiarowych „beamtime” w obiektach synchrotronowych w BESSY (Berlin), DESY (Hamburg) oraz SOLEIL (Paryż). Wreszcie uzyskaliśmy solidne wyniki, które zostały przedstawione w mojej najnowszej publikacji.^{B34} W tym miejscu chciałbym podkreślić zalety techniki SWXF w porównaniu z innymi wysokorozdzielczymi metodami rozwiązywania struktur międzyfazowych na powierzchniach stałych, na przykład mikroskopią sił atomowych i technikami reflektometrii z wykorzystaniem światła (elipsometrii), neutronów lub promieni rentgenowskich. Te techniki pomiarowe ujawniają grubości warstw oraz zewnętrzne kształty zaadsorbowanych cząsteczek bez żadnego wglądu w ich orientację lub konfigurację przestrzenną. Analiza widm fluorescencyjnych uzyskanych w eksperymentach SWXF z kazeiną β zaadsorbowaną na powierzchniach stałych pozwoliła na zlokalizowanie biologicznie istotnych elementów lekkich, takich jak S oraz P, a tym samym ustalenie orientacji cząsteczek białka.^{B34} W ten sposób wykazaliśmy potencjał tej techniki do uzyskiwania wyższego poziomu informacji o strukturach międzyfazowych bez konieczności dodatku dodatkowych wskaźników i z rozdzielczością sub-nanometrową.

W latach 2017–2019 pracowałem jako adiunkt w grupie prof. B. Braunschweiga na WWU Münster w Niemczech. We współpracy z kolegą N. García Rey opracowaliśmy procedurę szacowania potencjału podwójnej warstwy (ładunku powierzchniowego) na powierzchni W/A, wykorzystując kombinację pomiarów SFG i TLF.^{B29} W innej publikacji,^{B30} twierdziliśmy, że na stan naładowania warstw adsorpcyjnych BLG na powierzchni W/A może dramatycznie wpłynąć obecność trójwartościowych jonów metali i po raz pierwszy wykazano, że takie jony indukują odwrócenie ładunku elektrycznego na granicy faz ze względu na sprzężenie białko/jon.

Od 2017 roku współpracuję z prof. B. A. Noskovem z Petersburskiego Uniwersytetu Państwowego, Petersburg, Rosja. Nasze wspólne badania koncentrują się zarówno na zachowaniu pojedynczych białek (artykuły [H5,H7]) jak i mieszaninach białek z innymi rodzajami substancji (wspomniane wyżej prace)^{B26-B28} na granicy faz. W naszej ostatniej publikacji,^{B33} zbadaliśmy oddziaływania lizozymu z nanoagregatami fulerenów powstającymi na powierzchni W/A w odniesieniu do bioaktywności nanocząstek fulerenów, które w ostatnim czasie cieszą się dużym zainteresowaniem naukowym.

※

Przedstawiona rozprawa habilitacyjna podkreśla, że moje ostatnie zainteresowania naukowe skierowane są głównie na poznanie zachowania białek na granicy faz na poziomie molekularnym. Zastosowanie podejścia wielowymiarowego dało owocne wyniki w trakcie badań z białkiem mleka BLG. Perspektywy przyszłych badań obejmują na przykład: rozszerzenie tego podejścia na badania z innymi białkami; systematyczne badania na granicach faz ciecz/ciecz; rozwinięcie tematu niezwyklego wpływu jonów metali trójwartościowych na właściwości powierzchni białek,^{B30} *itp.*

Jednak moim konkretnym planem na najbliższą przyszłość jest skierowanie badań nad białkami w kierunku badań nad zachowaniem międzyfazowym zagregowanych białek, takich jak miękkie nanocząsteczki białek i włókienka amyloidu. Obecna wiedza na ten temat została podsumowana w moim ostatnim artykule przeglądowym (we współpracy z prof. Noskovem),^{B31} który pokazuje, że ten temat jest wciąż bardzo młody i jest wiele otwartych pytań, które czekają na odpowiedź. W tym celu złożyłem wniosek w konkursie NCN SONATA BIS 11 (2021, Id: 526361) na projekt dotyczący włókienek amyloidu w miękkich koloidach. Wniosek został zakwalifikowany do drugiego etapu oceny merytorycznej (rozmowa kwalifikacyjna odbędzie się w lutym 2022 r.).



PODPIS ZAUFANY

GEORGI
GOCHEV

21.12.2021 06:57:49 [GMT+1]

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

(podpis wnioskodawcy)

Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny

I. I. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY

1. Monografia naukowa, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2a Ustawy; lub
2. **2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy; lub**
3. Wykaz zrealizowanych oryginalnych osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych lub artystycznych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2c Ustawy.

Publikacje naukowe będące podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego:

[H1] **Gochev G.**, Retzlaff I., Aksenenko E.V., Fainerman V.B., Miller, R. Adsorption isotherm and equation of state for β -Lactoglobulin layers at the air/water surface. *Colloids Surfaces A* **2013**, 422, 33-38.

IF₂₀₁₃: 2.354

MNiSW₂₀₁₃: 25

Cit: 24*

Konceptualizacja: Gochev i Miller; badanie: Retzlaff i Gochev; analiza danych: Gochev, Aksenenko i Fainerman; oryginalny manuskrypt: Gochev; historia publikacji: drobna korekta przez Gochev.

