

АДСОРБЦІЯ АЛЬБУМІНУ НА ПОВЕРХНІ КРЕМНЕЗЕМУ В ПРИСУТНОСТІ САХАРИДІВ

Н.Ю. Клименко, О.А. Новікова, Н.П. Галаган, В.В. Туров

*Інститут хімії поверхні ім. О.О.Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова 17, Київ, 03164, Україна, e-mail: nklymenko@ukr.net*

Одержано ізотерми адсорбції бичачого сироваткового альбуміну на поверхні високодисперсного кремнезему з водного та цитратного розчинів в присутності сахаридів (фруктоза, цукроза). Встановлено вплив розчинника на адсорбцію білка в присутності цукрози на відміну від фруктози. Показано, що композит кремнезем/альбумін-сахарид значно стабільніший, ніж кремнезем/альбумін.

Вступ

Відомо [1, 2], що високодисперсний кремнезем (ВДК) та деякі композити з біомолекулами на його основі в межах певних концентрацій, як домішки до кріосередовищ, сприяють життєздатності клітин в технології довготривалого зберігання генофонду сільськогосподарських тварин. Проте до складу сперми і кріосередовища входить значна кількість білків (глікопротеїнів) та сахаридів (фруктоза, глюкоза, цукроза тощо) [3, 4], які виконують функцію енергоємних речовин, що сприяють рухливості клітин. Оскільки нанокремнеземи володіють високою білоксорбуючою здатністю [5] в кріосередовищах, що містять ВДК, повинно здійснюватись формування композитної системи, що складається з частинок ВДК з адсорбованими білками, які в свою чергу можуть зв'язувати певну кількість сахаридів. Не виключено, що при цьому може формуватись інша структура вторинних частинок кремнезему та поверхні адсорбентів і змінюватись їх властивості щодо дії на клітини.

Попередні дослідження впливу сахаридів на гідратацію білків, зокрема сироваткового альбуміну, виконані із застосуванням низькотемпературної ¹H ЯМР-спектроскопії [6] виявили здатність білкових молекул до значного зменшення кількості зв'язаної з білками води. Це свідчить про зміну будови білкових глобул, яка відбувається в присутності сахаридів, а також про високу адсорбційну здатність білків по відношенню до вуглеводів.

Метою даної роботи було проведення модельних досліджень, які б могли охарактеризувати особливості адсорбційної взаємодії білка – бичачого сироваткового альбуміну (БСА) з вуглеводами (фруктоза, цукроза) при їх одночасному знаходженні в розчині, а також взаємодії бінарного розчину вказаних молекул з поверхнею нанокремнезему.

Експериментальна частина

В роботі використовували ВДК (А-300, питома поверхня 285 м²/г), що одержаний на Калуському дослідно-експериментальному заводі Інституту хімії поверхні ім. О.О.Чуйка НАН України. ВДК попередньо прожарювали при 400 °С протягом 2 год. Для дослідження було обрано бичачий сироватковий альбумін (БСА) фірми Merck (Німеччина; молекулярна маса (M_r) 67000, фракція V), фруктозу (Fr) фірми Fluka (США; M_r=180,2) та цукрозу (Sucr) фірми Merck (Німеччина, M_r=342,3).

Адсорбцію сахаридів альбуміном проводили з водного розчину та 2,9%-го розчину цитрату натрію, який є компонентом багатьох кріосередовищ. Для цього використовували серію розчинів сахариду (фруктози або цукрози) з різною

