

Zárójelentes, 2006. február 26.

A projekt eredeti vezető kutatója, Haraszi Tamás (Kutatási Megbízási Szerződés KO-10813/2003.04.02.), külföldi munkavállalása miatt nem tudta végigvinni az eredetileg tervezett munkafolyamatot. 2004-ben, a projekt második évében ezért mint korábbi résztvevő kutató, átvettem a projekt vezetését, az OTKA bizottság engedélyezésével (Kutatási Megbízási Szerződés KO-14582/2005.05.26.). Haraszi Tamás a kompozit nanofilmek építésénél fém- illetve félvezető nanorészecskék beépítését tervezte, amelyek közel álltak a PhD témájában végzett kutatásokhoz. Az én témavezetésem alatt ez a koncepció kissé módosult, mivel célszerűbbnek tartottam biológiai nanorészecskék, nevezetesen globuláris proteinek beépítésével foglalkozni, így a projektben elért kutatási eredményeket a saját kutatási területemen, a biokolloidok vonatkozásában a későbbiekben is hasznosíthatom.

További változás volt, hogy az eredeti beruházási tervben nem szereplő laptop számítógépet szereztem be, amelynek szükségességét kérvényben indokoltam meg, és az OTKA Iroda igazgatója (2005. október 25, ikt.sz.: KO-24459/2005) engedélyezte ezt a módosítást. A laptopot jelenleg két mérőberendezés, a jelen Projektben használt SPR spektrométer és Langmuir mérleg működtetéséhez és az adatok feldolgozásához használjuk.

A kutatás első évében lényegében a nanokompozit filmek önrendeződéssel történő felépítéséhez szükséges komponensek egymással való kölcsönhatásait vizsgáltuk. Az első éves kutatások eredményeit egy publikáció (M. Szekeres, A. Széchenyi, K. Stépán, T. Haraszi, I. Dékány: Layer-by-layer self-assembly preparation of layered double hydroxide-polyelectrolyte nanofilms by surface plasmon resonance spectroscopy Colloid and Polymer Science, 283 (9), 937-945, 2005) és egy konferencia bemutatás (I. Dékány, T. Haraszi, Preparation and structural properties of ultrathin films, Invited lecture Louis Pasteur Univ., Strasbourg, 11-14, June, France, 2003.) tartalmazza. Az elért eredményeket röviden összefoglalva, megállapítottuk, hogy

i) a kompozit nanofilmek rétegenkénti önrendeződéses felépítésében elsődleges fontosságú, hogy a multiréteg és a hordozó közötti kapcsolatot teljes mértékben disszociált, nagy töltéssűrűségű polielektrolit, vagy szintén önrendeződéssel kialakított monolmolekulás réteggel biztosítsuk

ii) a premanens pozitív töltésű, lamellás szerkezetű kettős hidroxid (LDH) nanorészecskékből és anionos polielektrolitból felépített szerkezetek stabilitásához a polielektrolit töltését optimalizálni kell, sem túl alacsony, sem túl magas töltéssűrűség nem kedvez a kialakított filmek stabilitásának. Ez a megállapítás alátámasztja N.A. Kotov (NanoStructured Materials, Vol. 12, pp. 789-796, 1999, Layer-by-layer self-assembly: the contribution of hydrophobic interactions) korábbi következtetését. Ezt a szabályszerűséget a szakirodalomban még a legújabb közleményekben sem lehet általánosan felismert, elfogadott és alkalmazott elvként megtalálni, ezért tartjuk lényeges hozzátténeket a nemzetközi szakirodalmi anyaghoz a Projekt keretében megjelent publikációknak ezt a pontját.

iii) a filmek szerkezete alapvetően változik az alkalmazott részecske szuszpenzió koncentrációjával. Minél töményebb diszperziókból képződik az önrendeződő LDH réteg, ennek részecskesűrűsége annál nagyobb, és a sűrű borítottság nem kedvez a nagyobb számú rétegek képződésének. Az ennek magyarázatául szolgáló feltételezett mechanizmusokat szintén közöltük a publikációban.

Szintén az első kutatási év eredménye a Langmuir-Blodgett technikával készített Stöber szilika nanorészecskékből felépített mono- és multiréteges filmekben elérhető rendezettség javításával és ezen filmek fotonikus tulajdonságainak vizsgálatával kapcsolatos publikációk megjelenése, amely egy párhuzamosan futó együttműködési programban, de a jelen Projekttel szoros összefüggésben végzett kutatások eredménye. Külföldi együttműködő

partner a Leuveni Katolikus Egyetem, és az Antwerpeni Egyetem egy-egy kutatócsoportja volt. 2 publikációban és 1 konferencián mutattuk be a jelen ptojekthez kapcsolódó eredményeket:

M. Szekeres, O. Kamalin, P. G. Grobet, R. A. Schoonheydt, K. Wostyn, K. Clays, A. Persoons, I. Dékány: Two-dimensional ordering of Stöber silica particles at the air/water interface, *Colloids and Surfaces A*, 227, 77-83, 2003.

I. Dékány, J. Németh, M. Szekeres, R. Schoonheydt: Surface, liquid sorption and monolayer forming properties of hydrophilic and hydrophobic Stöber silica particles, *Colloid and Polymer Science*, 282, 1-6, 2003.

M. Szekeres, O. Kamalin, R. A. Schoonheydt, K. Wostyn, K. Clays, A. Persoons, I. Dékány: Application of the Langmuir - Blodgett technique to prepare photonic bandgap structures from monodisperse colloidal silica spheres, *Workshop on Nanomaterials and Catalysis Leuven (Haasrode), Belgium, 5-6 February, 2004.*

A fotonikus bandgap anyagok előállítása nem kizárólagosan tartozott a jelen projekthez, azonban a multiréteges nanofilmek rétegenkénti előállítása, mint módszer, egyértelműen a jelen projektben végzett kutatások témája. Az itt elért eredmények is részét képezik a kutatási időszak eredményeinek. Ezzel az indokkal szerepeltetem a zárójelentésben, de a megjelent cikkekben a jelen OTKA támogatásra nem történt hivatkozás. Ebben a témában a pályázathoz közvetlenül kapcsolódó eredményeink a következők:

- i) a Stöber szilika részecskék L-B technikával felületmódosítás után alkalmasak rendezett szerkezetű mono- és multirétegek felépítésére, amely eredmény alátámasztotta egy korábbi kutatás eredményeit, amelyet a leuveni közreműködő fél elsőként közölt a szakirodalomban
- ii) megállapítottuk, hogy a rétegek rendezettségét nem növeli, hanem csökkenti a rendező célszállal a rétegbe bevitt felületaktív anyag
- iii) új felületmódosítási eljárást dolgoztunk ki, nevezetesen a szilika részecskék metanollal szobahőmérsékleten történő többszöri kezelését, amely felületi metoxi-csoportokat alakított ki a Stöber szilikán. Ez a felületmódosítás, tenzid hozzáadása nélkül, az eddigi legrendezettebb részecskefilm kialakítását tette lehetővé az L-B technikával.
- iv) az L-B technika alkalmazásával a multirétegek felépítésekor a rétegre merőleges irányban, a részecske-aggregátumok beépülésével keletkező rendezetlenségek eliminálódnak, és a multirétegek két dimenzióban rendezettek válnak, amelyet az optikai tulajdonságok vizsgálata bizonyított.

Az L-B technikával kialakítandó rendezett multiréteges kompozit nanofilmek témakörében tovább folynak a kutatások diplomamunka keretében, olyan irányban, hogy további szilika felületmódosítási eljárásokat dolgozunk ki, a tökéletes hexagonális szoros részecske - elrendeződés megvalósítása céljából. Ennek a kutatási témának felbecsülhetetlen a gyakorlati jelentősége, mivel a fotonikus bandgap anyagok a számítástechnika, informatika, telekommunikáció és szenzortechnika új korszakát indíthatják el, azonban ehhez először meg kell találni azokat a biztonságos bottom-up (kolloid kristályok felépítése 1, 2, illetve 3 dimenzióban, tervezett mintázatú törésmutató-modulációk beépítésével), eljárásokat, amelyek alkalmasak arra, hogy a kívánt szerkezeteket nagy mennyiségben gazdaságosan építsük fel. Legújabb eredményünk a Stöber szilika felületmódosítását illetően egy olyan részecske, amely a Langmuir mérlegben a víz fázis felületén szétterítve egyáltalán nem mutat részecske-részecske vonzási kölcsönhatásokat, és a kompressziós és a relaxációs két dimenziós izotermák között nincs histerézis. A következő feladat az egymással csak tasztító kölcsönhatásban álló részecskék átvitele szilárd hordozóra a rendezett szerkezet megtartásával, majd pedig a multiréteges filmek funkcionálizálása lesz.