Sformułowałem koncepcję badań, która była rozwijana wspólnie z kierownikiem mojej grupy, Millerem. Moim zamysłem było sprawdzenie zdolności modelu teoretycznego do wykrywania tworzenia się wtórnej warstwy białkowej na podstawie wyników eksperymentalnych, dotyczących powierzchniowego modułu dylatacyjnego. W pracach doświadczalnych nadzorowałem eksperymenty prowadzone przez magistrantkę Retzlaff. Przeprowadziłem wszystkie symulacje modelowe. Zaproponowałem interpretację wyników, która została przedyskutowana z Fainermanem i Millerem. Przygotowałem manuskrypt, złożyłem go w czasopiśmie i dokonałem drobnej korekty ustalonej przez redaktora.

[H2] Engelhardt K., Lexis M., **Gochev G.**, Konnerth C., Miller, R., Willenbacher N., Peukert W., Braunschweig B. pH effects on the molecular structure of β -lactoglobulin modified air-water interfaces and its impact on foam rheology. *Langmuir* **2013**, 29, 11646-11655.

IF₂₀₁₃: 4.384

MNiSW₂₀₁₃: 35

Cit: 93*

* Bez autocytowań

Konceptualizacja: Braunschweig; badanie: Engelhardt, Lexis, **Gochev**, Konnerth; analiza danych: Engelhardt, Lexis i **Gochev**; oryginalny manuskrypt: Engelhardt, Lexis i Braunschweig. historia publikacji: drobna korekta przez Braunschweig.

R. Miller i ja pracowaliśmy jako zespół nad wspólnymi badaniami z dwoma innymi grupami (Erlangen i Karlsruhe). Rolą naszego zespołu było dostarczenie wyników eksperymentalnych dotyczących kinetyki adsorpcji i reologii dylatacyjnej powierzchni badanych warstw międzyfazowych, które zostały przeze mnie uzyskane i przedstawione w postaci wykresów. Ponadto brałem udział w interpretacji całego zestawu wyników uzyskanych przez trzy grupy badawcze, które przedstawione zostały w części dyskusyjnej artykułu.

[H3] **Gochev G.**, Retzlaff I., Exerowa D., Miller R. Electrostatic stabilization of foam films from β -lactoglobulin solutions. *Colloids Surfaces A* **2014**, 460, 272-279.

IF₂₀₁₄: 2.752

MNiSW₂₀₁₄: 25

Cit: 23*

Konceptualizacja: **Gochev**; badanie: **Gochev** i Retzlaff; analiza danych: **Gochev**; oryginalny manuskrypt: **Gochev**; historia publikacji: drobna korekta przez **Gochev**.

Koncepcję badań sformułowałem z myślą o znalezieniu warunków powstawania czarnych filmów Newtona z β -laktoglobuliny. Eksperymenty z filmami piankowymi przeprowadziłem w laboratorium w Sofii i zaproponowałem interpretację wyników, którą omówiłem z Millerem i Exerową. Przygotowałem manuskrypt, przelałem go do czasopisma i dokonałem drobnej korekty ustalonej przez redaktora.

[H4] Ulaganathan, V., **Gochev, G.**, Gehin-Delval, C., Leser, M.E., Gunes, D.Z., Miller, R. Effect of pH and electrolyte concentration on rising air bubbles in β -lactoglobulin solutions. *Colloids Surfaces A* **2016**, 505, 165–170.

IF₂₀₁₆: 2.752

MNiSW₂₀₁₆: 30

Cit: 9*

Konceptualizacja: Ulaganathan i **Gochev**; badanie: Ulaganathan; analiza danych: Ulaganathan i **Gochev**; oryginalny manuskrypt: Ulaganathan i **Gochev**; historia publikacji: drobna korekta przez Ulaganathan i **Gochev**.

Brałem udział w formułowaniu koncepcji badań. Opiekowałem się doktorantem Ulaganathan, nadzorując jego prace eksperymentalne. Uczestniczyłem w interpretacji uzyskanych wyników oraz w drobnej korekcie manuskryptu ustalonej przez redaktora.

Poniższa seria publikacji [H5-H9] wyłoniła się z cyklu badań zainicjowanych i koordynowanych przeze mnie, a wypracowanych we współpracy z naukowcami z różnych grup.

- [H5] Ulaganathan V., Retzlaff I., Won J.Y., **Gochev G.**, Gehin-Delval C., Leser M., Noskov B.A., Miller R. β -Lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface: 1. Adsorption kinetics and surface pressure isotherm: Effect of pH and ionic strength. *Colloids Surfaces A* **2017**, 519, 153-156.

IF₂₀₁₇: 2.829MNI_{SW}₂₀₁₇: 70

Cit: 19*

Konceptualizacja: **Gochev**; badanie: Ulaganathan, Retzlaff i Won; analiza danych: Ulaganathan, **Gochev** i Noskov; oryginalny manuskrypt: Ulaganathan i **Gochev**; historia publikacji: drobna korekta przez **Gochev**.

Sformulowałem koncepcję badań. Opiekowałem się doktorantami Ulaganathan i Won oraz magistrantką Retzlaff, nadzorując ich w prace eksperymentalne. Zaproponowałem interpretację wyników, która została przedyskutowana z wszystkimi współautorami. Przygotowałem większą część manuskryptu, złożyłem go do czasopisma i dokonałem drobnej korekty ustalonej przez redaktora.

- [H6] Ulaganathan V., Retzlaff I., Won J.Y., **Gochev G.**, Gunes D.Z., Gehin-Delval C., Leser M., Noskov B.A., Miller R. β -Lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface: 2. Dilational rheology: Effect of pH and ionic strength. *Colloids Surfaces A* **2017**, 521, 167-176.

