



УДК 678.675

Кинетика сорбции и десорбции лизоцима ультрафильтрационными мембранами на основе ароматических полиамидов

Смирнова Н.Н., Небукина И.А.

Владимирский государственный университет им. Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, Владимир

Поступила в редакцию 18.09.2014 г.

В статье приведены результаты исследований сорбции/десорбции лизоцима в статическом режиме и в условиях ультрафильтрации мембранами на основе поли-*m*-фениленизофталамида и ароматического сополиамида с 10 мол.% фрагментов с сульфонатными группами. Показано влияние электростатических взаимодействий белок/мембрана на механизм, скорость и глубину сорбции. Установлено, что скорость десорбции в значительной степени определяется природой десорбирующего агента. Рассчитаны энергии активации сорбции/десорбции белка с поверхности исследованных образцов.

Ключевые слова: ароматические полиамиды, мембраны, сорбция, десорбция, лизоцим, кинетика

Kinetics of sorption and desorption of lysozyme of ultrafiltration membranes based on aromatic polyamides

Smirnova N.N., Nebukina I.A.

Vladimir State University named after A.G. and N.G. Stoletovs, Vladimir

An attempt to value the presence and the degree of influence of electrosurface properties of porous membranes based on poly-*m*-phenylenisophthalamide (PA) and aromatic co-polyamide with 10 mol. % sulfonate-containing fragments (PA-10(-)) on lysozyme sorption / desorption kinetics has been done in present work. Studies were conducted in static mode and under ultrafiltration conditions. To describe the experimental kinetic dependences the modified diffusion model and sorption model controlled by interaction protein/membrane have been used. The influence of protein/membrane electrostatic interactions on mechanism, speed and the depth of sorption has been shown. The activation energies of protein sorption/desorption from the surface of the test samples were calculated; their values were ~ 40/50 kJ/mol and ~ 20/40 kJ/mol for the PA and PA-10 (-), respectively. The results obtained offer the possibility to control the sorption process in case of practical use of the synthesized membranes.

Keywords: aromatic polyamides, membranes, sorption, separation, lysozyme, kinetics

Введение

Интерес исследователей к сорбции/десорбции белков из растворов на твердой поверхности, несмотря на наличие значительного числа работ [1, 2], обусловлен, во-

первых, актуальностью рассматриваемых процессов, а, во-вторых, сложностью и во многом индивидуальностью реализуемого в каждом конкретном случае механизма.

При мембранной фильтрации сорбция сорбата на рабочей поверхности в значительной степени изменяет фильтрующие свойства мембраны. Снижение ее проницаемости при фильтрации, безусловно, является серьезной проблемой, стимулирующей поиск механизмов, позволяющих контролировать процесс загрязнения. Как показали имеющиеся литературные данные, вследствие множества явлений, происходящих одновременно на поверхности мембраны, комплексная оценка сорбции, контроль ее скорости и глубины является непростой задачей. Установлена взаимосвязь сорбции с природой сорбата, свойствами мембраны, характером взаимодействия и состоянием равновесия сорбат/сорбат и сорбат/мембрана, концентрацией сорбата, pH раствора и его ионной силы, а также рабочих параметров процесса (трансмембранное давление, способ подачи фильтруемого раствора, температура и др.). В случае исследования процесса с участием белковых макромолекул, необходимо также учитывать влияние на сорбцию их конформационного состояния [3].

Высказано предположение, что в зависимости от наличия или отсутствия интенсивных, в частности, электростатических взаимодействий сорбат/мембрана лимитирующей стадией сорбционного процесса может являться либо процесс диффузии молекул сорбата из объема раствора к мембранной поверхности, либо собственно сорбция на этой поверхности [4].

В настоящей работе предпринята попытка оценить наличие и степень влияния электроповерхностных свойств пористых мембран на основе ароматического полиамида на кинетику сорбции/десорбции лизоцима.

Эксперимент

В ходе исследований использовали полученные фазоинверсионным методом мокрого формования образцы ультрафильтрационных мембран на основе поли-*m*-фениленизофталамида (*ПА*) и синтезированного в ОАО «Полимерсинтез» под руководством Ю.А. Федотова статистического ароматического сополиамида с 10 мол.% фрагментов с сульфонатными группами (*ПА-10(-)*).

