

УДК 577.3

## МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ИНАКТИВАЦИИ СПОР *BACILLUS SUBTILIS* И *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*

**И.В. Нога, В.М. Шаталов**

Донецкий национальный университет, ул. Щорса 46, Донецк, 83050. E-mail: nogainna@mail.ru  
30 июля 2007 г.

На основе разработанной ранее методики получены параметры линейной кинетики инактивации спор *Bacillus subtilis* и *Bacillus stearothermophilus*. Энергия активации оказывается сравнимой с характерной энергией стабилизации белков. Сопоставление активационных барьеров и изменений объемов для вегетативных и споровых форм показывает, что активированное состояние для деградации белков связано с разрывом сетки водородных связей и заполнением водой внутренних полостей белка.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** высокое давление, кинетика, инактивация, микроорганизмы, денатурация, белки.

В наших предыдущих работах [1-6] было проведено комплексное исследование совместного воздействия высокого давления  $P$  (до 600 МПа), температуры  $T$  (до 60°C) и времени обработки  $t$  (до 30 мин) на жизнеспособность некоторых микроорганизмов. Эти исследования направлены на создание фундаментальных основ технологии стерилизации продуктов питания высоким давлением, обладающей рядом преимуществ по сравнению с традиционными методами консервации [7]. В результате было установлено, что давление порядка 500 МПа является пороговым для инактивации выявленных микроорганизмов, в то время как содержание витамина С при этом меняется незначительно [1, 3]. Процессы инактивации микроорганизмов и деградации витамина С успешно воспроизводятся в рамках линейной кинетики, где реакцию биосистемы на всевозможные сочетания факторов давления, температуры и времени обработки определяет набор трех параметров в формуле Аррениуса – предэкспоненциальный множитель  $A$ , активационный барьер реакции  $U$  и изменение удельного объема  $\Delta V$  [2-4]. Наблюдаемая нелинейность в кинетике инактивации микроорганизмов, которая обычно приписывалась наличию барорезистивной части популяции, объясняется неравномерностью остывания нагретого при сжатии образца [5]. Нелинейность проявляется при временах малых по сравнению с характерным временем остывания, которое определяется геометрией камеры сжатия, отклонения от линейности растут с ростом давления обработки и скорости его подъема. Инактивация микроорганизмов высоким давлением может быть обусловлена сопутствующим ростом кислотности среды [6]. Однаковые для многих микроорганизмов критические значения давления ~500 МПа (при 25°C) или температуры стерилизации ~60°C (при  $P=0$ ) вызывают одинаковое уменьшение равновесного pH воды и соответствуют выходу за границы кислотного оптимума, полуширина которого составляет 1-2 единицы pH для большинства микроорганизмов.

Полученные результаты могут быть использованы для выбора оптимальных значений  $P$ ,  $T$  и  $t$  и создают предпосылки для разработки отсутствующих на данный момент стандартов технологии обработки продуктов питания высоким давлением. Однако с точки зрения биофизики высоких давлений остается неясным, насколько широк класс объектов, для которых применима использованная модель, какие микропроцессы лежат в основе инактивации давлением.

Целью настоящей работы является применение этой методики к описанию инактивации спор и обсуждение механизма инактивации через изменение гидратации белков под давлением. Данные по инактивации спор *Bacillus subtilis* [8] и *Bacillus stearothermophilus* [9] используются для получения кинетических параметров инактивации на основе разработанной в [1-3] методики. Сопоставления полученных параметров с другими известными результатами позволяет уточнить микроскопический механизм действия давления.

### МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ

Образцы с суспензией спор *Bacillus subtilis* ATCC 9372 подвергались воздействию высокого давления при разных температурах и временем выдержки [8], обработка осуществлялась двумя независимыми способами: с быстрым (5-30 с) и медленным (2.5-20 мин) подъемом давления. Затем из них готовились серии десятикратных разбавлений, которые высевались на питательный агар в

трех повторностях. Чашки с агаром инкубировались сутки при 37°C, после чего число выживших спор подсчитывалось по средним числам КОЕ/мл.