IF₂₀₁₇: 2.829MNI_{SW}₂₀₁₇: 70

Cit: 15*

Konceptualizacja: **Gochev**; badanie: Ulaganathan, Retzlaff i Won; analiza danych: Ulaganathan, **Gochev** i Noskov; oryginalny manuskrypt: Ulaganathan i **Gochev**; historia publikacji: drobna korekta przez **Gochev**.

Sformulowałem koncepcję badań. W pracach doświadczalnych nadzorowałem eksperymenty prowadzone przez doktorantów Ulaganathana i Wona oraz magistrantkę Retzlaff. Zaproponowałem interpretację wyników, która została przedyskutowana z wszystkimi współautorami. Przygotowałem większą część manuskryptu, złożyłem go do czasopisma i dokonałem drobnej korekty ustalonej przez redaktora.

- [H7] **Gochev G.**, Scoppola E., Campbell R.A., Noskov B.A., Miller R., Schneck E. β -lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface: 3. Neutron Reflectivity Study on the Effect of pH. *J. Phys. Chem. B* **2019**, 123, 10877-10889.

IF₂₀₁₉: 2.857MNI_{SW}₂₀₁₉: 140

Cit: 6*

Konceptualizacja: **Gochev**, Campbell i Schneck; badanie: **Gochev** i Campbell; analiza danych: **Gochev**, Scoppola, Campbell i Schneck; oryginalny manuskrypt: **Gochev**; historia publikacji: poważna korekta przez wszystkich współautorów.

Sformulowałem koncepcję badań, która była dalej rozwijana w aspekcie technicznym wspólnie z Campbellem i Schneck'iem. Prace doświadczalne wykonywałem pod kierunkiem Campbella na reflektometrze "Figaro" w ILL, Grenoble, Francja. Brałem udział w interpretacji wyników

uzyskanych z analizy danych reflektometrycznych. Przygotowałem manuskrypt i złożyłem go do czasopisma. Redaktor zdecydował o konieczności wprowadzeniu istotnej korekty artykułu, której byłem głównym autorem (w tym autorem szczegółowych odpowiedzi na uwagi recenzentów).

- [H8] **Gochev G.**, Ulaganathan V., Retzlaff I., Gehin-Delval C., Gunes D.Z., Leser M., Kulozik U., Miller R., Braunschweig B. β -lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface: 4. Impact on the Stability of Foam Films and Foams. *Minerals* **2020**, 10, 636.

IF₂₀₂₀: 2.644

MNiSW₂₀₁₉: 100

Cit: 3*

Konceptualizacja: **Gochev**, Ulaganathan i Miller; badanie: **Gochev**, Ulaganathan i Retzlaff; analiza danych: **Gochev** i Ulaganathan; oryginalny manuskrypt: **Gochev** i Ulaganathan; historia publikacji: drobna korekta przez **Gochev**.

Sformułowałem koncepcję badań. Nadzorowałem prace doktoranta Ulaganathana i magistranta Retzlaffa podczas prowadzonych przez nich eksperymentów. Zaproponowałem interpretację wyników, która została przedyskutowana z wszystkimi współautorami. Przygotowałem manuskrypt, złożyłem go w czasopiśmie i dokonałem drobnej korekty ustalonej przez redaktora.

- [H9] **Gochev G.**, Kovalchuk V.I., Aksenenko E.V., Fainerman V.B., Miller, R. β -Lactoglobulin adsorption layers at the water/air surface: 5. Adsorption isotherm and equation of state revisited, impact of pH. *Colloids Interfaces* **2021**, 5, 14.

IF: jeszcze nie przydzielony

MNiSW₂₀₂₁: 20

Cit: 0

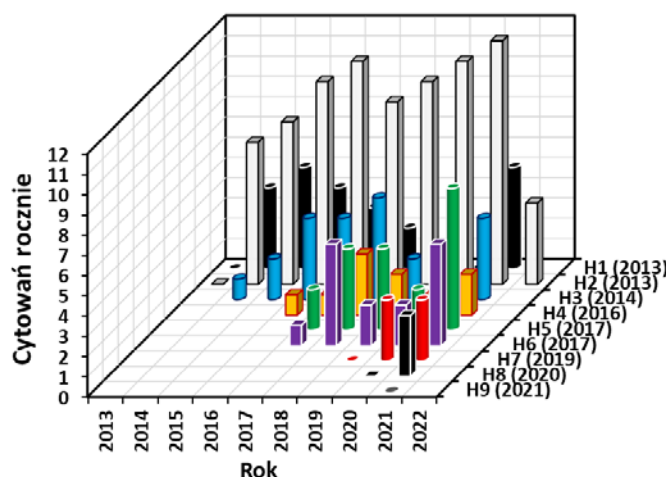
Konceptualizacja: **Gochev** i Miller; badanie: **Gochev**; analiza danych: **Gochev**, Kovalchuk, Aksenenko i Fainerman; oryginalny manuskrypt: **Gochev**; historia publikacji: drobna korekta przez **Gochev**.

Przeprowadziłem prace eksperymentalne i symulacje modelowe. Zaproponowałem interpretację wyników, która została przedyskutowana z wszystkimi współautorami. Przygotowałem manuskrypt, złożyłem go w czasopiśmie i dokonałem drobnej korekty ustalonej przez redaktora.