Характеристики изготовленных мембран: проницаемость, точка прорыва пузырька воздуха и величина номинально отсекаемой молекулярной массы ~ 40 кДа соответствуют показателям, типичным для ультрафильтрационных мембран. Для рассматриваемых образцов величина ζ – потенциала составила +2.4 и -43.8 мВ (*ПА* и *ПА-10(-)* соответственно).

Для сорбционных экспериментов использовали лизоцим куриных яиц (*Lys*) фирмы «AppliChem» (Германия) молекулярной массы 14.4 кДа. Белок содержит 7–10 свободных отрицательно заряженных карбоксильных групп (аспаргиновой и глутаминовой кислот) и 17-19 положительно заряженных аминогрупп, 11 из которых гуанидиновые группы аргинина [5]. Такое соотношение отрицательно и положительно заряженных ионогенных групп определяет значение pI белка, равное 11.0 [5]. Молекула *Lys* представляет собой вытянутый эллипсоид вращения с осями 35 и 45 Å [6].

Кинетические кривые сорбции при различных температурах снимали на образцах мембран площадью 1-2 см². Объем раствора белка составлял 5 мл. Концентрация лизоцима в растворе – 0.25 г/л. Для приготовления раствора применяли фосфатный буфер с pH равным 6.86. Концентрацию *Lys* определяли с

использованием спектрофотометра СФ-2000 по оптической плотности при длине волны $\lambda=277$ нм. Количество параллельных опытов составляло не меньше пяти. Результаты, описывающие экспериментальные данные, обрабатывали по теории ошибок. Доверительный интервал рассчитывали для уровня значимости 0.05.

Десорбцию Lys в присутствии различных десорбирующих агентов исследовали на мембранах, предварительно насыщенных белком из его раствора в фосфатном буфере с концентрацией 0.25 г/л.

Кинетические кривые десорбции при различных температурах снимали в виде временных зависимостей изменения сорбционной емкости мембраны по Lys . Обработку результатов, полученных в ходе сорбционных и десорбционных экспериментов, проводили аналогично.

Степень десорбции белка рассчитывали по формуле:

$$W = \frac{S_0 - S_k}{S_0} \cdot 100\%$$

где S_0 и S_k – начальная и конечная сорбционная емкость мембраны по белку соответственно, мг/см².

Десорбцию лизоцима исследовали в статических условиях и/или в условиях ультрафильтрации. В последнем случае использовали тупиковую разделительную ячейку. Через предварительно насыщенную белком мембрану под давлением равным 0.1 МПа фильтровали раствор десорбирующего агента соответствующей концентрации (объем фильтруемого раствора составлял 100 мл).

Коэффициент восстановления мембраны (K) оценивали как отношение проницаемости образца по бидистиллированной воде при $p = 0.1$ МПа после десорбции к начальному значению этого показателя.

Обсуждение результатов

Для описания скорости сорбции Lys в статическом режиме на мембранах *ПА* и *ПА-10(-)* использовали модифицированную диффузионную модель, учитывающую изменение по мере протекания процесса доступной для сорбции поверхности образцов [4]:

$$\frac{dS}{d\tau} = \alpha \left[1 - \frac{S}{S_e} \right] c_0 \left(\frac{D}{\pi\tau} \right)^{1/2}$$

где S – сорбционная емкость мембраны в момент времени τ ; S_e – сорбционная емкость в момент равновесия; c_0 – концентрация белка в растворе; τ – время; D – коэффициент диффузии; α – коэффициент, характеризующий степень, до которой сорбционный процесс контролируется переносом вещества к поверхности мембраны (принимает значения в диапазоне от 0 до 1). Величины S_e взяты непосредственно из изотерм сорбции [7]. При расчетах использовали данные по коэффициентам диффузии Lys в растворе при соответствующих температурах [8].

Полученные экспериментальные и теоретические кинетические кривые представлены на рис. 1.

Невысокие значения параметра α (табл. 1) указывают на тот факт, что диффузия молекул белка не является скоростью лимитирующей стадией рассматриваемых сорбционных процессов с участием обоих типов мембран.

