



**UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE**

**Wydział Chemii
Instytut Nauk Chemicznych**

mgr Agnieszka Chrzanowska

Tytuł osiągnięcia naukowego:

**ADSORPCJA BIAŁEK NA POWIERZCHNI
MEZOPOROWATEJ KRZEMIONKI: ANALIZA
FIZYKOCHEMICZNA, STRUKTURALNA
I MORFOLOGICZNA BIOKOMPOZYTU**

**PROTEIN ADSORPTION ON THE SURFACE OF MESOPOROUS SILICA:
PHYSICOCHEMICAL, STRUCTURAL AND MORPHOLOGICAL
ANALYSIS OF A BIOCOMPOSITE**

Rozprawa doktorska
wykonana w Katedrze Chemii Fizycznej
pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Deryło-Marczewskiej

Lublin 2021

PODZIĘKOWANIA:

Promotorowi Pani prof. dr hab. Annie Deryło-Marczewskiej za wprowadzenie w interesujący świat badań naukowych, przekazanie doświadczenia naukowego, zaangażowanie i profesjonalizm, a przede wszystkim za liczne inspirujące dyskusje i wszechstronną pomoc w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Kolegom z Katedry Chemii Fizycznej z Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej za miłe towarzystwo oraz dysputy urozmaicające codzienną pracę.

Wszystkim Współautorom moich artykułów naukowych za współpracę i wsparcie merytoryczne.

Pracownikom Laboratorium Analitycznego UMCS za możliwość wykonania badań laboratoryjnych z wykorzystaniem aparatury zakupionej ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (projekt POIG.02.01.00-06-024/09 Centrum Nanomateriałów Funkcjonalnych).

Moim Bliskim za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość.

„Uczony jest w swojej pracowni nie tylko technikiem, lecz również dzieckiem wpatrzonym w zjawiska przyrody”.

„Jestem jedną z tych osób, które uważają, że nauka kryje w sobie wielkie piękno”.

„Trzeba mieć wytrwałość i wiarę w siebie. Trzeba wierzyć, że człowiek jest do czegoś zdolny i osiągnąć to za wszelką cenę.”

Maria Skłodowska-Curie

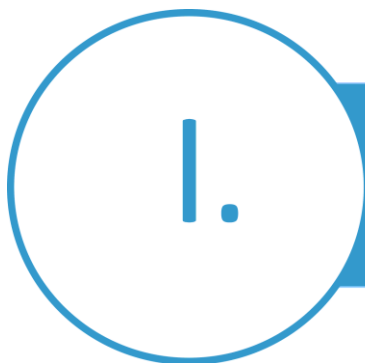
AUTOREFERAT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ



SPIS TREŚCI



I. WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI.....	1
II. STRESZCZENIE	4
III. ABSTRACT	7
IV. LISTA PUBLIKACJI	9
4.1. Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę postępowania doktorskiego	9
V. KOMENTARZ DO ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	11
5.1. Wprowadzenie	11
5.2. Cel i zakres prac badawczych	14
5.3. Materiał i metody eksperymentalne	17
5.4. Omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	24
VI. PODSUMOWANIE.....	38
VII. BIBLIOGRAFIA	42
ANEKS.....	46
ORYGINALNE PRACE NAUKOWE.....	54
OŚWIADCZENIA	1A



WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

Tabela 1. Wykaz stosowanych akronimów w tekście.

AKRONIM	OBJAŚNIENIE
AFM	Mikroskopia sił atomowych (ang. <i>Atomic Force Microscopy</i>)
ATR FT-IR	Spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Attenuated Total Reflection - Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
BSA	Surowicza albumina wołowa (ang. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CHN	Analiza elementarna (ang. <i>Elemental Analysis</i>)
D	Publikacja naukowa wchodząca w skład rozprawy doktorskiej
DSC	Różnicowa kalorymetria skaningowa (ang. <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DTG	Termograwimetria różnicowa (ang. <i>Derivative Thermogravimetry</i>)
EDX	Spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (ang. <i>Energy Dispersive X-ray Spectrometry</i>)
FOE	Równanie kinetyki adsorpcji I rzędu (ang. <i>First-order Equation</i>)
G	Granty/projekty naukowe
GL	Uogólniona izoterma Langmuira (ang. <i>General Langmuir isotherm</i>)
HCl	Kwas solny (ang. <i>Hydrochloric acid</i>)
IDM	Model dyfuzji kinetyki adsorpcji wewnątrzziarnowej Cranka (ang. <i>Intraparticle Diffusion Model</i>)
IF	Wskaźnik wpływu (ang. <i>Impact Factor</i>)
L	Izoterma Langmuira (ang. <i>Langmuir isotherm</i>)
LF	Izoterma Langmuira-Freundlicha (ang. <i>Langmuir-Freundlich isotherm</i>)
LYS	Lizozym (ang. <i>Lysozyme</i>)
MCF	Mezokomórkowa pianka krzemionkowa (ang. <i>Mesocellular Silica Foam</i>)
MIN	Punktacja czasopisma przyznana przez MNiSW
MOE	Równanie mieszanej kinetyki adsorpcji rzędu I i II (ang. <i>Mixed-order Equation</i>)
N	Nagrody i wyróżnienia
OMS	Wysokouporządkowane mezoporowate krzemionki (ang. <i>Ordered Mesoporous Silicas</i>)
OP	Profilometria optyczna (ang. <i>Optical Profilometry</i>)
OVA	Owoalbumina białka jaja kurzego (ang. <i>Ovalbumin</i>)
P	Plakaty naukowe
PBS	Sól fizjologiczna buforowana fosforanem (ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDM	Model dyfuzji w porach McKay'a (ang. <i>Pore Diffusion Model</i>)
PEO	Poli(tlenek etylenu) (ang. <i>Poly(ethylene oxide)</i>)

AKRONIM	OBJAŚNIENIE
PPO	Poli(tlenek propylenu) (ang. <i>Poly(propylene oxide)</i>)
PSD	Funkcja rozkładu wielkości porów (ang. <i>Pore Size Distribution</i>)
S	Staże naukowe
SD	Materiał uzupełniający do publikacji naukowej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej
SEM	Skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SOE	Równanie kinetyki adsorpcji II rzędu (ang. <i>Second-order Equation</i>)
T	Izoterma Tótha (ang. <i>Tóth isotherm</i>)
TEM	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TEOS	Tetraetyloortokrzemian (ang. <i>Tetraethylorthosilicate</i>)
TG	Termograwimetria (ang. <i>Termogravimetry</i>)
TG/DSC	Termograwimetria z różnicową kalorymetrią skaningową (ang. <i>Thermogravimetry/Differential Scanning Calorimetry</i>)
TG/DTG	Termograwimetria z różniczkową termograwimetrią (ang. <i>Thermogravimetry/Derivative Thermogravimetry</i>)
TG/FTIR	Termograwimetria sprzężona z spektroskopią w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Thermogravimetry coupled with Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
TG/MS	Termograwimetria sprzężona z spektroskopią masową (ang. <i>Thermogravimetry coupled with Mass Spectrometry</i>)
TMB	1,2,5-trimetylobenzen (ang. <i>1,2,3-trimethylbenzene</i>)
UV-Vis	Spektroskopia w zakresie promieniowania widzialnego oraz ultrafioletu UV/Vis (ang. <i>Ultraviolet-Visible Spectroscopy</i>)
UV-Vis DRS	Spektroskopia rozproszonego odbicia w zakresie światła widzialnego oraz bliskiego nadfioletu UV/Vis (ang. <i>UV-Visible Diffuse Reflectance Spectroscopy</i>)
W	Komunikaty/wystąpienia ustne
XPS	Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (ang. <i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>)
XRD	Dyfrakcja rentgenowska (ang. <i>X-Ray Diffraction</i>)
✉	Korespondencja z redakcją czasopisma

Tabela 2. Wykaz stosowanych symboli.

SYMBOLE	OBJAŚNIENIE
a_{eq}	Ilość substancji zaadsorbowanej na adsorbencie w stanie równowagi adsorpcyjnej
A_i	Ułamek adsorbentu w układzie (roztwór-adsorbent) adsorbowany z szybkością k_i
a_m	Pojemność monowarstwy adsorpcyjnej
A_o	Względne stężenie równowagowe
A_{peak}	Powierzchnia pików/refleksu dyfrakcyjnego
c	Rzeczywiste (chwilowe) stężenie substancji rozpuszczonej (adsorbentu)
c_{eq}	Stężenie adsorbentu w stanie równowagi adsorpcyjnej
c_o	Stężenie początkowe roztworu adsorbentu
D_{av}	Średni wymiar średnicy porów
D_h	Hydrauliczna średnica porów
d_{hkl}	Odległość międzypłaszczyznowa sieci
D_{mo}	Średnica porów określona z maksimum adsorpcyjnej funkcji rozkładu objętości porów
F	Stała Faradaya
f_i	Współczynnik równy ułomkowi całkowitej ilości zaadsorbowanego adsorbentu z szybkością k_i
I	Siła jonowa
K	Stała równowagi
k_i	Stała szybkości ($i = 1, 2, \dots, n$)
M	Masa cząsteczkowa
m, n	Parametry heterogeniczności określające kształt i szerokość rozkładu energii adsorpcji
m/z	Stosunek masy do ładunku zjonizowanych cząsteczek/atomów
n	Rząd dyfrakcji
p/p_o	Ciśnienie względne
pzc	Punkt zerowego ładunku elektrycznego
q_s	Ładunek powierzchniowy
S_{BET}	Powierzchnia właściwa odpowiadająca modelowi adsorpcji Brunauera-Emmetta-Tellera
S_{dq}	Nachylenie RMS (falistość powierzchni)
S_{ext}	Powierzchnia zewnętrzna
S_{ku}	Kurtoza powierzchni
S_q	Chropowatość powierzchni RMS
S_{sk}	Skośność powierzchni
T	Temperatura bezwzględna pomiaru
$t_{1/2}$	Czas połowkowy
V	Objętość roztworu
V_{mes}	Objętość mezoporów
V_{mic}	Objętość mikroporów
V_t	Całkowita objętość porów
w	Masa adsorbentu
α_s	Zredukowana izoterma standardowa
θ	Kąt odbłyску
λ	Długość fali
Δn_{H^+}	Liczba moli jonów na 1 gram materiału
Δh	Suma wartości dodatniej i bezwzględnej wartości ujemnej maksymalnej amplitudy odchyleń profilu chropowatości powierzchni

II.

STRESZCZENIE

Niniejsza rozprawa doktorska pt. „*Adsorpcja białek na powierzchni mezoporowatej krzemionki: analiza fizykochemiczna, strukturalna i morfologiczna biokompozytu*” stanowi cykl czterech spójnie powiązanych tematycznie oryginalnych prac badawczych opublikowanych w czasopismach naukowych z listy A MNiSW [D1-D4].

Tematyka cyklu pracy doktorskiej obejmuje analizę procesu adsorpcji modelowych białek tj. *surowicza albumina wołowa (BSA)*, *owoalbumina białka jaja kurzego (OVA)* oraz *lizozym wyizolowany z białka jaja kurzego (LYS)* na uporządkowanych mezoporowatych materiałach krzemionkowych typu *mezostrukturalna pianka komórkowa (MCF)* oraz jakością i ilościową charakterystykę powierzchni kompozytu białko/porowaty adsorbent w aspekcie uzyskania modelowych układów biologicznych oraz nowych biofunkcjonalnych kompozytów medycznych.

W cyklu prac przedstawiono analizę równowagi i kinetyki procesu adsorpcji BSA, OVA i LYS z wodnych roztworów soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) w warunkach fizjologicznych ($\text{pH} = 7,4$) na serii mezoporowatych nośników MCF o zróżnicowanej powierzchni właściwej ($250 \text{ m}^2/\text{g} - 720 \text{ m}^2/\text{g}$) i średnicy porów (6 nm – 30 nm) otrzymanych na bazie kopolimerów trójblokowych typu Pluronic, jako czynników porotwórczych. W celu określenia wpływu właściwości badanych układów adsorpcyjnych na wielkość (pojemność) i szybkość procesu adsorpcji enzymów na porowatym adsorbencie MCF wyznaczono izotermę adsorpcji równowagowej albumin oraz przeanalizowano zależności kinetyczne: stężenie ~ czas i adsorpcja ~ czas, jako kluczowe parametry decydujące o potencjalnych zastosowaniach danego adsorbentu. Zaobserwowano, że proces adsorpcji biomolekuł na nośniku MCF jest kontrolowany szybkością dyfuzji do wewnętrznej przestrzeni struktury porowatej adsorbentu i wykazuje silny związek z wielkością porów nośnika. Dodatkowo, wykazano związek pomiędzy rozmiarem cząsteczki albumin a kinetyką jego adsorpcji.

Otrzymane materiały MCF oraz biokompozyty białko/porowata krzemionka przebadano przy zastosowaniu różnych metod badawczych w celu określenia ich właściwości fizykochemicznych, strukturalnych, powierzchniowych i morfologicznych. Charakter kwasowo-zasadowy materiałów krzemionkowych MCF pokrytych warstwą adsorpcyjną białek oraz naturę oddziaływań adsorbentu z powierzchnią adsorbentu określono za pomocą miareczkowania potencjometrycznego. Dowiedziono, że osadzenie fazy białkowej na materiale MCF zmienia jego właściwości kwasowo-zasadowe oraz gęstość ładunku powierzchniowego. Ujawniono, że powierzchnie krzemionkowe z warstwą białek posiadają charakter amfifilowy,

a dominującą rolą w procesie immobilizacji biopolimerów odgrywają oddziaływania elektrostatyczne.

Właściwości strukturalno-geometryczne otrzymanych materiałów krzemionkowych MCF oraz biokompozytów białko/MCF określono za pomocą niskotemperaturowej adsorpcji/desorpcji azotu i dyfrakcji rentgenowskiej (XRD). Stwierdzono, że unieruchomienie warstw białkowych na adsorbencie MCF zmienia jego parametry teksturalne (wartości powierzchni właściwej, objętości i średnicy porów maleją wraz ze stopniem pokrycia powierzchni białkiem) natomiast nie wpływa na stopień ich uporządkowania.

Różnice we właściwościach fizykochemicznych i powierzchniowych (identyfikacja wiązań chemicznych, grup funkcyjnych, skład chemiczny) wynikające z oddziaływań enzym/porowaty nośnik scharakteryzowano za pomocą spektrofotometrii rozproszonego odbicia (UV-Vis DRS), spektroskopii osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ATR FT-IR) oraz rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS). Badania spektroskopowe (UV-Vis DRS, ATR FT-IR, XPS) ujawniły inny charakter chemiczny powierzchni układu białko/porowaty adsorbent oraz specyficzne interakcje między albuminą i krzemionką (osłabienie wiązań wodorowych w strukturze drugorzędowej α -helisy białka; nowe wiązania i grupy funkcyjne charakterystyczne dla cząsteczek białek: $O=C-O$, $O=C-N$, $HN-C(O)O/N-C=C$, $C-N$, $C-C$, $C-H$, $C=O$, $NH-CHR-CO$, $C-NH_2$, $-C(=O)-NH_2$)).

Przeprowadzono także charakterystykę morfologii (odwzorowanie i wizualizacja struktur powierzchniowych w układzie dwu- i trójwymiarowym w skali nano i mikro) oraz analizę parametrów powierzchni (mikro- nanochropowatości, falistość, asymetria, kurtoza) warstw białkowych unieruchomionych na nośniku porowatym w oparciu o profilometrię optyczną (OP) i mikroskopię sił atomowych (AFM). Komplementarną analizę topografii powierzchni oraz jakościowy i ilościowy skład chemiczny materiału MCF przed i po adsorpcji białek scharakteryzowano za pomocą analizy elementarnej (CHN), skaningowej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej (SEM, TEM) z mikroanalizą rentgenowską z dyspersją energii (EDX). Analiza morfologii, topografii i mikro- nanostruktury za pomocą metod mikroskopowych i profilometrii optycznej (AFM, TEM, SEM, OP) wykazała że powierzchnia podłoża z unieruchomionym białkiem jest mniej chropowata, falista i heterogeniczna a tym samym bardziej gładka, płaska i jednorodna w stosunku do materiału niemodyfikowanego cząsteczkami protein. Dodatkowo, przeprowadzona analiza powierzchniowa i objętościowa (TEM/EDX, SEM/EDS) oraz charakterystyka dyfrakcyjna (XRD) w zakresie niskich wartości kąta dyfrakcji materiału MCF i biokompozytu białkowo-krzemionkowego potwierdziła nie tylko jednorodne pokrycie powierzchni białkiem (homogeniczny rozkład pierwiastków C, O, N, S na powierzchni kompozytu białko/krzemionka), ale także uporządkowaną strukturę materiału MCF oraz obecność biomolekuł wewnątrz porów nośnika MCF.

Właściwości termiczne (stabilność termiczna i kinetyka rozkładu) i mechanizm interakcji białko/porowaty nośnik (trwałość wiązania molekuly z powierzchnią) wraz z jakościową identyfikacją cząsteczek protein (skład uwolnionych produktów gazowych) w badanym biokompozycie zweryfikowano za pomocą metod termooanalitycznych: termogravimetria (TG), różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC), termogravimetria TG sprzężona ze spektrometrią mas (TG/MS) i spektroskopią w podczerwieni z transformacją Fouriera, (TG/FTIR). Stwierdzono, że termiczna degradacja kompozytów białko/krzemionka jest procesem dwuetapowym przebiegającym w zakresie temperatur 165–420–830 °C i zależy od denaturacji protein, zmian konformacyjnych w strukturze biopolimeru oraz od interakcji biomolekuł albumin z powierzchnią porowatych struktur.

Zaprezentowane w cyklu pracy doktorskiej badania adsorpcyjne, fizykochemiczne, strukturalne i powierzchniowe porowatego adsorbentu MCF oraz kompozytu białko/porowaty adsorbent są niezbędne zarówno z fizykochemicznego punktu widzenia, jak również z perspektywy wytwarzania modelowych systemów biofizycznych i nowych biofunkcyjnych kompozytów medycznych, gdzie projektowanie i modyfikacja właściwości powierzchni i kontrolowana adsorpcja ma kluczowe znaczenie.

Słowa kluczowe: mezostrukturalna pianka krzemionkowa; białka; kinetyka i równowaga adsorpcji; biokompozyt białko/krzemionka; mikro- nanostruktura; morfologia powierzchni; analiza termiczna.



ABSTRACT

This doctoral dissertation entitled "Protein adsorption on the surface of mesoporous silica: physicochemical, structural and morphological analysis of a biocomposite" is a series of four coherently related original research papers published in scientific journals from the A list of the Ministry of Science and Higher Education [D1-D4].

The subject of the doctoral dissertation cycle includes the analysis of the adsorption process of model proteins, i.e. bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OVA), and lysozyme isolated from chicken egg white (LYS) on ordered mesoporous silica materials such as mesocellular silica foam (MCF) and qualitative and quantitative characteristics of the surface structure of the protein/porous adsorbent composite in terms of obtaining model biological systems and new biofunctional medical composites.

The series of works presents the analysis of the equilibrium and kinetics of the adsorption process of BSA, OVA, and LYS from aqueous solutions of phosphate buffered saline (PBS) under physiological conditions ($\text{pH} = 7.4$) on a series of mesoporous MCF carriers with different specific surface area ($250 \text{ m}^2/\text{g} - 720 \text{ m}^2/\text{g}$) and pore diameter ($6 \text{ nm} - 30 \text{ nm}$) obtained based on Pluronic triblock copolymers as pore-creating agents. To determine the effect of the properties of the studied adsorption systems on the size (capacity) and rate of the enzyme adsorption process on the porous MCF adsorbent, equilibrium albumin adsorption isotherms were determined and the kinetic relationships: concentration \sim time and adsorption \sim time were analyzed as key parameters determining the potential applications of a given adsorbent. It was observed that the process of adsorption of biomolecules on the MCF support is controlled by the rate of diffusion into the inner space of the adsorbent porous structure and shows a strong relationship with the pore size of the carrier. Additionally, a relationship was demonstrated between the albumin molecule size and its adsorption kinetics.

The obtained MCF materials and protein/porous silica biocomposites were studied using various research methods in order to determine their physicochemical, structural, surface, and morphological properties. The acid-base nature of MCF silica materials coated with the protein adsorption layer and the nature of the adsorbate's interaction with the adsorbent surface were determined by potentiometric titration. It has been proved that the deposition of the protein phase on MCF material changes its acid-base properties and surface charge density. It has been revealed that the siliceous surfaces with the protein layer have an amphiphilic character, and electrostatic interactions play the dominant role in the process of immobilization of biopolymers.

The structural and geometric properties of the obtained MCF silica materials and protein/MCF biocomposites were determined by low-temperature nitrogen adsorption/desorption and X-ray diffraction (XRD). It was found that the immobilization of protein layers on the MCF adsorbent changes its textural parameters (the values of specific surface area, volume, and pore diameter decrease with the degree of surface coverage with protein), but does not affect the degree of their order.

Differences in physicochemical and surface properties (identification of chemical bonds, functional groups, chemical composition) resulting from the enzyme/porous support interactions were characterized by using diffuse UV- visible reflectance spectroscopy (UV-Vis DRS), as well as attenuated total internal reflection (ATR) with Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Spectroscopic studies (UV-Vis DRS, ATR FT-IR, XPS) revealed a different chemical nature of the surface of the protein/porous adsorbent system and specific interactions between albumin and silica (weakening of hydrogen bonds in the secondary structure of the protein α -helix; new bonds and functional groups characteristic for protein molecules: O=C-O, O=C-N, HN-C(O)O/N-C=C, C-N, C-C, C-H, C=O, NH-CHR-CO, C-NH₂, -C(=O)-NH₂)).

Moreover, the morphology characterization (mapping and visualization of surface structures in a two- and three-dimensional system in the nano and micro scale) and analysis of surface parameters (micro-nanoroughness, waviness, asymmetry, kurtosis) of protein layers immobilized on porous support was carried out by optical profilometry (OP) and atomic force microscopy (AFM). Complementary surface topography analysis, as well as qualitative and quantitative chemical composition of MCF material before and after protein adsorption, were characterized by elemental analysis (CHN), scanning, and transmission electron microscopy (SEM, TEM) with energy dispersive X-ray microanalysis (EDX). Analysis of morphology, topography, and micro-nanostructure using microscopic methods and optical profilometry (AFM, TEM, SEM, OP) showed that the surface of the substrate with the immobilized protein is less rough, wavy, and heterogeneous, and thus more smooth, flat, and homogeneous compared to material unmodified with protein particles. Likewise, the conducted surface and volume analysis (TEM/EDX, SEM/EDS) and the diffraction characteristics (XRD) of the MCF material and the protein/silica biocomposite confirmed not only homogeneous surface coverage with protein (homogeneous distribution of C, O, N, S on the surface of the protein/silica composite), but also the ordered structure of the MCF material and the presence of biomolecules inside the pores of the MCF support.

The thermal properties (thermal stability, decomposition kinetics) and the mechanism of protein/porous support interaction (stability of the molecule bonding to the surface) along with the qualitative identification of protein molecules (composition of the emitted gaseous products) in the tested biocomposite were verified by thermoanalytical methods: thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC), TG thermogravimetry coupled with mass spectrometry (TG/MS) and Fourier transform infrared spectroscopy (TG/FTIR). It was found that thermal degradation of protein/silica composites is a two-stage process taking place in the temperature range 165-420-830 °C and depends on protein denaturation, conformational changes in the biopolymer structure, and interaction of albumin biomolecules with the surface of porous structures. The adsorption, physicochemical, structural and surface studies of the porous MCF adsorbent and the composite of protein/porous adsorbent presented in the doctoral dissertation cycle are necessary both from the physicochemical point of view, as well as from the perspective of producing model biophysical systems and new biofunctional medical composites, where the design and modification of surface properties and controlled adsorption are essential.

Keywords: mesocellular silica foam; proteins; adsorption equilibria and kinetics; protein/silica composite; micro- nanostructure; surface morphology; thermal analysis.

IV.

LISTA PUBLIKACJI

4.1. Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę postępowania doktorskiego

Cykl powiązanych tematycznie **4 artykułów naukowych** wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, opublikowanych w latach 2019-2020 w recenzowanych czasopismach naukowych, znajdujących się w aktualnym wykazie czasopism sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz. 1668 z późn. zm.) oznaczono numerami **D1, D2, D3, D4**. Natomiast symbolami **SD1, SD3, SD4** oznaczono materiał uzupełniający (ang. *Supplementary Material*) do oryginalnych artykułów naukowych. Dodatkowo umieszczono informacje naukometryczne: wskaźnik wpływu (ang. *Impact Factor, IF*) publikacji zgodnie z rokiem opublikowania i na przestrzeni ostatnich pięciu lat ($IF_{5-letni}$) oraz punktację wg. MNiSW (MIN). Prowadzenie korespondencji z Redakcją Czasopisma oznaczono symbolem „✉”.

Dysertacja ma formę zbioru spójnie powiązanych tematycznie następujących oryginalnych artykułów naukowych:

[D1] ✉ Deryło-Marczewska, A.; Chrzanowska, A.; Marczewski, A.W. Morphological, structural and physicochemical characteristics of the surface of mesocellular silica foam with the adsorbed OVA and BSA proteins. *Microporous and Mesoporous Materials* **2020**, 293, 109769.

$IF_{2020}/IF_{5-letni}$: 5,455/4,862

MIN: 100 pkt

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji artykułu, zaplanowaniu i realizacji badań, analizie i interpretacji wyników, wizualizacji danych eksperymentalnych, napisaniu oryginalnego maszynopisu pracy, opracowaniu i edycji wersji manuskryptu uwzględniającej uwagi recenzentów oraz współredagowaniu odpowiedzi na recenzje pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- [D2] ☒ **Chrzanowska, A.**; Derylo-Marczewska, A. Mesoporous silica/protein biocomposites: Surface, topography, thermal properties. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *139*, 531–542.

IF₂₀₁₉/IF_{5-letni}: 5,162/6,737

MIN: 100 pkt

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji pracy naukowej, zaplanowaniu i realizacji badań, analizie i interpretacji wyników, wizualizacji danych eksperymentalnych, tworzeniu koncepcji artykułu, napisaniu oryginalnego maszynopisu pracy, opracowaniu i edycji wersji manuskryptu uwzględniającej uwagi recenzentów oraz współredagowaniu odpowiedzi na recenzje pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 80%.

- [D3] ☒ **Chrzanowska, A.**; Derylo-Marczewska, A.; Wasilewska, M. Mesocellular Silica Foams (MCFs) with Tunable Pore Size as a Support for Lysozyme Immobilization: Adsorption Equilibrium and Kinetics, Biocomposite Properties. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 5479.

IF₂₀₂₀/IF_{5-letni}: 5,923/6,132

MIN: 140 pkt

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji badań naukowych, zaplanowaniu i realizacji badań, analizie i interpretacji wyników, wizualizacji danych eksperymentalnych, tworzeniu koncepcji artykułu, napisaniu oryginalnego maszynopisu pracy, opracowaniu i edycji wersji manuskryptu uwzględniającej uwagi recenzentów oraz współredagowaniu odpowiedzi na recenzje pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- [D4] ☒ **Chrzanowska, A.**; Derylo-Marczewska, A.; Borowski, P. Comprehensive characterization of biocomposite surface based on the mesoporous silica and lysozyme molecules: Chemistry, morphology, topography, texture and micro-nanostructure. *Applied Surface Science* **2020**, *525*, 146512.

IF₂₀₂₀/IF_{5-letni}: 6,707/5,905

MIN: 140 pkt

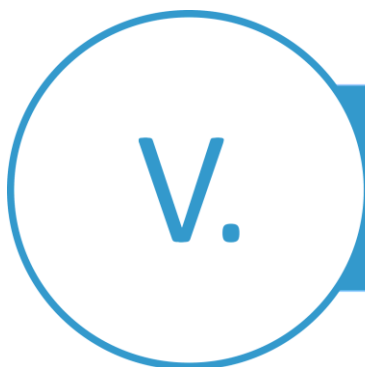
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji badań, zaplanowaniu i realizacji badań, analizie i interpretacji wyników, wizualizacji danych eksperymentalnych, tworzeniu koncepcji artykułu, napisaniu oryginalnego maszynopisu pracy, opracowaniu i edycji wersji manuskryptu uwzględniającej uwagi recenzentów oraz współredagowaniu odpowiedzi na recenzje pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

Sumaryczna liczba punktów przypisanych czasopismom przez MNiSW (MIN): 480

Sumaryczna wartość wskaźnika IF/IF_{5-letni} prac w cyklu: 23,247/23,636

Średni udział 72,5%



KOMENTARZ DO ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona rozprawa doktorska zatytułowana „*Adsorpcja białek na powierzchni mezoporowatej krzemionki: analiza fizykochemiczna, strukturalna i morfologiczna biokompozytu*” obejmuje cykl czterech spójnie powiązanych tematycznie oryginalnych prac naukowych [D1–D4]. Niniejszy manuskrypt nie zawiera pełnego opisu i interpretacji wszystkich uzyskanych wyników, a jedynie krótkie wprowadzenie do tematyki badawczej, celu naukowego, metodyki eksperymentalnej oraz zwięzłą analizę przeprowadzonych badań naukowych opublikowanych w pracach [D1–D4]. Oryginalne publikacje wraz z materiałami uzupełniającymi [SD1,SD3,SD4] zamieszczono na stronie 54 autoreferatu.