Publikacje [H1-H9] posiadają:

- sumaryczny IF_H: **23.40** (wg [JCR](#) za rok publikacji);
- sumaryczny wskaźnik MNiSW: **495** (115 przed 2017 i 380 po 2017);
- Cytowania: **194** (bez autocytowań, [Scopus](#) 19.12.2021).

Na rysunku przedstawiono ewolucję w czasie ilości cytowań publikacji [H1–H9] bez autocytowań (Scopus 19.12.2021)



Skany oryginalnych publikacji oraz oświadczenia współautorów o ich wkładzie zostały zebrane w Załączniku 4.

II. INFORMACJA O AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ

1. Wykaz opublikowanych monografii naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.1).

Nie dotyczy

2. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych.

- [A1] Tadros, T., Exerowa, D., **Gochev, G.**, Kolarov, T., Levecke, B., Booten, K. Interaction Forces in Emulsion Films Stabilized with Hydrophobically Modified Inulin (Polyfructose) and Correlation with Emulsion Stability. In: *Emulsion Science and Technology*, Tadros T. (ed.), [Wiley, 2009, 67-73](#).
- [A2] Dan, A., **Gochev, G.**, Kotsmar, Cs., Ferri, J.K., Javadi, A., Karbaschi, M., Krägel, J., Wüstneck, R., Miller, R. Simultaneous versus sequential adsorption of β -casein/SDS mixtures. Comparison of water/air and water/hexane interfaces. *Proteins at Interfaces III State of the Art*, T. Horbett, J.L. Brash, W. Norde (eds.), [ACS Symposium Series 2012,1120,153–178](#).
- [A3] Javadi, A., Krägel, J., Karbaschi, M., Won, J.-Y., Dan, A., **Gochev, G** Makievski, A.V., Loglio, G., Liggieri, L., Ravera, F., Kovalchuk, N.M., Lotfi, M., Ulaganathan, V., Kovalchuk, V.I., Miller, R. Capillary Pressure Experiments with Single Drops and Bubbles. In: *Colloid and interface chemistry for nanotechnology*, Kralchevsky P., Miller, R., Ravera, F. (eds.), [CRC Press, 2014, Chapter 13](#).
- [A4] Peukert, W., Braunschweig, B., Engelhardt, K., Miller, R., **Gochev, G.** Teilprojekt 1. Einfluss von Proteinen auf die Schaumbildung und Schaumstabilität (eng. Influence of proteins on foam formation and foam stability). In: *Proteinschäume in der Lebensmittelproduktion: Mechanismenaufklärung, Modellierung und Simulation* (eng. *Protein foams in food production: mechanisms elucidation, modeling and simulation*), Häusser V., Kinkel D. (eds.), Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonner Universitäts-Buchdruckerei, Bonn, **2014**, [ISBN 978-3-925032-53-0](#); pp. 11-30.
- [A5] **Gochev, G.**, Ulaganathan, V., Miller, R. Foams. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, [Wiley, 2016, 1–31](#).
- [A6] Won, J.-Y., Ulaganathan, V., Tleuova, A., Kairaliyeva, T., Sharipova, A.A., Hu, X.W., Karbaschi, M., **Gochev, G.**, Javadi, A., Taeibi Rahni, M., Makievski, A.V., Krägel, J., Aidarova, S.B., Miller, R. Profile Analysis Tensiometry for Studies of Liquid Interfacial Dynamics. In: *Laser Optofluidics in Fighting Multiple Drug Resistance*, Pascu, M.-L. (ed.), [Bentham Sci Publ, 2017, 41–74](#).
- [A7] **Gochev, G.**, Platikanov, D., Miller, R. Historical Perspectives on Foam Films. In: *Foam Films and Foams: Fundamentals and Applications*, Exerowa D., **Gochev G.**, Platikanov D., Liggieri L., Miller R. (eds.), [CRC Press, 2018, Chapter 2](#).
- [A8] **Gochev, G.**, Kristen-Hochrein, N. Foam Films Stabilized by Polymers and Proteins. In: *Foam Films and Foams: Fundamentals and Applications*, Exerowa D., **Gochev G.**, Platikanov D., Liggieri L., Miller R. (eds.), [CRC Press, 2018, Chapter 5](#).

[A9] Ulaganathan, V., **Gochev, G.** Foam Fractionation. In: *Foam Films and Foams: Fundamentals and Applications*, Exerowa D., **Gochev G.**, Platikanov D., Liggieri L., Miller R. (eds.), [CRC Press, 2018, Chapter 19](#).

3. Informacje o członkostwie w kolegiach redakcyjnych przygotowujących monografie naukowe do publikacji.

- Foam Films and Foams: Fundamentals and Application. Exerowa D., **Gochev G.**, Platikanov D., Liggieri L. and Miller R. (Red.), CRC Press, Taylor & Francis Group, 2018, [ISBN 9781466587724](#).