A második kutatási évben a témavezető-váltás miatt a kompozit réteg építést részben a biofilmek irányába fordítottuk. Az önrendeződési mechanizmusok egy újabb válfaját, a heterogén nukleációs rétegeképződési technikát is alkalmaztuk. Ezzel a módszerrel magasabb

szintű rendezettség érhető el az egyes rétegekben az adszorpciós önrendeződéshez viszonyítva. A heterogén nukleációs folyamatban okta-kalcium-foszfát kristály-réteg képződését értük el a reakció paraméterek – pH, prekursor ion koncentráció és mólarány (a kívánt kristályszerkezet kialakulásához szükséges anyagmérleg biztosítására), illetve az adagolási sebesség – állandó értéken tartásával. Ebben a témában is megjelent egy publikáció (M. Szekeres, G. Fodor, A. Fazekas, M. Radnai, K. Turzó, I. Dékány: Formation of octacalcium phosphate by heterogeneous nucleation on titania surface, Colloid and Polymer Science, 283 (6), 587-592, 2005.). A munka további folytatása várható, a konkrét gyakorlati alkalmazás irányában. Az alapkutatásokkal azt tisztáztuk, hogyan lehetséges a heterogén felületi nukleációs folyamatot, amely eredendően híg szuszpenziókra kidolgozott formában található meg a szakirodalomban, úgy módosítani, hogy a gyakorlati alkalmazáskor elegendő mennyiségű felületkezelt terméket kapjunk, ami a gazdaságosság feltétele. Megállapítottuk, hogy a híg szuszpenziós kísérletekhez viszonyítva nagyobb effektív felület elvonja a prekursor anyagok jó részét a kiindulási oldatból egy adszorpciós folyamatban, és a munkánk eredményeként sikeresen megjósoltuk ennek a megkötődésnek a mértékét, és a prekursor koncentráció adszorpció utáni tervezett mértékű visszaállításával sikeresen véghezvittük a reakciót a nagyobb töménységű szuszpenzióban is. Ennek az ismeretnek a birtokában készülünk folytatni a munkát, konkrét titán implantátum anyagokra adaptálva, a SZTE Fogászati Klinikai Intézetével együttműködésben.

A kutatás harmadik évében visszatértünk az eredeti munkatervhez, és a rétegenkénti adszorpciós önrendeződéses technikával kialakított kompozit multiréteges szerkezetekben vizsgáltuk a nanorészecskék beépítésének lehetőségeit, biológiai nanorészecskék, globuláris proteinek alkalmazásával. A rétegépítés menetét és a szerkezet tulajdonságait felületi plazmon rezonancia spektroszkópiával, röntgen diffraktometriával, UV-VIS spektroszkópiával, valamint atomi erő mikroszkópia módszerével ellenőriztük. Az eredmények összefoglalásával elkészült egy kézirat, amelyet közlesre a Biomacromolecules nemzetközi folyóirathoz nyújtunk be. A kéziratot jelenlegi formájában a jelentéshez csatolom. A globuláris proteinek, amelyek beépítésével foglalkoztunk, egy kivételével enzim molekulák. A kutatások célja olyan szerkezetek kialakítása, amelyekben a proteinek eredeti aktív formájukat megtartva immobilizáltak, és esetleges aktivitás növekedés mellett fermentorokban, vagy a szenzor technikában nyerhetnek alkalmazást. A globuláris proteinek beépítésével kapcsolatban tett új megállapításainkat a következőkben összegzem:

- i) alacsony háttér ionerősség alkalmazásával az ellentétes töltésű szaponit agyagásvány részecskék és globuláris proteinek egyenletes rétegvastagságú, és nagy számú rétegből álló szerkezetű kompozit filmeket képeznek az önrendeződéses adszorpciós technikával. Ez a megállapítás új szemszögbé helyezi Lvov és munkatársai (Lvov, Y., Ariga, K., I&nose, I., Kunitake, T. J. Am. Chem. Soc., 1995, 117,6 117.) korábbi eredményét, amely szerint az általunk is alkalmazott lizozim enzim és az alumino szilikátok nem képeznek multiréteges szerkezeteket önrendeződéssel.
- ii) a globuláris proteinek a rétegeképítés szempontjából alapvetően eltérően viselkednek, mint a jelen projekt első évében vizsgált lineáris polielektrolitok. A globuláris protein – agyagásvány rendszerekben a multiréteg képződés kizárólag az elektrosztatikai vonzó kölcsönhatásokra épül, szemben a polielektrolitos rendszerekkel, amelyeknél a töltés mellett a nem-elektrosztatikus kölcsönhatások meghatározó szerepük.
- iii) az egymást követő rétegek közötti összetartó mechanizmusok teljesen eltérőek a globuláris protein-agyagásvány és a polielektrolit-agyagásvány rendszerekben. Az előbbieknél az összetartó erő a két egymást követő agyagásvány réteg részecskéinek horizontális átlapolódásából származik, ilyenkor ugyanis az összekötő proteinek és az átlapolódó agyagásvány részecskék összefüggő térhálós szerkezetet alakítanak ki kizárólag elektrosztatikai vonzási mechanizmussal, amely hasonló ahhoz, ahogyan a falak építésekor

csúsztatják el egymáshoz viszonyítva a téglákat az egymást követő sorokban. Ezzel szemben a polielektrolitos rendszerekben az összefüggő három dimenziós térháló csak akkor épülhet ki, ha az egymást követő polielektrolit rétegek között felléphet nem-elektrosztatikus (vonzó) kölcsönhatás. Ezt a polielektrolitok töltésének szabályzásával lehet elérni.

iv) a globuláris proteinek adszorpciója az agyagásvány lamella-réteggel borított felületen annál nagyobb, minél kisebb a protein molekulatömege, és minél nagyobb a töltéssűrűsége.

v) a multiréteges globuláris protein-agyagásvány lamella szerkezetek felületi durvasága összefügg a beépülő protein méretével: a nagyobb globulumok interkalációja nagyobb felületi durvasághoz vezet, míg a kis molekulatömegű proteinek, pl. a lizozim, síma ismétlődő rétegeket alakít ki. Ezeket a film tulajdonságokat a röntgen diffrakció interferencia csúcsainak intenzitás-változása mutatta ki.

Közlésre előkészített kézirat:

Layer-by-layer self – assembly preparation of functional hybride biofilms with saponite and proteins

Márta Szekeres^{*1}, Krisztina Szendrei¹, Tamás Szabó^{1,3}, Viktória Hornok¹, Robert Schoonheydt³, Imre Dékány^{1,2}

¹ Department of Colloid Chemistry, University of Szeged, Hungary, 6720. Szeged, Aradi vt. 1., Hungary

² Nanostructured Materials Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Aradi vt. 1., 6720. Szeged, Hungary

³ Centrum voor Oppervlaktechemie en katalyse, Departement Microbiele en Moleculaire Systemen, KU Leuven, Kasteelpark Arenberg 23, 3001 Leuven, Belgium

* Corresponding author Tel: +36-62-544-409, Fax: +36-62-544-042, e-mail: szekeres@chem.u-szeged.hu

Abstract

Layer-by-layer (L-b-L) self assembly of alternate saponite and protein (papain, lysozyme, protamine or haemoglobin) monolayers was used to construct ordered multilayered hybride functional biofilms. Having fully explored the building up strategy for these films, the aim will be to use them as immobilized slabs of the active molecules and to investigate their use as biological catalyzers or sensors. The L-b-L multilayer preparation method gave substantially ordered, uniform film structures, evidenced from surface plasmon resonance, X-ray diffraction, UV-VIS spectroscopy and AFM results. The molar adsorption of the globular proteins on the exposed saponite film surfaces increased with decreasing molecular weight, and it correlated directly with the charge density on the proteins, as well. The smaller the molecular weight of the proteins, the larger their adsorbed molar amount and the smoother the next adsorbing saponite layers were in the sequential film building procedure. Because of the

decrease in the ordering and the increase in the bilayer thickness with increasing protein molecular weight, evaluable SPR spectra could be recorded on 4 bilayers on the largest papain and 6 bilayers on the smallest protamine alternate films with saponite. The film building characteristics of the globular proteins are substantially different from those of linear polyelectrolytes, which is evidenced from the comparison with our previous study on anionic polyelectrolyte and layered double hydroxide alternate multilayers [15].