концентрацією (0,0034; 0,01; 0,0166; 0,02; 0,06; 0,1; 0,14; 0,18; 0,22 мг/мл) із загальним об'ємом 6 мл. Таким чином, отримане співвідношення альбумін:сахарид складало 6:1, 2:1, 6:5, 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:9, 1:11. З отриманих розчинів відбирали 3 мл сахариду для побудови калібрувальної кривої. До розчину, що залишився, додавали 3 мл розчину альбуміну (вихідна концентрація 0,02 мг/мл, рН=4,8). Експериментально встановлено, що час їх взаємодії складає 1 год при постійному перемішуванні. Вміст фруктози та цукрози до та після адсорбції визначали згідно [7]. Для цього до розчинів із різною концентрацією сахариду додавали 2 мл 8% розчину молібдата амонію в 4н сірчаній кислоті та кип'ятили протягом 20 хв. Оптичну густину розчину, інтенсивність забарвлення якого залежить від концентрації сахариду, вимірювали на фотоелектроколометрі КФК-2 при поглинанні 670 нм. Вказаний метод ґрунтується на тому, що фруктоза та цукроза в сірчаноокислому середовищі відновлюють шестивалентний молібден до молібденової сині. На основі отриманих даних будували калібрувальну криву та розраховували величину адсорбції сахаридів на альбуміні.

Адсорбцію білка на кремнеземі після його взаємодії з сахаридом проводили з води та 2,9%-го розчину цитрату натрію при рН 4,8, оскільки згідно даних [5, 8], при такому значенні рН спостерігається максимальна адсорбція альбуміну. Співвідношення білок:сахарид складало 6:1, оскільки з літературних даних відомо [9], що саме таке співвідношення характерно для плазми сім'яної рідини бика. Вихідні концентрації розчинів альбуміну становили 0,15-18 мг/мл, фруктози або цукрози – 0,025-3 мг/мл. Час адсорбції 1 година. Співвідношення адсорбат:адсорбент – 1:10. Тверду фазу відділяли центрифугуванням (4000 об/хв, 10 хв). Кількість БСА в розчині визначали методом [10]. Параметри адсорбції біомолекул на поверхні носіїв розраховували згідно [11]. Використання розчину цитрату натрію зумовлено тим, що він є складовою частиною лактозо-гліцериново-жовткового (ЛГЖ) кріосередовища, яке використовується в технології низькотемпературного заморожування сперми биків та їх реконсервації. Використання такого кріосередовища є також перспективним для довготривалого збереження епідидимальних (тканьових) гамет хряків [12].

Результати та їх обговорення

На рис. 1 наведено ізотерми адсорбції сахаридів (фруктози або цукрози, рис. 1а та рис. 1б, відповідно) на БСА у водному та цитратному розчинах (криві 1 та 2, відповідно). Встановлено, що навіть при максимальному співвідношенні БСА:сахарид (яке становило 1:11) спостерігається адсорбція сахаридів на наночастинках БСА. Ізотерми адсорбції належать до S-типу, що підтверджує сильну міжмолекулярну взаємодію білка та сахариду в розчині [13].

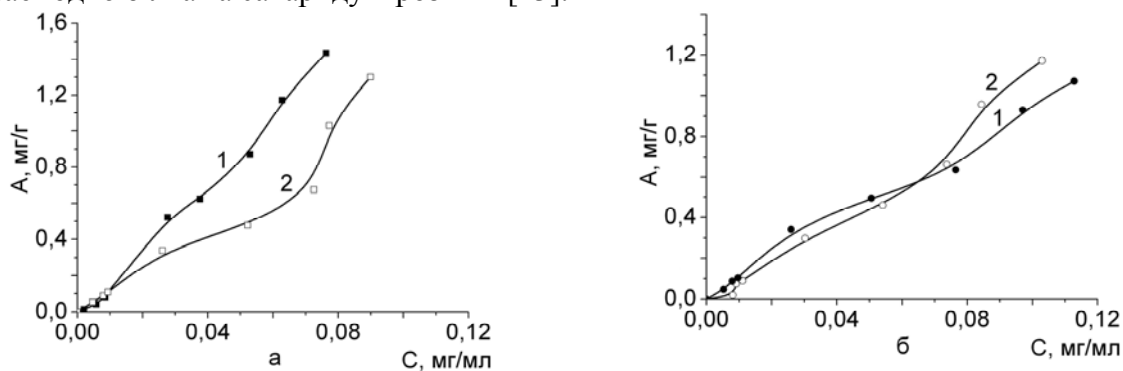


Рис. 1. Ізотерми адсорбції фруктози (1) та цукрози (2) альбуміном з водного розчину (а) та розчину цитрату натрію (б).

