

УДК 541.183

АДСОРБЦИЯ БЕЛКОВ НА ОСАЖДЕННОМ ВЫСОКОПОРИСТОМ КРЕМНЕЗЕМЕ И СИЛИКАГЕЛЕ

Т.Д. Хохлова, Ю.С. Никитин

(кафедра физической химии; e-mail: adsorption@phys.chem.msu.ru)

Сопоставлены адсорбционные свойства в отношении белков осажденного высокопористого кремнезема КВП-51 с удельной поверхностью $580 \text{ м}^2/\text{г}$ и кажущейся плотностью $0,26 \text{ г}/\text{см}^3$ и силикагеля КСС-3 с близкой удельной поверхностью ($600 \text{ м}^2/\text{г}$), но в 2 раза большей кажущейся плотностью ($0,53 \text{ г}/\text{см}^3$). Измерены изотермы и кинетика адсорбции трех белков. Предельная адсорбция γ -глобулина ($M 150\ 000$) и гемоглобина ($M 64\ 000$) на КВП-51 примерно в 10 и 5 раз больше, чем на КСС-3, а для белка с наименьшей молекулярной массой ($M 14\ 000$) она примерно одинакова. На обоих кремнеземах кинетические зависимости характеризуются двумя участками со значительно различающимися скоростями адсорбции.

Ранее была рассмотрена сорбция белков на сериях силикагелей и силохромов [1, 2]. Силохромы, получаемые из непористого кремнезема аэросила [3], имеют заметно большие удельные объемы пор, чем силикагели, синтезированные золь-гель методом [4]. Было показано, что вследствие большей доступности внутренней поверхности емкость силохромов по адсорбированным [1] и ковалентно иммобилизованным [2] белкам заметно больше, чем емкость силикагелей. В данной работе проведено сравнение адсорбции белков на двух кремнеземах с близкой удельной поверхностью, но разной пористостью: на синтезированном из жидкого стекла осажденном высокопористом кремнеземе и на промышленном силикагеле.

Экспериментальная часть

Высокопористый дисперсный кремнезем (КВП-51) синтезирован из раствора жидкого стекла осаждением серной кислотой [1]. Для сравнения с ним был взят промышленный силикагель марки КСС-3, получаемый методом золь-гель [4]. Размер частиц обоих кремнеземов менее 80 мкм . Удельная поверхность кремнеземов $S, \text{ м}^2/\text{г}$ измерена методом тепловой десорбции азота [6] на установке Газометр ГХ-1. Кажущаяся плотность после уплотнения $\rho_i, (\text{г}/\text{см}^3)$ определена по ГОСТ 21119.6-92. Суммарный удельный объем пор $V_\Sigma, (\text{см}^3/\text{г})$ рассчитан из соотношения истинной плотности кремнезема $\rho = 2,2 (\text{г}/\text{см}^3)$ и кажущейся $\rho_i, (\text{г}/\text{см}^3)$ по формуле: $V = 0,66/\rho_i - 1/\rho$, где $0,66$ – коэффициент упаковки частиц [7]. Удельный объем мезопор V_m измерен по капиллярной конденсации бензола при выдерживании навески кремнезема в парах бензола в эксикаторе в течение 10 дней. Средний диаметр пор D_{cp} (нм) рассчитан по формуле

$D_{cp} = 4 V_\Sigma/S$, а диаметр мезопор D_m по формуле $D_m = 4 V_m/S$. Для адсорбции взяты белки фирмы "Sigma": лизоцим (код L-6876), гемоглобин (H-2509) и гамма-глобулин (G-7516).

Для измерения кинетики адсорбции белков навески кремнеземов по 5 мг встряхивались в пробирках с 5 мл раствора белка концентрацией $0,1 \text{ г}/\text{л}$. Концентрация белков определена спектрофотометрически после центрифугирования растворов при $3500 \text{ об}/\text{мин}$. Предельная адсорбция измерялась через 3 сут.