[15] M. Szekeres, A. Széchenyi, K. Stépán, T. Haraszti, I. Dékány, *Colloid and Polymer Science*, 283 (9), 937-945, 2005.

Introduction

Layer-by-layer (L-b-L) self-assembly method is a widely used procedure to construct multilayered structures. The wide variety of possible building elements, organic/inorganic, molecular/particulate, structural/functional, the mild preparation conditions and low-cost technology make its application increasingly popular in optics, opto-electronics, high-tech and bio-tech.

In our previous study [15] we have investigated the general properties that govern alternate layer depositions using a positively charged inorganic layered particle, layered double hydroxide (LDH) together with anionic polyelectrolytes. The main findings can be summarized as follows:

- i) The first layer on which the multilayer structure is based is of primary importance. We have concluded, that this binding layer must be highly charged. Sodium salts of mercapto-propanoic acid and of polystyrene sulfonate (PSS) provided stable multilayer base, while mercaptoethanol, mercapto-propanoic acid or pure negatively polarized gold surface were unable to keep adsorbed multilayers.
- ii) The charge of the layering polyelectrolytes must not be too high. Highly charged PSS instead of adsorbing, detached the previously formed layers from the surface after a few deposition steps, while using moderately charged polyacrylate, more than 18 layers could be built up in otherwise identical conditions. This observation is in accordance with the findings of numerous other studies [16]. Analysing the thermodynamics of multilayer formation Kotov proved that non-electrostatic forces (including hydrophobic interactions) are highly important in L-b-L self-assembly [16].
- iii) It was also observed, that the concentration of the inorganic particle suspension affects the deposition. More concentrated suspensions prevented stable multilayer formation. This phenomenon was also attributed to the elimination of the interlayer non-electrostatic polyelectrolyte interactions that has been proven to increase the multilayer stability and durability. Increasing the number density of the particles in the layer decreases the possibility of interlayer polyelectrolyte contact formation.

Up to date most of the multilayer self assembly films were prepared using linear polyelectrolytes as one or both of the alternate layers. Only very few studies dealt with the construction of multilayer structures from globular proteins and colloidal inorganic particles, without the incorporation of a polyelectrolyte [7].

Globular proteins or polypeptides with secondary structure behave substantially differently, than linear polyelectrolytes. Hiller et al [6] found that two globular proteins, protamine and bovine serum albumin do not assemble in a multilayer structure with each other. PLGA polypeptide (Boulmedais et al [8]) and protamine (Hiller et al [6]), incorporated in L-b-L multilayer structures have considerable mobility, which is characteristic of superlinearly or exponentially growing films. Protamine could be released from the L-b-L film if it was placed in a protamine solution, even though the protein was stable in the film against washing with buffer solution during several days. PLGA was found to diffuse in and out the structure during the building process. Lvov et al [17] found that globular proteins like myoglobin and lysozyme do not self-assemble on negatively charged aluminosilicates, while they make stable films with anionic polyelectrolytes.

In the present study we examine the possibilities of multilayer immobilization of four different globular proteins protamine, lysozyme, papain and haemoglobin in multilayer structures built up with permanently negatively charged clay mineral saponite, that may be exploited in a variety of biotechnology applications. Being able to construct functional multilayers, further investigations will be aimed at the testing of the function of the multilayers for biological catalysis or sensing applications.

Protamine is a highly positively charged protein, rich in basic amino acids. Binding to heparin polyanions in blood, it is known to invert heparin's anti-coagulant action and is administered after cardiac and vascular surgery [1]. Protamine also binds tightly to DNA [2] thus, application in DNA binding assays is prevalent.

Papain is one of the protease enzymes. It is capable also of hydrolyzing carbohydrate polymers, like chitosan [3]. It was demonstrated, that the enzymatic activity increased if the enzyme was immobilized on crystalline chitin powder particles, and the reaction was effective at much more mild conditions (lower pH and higher temperature), than using free enzyme in solution.

Lysozyme cleaves peptidoglycan and polysaccharide repeat linkages. The activity of lysozyme is a function of both pH and ionic strength. The activity at pH 6.2 is maximum between 0.02 and 0.1 M, and at pH 9.2 between 0.01 to 0.06 M ionic strength [4].

Haemoglobin, an iron-containing metalloprotein, transports oxygen in blood. The maximum O₂ – binding affinity is at pH 6, below its isoelectric point [5].

Protamine, papain and lysozyme are positively charged in a wide range of pH, haemoglobin is positively charged below pH=7, and the alternate, layer-by-layer deposition of them with anionic clay saponite at slightly acidic pH can be used to immobilize the proteins in a multilayer structure. Immobilization using electrostatic attraction interactions is a promising method of simple preparation of fermentation reactor and sensor elements.

The build-up of protein-clay multilayers was monitored by using surface plasmon resonance (SPR) technique, UV-VIS spectroscopy and X-ray diffractometry. The films have been visualized by atomic force microscopy. One set of experiments was performed using gold-coated SPR slides as substrates. For further investigations, we prepared the same film constructions on quartz substrates, that are transparent to the low wavelength region of UV-VIS and can be properly inserted into the sample holder of the X-ray diffractometer. AFM pictures however, were taken on the films that had been built on the SPR slides.

Materials

The 0.5 - 2 μm fraction of sodium saturated saponite [22] (Source Clay Minerals Repository of the Clay Minerals Society) was used as the inorganic layering component of the multilayer films. The cation exchange capacity of the clay sample is ~ 74 meq/100 g [12]. Globular proteins were deposited alternately with the clay: chicken egg lysozyme, protamine sulfate (protamine) from herring, papain from papaya (Sigma), and haemoglobin (Reanal, Hungary). The properties of the proteins are collected in Table 1. The DLS sizes were measured in a Malvern Zetasizer Nano ZS dynamic light scattering apparatus. The sizes given in Table 1 are the average diameters calculated from the number distribution curves. For binding the multilayers to the substrate we used a high molecular weight cationic polyelectrolyte poly (diallyl dimethyl) ammonium chloride, PDDA. MilliQ water (ultra pure water) was used in the experiments, from MilliQ RG apparatus of Millipore.

Table 1. Specifications of the applied proteins

Protein	Lysozyme	Protamine	Papain	Haemoglobin
Source	chicken egg	herring	papaya	bovine blood
Amino acid residues	129	32	212	564
Molecular weight (Da)	14300	4500	21000	72000 including heme
IEP (pH)	10.7 [9]	10-12 [10]	8.75 [11]	7.1
pH (0.1% protein solution in 0.005 M NaCl)	4.45	5.98	5.88	7.38
DLS size (nm) at pH ~ 4 in 0.005 M NaCl	3	4	4	9
Absorption coefficients at $\lambda=280$ nm 1/(M cm) [19]	$3.8 * 10^4$	-	$5.7 * 10^4$	$118 * 10^4$

Experimental methods

Multilayer preparation protocols were identical in the two sets of films: those built on the SPR slides and on the quartz slides. Saponite suspension of 0.1 % concentration in 0.005 M NaCl electrolyte was used for L-b-L depositions at its original pH, 7.42 ± 0.05 . PDDA binding layer was prepared from 0.001 % solution of the high molecular weight

polyelectrolyte in ultra pure water. Proteins were dissolved at 0.1 % concentration in 0.005 M NaCl solution, and the pHs were adjusted with HCl between 4 – 5, if needed. The original solution pH values of the proteins are listed in Table 1.

The film preparation strategy was the following. The SPR slides were washed with ethanol and dried in N₂ stream. The quartz slides were cleaned in chromic acid, washed with colloidal dust-free ultrapure water and put in 0.1 M NaOH solution for 30 minutes before use, and washed thoroughly. The SPR slides were inserted into the sample holder of the SPR apparatus and the solution compartment was filled with the PDDA solution. After 10 min of contact time the solution was removed and the sample was washed twice with water, each time for 10 minutes. Next, it was dried in N₂ stream during 30 minutes. For coating with saponite and protein layers the same procedure was followed, as described for PDDA. The quartz slides were coated by using a programmable dipping apparatus. The slides were dipped into the sample solutions and suspensions with a constant speed, held in for 10 min, lifted up with constant speed and left to dry in air before the next dipping cycle. Each layer was washed dipping twice into ultrapure water, each time for 10 minutes. The layering sequence for the two kinds of building procedures was identical. The binding PDDA layer was followed by the saponite layer, then protein layer was deposited. The saponite-protein sequence was repeated until SPR curves could be recorded. On the quartz slides 6 saponite-protein sequences were deposited for all proteins.