4. Wykaz artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych (z wyłączeniem publikacji wymienionych w wykazie w I.2)

4.1. Artykuły w czasopismach opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora:

- [B1] Exerowa, D., **Gotchev, G.**, Kolarov, T., Khristov, Khr., Levecke, B., Tadros, Th. Interaction forces in thin liquid films stabilized by hydrophobically modified inulin polymeric surfactant. 2. Emulsion films. [Langmuir 2007,23,1711–1715](#).
- [B2] **Gotchev, G.**, Kolarov, T., Levecke, B., Tadros, Th., Khristov, Khr., Exerowa, D. Interaction forces in thin liquid films stabilized by hydrophobically modified inulin polymeric surfactant. 3. Influence of electrolyte type on emulsion films. [Langmuir 2007,23,6091–6094](#).
- [B3] Exerowa, D., **Gotchev, G.**, Levecke, B., Tadros, T. Emulsion newton black films stabilized by polymeric surfactants. [Compt Rend Acad Bulg Sci 2008,61,455–468](#).
- [B4] Exerowa, D., **Gotchev, G.**, Kolarov, T., Khristov, Khr., Levecke, B., Tadros, Th. Oil-in-water emulsion films stabilized by polymeric surfactants based on inulin with different degree of hydrophobic modification. [Colloids Surfaces A 2009,334,87–91](#).
- [B5] Exerowa, D., **Gotchev, G.**, Kolarov, T., Khristov, Khr., Levecke, B., Tadros, Th. Comparison of oil-in-water emulsion films produced using ABA or AB_n copolymers. [Colloids Surfaces A 2009,335,50–54](#).
- [B6] **Gotchev, G.**, Exerowa, D., Khristov, K., Levecke, B., Tadros, T. Stability of O/W emulsion films from mixed aqueous solutions of inulin-based polymeric and polyethylene glycol surfactants. [J Dispersion Sci Technol 2010,31,31–37](#).
- [B7] **Gotchev, G.**, Kolarov, T., Khristov, Khr., Exerowa, D. On the origin of electrostatic and steric repulsion in oil-in-water emulsion films from PEO-PPO-PEO triblock copolymers. [Colloids Surfaces A 2010,354,56–60](#).

4.2. Artykuły w czasopismach opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora:

- [B8] **Gotchev, G.**, Kolarov, T., Khristov, K., Exerowa, D. Electrostatic and steric interactions in oil-in-water emulsion films from Pluronic surfactants. [Adv Colloid Interface Sci 2011,168,79–84](#).
- [B9] **Gochev, G.**, Petkova, H., Kolarov, T., Khristov, K., Levecke, B., Tadros, T., Exerowa, D. Effect of the degree of grafting in hydrophobically modified inulin polymeric

- surfactants on the steric forces in foam and oil-in-water emulsion films. [*Colloids Surfaces A* **2011**,391,101–104.](#)
- [B10] Khristov, K., **Gochev, G.**, Petkova, H., Leveck, B., Tadros, T., Exerowa, D. Foams stabilized by hydrophobically-modified inulin polymeric surfactant. [*Compt Rend Acad Bulg Sci* **2013**,66,369–376.](#)
- [B11] Javadi, A., **Mucic, N.**, Karbaschi, M., Won, J.Y., Lotfi, M., Dan, A., Ulaganathan, V., **Gochev, G.**, Makievski, A.V., Kovalchuk, V.I., Kovalchuk, N.M., Krägel, J., Miller, R. Characterization methods for liquid interfacial layers. [*Eur Phys J: Spec Topics*, **2013**,222,7–29.](#)
- [B12] Dan, A., **Gochev, G.**, Krägel, J., Aksenenko, E.V., Fainerman, V.B., Miller, R. **Interfacial rheology of mixed layers of food proteins and surfactants.** [*Curr Opin Colloid Interface Sci* **2013**,18,302–310.](#)
- [B13] Won, J.Y., Krägel, J., **Makievski, A.V.**, Javadi, A., **Gochev, G.**, Loglio, G., Pandolfini, P., Leser, M.E., Gehin-Delval, C., Miller, R. Drop and bubble micro manipulator (DBMM)-A unique tool for mimicking processes in foams and emulsions. [*Colloids Surfaces A* **2014**,441,807–814.](#)
- [B14] Won, J.Y., **Krägel, J.**, **Gochev, G.**, Ulaganathan, V., Javadi, A., Makievski, A.V., Miller, R. Bubble-bubble interaction in aqueous β -Lactoglobulin solutions. [*Food Hydrocolloids* **2014**,34,15–21.](#)
- [B15] Ulaganathan, V., **Fainerman, V.B.**, **Gochev, G.**, Aksenenko, E.V., Gunes, D.Z., Gehin-Delval, C., Miller, R. Evidence of negative surface pressure induced by β -lactoglobulin and β -casein at water/air interface. [*Food Hydrocolloids* **2014**,34,10–14.](#)
- [B16] **Gochev, G.** **Thin liquid films stabilized by polymers and polymer/surfactant mixtures.** [*Curr Opin Colloid Interface Sci* **2015**,20,115–123.](#)
- [B17] Dan, A., **Gochev, G.**, **Miller, R.** Tensiometry and dilational rheology of mixed β -lactoglobulin/ionic surfactant adsorption layers at water/air and water/hexane interfaces. [*J Colloid Interface Sci* **2015**,449,383–391.](#)
- [B18] Dukhin, S.S., Kovalchuk, V.I., **Gochev, G.G.**, **Lotfi, M.**, Krzan, M., Malysa, K., Miller, R. Dynamics of Rear Stagnant Cap formation at the surface of spherical bubbles rising in surfactant solutions at large Reynolds numbers under conditions of small Marangoni number and slow sorption kinetics. [*Adv Colloid Interface Sci* **2015**,222,260–274.](#)
- [B19] **Mucic, N.**, **Gochev, G.**, Won, J., Ulaganathan, V., Fauser, H., Javadi, A., Aksenenko, E.V., Krägel, J., Miller, R. Adsorption of equimolar aqueous sodium dodecyl sulphate/dodecyl trimethylammonium bromide mixtures at solution/air and solution/oil interfaces. [*Colloid Polym Sci* **2015**,293,3099–3106.](#)
- [B20] Braunschweig, B., **Schulze-Zachau, F.**, Nagel, E., Engelhardt, K., Stoyanov, S., **Gochev, G.**, Khristov, K., Mileva, E., Exerowa, D., Miller, R., Peukert, W. Specific effects of Ca^{2+} ions and molecular structure of β -lactoglobulin interfacial layers that drive macroscopic foam stability. [*Soft Matter* **2016**,12,5995–6004.](#)
- [B21] **Gochev, G.**, **Platikanov, D.**, Miller, R. Chronicles of foam films. [*Adv Colloid Interface Sci* **2016**,233,115–125.](#)