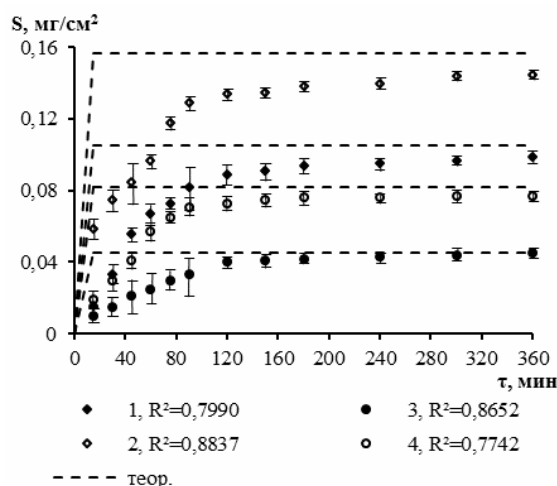


Рис. 1. Экспериментальные и теоретические (модифицированная диффузионная модель) кинетические кривые сорбции лизоцима полиамидными мембранами при $pH=6.86$: 1 – ПА-10(-), $T=23^{\circ}C$; 2 – ПА-10(-), $T=40^{\circ}C$; 3 – ПА, $T=23^{\circ}C$; 4 – ПА, $T=40^{\circ}C$

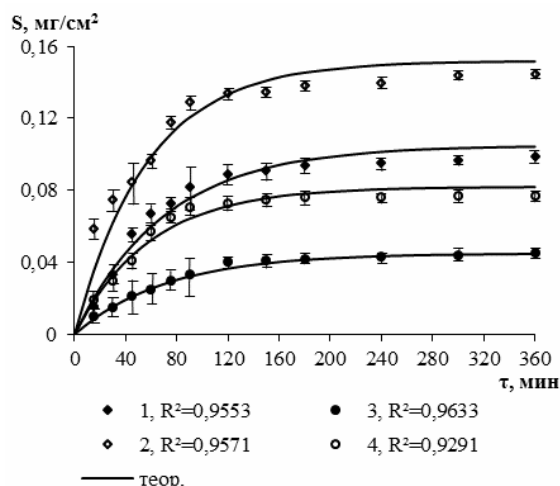


Рис. 2. Экспериментальные и теоретические (модель сорбции, контролируемой взаимодействием сорбат/мембрана) кинетические кривые сорбции лизоцима полиамидными мембранами при $pH=6.86$: 1 – ПА-10(-), $T=23^{\circ}C$; 2 – ПА-10(-), $T=40^{\circ}C$; 3 – ПА, $T=23^{\circ}C$; 4 – ПА, $T=40^{\circ}C$

Таблица 1. Коэффициенты сорбции L_{us} полиамидными мембранами при различных температурах (модифицированная диффузионная модель)

Коэффициент	ПА		ПА-10(-)	
	23°C	40°C	23°C	40°C
α	0.0168	0.0369	0.0360	0.0596

В случае когда процесс сорбции контролируется взаимодействием сорбат/мембрана, его кинетические закономерности могут быть описаны следующими уравнениями [4]:

$$\frac{dS}{d\tau} = k_1 c_s \left(1 - \frac{S}{Q}\right) - k_2 \frac{S}{Q}$$

где k_1 , k_2 – константы скорости сорбции и десорбции белка полиамидными мембранами соответственно, c_s – концентрация белка в приповерхностном слое, Q – максимальная сорбционная емкость мембраны (модель Ленгмюра).

Если ввести обозначение константы k_0 :

$$k_0 = \frac{k_1 c + k_2}{Q},$$

то при условии равенства концентрации белка в приповерхностном слое равновесной концентрации, взятой из соответствующей экспериментальной изотермы сорбции, могут быть получены уравнения:

$$\frac{ds}{d\tau} = k_0 (S_e - S), \quad S = S_e [1 - e^{-k_0 \tau}]$$

Значения констант k_1 , k_2 связаны равенством:

$$\Theta = \frac{k_2}{k_1}$$

где Θ – коэффициент изотермы сорбции белка полиамидными мембранами (модель Ленгмюра):

$$S_e = \frac{Qk_1c}{\Theta + k_1c}$$

Экспериментальные и теоретические кинетические кривые представлены на рис. 2, а соответствующие коэффициенты в табл. 2.

