

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ  
ПОВЕРХНОСТНЫХ ЯВЛЕНИЙ

УДК 544.723

АДСОРБЦИЯ ЛИЗОЦИМА КРЕМНЕЗЕМНЫМИ  
И АЛЮМОСИЛИКАТНЫМИ АДСОРБЕНТАМИ

© 2021 г. Л. Ф. Атякшева<sup>а,\*</sup>, О. С. Пилипенко<sup>а</sup>, Б. Н. Тарасевич<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

\*e-mail: Atyaksheva@phys.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 12.03.2020 г.

После доработки 08.06.2020 г.

Принята к публикации 23.06.2020 г.

Исследована адсорбция лизоцима на бипористом кремнеземе, силикалите-1 (кремнезем со структурой цеолита MFI), цеолите ZSM-5 и двух образцах галлуазита (природные алюмосиликатные нанотрубки). Получены изотермы адсорбции, определены предельные величины адсорбции и площади на поверхности адсорбента, приходящиеся на одну молекулу фермента. Максимальная величина адсорбции в расчете на единицу массы адсорбента (350 мг/г) получена на бипористом кремнеземе, а в расчете на единицу поверхности (0.962 мг/м<sup>2</sup>) – на галлуазите.

*Ключевые слова:* лизоцим, галлуазит, силикалит-1, цеолит ZSM-5, бипористый кремнезем, изотермы адсорбции

DOI: 10.31857/S0044453721010039

Интерес к иммобилизованным ферментам обусловлен их применением в качестве гетерогенных катализаторов, компонентов биосенсоров, в медицине для направленной доставки лекарств. В качестве носителей для ферментов используют органические и неорганические материалы, в том числе различные кремнеземные и алюмосиликатные адсорбенты. Среди исследуемых ферментов лизоцим занимает особое положение по нескольким причинам. Молекула лизоцима компактна и достаточно устойчива. Размеры боковой части молекулы  $3 \times 4.5$  нм, а концевой –  $3 \times 3$  нм, газокинетический диаметр молекулы 3.5 нм [1]. Топография поверхности белковой глобулы неоднородна: на различных участках формируются полярные или гидрофобные области [2], создавая соответствующие контактные участки для адсорбционного взаимодействия. Небольшой размер молекулы ( $M_R \sim 14000$ ), неоднородность топографии поверхности и наличие различных контактных участков, способных взаимодействовать с поверхностью адсорбента, обеспечивает лизоциму хорошие перспективы в качестве адсорбата. Лизоцим интересен также тем, что разрушает оболочку стенок бактерий и его можно использовать для получения антибактериальных препаратов. Например, для ферментативного разрушения бактериальных клеток использован лизоцим, адсорбированный на цеолите NaY [3]. Композит, полученный адсорбцией лизоцима на цеолите MFI, синтезированном на поверхности

пластины из кремния, предложено использовать как антибактериальное покрытие для имплантируемых устройств [4]. В качестве антибактериального средства использовали также композит на основе полилактида и лизоцима, инкорпорированного в нанотрубки галлуазита [5]. К настоящему времени опубликованы результаты исследований адсорбции лизоцима на мезопористых молекулярных ситах [6–9], наночастицах кремнезема [10], силихроме [11], кремнеземных адсорбентах с бимодальным распределением пор [12–14], на цеолитах [3, 15, 16], алюмосиликатных [5] и углеродных [17] нанотрубках. Цель данного исследования – провести адсорбцию лизоцима в одинаковых условиях и сравнить адсорбционные свойства нескольких алюмосиликатных и кремнеземных материалов.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

*Адсорбенты.* В работе исследовали адсорбенты, некоторые свойства которых приведены в табл. 1.

Силикалит-1 и кремнезем с бимодальным распределением пор (бипористый) были синтезированы по стандартным методикам. Образцы галлуазита получены от ООО “МТиМ”. Использовали также высококремнистый цеолит ZSM-5 и широкопористый силихром промышленного производства. На рис. 1 показаны электронные микрофотографии некоторых исследованных образцов.