Споры *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 обрабатывались [9] в широком диапазоне давлений от 200 до 1400 МПа и температур от 90 до 130°C, в фосфорнокислом буферном растворе с pH=7.0. После обработки готовились серии разбавленных образцов и в двух повторностях высевались на стандартный питательный агар. Число выживших клеток определялось после 48 часов инкубации при 37°C.

Описывая кинетику инактивации мы исходим из того, что скорость деградации всего организма под действием высокого давления и температуры определяется, прежде всего, денатурацией белков [3]. Как показывает анализ экспериментальных данных [10], денатурация белков  $N \rightarrow D$  является процессом активационного типа, то есть проходит через образование некоторого неустойчивого промежуточного соединения, называемого активированным комплексом  $A^*$ :  $N \rightarrow A^* \rightarrow D$ . Внешние изменения температуры  $T$  и/или давления  $P$  выводят систему из термодинамического равновесия. При этом разность свободных энергий для перехода  $N \rightarrow D$  становится отличной от нуля  $\Delta G \neq 0$ , что стимулируют реакцию в прямом  $N \rightarrow D$  или обратном  $D \rightarrow N$  направлении при  $\Delta G < 0$  или  $\Delta G > 0$  соответственно. Как показывает опыт [10], скорости этих реакций достаточно малы, поэтому мы можем говорить о неполном термодинамическом равновесии [11] и воспользоваться формулой Аррениуса для константы скорости химической реакции  $k$ . Для учета действия давления к величине активационного барьера денатурации  $U$  следует добавить слагаемое, описывающее работу против внешних сил  $P\Delta V$ :

$$k = A \exp\left(-\frac{U + P\Delta V}{RT}\right), \quad (1)$$

где  $\Delta V$  – изменение удельного объема  $N$  при переходе  $N \rightarrow A^*$ . Если переход  $A^* \rightarrow D$  не связан с изменением объема, то  $\Delta V$  характеризует изменение удельного объема при денатурации  $N \rightarrow D$  и определяет смещение химического равновесия под давлением через изменение свободной энергии Гиббса

$$\Delta G = \Delta U - T\Delta S + P\Delta V. \quad (2)$$

При  $\Delta V < 0$   $\Delta G$  падает с ростом давления, что вызывает сдвиг химического равновесия в сторону увеличения конечного продукта  $D$  в полном соответствии с принципом Ле-Шателье. Если при некотором достаточно высоком давлении свободная энергия реакции становится отрицательной  $\Delta G < 0$ , то термодинамически равновесному состоянию отвечает полный переход системы из  $N$  в  $D$ . Скорость такого перехода определяется константой скорости (1), которая также зависит от давления через высоту барьера  $U + P\Delta V$ . Таким образом, внешнее давление  $P$  влияет на равновесное отношение концентраций в нативном  $N$  и денатурированном  $D$  состояниях через слагаемое  $P\Delta V$  в термодинамическом потенциале в (2), а также влияет на скорость денатурации через изменение активационного барьера  $U + P\Delta V$  в (1).

В том случае, когда образование активированного комплекса  $A^*$  связано со структурными превращениями, изменением числа степеней свободы и т.п., к активационному барьеру реакции  $U$  следует добавить энтропийное слагаемое –  $T\Delta S$ . Величина  $\Delta S$  – характеризует изменение энтропии для реакции  $N \rightarrow D$  (если только переход  $A^* \rightarrow D$  не связан с изменением энтропии) и определяет смещение химического равновесия при сдвиге температуры через изменение свободной энергии Гиббса (2) а также влияет на скорость денатурации через изменение активационного барьера  $U - T\Delta S$ . Условие  $\Delta G > 0$  определяет область стабильности (температурный оптимум) белка. Таким образом, температура  $T$  влияет на равновесное отношение концентраций в нативном  $N$  и денатурированном  $D$  состояниях через слагаемое  $-T\Delta S$  в термодинамическом потенциале в (2), а также влияет на скорость денатурации через изменение активационного барьера  $U - T\Delta S$ . Некоторая функциональная асимметрия по отношению к влиянию давления связана с делением суммарного активационного барьера  $U - T\Delta S + P\Delta V$  на  $RT$  в формуле Аррениуса. Однако изменение температуры  $\Delta T$  в актуальной области температурного оптимума белка мало по сравнению с самой температурой  $T$ . Следовательно, можно ожидать, что кривые выхода реакции в зависимости от давления будут подобны температурным зависимостям с тем лишь отличием, что изменение давления  $\Delta P$  для бароденатурации нельзя сделать отрицательным.