5.1. Wprowadzenie

Proces adsorpcji, immobilizacji i interakcji biomolekuł aktywnych biologicznie, zwłaszcza enzymów – białek, na różnych granicach międzyfazowych i powierzchniach nośników stałych jest nie tylko ciekawym zjawiskiem w kontekście badań podstawowych nad biomateriałami, ale również odgrywa kluczową rolę w wielu procesach biochemicznych i technologicznych. Znaczenie filmów białkowych na powierzchni nośników stałych, związane jest z intensywnym rozwojem inżynierii medycznej oraz metod bioanalitycznych. Obejmuje szereg zastosowań w obszarze implantologii, bio- nanotechnologii oraz inżynierii nowoczesnych materiałów m.in. jest podstawą prawidłowego działania implantów biomedycznych, sztucznych narządów, tkanek, biochipów, biosensorów, bioreaktorów, testów diagnostycznych i immunologicznych, nośniki leków, a także mikro- nanourządzeń terapeutycznych.¹⁻³ Z uwagi na ogromne zainteresowanie wykorzystaniem białek w wielu dziedzinach nauki oraz praktycznym zastosowaniem materiałów modyfikowanych biologicznie (ang. *Biological Surface Science*, BioSS)^{4,5} począwszy od farmaceutyków aż po biomateriały, biokompozyty i biosensory, pojawiła się potrzeba analizy mechanizmu immobilizacji protein na różnorodnych powierzchniach ciała stałego, jak również zrozumienie i poznanie natury oddziaływań biomolekuł z powierzchnią materiału.

Zjawisko adsorpcji białek w układach ciało stałe-ciecz jest zjawiskiem powszechnym, jednakże bardzo skomplikowanym. Efektywność, szybkość i wielkość adsorpcji albumin zależy

w dużej mierze od właściwości samych białek (rozmiar, kształt, budowa cząsteczek enzymu, stabilność białka, konformacja, rozmieszczenie ładunków i aminokwasów na powierzchni, punkt izoelektryczny, stopień hydratacji i współczynnik dyfuzji), warunków środowiskowych (pH, temperatura, siła jonowa, rodzaj buforu, polarność) i właściwości fizykochemicznych powierzchni adsorpcyjnej (skład chemiczny, elektryczny ładunek powierzchniowy, hydrofilowy/hydrofobowy charakter powierzchni).^{6,7} Kluczowym parametrem wpływającym na adhezję i stabilność warstwy adsorpcyjnej białka na powierzchni materiału jest również morfologia (mikro- nanochropowatość, falistość, niejednorodność) i struktura (geometria, tekstura – kształt, rozmiar i objętość porów, powierzchnia właściwa) nośnika stałego.⁸ Aby zwiększyć efektywność i selektywność adsorpcji oraz powinowactwo materiału do adsorbowanych biopolimerów istotna jest odpowiednia optymalizacja i kontrola powierzchni nośnika stałego na poziomie mikro- i nanoskali. W związku z dużym znaczeniem tych procesów, nastąpił intensywny rozwój nanotechnologii i inżynierii powierzchni materiałów mający na celu wytwarzanie nowych funkcjonalnych materiałów o ściśle określonych właściwościach fizykochemicznych, adsorpcyjnych i powierzchniowych do konkretnych zastosowań w innowacyjnych nanotechnologiach, zarówno w dziedzinie biofizyki i biologii molekularnej oraz w obszarze współczesnej biochemii.

Ważną grupą nowoczesnych mezoporowatych materiałów wykazujących zdolności sorpcyjne w stosunku do różnych biocząsteczek adsorbentu są wysokouporządkowane mezoporowate materiały krzemionkowe (ang. *Large-Pore Mesoporous Structures* lub ang. *Ordered Mesoporous Silicas*, OMS). Obejmują one szeroką grupę nieorganicznych materiałów porowatych opartych na krzemionce, które różnią się właściwościami powierzchniowymi, uporządkowaniem struktury porowatej oraz wymiarem i kształtem porów m.in. MCM-41, MCM-48 (ang. *Mobil Composition of Matter No. 41, 48*),^{9,10} FSM-16 (ang. *Folded Sheet Silica No. 16*)^{11,12} i SBA-15, SBA-16 (ang. *Santa Barbara Amorphous No. 15, 16*).^{13,14} Innymi obszernie badanymi grupami mezoporowatych sit krzemionkowych są: MSU (ang. *Michigan State University*),¹⁵ MMS (ang. *Mesoporous Molecular Sieves*),¹⁶ FDU (ang. *Fudan University Material*),¹⁷ HMS (ang. *Hexagonal Mesoporous Silica*)¹⁸ oraz KIT-1 (ang. *Korea Advanced Institute of Science and Technology No. 1*),¹⁹ różniące się strukturą i uporządkowaniem sieci mezoporów. Adsorbenty OMS, ze względu na dużą powierzchnię właściwą, uporządkowaną strukturę porów o ściśle określonych rozmiarach i objętościach, a także szeroki zakres zmienności parametrów teksturalno-geometrycznych możliwy do osiągnięcia na drodze ukierunkowanej syntezy, sprawia, że spełniają one wymagania stawiane materiałom, które mogą być potencjalnie wykorzystane w procesach immobilizacji biomolekuł (enymy – białka; kwasy nukleinowe – DNA, RNA; polisacharydy – chitozan; lipidy – kwasy tłuszczowe), adsorpcji/separacji różnych związków chemicznych i zanieczyszczeń organicznych wody (farmaceutyki, hormony, przeciwutleniacze, pestycydy, fenole, węglowodory), wymiany jonowej (wypełnienia chromatograficzne) oraz nanotechnologii (nośniki medyczne, analityczne, katalityczne).

Oprócz wyżej wymienionych porowatych struktur, na szczególną uwagę zasługują mezoporowate materiały krzemionkowe o piankowej strukturze komórkowej (ang. *Mesocellular Silica Foam* lub ang. *Mesostructured Cellular Foams*, MCF). Mezostrukturalne pianki krzemionkowe, MCF, charakteryzują się dobrze rozwiniętą i uporządkowaną nanostrukturą wewnętrzną, posiadają sferyczne duże kuliste komórki o jednolitym rozmiarze, połączone kanałami, stanowiące ciągły trójwymiarowy periodycznie powtarzający się system porów (ang. *three-dimensional*, 3D). Dzięki dobrze rozwiniętej powierzchni właściwej (~1000 m²/g), dużej objętości (~2 cm³/g) i średnicy porów (~50 nm) stanowią bardzo atrakcyjną grupę

adsorbentów, które mogą być wykorzystywane w procesach z udziałem biomolekuł aktywnych biologicznie o dużych rozmiarach cząsteczkowych. Ponadto, dzięki swoim unikalnym właściwościom fizykochemicznym i adsorpcyjnym (duża pojemność sorpcyjna, dobra stabilność i wytrzymałość, wysoka selektywność, aktywność biologiczna, biofunkcjonalność i biokompatybilność chemiczna do bioorganizmów) oraz dużej elastyczności modyfikacji warunków prowadzenia procesu syntezy, jak również funkcjonalizacji powierzchni na etapie ich wytwarzania, umożliwi zaprojektowanie struktury nośnika MCF o zróżnicowanej chemii powierzchni w mikro- nanoskali do otrzymywania nowych, perspektywicznych materiałów biomedycznych dedykowanych do określonego celu.^{20, 21}

Adsorpcji białek na powierzchniach struktur porowatych poświęcono wiele prac eksperymentalnych i teoretycznych, lecz nadal brakuje kompleksowych i elementarnych badań wyjaśniających mechanizm immobilizacji i interakcji białka z powierzchnią porowatego adsorbentu, orientacji cząsteczki białka na powierzchni, szybkości i efektywności procesu ich adsorpcji czy też wpływu porowatości i morfologii powierzchni na trwalsze wiązanie molekuly z powierzchnią. W literaturze naukowej istnieje wiele prac badawczych, w których przedstawiono szeroki zakres metod syntezy i modyfikacji powierzchni uporządkowanych mezoporowatych sit molekularnych (MMS) oraz mezoporowatych nanocząstek krzemionki (ang. *Mesoporous Silica Nanoparticles*, MSN) aby dostosować strukturę i teksturę powierzchni materiału do konkretnych zastosowań w obszarze nauk medycznych, biologicznych oraz technicznych.²¹⁻²⁶ W celu lepszej kontroli procesu adsorpcji wiele prac naukowych dotyczyło wykorzystania najpopularniejszych materiałów MMS (MCM-41, SBA-15, MCM-48, MCM-21, MSE, FSM) jako skutecznych adsorbentów do immobilizacji różnych enzymów (cytochrom C, lizozym, albumina surowicy wołowej, owoalbumina jaja kurzego, mioglobina, hemoglobina, tripsyna, lipaza, chloroperoksydaza); m.in. skupiono się na znalezieniu optymalnej zależności między rozmiarem mezoporów a wymiarem molekularnym biocząsteczki. Analiza danych literaturowych wykazała, że istnieje zaledwie kilka doniesień naukowych dotyczących adsorpcji lizozymu, surowicy albuminy wołowej, owoalbuminy, mioglobiny, chloroperoksydazy, tripsyny, α -amylazy i glukoamylazy na mezokomórkowej pianie krzemionkowej MCF.²⁷ Na przykład Russo i współpracownicy badali wpływ funkcjonalizacji powierzchni na zdolność adsorpcji BSA i LYS na krzemionce MCF o średnicy porów 31,5 nm.²⁸ W innej pracy²⁹ wykazano, że adsorpcja mioglobiny na uporządkowanych mezoporowatych sitach molekularnych (ang. *Well-ordered Mesoporous Molecular Sieves*, MMS) o różnych porowatościach była relatywnie wyższa dla materiału MCF (rozmiar porów 14 nm) i SBA-15 (rozmiar porów 6,2 nm) w porównaniu z innymi krzemionkami: MCM-41 (rozmiar porów 3,1 nm), MSE (6,0 nm), CNS (14,7 nm). Z kolei Han i wsp.³⁰ zaobserwowali, że aktywność katalityczna enzymu chloroperoksydazy na nośniku MCF (rozmiar porów 15 nm) jest większa niż na materiale MCM-48 (rozmiar porów 3,2 nm) i SBA-15 (rozmiar porów 4,2 nm i 7 nm).

Z naukowego punktu widzenia, nadal brakuje wnikliwej analizy relacji wymiar porów-wielkość adsorpcji, w szerokim zakresie średnicy porów, niezbędnej do opracowania optymalnych nośników dla biomolekuł. Brak również szczegółowej analizy mikro-nanostruktury, jakości i morfologii powierzchni, jak również oceny charakteru chemicznego powierzchni i stabilności termicznej podłoża nanoporowatych struktur przed/po immobilizacji enzymów w kierunku określenia i zrozumienia mechanizmu oddziaływań bioadsorbat/adsorbent. W przedstawionych pracach badawczych [D1–D4], zagadnienie to zostało zrealizowane poprzez dokonanie wnikliwej analizy sorpcyjnej, fizykochemicznej, strukturalnej i morfologicznej otrzymanych porowatych materiałów krzemionkowych (zróżnicowane właściwości teksturalne powierzchni) oraz modyfikowanych warstwą adsorpcyjną enzymów białkowych (różna natura

chemiczna). Przeprowadzone badania stanowią podstawę do opracowania procedury wytwarzania nowych funkcjonalnych biokompozytów o ściśle zdefiniowanej porowatości i morfologii powierzchni, stanowiących układ mezoporowatych struktur krzemionkowych o piankowej strukturze komórkowej oraz cząsteczek protein.

W pracach [D1] i [D3] ważnym aspektem prowadzonych badań naukowych był wybór optymalnego układu adsorpcyjnego białko/porowata krzemionka oraz określenie warunków przebiegu procesu sorpcyjnego wykorzystując wielkość maksymalnej adsorpcji z równowagowych danych doświadczalnych oraz kinetykę, jako kluczowe parametry decydujące o potencjalnych zastosowaniach danego adsorbentu porowatego, jako nośnika substancji aktywnych biologicznie. W szczególności w przypadku białek o dużych rozmiarach cząsteczkowych szybkość przebiegu procesu adsorpcji w konkretnych warunkach ma decydujące znaczenie. Utrudniona dyfuzja do wewnętrznej przestrzeni porów może stanowić czynnik ograniczający stosowalność danego materiału przy konieczności zapewnienia określonej szybkości procesu adsorpcji. Czynnik ten jest bardzo istotny w przypadku materiałów, w których strukturze występują pory o relatywnie małych wymiarach w porównaniu z wymiarami cząsteczek substancji adsorbowanych (adsorpcja adsorbatu na zewnętrznej powierzchni sorbentu powoduje słabsze i niestabilne oddziaływania adsorbat-adsorbent). Trwalsze wiązanie molekuly z powierzchnią nośnika można osiągnąć w przypadku materiałów, w których występują pory o średnicy większej od rozmiaru adsorbowanej molekuly (zachodzi możliwość penetracji biocząsteczek do kanałów mezoporów).^{31, 32}

Oprócz porowatości materiału (powierzchnia właściwa, rozmiar i objętość porów) innym istotnym parametrem wpływającym na efektywność i stabilność adsorpcji białka na powierzchni mezostrukturalnych pianek komórkowych jest charakter powierzchni nośnika (tekstura, morfologia, topografia, chropowatość, falistość) [D1–D4], które determinuje naturę i mechanizm oddziaływań między biomolekulą a powierzchnią materiału. Aby lepiej zrozumieć mechanizm interakcji białko/nośnik, zaproponowana w moich pracach badawczych [D1–D4] analiza adsorpcyjna, fizykochemiczna, morfologiczna i mikro- nanostrukturalna modelowego układu białko/porowaty nośnik za pomocą różnych technik spektrofotometrycznych, spektroskopowych, mikroskopowych, optycznych, rentgenograficznych i termogravimetrycznych, pozwoliła określić nie tylko charakter fizykochemiczny powierzchni otrzymanych bioukładów na poziomie molekularnym, ale również scharakteryzować ich strukturę atomową, elektronową oraz ilościowy i jakościowy skład chemiczny.

Przeprowadzona analiza powierzchni porowatego materiału MCF z zaadsorbowaną warstwą albumin za pomocą różnych metod i komplementarnych technik badawczych jest niezbędna zarówno z fizykochemicznego punktu widzenia, a także z perspektywy potencjalnych zastosowań danego biomateriału w biomedycynie oraz biofizyce (projektowanie/modyfikacja właściwości powierzchni nośnika do określonych zastosowań, np. wytwarzanie modelowych systemów biofizycznych i nowych biofunkcjonalnych kompozytów medycznych).

5.2. Cel i zakres pracy badawczej

Wciąż podstawowym i bardzo popularnym kierunkiem badań we współczesnej biochemii, nanotechnologii oraz bioinżynierii materiałowej jest projektowanie i wytwarzanie nowej generacji bionośników stałych o zróżnicowanych właściwościach strukturalno-powierzchniowych przeznaczonych do konkretnych zastosowań w dziedzinie badań

analityczno-medycznych oraz biofizyczno-technologicznych. W zależności od obszaru zastosowań, immobilizacja protein na nośnikach stałych jest zjawiskiem pożądanym (biosensory; systemy dostarczania leków; inicjatory adhezji – molekuł, przeciwciał, bakterii, komórek; medyczne testy diagnostyczne – jakościowa/iłoścowa identyfikacja białek pozwalająca prognozować potencjalne choroby lub rozpoznać stopień zaawansowania choroby istniejącej) oraz niepożądanym (blokowanie bioreaktorów; redukcja użyteczności układów filtracji membranowej; implanty syntetyczne, sztuczne organy – adsorpcja białek i komórek może powodować tworzenie się zakrzepów, stanów zapalnych i infekcji)³³⁻³⁵. W celu wyprodukowania urządzeń, które mogą oddziaływać z ludzkim organizmem/ciałem lub innymi systemami biologicznymi bez niekorzystnych efektów, niewralgiczna jest wiedza naukowa o sposobach kontrolowania immobilizacji białek na różnorodnych (homo- heterogenicznych) powierzchniach materiałów, a także zrozumienie wzajemnych korelacji adsorbent-adsorbat. Ponadto, tworzenie nowoczesnych powierzchni materiałów o pożądanym właściwościach do konkretnych zastosowań, wiąże się nie tylko z doбором odpowiednich materiałów, a także opracowaniem metody ich wytwarzania, określenia natury oddziaływań biocząsteczek z powierzchnią nośnika oraz monitorowanie (nieuniknionej) adsorpcji protein na różnych materiałach. De facto, weryfikacja i kontrola czynników wpływających na właściwości adsorpcyjne danego bioukładu jest ważnym zagadnieniem z punktu widzenia projektowania biozgodnych powierzchni nośników gdzie zateżanie, eliminacja lub zredukowanie adsorpcji albumin wpływa na ulepszenie ich działania oraz użyteczność stosowanych urządzeń analityczno-medycznych i biofizycznych.

Głównym celem naukowym rozważanego cyklu prac [D1-D4] stanowiących podstawę postępowania doktorskiego była analiza procesu adsorpcji wybranych białek (surowicza albumina wołowa, owoalbumina, lizozym) na serii mezostrukturalnych nośnikach krzemionkowych typu mezokomórkowa pianka (MCF) o różnej porowatości.

Istotnym elementem pracy badawczej była również szczegółowa charakterystyka mikro-nanostruktury, topografii, morfologii i charakteru chemicznego powierzchni układu białko/mezoporowaty nośnik w aspekcie uzyskania modelowych układów biologicznych oraz nowych biofunkcjonalnych kompozytów medycznych.

Podczas realizacji tak obszernego tematu naukowego, badania prowadzono w sposób kompleksowy, tak aby uzyskać jak najwięcej informacji na temat: wpływu struktury, porowatości i morfologii powierzchni mezostrukturalnych pian komórkowych na pojemność i szybkość procesu adsorpcji albumin, mechanizmu interakcji protein z powierzchnią nośnika (trwałość i stabilność wiązania molekuly z powierzchnią), właściwości struktur białkowych uformowanych w sieci mezoporów.

Prace wykonane w ramach realizacji niniejszego zagadnienia można przedstawić następująco:

- i. Synteza mezostrukturalnych pian komórkowych MCF o zróżnicowanych właściwościach strukturalnych i powierzchniowych poprzez dobór i modyfikację odpowiednich parametrów ich syntezy.
- ii. Ocena wpływu parametrów strukturalnych mezokomórkowych pianek krzemionkowych MCF (tj. powierzchnia właściwa, powierzchnia mezoporów, objętość i średnica porów, funkcje rozkładu objętości porów względem ich średnic itp.) na pojemność sorpcyjną wobec biomolekuł za pomocą niskotemperaturowych izoterm adsorpcji/desorpcji azotu.
- iii. Zbadanie mechanizmu adsorpcji makrocząsteczek oraz określenie optymalnych warunków immobilizacji protein na powierzchni krzemionki: badania równowagi

i kinetyki adsorpcji obejmujące określenie wpływu właściwości badanych układów adsorpcyjnych na wielkość adsorpcji (pojemność adsorpcyjna) oraz kinetyki (szybkość) procesu sorpcji białka w funkcji czasu (wyznaczenie profili: stężenie ~ czas i adsorpcja ~ czas) za pomocą spektroskopii absorpcyjnej w zakresie światła widzialnego (UV) oraz bliskiego ultrafioletu (Vis); matematyczny opis procesu adsorpcji wybranych bioukładów z zastosowaniem modelowych izoterm adsorpcji uwzględniających energetyczną niejednorodność układu adsorpcyjnego; analiza profili kinetycznych badanych biokompozytów (zmiany stężenia bioadsorbentu w czasie) z wykorzystaniem najważniejszych obecnie stosowanych modeli i równań kinetycznych. W efekcie końcowym pozwoliło to na analizę zależności pomiędzy wielkością porów nośnika a pojemnością adsorpcji molekuly oraz szybkością przebiegu procesu adsorpcji adsorbentu.

- iv. Określenie charakteru chemicznego (identyfikacja grup funkcyjnych) oraz kwasowo-zasadowego (wyznaczenie ładunku powierzchniowego) powierzchni otrzymanych materiałów MCF przed i po adsorpcji albumin za pomocą metod spektroskopowych oraz miareczkowania potencjometrycznego. Otrzymane wyniki dostarczyły szczegółowych informacji na temat mechanizmu i wzajemnych oddziaływań między powierzchnią adsorbentu a substancją adsorbowaną.
- v. Dokonanie szczegółowej charakterystyki powierzchni (strukturalna, chemiczna, molekularna, elektronowa) oraz komplementarnej analizy jakości powierzchni (morfologia, mikro/nanochropowatość, topografia, tekstura) otrzymanych biokompozytów za pomocą różnych metod badawczych (mikroskopia elektronowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia elektronowa i oscylacyjna, badania dyfraktometryczne, profilometria optyczna). Takie interdyscyplinarne podejście do badań nie tylko dostarcza informacji na temat fizykochemicznego charakteru powierzchni w skali atomowej, obrazuje ich mikro/nanostrukturę powierzchniową w układzie dwu- i trójwymiarowym, ale również charakteryzuje mechanizm interakcji białka z powierzchnią nośnika oraz wyjaśnia wpływ właściwości morfologii i chropowatości powierzchni na stopień pokrycia powierzchni białkiem.
- vi. Przeprowadzenie szczegółowej identyfikacji (powierzchniowej i objętościowej) pierwiastków chemicznych wchodzących w skład badanego biomateriału za pomocą analizy elementarnej i spektroskopii XPS oraz uzyskanie informacji na temat jakościowego rozkładu przestrzennego biocząstek w badanym biokompozycie w oparciu o mikroanalizę rentgenowską (mapy EDX rozkładu pierwiastków).
- vii. Zbadanie właściwości termicznych bioukładów (stabilność termiczna i kinetyka rozkładu), określenie mechanizmu interakcji białko/nośnik (trwałość wiązania molekuly z powierzchnią) oraz dokonanie analizy jakościowej biomolekuł (skład uwolnionych produktów gazowych) w badanym kompozycie białkowo-krzemionkowym za pomocą metod termoanalitycznych sprzężonych ze spektrometrią mas i spektroskopią w podczerwieni z transformacją Fouriera.

Proponowane badania modelowego układu MCF/białko skupiające się na komplementarnej analizie warstw proteinowych zaadsorbowanych na porowatym nośniku krzemionkowym, mają na celu poszerzenie wiedzy na temat sposobu wytwarzania mezostrukturalnych pian komórkowych o określonych właściwościach teksturalnych i fizykochemicznych, wpływu układu adsorpcyjnego (białko/ciało stałe) na efektywność

i szybkość procesu adsorpcji warstw białkowych oraz zrozumienia interakcji biomolekuł z porowatym ciałem stałym.

5.3. Materiał badawczy i metodyka pomiarów

5.3.1. Stosowany materiał

Do badań procesu adsorpcji substancji biologicznie aktywnych, jako adsorbat wybrano trzy modelowe enzymy białkowe: lizozym wyizolowany z białka jajka kurzego (ang. *Lysozyme*, LYS) [D3,D4], owoalbuminę białka jaja kurzego (ang. *Ovalbumin*, OVA) oraz surowiczą albuminę wołową pochodzącą z surowicy krwi wołowej (ang. *Bovine Serum Albumin*, BSA) [D1,D2]. Mezoporowate adsorbenty krzemionkowe o piankowej strukturze komórkowej różniące się porowatością powierzchni i rozmiarem porów wykorzystano jak nośniki ciała stałego do immobilizacji cząsteczek białek [D1–D4]. Enzymy białkowe różniące się właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). W celu przybliżenia charakterystyki badanych białek w tabeli 3 zestawiono ich podstawowe parametry fizykochemiczne i funkcje biologiczne.

Tabela 3. Parametry i właściwości fizykochemiczne białek (LYS, OVA, BSA).

Właściwości fizykochemiczne			
Białko	LYS	OVA	BSA
Liczba aminokwasów	129	385	583
Masa cząsteczkowa [kDa]	14,3	45,0	66,4
Średnica hydrodynamiczna [nm]	~4,0	~5,9	~7,3
Wymiar [nm]	4,5 x 3 x 3	7 x 4,5 x 5	4 x 4 x 14 lub 8 x 8 x 3
Forma	wydłużona sferoida	wydłużona elipsoida	wydłużona elipsoida lub kształt serca
Punkt izoelektryczny	~10,5-11	~4,6-4,7	~4,7-5,1
Właściwości biologiczne – zastosowanie			
<p>Lizozym: Naturalny bakteriobójczy enzym hydrolityczny, wykazujący działanie destrukcyjne na ścianę komórkową bakterii Gram-dodatnie (rozkłada wiązania glikozydowe pomiędzy cząsteczkami kwasu N-acetyloglukozaminą i N-acetylomuraminowym wewnątrz polisacharydów budujących ściany komórkowe bakterii). Wykazuje aktywność przeciwgrzybiczą (wobec szczepów <i>Candida albicans</i>),³⁶ przeciwzapalną, przeciwwirusową i antyseptyczną oraz zwiększa skuteczność działania antybiotyków β-laktamowych. Należy do układu nieswoistej, humoralnej odpowiedzi immunologicznej (ochrona organizmu przez patogenami).³⁷ Znalazł zastosowanie w medycynie, przemyśle farmaceutycznym i spożywczym (leczenie zakażeń drobnoustrojami patogennymi błony śluzowej jamy ustnej, gardła, oczu i skóry; preparaty przeciwbólowe; środki wspomagające antybiotykoterapię oraz działanie antyseptyków, kortykosteroidów; konserwacja żywności). Powszechnie występuje w tkankach ludzkich, zwierzęcych i roślinnych. Można je znaleźć także w ziarnistościach dojrziałych granulocytów, monocytów i makrofagów, jak również w osoczu krwi, łzach, ślinie oraz wydzielinach śluzowo-surowiczych dróg oddechowych. Najcenniejszym źródłem enzymu jest białko jaj kurzego, zawierające około 3,5% lizozymu.³⁸</p> <p>Owoalbumina: Wysokowartościowe białko o dużej zawartości aminokwasów egzogennych (izoleucyny, treoniny, lizyny, metioniny). Stanowi 60-65% frakcji białka w całkowitej białkowej części jaja kurzego. Z technologicznego punktu widzenia łatwe w otrzymaniu i przetwarzaniu stąd jest częstym surowcem służącym do pozyskiwania enzymu na skalę przesyłową. W suplementacji sportowej wchodzi w skład wieloskładnikowych preparatów proteinowych i hydrolizatów białkowych – uzupełnienie diety w wysokowartościowe białko, wspiera rozrost beztłuszczowej masy mięśniowej oraz regenerację po treningową. Ma zastosowanie w różnych obszarach badań, w tym: ogólne badania struktury i właściwości białek (dostępna w dużych ilościach); proteomika (marker masy cząsteczkowej do kalibracji żeli do elektroforezy); immunologia (stymulowanie reakcji alergicznej).</p> <p>Albumina surowicy wołowej: Neutralne, niereaktywne, stabilne białko globularne pochodzące z surowicy krwi wołowej syntetyzowane w wątrobie zwierząt rzeźnych. Stanowi ponad 50% wszystkich białek osocza. Albumina surowicy krwi wołowej pełni kluczową rolę w regulowaniu ciśnienia onkotycznego (zapobiega obrzękom – kontrola stosunku ilości wody we krwi do ilości wody w płynach tkankowych). Bierze udział w transporcie związków egzogennych i endogennych: hormonów, leków (antybiotyki, barbiturany), kwasów tłuszczowych, lipidów i barwników żółciowych (bilirubina). W badaniach naukowych, biochemicznych i diagnostycznych stosowane jest jako: modelowe białko kontrolne do identyfikacji i ilościowego oznaczania białka w badanym materiale (krzywa kalibracyjna, metoda Bradforda, test immunoenzymatyczny ELISA); bloker w immunohistochemii (wzmocnienie oddziaływań niespecyficznych w reakcjach z przeciwciałami); składnik odżywczy w hodowlach komórkowych (rozmnażanie drobnoustrojów); stabilizator pracy enzymów restrykcyjnych (trawienie DNA) oraz w łańcuchowej reakcji polimerazy (amplifikacja fragmentu DNA); środek stabilizujący w buforach do przechowywania enzymów, szablon do syntezy nanostruktur; izolator przywierania enzymu do naczyń laboratoryjnych.</p>			

5.3.2. Synteza mezoporowatych materiałów krzemionkowych

Szereg mezokomórkowych pianek krzemionkowych typu MCF o regularnej uporządkowanej strukturze wewnętrznej mezoporów oraz zróżnicowanej porowatości powierzchni, wielkości i objętości porów otrzymano metodą zol-żel (hydrotermalna) w środowisku kwasowym (kwas solny, HCL) w wyniku hydrolizy-kondensacji organicznego prekursora krzemionkowego tetraetyloortokrzemianu (TEOS, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$), przy użyciu zmodyfikowanej metody opisanej w pracy^{14,39}. Jako matrycę porotwórczą wykorzystano niejonowe środki powierzchniowo czynne, trójblokowe kopolimery, składające się z poli(tlenku etylenu)_x – poli(tlenku propylenu)_y – poli(tlenku etylenu)_x, (PEO)_x – (PPO)_y – (PEO)_x o nazwie handlowej Pluronic: P123 – (EO)₂₀(PO)₇₀(EO)₂₀, PE9400 – (EO)₂₁(PO)₄₇(EO)₂₁ i PE10500 – (EO)₃₆(PO)₅₆(EO)₃₆, różniące się masą cząsteczkową ($M_{\text{P123}} = 5,800 \text{ g/mol}$; $M_{\text{PE9400}} = 4,600 \text{ g/mol}$; $M_{\text{PE10500}} = 6,500 \text{ g/mol}$) i budową chemiczną (różna ilość segmentów hydrofilowych EO do ilości segmentów hydrofobowych PO). Do powiększania rozmiaru i średnicy porów (ang. *expander*) wykorzystano 1,2,5-trimetylobenzen (TMB). Proces kalcynacji układu kopolimer/krzemionka pozwolił na otrzymanie adsorbentu o czysto mezoporowatej strukturze krzemionkowej [D1,D3]. Poprzez ukierunkowaną modyfikację i dobór odpowiednich parametrów syntezy (temperatura, rodzaj polimeru, stosunek masowy: polimer/TMB; polimer/TEOS) żeli krzemionkowych MCF otrzymano adsorbenty porowate o zróżnicowanej średnicy porów (6 nm – 30 nm), objętości porów (0,12 cm³/g – 1,98 cm³/g) i powierzchniami właściwej (250 m²/g – 720 m²/g). Szczegółowy opis preparatyki mezokomórkowych pianek krzemionkowych MCF opisano w pracach [D1,D3].