Хоча білкові молекули являють собою глобули, форма і доступна поверхня яких залежать як від термодинамічних параметрів середовища (температура, іонний склад і т.д.), а також від присутності адсорбатів, формально на основі ізотерм, наведених на рис. 1 у відповідності з методом БЕГ, може бути розрахована величина граничної адсорбції в моношарі ($A_{\text{макс}}$, табл. 1).

Таблиця 1. Величини граничної адсорбції сахаридів альбуміном

Адсорбат	Середовище	$A_{\text{макс}}$, мг/г
Fr	вода	0,28
	розчин цитрату натрію	0,225
Sucr	вода	0,23
	розчин цитрату натрію	0,195

З табл. 1 видно, що адсорбція фруктози в 1,2 рази вища від цукрози. Це можна пояснити різною будовою та молекулярною масою сахаридів (180,2, для фруктози і 342,3 для цукрози), оскільки за даними [14] саме хімічна

структура та молекулярна маса впливають на адсорбційну рівновагу моно- та дисахаридів. Малі величини $A_{\text{макс}}$ свідчать про те, що лише незначна ділянка поверхні (зовнішньої або внутрішньої) білкових глобул є доступною для молекул сахаридів. Зростання адсорбції у всьому доступному інтервалі зміни концентрації сахаридів свідчить про можливість формування об'ємних кластерів адсорбату, які, імовірно, знаходяться всередині глобул БСА, а також про можливу зміну вторинної будови білкових молекул під впливом адсорбованих сахаридів.

Щодо механізму взаємодії альбуміну з сахаридами, в літературі [15-17] описано кілька гіпотез. Перша з них [15, 16] пов'язана із заміщенням сахаридами молекул води, що утворюють гідратний шар навколо полярних груп білкових молекул за рахунок більшої енергії взаємодії та можливості утворення кількох водневих зв'язків. Згідно другої [15], побудованої на термодинамічних розрахунках, частина молекул води та сахариду утворюють поблизу поверхні колігативну систему, в якій гідратна оболонка полярних груп в певній степені зберігається. Автори [15] методом ЯМР-спектроскопії довели, що обидві гіпотези доповнюють одна одну, оскільки одна частина молекул гідратної води взаємодіє безпосередньо з молекулами сахариду, а інша – зв'язана з білком. Однак згідно даних [17] молекули сахариду проникають всередину білка, тобто взаємодіють з його гідрофобними групами, що визначаються амінокислотами: аланіном, лейцином, ізолейцином, валіном, фенілаланіном, проліном, триптофаном та складають близько 37% від загальної кількості залишків амінокислот в молекулі БСА [18]. Це узгоджується з результатами інших авторів [6], які методом ЯМР-спектроскопії встановили, що при такій взаємодії відбувається часткова дегідратація білкових молекул. Це викликано зміною їх конформації, а молекули сахариду витісняють частину молекул води з порожнин в глобулах альбуміну. При цьому зв'язування сахариду з альбуміном відбувається за рахунок утворення водневих зв'язків між гідроксильними групами вуглеводу та аміно- і карбоксильними групами білка.

На рис. 2 наведені ізотерми адсорбції БСА з попередньо адсорбованими сахаридами (криві 2,3 для фруктози та цукрози, відповідно) та чистого БСА (крива 1) на поверхні кремнезему з водного розчину (а) та 2,9%-го розчину цитрату натрію (б). При малих концентраціях (0,15-0,6 мг/мл) ізотерми можуть бути віднесені до S-типу. Це вказує на те, що на початковому етапі адсорбції має місце більша міжмолекулярна взаємодія між молекулами адсорбтиву (альбуміну) в розчині, ніж з поверхнею кремнезему, що добре узгоджується з літературними даними [6, 15-17].