Инактивация микроорганизмов под действием повышенной температуры и давления рассматривается аналогично описанию кинетики денатурации белков как одноступенчатая химическая реакция. Под концентрацией реагирующего вещества будем понимать число микроорганизмов, выживших после обработки высоким давлением и повышенной температурой.

Изменение концентрации в зависимости от времени  $C(t)$  описывается уравнением распада, поскольку в отличие от денатурации белков инактивация микроорганизмов, как правило, необратима. В том случае, когда внешние параметры обработки продукта не зависят от времени,

$$C(t) = C_0 \exp(-kt). \quad (3)$$

Для обработки и анализа экспериментальных данных вводим безразмерный параметр  $x$  как комбинацию факторов  $P$ ,  $T$  и  $t$ , однозначно определяющих величину концентрации

$$C = C_0 \exp[-\exp(x)], \quad (4)$$

где

$$x = \ln \left[ -\ln \left( \frac{C}{C_0} \right) \right] = \ln(At) - \frac{1}{RT} (U + P\Delta V). \quad (5)$$

Записывая равенство (5) для каждой экспериментальной точки мы получаем переопределенную систему линейных уравнений с тремя неизвестными  $\ln(A)$ ,  $U$  и  $\Delta V$ , которую решаем методом наименьших квадратов. Ценность полученного решения заключается в том, что с помощью всего лишь трех параметров можно получить реакцию системы на любое сочетание внешних воздействий  $P$ ,  $T$  и  $t$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ

Для получения параметров инактивации спор *Bacillus subtilis* были использованы табличные данные [8], полученные в случае быстрого подъема давления. Для спор *Bacillus stearothermophilus* набор точек был восстановлен по отдельным графикам на Рис.3.2.3.3 из [9]. Эти данные по выживаемости спор под давлением были обработаны по вышеописанной методике. Полученные значения термодинамических параметров приведены в Табл. 1. Для сравнения рядом приведены полученные ранее параметры инактивации для мезофильно-аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАМ), выявленных в вишневом соке [3] и в яблочном пюре [4].

Табл.1. Рассчитанные параметры инактивации спор *Bacillus subtilis* и *Bacillus stearothermophilus* в сравнении с результатами для вегетативных форм

Объект	$\ln(A \cdot 1\text{сек})$	$U$ , ккал/моль	$\Delta V$ , мл/моль
Споры <i>Bacillus subtilis</i>	17.3	15.6	-9.97
Споры <i>Bacillus stearothermophilus</i>	18.6	17.8	-9.18
МАФАМ в вишневом соке [3]	13.5	15.9	-35.5
МАФАМ в яблочном пюре [4]	13.6	13.4	-25.1
Плесень в вишневом соке [3]	7.91	12.9	-38.7

На Рис. 1 и 2 рассчитанные с этими параметрами теоретические кривые сравниваются с усредненными по всем повторностям экспериментальными точками. В целом наблюдается вполне удовлетворительное согласие. Теоретические кривые правильно передают как масштабы изменения концентрации под давлением, так и тенденции, связанные с изменением температуры и времени обработки. Таким образом, возможности используемой кинетической модели не ограничиваются вегетативными формами [1-4].