Изотермы адсорбции белков измерены после выдерживания кремнеземов в растворах белков при периодическом перемешивании в течение 3 сут. При этом навески кремнеземов взяты в интервале от 5 до 25 мг , а концентрации растворов белков – от $0,1$ до $1,5 \text{ г}/\text{л}$.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены структурные характеристики взятых кремнеземов. Видно, что кажущаяся плотность у кремнезема КВП-51 в 2 раза меньше, чем у силикагеля КСС-3. Удельные поверхности кремнеземов, удельные объемы мезопор (определенные по капиллярной конденсации бензола) и средние диаметры мезопор близки. При этом равновесие в капиллярной конденсации бензола на КСС-3 устанавливается быстро – менее чем за сутки, а на КВП-51 – медленно, в течение нескольких суток. Это указывает на присутствие в КВП-51 заметной доли пор, более широких, чем в КСС-3. Удельный объем пор V_Σ (определенный из кажущейся плотности) и средний диаметр пор D_{cp} кремнезема КВП-51 в 2,5 раза больше, чем силикагеля КСС-3. Следовательно, осажденный кремнезем имеет открытую высокопористую структуру с большой долей макропор. Структура пор силикагеля

Т а б л и ц а 1

Структурные характеристики кремнезема КВП-51 и силикагеля КСС 3

Образец	ρ	$S, \text{м}^2/\text{г}$	$V_{\Sigma}, \text{см}^3/\text{г}$	$V_m, \text{см}^3/\text{г}$	$D_m, \text{нм}$	$D_{\text{ср}}, \text{нм}$
КВП-51	0,26	580	2,08	0,73	5,0	14
КСС-3	0,53	600	0,80	0,78	5,3	5,5

КСС-3 значительно более однородна и в нем отсутствуют макропоры. В табл. 2 приведены характеристики трех белков [8], взятых для адсорбции.

Адсорбцию белков проводили в условиях, когда она близка к максимальной. Для сорбентов, поверхность которых обладает кислотными свойствами, условиям максимальной адсорбции соответствует низкая ионная сила раствора и рН примерно на 2 единицы ниже, чем изоэлектрическая точка белка [9, 10]. Для адсорбции использовались 0,01 М фосфатные буферные растворы, рН которых для лизоцима – 8,3, для гемоглобина и γ -глобулина – 5,1. Были измерены изотермы адсорбции этих белков со значительно различающимися молекулярными массами и размерами глобул. В качестве примера на рис. 1 приведены изотермы адсорбции гемоглобина. Видно, что адсорбция на КВП-51 значительно больше, чем на КСС-3. Из изотерм адсорбции по уравнению Лэнгмюра были рассчитаны величины предельной адсорбции A_m для трех белков, приведенные в табл. 3.

Видно, что для наименьшего белка – лизоцима (гидродинамический размер глобул которого меньше среднего диаметра пор обоих адсорбентов) величины

предельной адсорбции довольно близки, что свидетельствует о примерно одинаковой доступности внутренней поверхности этих адсорбентов для молекул лизоцима. Адсорбция же гемоглобина (с размером глобул заметно меньшим, чем средний диаметр пор КВП-51, но немного большим, чем средний диаметр пор КСС-3) на КВП-51 примерно в 3 раза больше, чем на силикагеле КСС-3. Это указывает на существенно большую доступность для этого белка поверхности осажденного кремнезема в сравнении с силикагелем КСС-3. Еще больше различия в структуре двух адсорбентов сказываются на адсорбции наибольших по размеру молекул γ -глобулина. Если на КСС-3 предельная адсорбция незначительна ($A_m = 10$ мг/г), то на КВП-51 она в 10 раз больше ($A_m = 100$ мг/г). При этом на КВП-51 адсорбция γ -глобулина меньше, чем гемоглобина и лизоцима. Можно предположить, что для γ -глобулина эффект исключения молекул из пор проявляется на обоих адсорбентах, но на КСС-3 он значительно больше.