При збільшенні концентрації білка в розчині ізотерма досягає насичення та стає подібною до L-типу, що згідно [13], може свідчити про сильну взаємодію комплексу БСА-сахарид з поверхнею кремнезему. При цьому в певному концентраційному

інтервалі адсорбція зростає пропорційно концентрації. Слід зазначити, що наявності сахариду (фруктози або цукрози) в розчині після завершення процесу адсорбції комплексу БСА-сахарид не спостерігалась, що свідчить про високу стабільність цих комплексів.

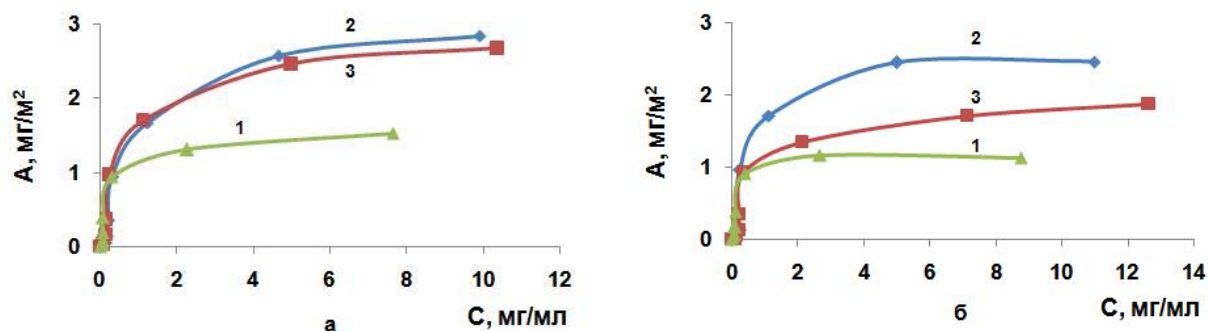


Рис. 2. Ізотерми адсорбції БСА на поверхні кремнезему з водного розчину (а) та 2,9%-го розчину цитрату натрію (б), що містить двокомпонентну (БСА-вода (1а) або БСА-цитрат (1б)) та трикомпонентну (Fr-БСА-вода (2а), Fr-БСА-цитрат (2б), Sucr-БСА-вода (3а), Sucr-БСА-цитрат (3б)) систему.

Відомо, що білки можуть взаємодіяти безпосередньо з поверхнею або через граничні шари води [5]. Згідно [6], при взаємодії білків з поверхнею кремнезему здійснюється три типи міжчастинкових взаємодій: частинок кремнезему між собою, частинок кремнезему з молекулами білка та білок-білкові взаємодії. При цьому взаємодія комплексу БСА-сахарид з поверхнею може відбуватися через молекули сахариду за рахунок карбонільних груп, характерних для фруктози.

В табл. 2 наведено розраховані у відповідності з теорією Ленгмюра адсорбційні параметри для систем кремнезем/БСА-сахариди та кремнезем/БСА. З табл. 2 видно, що в присутності сахариду значення максимальної адсорбції БСА в моношарі ($A_{\text{макс}}$) збільшується майже в 2 рази. На адсорбцію БСА в присутності фруктози (на відміну від цукрози) розчинник (наявність цитрату натрію) майже не впливає, оскільки її значення досить близькі. Адсорбція ж альбуміну з розчину, що містить одночасно цукрозу та цитрат натрію, майже в 1,5 рази нижче, ніж з водного розчину цукрози. Слід відзначити, що у випадку адсорбції альбуміну в присутності сахариду значення площі, яку займає 1 молекула БСА (ω_{∞}), досить близькі. При адсорбції комплексу БСА-Sucr в розчині цитрату натрію величина ω_{∞} збільшується майже в півтора рази і досягає максимальних значень при адсорбції на поверхні кремнезему чистого альбуміну.