The SPR spectra were taken in a home-built apparatus [15] in the Kretschmann-Raether configuration [13,14] using plane-polarized He-Ne laser light ($\lambda=633$ nm), and Oriel 13094 goniometer. SPR slides coated with 50 nm thick gold layer (AU.0500.ALSI) were purchased from Platypus Technologies. 10 mm, BK 7 Valumax RT-Angle prism (Newport) was used in the SPR measurements, and the SPR slides were contacted with the prism using index matching fluid from Newport ($n=1.52$).

The quartz slides were used for the UV-VIS (Uvikon 930 spectrophotometer) and XRD (Philips X-ray source, Cu K α = 1.54 Å, with a Kratky camera, and a position sensitive detector) investigations of the process of the building up and of the structure of the multilayer systems, respectively.

Scanning probe microscopic images of the films prepared in the SPR apparatus were taken in tapping mode by using a Digital Instruments MultiMode AFM.

Results and discussion

The changes in the incidence angle causing reflection minimum due to surface plasmon excitation (Θ SPR) on the coated SPR slides are represented in Figures 1 to 3. As the PDDA polyelectrolyte, saponite and protein layers build up in sequence, the angle shifts from about 43 ° characteristic of pure ~ 50 nm thick gold layer to about 49 °, characteristic of about 13 additional layers on the pure gold surface.

For comparison to the saponite-protein multilayers, saponite-PDDA films were attempted to construct. As it can be seen from Figure 1, only 4 layers remained on the substrate surface. Engulfing of the substrate for the third PDDA-layer formation led to complete detachment of the 4-layered film and the pure gold surface SPR curve was got back. This observation is in accord with our previous finding [15] that using fully dissociated polyelectrolytes do not support thick multilayer development, supposedly because of strong polyelectrolyte electrostatic repulsion between the two subsequent polyelectrolyte layers in the film. The electrostatic attraction between polyelectrolyte and oppositely charged solid

particles forces to desorb the particle layer from the surface, possibly together with more or all adsorbed layers.

SPR spectra of 9-13 layered constructions could be recorded, depending on the protein type, as it can be seen in Figures 2 and 3. In contrast to the saponite-PDDA film, the next saponite layer adsorption after the last recorded SPR spectrum did not detach the multilayers, but in the following measurements no more SPR minima could be observed. In general, because of the observed linear dependence of the Θ SPR shifts ($\Delta \Theta$ SPR) with increasing layer number (see Figure 4), it can be supposed that fairly uniform layers were prepared from all the proteins. The layer thickness and the layer refractive index determine the magnitude of $\Delta \Theta$ SPR, which is in turn proportional to the adsorbed amount of material in the corresponding layer [20]. A 0.1° shift in the SPR angle for globular proteins is equivalent to a surface concentration of 1 ng/mm^2 , irrespective of the protein structure, since the refractive indices of most proteins are essentially identical, about 1.55. Haemoglobin is an exception in this regard because of its iron content. The real part of the complex refractive index of oxygenated haemoglobin is 1.40 [21]. The average protein concentrations per one monolayer, calculated from the SPR results are collected in Table 2. With the exception of haemoglobin, the adsorbed mass of the proteins increases with increasing molecular weight. The molar amounts of the proteins in the multilayers show a reversed trend, which correlates with the protein charge density (data seen in Table 2). The latter correlation reveals that the adsorption of the proteins on the saponite layers is of electrostatic character. The higher the charge density, the higher is the affinity of the protein to the negatively charged saponite layer. The number of bilayers that gave measurable surface plasmon resonance increased with decreasing molecular weight and with increasing molar adsorption. Six bilayers could be measured for protamine and lysozyme, and four for the largest molar weight papain.

Table 2. Average adsorption densities of proteins per one monolayer in the saponite-protein multilayered structures, calculated from the SPR and UV-VIS spectra.

Protein	Adsorption ng/mm² (SPR)	Molecular weight (Da)	Adsorption mmoles/mm² (SPR)	Relative adsorption* (UV-VIS)	Charge at pH = 4 mmol/g
Papain	7	21000	0.33	0.304	0.707
Haemoglobin	6	72000	0.083	0.034	1.05
Lysozyme	5.3	14300	0.37	0.67	0.95
Protamine	3	4500	0.66	non measurable	4.44

*The numbers denote equivalent concentrations in $\mu\text{mol/L}$ units, the concentration of pure protein that would give the same absorption value (calculated by using the protein absorption coefficient), as the effectively measured extinction from the separate bilayers, after averaging over the whole film. It is supposed that the saponite layers contribution to the extinction is constant in each bilayer.