**Таблица 1.** Параметры пористой структуры исследованных адсорбентов

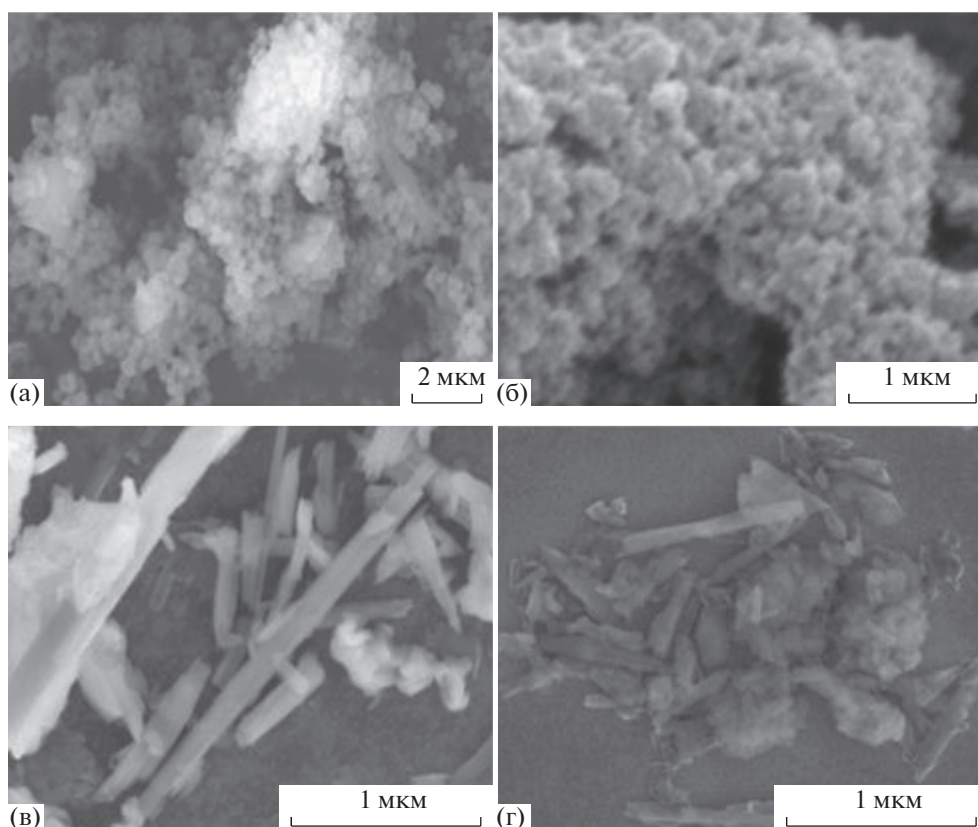
Адсорбент	$S_{\text{БЭТ}}, \text{м}^2/\text{г}$	$S_{\text{микро}}, \text{м}^2/\text{г}$	$S_{\text{БЭТ}} - S_{\text{микро}}, \text{м}^2/\text{г}^*$	$V, \text{см}^3/\text{г}$	$V_{\text{микро}}, \text{см}^3/\text{г}$
Силикалит-1	370	240	130	0.25	0.11
Цеолит ZSM-5	405	240	165	0.27	0.12
Бипористый кремнезем	800	50	750	1.8	0.01
Галлуазит (Hal-1)	28	2	26	0.14	0.001
Галлуазит (Hal-2)	50	7	43	0.15	0.003
Силохром	40	—	40	—	—

\* Использована при расчете адсорбции белков на единицу поверхности.

Остановимся кратко на их характеристиках. Силикалит-1 — это кремнеземный материал со структурой цеолита MFI, обладающий гидрофобными свойствами. Размер кристаллов исследованного образца 0.3 мкм (рис. 1а). Галлуазит — глинистый минерал, обладающий уникальной кристаллической структурой. Он состоит из слоев оксидов алюминия и кремния, закрученных в трубки, причем слой кремнезема находится на внешней стороне нанотрубки, а слой оксида алюминия — на внутренней.

Исследованные образцы галлуазита различаются по длине и диаметру нанотрубок, а также по

величине удельной поверхности. Длина нанотрубок образца Hal-1 (рис. 1в) находится в пределах 0.4–4 мкм, а образца Hal-2 (рис. 1г) — в пределах 0.2–2 мкм. Внутренние диаметры нанотрубок составляют 20–60 нм и 10–40 нм соответственно для Hal-1 и Hal-2. Полученное из изотерм низкотемпературной адсорбции-десорбции азота распределение объемов пор по их размерам (рис. 2б), согласуется с этими результатами. Максимумы на кривых соответствуют 50 нм для образца Hal-1 и 12.5 нм — в случае образца Hal-2. Кремнезем с бимодальным распределением пор состоит из агломератов сферических частиц (рис. 1б), размеры



**Рис. 1.** Электронные микрофотографии адсорбентов: а — силикалит, б — бипористый кремнезем, в — галлуазит-1, г — галлуазит-2.