Таблица 2. Коэффициенты и кинетические параметры сорбции Lys полиамидными мембранами при различных температурах (модель, учитывающая взаимодействие сорбат/ мембрана)

Коэффициент	ПА		ПА-10(-)	
	23°C	40°C	23°C	40°C
k_0 , мин ⁻¹	0.0139	0.0170	0.0141	0.0175
Θ , мг/(см ² ·мин)	0.00469	0.00688	0.0107	0.00960
Q , мг/см ²	0.150	0.247	0.378	0.431
S_e , мг/см ²	0.045	0.082	0.105	0.157

Полученные данные указывают на тот факт, что в рассматриваемых системах белок/мембрана электростатические силы в значительной степени определяют скорость (в начальный период времени) и глубину сорбционных процессов, что можно рассматривать как вполне закономерный результат.

Значения энергий активации E_a рассчитанные на основании температурных зависимостей сорбционной емкости образцов составляют ~ 40 и ~ 20 кДж/моль для ПА и ПА-10(-) соответственно.

Как с теоретической (информация о реализуемом механизме сорбции/десорбции), так и с практической точки зрения представлялось интересным, оценить влияние электроповерхностных свойств образцов мембран на десорбционные процессы. Эксперименты по десорбции проводили после 24 часов сорбции. На рис. 3 изменения сорбционной емкости образцов показаны при постепенной десорбции лизоцима с поверхности мембраны в раствор в присутствии различных десорбирующих агентов, наиболее активно используемых в процессах, исследованных в настоящей работе: хлорида калия ($c=2M$), роданида калия ($c=1M$) и триполифосфата натрия ($c=2\%$). Необходимо отметить, что когда покрытые белком образцы мембран находятся в буферном растворе при pH равном 6.86, скорость и глубина десорбции лизоцима с поверхности в раствор незначительны. При времени десорбции более 24 часов ее степень составляет менее 1.5 %.

Скорость десорбции лизоцима изучалась для состояния, характеризуемого отсутствием насыщения макромолекулами белка поверхности образцов [7]. Значения S при $T=23^\circ C$ для мембран ПА и ПА-10(-) составляли 0.048 мг/см² и 0.120 мг/см² соответственно.

Было установлено, что в зависимости от типа исследуемой мембраны и природы используемого десорбирующего агента степень десорбции при 23°C варьируется в диапазонах: для ПА 17-22 % (хлорид калия), 78-82 % (триполифосфат натрия), 87-91 % (роданид калия); для ПА-10(-) 65-69 % (хлорид калия), 86-97 % (триполифосфат натрия), 94-99 % (роданид калия) (рис. 4). Наиболее существенное отличие для двух изученных типов мембран наблюдается при использовании в качестве десорбирующего агента хлорида калия, что указывает на различие сорбционных механизмов, реализуемых для систем мембрана/белок при доминировании электростатических сил, когда поверхность мембраны и

макромолекулы белка заряжены противоположно (*ПА-10(-)*) и сил неэлектростатической природы при их одноименной заряженности (*ПА*). Известным является тот факт, что в растворах с высокой ионной силой за счет экранирующего действия соли происходит дестабилизация химических связей, образованных между соответствующими функциональными группами в интерполиэлектролитных реакциях, в том числе с участием белковых макромолекул [9]. Как показали проведенные исследования, взаимодействия такой природы реализуются при участии в сорбционном процессе мембран, содержащих свободные функциональные группы [7].