Как видно из Табл. 1, значения активационного барьера  $U$  оказываются примерно одинаковыми для всех объектов. Можно предположить, что это одна и та же величина и, следовательно, активационный барьер инактивации различных микроорганизмов определяется одним и тем же процессом, не связанным с их размером, массой или формой. Как известно, значения свободной энергии стабилизации различных белков также разбросаны в весьма узком интервале (от 10 до 20 ккал/моль) [21] и явно не зависят от размеров белка. Приведенные в Табл. 1 значения энергии активации  $U$  попадают в указанный интервал для энергий стабилизации, что представляется весьма удивительным и заставляет думать, что одни и те же события на микроскопическом уровне ответственны как за стабилизацию структуры белков относительно распада  $N \rightarrow D$ , так и за переход в активированное состояние  $N \rightarrow A^*$ , из которого происходит спонтанная денатурация  $A^* \rightarrow D$ .

Значения изменения удельного объема  $\Delta V$  для всех объектов Табл. 1 по порядку величины совпадают с характерными значениями  $\Delta V$  для белков (см., например, [10]), что подтверждает наше предположение о том, что инактивация микроорганизмов обусловлена деградацией белков [3]. Величины  $\Delta V$  для разных вегетативных форм получились примерно одинаковыми. То же

## Моделирование кинетики инактивации спор *Bacillus subtilis* и...

самое можно сказать о спорах, причем  $\Delta V$  для спор заметно меньше. Это еще одно подтверждение связи инактивации микроорганизмов с деградацией белков, поскольку в спорах белки упакованы более плотно, в них отсутствуют или минимизированы полости, заполняемые водой при разворачивании.

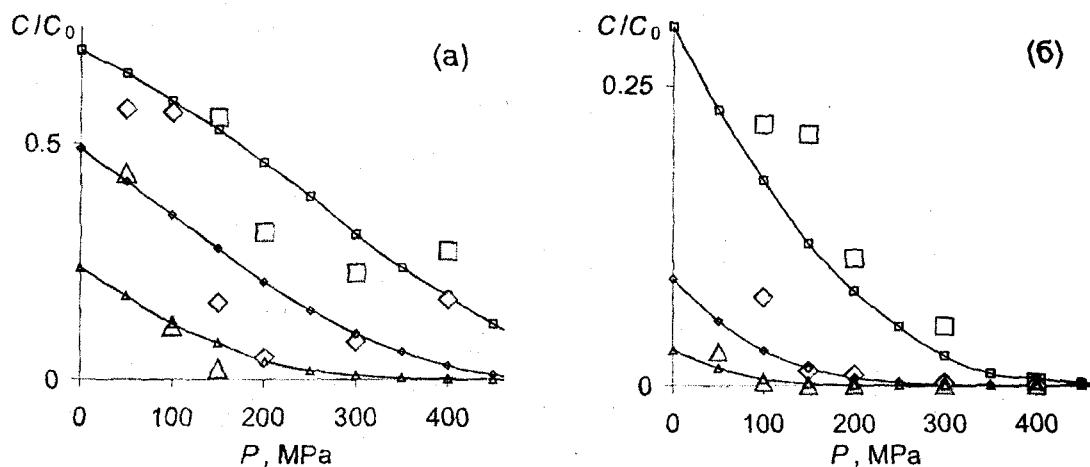


Рис. 1. Выживаемость (относительные числа КОЕ) спор *Bacillus subtilis* в зависимости от давления  $P$  при различных температурах  $T$  и временах обработки  $t$ , крупные маркеры – эксперимент [8], кривые с маркерами – расчет при тех же условиях:  
 а)  $T=30^\circ\text{C}$ ,  $\square - t=30$ ,  $\diamond - t=60$  и  $\Delta - t=120\text{мин}$ ;  
 б)  $T=60^\circ\text{C}$ ,  $\square - t=10$ ,  $\diamond - t=20$  и  $\Delta - t=30\text{мин}$ .