5.3.3. Analiza właściwości adsorpcyjnych

W celu poznania mechanizmu adsorpcji oraz określenia optymalnych warunków immobilizacji badanych albumin na powierzchni porowatej krzemionki, przeprowadzono badania równowag adsorpcyjnych rozważanych biomolekuł, obejmujące określenie wpływu właściwości badanych układów adsorpcyjnych na wielkość adsorpcji (pojemność adsorpcyjna), jak również badania kinetyki procesu adsorpcji białek w funkcji czasu (wyznaczenie profili: stężenie ~ czas i adsorpcja ~ czas) za pomocą metod spektrofotometrycznych UV-Vis (ang. *Ultraviolet-Visible Spectroscopy*) i UV-Vis z celką przepływową.

Równowaga adsorpcji: Immobilizację białek z wodnych roztworów soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (ang. *Phosphate Buffered Saline*, PBS, $\text{pH} = 7,4$) o stężeniu 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml wykonano w układzie statycznym. Proces adsorpcji prowadzono w temperaturze $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ze stałą szybkością wytrząsania (110 obr/min, rmp) przez 24 godziny w inkubatorze (New Brunswick Scientific Innova 40R Model, Eppendorf AG, Hamburg, Niemcy). Równowagowe stężenie adsorbentu po adsorpcji wyznaczono za pomocą spektrofotometru UV-Vis Cary 100 (Varian Inc., Melbourne, Australia) przy charakterystycznej długości fali ($\lambda = 279 \text{ nm}$ i 280 nm). Wielkość adsorpcji względnej (przeliczonej na masę adsorbentu) obliczono z różnicy stężeń przed i po adsorpcji na podstawie bilansu materiałowego zgodnie z równaniem [D1,D3]:

$$a_{\text{eq}} = \frac{(c_o - c_{\text{eq}}) \cdot V}{w} \quad (1)$$

gdzie: a_{eq} – ilość substancji zaadsorbowanej na adsorbencie krzemionkowym w stanie równowagi, c_o – stężenie początkowe roztworu adsorbentu, c_{eq} – stężenie adsorbentu w stanie równowagi adsorpcyjnej, V – objętość roztworu, w – masa adsorbentu.

Uzyskane dane równowagowe adsorpcji bioenzymów na materiale MCF przeanalizowano za pomocą uogólnionej izotermy Langmuira (ang. *General Langmuir*, GL) opisującej adsorpcję na energetycznie niejednorodnych ciałach stałych [D3]:

$$\frac{a_{eq}}{a_m} = \left[\frac{(Kc_{eq})^m}{1 + (Kc_{eq})^m} \right]^{m/n} \quad (2)$$

gdzie: a_m – pojemność adsorpcji (maksymalna adsorpcja), m i n – parametry niejednorodności ($0 < m, n \leq 1$) charakteryzujące kształt (szerokość i asymetrię) funkcji rozkładu energii adsorpcji, K – stała równowagi opisująca położenie funkcji rozkładu na osi energii. Dla określonych wartości parametrów heterogeniczności (m i n) równanie GL upraszcza się do uogólnionej izotermy Langmuira (L) (GL: $m = n = 1$), Freundlicha (GF) (GL: $n = 1, 0 < m \leq 1$), Langmuira- Freundlicha (LF) (GL: $0 < m = n \leq 1$) i Tótha (T) (GL: $m = 1, 0 < n \leq 1$).

Kinetyka adsorpcji: Pomiar kinetyczny monitorowano przy wykorzystaniu metody ciągłej rejestracji widma za pomocą spektrofotometru UV-Vis Cary 100 (Varian Inc., Melbourne, Australia) z komorą przepływową połączoną teflonową rurką z naczyniem, w którym zachodził proces adsorpcji. Badany układ adsorpcyjny, mieszano za pomocą sterowanego cyfrowo mieszadła mechanicznego (IKA, Polska) z szybkością 110 obr/min (rpm). Do analizy otrzymanych profili stężeniowych zastosowano równanie multi-ekspotencjalne (m-exp) [D1,D3]:

$$c = (c_o - c_{eq}) \sum_{i=1}^n f_i \exp(-k_i t) + c_{eq} \quad \text{gdzie } f_i = \frac{A_i}{1 - A_o} \quad \text{i} \quad \sum_{i=1}^n f_i = 1 \quad (3)$$

gdzie: c – rzeczywiste (chwilowe) stężenie substancji rozpuszczonej (adsorbentu); c_o – stężenie początkowe adsorbentu, c_{eq} – stężenie równowagowe adsorbentu, k_i – współczynnik szybkości adsorpcji ($i = 1, 2, \dots, n$), f_i – współczynnik odpowiadający ułamkowi całkowitej ilości zaadsorbowanej z szybkością k_i , A_i parametr odpowiadający ułamkowi adsorbentu w układzie (roztwór-adsorbent) adsorbowany z szybkością k_i , A_o – względne stężenie równowagowe.

Do analizy doświadczalnych danych kinetycznych oprócz równania multi-ekspotencjalnego wykorzystano również proste równania kinetyki adsorpcji: I rzędu (ang. *First-order Equation*, FOE), II rzędu (ang. *Second-order Equation*, SOE), mieszane I i II rzędu (ang. *Mixed-order Equation*, MOE) oraz modele uwzględniające efekty dyfuzyjne: model dyfuzji wewnątrzziarnowej Cranka (ang. *Intraparticle Diffusion Model*, IDM) i model dyfuzji w porach (ang. *Pore Diffusion Model*, PDM) McKay [D1,SD1,D3,SD3].

5.3.4. Analiza właściwości kwasowo-zasadowych

Właściwości kwasowo-zasadowe powierzchni mezoporowatych struktur MCF i kompozytów białkowo-krzemionkowych określono za pomocą miareczkowania potencjometrycznego [D1,D3].

Miareczkowanie potencjometryczne: Gęstość ładunku powierzchniowego oraz punkt zerowego ładunku elektrycznego (ang. *point of zero charge*, pzc) zróżnicowanych teksturalnie krzemionek

MCF i biokompozytów białko/MCF wyznaczono za pomocą miareczkowania potencjometrycznego. Pomiar wykonano przy użyciu automatycznej biurety (Dosimat 765, Metrohm, Herisau, Szwajcaria) połączonej z precyzyjnym pehametrem (PHM 240, Radiometer, Kopenhaga, Dania). Szczegóły pomiarów miareczkowania potencjometrycznego dla wyjściowych adsorbentów MCF przedstawiają się następująco: 30 ml roztworu elektrolitu NaCl o stężeniu $0,1 \text{ mol/dm}^3$ zakwaszono roztworem kwasu solnego (HCl) o stężeniu $0,5 \text{ mol/dm}^3$ i umieszczono w termostатовanym naczynku kwarcowym; po stabilizowaniu się temperatury roztworu i pH ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $pH \cong 2,5$) wprowadzano odważkę badanego materiału krzemionkowego; zawiesinę miareczkowano roztworem NaOH o stężeniu $0,2 \text{ mol/dm}^3$ i rejestrowano zmiany pH . W celu wyeliminowania błędów pomiarowych związanych z obecnością CO_2 w układzie pomiarowym, pomiar prowadzono w atmosferze ochronnej azotu.

Pomiary dla adsorbentów MCF ze związaną fazą białek przeprowadzono następująco: naważkę materiału MCF dodano do naczynia termostaticznego zawierającego 30 ml roztworu białka o stężeniu 5 mg/ml w roztworze elektrolitu NaCl o sile jonowej $I = 0,1 \text{ mol/dm}^3$; układ zakwaszono roztworem HCl ($0,5 \text{ mol/dm}^3$); adsorpcję prowadzono w $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 24 godziny; zawiesinę białko/adsorbent miareczkowano przy użyciu roztworu NaOH (2 mol/dm^3).

Uzyskane wyniki przedstawiono za pomocą wykresów zmian pH w funkcji ilości dodanej mocnej zasady. Z różnicy ilości jonów wodorowych (wodorotlenowych) potrzebnych do doprowadzenia obu układów do tej samej wartości pH obliczono gęstość ładunku powierzchniowego za pomocą równania [D1,D3]:

$$q_s = \frac{F \cdot \Delta n_{\text{H}^+}}{S_{\text{BET}}} \quad (4)$$

gdzie: q_s – ładunek powierzchniowy, Δn_{H^+} – liczba moli jonów przypadająca na 1 gram materiału, F – stała Faradaya, S_{BET} – powierzchnia właściwa.

5.3.5. Analiza strukturalno-teksturalna

Do oceny porowatości i uporządkowania struktury zsyntezowanego materiału mezoporowatego oraz materiału ze związaną fazą białek wykorzystano niskotemperaturowe pomiary izoterm adsorpcji/desorpcji azotu oraz dyfrakcji rentgenowskiej.

Niskotemperaturowe izotermy adsorpcji/desorpcji azotu: Właściwości i parametry teksturalne materiałów krzemionkowych przed i po adsorpcji białek określono przy użyciu analizatora powierzchni i porowatości typu ASAP 2020 (Accelerated Surface Area and Porosimetry) firmy Micromeritics Instrument Corp. (Norcross, GA, USA). Izotermy adsorpcji wyznaczono w temperaturze $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ w szerokim zakresie ciśnień względnych (10^{-3} – $0,99$). Przed pomiarami adsorpcyjnymi próbki odgazowano w temperaturze $150 \text{ }^\circ\text{C}$ i $30 \text{ }^\circ\text{C}$, odpowiednio dla materiału wyjściowego MCF i biokompozytu białko/MCF przez 24 godziny przy ciśnieniu $4 \text{ } \mu\text{mHg}$ [D1,D3].

Z otrzymanych niskotemperaturowych izoterm sorpcji azotu wyznaczono podstawowe parametry strukturalne badanych nośników krzemionkowych i biomateriału:

- powierzchnię właściwą (S_{BET}) z liniowej zależności równania Brunauer-Emmett-Teller (BET),

- powierzchnię zewnętrzną (S_{ext}) i objętość mezoporów (V_{mes}) oszacowano metodą α_s .⁴⁰ Metoda α_s polega na porównaniu izotermy adsorpcji azotu na badanym materiale porowatym z izotermą adsorpcji na nieporowatym standardzie o tym samym charakterze chemicznym. Jako materiał odniesienia zastosowano makroporowatą (praktycznie nieporowatą) krzemionkę typu LiChrospher Si-1000.⁴¹ Zredukowaną izotermę standardową α_s , zdefiniowano jako stosunek wielkości adsorpcji odpowiadającej danemu ciśnieniu względnemu p/p_0 oraz wielkości adsorpcji przy ciśnieniu $p/p_0 = 0,4$ (p – ciśnienie równowagowe gazu, p_0 – ciśnienie nasycone; wartość ciśnienia względnego 0,4 odpowiada początkowi pętli histerezy dla adsorpcji azotu),
- objętość mikroporów (V_{mic}) obliczono metodą t-plot⁴² (izoterma standardowa i doświadczalna są znormalizowane w odniesieniu do średniej grubości warstwy zaadsorbowanej określonej dla pewnej klasy nieporowatych adsorbentów),
- całkowitą objętość porów (V_t) oszacowano z wielkości adsorpcji przy ciśnieniu względnym $p/p_0 = 0,99$,
- funkcje rozkładu objętości porów względem ich promienia (ang. *Pore Size Distribution*, PSD) wyznaczono z danych izoterm adsorpcji i desorpcji azotu przy zastosowaniu metody Barretta-Joynera-Halendy (BJH). Średnice porów określono z maksimumów rozkładów PSD (D_{mo}) oraz wartości średniej PSD (D_{av}),
- średni hydrauliczny rozmiar porów wyznaczono z zależności: $D_h = 4V_t/S_{BET}$.

Dyfrakcja rentgenowska: Właściwości strukturalne badanych materiałów MCF oraz biokompozytów białko/krzemionka scharakteryzowano za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej (ang. *X-ray Diffraction*, XRD) stosując dyfraktometr rentgenowski Empyrean (PANalytical, Holandia, 2012) wyposażony w lampę rentgenowską z anodą miedzianą $CuK\alpha$ emitującą promieniowanie o długości fali $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$. Pomiar przeprowadzono w zakresie niskich kątów dyfrakcji 2θ ($0.13^\circ - 5.0^\circ$) z krokiem pomiaru 0.01° [D2,D4]. Dyfrakcja polega na spójnym (sprężystym, koherentnym) rozpraszaniu promieni rentgenowskich padających na badaną próbkę oraz możliwości interferencji promieniowania emitowanego przez poszczególne atomy. Zjawisko dyfrakcji zachodzi wówczas, gdy badany materiał charakteryzuje się strukturą o dalekim zasięgu uporządkowania. Refleksy dyfrakcyjne obserwujemy, gdy kąt odbłyску θ spełnia prawo Wulfa-Braggów:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin \theta \quad (5)$$

gdzie: d_{hkl} – odległość międzypłaszczyznowa sieci; λ – długość rozproszenia fali, n – rząd dyfrakcji.

5.3.6. Analiza mikroskopowa

Morfologię, mikro- nanostrukturę oraz szorstkość powierzchni badanych układów scharakteryzowano za pomocą mikroskopu sił atomowych (ang. *Atomic Force Microscopy*, AFM) oraz profilometru optycznego (ang. *Optical Profilometry*, OP). Komplementarną analizę jakości powierzchni (topografia, skład chemiczny, mapy pierwiastkowe) badanego nośnika MCF oraz warstw białkowych naniesionych na powierzchnię krzemionki przeprowadzono za pomocą skaningowego (agn. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) i transmisyjnego mikroskopu elektronowego (ang. *Transmission Electron Microscopy*, TEM) z mikroanalizą rentgenowską (ang. *Energy Dispersive X-ray Spectrometer*, EDX).

Mikroskop sił atomowych i profilometr optyczny: Nanostrukturę oraz chropowatość powierzchni w nanoskali określono za pomocą Mikroskopu Sił Atomowych AFM firmy Bruker-Veeco (NanoScope V Controller System, USA). Pomiary prowadzono w trybie półkontaktowym (ang. *tapping mode*) za pomocą oscylacyjnego ruchu igły skanującej przesuwającej się nad próbką (promień końcówki igły < 8 nm, częstość rezonansowa 280 kHz). Rozmiar skanowanej powierzchni wynosił 1 μm x 1 μm przy rozdzielczości skanowania 256 x 256 punktów pomiarowych [D1,D4].

Analizę mikrostruktury (chropowatości, falistość/nachylenie powierzchni) oraz ocenę topografii powierzchni określono za pomocą profilometru optycznego firmy Bruker-Veeco (Contour GT, USA) wykorzystując zjawisko interferencji światła białego. Badania zostały przeprowadzone w trybie pracy urządzenia VSI (ang. *Vertical Scanning Interferometry*). Zastosowano obiektyw o powiększeniu 20x mając pole widzenia głowicy FOV 2x (ang. *Field of View*, FOV) przy rozdzielczości skanowania 640 x 480 punktów, co odpowiada rozmiarowi piksela 0.24 μm i powierzchni 156 μm x 117 μm [D1,D4]. Podstawowe parametry morfologii powierzchni uzyskane z obrazów AFM i OP (S_a – średnia chropowatość, S_q – chropowatość powierzchni RMS, S_{dq} – nachylenie RMS (falistość powierzchni), S_{sk} – skośność powierzchni, S_{ku} – kurtoza powierzchni) obliczono za pomocą programu Scanning Probe Image Processor (SPIP) v. 5.1.4 (Image Metrology A/S, Dania). Szczegółowy opis parametrów chropowatości powierzchni opisano w materiałach uzupełniających [SD1,SD4] do prac naukowych [D1,D2].

Skaningowy mikroskop elektronowy z mikroanalizą reaganowską SEM/EDX: Badania morfologii powierzchni w mikroskali oraz składu chemicznego (C, N, O, S, Si) badanych materiałów MCF i biokompozytów przeprowadzono za pomocą mikroskopu skaningowego (SEM) wykorzystując mikroskop skaningowy FEI Quanta 250 FEG wyposażony w system analizy składu chemicznego oparty na dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego – EDS firmy EDAX [D2–D4].

Transmisyjny mikroskop elektronowy z mikroanalizą reaganowską TEM/EDX: Do zobrazowania nanostruktury i topografii powierzchni badanych materiałów krzemionkowych i kompozytów białkowo-krzemionkowych wykorzystano wysokorozdzielczy elektronowy mikroskop transmisyjny S/TEM Titan3 G2 60-300 firmy FEI. Mikroskop wyposażony jest w układ trzech współosiowych detektorów do trybu generowania obrazów S/TEM w jasnym i ciemnym polu: centralny detektor pola jasnego (ang. *Bright Field*, BF), niskokątowy pierścieniowy detektor pola ciemnego (ang. *Dark Field*, DF) oraz wysokorozdzielczy szerokokątowy pierścieniowy detektor pola ciemnego (HAADF). Identyfikację (powierzchniową i objętościową) pierwiastków chemicznych (C, N, O, S, Si) wchodzących w skład badanego materiału oraz tworzenie map pierwiastkowych obrazujących rozmieszczenie pierwiastków na badanym obszarze nośnika wykorzystano spektrometr rentgenowski z dyspersją energii (EDX) [D1,D3,D4,SD4].

5.3.7. Analiza spektroskopowa i elementarna

Charakter chemiczny powierzchni układu białko/mezoporowaty nośnik scharakteryzowano za pomocą różnych technik spektroskopowych: spektroskopia osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. *Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, ATR FT-IR), spektroskopia rozproszonego odbicia w zakresie UV/Vis (ang. *UV-visible diffuse reflectance spectroscopy*, UV-Vis DRS) oraz rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (ang. *X-ray photoelectron*

spectroscopy, XPS). Skład chemiczny mezoporowatej krzemionki, natywnego białka globularnego i biokompozytów białko/MCF potwierdzono za pomocą analizy elementarnej.

Spektroskopia ATR FT-IR: Do określenia rodzaju grup funkcyjnych wyjściowego mezoporowatego adsorbentu krzemionkowego oraz układu białko/MCF wykorzystano spektroskopię ATR FT-IR z zastosowaniem spektrometru FTIR Tensor 27 wyposażonego w przystawkę do pomiarów osłabionego całkowitego odbicia ATR firmy Bruker (Niemcy) z monolitycznym kryształem diamentowym. Widma ATR FT-IR rejestrowano w zakresie liczb falowych 4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1} z rozdzielczością 4 cm^{-1} . Pomiarów wykonywano w temperaturze pokojowej bezpośrednio na powierzchni próbki [D2,D4].

Spektroskopia UV-Vis DRS: Właściwości fizykochemiczne materiału MCF przed i po immobilizacji albumin określono za pomocą spektroskopii rozproszonego odbicia UV-Vis DRS. Widma DRS rejestrowano w zakresie długości fali od 200 nm do 600 nm z szybkością przemiatania $5\text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ za pomocą spektrofotometru UV-Vis (Cary 4000, Varian Inc., Australia) wyposażonego w przystawkę do ciała stałego z integralną sferą całkującą rozproszonego odbicia światła, która umożliwia pomiar proszków i powierzchni chropowatych różnych materiałów. Widma odbiciowe DRS generowane są w wyniku zebrania przez układ optyczny o odpowiedniej geometrii promieniowania rozproszonego na próbce. Na widmie absorpcji układu białko/MCF zaobserwowano bardzo intensywne pasmo w zakresie $\sim 230\text{ nm}$ – 300 nm z maksimum zlokalizowanym przy długości fali $\sim 279\text{ nm}$, 282 nm i $\sim 230\text{ nm}$, 240 nm , co związane jest z bezpośrednią detekcją BSA, OVA, LYS na powierzchni porowatej krzemionki [D1,D4].

Spektroskopia XPS: Interakcję chemiczną białka z powierzchnią nośnika (identyfikacja grup funkcyjnych) oraz jakościową i ilościową analizę składu chemicznego powierzchni mezoporowatego materiału krzemionkowego oraz materiału z zaadsorbowaną warstwą białka scharakteryzowano za pomocą rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS). W badaniach XPS próbkę umieszczono w wielokomorowym systemie analitycznym w ultrawysokiej próżni UHV (ang. *Ultra High Vacuum*, UHV, $p = 10^{-8}$ mbar) firmy Prevac (Polska) wyposażonym w monochromatyzowane źródło promieniowania $\text{AlK}\alpha$ ($h\nu = 1486,6\text{ eV}$) generowane przez Scienta MX 650 X-Ray Source Monochromator oraz półkulisty analizator energii elektronów o wysokiej rozdzielczości VG Scienta R4000 ($U = 12\text{ kV}$, $I_e = 300\text{ mA}$). W celu wykrycia składu pierwiastkowego na powierzchni badanego materiału zarejestrowano widma zbiorcze (ang. *survey scan*) z energią przejścia 200 eV (z krokiem energii $0,5\text{ eV}$). Widma szczegółowe (ang. *detail scans*) o wysokiej rozdzielczości poziomów rdzenia węgla (C 1s), tlenu (O 1s), azotu (N 1s) i siarki (S 2p) zebrano przy energii przejścia 50 eV ($0,1\text{ eV/krok}$) w celu określenia różnych konfiguracji elektronowej elektronów w atomach struktury każdego pierwiastka. Energie wiązania poziomu rdzenia skalibrowano na podstawie położenia linii węgla C 1s przy $284,8\text{ eV}$. Analizę przetwarzania danych i dopasowywanie krzywych (kształt linii: kombinacja funkcji Gaussa-Lorenza) przeprowadzono za pomocą oprogramowania CasaXPS (wersja 2.3.17) [D2,D4].

Analiza CHN: Procentową zawartość związków organicznych (węgla, wodoru i azotu) w wyjściowym materiale MCF, białku i biokompozycie oznaczono za pomocą analizatora CHN 2400 firmy Perkin-Elmer. W rurze kwarcowej w obecności katalizatorów w temperaturze $T = 950\text{ }^\circ\text{C}$ przeprowadzono proces spalania. Następnie powstałe w procesie spalania tlenki azotu zredukowano w rurze redukcyjnej w temperaturze $T = 650\text{ }^\circ\text{C}$. Produkty spalania (woda, dwutlenek węgla i azot) wprowadzono do komory mieszania, rozdzielano chromatograficznie i oznaczano przy pomocy elektronicznego detektora gazów [D4].

5.3.8. Analiza termiczna sprzężona z analizą MS i FTIR

Właściwości termiczne badanych materiałów, mechanizm interakcji białko/nośnik (trwałość wiązania molekuly z powierzchnią) oraz jakościową identyfikację biomolekuł (skład uwolnionych produktów gazowych) w badanym biokompozycie określono za pomocą metod termoanalitycznych: termogravimetria (ang. *Thermogravimetric*, TG), pochodna krzywej termogravimetrycznej (ang. *Derivative Thermogravimetric*, DTG), różnicowa kalorymetria skaningowa (ang. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) oraz termogravimetria TG sprzężona ze spektrometrią mas (ang. *Mass Spectrometry*, MS) (TG/MS) i spektroskopią w podczerwieni z transformacją Fouriera, (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) (TG/FTIR).

TG-DTG/DSC/MS/FTIR: Właściwości fizykochemiczne badanych materiałów krzemionkowych oraz biokompozytów pod wpływem zmian temperatury zanalizowano przy użyciu aparatu STA 449 Jupiter F1 (Netzsch, Niemcy). Aparat STA wykorzystuje równolegle dwie techniki: termogravimetrię (TG – pomiar zmiany masy próbki podczas jej ogrzewania/chłodzenia) oraz skaningową kalorymetrię różnicową (DSC – pomiar zmiany różnicy strumienia ciepłego powstającego między próbką badaną i referencyjną w trakcie przemiany termicznej). Pomiaru prowadzono w atmosferze syntetycznego powietrza (50 ml/min) w szerokim zakresie temperaturowym (30 °C – 950 °C) z szybkością nagrzewania 10 °C/min. Produkty gazowane emitowane podczas dekompozycji termicznej badanego materiału analizowano za pomocą kwadropolowego spektrometru mas QMS 403C Aëolos firmy Netzsch (Niemcy) oraz spektrofotometru FTIR Tensor 27 firmy Bruker (Niemcy) sprzężonego z aparatem STA. W celu analizy *in situ* gazowych produktów rozkładu badanych nośników i kompozytów białkowo-krzemionkowych rejestrowano widma MS (stosunek masy do ładunku (m/z) zjonizowanych cząstek lub atomów) w zakresie od 10 amu do 300 amu oraz widma FTIR w zakresie 600 cm^{-1} – 4000 cm^{-1} [D2,D3].

5.4. Omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

W pracach [D1–D4] opisano analizę procesu adsorpcji modelowych enzymów białkowych na uporządkowanych mezoporowatych nośnikach krzemionkowych typu mezostrukturalna pianka komórkowa o zróżnicowanej geometrii struktury porowatej i morfologii powierzchni. Przeprowadzono również szczegółową charakterystykę właściwości fizykochemicznych, strukturalnych i morfologicznych filmów białkowych naniesionych na powierzchnię nośnika stałego.

Jako modelowe enzymy, różniące się właściwościami fizykochemicznymi i budową cząsteczkową, wybrano *albuminę surowicy krwi wołowej* (BSA – masa cząsteczkowa: 66,4 kDa; średnica hydrodynamiczna: 7,3 nm; wymiar: 4 nm × 4 nm × 14 nm lub 8 nm × 8 nm × 3 nm; punkt izoelektryczny: ~4,7 – 5,1), *owoalbuminę białka jaja kurzego* (OVA – masa cząsteczkowa: 45 kDa; średnica hydrodynamiczna: 5,9 nm; wymiar: 7 nm × 4,5 nm × 5 nm; punkt izoelektryczny: ~4,6 – 4,7) oraz *lizozym z białka jaja kurzego* (LYS – masa cząsteczkowa: 14,3 kDa; średnica hydrodynamiczna: 4 nm, wymiar: 4,5 nm × 3 nm × 3 nm; punkt izoelektryczny: ~10,5 – 11).

Istotną częścią pracy naukowej [D1] i [D3] było otrzymanie serii mezostruktur MCF o pożądanych właściwościach strukturalnych, powierzchniowych i morfologicznych poprzez dobór odpowiednich parametrów ich syntezy (rodzaj matrycy organicznej – Pluronic PE9400, PE10500, P123; skład mieszaniny reakcyjnej – stosunek masowy: polimer/TMB; polimer/TEOS; warunki syntezy – czas, temperatura). Adsorbenty krzemionkowe MCF różniące się parametrami strukturalnymi: powierzchnia właściwa ($250 \text{ m}^2/\text{g} - 720 \text{ m}^2/\text{g}$), powierzchnia zewnętrzna ($30 \text{ m}^2/\text{g} - 260 \text{ m}^2/\text{g}$), średnica porów ($6 \text{ nm} - 30 \text{ nm}$) i całkowita objętość porów ($0,12 - 1,98 \text{ cm}^3/\text{g}$) wykorzystano jako nośniki ciała stałego do immobilizacji wybranych enzymów białkowych.

Ważnym aspektem prowadzonych badań naukowych w rozważanych pracach [D1–D4] była również szczegółowa charakterystyka powierzchni (strukturalna, chemiczna, molekularna, elektronowa) oraz komplementarna analiza jakości powierzchni (morfologia – mikro-nanochropowatość, falistość; topografia – obrazowanie mikro- nanostruktur powierzchniowych; tekstura – porowatość, skład chemiczny – mapy rozkładu stężenia pierwiastków) otrzymanych materiałów MCF oraz biokompozytów białko/porowaty nośnik przy zastosowaniu różnych metod badawczych i technik pomiarowych: miareczkowanie potencjometryczne [D1,D3,SD3], analiza elementarna (CHN) [D4,SD4], termogravimetria (TG, DTG, DSC) sprzężona ze spektrometrią mas (QMS) [D2,D3], niskotemperaturowa adsorpcja azotu [D1,SD1,D3,SD3], spektrofotometria (UV-Vis, UV-Vis DRS) [D1,SD1,D4,SD4] spektroskopia (XPS, ATR FT-IR) [D2,D4], dyfrakcja promieni rentgenowskich (XRD) [D2,D4], profilometria optyczna (OP), mikroskopia sił atomowych (AFM) [D1,D4], skaningowa i transmisyjna mikroskopia elektronowa (SEM, TEM) z mikroanalizą rentgenowską z dyspersją energii (EDX) [D1–D4,SD4].