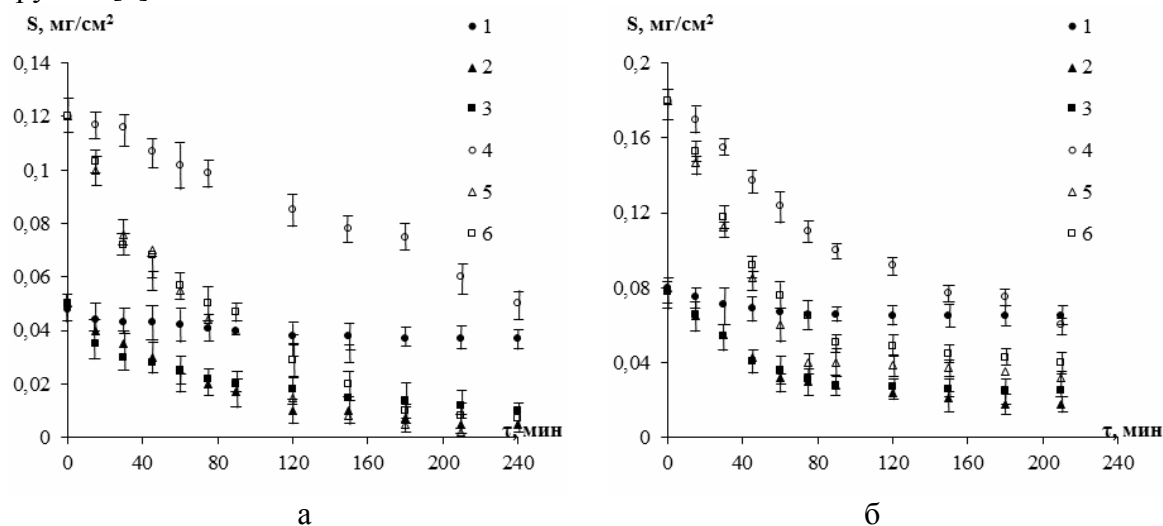


Рис. 3. Кинетические кривые десорбции лизоцима с поверхности полиамидных мембран при $T=23^{\circ}\text{C}$ (а) и $T=40^{\circ}\text{C}$ (б) (1, 2, 3 - *ПА*; 4, 5, 6 - *ПА-10(-)*) в присутствии десорбирующих агентов: 1, 4 – хлорида калия; 2, 5 – роданида калия; 3, 6 – триполифосфата натрия.

Сравнительный анализ кинетических кривых десорбции, полученных при различных температурах (рис. 3), свидетельствует о возрастании скорости десорбции с увеличением значения данного параметра. Энергии активации в присутствии рассматриваемых десорбирующих агентов составляют ~ 50 кДж/моль для *ПА* и ~ 40 кДж/моль для *ПА-10(-)*. Более высокие значения энергии активации для процесса десорбции (в сравнении с сорбцией) обуславливают меньшую скорость процесса десорбции.

Наибольшей эффективности удалось достичь при использовании в качестве десорбирующего агента роданида калия, что было установлено ранее в целом ряде работ и, по всей видимости, обусловлено способностью роданидов к взаимодействию с белковыми макромолекулами [10].

В табл. 3 приведены результаты оценки констант скоростей десорбции для исследованных систем и соответствующие коэффициенты R^2 . Расчет удалось провести только для первого кинетического этапа ($\tau < 200 - 280$ мин).

В основу расчета было положено уравнение скорости первого порядка, устанавливающее связь скорости десорбции и количества белка, который остался в сорбированном состоянии на поверхности образца в данный момент времени [11]:

$$-\frac{dS}{d\tau} = k_2 S$$

Полученные кинетические характеристики позволили расположить рассмотренные в настоящей работе десорбирующие агенты по эффективности в следующий ряд: хлорид калия < триполифосфат натрия < роданид калия.

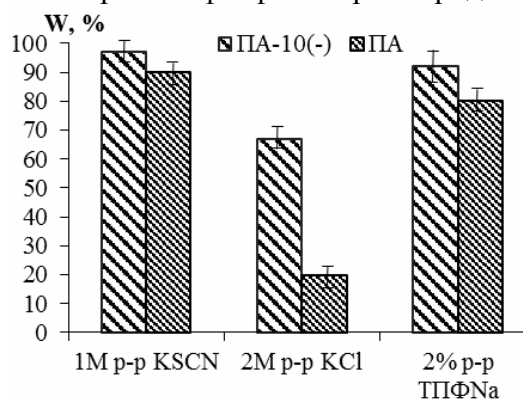


Рис. 4. Степень десорбции лизоцима с поверхности полиамидных мембран *ПА* и *ПА-10(-)* в присутствии десорбирующих агентов: хлорида калия, роданида калия, триполифосфата натрия

