

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ
АРМЕНИЯ

Հայաստանի քիմիական հանդես 62, №3-4, 2009 Химический журнал Армении

УДК 541.183

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ СОРБЦИИ БЕЛКОВ НА
ПОЛИМЕРСОДЕРЖАЩИХ СИЛИКАГЕЛЯХ

Г. Г. БАЛАЯН, Л. Э. ТКАЧЕНКО и С. Г. ГРИГОРЯН

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии
НАН Республики Армения

Институт тонкой органической химии им. А.Л.Мнджояна

Армения, 0014, Ереван, пр. Азатутян, 26

Факс: (374-10)285291, E-mail: grigstepan@yahoo.com

Поступило 15 VI 2009

Исследованы некоторые закономерности сорбции бычьего сывороточного альбумина (БСА) на силикагеле, модифицированном шитыми полимерами акриламида и акриловой кислоты. Выявлено время установления адсорбционного равновесия, получены изотермы адсорбции БСА на поверхности силикагелей при различных значениях pH среды.

Рис. 3, библиограф. ссылок 8.

Вопросы, связанные с сорбцией белков на различных типах высокодисперсных кремнеземов, представляют значительный теоретический и практический интерес в связи с широким использованием кремнеземных сорбентов в различных вариантах биохроматографии и биотехнологии, а также при получении новых лекарственных препаратов [1].

Информация, содержащаяся в литературе по сорбции белков на поверхности дисперсных кремнеземов, достаточно противоречивая, что связано с различными условиями приготовления образцов и различиями в структуре применяемых кремнеземных сорбентов. Предполагается, что силанольные группы поверхности кремнеземов участвуют в связывании белков с поверхностью силикагеля, и, в зависимости от pH среды, такое связывание может протекать как по ионному механизму с переносом протона, так и за счет образования водородных связей [2]. Показано также, что сорбция белков на поверхности кремнеземов (как гидрофобной, так и гидрофильной) может быть необратимой (хемосорбция) в зависимости от условий проведения процесса [3,4]. Проблемы, связанные с десорбцией, объясняются высокой энергией активации процесса из-за многоточечного связывания глобулы молекулы белка с

поверхностью силикагеля, в то время как для десорбции молекулы белка необходим одновременный разрыв всех связей [5]. В то же самое время имеются сведения о том, что обратимая сорбция более характерна для гидрофильной поверхности силикагеля [6]. При адсорбции белков на гидрофобной поверхности имеет место разворачивание глобул молекул белка. При сорбции на гидрофильной поверхности значительных изменений конформации макромолекул белков не наблюдается. При этом, если даже адсорбция белка является необратимой, заряд, величина молекул белка и химические свойства адсорбированных молекул белков одинаковы со свойствами молекул белка в растворе [3]. Указанное не относится к сохранению нативности адсорбированных молекул белков.

Сорбционная емкость дисперсных кремнеземов по отношению к различным белкам достаточно высокая. Закономерности сорбции белков определяются, главным образом, пористой структурой, химией поверхности адсорбента, а также размерами адсорбированных макромолекул и их химической структурой. Исследования по адсорбционному взаимодействию в системе пористый кремнезем – белок проводились, главным образом, на немодифицированных кремнеземах. Однако в настоящее время в биохроматографии и биотехнологии все возрастающий интерес представляют сорбенты, модифицированные полимерами, содержащими различные функциональные группы (композиционные сорбенты, сочетающие в себе достоинства кремнеземных и полимерных сорбентов) [7].

Целью настоящей работы является сравнительное исследование сорбции белка на поверхности модифицированного и немодифицированного силикагелей с различной пористой структурой.

Экспериментальная часть

В качестве исходного кремнеземсодержащего материала использовали макропористый силикагель с удельным объемом пор $\sim 1.0 \text{ см}^3/\text{г}$, средним диаметром пор 50 нм и размером частиц $100\text{--}160 \text{ мкм}$. Нанесение полимерных слоев (полиакриловая кислота и полиакриламид) проводили методом, описанным в [8]. В качестве модельного белка использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) с молекулярной массой ~ 68000 («Aldrich»). Мономеры перед полимеризацией очищались стандартными методами. В качестве сшивающего агента в обоих случаях использовался N,N'-метиленабисакриламид. Содержание полимера в обоих случаях составляло около 15% от массы силикагеля.