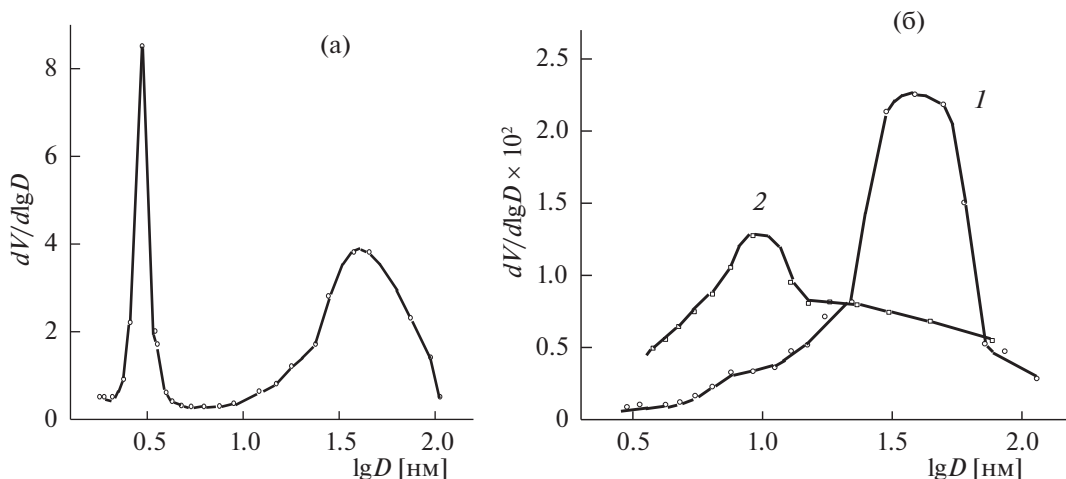


Рис. 2. Распределение объемов пор по их размерам: а – бипористый кремнезем, б – галлуазит-1 (1) и галлуазит-2 (2).

которых 100–350 нм. Максимумы на кривых распределения объемов пор по их размерам (рис. 2а) соответствуют порам 3 и 45 нм.

**Адсорбция.** Исследована адсорбция лизоцима (КФ 3.2.1.17), выделенного из яичного белка ( $M_R = 14300$ , рИ 11). Использовали препарат производства НПО “Биохимреактив”, полученный в виде лиофильного порошка. Содержание белка в препарате, определенное нами методом Брэдфорда, составляет 52%.

**Адсорбционные измерения.** Адсорбцию проводили из водных растворов лизоцима при температуре  $6 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 3 суток. Концентрацию фермента в исходных растворах варьировали в пределах 0.05–2 мг/мл. Навески адсорбента массой 50–100 мг помещали в стеклянные бюксы, добавляли по 3–5 мл раствора с разным содержанием белка и оставляли в холодильнике. По достижению адсорбционного равновесия определяли концентрацию белка в контактном растворе. Величину адсорбции находили исходя из начальной и текущей концентраций белка. Полученные гетерогенные образцы отделяли от раствора, промывали несколько раз небольшими порциями воды, добавляли по 5 мл воды и оставляли в холодильнике на трое суток для проверки обратимости адсорбции. Из концентрации белка в контактном растворе рассчитывали величину десорбции. Величина десорбции белка возрастает с увеличением степени заполнения поверхности и зависит от природы адсорбента. Полученные величины лежат в пределах 1–4% с поверхности силикалита-1 и цеолита ZSM-5, не превышает 8% в случае бипористого кремнезема и достигают 10–20% с поверхности нанотрубок галлуазита.

**Определение концентрации белков в растворе.** Для определения концентрации белка использовали спектрофотометрический метод анализа.

Измерение оптической плотности ( $A_{280}$ ) проводили в пластиковых кюветах 0.5 см при  $\lambda = 280$  нм на спектрофотометре GENESIS-5. Калибровочные графики строили, используя растворы бычьего сывороточного альбумина.