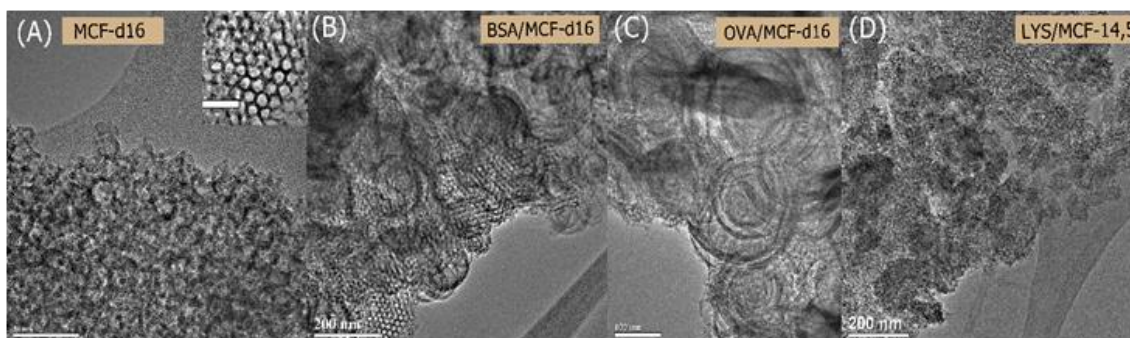
W pracach [D1–D4] do weryfikacji struktury i porowatości powierzchni oraz stopnia uporządkowania otrzymanych nanoporowatych ciał stałych wykorzystano podstawowe techniki eksperymentalne: niskotemperaturowa sorpcja azotu, dyfrakcja rentgenowska (XRD) oraz wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa (HRTEM).

W oparciu o zarejestrowane izotermy adsorpcji/desorpcji azotu (izoterma typu IV według klasyfikacji Brunauer’a z pętlą histerezy typu H1) dla wszystkich otrzymanych materiałów MCF, zawarte w pracy [D1,SD1,D3,SD3], wykazały porowatą strukturę nośnika, obecność mezoporów w ich strukturze wewnętrznej oraz butelkową budowę porów z dużymi komorami połączonymi wąskimi porami transportowymi. Badane mezostrukturalkne pianki krzemionkowe charakteryzują się zróżnicowaną porowatością, objętością i rozmiarem porów oraz powierzchnią właściwą: **MCF-d10** ($V_t = 1,32 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 10 \text{ nm}$, $S_{BET} = 525 \text{ m}^2/\text{g}$) i **MCF-d16** ($V_t = 1,98 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 16 \text{ nm}$, $S_{BET} = 495 \text{ m}^2/\text{g}$) [D1] oraz **MCF-6,4** ($V_t = 1,15 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 6,4 \text{ nm}$, $S_{BET} = 716 \text{ m}^2/\text{g}$); **MCF-7,4** ($V_t = 1,26 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 7,4 \text{ nm}$, $S_{BET} = 685 \text{ m}^2/\text{g}$); **MCF-8,7** ($V_t = 1,14 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 8,7 \text{ nm}$, $S_{BET} = 522 \text{ m}^2/\text{g}$); **MCF-10,1** ($V_t = 1,32 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 10,1 \text{ nm}$, $S_{BET} = 533 \text{ m}^2/\text{g}$); **MCF-12,4** ($V_t = 1,76 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 12,4 \text{ nm}$, $S_{BET} = 569 \text{ m}^2/\text{g}$); **MCF-14,5** ($V_t = 1,98 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 14,5 \text{ nm}$, $S_{BET} = 547 \text{ m}^2/\text{g}$); **MCF-15,5** ($V_t = 1,91 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 15,5 \text{ nm}$, $S_{BET} = 494 \text{ m}^2/\text{g}$); **MCF-20,3** ($V_t = 2,21 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 20,3 \text{ nm}$, $S_{BET} = 435 \text{ m}^2/\text{g}$); **MCF-25,8** ($V_t = 1,94 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 25,8 \text{ nm}$, $S_{BET} = 301 \text{ m}^2/\text{g}$); **MCF-27,7** ($V_t = 1,85 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 27,7 \text{ nm}$, $S_{BET} = 267 \text{ m}^2/\text{g}$); **MCF-30,1** ($V_t = 1,88 \text{ cm}^3/\text{g}$, $D_{hy} = 30,1 \text{ nm}$, $S_{BET} = 275 \text{ m}^2/\text{g}$) [D3].

Badania metodą XRD przeprowadzone dla dwóch reprezentatywnych materiałów MCF-d16 [D2] i MCF-14,5 [D4] wykazały obecność trzech charakterystycznych refleksów Bragg’a na dyfraktogramie XRD w zakresie niskich wartości kąta dyfrakcji 2θ (jeden intensywny refleks przy $2\theta \cong 0,5^\circ$ oraz dwa szerokie refleksy o zmniejszonej intensywności $2\theta = 0,86^\circ$ i $1,22^\circ$ oraz $0,93^\circ$ i $1,36^\circ$ odpowiednio dla materiału MCF-d16 i MCF-14,5) potwierdzając

uporządkowany charakter struktury porów analizowanych nośników krzemionkowych MCF [D2,D4].

Charakterystykę nanostrukturalną i topograficzną ukształtowania powierzchni wybranych materiałów MCF: MCF-d16 [D1,D2] i MCF-6,4; MCF-14,5; MCF-30,1 wzbogacono o pomiary metodą wysokorozdzielczej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (HRTEM) oraz skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) [D3,D4].



Rysunek 1. Mikrografie HRTEM obrazujące strukturę powierzchni mezostrukturalnej pianki krzemionkowej MCF-d16 (A) oraz biokompozytów (B) BSA/MCF-d16, (C) OVA/MCF-d16 i (D) LYS-MCF-14,5 [D1, D4].

Otrzymane wysokorozdzielcze mikrografie TEM ujawniły porowatą strukturę nośników z dobrze rozbudowaną i uporządkowaną nanostrukturą wewnętrzną porów o średnicy ~ 13 nm dla nośnika MCF-d16, ~ 7 nm (MCF-6,4), ~ 15 nm (MCF-14,5) i ~ 31 nm (MCF-30,1), co dobrze koreluje z wynikami sorpcji azotu [D1,D3,D4]. Na uwagę zasługuje fakt, że pomiary HRTEM dokładnie zobrazowały topografię i nanostrukturę porowatego nośnika krzemionkowego (na mikrografii TEM widoczne duże kuliste komórki połączone regularnie ułożonymi kanałami, stanowiącą ciągły trójwymiarowy (3D) periodycznie powtarzający się system porów – ciemne obszary reprezentują ściany, a białe rzeczywiste pory; rysunek 1A). W celach porównawczych dla rozważanych krzemionek przeprowadzono badania topografii powierzchni mikroskopią SEM. Analiza SEM również potwierdziła porowatą strukturę badanych adsorbentów (MCF-d16, MCF-6,4, MCF-14,5, MCF-30,1) oraz heterogeniczną topografię podłoża o charakterze drobnoziarnistym [D2,D3,D4].

Aby określić wpływ porowatości powierzchni i wielkości porów mezostrukturalnych pianek krzemionkowych na właściwości adsorpcyjne względem BSA, OVA, LYS dla wszystkich syntezowanych materiałów MCF przeprowadzono badania równowagi adsorpcji biopolimerów (pomiar izoterm adsorpcji z roztworów wodnych białek o stężeniu $c_0 = 1 - 5$ mg/ml w PBS o $pH = 7,4$) [D1,D3]. Badania kinetyki adsorpcji białek (wyznaczenie profili kinetycznych: $c(t)$ – stężenie adsorbentu \sim czas; $a(t)$ – adsorpcja \sim czas) wykonano dla pięciu reprezentatywnych adsorbentów MCF o zróżnicowanych cechach strukturalnych: MCF-d10, MCF-d16 [D1] oraz MCF-6,4, MCF-14,5 i MCF-30,1 [D3]. W pracy [D3] do optymalizacji równowagowych izoterm adsorpcji w układzie LYS/porowaty nośnik zastosowano uogólnione równanie Langmuira (GL), Langmuira-Freundlicha (FL) i Langmuira (L), które najlepiej opisały proces adsorpcji małej cząsteczki lizozymu na adsorbentach krzemionkowych MCF-6,4, MCF-14,5 i MCF-30,1 (współczynnik ideterminacji R^2 w granicach od 0,997 do 0,985; natomiast odchylenia standardowe $SD (c/c_0)$ w zakresie od 0,004% do 0,008%). Otrzymane zależności kinetyczne (profile stężeniowe – zmiany stężenia białka w czasie) dla układów BSA/MCF-d10, OVA/MCF-d10, BSA/MCF-d16, OVA/MCF-d16 [D1] oraz LYS/MCF-6,4, LYS/MCF-14,5 i LYS/MCF-30,1 [D3] przeanalizowano za pomocą prostych równań kinetycznych (m-exp, FOE, SOE, MOE) i modeli dyfuzyjnych (IDM, PDM). Najlepszą jakość

dopasowania dla badanych układów białko/MCF otrzymano w przypadku równania multi-eksponecjonalnego (współczynnik indeterminacji $1-R^2$ w granicach od $9,4 \cdot 10^{-4}$ do $2,31 \cdot 10^{-2}$; względne odchylenie standardowe 0,259% – 0,723%). Oszacowano również czasy połówkowe $t_{1/2}$ (czas potrzebny do uzyskania zmiany stężenia białka o 50% w stosunku do jego stężenia początkowego) z równania multi-eksponecjonalnego (m-exp).

Analiza porównawcza adsorpcji BSA i OVA zawarta w pracy [D1] wykazała, że adsorpcja obu białek (ilość zaadsorbowana $a_{eq} = 0,214$ g/g dla BSA i $0,205$ g/g dla OVA) zachodzi efektywniej na nośniku MCF-d16 o większym rozmiarze porów (średni hydrauliczny rozmiar porów: $D_{hy} = 16$ nm) niż w przypadku materiału o mniejszej średnicy porów MCF-d10 ($D_{hy} = 10$ nm). Na podstawie analizy oszacowanych czasów połówkowych stwierdzono, że szybkość adsorpcji BSA ($t_{1/2} = 13149$ min i 1201 min odpowiednio dla MCF-d10 i MCF-d16) i OVA ($t_{1/2} = 7827$ min i 5979 min odpowiednio dla MCF-d10 i MCF-d16) na porowatej krzemionce wzrasta wraz ze wzrostem średnicy porów według następującego porządku adsorbentów: MCF-d10 < MCF-d16. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że w przypadku większej molekuly białka BSA całkowita szybkość adsorpcji na adsorbencie MCF-d16 z większymi porami jest większa niż dla adsorpcji mniejszej owoalbuminy. Odwrotny efekt zaobserwowano w przypadku materiału MCF-d10 z mniejszymi porami (pojemność i szybkość adsorpcji BSA jest mniejsza w porównaniu do owoalbuminy). Uzyskany efekt można wytłumaczyć innym mechanizmem immobilizacji biomolekuł zachodzącym na nośniku porowatym związanym z różną budową cząsteczkową protein (szybkość dyfuzji biocząsteczek adsorbentu uwarunkowana ich masą cząsteczkową, wymiarem i kształtem geometrycznym molekuly) oraz zmianą konformacji lub reorientacji albuminy surowiczej krwi wołowej na powierzchni krzemionki (zmiana kształtu z wydłużonej elipsoidy o wymiarach $4 \times 4 \times 14$ nm³ w $pH = 7,4$ na kształt serca o wymiarach $8 \times 8 \times 3$ nm³ w roztworze o $pH \sim 8$).

Badania przedstawione w artykule [D1] były inspiracją do dalszej pracy naukowo-badawczej nad analizą adsorpcji małego, sztywnego białka – lizozymu, należącego do „twardych” protein, które wykazuje słabą tendencję do zmian konformacji na skutek immobilizacji.⁴³ Opublikowane wyniki badań w pracy [D3], poświęconej adsorpcji lizozymu (masa cząsteczkowa: ~3-krotnie i ~5-krotnie mniejsza w stosunku do OVA i BSA; promień hydrodynamiczny: ~1,5 i ~1,8 razy mniejszy względem OVA i BSA) na mezokomórkowych piankach krzemionkowych, rozszerzyły tematykę badawczą na dużą grupę materiałów porowatych MCF w szerokim zakresie zmienności średnicy porów (6 nm – 30 nm) i powierzchni właściwej (250 m²/g – 720 m²/g). W rozważanej pracy [D3] przeanalizowano wpływ zróżnicowania właściwości teksturalnych i strukturalnych wszystkich otrzymanych mezokomórkowych pianek krzemionkowych MCF na wielkość adsorpcji lizozymu. Przeprowadzono również analizę kinetyki adsorpcji LYS dla trzech reprezentatywnych materiałów MCF (MCF-6,4, MCF-14,5 i MCF-30,1). Największą adsorpcję lizozymu ($a_{eq} = 0,55$ g/g) odnotowano na materiale MCF-14,5 o średnim wymiarze porów ($D_{hy} = 14,5$ nm). Zachowanie takie może wskazywać na istnienie optymalnej zależności pomiędzy rozmiarem cząsteczki lizozymu a średnicą porów nośnika, odpowiedzialnej w tym przypadku za wzrost sił adsorpcji. Z kolei dla materiałów MCF odznaczających się najmniejszą i największą średnicą porów (MCF-6,4 – rozmiar porów 6,4 nm i MCF-30,1 – wymiar porów 30,1 nm), ilość zaadsorbowanego białka uległa zmniejszeniu w przybliżeniu proporcjonalnie do stosunku pomiędzy średnicą porów i średnicą białka (ilość zaadsorbowana przez LYS: $a_{eq} = 0,29$ g/g dla MCF-6,4 i $a_{eq} = 0,27$ g/g dla MCF-30,1). W przypadku innych materiałów krzemionkowych o porównywalnych powierzchniach właściwych, jednakże z różnymi rozmiarami porów (pory mniejsze i większe niż 14,5 nm) zaobserwowano słabszą zdolność adsorpcji enzymu co może być

skorelowane z wartością powierzchni właściwej i wymiarem porów badanych adsorbentów. Przeprowadzone pomiary kinetyki adsorpcji dla układu lizozym/MCF wykazały zróżnicowany przebieg procesu adsorpcji na badanych adsorbentach. Biorąc pod uwagę przebieg profili stężeniowych i adsorpcyjnych dla układów LYS/MCF stwierdzono, że najszybciej lizozym adsorbuje się w początkowym etapie trwania procesu adsorpcji (łatwiejszy dostęp do niezapełnionych porów adsorbentu). Analizując połówkowe czasy adsorpcji zauważono, że proces formowania warstwy lizozymu przebiegał najszybciej na adsorbencie MCF-30,1 z największą średnicą porów ($t_{1/2} = 0,5$ min), co ułatwiało dyfuzję i adsorpcję białka w porach. Zdecydowanie najwolniejszy przebieg adsorpcji odnotowano dla materiału MCF-6,4 o najmniejszej średnicy porów ($t_{1/2} = 358$ min) z powodu spowolnionej i utrudnionej dyfuzji cząsteczek lizozymu w mezoporach krzemionki. W przypadku materiału MCF-14,5 ($t_{1/2} = 1,7$ min) proces adsorpcji lizozymu przebiegał stosunkowo wolniej w porównaniu z adsorbentem MCF-30,1, jednakże rozmiar porów tego materiału znacząco nie ograniczał dyfuzji biomolekuł do wewnętrznej przestrzeni struktury porowatej nośnika.

Aby zweryfikować zmiany charakteru struktury porowatej nośnika zachodzące w wyniku adsorpcji BSA, OVA, LYS w pracach [D1,D3] dokonano analizy powierzchni właściwej i parametrów teksturalnych badanych biokompozytów BSA/MCF-d16 i OVA/MCF-d16 [D1] oraz LYS/MCF-6,4, LYS/MCF-14,5, LYS/MCF-30,1 [D3,SD3] opierając się na zarejestrowanych izotermach sorpcji azotu w temperaturze ciekłego azotu – 77 K. Badania sorpcyjne azotu [D1] dowiodły, że adsorpcja surowiczej albuminy wołowej oraz owoalbuminy na powierzchni materiału MCF-d16 powoduje znaczne obniżenie wartości parametrów geometrycznych powierzchni w stosunku do materiału wyjściowego (redukcja S_{BET} i V_t , V_{mez} odpowiednio o ~30% i ~53% w przypadku kompozytu OVA/MCF-d16 oraz ~40% i ~60% dla BSA/MCF-d16). Krzywe rozkładu wielkości porów względem ich średnicy (PSD) obliczone metodą BJH dowiodły zmniejszenia średnicy porów po adsorpcji obu białek (rozkłady przesunięte w kierunku niższych wartości średnicy porów). De facto, BSA o większej masie cząsteczkowej (66,4 kDa) zmienia porowatość powierzchni materiału MCF-d16 w większym stopniu niż albumina jaja kurzego o mniejszej masie cząsteczkowej (45 kDa). Zjawisko to związane jest z silniejszą adsorpcją cząsteczek BSA z roztworu buforowego PBS o $pH = 7,4$ wynikające ze zmiany konformacyjnej lub reorientacji cząsteczek białek na powierzchni nośnika (ekspozycja różnych części molekuł o odmiennych własnościach hydrofobowych/hydrofilowych, polarnych/niepolarnych, naładowanych/elektrycznie obojętnych)⁴⁴ oraz silniejszym oddziaływaniem białko-ciało stałe. Z kolei w pracy [D3] dotyczącej analizy adsorpcyjnej i fizykochemicznej badanego układu lizozym/porowata krzemionka również wykazano znaczącą redukcję wartości parametrów strukturalnych (S_{BET} , V_t , V_{mez} , D_{hy}) adekwatnie do ilości zaadsorbowanego białka na nośniku MCF. Największy spadek powierzchni właściwej S_{BET} (~93%) i całkowitej objętości porów V_t (~94%) w stosunku do materiału MCF bez osadzonej warstwy białka odnotowano dla bioukładu LYS/MCF-14,5 potwierdzając największą adsorpcję enzymu. Dla kompozytów LYS/MCF-6,4 i LYS/MCF-30,1 wartość S_{BET} i V_t zmniejszyły się odpowiednio o ~52% i 57% dla MCF-6,4 i ~54% i 73% dla LYS/MCF-30.1. Ponadto, funkcje rozkładu porów PSD wykazały zmniejszenie porów po adsorpcji lizozymu we wszystkich badanych biokompozytach lizozym/porowata nośnik (rozkłady przesunięte w kierunku niższych wartości średnicy porów) oraz wykazały silny spadek wysokości pików w porównaniu z materiałem bez warstwy białkowej (~96% dla MCF-14,5, ~26% dla MCF-6,4, ~61% dla MCF-30,1).

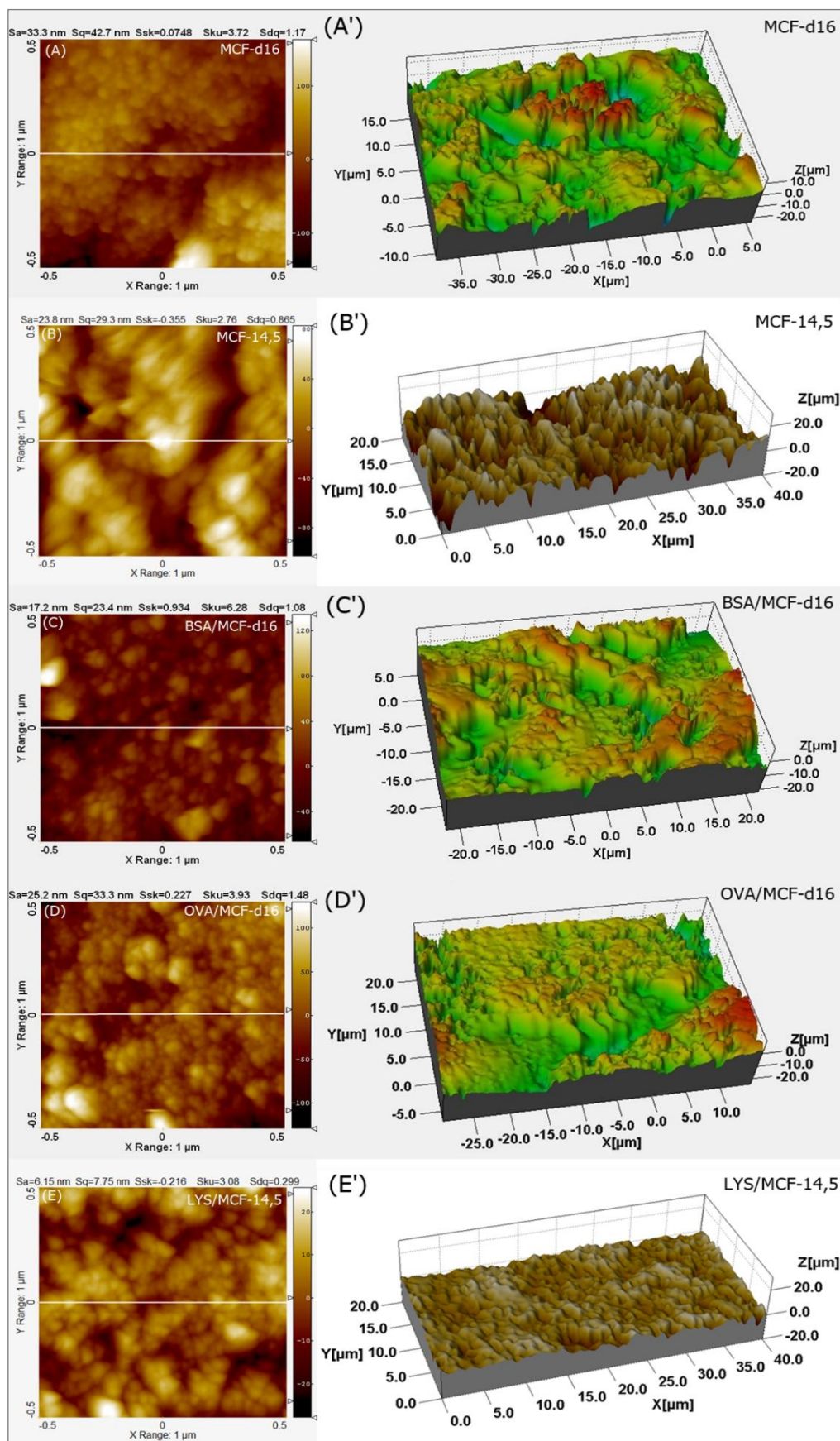
Podsumowując tę część pracy stwierdzono, że cząsteczki albumin mogą być unieruchomione wewnątrz mezoporów materiału, jak również zaadsorbowane na powierzchniach zewnętrznych nośnika, co znajduje swoje odzwierciedlenie w zredukowanych wielkościach

parametrów struktury geometrycznej powierzchni (powierzchni właściwej, objętości i wielkości porów) materiału MCF po immobilizacji filmu białkowego.

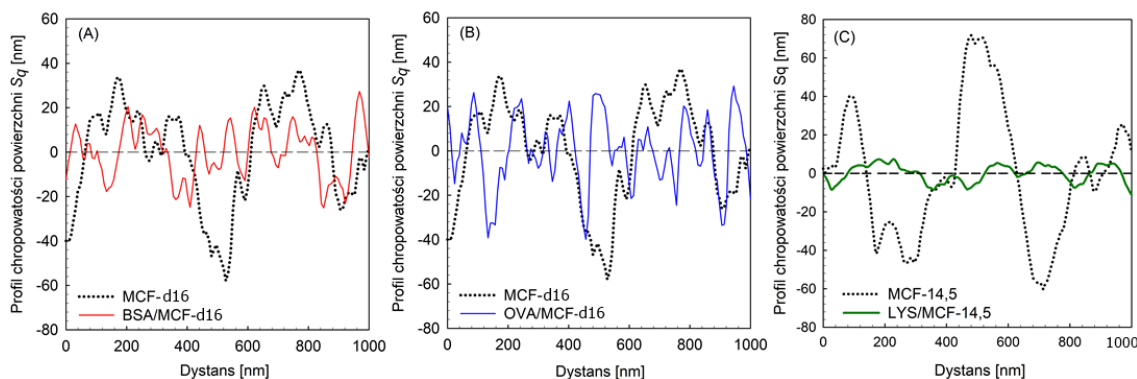
Zarejestrowane dyfraktogramy XRD w zakresie niskich kątów dyfrakcji 2θ dla materiałów ze związaną fazą białek zamieszczone w pracach [D2] i [D4] również potwierdzają obecność cząsteczek protein wewnątrz struktury porowatej adsorbentu MCF. W przypadku badanych biokompozytów (BSA/MCF-d16, OVA/MCF-d16 [D2] i LYS/MCF-14,5 [D4]) na dyfraktogramie XRD odnotowano znaczny spadek intensywności zarejestrowanych trzech refleksów Bragg'a (redukcja wysokości pierwszego, dobrze wykształconego refleksu Bragg'a odpowiednio o ~39%, ~37% i ~33% względem kompozytu BSA/MCF-d16, OVA/MCF-d16 i LYS/MCF-14,5), całkowitej zintegrowanej powierzchni refleksu XRD (A_{peak}) oraz odległości międzypłaszczyznowej (d) w stosunku do materiału niemodyfikowanego warstwą enzymu, sugerując lokowanie się biomolekuł wewnątrz porów nośnika. Ponadto, zaobserwowany spadek intensywności refleksów dyfrakcyjnych z jednoczesnym ich przesunięciem w kierunku wyższych wartości kątów dyfrakcji 2θ , wskazuje na zmniejszenie rozmiarów komórki (wielkości porów) w strukturze wewnętrznej kompozytu białko/MCF w porównaniu do nośnika bez warstwy adsorpcyjnej białka. Zjawisko to nie jest interpretowane jako zaburzenie uporządkowanej struktury porowatej adsorbentu, ale najprawdopodobniej wynika ze zmniejszenia różnicy gęstości elektronowej między mezoporami wypełnionymi biomolekułami a ściankami porów. Otrzymane wyniki, stanowią podstawę do dalszych rozważań dotyczących wpływu ukształtowania mikro- nanostruktury i morfologii powierzchni nośnika na proces osadzania cząsteczek adsorbentu na powierzchni ziarna jak i w porach materiału zmierzające w kierunku zrozumienia mechanizmu interakcji białko/nośnik (trwałość wiązania molekuly z powierzchnią).

Oceny morfologii i chropowatości powierzchni w mikro i nanoskali z jednoczesnym odwzorowaniem struktur powierzchniowych w układzie dwu- (2D) i trójwymiarowym (3D) badanych materiałów krzemionkowych (MCF-d16 [D1] i MCF-14,5 [D4]) oraz kompozytów białko/porowaty adsorbent (BSA/MCF-d16, OVA/MCF-d16 [D1] i LYS/MCF-14,5 [D4]) dokonano w oparciu o mikroskopię sił atomowych i profilometrię optyczną (rysunek 2). Przeprowadzone badania morfologiczne na poziomie nano- mikroskopowym opisane w pracach [D1] i [D4] dostarczyły informacji na temat stanu fizycznego powierzchni rozważanych mezoporowatych struktur i bioukładów opierając się na analizie podstawowych parametrów mikro- nanochropowatości i falistości powierzchni: chropowatość (S_q), falistość – nachylenie powierzchni (S_{dq}), asymetria – skośność powierzchni (S_{sk}), kurtoza – spłaszczenie powierzchni (S_{ku}).

Dowiedziano, że nośniki MCF-d16 i MCF-14,5 wykazują zróżnicowaną morfologię i chropowatość powierzchni ziaren adsorbentu (parametr chropowatości powierzchni w nano- i mikroskali wynosił odpowiednio: $S_q = 42,7$ nm i $5,44$ μm dla MCF-d16 oraz $S_q = 29,3$ nm i $6,59$ μm dla MCF-14,5) oraz heterogeniczne, nieregularne ukształtowanie podłoża (mała częstotliwość i wysoka maksymalna amplituda odchyień profilu nanochropowatości powierzchni S_q od zerowej linii bazowej w zakresie od -60 nm do 70 nm dla materiału MCF-14,5 i od -60 nm do 40 nm dla MCF-d16; rysunek 3A-C).



Rysunek 2. Wizualizacja i odwzorowanie struktur powierzchniowych i morfologii powierzchni w układzie 2D i 3D materiału MCF przed i po adsorpcji albumin. Mikrografie AFM 2D powierzchni materiałów MCF i biokompozytów: (A) MCF-d16; (B) MCF-14,5; (C) BSA/MCF-d16; (D) OVA/MCF-d16; (E) LYS/MCF-14,5. Obrazy izometryczne 3D uzyskane za pomocą profilometru optycznego dla powierzchni nośników MCF i kompozytów protein/MCF: (A') MCF-d16; (B') MCF-14,5; (C') BSA/MCF-d16; (D') OVA/MCF-d16; (E') LYS/MCF-14,5 [D1,D4].