На рис. 2–4 представлена кинетика адсорбции трех белков. На обоих кремнеземах наблюдается резкий рост адсорбции в начальный период времени около 10 мин. Видно, что для лизоцима – белка с наименьшим размером глобул (заметно меньшим, чем средние диаметры пор обоих кремнеземов) кинетические кривые расположены довольно близко друг к другу (рис. 2), т.е. различия в эффектах исключения молекул этого белка из пор кремнеземов не очень значительны. При этом сначала (в период времени до 10 мин) скорость адсорбции на КВП-51 больше, а потом (с 20 до 90 мин) меньше, чем на КСС-3. Для гемоглобина, размер глобул которого несколько больше среднего диаметра пор силикагеля КСС-3, наблюдается значительный эффект исключения молекул из пор этого силикагеля (рис. 3). Адсорбция гемоглобина на нем примерно в 4 раза меньше, чем на КВП-51 со средним диаметром пор примерно в 2 раза большим, чем диаметр глобул белка. Еще большие различия в адсорбции обнаруживаются для γ -глобулина – белка с наибольшим размером глобул (рис. 4). На силикагеле КСС-3 его

Т а б л и ц а 2

Молекулярные массы M , гидродинамические диаметры D_h , нм и изоэлектрические точки pI белков

Белок	M	D_h	pI
Лизоцим	14300	3,5	10,5
Гемоглобин	64000	6,2	6,9
γ -глобулин	150000	10	7,3

Т а б л и ц а 3

Предельная адсорбция белков A_m , мг/г

Белок	КВП-51	КСС-3
Лизоцим	150	135
Гемоглобин	160	35
γ -глобулин	100	10

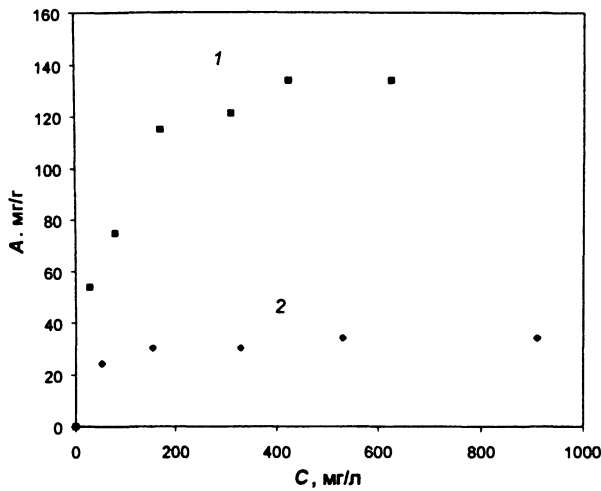


Рис. 1. Изотермы адсорбции гемоглобина на: 1 – кремнеземе КВП-51 и 2 – силикагеле КСС-3. Адсорбция из 0,01 М фосфатного буферного раствора (рН 5,1); объем растворов 5 мл, начальные концентрации растворов белка от 0,1 до 1,5 г/л, навески сорбентов от 5 до 25 мг

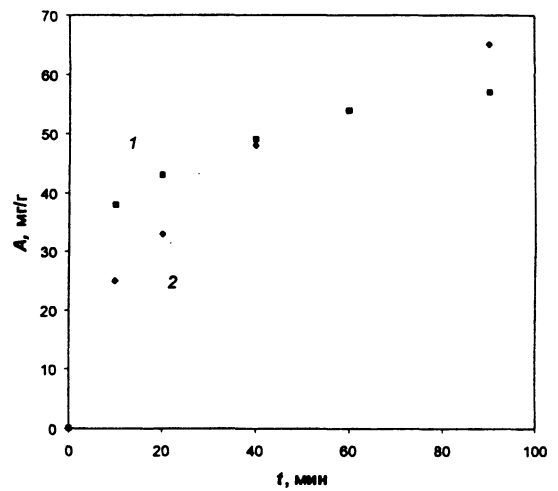


Рис. 2. Кинетика адсорбции лизоцима на: 1 – кремнеземе КВП-51 ($A_{\infty} = 94$ мг/г) и 2 – силикагеле КСС-3 ($A_{\infty} = 99$ мг/г). Адсорбция из 0,01 М фосфатного буферного раствора (рН 8,0); начальная концентрация раствора белка 0,1 г/л, навеска сорбентов 5 мг, объем растворов 5 мл