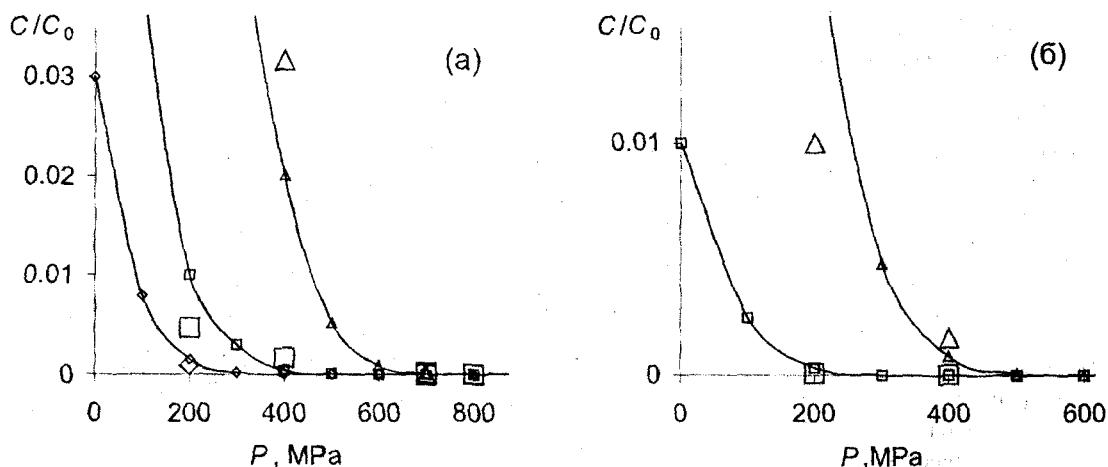


Рис. 2. Выживаемость (относительные числа КОЕ) спор *Bacillus stearothermophilus* в зависимости от давления  $P$  при различных температурах  $T$  и временах обработки  $t$ , крупные маркеры – эксперимент [9], кривые с маркерами – расчет при тех же условиях:  
 а)  $T=100^\circ\text{C}$ ,  $\Delta - t=5$ ,  $\square - t=10$ ,  $\diamond - t=15\text{мин}$ ;  
 б)  $T=110^\circ\text{C}$ ,  $\Delta - t=5$ ,  $\square - t=10\text{мин}$ .

Это наблюдение дает нам еще один довод в пользу того, что образование активированного состояния перед денатурацией белка  $N \rightarrow A^*$  связано с открытием доступа воды во внутренние полости белка, поскольку заполнение их водой дает основной вклад в уменьшение объема. После заполнения полостей становятся возможными макропреремещения пептидных цепей, что, по сути, и является денатурацией. Объем на этом шаге  $A^* \rightarrow D$  не меняется, поэтому изменение объема  $\Delta V$  при активации промежуточного состояния  $N \rightarrow A^*$  оказывается равным изменению объема для равновесной реакции  $N \rightarrow D$ . Таким образом, проведенный анализ помогает нам сделать выводы о микроскопических процессах, с которыми связана инактивация микроорганизмов давлением.

### ОБСУЖДЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ДАВЛЕНИЯ

Современный взгляд на структуру воды [12] заключается в том, что в ней существует единая трехмерная сетка водородных связей, соединяющих соседние молекулы. Устройство этой сетки не похоже на структуры каких-либо кристаллов, она структурно и динамически неоднородна, молекулы воды в ней непрерывно меняют своих соседей, так что среднее время жизни водородных связей составляет несколько пикосекунд. Гидрофобный эффект при растворении в воде неполярных молекул (типа неполярных газов) возникает из-за нарушения процесса объединения молекул окружающей воды и образования «полостей» в трехмерной сетке водородных связей вокруг гидрофобных молекул [13]. Гидрофобная гидратация сопровождается отрицательным изменением энталпии и отрицательным изменением энтропии из-за упорядочения водного окружения. Эти термодинамические факторы, в основном, взаимно компенсируются, но энтропийный вклад превалирует, что дает положительное изменение свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) и обуславливает плохую растворимость гидрофобных молекул в воде.

Гидратация очень важна для формирования трехмерной структуры и активности белков [14]. Сворачивание (фолдинг) белков зависит от тех же самых факторов, которые управляют *спланием* гидрофобных поверхностей, несовместимость между водой и гидрофобной поверхностью заставляет такие группы формировать гидрофобное ядро. Биологическая активность белков зависит от формирования двумерной сетки водородных связей, которая охватывает большую часть поверхности белка и объединяет все приповерхностные водные кластеры, образованные водородными связями [15]. Считается, что такая водная сетка может передавать информацию вокруг белка и управлять динамикой белка, например, движением его доменов.