Rysunek 3. Rozkład profilu chropowatości powierzchni S_q materiału (A,B) MCF-d16 i (C) MCF-14,5 (linia czarna – kropkowana) i biokompozytów (A) BSA/MCF-d16 (linia czerwona – ciągła), (B) OVA/MCF-d16 (linia niebieska – ciągła) i (C) LYS-MCF-14,5 (linia zielona – ciągła) w zakresie od 0 nm do 1000 nm [D1,D4].

W wyniku adsorpcji białka na powierzchni materiału MCF odnotowano istotne zmiany we właściwościach fizycznych powierzchni w skali nano i mikro (morfologia, topografia, tekstura) w stosunku do powierzchni czystej krzemionki. Analiza AFM wykazała spadek chropowatości powierzchni w skali nanometrycznej o 45% po adsorpcji BSA i 22% po adsorpcji OVA w stosunku do materiału MCF-d16 oraz 73% po immobilizacji LYS na nośniku MCF-14,5. Ten sam efekt zaobserwowano opierając się na analizie chropowatości powierzchni w skali mikrometrycznej za pomocą profilometru optycznego (redukcja S_q o 29,4% po immobilizacji BSA i 28% po immobilizacji OVA na materiale MCF-d16 oraz 73% po adsorpcji LYS na MCF-14,5). Porównując częstotliwość i oscylacje amplitudy profilu nanochropowatości powierzchni dla układów z warstwą adsorpcyjną protein w przedziale od 0 nm do 1000 nm (rysunek 3A-C) odnotowano następujące różnicowania: (i) suma wartości dodatniej i bezwzględnej wartości ujemnej maksymalnej amplitudy odchyłań profilu chropowatości powierzchni (Δh) w nanoskali jest $\sim 2,5$ - i $\sim 1,4$ -krotnie mniejsza w wyniku adsorpcji BSA i OVA na nośniku MCF-d16 oraz ~ 10 -krotnie dla kompozytu lizozym/MCF-14,5 (w mikroskali – Δh zmniejsza się $\sim 2,4$ - i ~ 2 -krotnie po adsorpcji BSA i OVA na nośniku MCF-d16 oraz ~ 7 -krotnie dla kompozytu lizozym/MCF-14,5); (ii) profil chropowatości powierzchni dla biokompozytów charakteryzuje się regularnym przebiegiem w stosunku do materiału referencyjnego MCF; (iii) rozkład częstotliwości oscylacji na powierzchni krzemionki w wyniku osadzenia cząsteczek protein jest znacznie większy (mniejsze odstępy) w porównaniu z materiałem MCF. Zaobserwowano również, że histogram funkcji rozkładu wysokości chropowatości powierzchni dla kompozytów białko/krzemionka ulega zawężeniu względem materiału MCF nie pokrytego warstwą białka co wskazuje na leptokurtyczny charakter powierzchni o mniejszej izotropowości ($S_{ku} > 3$ i $S_{sk} > 0$) po immobilizacji enzymu [D1,D4]. Efekt ten wzrasta według następującego porządku biokompozytów: OVA/MCF-d16 < BSA/MCF-d16 < LYS/MCF-14,5 co jest zgodne z ilością zaadsorbowaną enzymów białkowych określoną z równowagowych danych adsorpcyjnych.

Podsumowując tę część pracy, analiza wpływu morfologii i ukształtowania powierzchni geometrycznej struktury porowatej i nano- mikrochropowatości powierzchni badanego materiału MCF na stopień pokrycia powierzchni białkiem potwierdziła nie tylko adsorpcję bioadsorbentu na powierzchni nośnika i w porach adsorbentu, ale również ujawniła następujące zależności: (i) immobilizacja protein na porowatym nośniku krzemionkowym tworzy inną strukturę morfologiczną powierzchni materiału (biocząsteczki enzymu w wyniku adsorpcji fizycznej tworzą ciągłą i upakowaną warstwę filmu białkowego na powierzchni nośnika – leptokurtyczny charakter powierzchni); (ii) biokompozyty charakteryzują się gładszą i mniej falistą strukturą

powierzchni (redukcja parametrów S_q i S_{dq} – adsorpcja adsorbentu na powierzchni); (iii) powierzchnia z warstwą białka jest bardziej homogeniczna a struktura powierzchni ze względu na ukształtowanie staje się bardziej regularna (obniżona amplituda i zwiększona częstotliwość profili chropowatości powierzchni – adsorpcja białka w strukturze mezoporów i na powierzchni nośnika MCF). Generalnie największe zmiany w morfologii i mikro-nanochropowatości powierzchni zaobserwowano w przypadku materiału MCF z porami 14,5 nm (MCF-14,5) w wyniku adsorpcji lizozymu – małego i modelowego sztywnego białka (ang. *hard model protein*), które wykazuje słabą tendencję do zmian konformacyjnych na skutek adsorpcji [D4]. W przypadku materiału krzemionkowego z większymi porami 16 nm (MCF-d16) [D1] zmiana parametrów morfologii powierzchni w wyniku adsorpcji większej makromolekuły białka (BSA, największe powinowactwo do zmian konformacyjnych w wyniku immobilizacji) była większa w porównaniu do zmian wywołanych immobilizacją mniejszej owoalbuminy. W oparciu o wyniki badań zaprezentowane w pracach [D1-D4] stwierdzono, że mechanizm interakcji białko/porowaty nośnik w procesie adsorpcji bioadsorbentu (różnorodna budowa, rozmiar i stabilność struktury protein) zarówno na powierzchni materiału (zróżnicowana morfologia i geometria struktury powłoki nośnika MCF) jak i w uporządkowanej architekturze sieci mezoporów (różny wymiar i objętość porów adsorbentu) zależy od właściwości powierzchni podłoża materiału oraz od charakteru fizykochemicznego cząsteczek białek. Te wzajemne relacje mają bardzo duże znaczenie w odniesieniu do adsorpcji biocząsteczek (gęstość filmu białkowego) na powierzchni ciała stałego, ponieważ pozwalają na dostosowanie i kontrolę struktury powierzchni materiału oraz parametrów morfologii i chropowatości podłoża nanoporowatych struktur krzemionkowych na poziomie mikro- nanometrycznym pod kątem projektowania i wytwarzania nowych, funkcjonalnych nośników biomedycznych/biofizycznych dedykowanych do określonych zastosowań w analityce medycznej, farmakologii i inżynierii nowoczesnych materiałów.

Na tym etapie rozważań, warto zaznaczyć, że szczegółowa charakterystyka budowy powierzchni oraz komplementarna analiza jakości powierzchni (powierzchniowa i objętościowa) badanych krzemionkowych pianek mezokomórkowych z/bez warstwy adsorpcyjnej protein mają decydujące znaczenie w procesie immobilizacji i interakcji biomolekuł aktywnych biologicznie na powierzchni ciała stałego. W związku z powyższym w pracach [D1,D2,D4] poza analizą topografii i struktury powierzchni na poziomie atomowym badanych nośników (MCF-d16 i MCF-14,5) i układów (BSA/MCF-d16, OVA/MCF-d16 i LYS/MCF-4,5) dokonano również analizy chemicznej powierzchni stosując mikroskopię elektronową TEM i SEM z mikroanalizą rentgenowską EDX [D1,D2,D4,SD4], spektroskopię fotoelektronów (XPS) [D2,D4] oraz analizę elementarną CHN [D4,SD4]. Badania mikroskopowe jednoznacznie potwierdziły i zobrazowały obecność fragmentu materiału białkowego na powierzchni krzemionki (widoczne spiralne formy biopolimeru na mikrografii HRTEM; rysunek 1B-D). Ponadto, spektroskopia EDX i XPS, a także analiza elementarna dowiodła, że immobilizacja albumin na powierzchni MCF znacząco zmienia jakościowy i ilościowy skład chemiczny pierwiastków pochodzących z aminokwasów budujących białko (C – węgiel; N – azot; O – tlen; S – siarka; H – wodór) w badanym układzie. W dodatku, stosunek atomowy i masowy procentowej zawartości atomów azotu do węgla N/C (tzw. marker wykrywania białek)⁴⁵ oszacowany na podstawie analizy jakościowej i ilościowej TEM/EDX, SEM/EDS i XPS [D1,D2,D4,SD4] dla układów BSA/MCF-d16, OVA/MCF-d16 i LYS/MCF-14,5 potwierdził obecność białka na powierzchni ciała stałego (analiza SEM/EDS i XPS wykazała odpowiednio at.% N/C: OVA/MCF-d16 = 0,08 i 0,21; BSA/MCF-d16 = 0,088 i 0,26 [D2] oraz LYS/MCF-14,5 = 0,24 i 0,24 [D4]). Jednocześnie, mikroanaliza EDX sprzężona z obrazem mikroskopowym TEM umożliwiła wygenerowane map rozkładu stężenia

poszczególnych składowych pierwiastków w badanym obszarze biokompozytu (protein/MCF-16, i protein/MCF-14,5) [D1,D4] potwierdzając homogeniczne pokrycie powierzchni białkiem (równomierny rozkład pierwiastków C, O, N, S wchodzących w skład badanego bioukładu w analizowanym obszarze).

Przedmiotem części prac badawczych zaprezentowanych w artykułach [D1–D4] była także ocena charakteru wzajemnych oddziaływań pomiędzy adsorbentem a substancją adsorbowaną. Na tym etapie badań ważne było uwzględnienie i dokładne poznanie kwasowo-zasadowego charakteru powierzchni niemodyfikowanej krzemionki MCF oraz modyfikowanej warstwą adsorpcyjną polimerów białkowych, opierając się na pomiarach miareczkowania potencjometrycznego. Z drugiej strony, istotna była również wnikliwa i kompleksowa charakterystyka spektroskopowa (UV-Vis DRS, ATR FT-IR, XPS), która pozwoliła określić właściwości chemiczne powierzchni (identyfikacja wiązań chemicznych i grup funkcyjnych) rozważanych układów białko/mezoporowaty nośnik.

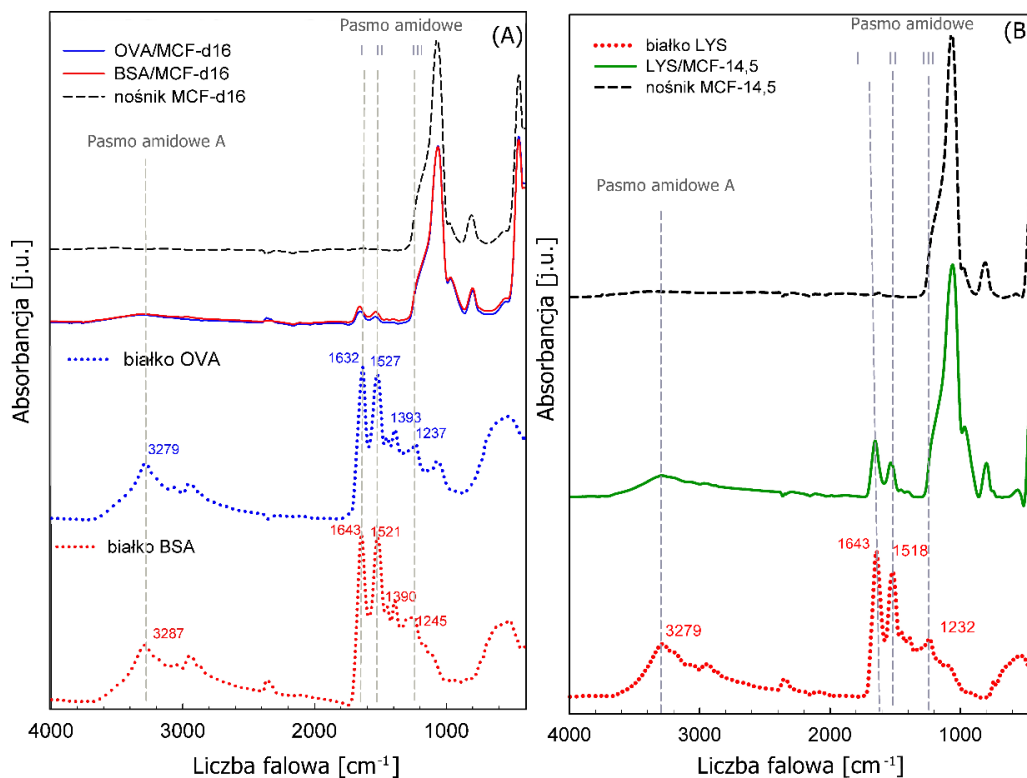
W związku z powyższym, w celu określenia różnic we właściwościach powierzchniowych badanych mezostrukturalnych pianek krzemionkowych po adsorpcji enzymów białkowych, w pracach [D1,D3,SD3], przeanalizowano ich właściwości kwasowo-zasadowe oraz wyznaczono gęstość ładunku powierzchniowego za pomocą miareczkowania potencjometrycznego. Generalnie zaobserwowano odmienny charakter kwasowo-zasadowy powierzchni czystej krzemionki w porównaniu do powierzchni pokrytej warstwą adsorpcyjną białek. Wartość punktu zerowego ładunku elektrycznego pH_{pzc} dla reprezentatywnych krzemionek (MCF-d16; MCF-6,4; MCF-14,5; MCF-30,1) odnotowano w zakresie od 4,02 do 5,62 co oznacza, że w warunkach pomiarowych ($pH = 7,4$) adsorbenty posiadały słaby ładunek ujemny. Natomiast, po adsorpcji cząsteczek protein badane materiały krzemionkowe ujawniły amfifilowy charakter powierzchni z jednoczesnym przesunięciem pH_{pzc} w stronę wyższych wartości pH ($pH_{pzc} \sim 6,5$ po adsorpcji BSA i OVA na nośniku MCF ze średnicą porów 16 nm oraz $pH_{pzc} \sim 4,88$, $\sim 4,64$ i $\sim 4,70$ po adsorpcji LYS odpowiednio na materiałach krzemionkowych z porami o rozmiarze 6,4 nm, 14,5 nm i 30,1 nm). Należy zaznaczyć, że w procesie immobilizacji lizozymu przy $pH = 7,4$ istotną rolę odgrywały oddziaływania elektrostatyczne (przyciągające) pomiędzy dodatnio naładowanym lizozymem a ujemnie naładowaną krzemionką.

W kolejnych badaniach [D1,SD1] i [D4,SD4] poświęconych tym razem charakterystyce fizykochemicznej powierzchni porowatego materiału MCF pokrytego warstwą adsorpcyjną enzymów białkowych za pomocą UV-Vis DRS, wykazały inną strukturę chemiczną powierzchni materiału oraz ujawniły nowe typy wiązań pomiędzy białką a powierzchnią krzemionki. W przypadku powierzchni MCF nie pokrytych warstwą białek (MCF-d16 i MCF-14,5) na widmie UV-Vis DRS nie odnotowano żadnych dominujących pasm absorpcyjnych. W wyniku immobilizacji enzymów białkowych (BSA, OVA, LYS) na powierzchni adsorbentu (MCF-d16 i MCF-14,5) zarejestrowano dwa charakterystyczne pasma absorpcyjne na widmie UV-Vis DRS: (i) wąskie pasmo o maksymalnej absorbancji przy długości fali około ~ 229 nm i ~ 240 nm – odpowiadające przejściom elektronowym typu $\pi \rightarrow \pi^*$ pochodzące od aromatycznych aminokwasów: tryptofanu, tyrozyny i cysteiny; (ii) szerokie pasmo przy ~ 279 nm i ~ 282 nm – związane z przejściem typu $n \rightarrow \pi^*$ grupy karboksylowej w wiązaniu peptydowym odpowiednio dla kompozytu białko/MCF-d16 oraz białko/MCF-14,5.⁴⁶

Różnice we właściwościach powierzchniowych wynikające z oddziaływań enzym/porowaty nośnik określono za pomocą spektroskopii osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni z transformatą Fouriera ATR FT-IR oraz rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów XPS [D2,D4]. Zarejestrowane widma ATR-FTIR przed i po

adsorpcji biomolekuł na powierzchni materiału krzemionkowego jednoznacznie wykazały zmianę budowy chemicznej nośnika, a także potwierdziły obecność białka oraz transformację jego struktury na powierzchni porowatego ciała stałego. W przypadku zarejestrowanych widm ATR FT-IR dla wyjściowego materiału MCF-d16 i MCF-14,5 (rysunek 4A,B) odnotowano typowe pasma ugrupowań Si–O–Si w strukturze MCF: pasmo w zakresie od 1065 cm^{-1} do 1067 cm^{-1} – asymetryczne drgania rozciągające Si–O–Si w sieci przestrzennej krzemianów $[\text{SiO}_4]^{4-}$; pasmo przy 965 cm^{-1} – 976 cm^{-1} – drgania rozciągające grup silanolowych połączonych wiązaniem wodorowym Si–OH; pasmo przy 808 cm^{-1} – symetryczne drgania rozciągające Si–O–Si w tetraedrach $[\text{SiO}_4]^{4-}$; pasmo przy 450 cm^{-1} – drgania zginające ugrupowań Si–O–Si (rysunek 4A,B).

W wyniku immobilizacji protein w widmie absorpcyjnym odnotowano charakterystyczne pasma białkowe (tzw. pasma amidowe) oraz nowe typy wiązań pomiędzy cząsteczką enzymu a powierzchnią krzemionki: (i) pasmo amidowe I – pochodzące od drgań rozciągających wiązania C=O szkieletu peptydowego w zakresie od 1600 cm^{-1} do 1700 cm^{-1} ($\sim 1658\text{ cm}^{-1}$ dla BSA/MCF-d16, $\sim 1657\text{ cm}^{-1}$ dla OVA/MCF-d16, $\sim 1653\text{ cm}^{-1}$ dla LYS/MCF-14,5); (ii) pasmo amidowe II – odpowiadające sprzężonym drganiom zginającym wiązania N–H i rozciągającym wiązania C–N grup peptydowych w zakresie od 1500 cm^{-1} do 1600 cm^{-1} ($\sim 1532\text{ cm}^{-1}$ dla BSA/MCF-d16, $\sim 1532\text{ cm}^{-1}$ dla OVA/MCF-d16 i $\sim 1531\text{ cm}^{-1}$ dla LYS/MCF-14,5); (iii) pasmo amidowe A – pochodzące od drgań rozciągających grupy N–H związanych wiązaniem wodorowym przy 2800 – 3300 cm^{-1} ($\sim 3291\text{ cm}^{-1}$ dla BSA/MCF-d16, $\sim 3297\text{ cm}^{-1}$ dla OVA/MCF-d16 i $\sim 3287\text{ cm}^{-1}$ dla LYS/MCF-14,5). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że po unieruchomieniu filmu białkowego na powierzchni nośnika stałego analiza spektroskopowa ATR FT-IR ujawniła inną strukturę chemiczną zaadsorbowanego białka – przesunięcie pasm amidowych I ($\sim 15\text{ cm}^{-1}$, $\sim 25\text{ cm}^{-1}$, $\sim 10\text{ cm}^{-1}$), amidowych II ($\sim 11\text{ cm}^{-1}$, $\sim 5\text{ cm}^{-1}$, $\sim 13\text{ cm}^{-1}$) i amidowych A ($\sim 11\text{ cm}^{-1}$, $\sim 17\text{ cm}^{-1}$, $\sim 8\text{ cm}^{-1}$) w widmie ATR FT-IR odpowiednio dla kompozytów BSA/MCF-d16, OVA/MCF-d16 i LYS/MCF-14,5 w kierunku wyższych wartości liczb falowych w stosunku do pasm amidowych zarejestrowanych dla czystych form natywnych białek. Zjawisko to najprawdopodobniej może być konsekwencją interakcji między biocząsteczką albuminy a porowatą powierzchnią krzemionki w wyniku osłabienia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych C=O \cdots H–N między łańcuchami białka i/lub wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych łańcucha tworzącego strukturę drugorzędową białka (α -helisę).



Rysunek 4. Widma ART FT-IR zarejestrowane dla albumin oraz materiału MCF przed i po adsorpcji cząsteczek białek [D2,D4].

Chemiczną naturę oddziaływań białka z powierzchnią porowatego nośnika wzbogacono o pomiary spektroskopowe XPS, które umożliwiły charakterystykę chemiczną poziomów energetycznych elektronów rdzenia atomowego danych pierwiastków tworzących strukturę materiału krzemionkowego (MCF-d16 i MCF-14,5) i bioadsorbentu (BSA, OVA i LYS) unieruchomionego na jej powierzchni poprzez uzyskanie informacji z warstwy powierzchniowej badanego układu. W celu potwierdzenia oddziaływań adsorbat-adsorbent wykonano analizę chemiczną stanu atomów pierwiastków i składu powierzchniowego badanego biomateriału definiując powstałe wiązania chemiczne i grupy funkcyjne w badanym kompozycie. W wyniku unieruchomienia białka na powierzchni adsorbentu MCF dla badanych układów BSA/MCF-d16, OVA/MCF-d16 [D2] i LYS/MCF-14,5 [D4] na widmach przeglądowych XPS oprócz sygnałów fotoemisyjnych typowych dla podłoża krzemionkowego MCF (tlen – O 1s zlokalizowany przy energii wiązania $\sim 532,5$ eV; węgiel – C 1s przy ~ 284 eV i krzem – Si 2p przy $\sim 103,5$ eV) pojawiły się charakterystyczne dla aminokwasów występujących w białku, linie spektralne fotoelektronów związane z pasmami przejść atomów: N 1s (~ 400 eV); C 1s (~ 285 eV); O 1s (~ 532 eV) i S 2p (~ 164 eV). Różnice we właściwościach chemicznych powierzchni w badanym kompozycie (BSA/MCF-d16, OVA/MCF-d16 i LYS/MCF14,5) scharakteryzowano przy użyciu procedury dekonwolucji/rozplotu (dopasowanie linii do kształtu piku) widm szczegółowych poszczególnych pierwiastków zarejestrowanych z dużą rozdzielczością. Po przeprowadzeniu procedury dekonwolucji pików na widmie XPS zaobserwowano następujące pasma przejść elektronowych: pasmo N 1s – występowanie azotu w dwóch stanach chemicznych przy energii wiązania ~ 400 eV i ~ 402 eV odpowiadające grupie aminowej C–NH₂ i amidowej –C(=O)–NH₂ w cząsteczce białka;⁴⁷ pasmo O 1s – wykazuje dwa rodzaje połączeń tlenowych przy energii ~ 531 eV i ~ 533 eV pochodzące od grup O=C–O, O=C–N (tlen wchodzący w skład ugrupowania peptydowego w białku) i wiązania C–OH;⁴⁸ pasmo C 1s – zdefiniowanie węgla w trzech stanach

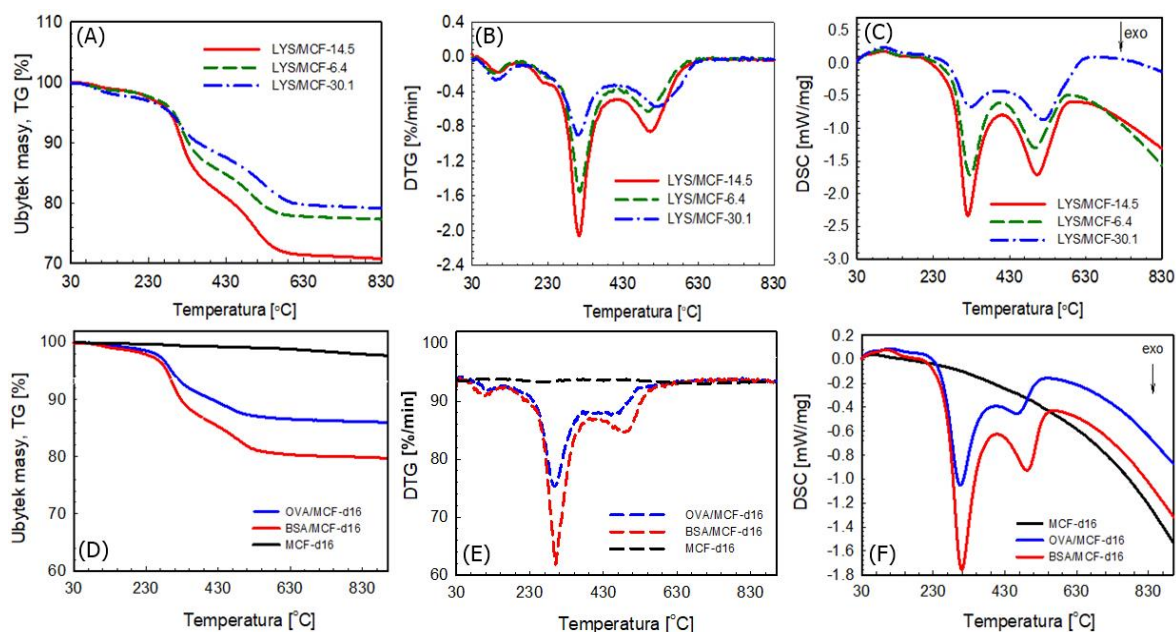
chemicznych przy energii wiązania ~ 285 eV, ~ 286 eV i 288 eV przypisane wiązaniami C–C/C–H, NH–CHR–CO (atom węgla w szkielecie części białkowej w łańcuchu polipeptydowym) i C(–O)–NH₂ (atom węgla w wiązaniu peptydowym proteiny);^{8,49} pasmo S 2p – podwójny dublet S 2p_{1/2} oraz S 2p_{3/2} przy energii wiązania ~ 164 eV i ~ 165 eV pochodzące od grup –SH i wiązań dwusiarczkowych pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasu siarkowego – cysteiny).⁵⁰

Interesujących informacji odnośnie właściwości fizykochemicznych i termicznych (stabilność materiału, kinetyka rozkładu, interakcja białko/porowaty nośnik, trwałość wiązania molekuly z powierzchnią, skład uwolnionych produktów gazowych) badanych materiałów (MCF-d16 i MCF-14,5) i biokompozytów (BSA/MCF-d16, OVA/MCF-d16 i LYS/MCF-14,5) pod wpływem zmian temperatury dostarczyła analiza termiczna TG/DSC wraz z analizą *in situ* gazowych produktów rozkładu emitowanych podczas dekompozycji termicznej badanego układu (sprzężone analizy TG/FTIR i TG/MS) [D2,D3]. Jednoczesna analiza TG/DSC/FTIR/MS ujawniła zupełnie inne właściwości termiczne porowatego materiału krzemionkowego po adsorpcji białek. Rozważane biokompozyty BSA/MCF-d16 i OVA/MCF-d16 [D2] oraz LYS/MCF-14,5 [D3] wykazywały stabilność termiczną w zakresie temperatur od 30 °C do 165 °C, natomiast powyżej 165 °C rozkład termiczny zachodził w dwóch głównych etapach w przedziale temperatur 165 °C – 420 °C i 420 °C – 900 °C. W przypadku badanych biokompozytów niewielki ubytek masy (od 0,7% do 2%) związany z usuwaniem fizycznie zaadsorbowanej wody zarówno z powierzchni białka jak i wody pochodzącej z kondensacji grup silanolowych odnotowano w początkowym etapie termicznej degradacji (proces endotermiczny) w zakresie od 30 °C do 165 °C (rysunek 5A,D,C,F). Desorpcję cząsteczek wody potwierdza również jednoczesna analiza FTIR i MS gazowych produktów rozkładu emitowanych w trakcie analizy TG (obecność pasm adsorpcyjnych na widmach TG/FTIR przy ~ 3736 cm⁻¹, ~ 3503 cm⁻¹, ~ 1760 cm⁻¹ – odpowiadające drganiom rozciągającym O–H w cząsteczce wody; obecność sygnału na widmie MS przy $m/z = 18$ dla H₂O) [D2,D3]. Wraz ze wzrostem temperatury na krzywej TG i DTG (rysunek 5A,B,D,E) odnotowano drugi etap procesu dekompozycji badanych biomateriałów w przedziale temperaturowym 165 °C – 420 °C (wyraźne minimum pików na krzywej DTG w zakresie temperatur 296 °C – 327 °C; ubytek masy w zakresie $\sim 9\%$ – $\sim 17\%$) odpowiadający termicznej degradacji enzymu – usuwanie słabo związanej albuminy z powierzchni materiału MCF (siły van der Waalsa). Kolejny proces termiczny (egzotermiczny) zaobserwowano w przedziale temperatur 420 °C – 830 °C (minimum pików na krzywej DTG w zakresie temperatur 450 °C – 520 °C; ubytek masy $\sim 4\%$ – $\sim 11\%$) związany z kontynuacją procesu degradacji pozostałości enzymu białkowego – usuwanie cząsteczek białek silnie związanych z powierzchnią materiału krzemionkowego (oddziaływania elektrostatyczne).⁵¹

Analiza gazowych produktów degradacji (identyfikacja jakościowa i ilościowa biomolekuł) badanych kompozytów BSA/MCF-d16, OVA/MCF-d16, LYS/MCF-14,5 sprzężonymi technikami pomiarowymi TG/MS i TG/FTIR dostarczyła informacji na temat mechanizmu rozkładu termicznego badanych biomateriałów [D2,D3]. Główne produkty gazowe uwalniane podczas dekompozycji termicznej badanych układów białko/MCF-d16 i białko/MCF-14,5 charakterystyczne dla biopolimerów to: (i) CH₃ – drgania rozciągające grup C–H (pasmo absorpcyjne na widmie FTIR przy 2896 cm⁻¹– 2972 cm⁻¹; sygnał przy $m/z = 15$ na widmie MS); (ii) NH₃ – symetryczne i asymetryczne drgania zginające N–H (pasmo przy 965 cm⁻¹ – 930 cm⁻¹ i 1620 cm⁻¹ – 1626 cm⁻¹; $m/z = 17$); (iii) CO₂ – asymetryczne drgania rozciągające i symetryczne drgania zginające molekuly CO₂ (pasma przy 2310 cm⁻¹ – 2330 cm⁻¹, 2350 cm⁻¹ – 2360 cm⁻¹ i 669 cm⁻¹; $m/z = 44$); (iv) HCN – drgania zginające HCN (pasmo przy 714 cm⁻¹; $m/z = 27$); (v) NO i NO₂ – drgania rozciągające wiązania N–O i drgania asymetryczne

rozciągające N=O (pasmo przy 1909 cm^{-1} i 1614 cm^{-1} ; $m/z = 30$ i 46); (vi) SO_2 – asymetryczne drgania rozciągające cząsteczki SO_2 (pasmo przy 1370 cm^{-1} ; $m/z = 27$) [D2,D3].