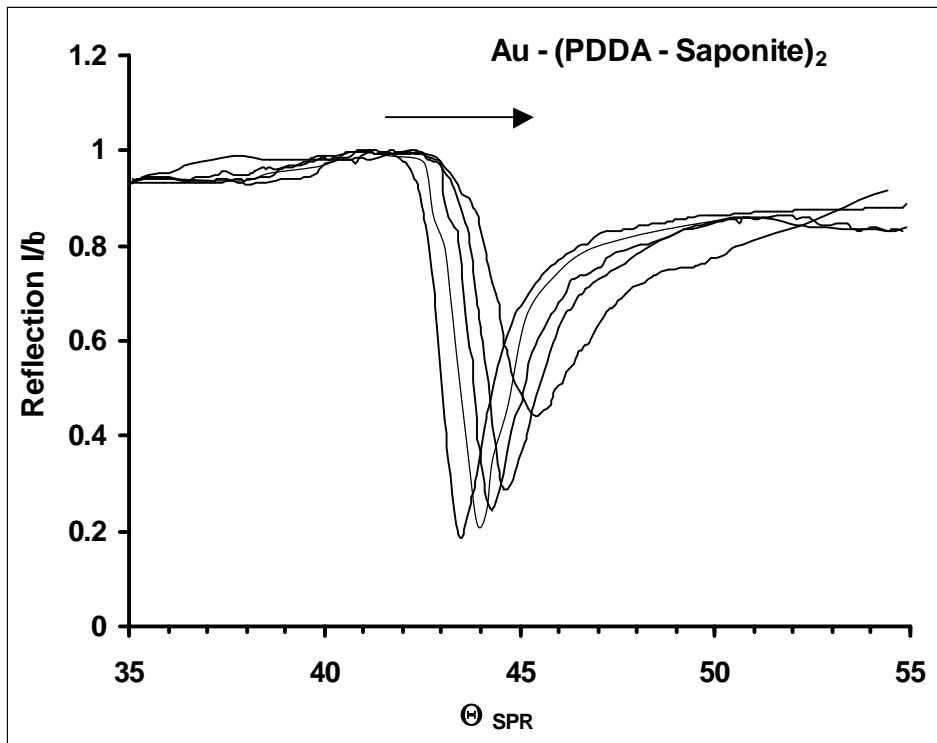


Figure 1. SPR spectra of the saponite-PDDA alternate layered films

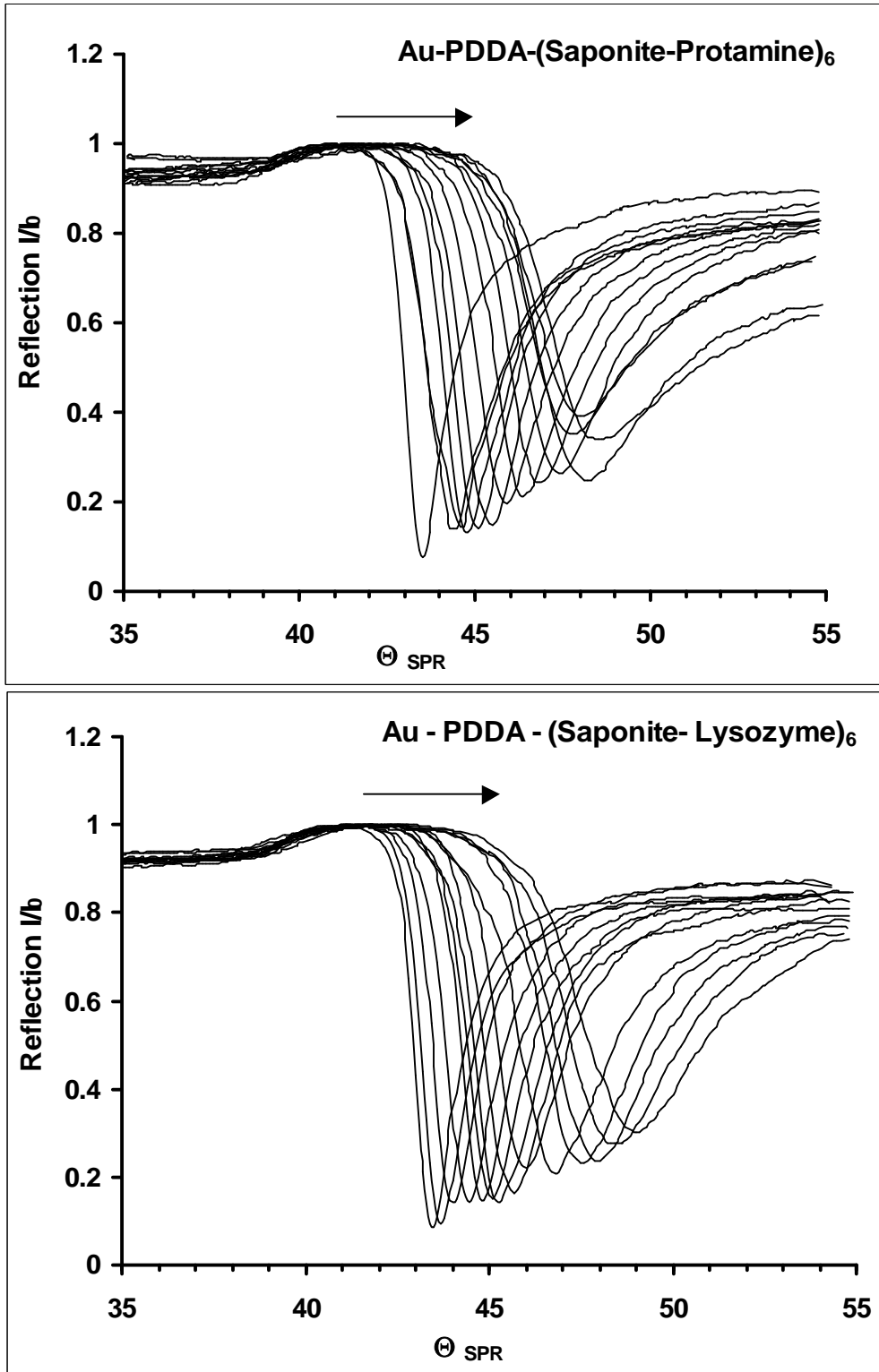


Figure 2. SPR spectra of the saponite – protamine and saponite – lysozyme multilayers

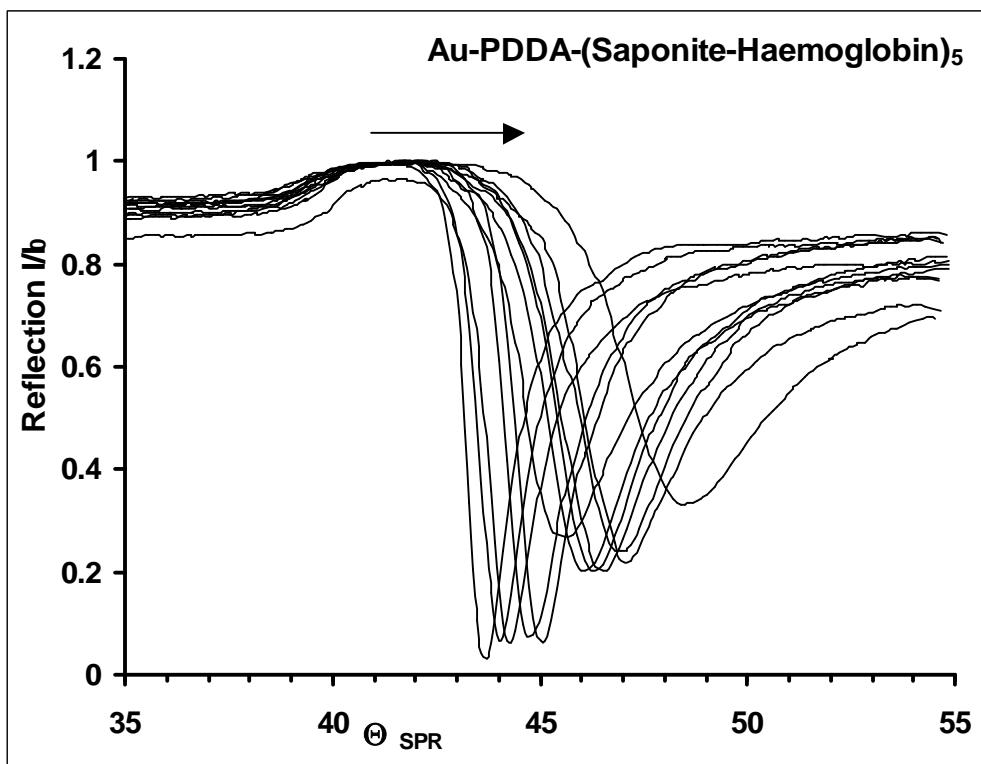
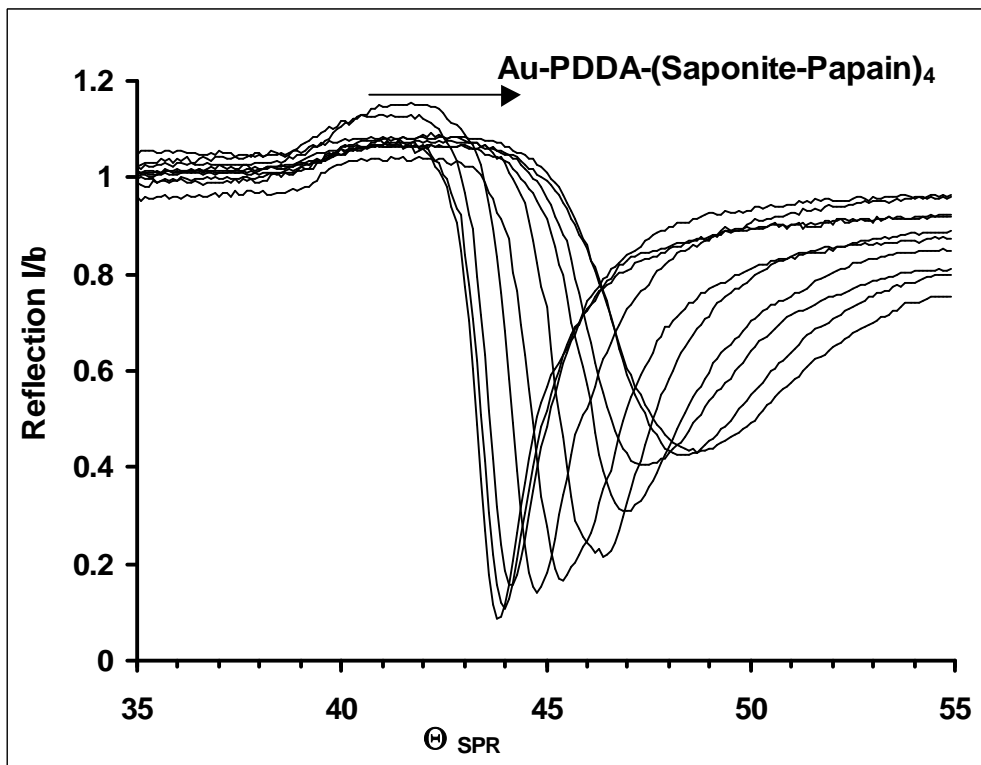


Figure 3. SPR spectra of the saponite – papain and saponite – haemoglobin multilayers SPR spectra