Таблица 3. Коэффициенты и кинетические параметры десорбции *Lys* с поверхности полиамидных мембран в присутствии различных десорбирующих агентов

Т, °С	Коэффициенты	ПА			ПА-10(-)		
		Хлорид калия	Роданид калия	Триполифосфат натрия	Хлорид калия	Роданид калия	Триполифосфат натрия
23	$k_2, \text{мин}^{-1}$	0.0014	0.0100	0.0051	0.0046	0.0202	0.0127
	R^2	0.9711	0.9734	0.9871	0.9567	0.9820	0.9899
40	$k_2, \text{мин}^{-1}$	0.0021	0.0120	0.0068	0.0065	0.0225	0.0151
	R^2	0.9563	0.9491	0.8246	0.9730	0.9918	0.9934

Та же последовательность десорбирующих агентов определяется в ходе оценки их сравнительной эффективности по значениям коэффициентов восстановления мембран K как в статическом, так и в динамическом режиме (табл. 4).

Таблица 4. Коэффициенты восстановления полиамидных мембран в статическом режиме и в процессе ультраfiltrации различных десорбирующих агентов (сорбция: $pH=6.86$, $T=23^\circ\text{C}$, $p=0.1$ МПа, $c_{Lys}=0.2$ г/л)

Режим десорбции	ПА			ПА-10(-)		
	Хлорид калия	Роданид калия	Триполифосфат натрия	Хлорид калия	Роданид калия	Триполифосфат натрия
динамический	0.30	0.45	0.27	0.58	0.75	0.61
статический	0.58	0.93	0.65	0.70	0.95	0.70

Значительное отличие коэффициентов восстановления мембраны *ПА* (в сравнении с *ПА-10(-)*) при динамическом режиме десорбции может быть обусловлено различием скоростей десорбции белка с поверхности соответствующих образцов (табл. 3).

Заключение

Проведенный анализ особенностей сорбции/десорбции лизоцима ультрафильтрационными мембранами на основе ароматических полиамидов позволил определить степень влияния электростатических и неэлектростатических сил на кинетику сорбции/десорбции белок/мембрана. Показано, что во всех рассматриваемых системах процесс сорбции контролируется взаимодействием сорбат/мембрана. Электростатические силы между соответствующими функциональными группами макромолекул белка и поверхностью мембранных образцов в значительной степени определяют скорость и глубину сорбционных процессов.

Установлено, что на скорость десорбции влияют как природа десорбирующего агента, так и материал, из которого изготовлена мембрана. Максимального значения коэффициента восстановления исследованных образцов удалось достичь при использовании в качестве десорбирующего агента роданида калия. Понимание основных закономерностей сорбционных и десорбционных процессов в исследованных системах открывает возможность не только для установления реализуемого в них механизма, но и, как следствие, - для управления рассматриваемыми процессами при практическом использовании полученных мембран.

Список литературы

1. Veen M., Stuart M., Norde W. Spreading of proteins and its effect on adsorption and desorption kinetics // *Colloids and Surfaces*. В, 2007. V. 54. pp. 136-142.
2. Zhou Y., Wang Zh., Zhang Q. et al. Equilibrium and thermodynamic studies on adsorption of BSA using PVDF microfiltration membrane // *Desalination*. 2012. V. 307. No 1-2, pp. 61-67.
3. Vasin E., Dejardin Ph. Kinetics of adsorption, desorption, and exchange of α -chymotrypsin and lysozyme on poly(ethyleneterephthalate) tracked film and track-etched membrane // *J. Biomacromol.* 2003. V. 4. pp. 304-313.
4. Jones K., O'Melia Ch. Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effect of pH and ionic strength // *J. Membr. Sci.* 2000. V. 165. No 1-2. pp. 31-46.
5. Lehninger A.L. *Biochemistry*. New York: Worth Publ. 1972. 767 с.
6. Phielips D.C. *Lysozyme*. New York: Acad. Press. 1974. 495 с.
7. Смирнова Н.Н., Небукина И.А. Влияние природы и концентрации ионогенных групп на сорбционные и разделительные свойства ультрафильтрационных мембран на основе ароматических полиамидов по отношению к лизоциму // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14. Вып. 1. С. 150-158.
8. Xu Sh., Damodaran S. The role of chemical potential in the adsorption of lysozyme at the air-water interface // *Langmuir*. 1992. No 8. pp. 2021-2027.
9. Изумрудов В.А. Явление самосборки и молекулярного «узнавания» в растворах (био)полиэлектролитных комплексов // *Успехи химии*. 2008. Т. 77. № 4. С. 401-415.
10. Тюкавина Н.А. *Биоорганическая химия*. М.: Дрофа. 2005. 542 с.
11. Sarkar D., Chattoraj D. Kinetics of desorption of proteins from the surface of protein-coated alumina by various desorbing reagents // *J. Colloids and Surface Sci.* 1996. V. 178, No 1-2. pp. 606-613.