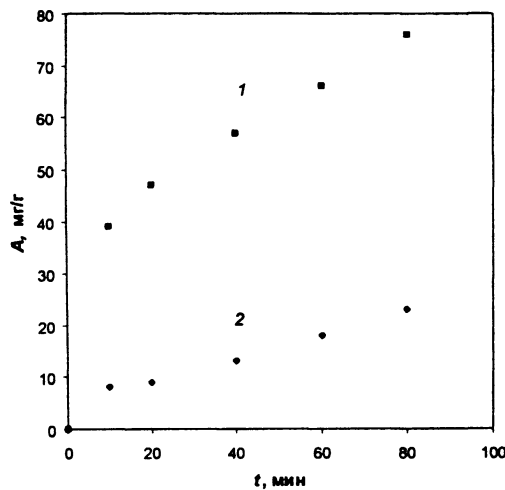


Рис. 3. Кинетика адсорбции гемоглобина на: 1 – кремнеземе КВП-51 ($A_{\infty} = 95$ мг/г) и 2 – силикагеле КСС-3 ($A_{\infty} = 50$ мг/г). Адсорбция из 0,01 М фосфатного буферного раствора (рН 5,1); начальная концентрация раствора белка 0,1 г/л, навеска сорбентов 5 мг, объем растворов 5 мл

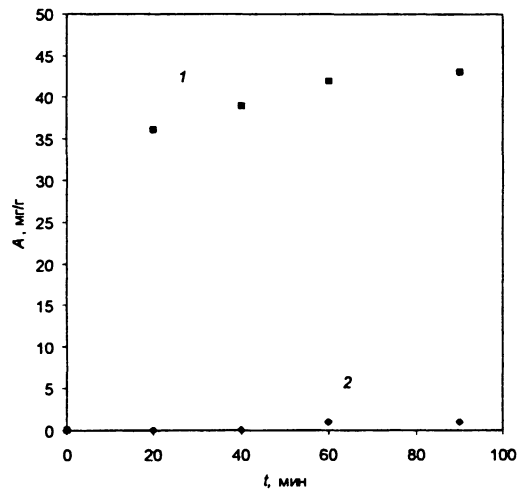


Рис. 4. Кинетика адсорбции γ -глобулина на: 1 – кремнеземе КВП-51 ($A_{\infty} = 44$ мг/г) и 2 – силикагеле КСС-3 ($A_{\infty} = 7$ мг/г). Адсорбция из 0,01 М фосфатного буферного раствора (рН 5,1); начальная концентрация раствора белка 0,1 г/л, навеска сорбентов 5 мг, объем растворов 5 мл

адсорбция близка к нулю, а на КВП-51 она довольно значительна.

Эти кинетические данные были обработаны по уравнению [11]:

$$dA/dt = k_1(A_m - A) = k_1 A_m - k_1 A,$$

откуда

$$\ln(A_m - A) = \ln A_m - k_1 t.$$

При $t > 0$ и $A > 0$ скорость адсорбции $w = k_1 A_m$, мг/г·мин.

Были рассчитаны скорости адсорбции для участков кинетических зависимостей, соответствующих двум интервалам времени адсорбции: w_1 для 0–10 мин и w_2 для 20–90 мин. Эти скорости, а также величины предельной адсорбции A_{∞} (измеренной через 3 сут) приведены в табл. 4. Условия адсорбции: начальная концентрация белка $c_0 = 0,1$ мг/мл, навески сорбентов $m = 5$ мг, объем растворов $v = 5$ мл.