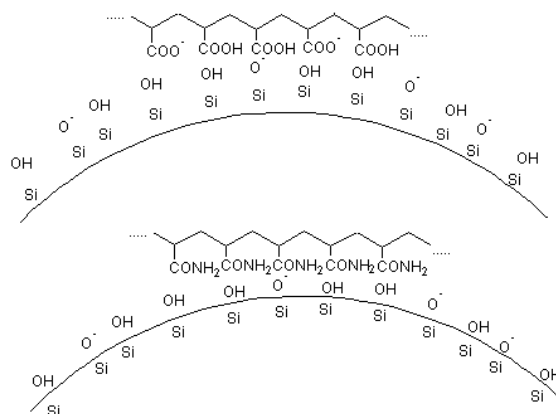


Схема поверхности силикагеля, модифицированного сшитыми полимерами акриловой кислоты и акриламида

Адсорбцию БСА исследовали в статическом режиме при комнатной температуре из водных растворов (соотношение раствор-адсорбент поддерживалось постоянным и равным 10 мл/100 мг). Величины адсорбции определяли по разности между исходной и равновесной концентрациями белка (после установления адсорбционного равновесия и последующего разделения твердой и жидкой фаз центрифугированием при 8000 об/мин). Исходную и равновесную концентрации БСА определяли с помощью спектрофотометра «Shimadzu UV-VIS 1202» при длине волны 260 нм.

Результаты и их обсуждение

Предварительные эксперименты показали, что время, необходимое для установления сорбционного равновесия в изученных системах, составляет ~5-7 ч (рис.1). При этом величины адсорбции, отнесенные к 1 г массы адсорбента, а также кинетика адсорбции мало зависят от размеров пор адсорбента (в исследованном интервале размера пор). Поэтому во всех последующих экспериментах разделение фаз и сорбционные измерения проводили по истечении 7 ч после смешивания компонентов.

Известно, что белки – это амфифильные соединения, содержащие как гидрофобные, так и гидрофильные аминокислотные остатки. Распределение амфифильных групп в объеме или на поверхности молекул белков определяет их гидрофобно-гидрофильные свойства. Гидрофильные свойства определяются ионизованными и неионизованными аминокислотными остатками. Поэтому гидрофильные свойства белков, а значит и величины адсорбции, должны зависеть от суммарного заряда глобул белка, следовательно, и pH среды. Используя 0.01 М растворы ацетатного и фосфатного буферов, были приготовлены растворы с различными значениями pH и изучена зависимость адсорбции БСА от pH среды.

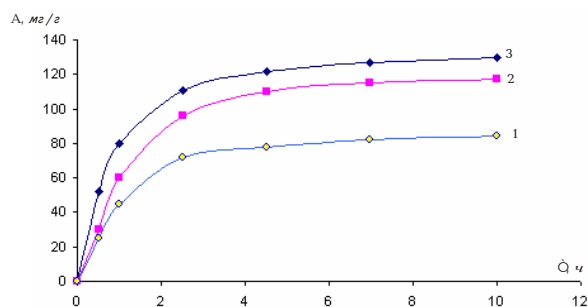


Рис. 1. Кинетика адсорбции БСА на немодифицированном силикагеле (1) и силикагеле, модифицированном полиакриловой кислотой (2) и полиакриламидом (3) (рН 7,0).

На рис. 2 представлены изотермы адсорбции альбумина на поверхности частиц немодифицированного силикагеля с диаметром пор 50 нм при рН 4.9 (изоэлектрическая точка БСА), 7.0 и 3.5. Наиболее сильное адсорбционное взаимодействие для исследуемой системы наблюдается при рН 4.9, оно несколько ослабевает при рН 7.0 и имеет минимальные значения в кислых средах.