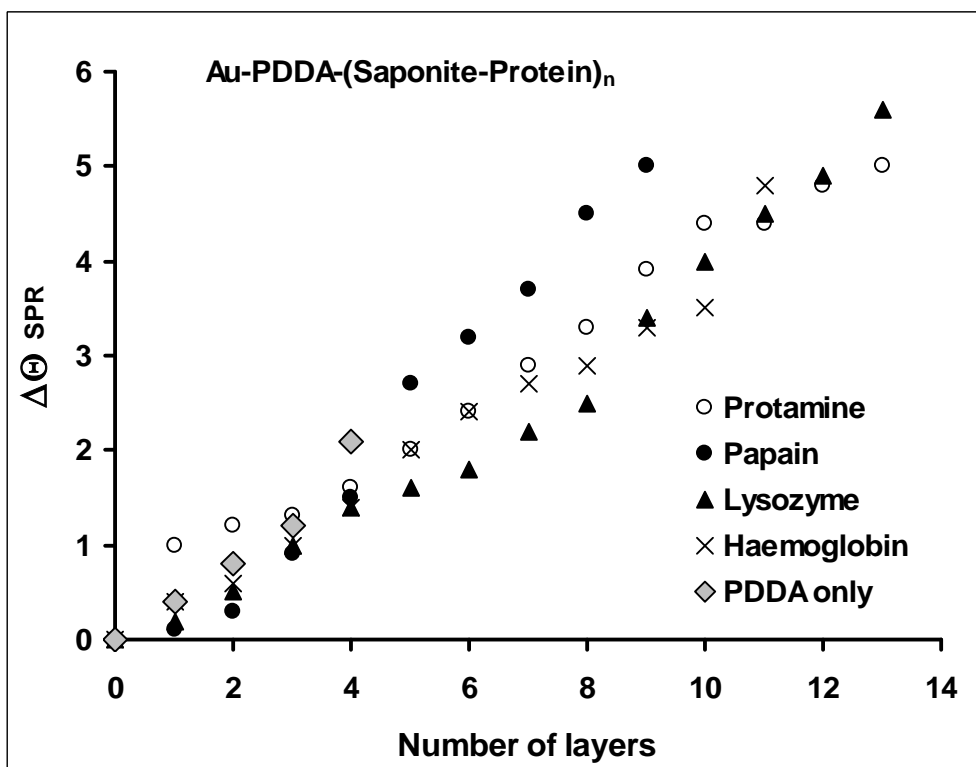


Fig. 4. Shifting of the SPR-angle ($\Delta\Theta_{SPR}$) with the number of layers built up by saponite and protein alternate self-assembly deposition on Au-SPR slides

The results of the UV-VIS spectrometry of the 6-bilayer containing hybride nanofilms on quatrz are presented in Figure 5 and Table 2. The increase in the extinction is due to the absorption of the tyrosine, thryptophane and cystine residues of each protein at 280 nm, the higher wavelength (405 nm in our spectra) absorption of haemoglobin, and the scattering and absorption by the saponite particles. The extinction of the films was evaluated at $\lambda=208$ nm wavelength. This analysis allows to relate the haemoglobin adsorption to that of the other proteins, which was not possible in the case of the SPR results. By this same procedure on the other hand protamine is excluded from the UV-VIS analysis, since it has no specific UV-absorption. The extinction increase in the saponite-protamin films is solely due to the scattering or absorption of light by the adsorbed saponite particles. Accordingly, as it can be seen in Figure 5, the building up of the saponite-protamine multilayered structures results in the smallest increase in the extinction at 280 nm wavelength among all the investigated multilayers. Relative adsorption values of the lysozyme, haemoglobin and papain in the hybride nanofilms were calculated using the absorption coefficients of the proteins, and the numbers presented in Table 2, correspond to equivalent μ molar (volume) concentrations. Since the area of illumination is not known, the exact amount of proteins in the layers can not be calculated. The equivalent molar concentrations contain the saponite layer extinction as well, as an unknown additive component, which is supposed to be constant over the entire film. The relative adsorption of haemoglobin is one order of magnitude smaller, than that of the papain and lysozyme. On the basis of the UV-VIS measurements the general conclusion follows, that the molar adsorption of the proteins decreases with increasing molar mass. This result is fully consistent with SPR spectroscopy results (see the data in Table 2). It is likely

then, that the plateau value of the adsorption has been reached, and the structure of the layers is close to a complete monolayer.

The adsorption density of the proteins has been visualized using atomic force microscopy. The AFM pictures of the lysozyme and papain coated saponite films can be seen in Figure 6. In the pictures the flat lying, lamellar saponite particles can be seen, overlapping in the subsequent layers. The pictures were taken on multilayer structures (6 bilayers for lysozyme and 4 for papain), the top layer is a protein layer. In all pictures it is apparent that the protein globules are spread evenly over the entire surface. The spots of the proteins in both samples are shown as dips, not hills. This is supposed to be due to the image effect in the tapping mode AFM. The AFM tip is oscillated during the surface scan with a preset amplitude, and when the surface force field changes, the oscillation amplitude of the tip also changes. In response to this change the tip is approached to or lifted from the surface, depending on the sign of the change. We can hypothesize in the case of the soft protein globules deposited on the hard surface saponite particles, that when the tip encounters the soft proteins, it will experience a smaller surface force relative to the saponite surface force, causing an increase in the oscillation amplitude, and in response, the surface will be approached more close. Due to this latter effect the soft protein globules on the hard saponite surface appear as dips. The surface roughness values calculated analysing the AFM pictures are ~3 nm for the saponite-lysozyme, and 6 to 9 nm for the saponite-papain surfaces. The roughness values are not characteristic however of the saponite – protein bilayer thickness due to the fact, that more than one bilayers can be seen in one scan at several locations, and the deep holes from the underlying bilayers are also scanned place to place. Another difficulty of the roughness analysis of the AFM pictures is, that the relatively large flat features of saponite can not be followed exactly by the tip because of the small and sharp steps due to the lamellar structure of the clay particles and the few angstrom thick protein globules. Setting the PID values to optimal leaves numerous vertical peaks in the image because of overshooting the steps in the surface features. Such peaks are also included in the roughness calculation.

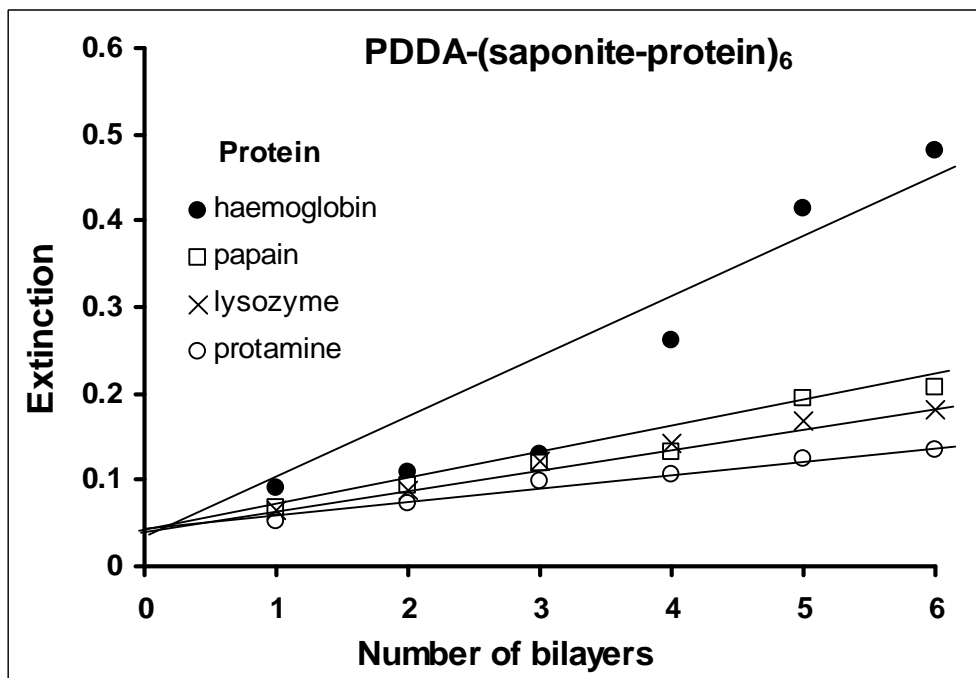


Figure 5. Increase of the extinction of the multilayers at 280 nm wavelength during the film preparation process. Each additional bilayer consisted of a saponite-protein structure.