Таблиця 2. Параметри адсорбції комплексів БСА-сахарид на поверхні кремнезему

Адсорбат	Середовище	$A_{\text{макс}}$, мг/м ²	ω_{∞} , нм ²	σ , нм	$-\Delta G$, кДж/моль
Fr-БСА	вода	2,57	43,25	1,71	26,5
	розчин цитрату натрію	2,45	45,44	1,63	27,5
Sucr-БСА	вода	2,46	45,23	1,64	27,3
	розчин цитрату натрію	1,71	65,13	1,14	27,3
БСА	вода	1,31	85,19	0,87	29
	розчин цитрату натрію	1,17	95,21	0,78	29,8

Збільшення товщини поверхневого шару (σ) майже вдвічі при адсорбції альбуміну в присутності сахариду вказує на утворення комплексу БСА-сахарид. Зміна вільної енергії Гіббса ($-\Delta G$) для всіх адсорбційних систем має близькі значення. Це

дозволяє очікувати приблизно однакову адсорбційної активність по відношенню до кремнезему, що добре узгоджується з отриманими експериментальними даними. Виявлено, що ізотерми добре описуються рівнянням Ленгмюра, про що свідчать високі коефіцієнти кореляції.

Означені особливості адсорбційних взаємодій можуть бути пояснені з точки зору формування досить щільної нанокompatитної системи, в якій значна частина поверхні кремнезему залишається вільною від адсорбованого на її поверхні альбуміну (або його комплексів з сахаридами). Імовірно, білкові молекули заповнюють міжчастинкові зазори кремнезему, що забезпечує його слабку десорбцію. Оскільки агрегати кремнезему не утворюють жорсткої структури в процесі адсорбції білкових молекул може відбуватись їх перебудова у відповідності з принципами забезпечення мінімальної вільної енергії при формуванні композиту. Більша адсорбція комплексу альбумін-сахарида може свідчити про ущільнення білкових глобул в процесі формування і як наслідок утворення аддуктів з меншою гідратованістю [19, 20].

З метою дослідження стабільності одержуваних композитів було проведено вивчення десорбції альбуміну (рис. 3) у водній (а) та цитратній (б) розчині. На цьому рисунку криві 1 відносяться до десорбції чистого альбуміну, а криві 2,3 – до десорбції альбуміну, що адсорбовано на кремнеземі у складі комплексів альбумін-фруктоза (2) та альбумін-цукроза (3). Одержані значення десорбції альбуміну досить низькі, що свідчить про його багатоцентрове зв'язування з поверхнею [21, 22]. Десорбція білка потребує не тільки одночасного розриву великої кількості зв'язків, що перешкоджає досягненню рівноваги [23, 24], але й перебудови агрегатів кремнезему, що утворились в процесі адсорбційних взаємодій при утворенні композиту.