- [B22] Schneck, E., Rodriguez-Loureiro, I., Bertinetti, L., Marin, E., Novikov, D., Konovalov, O., **Gochev, G.** Element-specific density profiles in interacting biomembrane models. *J Phys D: Appl Phys* **2017**,*50*,104001.
- [B23] Won, J.Y., **Gochev, G.G.**, Ulaganathan, V., Krägel, J., Aksenenko, E.V., Fainerman, V.B., Miller, R. Effect of solution pH on the adsorption of BLG at the solution/tetradecane interface. *Colloids Surfaces A* **2017**,*519*,161–167.
- [B24] Won, J.Y., **Gochev, G.**, Ulaganathan, V., Krägel, J., Aksenenko, E.V., Fainerman, V.B., Miller, R. Mixed adsorption mechanism for the kinetics of BLG interfacial layer formation at the solution/tetradecane interface. *Colloids Surfaces A* **2017**,*519*,146–152.
- [B25] Won, J.Y., **Gochev, G.**, Ulaganathan, V., Krägel, J., Aksenenko, E.V., Fainerman, V.B., Miller, R. Dilational visco-elasticity of BLG adsorption layers at the solution/tetradecane interface – Effect of pH and ionic strength. *Colloids Surfaces A* **2017**,*521*,204–210.
- [B26] Milyaeva, O.Y., **Gochev, G.**, Loglio, G., Miller, R., Noskov, B.A. Influence of polyelectrolytes on dynamic surface properties of fibrinogen solutions. *Colloids Surfaces A* **2017**,*532*,108–115.
- [B27] Bykov, A.G., **Gochev, G.**, Loglio, G., Miller, R., Panda, A.K., Noskov, B.A. Dynamic surface properties of mixed monolayers of polystyrene micro- and nanoparticles with DPPC. *Colloids Surfaces A* **2017**,*521*,239–246.
- [B28] Milyaeva, O.Y., Campbell, R.A., **Gochev, G.**, Loglio, G., Lin, S.-Y., Miller, R., Noskov, B.A. Dynamic Surface Properties of Mixed Dispersions of Silica Nanoparticles and Lysozyme. *J Phys Chem B* **2019**,*123*,4803–4812.
- [B29] Garcíá Rey, N., Weißenborn, E., Schulze-Zachau, F., **Gochev, G.**, Braunschweig, B. Quantifying Double-Layer Potentials at Liquid-Gas Interfaces from Vibrational Sum-Frequency Generation. *J Phys Chem C* **2019**,*123*,1279–1286.
- [B30] Richert, M.E., **Gochev, G.G.**, Braunschweig, B. Specific Ion Effects of Trivalent Cations on the Structure and Charging State of β -Lactoglobulin Adsorption Layers. *Langmuir* **2019**,*35*,11299–11307.
- [B31] Noskov, B.A., Bykov, A.G., **Gochev, G.**, Lin, S.-Y., Loglio, G., Miller, R., Milyaeva, O.Y. Adsorption layer formation in dispersions of protein aggregates. *Adv Colloid Interface Sci* **2020**,*276*,102086.
- [B32] Fainerman, V.B., Aksenenko, E.V., Makievski, A.V., Trukhin, D.V., Yeganehzad, S., **Gochev, G.**, Miller, R. Surface tension and dilational rheology of mixed β -casein – β -lactoglobulin aqueous solutions at the water/air interface. *Food Hydrocolloids* **2020**,*106*,105883.
- [B33] Noskov, B.A., Isakov, N.A., **Gochev, G.**, Loglio, G., Miller, R. Interaction of Fullerene C₆₀ with Bovine Serum Albumin at the Water – Air Interface. *Colloids Surfaces A* **2021**,*631*,127702.
- [B34] Scoppola, E., **Gochev, G.**, Drnec, J., Pithan, L., Novikov, D., Schneck, E. Investigating the Conformation of Surface-Adsorbed Proteins with Standing-Wave X-Ray Fluorescence. *Biomacromolecules* **2021**,*22*,5195–5203.

5. Wykaz osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3).

Nie dotyczy

6. Wykaz publicznych realizacji dzieł artystycznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3).

Nie dotyczy

7. Informacja o wystąpieniach na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

7.1. Wykłady na zaproszenie i wykłady plenarne:

- 7.1.1. β -Lactoglobulin at Liquid-Gas Interfaces.

G. Gochev, R. Miller, D. Exerowa, E. Scoppola, E. Schneck, R.A. Campbell, B.A. Noskov, B. Braunschweig.

8th Bubble & Drop Conference, Sofia, Bulgaria, **2019** (Keynote lecture).

- 7.1.2. β -Lactoglobulin at Liquid-Gas Interfaces.

G. Gochev.

Scientific seminar of the Jerzy Haber Institute of Catalysis and Surface Chemistry of the Polish Academy of Sciences, **2019** (Invited lecture).