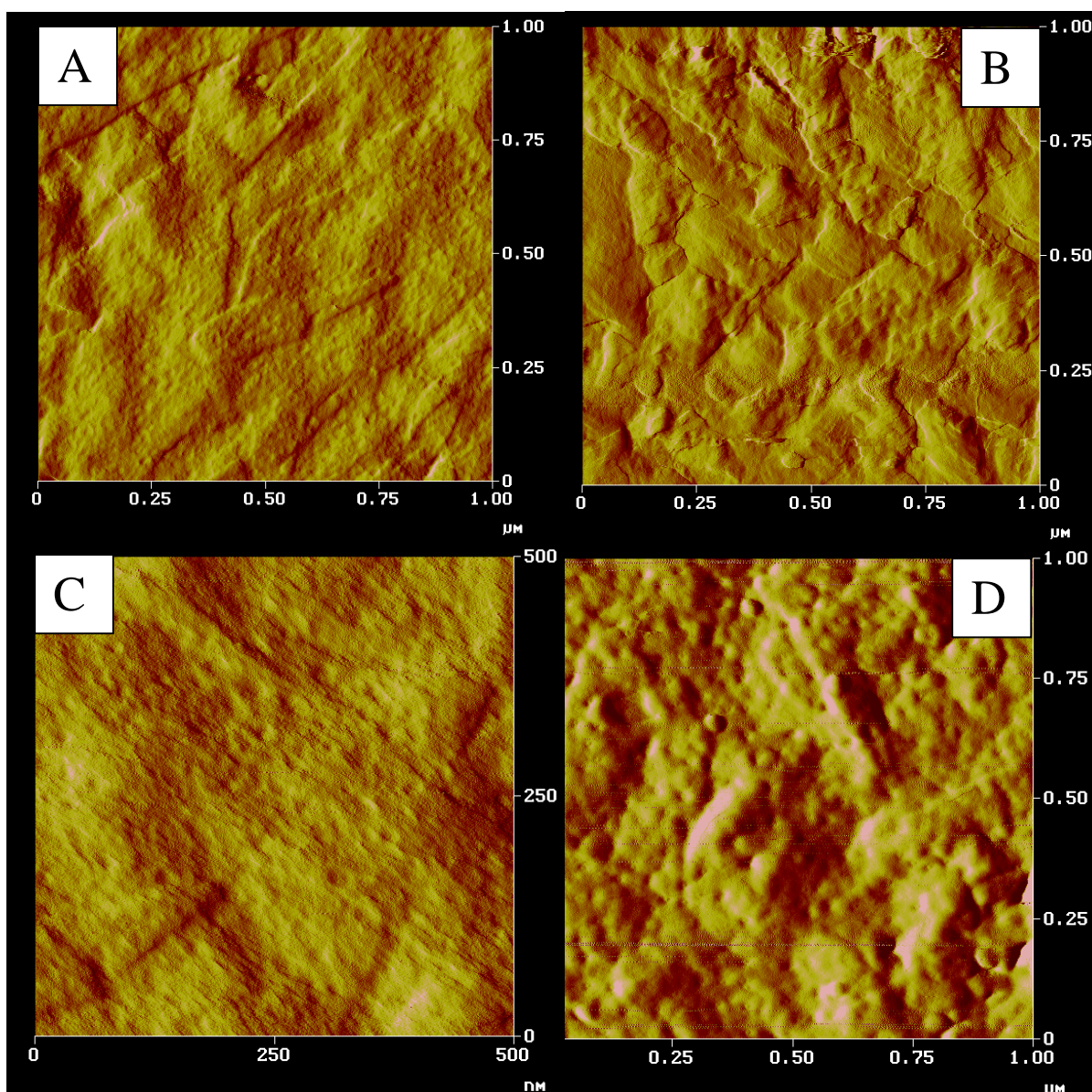


Figure 6. AFM images of the top protein-coated layers of saponite – lysozyme (A – C) and saponite – papain (D) multilayers. (A) and (B) are taken at different AFM parameter sets on $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ sample area, (C) is taken by scanning a smaller ($500\ \text{nm} \times 500\ \text{nm}$) film area with higher resolution.

X-ray diffraction patterns of the pure saponite sample and the saponite-protein films deposited on the quartz slides are presented in Figure 7. Pure saponite film was prepared on a quartz plate from dense saponite suspension, evaporating the water medium and subsequently dried at $200\ ^\circ\text{C}$ in an oven. The first and second order interference peaks are identified at $2\Theta=7.04\ ^\circ$ ($13.9\ \text{\AA}$) and $2\Theta=28.7\ ^\circ$ ($6.97\ \text{\AA}$), respectively, corresponding with literature data [18]. Protein incorporation between the saponite lamellae results in the shift of the first order

interference peak to higher basal plane distances (d_{001}), but the intensity of the peaks is much smaller than that of the pure saponite film. The large decrease in the intensity is due to increased disorder in the z-direction relative to pure saponite. All the films consisted of 6 saponite-protein bilayers, so that the X-ray diffraction peak intensity changes are not due to different amounts of layered saponite present in the films, but only due to the disordering effect of the proteins. To relate the peaks intensities to protein disordering effect may be reliable, if the electron density difference of all proteins (relative to air) are the same. This supposition can be afforded, but haemoglobin is again disclosed from the comparison because its iron content. As it can be seen from the data in Table 3, the largest protein papain ($M=23500$) caused the biggest disorder (smallest intensity, 460 a.u.) and the smallest protein protamine ($M=4500$) disordered least the multilayered structure (largest intensity, 750 a.u.). The medium sized lysozyme gives medium peak intensity ($M = 14300$, intensity = 680 a.u.). On the other hand, the shifts in the d_{001} values due to protein incorporation do not correlate with the molecular weight of the proteins (see the data in Table 3). To find an explanation to this latter phenomenon, further systematic investigations are needed. However, from the present experimental X-ray diffraction results it can be clearly seen, that the saponite layers in the saponite-protein films are single unit lamellae of the clay, because no signs of remaining interference from the pure saponite d_L distances could be found in the spectra. In any case, should they be present yet, the amount of them is negligible compared to the exfoliated elementary lamellae. The presence of primarily elementary lamellae in the films is also evidenced from the AFM pictures, by visualization.

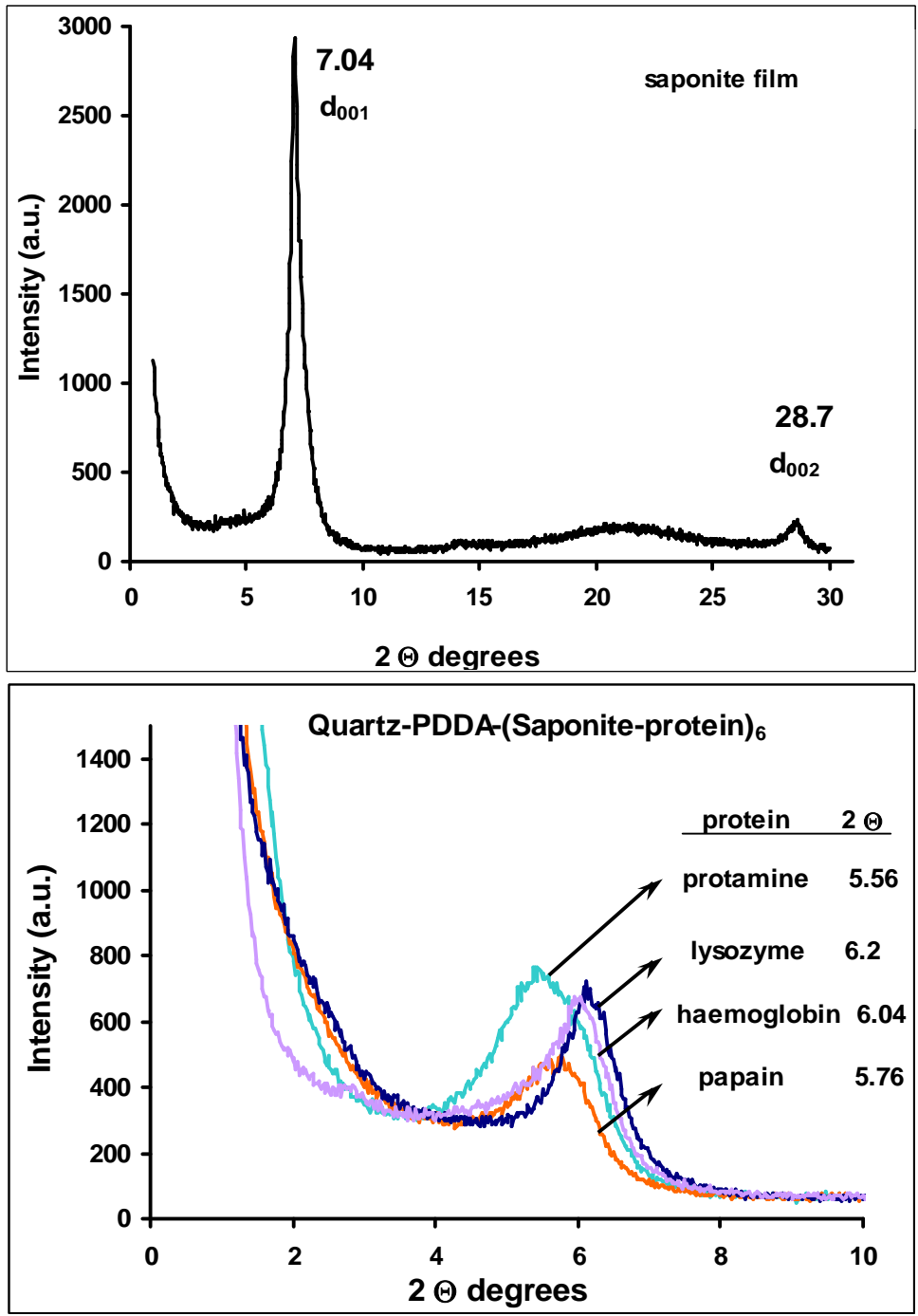


Figure 7. X-ray diffraction pattern of pure saponite film, deposited on quartz plate (A) and of saponite-protein multilayers prepared by self-assembly on quartz plates

Table 3. Evaluation of the XRD results concerning the shifts in the saponite d_{001} interlayer spacings and the peak intensities due to L-b-L deposition of alternate saponite-protein multilayers.