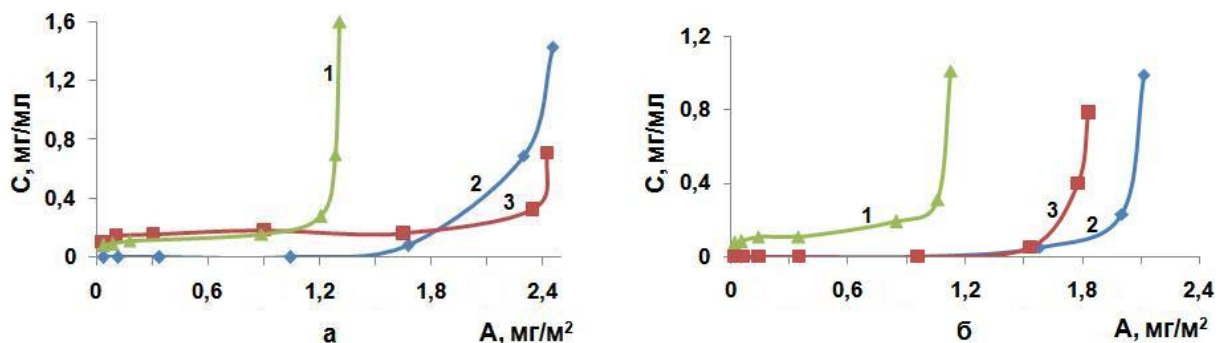


Рис. 3. Залежність концентрації десорбованого БСА у водному розчині (а) та 2,9%-му розчині цитрату натрію (б) від його вихідної концентрації на поверхні кремнезему: 1 - БСА, 2 - Fr-БСА, 3 - Sucr-БСА.

Криві, представлені на рис. 3, свідчать, що комплекси сахариду з білком значно стабільніші на поверхні адсорбенту, порівняно з чистим білком. Застосування водного розчину цитрату натрію дещо зменшує кількість десорбованого альбуміну, присутнього у вигляді комплексів з сахаридами, причому цей ефект більший у випадку цукрози.

Висновки

Проведені дослідження свідчать про можливість формування у водних або цитратних розчинах стабільних композитних систем, що містять нанокремнезем та альбумін, адсорбційно зв'язаний з сахаридами. Значна частина поверхні таких композитів вільна від біополімеру, що забезпечує можливість їх використання в технологіях підвищення життєздатності репродуктивних клітин сільськогосподарських тварин при їх довгостроковому зберіганні. Слід очікувати, що аналогічні композитні системи будуть утворюватись і безпосередньо в сім'яній рідині, яка містить сахаридну та білкову складові. При цьому забезпечується доставка енергоємних речовин

(сахаридів) до клітин при їх контактi з частинками композиту. Це пояснює високу ефективність нанокремнезему в біотехнологічних схемах деконсервації гамет сільськогосподарських тварин.

Література

1. Недава В.Е., Чуйко А.А., Бегма Л.А. и др. Использование аэросилов в практике искусственного осеменения // Зоотехния. – 1990. – №8. – С. 63–65.
2. Галаган Н.П. Наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема и биомолекул в средах с репродуктивными клетками // Материалы II Всероссийской научн. конф. „Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья”, Москва-Белгород. – 18 – 23 сентября, 2006. – С. 55–59.
3. Живков В.И. Сахара в спермальной плазме быка, барана и жеребца // Укр. биохим. журн. – 1961. – Т. 33, №2. – С. 168–174.
4. Стейси М., Баркер С. Углеводы живых тканей. – Москва: Мир, 1965. – 324 с.
5. Чуйко А.А., Власова Н.Н., Давиденко Н.К., Погорелый В.К. Адсорбционное взаимодействие высокодисперсного кремнезема с биомолекулами // Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А.А.Чуйко. – Киев: Наукова думка, 2003. – С. 116–144.
6. Гунько В.М., Туров В.В., Горбик П.П. Вода на межфазной границе. – Киев: Наукова думка, 2009. – 694 с.
7. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. – Киев: Наукова думка, 1976. – 334 с.
8. Holt P.F., Bowcott J.E.L. Adsorption of protein on silica surfaces // AMA Arch. Industrial hygiene and occupational medicine. – 1954. – V. 9. – P. 503–506.
9. Белоус А.М., Грищенко В.И., Паращук Ю.С. Криоконсервация репродуктивных клеток. – Киев: Наукова думка, 1986. – 207 с.
10. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – Москва: Высшая школа, 1980. – 215 с.
11. Айвазов Б.В. Практикум по химии поверхностных явлений и адсорбции. – Москва: Высшая школа, 1973. – 208 с.
12. Ковтун С.И., Галаган Н.П., Клименко Н.Ю. Использование нанобиоматериалов в технологии криоконсервации генетических ресурсов животных // Simpozionului științific cu participare internațională „Realizări și perspective în zootehnie, biotehnologii și medicină veterinară”, Maximovca. – 6 – 8 Octombrie, 2011. – P. 386–390.
13. Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел / Под ред. Г. Парфита, К. Рочестера. – Москва: Мир, 1986. – 488 с.
14. Jae-Wook Lee, Tae-Ouk Kwon, Il-Shik Moon Adsorption of monosaccharides, disaccharides, and maltooligosaccharides on activated carbon for separation of maltopentaose // Carbon. – 2004. – V. 42. – P. 371–380.
15. Федюкина Г.Н., Волков В.Я. Гидратные свойства и подвижность молекул в системах белок-дисахариды при малой влажности // Журн. физ. химии. – 2008. – Т. 82, №4. – С. 759–767.
16. Guzey D., McClements D. J., Weiss J. Adsorption kinetics of BSA at air–sugar solution interfaces as affected by sugar type and concentration // Food Research International. – 2003. – V. 36. – P. 649–660.
17. Ebel C., Eisenberg H., Ghirlando R. Probing Protein-Sugar Interactions // Biophysical Journal. – 2000. – V. 78. – P. 385–393.
18. Соркина Д.А., Залевская И.Н. Структурно-функциональные свойства белков. – К.: Выща школа, 1989. – 216 с.
19. Pandey N.K., Ghosh S., Dasgupta S. Fructose restrains fibrillogenesis in human serum albumin // International Journal of Biological Macromolecules. – 2013. – V. 61. – P. 424–432.