- 7.1.3. β -Lactoglobulin Adsorption Layers at Water/Air Surface.

G. Gochev, L. Sagis, E.V. Aksenenko, V.B. Fainerman and R. Miller.

Workshop Dynamics of complex fluid-fluid interfaces, Monte Verità, Ascona, Switzerland, **2014** (Keynote lecture);

- 7.1.4. Colloid systems: interactions between surfaces.

G. Gochev.

14th European Student Colloid Conference, Golm/Potsdam, Germany, **2013** (Plenary lecture);

- 7.1.5. Oil-in-water Emulsion Films Stabilized by Polymeric Surfactants.

G. Gochev, D. Exerowa, T. Kolarov, Khr. Khristov, B. Leveck, Th. Tadros, Scientific seminar of Max-Planck-Institute of Colloids and Interfaces, Potsdam, Germany, **2010** (Invited lecture).

7.2. Wystąpienia ustne:

- 7.2.1. Effect of pH on the Stability of Protein Foams.

G. Gochev, B. Braunschweig, R. Campbell, E. Schneck, R. Miller

63rd Meeting PTChem, Łódź (on-line meeting), **2021**.

- 7.2.2. Chronicles of Foam Films.

G. Gochev, D. Platikanov, R. Miller, D. Exerowa

International conference "Smart and Green Interfaces" Sofia, Bulgaria, **2015**.

- 7.2.3. β -Lactoglobulin Adsorption Layers at Water/Air Surface: Adsorption, Surface Rheology and Foam Films

G. Gochev, I. Retzlaff, E.V. Aksenenko, V.B. Fainerman, D. Exerowa, R. Miller Conference EUFOAM, Thessaloniki, Greece, **2014**.

- 7.2.4. Adsorption Layers and Foam Films from β -Lactoglobulin.

G. Gochev, D. Exerowa, R. Miller

- Annual conference of the European Colloid and Interface Society, Sofia, Bulgaria, **2013**.
- 7.2.5. Role of Adsorption Layers and Foam Films on the Stability of Protein Foams.
G. Gochev, K. Engelhardt, B. Braunschweig, W. Peukert, R. Miller
Workshop ProcessNet, Quakenbrück, Germany, **2013**.
- 7.2.6. Adsorption Isotherm and Equation of State for β -Lactoglobulin Layers at the Air/Water Surface.
G. Gochev, I. Retzlaff, E.V. Aksenenko, V.B. Fainerman, R. Miller
Workshop COST CM 1101, Potsdam, Germany, **2013**.
- 7.2.7. Impact of Adsorption Layers and Thin Films on Stability of Protein Foams.
G. Gochev, A. Dan, K. Engelhardt, B. Braunschweig, W. Peukert, E. Mileva, D. Exerowa, R. Miller
Conference EUFOAM, Lisbon, Portugal, **2012**.
- 7.2.8. Emulsion Stability as Studied by Thin Liquid Films
G. Gochev, A.V. Makievski, D. Exerowa, Khr. Khristov, E. Mileva, L. Liggieri, G. Loglio, A. Javadi, J. Krägel, R. Miller
Workshop Trends in Colloid & Interface Science, Potsdam, Germany, **2011**.
- 8.** Informacja o udziale w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.
Nie dotyczy
- 9.** Informacja o uczestnictwie w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.
- 9.1. 2020: Wykonawca w projekcie “W poszukiwaniu efektywnych i przyjaznych środowisku spieniaczy i emulgatorów - ilościowy opis stabilności cienkich filmów ciekłych w roztworach ‘zielonych’ surfaktantów” (NCN OPUS 2017/25/B/ST8/01247)
- 9.2. 2019: Wykonawca w projekcie Międzynarodowej Wymiany Akademickiej: “Smart liquid/gas interfaces with photo-switchable surfactants” (NAWA-DAAD grant PPN/BIL/2018/1/00093)
- 9.3. 2017–2019: Wykonawca w projekcie “Structure-Property Relations in Aqueous Foam and Their Control on a Molecular Level” ([ERC-638278](#))
- 9.4. 2015–2017: Wykonawca w projekcie “The Physics of Non-Specific Interactions between Biomembranes” ([DFG-256222543](#))
- 9.5. 2011–2014: Wykonawca w projekcie tandemowym “Influence of proteins on the formation and stability of foams” ([DFG-199448917](#) within [DFG/AiF-Cluster 5](#))
- 9.6. 2010–2011: Wykonawca w projekcie “Stability of emulsion films” (PSKOLL 3835/ESA/FASES)
- 9.7. 2008–2010: Wykonawca w projekcie europejskim FP6 NANOPHEN (INCO-CT-2005-106696)
- 9.8. 2004–2006: Wykonawca w projekcie “Foam, emulsion and wetting films from polymeric surfactants” (Orafti (obecnie BENEIO-Orafti), Belgium)
- 10.** Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.
Nie dotyczy