Protein	2Θ °	d (Å)	Δd (Å)	Intensity (a.u.)	M protein (Da)
Saponite (ref [18])	6.41	1.529	-		-
Saponite (this work)	7.04	13.93	-	2900	-
Saponite/lysozyme	6.2	15.82	1.88	680	14300
Saponite/haemoglobin	6.04	16.24	2.3	680	72000
Saponite/papain	5.76	17.03	3.09	460	23500
Saponite/protamine	5.56	17.64	3.71	750	4500

Conclusions

Positively charged globular proteins protamine, papain, lysozyme and haemoglobin were successfully built into alternate bilayers with permanently negatively charged, flat, lamellar clay mineral particles. Our finding does not support the results of Lvov et al [17] who state that lysozyme does not self-assemble into multilayer structures with aluminosilicates. The structural characteristics of the multilayers showed clear correlations with the molecular weight and the charge density of the proteins. From the smallest molar weight and highest charge density protamine the smoothest and most compact protein layers were formed, with the possibility of measuring surface plasmon resonance on structures consisted of 6 bilayers. The largest molar weight papain gave the most rough surface multilayers and only 4 bilayers of those structures could be investigated via SPR spectroscopy.

We have conducted our experiments in a low ionic strength medium (0.005 M NaCl electrolyte), that served to fix the activities of all of the soluble ionic components and to slightly craze the thick hydration layer structure around the proteins and clay particles. The latter moderate charge screening effect is needed to enable the solid particles and the protein globules to „see” each others charges, in other words to decrease the steric hindrance of attractive charge interactions caused by the hydration layer in pure water medium. In addition, highly charged proteins are known to denature in pure aqueous solution, essentially due to charged segment repulsions within the protein globule, that also must be screened with addition of electrolyte. In biological fluids, buffers are used to keep the ionic strength constant, besides keeping the pH constant. At low ionic strength and at fixed pH values, the electrostatic attraction between the saponite and proteins resulted in fairly uniform, regular multilayer structures using the L-b-L self-assembly technique. In the construction of alternate layer structures via electrostatic interactions one must inevitably pay attention to the screening effect. On the other hand, using a too high ionic strength may cause complete disbalancing of the charges.

In contrast to the linear polyelectrolytes, globular proteins with layered clay saponite were found to self-assemble into multilayered structures via purely electrostatic attraction. Our results did not reveal any contribution from non-electrostatic forces. The stability of the

built up multilayer structures, i.e. the linear dependence of the optical (SPR and UV-VIS) properties the films on the number of the built up layers suggests that robust interlayer interactions keep the multilayers together. As it was found for polyelectrolyte-layered particle films, the strength of the multilayered structures depended on the possibility of attractive interlayer interactions between the two subsequent polyelectrolyte layers. In the case of the globular proteins, the interlayer interactions are caused by two effects: i) the strong electrostatic interactions between the clay lamellae and protein globules, and ii) the partial overlapping of the clay particles between the two subsequent clay-layers, as it was visualized in the AFM pictures. The multilayer structures resemble the building sequence of bricks in the wall of an ordinary house.

Acknowledgement

This work was sponsored as basic research by the Foundation of the Hungarian Academy of Sciences OTKA, project number T/F 42715 and by the Flamand-Hungarian Bilateral Agreement, project number BIL 04/32, the authors wish to thank for.

References

1. Thrombosis Research 94 (1999) 53–61
REGULAR ARTICLE
Low Molecular Weight Protamine:
A Potential Nontoxic Heparin Antagonist
Youngro Byun, Vijendra K. Singh and Victor C. Yang
Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, The University of Michigan, Ann Arbor,
Michigan, USA.
2. Raukas, E., and Mikelsaar, R.H. (1999). Are there molecules of
nucleoprotamine? *Bioessays* 21, 440–448.
3. M. Terbojevic, A. Cosania & R.A.A. Muzzarelli, *Carbohydrak- Polymers*, Vol. 29, No. I,
pp. 6348, 1996, Molecular parameters of chitosans depolymerized
with the aid of papain
4. Davies, R.C., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 178,
294-305 (1969).
5. Massimo Pomponi, Enrico Gavuzzo, Claudia Bertonati, Andrew E. Derocher
Christian Lydersen, Øystein Wiig, Kit M. Kovacs
Biochimie 86 (2004) 927–932
Hemoglobin, pH and DPG/chloride shifting
6. Sabine Hiller,* Stefano Leporatti, Andreas Schnäcker, Elke Typlt, and Edwin Donath
Biomacromolecules 2004, 5, 1580-1587
Protamine Assembled in Multilayers on Colloidal Particles Can Be Exchanged and Released
7. Yinglin Zhou,† Zhen Li,† Naifei Hu,*† Yonghuai Zeng,† and James F. Rusling
Langmuir 2002, 18, 8573-8579
Layer-by-Layer Assembly of Ultrathin Films of Hemoglobin and Clay Nanoparticles with
Electrochemical and Catalytic Activity
8. Fouzia Boulmedais,† Vincent Ball,† Pascale Schwinte,‡ Benoit Frisch,§
Pierre Schaaf,† and Jean-Claude Voegel*,‡
Langmuir 2003, 19, 440-445
Buildup of Exponentially Growing Multilayer Polypeptide Films with Internal Secondary
Structure
9. Bairoch, Amos. and Apweiler, Rolf (2000) The SWISS-PROT protein sequence database
and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.* 28:45-48.
10. Swanson JA and Kern DF. Characterization of pulmonary endothelial charge barrier. *Am
J Physiol Heart Circ Physiol* 266: H1300–H1303, 1994
11. Soumen Ghosh, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41 (2005) 209–216,
Conformational study of papain in the presence of sodium dodecyl sulfate in aqueous medium

12. Bart van Duffel, Preparation and optical properties of organic-inorganic composite thin films, PhD Thesis, K.U. Leuven, 2001.
13. H. raether, Surface plasmons on smooth and rouhg surfaces and on gratings, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1988.
14. C. E. Miller, W. H. Meyer, W. Knoll, G. Wegner, Der Bunsenges Phys Chem, 96, 869, 1992.
15. M. Szekeres, A. Széchenyi, K. Stépán, T. Haraszti, I. Dékány, Layer-by-layer self-assembly preparation of layered double hydroxide-polyelectrolyte nanofilms by surface plasmon resonance spectroscopy Colloid and Polymer Science, 283 (9), 937-945, 2005.
16. N. A. Kotov, NanoStructured Materials, Vol. 12, pp. 789-796, 1999, LAYER-BY-LAYER SELF-ASSEMBLY: THE CONTRIBUTION OF HYDROPHOBIC INTERACTIONS
17. Lvov, Y., Ariga, K., I&nose, I., Kunitake, T. J. Am. Chem. Sot., 1995, 117,6 117.
18. Crystal structures of clay minerals and their X.ray identification (eds. G. W. Brindley and G. Brown), Mineralogical Society, London, 1980.
19. C. N. F. VAJDOS, L. FEE, G. GRIMSLEY, T. GRAY, Prorein Science (1995), 4:2411-2423., How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein
20. Green, R.J., R.A. Frazier, K.M. Shakesheff, M.C. Davies, C.J. Roberts, and S.J.B. Tendler. 2000. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. Biomaterials. 21:1823-1835.
21. S. Yilmaza, A. Kalkandelena, N. Isayeva, Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer 97 (2006) 20–28, Comparison of the T-matrix calculations for erythrocytes with oxygenated hemoglobin and immersed in water
22. RALUCA MITEA, TAMÁS SZABÓ, MÁRTA SZEKERES, IMRE DÉKÁNY, ROBERT A. SCHOONHEYDT, THE ADSORPTION OF PROTEINS ON SMECTITES: PROTAMINE AND PAPAINE, in preparation

TOC (Table Of Contents)