**Физико-химические методы исследования.** Характеристики пористой структуры исходных образцов галлуазита и образцов после адсорбции лизоцима определяли из изотерм низкотемпературной адсорбции-десорбции азота, полученных на порометре ASAP 2020 (Micromeritics, США). Электронно-микроскопические изображения образцов получены методом сканирующей электронной микроскопии с использованием электронного микроскопа Leo Supra 50VP (Германия). ИК-спектры поглощения образцов регистрировали на ИК-спектрометре с преобразованием Фурье IR200 (ThermoNicolet), разрешение  $2\text{ см}^{-1}$ . Образцы прессовали в таблетки с KBr.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из приведенных на рис. 3 изотерм адсорбции видно, что максимальные количества лизоцима адсорбируются на галлуазите, а минимальные – на цеолитах. На силикалите-1 (кремнезем со структурой цеолита MFI), цеолите ZSM-5 и галлуазите (Hal-2) получены изотермы L-типа, обработкой которых в линейных координатах уравнения Ленгмюра рассчитаны предельные величины адсорбции (табл. 2). В случае бипористого кремнезема и образца галлуазита Hal-1 получены ступенчатые изотермы адсорбции. Сложный вид изотерм может быть обусловлен присутствием на поверхности адсорбента нескольких типов адсорбционных центров. Спряжением этих изотерм в интервале концентраций после перегиба также определены предельные адсорбции.

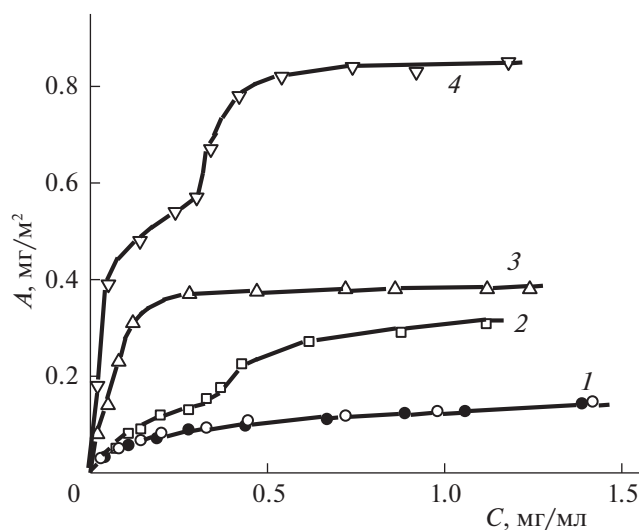


Рис. 3. Изотермы адсорбции ( $A$ ) лизоцима из водных растворов: 1 - на цеолите ZSM-5 (○) и силикалите-1 (●), 2 - на бипористом кремнеземе, 3 - на галлуазите-2, 4 - на галлуазите-1.

Двухступенчатые изотермы получены нами ранее при адсорбции гемоглобина на бипористых кремнеземах [18]. Изотермы L-типа получены при адсорбции лизоцима на цеолитах NaY [3, 15]. Предельные величины адсорбции, найденные авторами [3, 15] обработкой изотерм в линейных координатах уравнения Ленгмюра, близки к полученным нами результатам и изменяются от 13.5 мг/г [3] до 35 мг/г [15].

В табл. 2 приведены площадки, приходящиеся на одну молекулу лизоцима на поверхности исследованных адсорбентов, рассчитанные из предельной величины адсорбции и поверхности ( $S_{\text{БЭТ}} - S_{\text{микро}}$ ). Минимальные значения (24 и 25  $\text{nm}^2$ ) получены при адсорбции лизоцима на силохроме и галлуазите со средним диаметром нанотрубок 50 нм. При pH 11 (изоэлектрическая точка фермента) площадка молекулы лизоцима

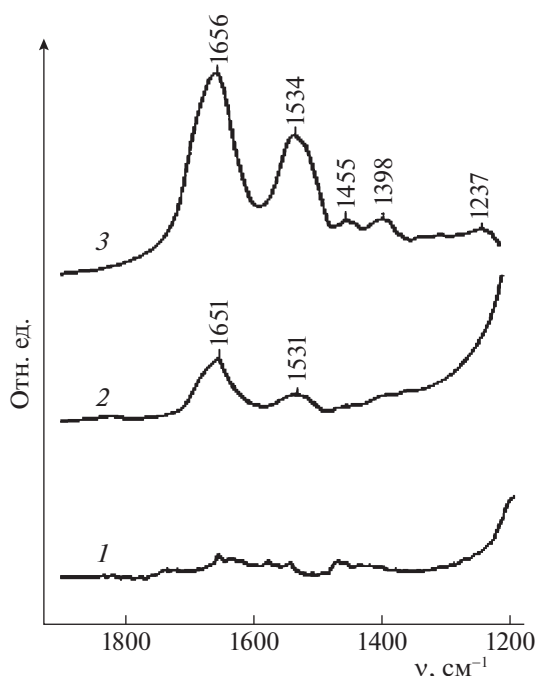
составляет 13.5  $\text{nm}^2$  (теоретический размер боковой грани), и возрастает до 26.6  $\text{nm}^2$  при значении pH 4 [19]. При адсорбции лизоцима на силохроме ( $S_{\text{БЭТ}}$ , 120  $\text{m}^2/\text{г}$ ) при различных значениях pH площадка молекулы на поверхности, рассчитанная из величины адсорбции, уменьшается от 24  $\text{nm}^2$  (pH 6) до 14  $\text{nm}^2$  (pH 10) [11]. Полученные нами результаты свидетельствуют, что на галлуазите с достаточно большим диаметром нанотрубок, так же, как и на широкопористом силохроме, вся поверхность адсорбента доступна для адсорбции лизоцима. На силикалите-1 и цеолите лишь незначительная часть поверхности (менее 20%) доступна для адсорбции молекул белка.