Generalnie zaobserwowano, że wzrost ilości zaadsorbowanych białek na powierzchni materiału MCF powoduje większy ubytek masy próbki podczas procesu ogrzewania badanych biomateriałów, obserwowany na krzywych TG. W przypadku materiału MCF-d16 (średnica porów odpowiednio $\sim 2,1$ i $\sim 2,7$ razy większa od średnicy hydrodynamicznej BSA i OVA) odnotowano większe zmiany stabilności termicznej materiału, jak również silniejsze oddziaływanie adsorbent/adsorbat po adsorpcji większej cząsteczki BSA (minima pików na krzywych DTG i DSC przesunięte w kierunku wyższych temperatur; wyższe wartości entalpii rozkładu) w porównaniu do adsorpcji albuminy jaja kurzego o mniejszej masie cząsteczkowej (rysunek 5B-F). Analiza termiczna potwierdziła również większą ilość zaadsorbowanego białka BSA na powierzchni krzemionki MCF-d16 (6,17% większy całkowity ubytek masy na krzywych TG; wzrost intensywności pasm absorpcji na widmach TG/FTIR i prądu jonowego na widmach TG/MS gazowych produktów rozkładu termicznego BSA w porównaniu do kompozytu OVA/MCF-d16 [D2]. Na uwagę zasługuje fakt, iż większe wartości entalpii rozkładu zaobserwowane dla kompozytu BSA/MCF-d16 ($\Delta H = -153,8\text{ J/g}$) w porównaniu do układu OVA/MCF-d16 ($\Delta H = -62,39\text{ J/g}$) mogą wskazywać na korzystniejsze oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe w albuminie [D2]. Przy analizie materiału krzemionkowego (MCF-14,5) o średnicy porów 3,6 razy większej od średnicy hydrodynamicznej lizozymu, analiza termooanalityczna wykazała, że całkowity ubytek masy po adsorpcji LYS na powierzchni hydrofilowego adsorbentu zwiększył się odpowiednio o $\sim 5,7\%$ i $\sim 9,4\%$ w stosunku do materiału MCF-6,4 z najmniejszymi porami (2,5 razy większe pory od średnicy cząsteczki lizozymu) i materiału z największymi porami MCF-30,1 (7,5 razy większe pory od średnicy biopolimeru) [D3]. Różnice w stabilności termicznej zaadsorbowanych polimerów (BSA, OVA i LYS) na mezostrukturalnych pianach krzemionkowych o zmiennych właściwościach strukturalno-powierzchniowych związane były najprawdopodobniej z denaturacją cieplną protein, zmianą konformacji w strukturze białek oraz zróżnicowaniem natury oddziaływań białko/krzemionka.



Rysunek 5. Znormalizowane krzywe TG (A,D), DTG (B,E) i DSC (C,F) zarejestrowane dla badanych materiałów MCF-14,5 po adsorpcji lizozymu i MCF-d16 po adsorpcji surowiczej albuminy wołowej i owoalbuminy [D2,D3].

VI.

PODSUMOWANIE

Proces immobilizacji albumin na różnych powierzchniach nośników stałych jest procesem wielofazowym, który zależy nie tylko od właściwości fizykochemicznych adsorbentu i warunków prowadzenia procesu adsorpcji, ale również od właściwości strukturalnych i powierzchniowych adsorbentu. Kluczowym parametrem wpływającym na adhezję i stabilność warstwy adsorpcyjnej białka na powierzchni materiału jest struktura, morfologia, porowatość i chropowatość podłoża materiału. Zatem, aby zwiększyć selektywność i efektywność adsorpcji oraz powinowactwo nośnika do adsorbowanych biocząsteczek istotna jest odpowiednia kontrola i modyfikacja powierzchni materiału na poziomie mikro- nanoskali.

Uporządkowane mezoporowate materiały krzemionkowe typu piany mezokomórkowej MCF, ze względu na swoje unikatowe właściwości fizykochemiczne i strukturalne (regularna i uporządkowana struktura wewnętrzna porów o ściśle określonych rozmiarach, dobrze rozwinięta powierzchnia właściwa, duża objętość i średnica porów, duża pojemność adsorpcyjna) oraz łatwość modyfikacji i funkcjonalizacji powierzchni na etapie syntezy, wydają się być interesującymi materiałami pod kątem opracowania nośników biomedycznych o zdefiniowanych właściwościach teksturalno-powierzchniowych na poziomie mikro- nanoskopowym.

Rozprawa doktorska zatytułowana „*Adsorpcja białek na powierzchni mezoporowatej krzemionki: analiza fizykochemiczna, strukturalna i morfologiczna biokompozytu*” obejmuje cykl czterech spójnie powiązanych tematycznie artykułów naukowych [D1-D4] poświęconych interpretacji procesu immobilizacji enzymów białkowych: *surowicza albumina wołowa*, *owoalbumina* i *lizozym*, na uporządkowanych zróżnicowanych teksturalnie materiałach krzemionkowych typu piany mezokomórkowej MCF oraz charakterystyce strukturalno-powierzchniowej biokompozytu białko/porowaty nośnik.

Istotną częścią badań była synteza mezokomórkowych pian MCF (projektowanie struktury porowatej już na etapie syntezy) o różnych właściwościach geometrycznych powierzchni oraz ocena ich struktury porowatej (powierzchnia właściwa, objętość porów, średnica porów) na podstawie niskotemperaturowej adsorpcji/desorpcji azotu, zmierzająca do zaprojektowania i wytworzenia modelowych powierzchni nośników porowatych, gdzie zjawisko adsorpcji biocząsteczek wpływa na użyteczność stosowanych urządzeń biomedycznych i biofizycznych.

Ważnym aspektem przeprowadzonych badań była również ocena mechanizmu adsorpcji białka oraz określenie optymalnych warunków immobilizacji biopolimeru na powierzchni

porowatej krzemionki. Celem wyboru optymalnego układu oraz określenia warunków przebiegu procesu adsorpcyjnego wyznaczono wielkość adsorpcji białek z równowagowych danych doświadczalnych, oraz przebadano kinetykę procesu ich adsorpcji.

Szczególną uwagę w cyklu publikacji [D1-D4] poświęcono analizie mikro- nanostruktury porowatej, morfologii, topografii powierzchni oraz ocenie chemicznego charakteru podłoża biokompozytu białko/porowaty adsorbent na poziomie molekularnym i atomowym, zmierzając do określenia mechanizmu i natury oddziaływań oraz wzajemnych korelacji między powierzchnią adsorbentu krzemionki a substancją adsorbowaną. W tym celu otrzymane materiały MCF oraz biokompozyty białko/porowata krzemionka przebadano przy zastosowaniu różnych technik pomiarowych: niskotemperaturowa adsorpcja azotu, spektrofotometria (UV-Vis DRS), spektroskopia (XPS, ATR FT-IR), dyfrakcja promieni rentgenowskich (XRD), profilometria optyczna (OP), mikroskopia sił atomowych (AFM), skaningowa i transmisyjna mikroskopia elektronowa (SEM, TEM) z mikroanalizą rentgenowską z dyspersją energii (EDX), miareczkowanie potencjometryczne, analiza elementarna (CHN), termogravimetria (TG, DTG, DSC) sprzężona ze spektrometrią mas (QMS).

Opublikowane prace mają duże znaczenie poznawcze dla rozwoju fizykochemii układów białkowych ze względu na brak w literaturze naukowo-specjalistycznej kompleksowych danych doświadczalnych i analizy dobrze zdefiniowanych układów białko/porowaty adsorbent. Uzyskane wyniki pozwalają na pełną charakterystykę układu adsorpcyjnego (białko/ciało stałe), oraz analizę wpływu parametrów fizykochemicznych powierzchni (porowatość, mikro-nanostruktura, morfologia, topografia, skład chemiczny, ładunek powierzchniowy, stabilność termiczna) porowatych ciał stałych na efektywność i szybkość procesu adsorpcji dużych makrocząsteczek.

Przedstawione w cyklu publikacji [D1-D4] badania obejmują następujące osiągnięcia naukowe:

- i. Otrzymanie serii mezoporowatych krzemionek typu MCF zróżnicowanych ze względu na średnice porów, objętości porów i powierzchnię właściwą jako efektywnych nośników dla wybranych białek [D1,D3].
- ii. Optymalizacja warunków procesu adsorpcji polegająca na doborze odpowiedniego adsorbentu i adsorbentu, umożliwiającą zaprojektowanie biokompozytu białkowo-krzemionkowego charakteryzującego się efektywnością dostosowaną do konkretnych zastosowań [D1,D3].
- iii. Określenie wpływu struktury porowatej mezokomórkowych pianek krzemionkowych oraz właściwości białek na efektywność i szybkość procesu immobilizacji biocząsteczek (wyznaczono izotermy adsorpcji i profile kinetyczne). Dokonano analizy wzajemnych relacji: wielkość porów, wielkość białka – pojemność adsorpcyjna, szybkość adsorpcji, gęstość filmu białkowego [D1,D3].
- iv. Charakterystyka właściwości materiału MCF oraz układu białko/MCF za pomocą różnorodnych metod badawczych zmierzająca do: określenia ich parametrów teksturalnych i geometrycznych (badania niskotemperaturowej adsorpcji/desorpcji azotu); oceny ich parametrów strukturalnych (badania XRD, TEM, SEM); ustalenia morfologii cząstek i oceny parametrów powierzchni (badania AFM, TEM, SEM, OP); wizualizacji i odwzorowania struktur powierzchniowych w układzie 2D i 3D (mikrografie, profilogramy, histogramy AFM i OP); analizy powierzchniowej

i objętościowej (miareczkowanie potencjometryczne, analiza elementarna, badania XPS, TEM/EDX, SEM/EDS); potwierdzenia wiązań chemicznych i grup funkcyjnych (badania XPS, UV-Vis DRS, ATR FT-IR); uzyskania informacji na temat jakościowego rozkładu przestrzennego biocząsteczek w badanym biokompozycie (analiza TEM/EDX – mapy rentgenowskie rozkładu stężenia pierwiastków C, O, N, S); określenia stabilności termicznej badanych układów adsorpcyjnych (badania termoanalityczne TG/DTG/DSC sprzężone z MS i FTIR) [D1-D4].

Takie interdyscyplinarne podejście do badań i analizy układu białko/porowaty nośnik dostarczyło ważnych informacji na temat fizykochemicznego charakteru powierzchni, zobrazowało ich mikro/nanostrukturę powierzchniową w skali atomowej oraz pozwoliło określić mechanizm interakcji biopolimeru z porowatym ciałem stałym.

Analiza procesu adsorpcji BSA, OVA i LYS na nośniku MCF o zróżnicowanej strukturze:

- Analiza właściwości adsorpcyjnych (wyznaczenie maksymalnej adsorpcji z równowagowych danych doświadczalnych) otrzymanych materiałów MCF w stosunku do adsorbowanych cząsteczek białek wykazała, że wielkość adsorpcji biomolekuł zależy od porowatości materiału MCF (wielkości porów krzemionki) oraz właściwości fizykochemicznych białek [D1,D3].
- Analiza kinetyki adsorpcji dla układów białko/MCF z zastosowaniem różnorodnych modeli i równań kinetycznych dowiodła zróżnicowanego przebiegu procesu immobilizacji białek. Stwierdzono, że proces unieruchomienia enzymów na powierzchni porowatego materiału jest stosunkowo powolny, limitowany dyfuzją biomolekuł do wewnętrznej struktury porowatej adsorbentu i wykazuje silny związek między wielkością porów materiału krzemionkowego a budową cząsteczkową protein [D1,D3].

Kompleksowa analiza fizykochemiczno-strukturalna materiału MCF oraz modelowego układu białko/MCF:

- Zsyntezowane materiały MCF charakteryzują się dużą powierzchnią właściwą ($250 \text{ m}^2/\text{g} - 720 \text{ m}^2/\text{g}$), zróżnicowaną średnicą porów (6 nm – 30 nm) i objętością porów ($0,12 \text{ cm}^3/\text{g} - 1,98 \text{ cm}^3/\text{g}$) z dobrze rozbudowaną i uporządkowaną nanostrukturą porów (badania sorpcji azotu, TEM, XRD) [D1,SD1,D3,SD3,D4].
- Adsorpcja warstw białkowych na adsorbencie MCF zmienia strukturę porowatą materiału – wartości parametrów geometrycznych powierzchni S_{BET} , V_t , V_{mez} , D_{hy} dla układu białko/MCF maleją wraz ze stopniem pokrycia powierzchni białkiem (badania sorpcji azotu) [D1,SD1,D3,SD3].
- Immobilizacja enzymów na powierzchni MCF prowadzi do wyraźnych zmian chemicznego charakteru powierzchni oraz stabilności termicznej adsorbentu. W wyniku immobilizacji protein na powierzchni materiału MCF zaobserwowano: charakterystyczne pasma białkowe: Amidowe I, II i A; wiązania chemiczne i grupy funkcyjne: O=C–O, O=C–N, HN–C(O)O/N–C=C, C–N, C–C, C–H, C=O, NH–CHR–CO, C–NH₂, –C(=O)–NH₂; pierwiastki chemiczne w różnych stosunkach masowych i atomowych: O, S, C, N, a także związki chemiczne powstałe wyniku degradacji termicznej bioukładu: CH₃, NH₃, CO₂, CN, NO, NO₂, SO₂ (badania: ATR

FT-IR, XPS, UV-Vis DRS, SEM/EDS, HRTEM/EDX, CHN, TG/DTG/DSC sprzężona z QMS i FTIR) [D1-D4].

- Osadzenie fazy białkowej na materiale MCF zmienia jego właściwości kwasowo-zasadowe oraz ładunek powierzchniowy – powierzchnie krzemionkowe z warstwą białek posiadają charakter amfifilowy; pH_{PZC} przesuwa się w kierunku wyższych wartości pH ; dominującą rolę w procesie adsorpcji biopolimerów odgrywają oddziaływania elektrostatyczne (badania: miareczkowanie potencjometryczne) [D1,D3].

Analiza morfologiczna i topograficzna powierzchni na poziomie mikro- i nanoskopowym materiału krzemionkowego MCF oraz materiału ze związaną fazą białek:

- Osadzenie białek na porowatym nośniku krzemionkowym zmienia strukturę morfologiczną powierzchni – cząsteczki białek w wyniku adsorpcji fizycznej tworzą ciągłą i upakowaną warstwę filmu białkowego na powierzchni krzemionki (SEM, TEM, AFM, OP) [D1-D4].
- Biokompozyty charakteryzują się gładszą i mniej falistą strukturą powierzchni – adsorpcja adsorbentu na powierzchni nośnika MCF powoduje redukcję parametrów falistości i chropowatości powierzchni nośnika krzemionkowego (badania AFM i profilometria optyczna) [D1,D4].
- Powierzchnia z warstwą białka jest bardziej homogeniczna a struktura powierzchni ze względu na ukształtowanie staje się bardziej regularna – immobilizacja białka na powierzchni porowatej krzemionki MCF powoduje równomierny rozkład przestrzenny pierwiastków C, O, N, S pochodzących z aminokwasów budujących białka na powierzchni próbki (badania TEM, SEM, mapy EDX rozkładu stężenia pierwiastków) [D1-D4].
- Cząsteczki białka adsorbują się zarówno na powierzchni ziarna jak i w uporządkowanej strukturze mezoporów materiału MCF czego odzwierciedleniem jest obniżona amplituda i zwiększona częstotliwość profili chropowatości powierzchni na profilogramie AFM i OP, a także zawężone funkcje rozkładu wysokości chropowatości powierzchni na histogramie AFM i OP w wyniku unieruchomienia enzymu na materiale krzemionkowym (badania AFM i profilometria optyczna) [D1,D4].

Przedstawiona w cyklu publikacji [D1–D4] analiza kompozytu białkowo-krzemionkowego, skupiająca się na interdyscyplinarnym podejściu do badań procesu adsorpcji różnych filmów proteinowych na zróżnicowanych teksturalnie mezokomórkowych piankach krzemionkowych dowiodła, że mechanizm interakcji białka z powierzchnią nośnika MCF w dużej mierze zależy od właściwości powierzchniowych i morfologicznych podłoża materiału (elektryczny ładunek powierzchniowy, chemizm powierzchni, porowatość, chropowatość, tekstura, morfologia, topografia), jak również od charakteru fizykochemicznego cząsteczek białek (budowa i rozmiar molekuly, stabilność struktury enzymu – zmiany konformacyjne i reorientacja cząsteczki na powierzchni).

VII.

BIBLIOGRAFIA

- [D1] Derylo-Marczewska, A.; Chrzanowska, A.; Marczewski, A.W. Morphological, structural and physicochemical characteristics of the surface of mesocellular silica foam with the adsorbed OVA and BSA proteins. *Microporous and Mesoporous Materials* **2020**, *293*, 109769.
- [D2] Chrzanowska, A.; Derylo-Marczewska, A. Mesoporous silica/protein biocomposites: Surface, topography, thermal properties. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *139*, 531–542.
- [D3] Chrzanowska, A.; Derylo-Marczewska, A.; Wasilewska, M. Mesocellular Silica Foams (MCFs) with Tunable Pore Size as a Support for Lysozyme Immobilization: Adsorption Equilibrium and Kinetics, Biocomposite Properties. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 5479.
- [D4] Chrzanowska, A.; Derylo-Marczewska, A.; Borowski, P. Comprehensive characterization of biocomposite surface based on the mesoporous silica and lysozyme molecules: Chemistry, morphology, topography, texture and micro-nanostructure. *Applied Surface Science* **2020**, *525*, 146512.
- [SD1] Supplementary material for the paper [D1].
- [SD3] Supplementary material for the paper [D3].
- [SD4] Supplementary material for the paper [D4].
1. Byon, H. R.; Choi, H. C. Network single-walled carbon nanotube-field effect transistors (SWNT-FETs) with increased Schottky contact area for highly sensitive biosensor applications. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, (7), 2188-2189.
 2. Farokhzad, O. C.; Langer, R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, (14), 1456-1459.
 3. Kasemo, B. Biological surface science. *Surface Science* **2002**, *500*, (1-3), 656-677.
 4. Kirkland, J. J.; Truskowski, F. A.; Ricker, R. D. Atypical silica-based column packings for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2002**, *965*, (1-2), 25-34.
 5. Giacomelli, C. E.; Norde, W. The adsorption-desorption cycle. Reversibility of the BSA-silica system. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, *233*, (2), 234-240.
 6. Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* **2011**, *162*, (1-2), 87-106.
 7. Moerz, S. T.; Huber, P. Protein Adsorption into Mesopores: A Combination of Electrostatic Interaction, Counterion Release, and van der Waals Forces. *Langmuir* **2014**, *30*, (10), 2729-2737.

8. Deligianni, D. D.; Katsala, N.; Ladas, S.; Sotiropoulou, D.; Amedee, J.; Missirlis, Y. F. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* **2001**, *22*, (11), 1241-1251.
9. Corma, A. From microporous to mesoporous molecular sieve materials and their use in catalysis. *Chemical Reviews* **1997**, *97*, (6), 2373-2419.
10. Huo, Q. S.; Margolese, D. I.; Stucky, G. D. Surfactant control of phases in the synthesis of mesoporous silica-based materials. *Chemistry of Materials* **1996**, *8*, (5), 1147-1160.
11. Yanagisawa, T.; Shimizu, T.; Kuroda, K.; Kato, C. The preparation of alkyltrimethylammonium-kanemite complexes and their conversion to microporous materials. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1990**, *63*, (4), 988-992.
12. Kimura, T.; Saeki, S.; Sugahara, Y.; Kuroda, K. Organic modification of FSM-type mesoporous silicas derived from kanemite by silylation. *Langmuir* **1999**, *15*, (8), 2794-2798.
13. Zhao, D. Y.; Huo, Q. S.; Feng, J. L.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, (24), 6024-6036.
14. Zhao, D. Y.; Feng, J. L.; Huo, Q. S.; Melosh, N.; Fredrickson, G. H.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science* **1998**, *279*, (5350), 548-552.
15. Bagshaw, S. A.; Prouzet, E.; Pinnavaia, T. J. Templating of mesoporous molecular-sieves by nonionic polyethylene oxide surfactants. *Science* **1995**, *269*, (5228), 1242-1244.
16. Kwon, O. Y.; Kim, S.; Choi, S. W. Synthesis of mesoporous molecular sieves - Hydrolysis of H₂SiF₆ by a non-ionic polyethyleneoxide surfactant template. *Microporous and Mesoporous Materials* **1999**, *27*, (2-3), 255-259.
17. Yu, C. Z.; Tian, B. Z.; Fan, J.; Stucky, G. D.; Zhao, D. Y. Salt effect in the synthesis of mesoporous silica templated by non-ionic block copolymers. *Chemical Communications* **2001**, (24), 2726-2727.
18. Tanev, P. T.; Chibwe, M.; Pinnavaia, T. J. Titanium-containing mesoporous molecular-sieves for catalytic-oxidation of aromatic-compounds. *Nature* **1994**, *368*, (6469), 321-323.
19. Ryoo, R.; Kim, J. M.; Ko, C. H.; Shin, C. H. Disordered molecular sieve with branched mesoporous channel network. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, (45), 17718-17721.
20. Hartmann, M. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. *Chemistry of Materials* **2005**, *17*, (18), 4577-4593.
21. Chen, S.; Sun, S. A.; Zhang, X. Q.; Han, Q.; Yang, L.; Ding, M. Y. Synthesis of large-pore mesostructured cellular foam silica spheres for the adsorption of biomolecules. *Journal of Separation Science* **2014**, *37*, (17), 2411-2417.
22. Lin, C. Y.; Yang, C. M.; Linden, M. Influence of serum concentration and surface functionalization on the protein adsorption to mesoporous silica nanoparticles. *Rsc Advances* **2019**, *9*, (58), 33912-33921.
23. Ran, R. X.; You, L. J.; Di, B.; Hao, W. Q.; Su, M. X.; Yan, F.; Huang, L. L. A novel chiral mesoporous binaphthyl-silicas: Preparation, characterization, and application in HPLC. *Journal of Separation Science* **2012**, *35*, (15), 1854-1862.
24. Katiyar, A.; Yadav, S.; Smirniotis, P. G.; Pinto, N. G. Synthesis of ordered large pore SBA-15 spherical particles for adsorption of biomolecules. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1122*, (1-2), 13-20.
25. Nguyen, T. P. B.; Lee, J. W.; Shim, W. G.; Moon, H. Synthesis of functionalized SBA-15 with ordered large pore size and its adsorption properties of BSA. *Microporous and Mesoporous Materials* **2008**, *110*, (2-3), 560-569.
26. Ma, Z. F.; Bai, J.; Wang, Y. C.; Jiang, X. Impact of Shape and Pore Size of Mesoporous Silica Nanoparticles on Serum Protein Adsorption and RBCs Hemolysis. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6*, (4), 2431-2438.

27. Hudson, S.; Cooney, J.; Magner, E. Proteins in Mesoporous Silicates. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, (45), 8582-8594.
28. Russo, P. A.; Carrott, M.; Mourao, P. A. M.; Carrott, P. J. M. Tailoring the surface chemistry of mesocellular foams for protein adsorption. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, *386*, (1-3), 25-35.
29. Essa, H.; Magner, E.; Cooney, J.; Hodnett, B. K. Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2007**, *49*, (1-4), 61-68.
30. Han, Y. J.; Watson, J. T.; Stucky, G. D.; Butler, A. Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2002**, *17*, (1), 1-8.
31. Vinu, A.; Murugesan, V.; Tangermann, O.; Hartmann, M. Adsorption of cytochrome c on mesoporous molecular sieves: Influence of pH, pore diameter, and aluminum incorporation. *Chemistry of Materials* **2004**, *16*, (16), 3056-3065.
32. Diao, X. A.; Wang, Y. J.; Zhao, J. Q.; Zhu, S. L. Effect of Pore-size of Mesoporous SBA-15 on Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme Protein. *Chinese Journal of Chemical Engineering* **2010**, *18*, (3), 493-499.
33. Elofsson, U. M.; Paulsson, M. A.; Arnebrant, T. Adsorption of beta-lactoglobulin A and B: Effects of ionic strength and phosphate ions. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **1997**, *8*, (3), 163-169.
34. Wahlgren, M.; Elofsson, U. Simple models for adsorption kinetics and their correlation to the adsorption of beta-lactoglobulin A and B. *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, *188*, (1), 121-129.
35. Kalasin, S.; Santore, M. M. Non-specific adhesion on biomaterial surfaces driven by small amounts of protein adsorption. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2009**, *73*, (2), 229-236.
36. Andersen, C. J. Bioactive Egg Components and Inflammation. *Nutrients* **2015**, *7*, (9), 7889-7913.
37. Ralla, K.; Sohling, U.; Riechers, D.; Kasper, C.; Ruf, F.; Scheper, T. Adsorption and separation of proteins by a smectitic clay mineral. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2010**, *33*, (7), 847-861.
38. Sener, G.; Ozgur, E.; Yilmaz, E.; Uzun, L.; Say, R.; Denizli, A. Quartz crystal microbalance based nanosensor for lysozyme detection with lysozyme imprinted nanoparticles. *Biosensors & Bioelectronics* **2010**, *26*, (2), 815-821.
39. Derylo-Marczewska, A.; Marezewski, A. W.; Skrzypek, I.; Pikus, S. Effect of block copolymer type on formation of mesoporous silica structure. *Polish Journal of Chemistry* **2008**, *82*, (1-2), 205-212.
40. Kruk, M.; Jaroniec, M.; Ryoo, R.; Kim, J. M. Monitoring of the structure of siliceous mesoporous molecular sieves tailored using different synthesis conditions. *Microporous Materials* **1997**, *12*, (1-3), 93-106.
41. Jaroniec, M.; Kruk, M.; Olivier, J. P. Standard nitrogen adsorption data for characterization of nanoporous silicas. *Langmuir* **1999**, *15*, (16), 5410-5413.
42. Deboer, J. H.; Linsen, B. G.; Osinga, T. J. Studies on pore systems in catalysts .6. universal t curve. *Journal of Catalysis* **1965**, *4*, (6), 643-&.
43. Norde, W.; Macritchie, F.; Nowicka, G.; Lyklema, J. Protein adsorption at solid liquid interfaces - reversibility and conformation aspects. *Journal of Colloid and Interface Science* **1986**, *112*, (2), 447-456.
44. Andrade, J. D.; Hlady, V.; Wei, A. P. Adsorption of complex proteins at interfaces. *Pure and Applied Chemistry* **1992**, *64*, (11), 1777-1781.
45. Arvidsson, A.; Currie, F.; Kjellin, P.; Sul, Y. T.; Stenport, V. Nucleation and growth of calcium phosphates in the presence of fibrinogen on titanium implants with four potentially bioactive surface preparations. An in vitro study. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2009**, *20*, (9), 1869-1879.
46. Voicescu, M.; El Khoury, Y.; Martel, D.; Heinrich, M.; Hellwig, P. Spectroscopic Analysis of Tyrosine Derivatives: On the Role of the Tyrosine-Histidine Covalent

- Linkage in Cytochrome c Oxidase. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, (40), 13429-13436.
47. Advincula, M.; Fan, X. W.; Lemons, J.; Advincula, R. Surface modification of surface sol-gel derived titanium oxide films by self-assembled monolayers (SAMS) and non-specific protein adsorption studies. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2005**, *42*, (1), 29-43.
48. Iucci, G.; Polzonetti, G.; Infante, G.; Rossi, L. XPS and FT-IR spectroscopy study of albumin adsorption on the surface of a pi-conjugated polymer film. *Surface and Interface Analysis* **2004**, *36*, (8), 724-728.
49. Lebugle, A.; Subirade, M.; Gueguen, J. Structural characteristics of a globular protein investigated by x-ray photoelectron-spectroscopy - comparison between a legumin film and a powdered legumin. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1995**, *1248*, (2), 107-114.
50. Nelson, G. W.; Perry, M.; He, S. M.; Zechel, D. L.; Horton, J. H. Characterization of covalently bonded proteins on poly(methyl methacrylate) by X-ray photoelectron spectroscopy. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2010**, *78*, (1), 61-68.
51. Wisniewska, M.; Szewczuk-Karpisz, K.; Sternik, D. Adsorption and thermal properties of the bovine serum albumin-silicon dioxide system. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2015**, *120*, (2), 1355-1364.

Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych stanowiących podstawę postępowania doktorskiego

LISTA PUBLIKACJI NAUKOWYCH

- [D1] Derylo-Marczewska, A.; **Chrzanowska, A.**; Marczewski, A.W. Morphological, structural and physicochemical characteristics of the surface of mesocellular silica foam with the adsorbed OVA and BSA proteins. *Microporous and Mesoporous Materials* **2020**, *293*, 109769.
- [D2] **Chrzanowska, A.**; Derylo-Marczewska, A. Mesoporous silica/protein biocomposites: Surface, topography, thermal properties. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *139*, 531–542.
- [D3] **Chrzanowska, A.**; Derylo-Marczewska, A.; Wasilewska, M. Mesocellular Silica Foams (MCFs) with Tunable Pore Size as a Support for Lysozyme Immobilization: Adsorption Equilibrium and Kinetics, Biocomposite Properties. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 5479.
- [D4] **Chrzanowska, A.**; Derylo-Marczewska, A.; Borowski, P. Comprehensive characterization of biocomposite surface based on the mesoporous silica and lysozyme molecules: Chemistry, morphology, topography, texture and micro-nanostructure. *Applied Surface Science* **2020**, *525*, 146512.

WYKAZ KONFERENCJI NAUKOWYCH

Osiągnięcia naukowo-badawcze, w ramach których propagowano zagadnienia oraz tematykę badawczą związaną z cyklem postępowania doktorskiego, upowszechniłam na licznych konferencjach międzynarodowych i krajowych oraz seminariach naukowych w formie wystąpień

ustnych i plakatów. Wystąpienia konferencyjne oznaczono numerami **W1 – W9** (komunikaty – wystąpienia ustne) oraz **P1 – P25** (plakaty naukowe).

Na konferencjach naukowych, w roli prelegenta wygłosiłam **9 komunikatów ustnych** oraz przedstawiłam **25 plakatów**, w tym:

- **4 wystąpienia** ustne na konferencjach międzynarodowych,
- **12 plakatów** (posterów) na konferencjach międzynarodowych,
- **5 wystąpień** ustnych na konferencjach krajowych,
- **13 plakatów** (posterów) na konferencjach krajowych.

Konferencje międzynarodowe:

- [W1] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Marczewski, A.W.; Sęczkowska, M. „*Analysis of structure and morphology of the MCF surface with adsorbed protein molecules*”. Ukrainian Conference with International Participation "Chemistry, physics and technology of surface" devoted to the 30th anniversary of the founding of Chuiko Institute of Surface Chemistry of NAS of Ukraine and Workshop "Nanostructured biocompatible/bioactive materials", 17-18 May 2016, Kiev (Ukraine).
- [W2] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Lysozyme adsorption on mesocellular silica foam: analysis of morphology and micro-nanostructure of the surface*”. XV Ukrainian-Polish Symposium Theoretical and Experimental Studies of Interfacial Phenomena and Their Technological Applications Simultaneously with 2nd Nanobiomat Conference Nanostructured Biocompatible/Bioactive Materials, 12-15 September 2016, Lviv (Ukraine).
- [W3] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Marczewski, A.W.; Sęczkowska, M. „*Structural and surface properties of biocomposite protein/mesoporous silica*”. Chemistry, Physics and Technology of Surface and Workshop Nanostructured Biocompatible/Bioactive Materials, 24-25 May 2017, Kiev (Ukraine).
- [W4] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Structural and morphological characterization of the MCF silica surface covered by protein molecules*”. 16th International Workshop for Young Scientists “BioPhysSpring 2017”, 1-3 June 2017, Lublin (Poland).
- [P1] Deryło-Marczewska, A.; **Chrzanowska A.**; Marczewski, A.W.; Zienkiewicz-Strzałka, M. „*Effect of albumin sorption on surface and structural properties of mesoporous silicas*”. Fourteenth Polish-Ukrainian Symposium on Theoretical and Experimental Studies of Interface Phenomena and Their Technological Applications, 9-13 September 2014, Zakopane (Poland).
- [P2] Deryło-Marczewska, A.; **Chrzanowska A.**; Marczewski, A.W.; Sęczkowska, M. „*Morphological and structural investigation of the MCF surface with the adsorbed protein molecules*”. XXXIX Międzynarodowe Seminarium Naukowo Techniczne “Chemistry for Agriculture”, 23-26 November 2014, Karpacz (Poland).
- [P4] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Marczewski, A.W.; Sęczkowska, M. „*Surface properties of mesocellular silica foam (MCF) covered by the adsorbed protein layers*”. Suspensions – designing, synthesis, properties, application (SUSPENS), 25 September 2015, Cracow (Poland).

- [P5] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Marczewski, A.W.; Sęczkowska, M. „*Synthesis, characterization and structural properties of mesoporous silicas for adsorption of biomolecules*”. Membrane and Sorption Processes and Technologies, National University Kyiv-Mohyla Academy, 2-4 December 2015, Kyiv (Ukraine).
- [P6] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Marczewski, A.W.; Sęczkowska, M. “*Detailed analysis of morphology and micro-nanostructure of the MCF surface with adsorbed protein layers*”. Membrane and Sorption Processes and Technologies, National University Kyiv-Mohyla Academy, 2-4 December 2015, Kyiv (Ukraine).
- [P7] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Marczewski, A.W.; Sęczkowska, M. “*Synthesis and characterization of MCF with tunable porous structure for immobilization of biopolymers*”. Ukrainian Conference with International Participation "Chemistry, physics and technology of surface" devoted to the 30th anniversary of the founding of Chuiko Institute of Surface Chemistry of NAS of Ukraine and Workshop "Nanostructured biocompatible/bioactive materials", 17-18 May 2016, Kyiv (Ukraine).
- [P8] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Controlling the pore size and structural properties of mesoporous silicas for protein adsorption*”. XV Ukrainian-Polish Symposium Theoretical and Experimental Studies of Interfacial Phenomena and Their Technological Applications Simultaneously with 2nd Nanobiomat Conference Nanostructured Biocompatible/Bioactive Materials, 12-15 September 2016 Lviv (Ukraine).
- [P9] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M.; “*UV-Vis DRS and ATR-FTIR spectroscopic studies of porous MCF silica surface with adsorbed lysozyme*”. Chemistry, Physics and Technology of Surface and Workshop Nanostructured Biocompatible/Bioactive Materials, 24-25 May, 2017, Kyiv (Ukraine).
- [P10] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. “*Biopolymer/porous silica support: spectroscopic characteristics of biocomposite surface*”. Ukrainian Conference with International Participation “Chemistry, Physics and Technology of Surface”, 23-24 May 2018, Kiev (Ukraine).
- [P11] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. “*Structural and morphological analysis of biocomposite surface of lysozyme/silica system*”. 16-th Polish-Ukrainian Symposium on Theoretical and Experimental Studies of Interfacial Phenomena and Their Technological Applications, 28-31 August 2018, Lublin (Poland).
- [P12] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. “*Geometrical properties of MCF supports and albumin adsorption studies*”. 10-th Int. Symp. on Effects of Surface Heterogeneity in Adsorption and Catalysis on Solids (ISSHAC), 28-31 August 2018, Lublin (Poland).

Konferencje krajowe:

- [W5] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Spektrofotometryczna analiza równowagi i kinetyki adsorpcji białek na porowatych materiałach krzemionkowych*”. III Forum Młodych Przyrodników, 21 maj 2016, Lublin (Polska).
- [W6] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Adsorpcja lizozymu na porowatych materiałach krzemionkowych (MCF): analiza morfologii i mikro-*

- nanostruktury powierzchni*". 59 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 19-23 wrzesień 2016, Poznań (Polska).
- [W7] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Analiza właściwości strukturalnych i powierzchniowych biokompozytu białko/mezoporowaty nośnik*”. Fizykochemia granic faz – metody instrumentalne, 23-26 kwiecień 2017, Lublin (Polska).
- [W8] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Enzym/porowaty nośnik: preparatyka, charakterystyka i zastosowanie*”. IV Forum Młodych Przyrodników, 27 maj 2017, Lublin (Polska).
- [W9] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Ocena morfologii i struktury geometrycznej powierzchni warstw białkowych na mezoporowatym nośniku stałym*”. 60 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, 17-21 wrzesień 2017, Wrocław (Polska).
- [P13] Deryło-Marczewska, A.; **Chrzanowska, A.**; Zienkiewicz-Strzałka, M.; Marczewski, A.W.; Marecka, A. „*Badania procesu adsorpcji białek na mezoporowatych materiałach krzemionkowych - kinetyka i równowaga adsorpcji*”. 56 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, 16-20 wrzesień 2013, Siedlce (Polska).
- [P14] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Strukturalne i morfologiczne właściwości powierzchni mezoporowatych adsorbentów krzemionkowych z warstwą biopolimerów*”. III Forum Młodych Przyrodników, 21 maj 2016, Lublin (Polska).
- [P15] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Analiza procesu adsorpcji białek na materiałach mezoporowatych: kinetyka i równowaga adsorpcji*”. XIII Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików "ChemSession'16", 10 czerwiec 2016, Warszawa (Polska).
- [P16] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Spektroskopowa i mikroskopowa analiza struktury powierzchni białko/mezoporowaty nośnik*”. Obrazowanie FTIR w mikro- i nanoskali: Struktura molekularna a jej dystrybucja przestrzenna, 16-17 czerwiec 2016, Kraków (Polska).
- [P17] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Marczewski, A.W.; Sęczkowska, M. „*Mikroskopowa i spektrofotometryczna analiza procesu adsorpcji wybranych białek na porowatych adsorbentach krzemionkowych*”. 59 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 19- 23 wrzesień 2016, Poznań (Polska).
- [P18] **Chrzanowska A.**; Deryło- Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Wykorzystanie spektroskopii UV-Vis oraz mikroskopii TEM w analizie struktury powierzchni materiałów krzemionkowych z warstwą biopolimeru*”. Seminarium "Samoorganizacja, mikroskopia, spektroskopia", 06-07 październik 2016, Kraków (Polska).
- [P19] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Charakterystyka strukturalna i powierzchniowa mezoporowatych materiałów krzemionkowych*”. Fizykochemia granic faz metody instrumentalne 23-26 kwiecień 2017, Lublin (Polska).
- [P20] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „*Spektroskopowa i mikroskopowa analiza powierzchni porowatych nośników krzemionkowych*”. IV Forum Młodych Przyrodników, 27 maj 2017, Lublin (Polska).

- [P21] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M.; Nowicka, A. „Mezoporowate materiały krzemionkowe: synteza, charakterystyka i właściwości”. 60 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, 17-21 wrzesień 2017, Wrocław (Polska).
- [P22] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „Spektrofotometryczna (*Uv- vis DRS*) i spektroskopowa (*FTIR*) analiza powierzchni układu enzym/porowaty nośnik”. 60 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, 17-21 wrzesień 2017, Wrocław (Polska).
- [P23] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „Właściwości strukturalne, morfologiczne i termiczne układu biokompozytu na bazie porowatej krzemionki i biopolimeru”. 60 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, 17-21 wrzesień 2017, Wrocław (Polska).
- [P24] **Chrzanowska A.**; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M. „Materiały krzemionkowe nowej generacji: charakterystyka i zastosowanie”. V Forum Młodych Przyrodników "Rolnictwo - Żywność - Zdrowie", 26 Maj 2018, Lublin (Polska).
- [P25] Sęczkowska, M.; Deryło-Marczewska, A.; **Chrzanowska A.** „Badanie wpływu modyfikacji uporządkowanych mezoporowatych materiałów krzemionkowych na adsorpcję białka. V Forum Młodych Przyrodników "Rolnictwo - Żywność - Zdrowie", 26 Maj 2018, Lublin (Polska).

NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

Nagrody i wyróżnienia w zakresie działalności naukowej w ramach których zaprezentowałam zagadnienia i tematykę badawczą związaną z cyklem postępowania doktorskiego oznaczono numerami **N1-N4**.

- [N1] Award for the first best oral presentation: “*Lysozyme adsorption on mesocellular silica foam: analysis of morphology and micro-nanostructure of the surface*”. National Academy of Sciences of Ukraine, XV Ukrainian-Polish Symposium Theoretical and Experimental Studies of Interfacial Phenomena and Their Technological Applications Simultaneously with 2nd Nanobiomat Conference Nanostructured Biocompatible/Bioactive Materials, 12- 15 September 2016, Lviv (Ukraine).
- [N2] Pierwsza nagroda za najlepszy plakat naukowy w sekcji Polimery i Biopolimery: „*Mikroskopowa i spektrofotometryczna analiza procesu adsorpcji wybranych białek na porowatych adsorbentach krzemionkowych*”. 59 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 19-23 wrzesień 2016, Poznań (Polska).
- [N3] Award for the first best oral presentation: “*Structural an surface properties of biocomposite protein/mesoporous silica*”. National Academy of Sciences of Ukraine, Ukrainian Conference with International participation Chemistry, Physics and Technology of Surfce and Workshop Nanostructured Biocompatible/Bioactive Materials, 24-25 May 2017, Kyiv (Ukraine).
- [N4] Nagroda Rektora UMCS za wysoko punktowany artykuł naukowy (Liczba punktów MNiSzW: 140):

- **Chrzanowska, A.**; Derylo-Marczewska, A.; Wasilewska, M. Mesocellular Silica Foams (MCFs) with Tunable Pore Size as a Support for Lysozyme Immobilization: Adsorption Equilibrium and Kinetics, Biocomposite Properties. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 5479.
- **Chrzanowska, A.**; Derylo-Marczewska, A.; Borowski, P. Comprehensive characterization of biocomposite surface based on the mesoporous silica and lysozyme molecules: Chemistry, morphology, topography, texture and micro-nanostructure. *Applied Surface Science* **2020**, *525*, 146512.

PROJEKTY I STAŻE NAUKOWE

Udział w grantie międzynarodowym oznaczono numerem **G1**. Odbycie stażu naukowego w jednostce międzynarodowej oznaczono **S1**. Pozyskanie dotacji celowej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w formie grantu na badania naukowe służące rozwojowi młodych naukowców z funduszu młodych naukowców Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie oznaczono numerami **DC1-DC2**.

[G1] Wykonawca: projekt „NanoBioMat” - European Community's Seventh Framework Programme (FP-7-PEOPLE-2013-IRSES) under a Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme, Grant Agreement No PIRSES-GA-2013-612484, Nanostructured Biocompatible/Bioactive Materials, NanoBioMat (1.01.2014–31.12.2017).

[S1] Staż naukowy: Instytut Chemii Powierzchni im. O.O. Chuiko Narodowej Akademii Nauk Ukrainy w Kijowie (lipiec 2017 r. -1 miesiąc, lipiec 2018r. -1 miesiąc).

[DC1] Dotacja: pozyskanie dofinansowania w ramach dotacji celowej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na Wydziale Chemii UMCS w ramach konkursu wydziałowego na temat : „*Analiza procesu adsorpcji białek na materiałach mezoporowatych: wpływ wielkości porów i struktury powierzchni adsorbenta*”, 2016, Lublin.

[DC2] Dotacja: pozyskanie dofinansowania w ramach dotacji celowej na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na Wydziale Chemii UMCS w ramach konkursu wydziałowego na temat: „*Strukturalne i morfologiczne właściwości powierzchni mezoporowatych adsorbentów krzemionkowych z warstwą biopolimeru*”, 2017, Lublin.

Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze nie wchodzące do cyklu rozprawy doktorskiej

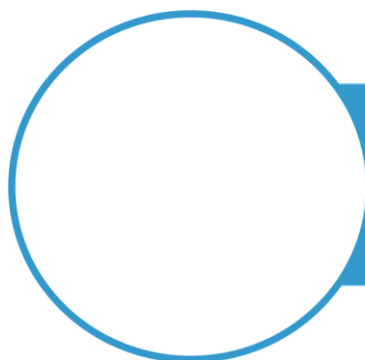
INNE PUBLIKACJE: CZASOPISMA Z LISTY A MNiSW

1. Talik, A.; Tarnacka, M.; Geppert-Rybczyńska, M.; Hachuła, B.; Bernat, R.; **Chrzanowska, A.**; Kaminski, K.; Paluch, M. Are hydrogen supramolecular structures being suppressed upon nanoscale confinement? The case of monohydroxy alcohols. *Journal of Colloid and Interface Science* **2020**, *576*, 217-229.
2. **Chrzanowska, A.**; Mroczka, R.; Florek, M. Effect of interaction between dodecyltrimethylammonium chloride (DTAC) and bis(3-sulphopropyl) disulphide (SPS) on the morphology of electrodeposited copper. *Electrochimica Acta* **2013**, *106*, 49-62.
3. **Chrzanowska, A.**; Mroczka, R. Influence of chloride anions and polyethylene glycol on the morphology of electrodeposited copper layers. *Electrochimica Acta* **2012**, *78*, 316-323.
4. Zawala, J.; Todorov, R.; **Olszewska, A.**; Exerowa, D.; Malysa, K. Influence of pH of the BSA solutions on velocity of the rising bubbles and stability of the thin liquid films and foams. *Journal of the International Adsorption Society- Adsorption* **2010**, *16*, 423-435.

INNE PUBLIKACJE: CZASOPISMA I MONOGRAFIE

5. Więclaw, K.; **Olszewska, A.**; Paluch, M.; Korchowicz, B. „A study of mixed Langmuir monolayers of synthetic glycolipid and sterols: ergosterol and stigmasterol. *Surfactant and dispersed systems in theory and practice*”, pod redakcją prof. Kazimiery Anny Wilk, 22-24.05.2007, Książ, ISBN: 83-7076-125-9, str. 377-380.
6. Fornal, E.; Stachniuk, A.; Mroczka, R.; **Chrzanowska, A.** „Zastosowanie tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową w kontroli jakości żywności”. *Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*”, pod redakcją prof. dr hab. Z. Hubickiego, 12-14.06.2012, Lublin, ISBN: 978-83-77-84-086-3, str. 445.
7. Fornal, E.; **Chrzanowska, A.**; Stachniuk, A.; Szmagara, A.; Zięba, E.; Żukiewicz-Sobczak, W. „Wykrywanie i identyfikacja leków i substancji lekopodobnych w produktach z niezadeklarowaną ich obecnością metodą wysokorozdzielczej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową”, *Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce nowe wyzwania i możliwości*, pod redakcją prof. dr hab. Zbigniewa Hubickiego, 04-06.06.2013, Lublin, ISBN 978-83-937272-0-9, str. 910.
8. Fornal, E.; Stachniuk, A.; Mroczka, R.; **Chrzanowska, A.**; Zięba, E. „Zastosowanie tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową w kontroli jakości żywności”, *LAB Laboratoria, aparatura, badania 2* (2013) 18, ISSN: 1427-5619, str.6.
9. Marczewski, A.W.; Deryło-Marczewska, A.; Sęczkowska, M.; **Chrzanowska, A.** „Równowaga i kinetyka adsorpcji związków aromatycznych na węglach i innych materiałach porowatych – teoria i praktyka”. *Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, pod redakcją prof. dr hab. Zbigniewa Hubickiego, 07-09.06.2016, Lublin, ISBN: 978-83-945225-0-6, str. 743.

10. Sęczkowska, M.; Marczewski, A.W.; Deryło-Marczewska, A.; **Chrzanowska, A.** „Kinetyka adsorpcji 4-nitrofenolu na węglu aktywnym z roztworów wodnych – wpływ szybkości mieszania”. *Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, pod redakcją prof. dr hab. Zbigniewa Hubickiego, 21-23.06.2017, Lublin, ISBN: 978-83-945225-3-7, str. 556.
11. Sęczkowska, M.; Pasek, A.; Deryło –Marczewska, A.; **Chrzanowska, A.** ”Synteza oraz badanie właściwości strukturalnych i adsorpcyjnych mezoporowatych materiałów krzemionkowych domieszkowanych jonami metalu”. *Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, pod redakcją prof. dr hab. Zbigniewa Hubickiego, 26-28.06.2018, Lublin, ISBN: 978-83-945225-0-6, str. 467.
12. Sęczkowska, M.; Marczewski, A.W.; Deryło-Marczewska; A.; **Chrzanowska, A.** ”Badania kinetyki adsorpcji błękitu metylowego na węglu aktywnym z wykorzystaniem spektrofotometrii UV-Vis”. *Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, pod redakcją prof. dr hab. Zbigniewa Hubickiego, 26-28.06.2018, Lublin, ISBN: 978-83-945225-0-6, str. 471.



ORYGINALNE PRACE NAUKOWE

PUBLIKACJA [D1]



Contents lists available at ScienceDirect

Microporous and Mesoporous Materials

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/micromeso>

Morphological, structural and physicochemical characteristics of the surface of mesocellular silica foam with the adsorbed OVA and BSA proteins

Anna Deryło-Marczewska^{*}, Agnieszka Chrzanowska, Adam W. Marczewski

Maria Curie-Skłodowska University, M. Curie-Skłodowska Sq. 3, 20-031, Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Proteins
mesocellular silica foam MCF
Structure, Surface morphology
Adsorption equilibria and kinetics

ABSTRACT

The present work presents studies on the morphology and structure properties of the mesocellular silica foam (MCF) with the adsorbed proteins, i.e. bovine serum albumin and ovalbumin. The equilibrium and kinetic measurements of albumin sorption were carried out. Several techniques were applied for investigation of surface, structural, morphological properties of the MCF material without and with the adsorbed protein (potentiometric titration, UV-Vis diffuse reflectance spectroscopy, nitrogen adsorption/desorption, atomic force microscopy, optical profilometer, transmission electron microscopy, and energy dispersive X-ray spectroscopy). Stronger and quicker adsorption was observed for larger BSA molecules in the case of MCF support with larger pores, which may be correlated with its conformational change or reorientation. The change of electrochemical properties into amphiphilic was found after protein adsorption, pH_{pZC} was moved towards higher pH values. The silica surface after albumin adsorption became less porous and rough, smoother and more homogeneous in comparison to the pure silica. TEM and UV-Vis DRS techniques confirmed the structure and presence of the adsorbed proteins on MCF material.

1. Introduction

In the past few years an increased interest in the processes of biomolecules adsorption, such as proteins, drugs or enzymes from solutions on solid surfaces is observed. The protein interaction with solid surfaces is not only a fundamental phenomenon with implications for nanotechnology, biomaterials, biomedicine, biochemical engineering or environmental science but it is also a key to several important and novel applications [1–5]. In the case of biomaterials, protein adsorption is the first step in the integration of an implanted device or material with tissue [6,7]. In turn, in nanotechnology, protein–surface interactions are fundamental for the assembly of interfacial protein constructs, such as sensors, activators and other functional components at the biological/electronic junction. For instance in biomedicine, it is important to understand the adsorption of blood proteins to implants. Therefore, it is essential to understand mechanisms of adsorption processes of the compounds showing biological activity at different interface boundaries [8–15].

Protein adsorption on the high ordered mesoporous silica materials have great potential applications in many areas such as bioseparations,

biosensors, biocatalysis [16,17]. These materials are widely used for immobilisation of enzymes and proteins due to their highly ordered large pores of well defined dimensions, spacious pore volume, high surface area and tunable surface properties [18–24]. Considering the importance of mesopore size on protein adsorption/immobilisation, silica adsorbents like the mesocellular silica foam (MCF) belong to the most attractive group of materials which can be very useful in the adsorption processes involving substances with large molecular sizes including proteins [21,25–30]. These materials have a three-dimensional pore structure of uniform large spherical pore cells interconnected by narrow window pores (“inkbottled”) which are useful in the adsorption processes of protein molecules [22,25,31–35]. Many reports concerned the use of mesocellular silica foams as efficient sorbents for ovalbumin, bovine serum albumin, L-tryptophan and lysozyme [33,36–38]. For example, Russo et al. [39] studied the effect of surface functionalization on the adsorption capacity of BSA and lysozyme on MCF silica. Huang et al. found that adsorption onto modified Fe_3O_4 -MCF sorbent is relatively high for BSA in comparison to aspirin [40]. Regarding the applications of support/biomolecule composite materials the studies of their structural and surface properties are of great

^{*} Corresponding author.

E-mail address: annad@hektor.umcs.lublin.pl (A. Deryło-Marczewska).

importance. The proposed investigations of the model system MCF/protein focusing on analysis of albumin layers formed by adsorption allow deeper understanding of surface morphology in micro- and nanoscale, and interactions with porous solid. Regarding the studies presented in the literature further research on the adsorption processes and morphological and structural properties of protein/silica composites are necessary.

The present work describes the morphological and structural investigations of the MCF surface with the adsorbed protein molecules (BSA) and ovalbumin (OVA) in comparison to pure MCF material. BSA is a large protein (66.4 kDa) of dimensions $4 \times 4 \times 14$ nm (ellipsoidal/prolate shape) or $8 \times 8 \times 3$ nm (heart shape) [11,41–43]. In solution the BSA molecule presents a versatile conformation modified by changes in pH, ionic strength, presence of ions which influence the protein structure and properties. It is generally accepted that near the isoelectric point ($\text{pH}_{\text{IEP}} \sim 4.7\text{--}5.1$) [11,44] the BSA molecule has a triangular or heart-like shape, whereas at low pH (below $\text{pH} = 4$) the BSA molecule is in an expanded (E) linear state [45]. In physiological solution at $\text{pH} = 7.4$ the BSA molecule has prolate shape [41]. The native or normal (N) conformation exists in solution within pH range 4.5–8 [41,45] and this heart-like shape is the most compact structure [46]. Ovalbumin forms a major part of chicken egg white (60–65%), it has molecular weight 45 kDa and isoelectric point 4.6–4.7 [47]. The ovalbumin molecule has an ellipsoidal shape with dimensions $7 \times 4.5 \times 5$ nm [48–50].

In the paper the albumin adsorption on the synthesized MCF material was investigated with regard to equilibrium and kinetic of the process. Studies of structure and surface topography (micro- and nanolevel) of silica before and after albumin adsorption were performed by means of: low temperature nitrogen adsorption/desorption, UV–Vis diffuse reflectance spectroscopy (UV–Vis DRS), atomic force microscopy (AFM), optical profilometer (OP), transmission electron microscopy (TEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX). In order to study the differences in the acid/base properties the potentiometric titration was carried out. The surface techniques confirm the presence of the adsorbed proteins on the surface of porous material and indicate strong influence of porosity and surface morphology on the composite characteristics.

2. Materials and methods

2.1. Materials

In the studies, Pluronic copolymer PE9400-(EO₂₁PO₄₇EO₂₁) ($M_{\text{av}} = 4600$) and Pluronic PE10500-(EO₃₆PO₅₆EO₃₆) ($M_{\text{av}} = 6500$) were obtained from BASF (Poland). Tetraethylorthosilicate (TEOS) and 1,3,5-trimethylbenzene (TMB) were supplied by Sigma-Aldrich. Bovine serum albumin (BSA, purity $\geq 98\%$, Cat. No. A7906) and ovalbumin from chicken egg albumin (OVA, purity $\geq 98\%$ by gel electrophoresis, Cat. No. A5503) in powder form were purchased from Sigma-Aldrich. Protein solutions (0.4 and 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml) were prepared in phosphate buffered saline $\text{pH} = 7.4$ (Sigma-Aldrich, Cat. No. P5368) and used immediately after preparation. All chemicals were used without further purification.

2.2. Material preparation

Two MCF materials with differentiated structure properties were prepared according to the reported procedure [21,25,51] with some modifications of the method described in the papers [52,53]. The synthesis was conducted in hydrochloric acid solution, using the non-ionic triblock copolymers Pluronic PE9400 and Pluronic PE10500 as the structure-directing agents. As a silica source tetraethylorthosilicate (TEOS) and as a pore expanding agent 1,3,5-trimethylbenzene (TMB) were applied. The weighed amount of copolymer was dissolved in 180 ml of 1.6 M HCl solution. Then, a known amount of TMB (the mass proportion of polymer/TMB was always constant and equal to 1:1) was

added to the mixture which was stirred at 308 K by 45 min. Afterwards, an established amount of TEOS (polymer/TEOS mass ratios were 2.2 (PE-9400) and 1.8 (PE-10500)) was introduced to the reaction mixture which was stirred for 20 h at the same temperature. The mixture was aged at 393 K for 24 h in autoclave. Finally, the synthesized product was thoroughly washed with distilled water, dried and calcined at 773 K for 6 h. Basing on the pore sizes the obtained materials were denoted as MCF-d16 (PE-9400 template) and MCF-d10 (PE-10500 template).