Гидрофобные взаимодействия в белках обусловлены уменьшением энтропии при контакте неполярных групп с водой. Несовместимость гидрофобной поверхности с водой уменьшенной плотности, которая образуется над такой поверхностью, стимулирует минимизацию площади взаимодействия, что приводит к формированию третичной структуры белков. Движущей силой этого процесса является освобождение и выход воды, которая затем гидратирует другие центры в окружающей среде и увеличивает суммарную энтропию системы. Подобные факторы работают и при четвертичной организации белков. Таким образом, вода является неотъемлемым участником процесса сворачивания белков.

Присутствие воды является критичным не только для правильного сворачивания белков, но также и для сохранения их структуры. Считается, что денатурация (разворачивание) белков при нагреве и потеря ими биологической активности связаны с разрывом двумерной сетки из молекул воды, охватывающей белок, которая ограничивает или сдерживает вибрационную динамику белка [16]. Можно предположить, что необходимая для разрыва энергия определяет величину барьера  $U$  для перехода из нативного в активированное состояние  $N \rightarrow A^*$ . Тогда отмеченная выше независимость  $U$  от размера объекта свидетельствует о существовании критической величины конформационного искажения молекулы белка, достаточной для проникновения воды в глобулу. Показателем прочности сетки водородных связей может служить кислотность среды pH, которая влияет на скорость инактивации микроорганизмов (и денатурации белков) [6]. Величина pH понижается с ростом температуры и давления, что повышает вероятность разрыва.

Как известно, в случае термоденатурации белка соответствующее изменение свободной энергии  $\Delta G$  формируется совместными эффектами сворачивания/разворачивания и сопутствующими изменениями гидратации неполярных и полярных групп белка. Эти вклады в значительной мере компенсируют друг друга, так что свободная энергия стабилизации типичного белка  $\Delta G = \Delta H_{\text{nonpolar}} + \Delta H_{\text{polar}} - T\Delta S_{\text{nonpolar}} - T\Delta S_{\text{polar}}$  составляет всего 10-20 ккал/моль, тогда как изменения энталпии  $\Delta H_{\text{nonpolar}}$  и  $\Delta H_{\text{polar}}$  (и умноженные на температуру изменения энтропии  $T\Delta S_{\text{nonpolar}}$  и  $T\Delta S_{\text{polar}}$ ) могут различаться более чем на  $\pm 120$  ккал/моль [13, 17].

Суммируя аналогичным образом характерные изменения вкладов от разворачивания полярных и неполярных групп в случае бароденатурации, получаем энергию Гиббса для перехода белка из нативного в денатурированное состояние  $\Delta G = \Delta F_{\text{nonpolar}} + \Delta F_{\text{polar}} + P\Delta V_{\text{cavities}} + P\Delta V_{\text{nonpolar}} + P\Delta V_{\text{polar}}$ . Область давлений выше некоторого критического давления  $P > P_c$  соответствует денатурированному состоянию белка. Скорость денатурации при попадании системы в эту область определяется величиной активационного барьера, слагаемое  $U$  в котором одинаково для термо- и бароденатурации и связано с разрывом двумерной сетки водородных связей. Влияние давления на скорость денатурации определяется суммарным изменением объема при заполнении водой внутренних полостей белка и гидратации развернутых полярных и неполярных групп  $\Delta V = \Delta V_{\text{cavities}} + \Delta V_{\text{nonpolar}} + \Delta V_{\text{polar}}$ . Область существования нативного состояния  $P < P_c$  определяет оптимум активности белка под давлением. Очевидно, что  $P_c$  существенно

## Моделирование кинетики инактивации спор *Bacillus subtilis* и ...

---

меньше пороговых значений инактивации ( $\sim 500$  МПа для большинства микроорганизмов) Парадокс малого изменения удельного объема  $\Delta V$  в больших белковых молекулах [18] объясняется почти полной взаимной компенсацией вкладов от полярных  $\Delta V_{\text{polar}}$  и неполярных групп  $\Delta V_{\text{nonpolar}}$ .