Видно, что в начальный период времени менее 10 мин скорость адсорбции на высокопористом кремнеземе КВП-51 для лизоцима и гемоглобина соответ-

Т а б л и ц а 4

Скорости адсорбции белков на кремнеземах w_1 , мг·г⁻¹·мин⁻¹ (0–10 мин) и w_2 , мг·г⁻¹·мин⁻¹ (20–90 мин), предельная адсорбция A_∞ , мг/г ($c_0 = 0,1$ мг/мл, $m = 5$ мг, $v = 5$ мл)

Белок	Лизоцим			Гемоглобин			γ-Глобулин		
	w_1	w_2	A_∞	w_1	w_2	A_∞	w_1	w_2	A_∞
КВП-51	5,4	0,27	94	7,7	0,90	95	2,7	0,14	44
КСС-3	2,8	0,62	99	1,3	0,32	50	?	?	7

ственно в 2 и 6 раз больше чем на силикагеле КСС-3. Если для γ-глобулина в этом интервале времени наблюдается довольно значительная скорость адсорбции на КВП-51, то на КСС-3 этот белок практически не адсорбируется. В интервале времени от 20 до 90 мин скорость адсорбции белков на обоих сорбентах значительно падает. При этом уменьшение скорости на КВП-51 (в 8 раз для гемоглобина и в 20 раз для лизоцима и γ-глобулина) больше, чем на КСС-3 (примерно в 4 раза для лизоцима и гемоглобина). На КСС-3 адсорбция γ-глобулина остается близкой к нулевой. Величины предельной адсорбции

для лизоцима на двух сорбентах примерно одинаковы, для гемоглобина на КВП-51 в 2 раза, а для γ-глобулина в 6 раз больше, чем на КСС-3.

На основании всех этих равновесных и кинетических данных можно заключить, что адсорбционная активность высокопористого кремнезема, значительно выше, чем силикагеля, обладающего такой же удельной поверхностью, но в 2 раза меньшей удельной плотностью. Поэтому такой высокопористый кремнезем можно использовать в качестве емкого носителя иммобилизованных белков или эффективного сорбента для очистки растворов от белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хохлова Т.Д., Никитин Ю.С., Ворошилова О.И. // Журнал ВХО им. Д.И. Менделеева. 1989. 34. С. 363.
2. Хохлова Т.Д., Янина М.М., Дихтярев С.И. и др. // Прикл. биохимия и микробиол. 1983. 19. №3. С. 378.
3. Бебрис Н.К., Киселев А.В., Никитин Ю.С. // Коллоид. ж. 1967. 29. С. 326.
4. Неймарк И.Е., Шейнфайн Р.Ю. // Силикагель, его получение, свойства и применение. Киев, 1973.
5. Айлер Р. // Химия кремнезема. М., Т.2. 1982.
6. Экспериментальные методы в адсорбции и молекулярной хроматографии / Под ред. Ю.С. Никитина, Р.С. Петровой. М., 1990.
7. Никитин Ю.С. // ЖФХ. 1959. 33. С. 2513.
8. Коликов В.М., Мчедlishvili Б.В. // Хроматография биополимеров на макропористых кремнеземах. Л., 1986.
9. Хохлова Т.Д. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2 Химия. 2002. 43. С. 147.
10. Митрофанова Н.В., Нечаев А.С., Хохлова Т.Д. // Коллоид. ж. 2002. 65. С. 248.
11. Брунауер С. // Адсорбция газов и паров. М., 1948.

Поступила в редакцию 07.09.04

ADSORPTION OF PROTEINS ON PRECIPITATED HIGH POROUS SILICA AND SILICA GEL

T.D. Khokhlova, Yu.S. Nikitin

(Division of Physical Chemistry)

Adsorption characteristics of proteins on high porous silica (specific surface area 580 m²/g and apparent density 0,26 g/cm³) and on silica gel (600 m²/g and 0,53 g/cm³) are compared. Adsorption isotherms and kinetics for three proteins are obtained. Maximum adsorptions on high porous silica for gamma-globulin (M 150 000) and hemoglobin (M 64 000) are 10 and 5 times greater than on silica gel respectively. For lysozyme (M 14 000) maximum adsorptions on two silicas are approximately equal. On kinetic curves for both silicas are observed two regions with much different adsorption velocities.