11. Informacja o odbytych stażach w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.
 - June.2010: Krótkoterminowy staż naukowy “Interfacial properties of protein-surfactant mixed layers at the water/hexane interface and corresponding emulsion films” under COST-STSM-ECOST–D43-230210-000000, Max-Planck-Institut Kolloidów i Interfejsów (Wydział Interfejsów), Poczdam, Niemcy
12. Członkostwo w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.).
 - 12.1. Od lutego 2020 r.: członek rady redakcyjnej czasopisma “[Colloids and Interfaces](#)” (MDPI).
Redaktor gościnny wydania specjalnego “[Heterogeneous Interfacial Layers – Implications in Thin Liquid Films and Soft Colloids](#)” 2020/2021.
 - 12.2. Od stycznia 2021 r.: członek rady redakcyjnej czasopisma “[Advances in Colloid and Interface Science](#)” (Elsevier).
13. Informacja o recenzowanych pracach naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.
 - Recenzent czasopism naukowych wydawanych przez Elsevier, ACS, RSC, Wiley, Springer, MDPI, etc.; 27 recenzji zweryfikowanych w bazie [Publons](#) (19.12.2021).
14. Informacja o uczestnictwie w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.
Nie dotyczy
15. Informacja o udziale w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt. II.9.
Nie dotyczy
16. Informacja o uczestnictwie w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny.
Nie dotyczy

III. INFORMACJA O WSPÓŁPRACY Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM

1. Wykaz dorobku technologicznego.
Nie dotyczy
2. Informacja o współpracy z sektorem gospodarczym.
Nie dotyczy
3. Uzyskane prawa własności przemysłowej, w tym uzyskane patenty, krajowe lub międzynarodowe.
Nie dotyczy

4. Informacja o wdrożonych technologiach.
Nie dotyczy
5. Informacja o wykonanych ekspertyzach lub innych opracowaniach wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców.
 - Recenzent pracy doktorskiej Luis Maria Pérez-Mosqueda, Uniwersytet w Sewilli, Sewilla, Hiszpania, 2013 r.
6. Informacja o udziale w zespołach eksperckich lub konkursowych.
 - Członek międzynarodowego komitetu ekspertów przy obronie pracy doktorskiej Luisa Marii Péreza-Mosquedy, Uniwersytet w Sewilli, Sewilla, Hiszpania, 2014 r.
7. Informacja o projektach artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi.
Nie dotyczy

IV. INFORMACJE NAUKOMETRYCZNE

Profile autorskie w popularnych naukowych platformach internetowych:

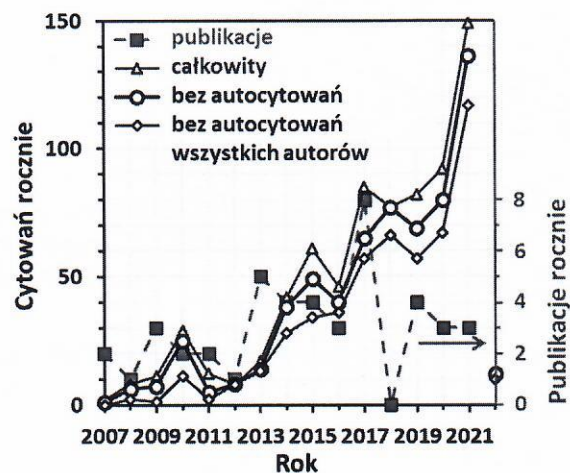
- ORCID ID: [0000-0001-5033-3194](https://orcid.org/0000-0001-5033-3194)
 - Scopus Autor ID: [56536754200](https://scopus.org/authid/detail/authid?cid=56536754200)
 - Web of Science/Publons Researcher ID: [N-6434-2019](https://publons.com/researcher/Georgi-Gochev/)
 - https://www.researchgate.net/profile/Georgi_Gochev (> 7,600 odczytów)
1. Informacja o punktacji Impact Factor (w dziedzinach i dyscyplinach, w których parametr ten jest powszechnie używany jako wskaźnik naukometryczny).

Mój dorobek publikacyjny obejmuje:

- 43 artykuły naukowe [H1-H9, B1-B34] opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR)*.
Sumaryczny impact factor IF jako suma wartości IF dla danego czasopisma (w roku wydania).
 $IF = IF_1 + IF_2 + IF_3 = \underline{159.57}$, gdzie:
 - ✓ $IF_1 = \underline{14.95}$ dla 7 artykułów oryginalnych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora
 - ✓ $IF_2 = \underline{94.09}$ dla 29 artykułów oryginalnych po uzyskaniu stopnia doktora
 - ✓ $IF_3 = \underline{50.53}$ dla 7 artykułów przeglądowych po uzyskaniu stopnia doktora
 - 9 rozdziałów w 6 książkach i 1 encyklopedii
2. Informacja o liczbie cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań ([Scopus](https://scopus.org) 19.12.2021):

• Całkowita liczba cytowań:	733
• <u>Liczba cytowań bez autocytowań:</u>	<u>632</u>
• Autocytowania	101
• Liczba cytowań bez autocytowań wszystkich autorów (71 współautorów):	509

Na rysunku przedstawiono ewolucję w czasie ilości cytowań publikacji [H1–H9, B1–B34,] (Scopus 19.12.2021).



3. Informacja o posiadanym indeksie Hirscha.

- h-index: **15**, bez autocytowań (*Scopus* 19.12.2021)

4. Informacja o liczbie punktów MNiSW.

- Liczba punktów przed 2017 r. (skala do 50 punktów): **715**

Źródła:

2010–2017: www.punktacjczasopism.pl

przed 2010: https://ekulczycki.pl/warsztat_badacza/jak-liczyc-punkty-za-publicacje-z-lat-1999-2012/

- Liczba punktów po 2017 (skala do 200 punktów): **1730**

Źródło: www.listymnisw.pl



PODPIS ZAUFANY
GEORGI
GOCHEV
21.12.2021 17:06:52 [GMT+1]
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

(podpis wnioskodawcy)