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сукманов В.А., Соколов С.А., Нога И.В., Шаталов В.М., Жданов И.В., Волкова А.В. Оптимизация параметров обработки продуктов питания сверхвысоким давлением // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона: Межведомственный сборник научных работ. – Донецк: ДонНУ, 2003. – N.3. – С.238-247.
2. Нога И.В., Шаталов В.М., Сукманов В.А. Кинетическая модель деградации биомолекул под воздействием высокого давления и температуры // Физика и техника высоких давлений. – Донецк: ДонФТИ НАНУ, 2004. – Т.14, N.2. – С.74-85.
3. Нога И.В. Термодинамика воздействия высокого давления и температуры на микроорганизмы и витамины // Физика и техника высоких давлений. – Донецк: ДонФТИ НАНУ, 2006. – Т.16, N.3. – С.126-136.
4. Борисенко И.Н., Ветрова Е.В., Нога И.В., Панфилова Е.Г., Шаталов В.М. Инактивация микроорганизмов в яблочном пюре под действием высокого давления // Вісник Донецького університету, сер. А: Природничі науки. - Донецк: ДонНУ, 2006. – N 2. – С.375-377.
5. Нога И.В., Шаталов В.М. Причины нелинейности в кинетике инактивации микроорганизмов под давлением // Біофізичний вісник. – 2007. – Вип. 18 (1). - С. 90-95.
6. Нога И.В., Шаталов В.М. Рост кислотности среды под давлением как фактор инактивации микроорганизмов // Физика и техника высоких давлений. – Донецк: ДонФТИ НАНУ, 2007. – Т.17, N.2. – С.131-137.
7. Farr D. High pressure technology in the food industry // Trends Food Sci Technol. Int. – 1995. – 1. – P. 75-80.
8. Urzica A.C. High hydrostatic pressure inactivation of *Bacillus subtilis* var. niger. spores: the influence of the pressure build-up rate on the inactivation: Inag. – dis. – Heidelberg: Ruprecht-Karls-Univers., 2004. – 122 P.
9. Ardia A. Process Considerations on the Application of High Pressure Treatment at Elevated Temperature Levels for Food Preservation: Genehm. – dis. – Berlin: Technischen Univers., 2004. – 94 P.
10. Prehoda K. E., Mooberry E. S., Markley J. L. High Pressure Effects on Protein Structure, In *Protein Dynamics, Function and Design* (O. Jardetzky and J.-F. Lefevre , Eds.), NATO ASI Series, Plenum Press, 1998. – P.59-86.
11. Ландau Л.Д., Лишиц Е.М. Статистическая физика. – М.: «Наука», 1964. – 568с.
12. Маленков Г.Г. Структура и динамика жидкой воды // Журнал структурной химии. – 2006. – Т.47(Приложение). – С.S5-S35.
13. Финкельштейн А.В., Птицин О.Б. Физика белка/М.: КДУ, 2005. – 456 С.
14. Chaplin M. F. Opinion: Do we underestimate the importance of water in cell biology? // Nature Rev. Mol. Cell Biol. – 2006. – V.7. – P.861-866.
15. Smolin N., Oleinikova A., Brovchenko I., Geiger A., Winter R. Properties of spanning water networks at protein surfaces // J. Phys. Chem. B. – 2005. – V.109. – P.10995-11005.
16. Brovchenko I., Kruckau A., Smolin N., Oleinikova A., Geiger A., Winter R. Thermal breaking of spanning water networks in the hydration shell of proteins // J. Chem. Phys. – 2005. – V.123. – P.224905.
17. Makhtadze G. I., Privalov P. L. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics I. The enthalpy of hydration J. Mol. Biol. – 1993. – V.232. – P.639-657. Privalov P. L., Makhtadze G. I. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics II. The entropy and Gibbs energy of hydration // J. Mol. Biol. – 1993. – V. 232. – P.660-679.
18. Chalikian T. V., Breslauer, K. J. On Volume Changes Accompanying Conformational Transitions of Biopolymers // Biopolymers. – 1996. – V.39. – P.619-626.