Остановимся более подробно на адсорбции лизоцима на двух образцах галлуазита. Предельные величины адсорбции на образцах в расчете на единицу поверхности отличается вдвое. Различный вид изотерм адсорбции на этих образцах может свидетельствовать о наличии нескольких типов взаимодействия белка с поверхностью адсорбента. Особенность строения алюмосиликатных нанотрубок приводит к тому, то внутренняя поверхность (оксид алюминия) заряжена положительно, а внешняя (оксид кремния) — отрицательно [20]. Считается, что молекулы с избыточным отрицательным зарядом адсорбируются на внутренней поверхности нанотрубок галлуазита, а заряженные положительно — на его внешней поверхности [21]. В нейтральных водных растворах молекула лизоцима заряжена положительно (pH < pI), поэтому адсорбция на внешней поверхности предпочтительнее. Можно предположить, что на образце Hal-2 адсорбция идет только на внешней поверхности. В случае образца Hal-1 при небольших концентрациях белка (до точки перегиба на изотерме) адсорбция также происходит в основном на внешней поверхности нанотрубки. Однако адсорбция белков обусловлена не только электростатическими взаимодействиями. Нельзя не учитывать ван-дер-ваальсовы силы, гидрофобные взаимодействия и возможность об-

Таблица 2. Предельные величины адсорбции и площадки, приходящиеся на молекулу лизоцима на поверхности адсорбента

Адсорбент	Предельная адсорбция		$S_{\text{молек}}$ , $\text{nm}^2$	$\Delta$ , %
	мг/г	мг/ $\text{m}^2$		
Силикалит-1	24	0.185	128	19
Цеолит ZSM-5	30	0.182	130	19
Бипористый кремнезем	350	0.467	50	48
Галлуазит (Hal-1)	25	0.962	25	98
Галлуазит (Hal-2)	19	0.442	54	45
Силохром	39	0.975	24	100

Обозначения:  $\Delta$  — доля занятой поверхности.



**Рис. 4.** ИК-спектры галлаузита до (1) и после (2) адсорбции лизоцима и лизоцима (3) в области полос Амид I и Амид II.

разования водородных связей с гидроксильными группами на внутренней поверхности нанотрубки галлаузита. Внутренний диаметр нанотрубок образца Hal-2, по-видимому, препятствует свободному проникновению молекул лизоцима внутрь нанотрубки. Диаметр нанотрубок образца Hal-1 позволяет молекулам белка проникать внутрь нанотрубки и адсорбироваться на внутренней поверхности. В результате меняется вид изотермы и величина адсорбции белка.

На рис. 4 показаны спектры лизоцима и галлаузита до и после адсорбции в области 1900–1200  $\text{cm}^{-1}$ . В спектре лизоцима (спектр 3) присутствуют полосы Амид I (1656  $\text{cm}^{-1}$ ) и Амид II (1534  $\text{cm}^{-1}$ ). Полоса Амид I возникает в результате взаимодействия валентных колебаний C=O и деформационных колебаний N–H в пептидной группе, на контур этой полосы влияет вторичная структура белковых макромолекул. Полоса Амид II возникает по причине деформационных колебаний связей N–H и также чувствительна к вторичной структуре макромолекул белка. В результате адсорбции макромолекул лизоцима на галлаузите в ИК-спектре образца (спектр 2) появляются полосы поглощения Амид I и Амид II. При этом наблюдается смещение максимумов поглощения в длинноволновую сторону – к 1651 и 1531  $\text{cm}^{-1}$ . Смещение максимумов Амид I и Амид II в ИК-спектре на 3–5  $\text{cm}^{-1}$  свидетельствует о незначи-

тельных изменениях во вторичной структуре белка в результате адсорбции.