References

1. Veen M., Stuart M., Norde W. Spreading of proteins and its effect on adsorption and desorption kinetics, *Colloids and Surfaces*, В, 2007, V. 54, pp. 136-142.

2. Zhou Y., Wang Zh., Zhang Q. et al. Equilibrium and thermodynamic studies on adsorption of BSA using PVDF microfiltration membrane, *Desalination*, 2012, V. 307, No 1-2, pp. 61-67.
3. Vasina E., Dejardin Ph. Kinetics of adsorption, desorption, and exchange of α -chymotrypsin and lysozyme on poly(ethyleneterephthalate) tracked film and track-etched membrane, *J. Biomacromol*, 2003, V. 4, pp. 304-313.
4. Jones K., O'Melia Ch. Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effect of pH and ionic strength, *J. Membr. Sci*, 2000, V. 165, No 1-2, pp. 31-46.
5. Lehninger A.L. *Biochemistry*. New York: Worth Publ. 1972. 767 p.
6. Phielips D.C. *Lysozyme*. New York: Acad. Press. 1974. 495 p.
7. Smirnova N.N., Nebukina I.A. Vliyanie prirody i koncentracii ionogennyh grupp na sorbcionnye i razdelitel'nye svojstva ultrafiltracionnyh membran na osnove aromaticeskikh poliamidov po otnosheniju k lizocimu [The influence of ionogenic groups' nature and concentration on sorption properties and separation performance of ultrafiltration membranes based on aromatic polyamides concerning lysozyme], *Sorbcionnye i khromatograficheskie process*, 2014, V. 14, No 1, pp. 150-158. [In Russian]
8. Xu Sh., Damodaran S. The role of chemical potential in the adsorption of lysozyme at the air-water interface, *Langmuir*, 1992, No 8. pp. 2021-2027.
9. Izumrudov V.A. Javlenie samosborki i molekularnogo «uznavanija» v rastvorah (bio)polijelektrolitnyh kompleksov [Self-assembly and molecular 'recognition' phenomena in solutions of (bio)polyelectrolyte complexes], *Uspehi himii*, 2008, V. 77, No 4, pp. 401-415. [In Russian]
10. Tjukavina N.A. *Bioorganicheskaja himija (Bioorganic chemistry)*, M.: Drofa, 2005, 542 p. [[In Russian]
11. Sarkar D., Chatteraj D. Kinetics of desorption of proteins from the surface of protein-coated alumina by various desorbing reagents, *J. Colloids and Surface Sci*, 1996, V. 178, No1-2, pp. 606-613.

Смирнова Наталья Николаевна – к.х.н., доцент кафедры химии, Владимирский государственный университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых, Владимир, тел. +8(4922)479-867

Небукина Ирина Александровна - аспирантка кафедры химии, Владимирский государственный университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых, Владимир, тел. +8(4922)479-867

Smirnova Natalya N. – the lecturer of chemistry department, Vladimir State University named after A.G. and N.G. Stoletovs, Vladimir, e-mail: smirnovann@list.ru

Nebukina Irina A. – post graduate of the chair of chemistry department, Vladimir State University named after A.G. and N.G. Stoletovs, Vladimir