20. Ohtake S., Kita Y., Arakawa T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2011. – V. 63. – P. 1053–1073.
21. Su T.J., Lu J.R., Thomas R.K., Cui Z.F. Effect of pH on adsorption of bovine serum albumin at the silica/water interface studied by neutron reflection // *Journal Physical Chemistry B: Condens Matter Mater Surface Interfaces Biophys.* – 1999. – V. 103. – P. 3727–3736.
22. Norde W., Giacomelli C.E. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states // *Journal Biotechnology*. – 2000. – V. 79, №3. – P. 259–268.
23. Камышный А.Л. Адсорбция глобулярных белков на твердых носителях: некоторые физико-химические характеристики // *Журн. физ. химии*. – 1981. – Т. 55, №3. – С. 562–580.
24. Study of interaction of proteins with fumed silica in aqueous suspensions by adsorption and photon correlation spectroscopy methods / Gun'ko V.M., Mikhailova I.V., Zarko V.I. [et al.] // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2003. – V. 260. – P. 56–69.

АДСОРБЦИЯ АЛЬБУМИНА НА ПОВЕРХНОСТИ КРЕМНЕЗЕМА В ПРИСУТСТВИИ САХАРИДОВ

Н.Ю. Клименко, Е.А. Новикова, Н.П. Галаган, В.В. Туров

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, e-mail: nklymenko@ukr.net*

Получены изотермы адсорбции бычьего сывороточного альбумина на поверхности высокодисперсного кремнезема из водного и цитратного растворов в присутствии сахаридов (фруктозы, сахарозы). Установлено влияние растворителя на адсорбцию белка в присутствии сахарозы, в отличие от фруктозы. Показано, что композит кремнезем/альбумин-сахарид значительно стабильнее, чем кремнезем/альбумин.

ADSORPTION OF ALBUMIN ON ULTRAFINE SILICA SURFACE IN THE PRESENCE OF SACCHARIDES

N.Y. Klymenko, E.A. Novikova, N.P. Galagan, V.V. Turov

*Chuiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine
General Naumov street 17, Kyiv, 03164, Ukraine, e-mail: nklymenko@ukr.net*

Isotherms of adsorption of bovine serum albumin on ultrafine silica surface from aqueous and citrate solutions in presence of saccharides (fructose, sucrose) were obtained. In solutions containing sucrose (unlike to those containing fructose) the effect of solvent on protein adsorption in solution was observed. It was shown that the composite silica/albumin-saccharide is more stable than silica/albumin.