Таким образом, проведенное исследование показало, что наибольшей адсорбционной емкостью в отношении лизоцима (0.962  $\text{mg}/\text{m}^2$ ) обладает образец галлаузита Hal-1, диаметр нанотрубок которого позволяет молекулам белка адсорбироваться на внешней и на внутренней поверхности. При адсорбции только на внешней поверхности нанотрубок (образец Hal-2) предельная адсорбция составляет 0.442  $\text{mg}/\text{m}^2$ . Это близко к величине адсорбции на бипористом кремнеземе (0.467  $\text{mg}/\text{m}^2$ ), который адсорбирует максимальное количество лизоцима в расчете на единицу массы адсорбента – 350  $\text{mg}/\text{g}$ . При адсорбции на цеолите ZSM-5 и силикалите-1 белок занимает менее 20% доступной поверхности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kharakoz D.P., Sarvazzyan A.P. // *Biopolymers*. 1993. V. 33. P. 11.
2. Lee B., Richards F.M. // *J. Mol. Biol.* 1971. V. 55. P. 379.
3. Lee S.Y., Show P.L., Ko C.-M., Chang J.-K. // *Biochem. Eng. J.* 2019. V. 141. P. 210. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.10.116>
4. Avery K.L., Peixoto C., Barsellona M. et al. // *Materials Today Communications*. 2019. V. 19. P. 352. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.03.004>
5. Bugatti V., Sorrentino A., Gorrasi G. // *Eur. Polym. J.* 2017. P. 495. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.06.24>
6. Vinu A., Murugesan V., Hartmann M. // *J. Phys. Chem. B*. 2004. V. 108. P. 7323. <https://doi.org/10.1021/jp037303a>
7. Diao X., Wang Y., Zhao J., Zhu S. // *Chin. J. Chem. Eng.* 2010. V. 18. P. 493. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(10\)60248-0](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(10)60248-0)
8. Katiyar A., Ji L., Smirniotis P., Pinto N.G. // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1069. P. 119. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.077>
9. Santos S.M.L., Cecilia J.A., Vilarrasa-García E. et al. // *Microporous Mesoporous Mater.* 2016. V. 232. P. 53. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.06.004>
10. Galdino F.E., Picco A.S., Sforca M.L. et al. // *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020. V. 186. P. 110677. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110677>
11. Пилипенко О.С., Атякшева Л.Ф., Крючкова Е.В., Чухрай Е.С. // *Журн. физ. химии*. 2012. Т. 86. С. 1417. Pilipenko O.S., Atyaksheva L.F., Kryuchkova E.V., Chukhray E.S. // *J. Phys. Chem. A*. 2012. V. 86. P. 1401. <https://doi.org/10.1134/S0036024412080109>
12. Tortajada M., Ramon D., Beltran D., Amoros P. // *J. Mater. Chem.* 2005. V. 15. P. 3859. <https://doi.org/10.1039/b504605j>
13. Yang X., Liao Z.-X., Li Y.-X., Du. L. // *Microporous Mesoporous Mater.* 2011. V. 143. № 1–2. P. 263. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2011.02.027>

14. *Li J., Fan N., Wang X., He Z.* // Mater. Sci. Eng. C. 2017. V. 76. P. 509.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmsec.2017.03.096>
15. *Chang Y.-K., Hiang R.-Z., Lin S.-Y. et al.* // Biochem. Engineering J. 2006. V. 28. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.029>
16. *Matsui M., Kiyozumi Y., Mizushima Y. et al.* // Separation and Purification Technology. 2015. V. 149. P. 103.  
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.05.023>
17. *Enayatpour B., Rajabi M., Moradi O. et al.* // J. Molecular Liquids. 2018. V. 254. P. 93.  
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01/079>
18. *Атякшева Л.Ф., Добрякова И.В., Иванова И.И. и др.* // Журн. физ. химии. 2012. Т. 86. С. 539.  
<https://doi.org/10.1134/S0036024412030041>
19. *Su T.I., Lu J.R., Thomas R.R. et al.* // Langmuir. 1998. V. 4. P. 438.
20. *Joussein E., Churchman J., Petit S., Theng B.K.G.* // Clay Miner. 2005. V. 40. P. 383.  
<https://doi.org/10.1180/0009855054040180>
21. *Tully J., Yendluri R., Lvov Y.* // Biomacromol. 2016. V. 17. P. 615.  
<https://doi.org/10.1021/asc.biomac.5b01542>