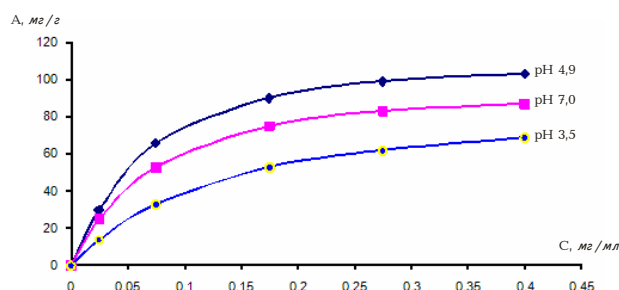


Рис. 2. Изотермы адсорбции БСА на силикагеле при различных значениях рН среды.

Полученная зависимость величин адсорбции молекул БСА от рН среды соответствует литературным данным для немодифицированных силикагелей. Уменьшение сорбции альбумина при рН 3.5 связано, вероятно, с высоким зарядом молекул белка. Это приводит к увеличению размера молекул белка за счет отталкивания заряженных участков молекул БСА и, следовательно, к уменьшению плотности упаковки в адсорбционном слое. Аминогруппы (RNH^+ и RN) и ROH -группы молекул БСА образуют с поверхностью силикагеля ионные ($\text{SiO}^- \dots \text{H}^+ \text{NR}$) или водородные связи ($\text{SiOH} \dots \text{NR}$, $\text{SiOH} \dots \text{OR}$). В щелочных средах молекулы БСА заряжены намного слабее, чем в кислых средах и, как следствие, вышеуказанные эффекты довольно незначительные. Величины адсорбции при рН 7.0 и близких к изоэлектрической точке альбумина практически одинаковы. Кроме того, нельзя исключить возможность частичной деформации макромолекул альбумина, адсорбированных на поверхности силикагеля в кислых средах, что приводит к увеличению поверхности, занятой сорбированными макромолекулами в адсорбционном слое.

Учитывая закономерности изменения структуры поверхности силикагеля при переходе от низких значений pH к более высоким значениям (появление и увеличение отрицательного заряда на поверхности с увеличением pH в результате диссоциации поверхностных силанольных групп), становится очевидным, что основной вклад в энергию адсорбционного взаимодействия связан с возможностью образования водородных связей между недиссоциированными силанольными группами поверхности силикагеля и функциональными группами макромолекул альбумина.

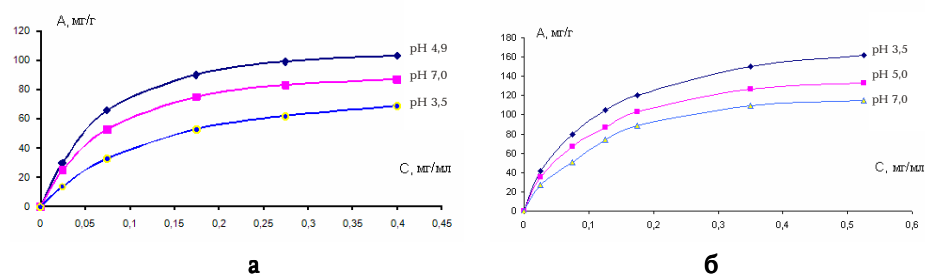


Рис. 3. Изотермы адсорбции БСА на силикагеле, модифицированном полиакриламидом (а) и полиакриловой кислотой (б).

На рис. 3 представлены изотермы адсорбции БСА на силикагеле со средним диаметром пор 50 нм, модифицированном сшитыми полиакриламидом (рис.3а) и полиакриловой кислотой (рис. 3б). Из этих рисунков следует, что в случае модифицированных силикагелей в пределах исследуемого интервала pH величины адсорбции заметно выше, чем в случае немодифицированного силикагеля. Вероятно, в этом случае так называемое гидрофобное взаимодействие между гидрофобными участками молекул белка и гидрофобно-ориентированной поверхностью модифицированного силикагеля оказывает дополнительное влияние на увеличение уровня сорбции. Для силикагеля, модифицированного полиакриламидом, влияние pH на уровень сорбции проявляется достаточно заметно. В случае полиакриловой кислотой, являющейся полиэлектролитом и диссоциирующей в водных средах, наибольший сорбционный уровень наблюдается также в кислых средах, с увеличением pH сорбция уменьшается. Вероятно, в кислых средах механизм сорбции основан на смешанном взаимодействии (ионном и гидрофобном) молекул БСА с поверхностью сорбента. Однако следует также отметить, что одни и те же группы (карбоксильная, аминная, гидроксильная) могут быть высоко- или низкогидрофильными в различных условиях их ионизации и концентрации, что может привести к изменению гидрофобно-гидрофильного баланса макромолекул белка и изменению механизма сорбционного взаимодействия.

**ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՍՈՐԲՅԻԱՅԻ ՈՐՈՇ ՕՐԻՆԱԶՄՓՈԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊՈԼԻՄԵՐ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ՄԻԼԻԿԱԶՈՂԵՐԻ ՎՐԱ**

Հ. Գ. ԲԱԼԱՅԱՆ, Լ. Է. ՏԿԱՉԵՆԿՈ և Ս. Գ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

Ուսումնասիրված են ցուլի սիճուկի ալբումինի (ՑՍԱ) սորբցիայի որոշ օրինաչափություններ՝ ակրիլամիդի և պոլիակրիլաթթվի կարված պոլիմերներով, մոդիֆիկացված սիլիկահողերի վրա: Որոշված է ադսորբցիոն հավասարակշռության գալու ժամանակը: Միջավայրի տարբեր pH-ների դեպքում ստացված են ադսորբցիայի իզոթերմեր ՑՍԱ-ի ադսորբցիայի համար սիլիկահողերի մակերեսի վրա:

**STUDY OF SOME REGULARITIES OF PROTEIN SORPTION ON
POLYMERCONTAINING SILICA GELS**

G. G. BALAYAN, L. E. TKACHENKO and S. G. GRIGORYAN

The Scientific and Technological Centre of Organic
and Pharmaceutical Chemistry NAS RA

A.L.Mnjoyan Institute of Fine Organic Chemistry

26 Azatutyan ave., Yerevan, 0014, Armenia

Fax: (374 – 10)285291, E – mail: grigstepan@yahoo.com

Kinetics study of bovine serum albumin (BSA) sorption on unmodified macroporous silica gel and silica gel modified by poly(acryl amide) and poly(acrylic acid) has shown that adsorption equilibrium in these systems is attained after 5-7h regardless of adsorbent surface nature. In case of modified silica gel inside the studied pH range (3.8, 4.9, 7.0) BSA sorption is significantly higher than in case of unmodified silica gel which can be explained by additional hydrophobic interaction between hydrophobic parts of protein molecules and hydrophobic oriented part of the modified sorbent surface.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Черкасов А.Н., Пасечник Б.А.* Мембраны и сорбенты в биотехнологии. Л., Химия, 1991, с. 5.
- [2] *Айлер Р.* Химия кремнезема. Часть 2, М., Мир, 1982, с. 1147.
- [3] *Казакова О.А., Гунько В.М., Воронин Е.Ф., Сильченко С.С.* // Коллоидный журнал, 1998, т. 60, №5, с. 613.
- [4] *Lindan G., Rhodius R.* // Z. Phys. Chem., A, 1966, v. 172, p. 321.
- [5] *Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм Б.Д.* Поверхностные явления в белковых системах. М., Химия, 1988, с. 85.
- [6] *Barthel H* // Colloid Surf., A., 1995, v. 101, p. 217.
- [7] US Patent 7018538, 2006.
- [8] *Айрапетян С.М., Балекаев А.Г., Ткаченко Л.Э., Балаян Г.Г.* // Хим. ж. Армении, 2007, т.60, №5, с. 981.