2.3. Protein adsorption

The adsorption isotherms were measured by using a static method as follows: prior to experiment MCF was dried at 423K, then, 0.1 or 0.2 g samples of adsorbents were introduced to the adsorption vessels containing 25 ml of a protein solution (1, 2, 3, 4, 5 mg/ml) in phosphate buffered saline of $\text{pH} = 7.4$. Then, the vessels were placed in the incubator shaker (New Brunswick Scientific Innova 40R Model) and shaken at 110 rpm speed by 24 h at 298 K. After attaining adsorption equilibrium the protein equilibrium concentrations were calculated basing on the UV–Vis measurements at $\lambda = 279$ nm (Cary 100 UV–Vis apparatus; Varian Inc., Australia). The adsorbed amount of protein was calculated from experimental data using mass balance formula:

$$a_{\text{eq}} = \frac{(c_0 - c_{\text{eq}}) \cdot V}{w} \quad (1)$$

where, a_{eq} is the equilibrium adsorbed amount, c_0 and c_{eq} are the initial and equilibrium concentrations, respectively, V is the solution volume, and w is the weight of the adsorbent.

2.4. Adsorption kinetics

The adsorption kinetic measurements were carried out by using UV–Vis spectrophotometer Cary 100 (Varian, Australia) with a quartz flow cell [54]. The protein solution of established initial concentration (0.4 mg/ml) was conducted with a known amount of silica sample (0.25 g) in an external vessel, from which at definite time intervals the solution samples were collected automatically to the flow cell. The entire UV spectra in the range $\lambda = 200\text{--}400$ nm were recorded and the solution was returned to the reaction vessel. The solution was stirred during the experiment by applying a magnetic stirrer. The concentration vs. time profiles were calculated from the obtained spectra. Various equations and models were used for analysis of the obtained kinetic data: multi-exponential (m-exp), first-order (FOE), second-order (SOE), mixed-order (MOE), fractal first-order (f-FOE), fractal second-order (f-SOE), fractal mixed-order (f-MOE) equations, and McKay pore diffusion (PDM) and intraparticle diffusion (IDM, Crank) models. In the calculations the non-linear LSQ optimization was used with regard to difference between the experimental and fitted protein concentrations. The best optimization results were obtained by using the multi-exponential equation [54] describing a series of the first order processes or the follow up processes. It may be presented in the following forms:

$$c = (c_0 - c_{\text{eq}}) \sum_{i=1}^n f_i \exp(-k_i t) + c_{\text{eq}} \quad \text{or} \quad c = c_0 - c_0 u_{\text{eq}} \sum_{i=1}^n f_i [1 - \exp(-k_i t)] \quad (2)$$

where: k_i – the rate constant ($i = 1, 2, \dots, n$), f_i – the coefficients determining a fraction of an adsorbate adsorbed with a rate k_i , $u_{\text{eq}} = 1 - c_{\text{eq}}/c_0$ – the relative change of adsorbate concentration at equilibrium [37].

The other equations and models used in analysis of kinetic data are described in Supplementary Material. In Table S2 the values of relative standard deviations $\text{SD}(c/c_0)$ for m-exp, FOE, SOE, MOE, f-FOE, f-SOE, f-MOE equations, PDM and IDM models are compared.

Table 1

The values of parameters characterizing the studied mesoporous silica materials obtained from the nitrogen adsorption/desorption data.

Adsorbent	^a S_{BET} [m ² /g]	^b S_{ext} [m ² /g]	^c V_t [cm ³ /g]	^d V_{mez} [cm ³ /g]	^e V_{mic} [cm ³ /g]	^f $D_{av(ads)}$ [nm]	^g $D_{av(des)}$ [nm]	^h D_{hy} [nm]
MCF-d10	525	73	1.32	1.19	0.015	9.0	8.2	10.1
MCF-d16	495	30	1.98	1.89	0.037	15.6	12.6	16.0

^a S_{BET} , BET specific surface area.^b S_{ext} , the external surface area.^c V_t , the total pore volume.^d V_{mez} , the mesopore volume.^e V_{mic} , the micropore volume.^f $D_{av(ads)}$, the average BJH adsorption pore diameter.^g $D_{av(des)}$, the average BJH desorption pore diameter.^h D_{hy} , the average hydraulic pore diameter.

2.5. UV-visible diffuse reflectance spectroscopy (UV-Vis DRS)

Diffuse reflectance UV-Vis spectra for MCF-d16 and MCF-d16/protein were measured using UV-Vis spectrophotometer (Cary 4000, Varian Inc., Australia) equipped with an integration sphere diffuse reflectance accessory. The DR spectra were measured over the wavelength region $\lambda = 200\text{--}400$ nm at room temperature. On the absorption spectrum very intense band in the range 230–300 nm with a maximum located at near wavelength ~ 280 nm and ~ 230 nm can be observed [55, 56].

2.6. Potentiometric titration measurements

The surface charge densities and pH_{PZC} (point-of-zero-charge pH) of MCF material before and after protein adsorption were determined by potentiometric titration method using a Dosimat 765 automatic burette (Metrohm, Herisau, Switzerland) combined with a precision pH-meter (PHM 240, Radiometer, Copenhagen, Denmark). The measurements were performed as follows: 30 ml of 0.1 M NaCl solution placed in a thermostatic quartz vessel was acidified with 0.3 ml of 0.5 M HCl solution; after establishing the temperature (298 K) and solution pH the material (0.1g) was introduced; the suspension was titrated with 0.2 M NaOH and the pH changes were recorded. In order to eliminate the errors associated with the presence of CO_2 in the system, the measurements were carried out under a protective atmosphere of nitrogen. The titration curves were transformed into the surface charge density curves [57].

2.7. Nitrogen adsorption/desorption isotherms

The structural properties of MCF-d10, MCF-d16 and MCF-d16/protein were determined from the low temperature nitrogen adsorption/desorption isotherms at 77K measured by using the ASAP 2020 sorption analyzer (Accelerated Surface Area and Porosimetry, Micromeritics Instrument Corp., USA). Before the experiment the pure silica material was degassed (5 mm Hg) at 413 K for 24h, while the material with immobilized protein was outgassed (5 mm Hg) at 313 K for 24h. The BET specific surface area (S_{BET}), the total pore volume (V_t) were obtained by applying the standard procedures [58]. To estimate the values of the external surface area (S_{ext}), and the primary mesopore volume (V_{mez}) the α_s -plot was used with the macroporous silica gel LiChrospher Si-1000 as a nonporous reference adsorbent [59]. The micropore volume (V_{mic}) was obtained from the t -plot method [60,61]. The average BJH adsorption and desorption pore diameters ($D_{av(ads)}$, $D_{av(des)}$), and the pore size distributions (PSD) were obtained from the adsorption and desorption branches of nitrogen isotherm using the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) procedure [62] with Halsey-Faas correction. The mean hydraulic pore diameters (D_{hy}) were calculated from the values of BET surface areas and total pore volumes.

2.8. Atomic force microscope (AFM) and optical profilometer (OP)

The morphology and microstructure of MCF-d16 with adsorbed protein were determined by means of atomic force microscopy (AFM) and optical profilometer (OP). The nanostructure of the studied samples were examined using AFM (NanoScope V Controller system Bruker-Veeco, USA) in tapping mode (tip radius < 8 nm, resonance frequency 280 kHz) with a resolution 256×256 pixels and scan area $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$. All images were measured in air without filtering [63].

The optical profilometer (Contour GT, Bruker-Veeco, USA) in vertical scanning interferometry (VSI) mode was used to determine the surface microroughness (also called the surface waviness or slope error/surface slope). The objective lens magnification was set to $20 \times$ having field of view (FOV) $640 \times 480 \mu\text{m}^2$ which corresponded to $0.24 \mu\text{m}$ sampling pixel size and $156 \times 117 \mu\text{m}$ area. The surface topography parameters obtained from AFM and OP images (roughness average, S_a , RMS surface roughness, S_q , RMS slopes – surface waviness, S_{dq} , surface skewness, S_{sk} , surface kurtosis, S_{ku}) were calculated using the Scanning Probe Image Processor (SPIP) v. 5.1.4 software (Image Metrology A/S, Denmark). The analyzed parameters are described in Supplementary Material (Table S1).

2.9. Transmission electron microscopy (TEM) and energy dispersive X-ray spectrometer (EDX)

The analysis of surface topography and chemical composition of investigated samples were conducted by using high resolution transmission electron microscope S/TEM Titan3 G2 60–300 (FEI Company) with the accelerating voltage of 300 kV, field-emission gun (FEG) in high resolution bright-field imaging (HRTEM-BF), in TEM mode and high angle annular dark field detector in scanning mode (HAADF-STEM). To investigate the local concentrations of elements (Si, C, O, N) the condensed beam in STEM mode and energy dispersive X-ray spectrometer (EDX) was used. The EDAX detector with energy resolution 134 eV scanning in HAADF-STEM mode was applied.

3. Results and discussion

3.1. Characterisation of structural properties of materials

The porosity of the synthesized MCF materials has been investigated basing on the nitrogen adsorption/desorption analysis. The adsorption/desorption isotherms and pore size distributions for both materials are presented in Fig. S1 and analyzed in Supplementary Material. The shape of isotherms is typical for mesoporous solids with a H1 type hysteresis loop suggesting that the obtained MCF materials have cell-type mesopores connected by smaller window pores [21,31,32,64,65]. The parameters characterizing the porous structure of synthesized MCF materials, calculated from the nitrogen adsorption/desorption data, are listed in Table 1. One can find that both materials are characterized by divergent meso- and total pore volumes, and pore sizes, however, they

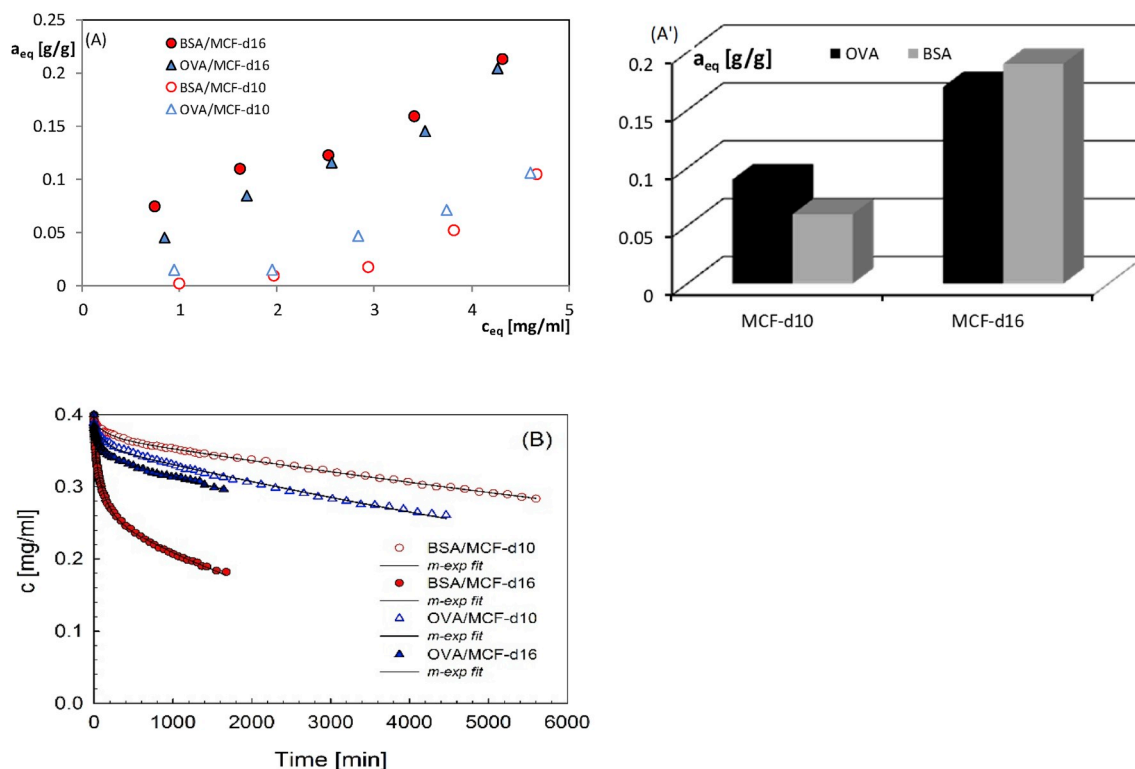


Fig. 1. Comparison of OVA and BSA adsorption isotherms (A), and adsorption values (g/g) on MCF-d10 and MCF-d16 at equilibrium concentration 4 mg/ml (A'). Comparison of concentration profiles for BSA and OVA adsorption on MCF-d10 and MCF-d16 (B).

Table 2
Optimized parameters of m-exp equation.

System	f_1 $\log k_1$	f_2 $\log k_2$	f_3 $\log k_3$	$t_{1/2}$ [min]	SD(c/c_0) [%]	1-R ²
BSA/MCF-d10	0.026 -0.57	0.049 -2.28	0.925 -4.33	13149.0	0.259	9.4·10 ⁻⁴
BSA/MCF-d16	0.118 -1.14	0.215 -2.12	0.667 -3.62	1201.2	0.426	5.8·10 ⁻⁴
OVA/MCF-d10	0.034 -0.001	0.075 -2.14	0.891 -4.13	7827.0	0.484	2.3·10 ⁻³
OVA/MCF-d16	0.048 0.021	0.091 -1.94	0.861 -4.04	5979.7	0.313	1.8·10 ⁻³

have similar specific surface areas (495 and 525 m²/g). The values of hydraulic pore diameters, as well as the average BJH adsorption and desorption pore diameters are higher for MCF-d16 in comparison to MCF-d10. Both materials contain mainly mesopores (95 and above 90%), they are characterized by low values of external surface area and micropore volume.

3.2. Protein adsorption – equilibrium and kinetics

For both proteins the adsorption isotherms from phosphate buffered saline were measured for MCF-d16 and MCF-d10. The experimental isotherms are presented in Fig. 1A. Moreover, the comparison of adsorption values (g/g) estimated at equilibrium concentration 4 mg/ml on MCF-d10 and MCF-d16 supports is shown (Fig. 1A'). Comparing adsorption of BSA and OVA on both materials one can find a strong effect of adsorbent structural characteristics on protein adsorption. Both MCFs are characterized by similar values of specific surface areas, however, they are differentiated with regard to pore sizes. MCF-d16 as adsorbent with larger pores shows higher adsorption uptakes towards both proteins which can penetrate its internal structure to a larger extent. Comparing the adsorption isotherms for BSA and OVA on MCF-

d10 one can observe an adsorption decrease for BSA with larger molecules; such a behavior is expected. However, for MCF-d16 the opposite tendency is found. OVA with smaller molecules shows weaker adsorption uptake in comparison to BSA. Such an unexpected behavior may suggest some conformational changes of BSA or reorientation (from prolate shapes having dimensions of 4 × 4 × 14 nm³ at pH = 7.4 to heart shape of dimensions 8 × 8 × 3 nm³ in solution of pH ~ 8). Comparing the adsorption values of both proteins on the same adsorbent one can find small differences. In Fig. 1B the adsorption kinetic curves are also compared for BSA and OVA on MCF-d10 and MCF-d16 in various time ranges. Similarly, as in the case of adsorption isotherms for MCF-d16 the BSA adsorption is higher in comparison to OVA, however, for MCF-d10 the opposite effect may be found. For analysis of concentration profiles the multi-exponential equation was used and the fitted lines are drawn in Fig. 1B (the comparison of fitting results obtained for various kinetic models and equations is presented in Supplementary Material, S2; in comparison to m-exp equation they gave worse results). One can find that this simple equation describes well the experimental data, and the fitting quality is confirmed by low SD (standard deviation) and 1-R² (determination coefficient) values. In Table 2 the parameter values of multi-exponential equation are presented: the logarithm of rate constant, $\log k_i$, the coefficient f_i determining a fraction of a protein adsorbed with a rate k_i , moreover, the adsorption half-times, $t_{1/2}$ (time required to adsorb half of equilibrium amount), estimated by using best-fitted parameters of m-exp eq. are also given. Taking into account the half-time values one can find that the processes of adsorption of both proteins are quicker for MCF-d16 with larger pores. Comparing the adsorption of BSA and OVA on MCF-d16 we observe that BSA is adsorbed with higher rate, however, the opposite effect is found for MCF-d10. These results are consistent with equilibrium experiment.

3.3. Physicochemical properties of MCF with adsorbed protein

Investigation of surface structures formed by BSA and OVA adsorbed

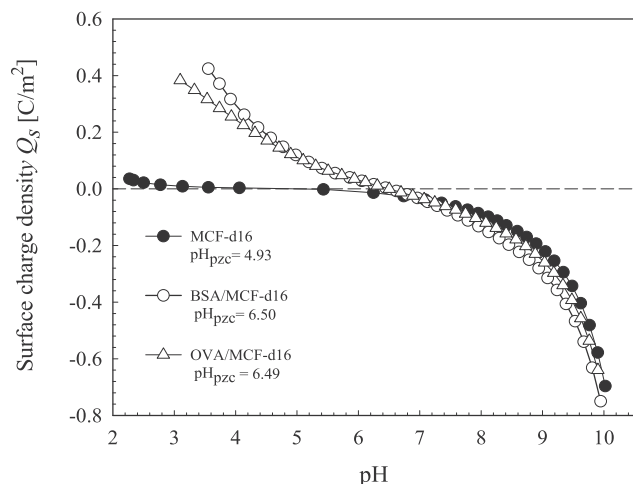


Fig. 2. Dependence of surface charge density on pH for the MCF-d16, BSA/MCF-d16 and OVA/MCF-d16 samples. The measurements were carried out by potentiometric titration for ionic strength $I = 0.1$ mol/L.

on the mesoporous silica material was carried out by UV–Visible diffuse reflectance spectroscopy (UV–Vis DRS). The obtained spectra are presented in Fig. S2 in Supplementary Material. One can find that the spectrum for MCF-d16 modified with proteins exhibits the well-known absorbance maxima at 279 nm and 229 nm. The maximum at 279 nm

is due to the $\pi \rightarrow \pi^*$ transition of the aromatic amino acids tryptophan (Trp) and tyrosine (Tyr) and to a small extent, by the absorbance of cystine (disulfide bonds). On the other hand, the maximum at 229 nm is attributed to the $n \rightarrow \pi^*$ transition of the carboxylic group in peptide bond [66].

To study the differences in acid/base properties of MCF-d16 before and after BSA and OVA adsorption the potentiometric titration experiments were carried out. Fig. 2 presents the surface charge density curves as a function of pH for the studied samples. Comparing the results shown in Fig. 2 one can notice that the acid/base character of pure silica surface is clearly different than the silica surface with adsorbed proteins. In the case of pure MCF-d16 the surface density curve has a typical character for silicas with a very small positive charge for pH values below point of zero charge ($\text{pH}_{\text{PZC}} \sim 4.93$). Upon protein adsorption, the MCF-d16 surface demonstrates different acid/base properties (amphiphilic surface), its zero-charge point is moved towards higher pH values, and it is located at $\text{pH}_{\text{PZC}} \sim 6.5$. It indicates that MCF surface is covered by protein molecules.

3.4. Structural and morphological properties of MCF with the adsorbed protein

3.4.1. N_2 adsorption/desorption isotherms

In order to determine semi-qualitatively the character of porosity changes after protein adsorption the measurements of nitrogen adsorption/desorption isotherms were carried out. Such studies are not strictly qualitative because the large protein molecules can block partly or totally the pore space even for small nitrogen molecules generating an

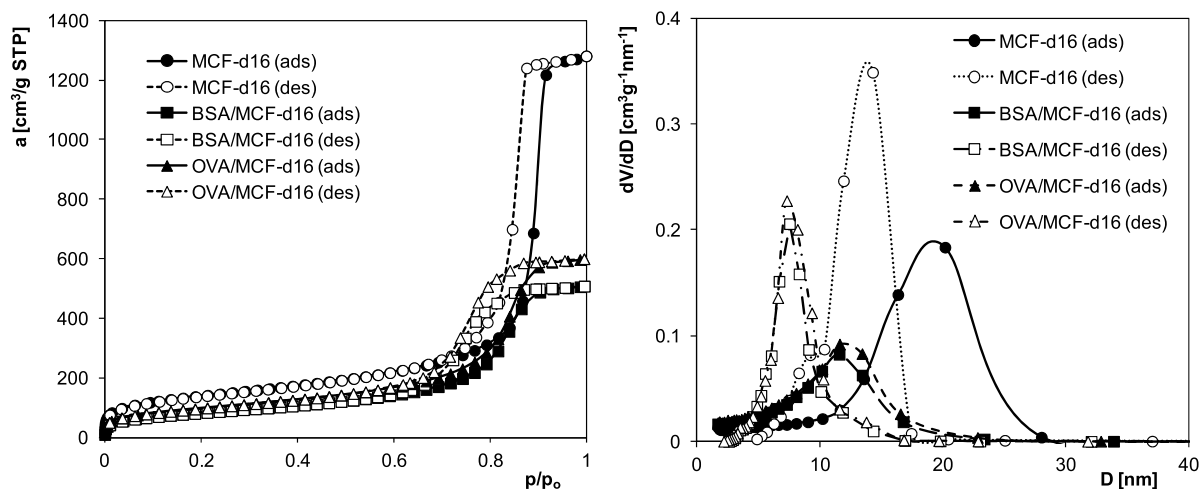


Fig. 3. Comparison of N_2 sorption isotherms and pore size distributions calculated from adsorption and desorption branches of isotherms for pure MCF-d16 material and with adsorbed protein layers (OVA, BSA).

Table 3

Parameters characterising porosity of the pure silica and after protein adsorption obtained from the nitrogen adsorption/desorption data.

Adsorbent	^a S_{BET} [m^2/g]	^b S_{ext} [m^2/g]	^c V_t [cm^3/g]	^d V_{mez} [cm^3/g]	^e V_{mic} [cm^3/g]	^f $D_{\text{av(ads)}}$ [nm]	^g $D_{\text{av(des)}}$ [nm]	^h D_{hy} [nm]
MCF-d16	495	30	1.98	1.89	0.037	15.6	12.6	16.0
OVA/MCF-d16	350	17	0.93	0.89	–	9.3	7.9	10.6
BSA/MCF-d16	295	14	0.78	0.76	–	9.2	7.7	10.6

^a S_{BET} , BET specific surface area.

^b S_{ext} , the external surface area.

^c V_t , the total pore volume.

^d V_{mez} , the mesopore volume.

^e V_{mic} , the micropore volume.

^f $D_{\text{av(ads)}}$, the average BJH adsorption pore diameter.

^g $D_{\text{av(des)}}$, the average BJH desorption pore diameter.

^h D_{hy} , the average hydraulic pore diameter.

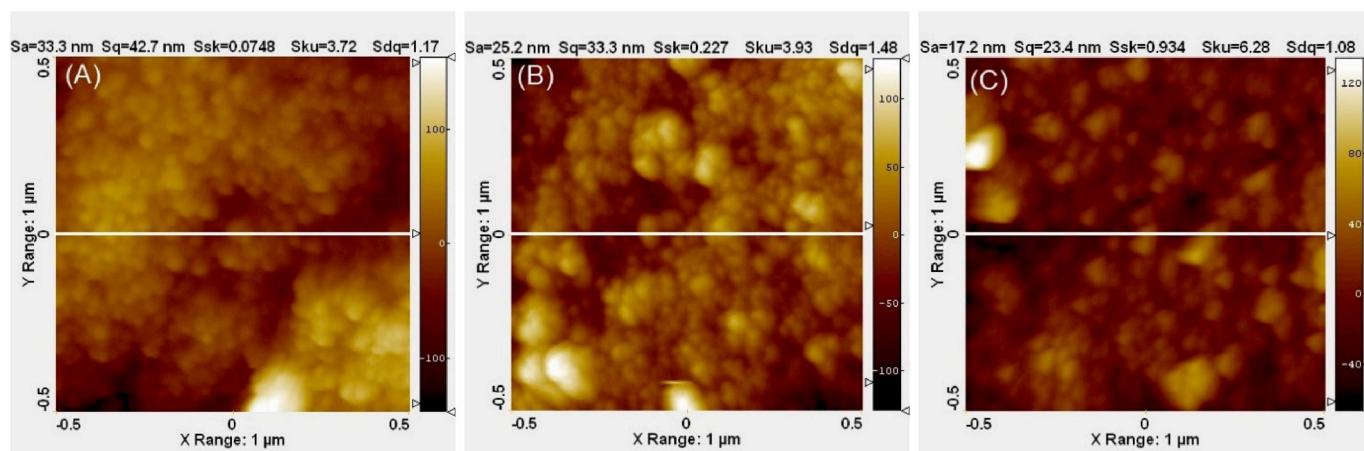


Fig. 4. 2D AFM micrographs ($1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$) of surface morphology and microstructure of: pure MCF-d16 material (A); after OVA adsorption (B) and BSA adsorption (C).

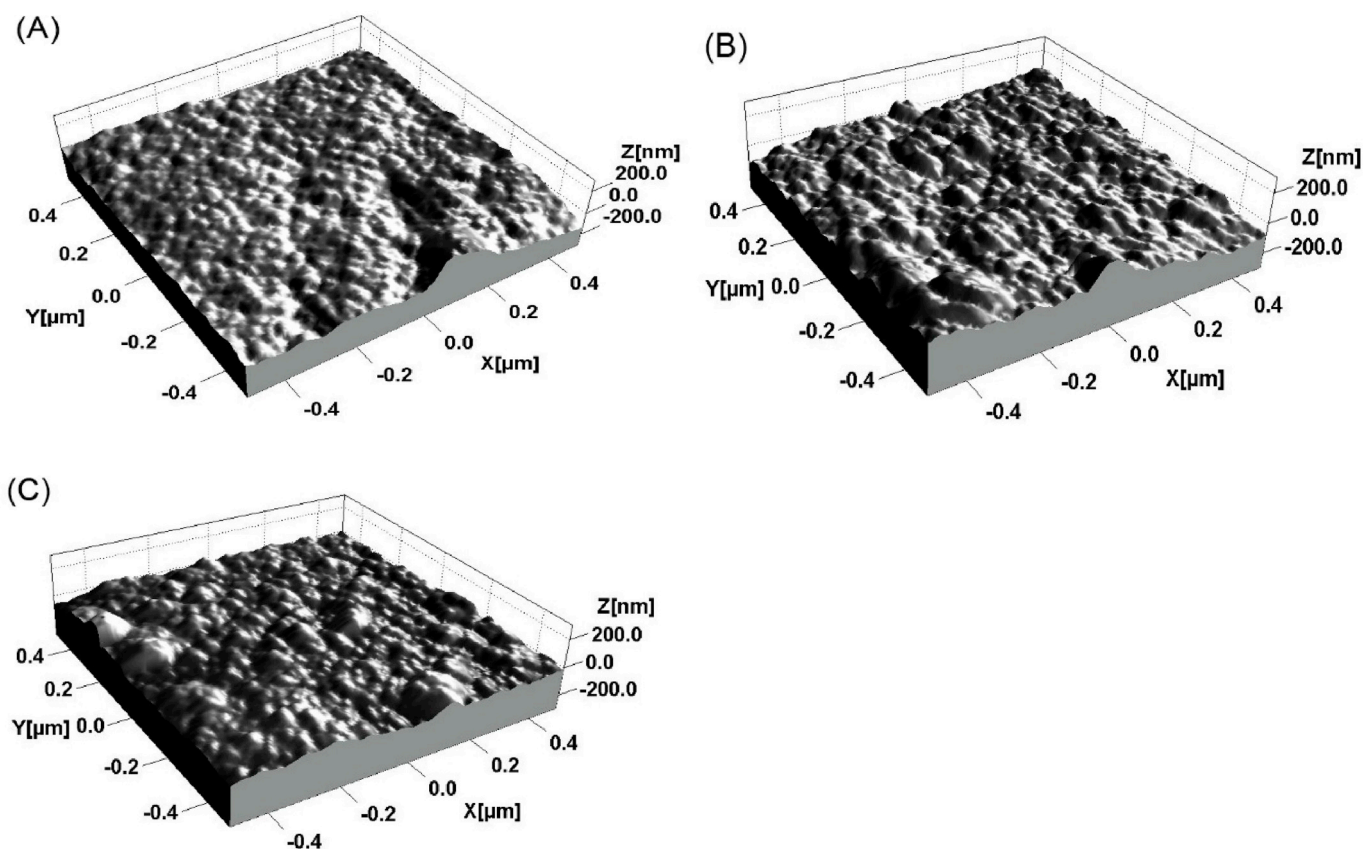


Fig. 5. 3D AFM topographic images of the scanned surfaces: pure MCF-d16 material (A); MCF-d16 covered by the OVA (B) and BSA molecules (C).

additional error in porosity estimation. However, the analysis of nitrogen adsorption for silica with immobilized protein may indicate a general trend in adsorption process, e.g. location of adsorbate in the inner or outer surface of pores.

The comparison of nitrogen adsorption/desorption isotherms and pore-size distribution functions calculated from adsorption and desorption branches of isotherms for pure MCF-d16 and after protein adsorption are shown in Fig. 3. One can find that as a result of protein adsorption its maximum value is decreased to much lower level, and hence the pore volumes are also diminished. The PSDs obtained from adsorption and desorption branches of nitrogen isotherms are shifted towards lower pore sizes. The pore size distributions are slightly

differentiated for the materials covered with BSA and OVA. In addition, the peak heights for BSA/MCF-d16 and OVA/MCF-d16 are dropped by $\sim 35\%$ in comparison to the pure material. The obtained results demonstrate that the adsorbed proteins change distinctly the porosity of the studied MCF. Moreover, one can state that BSA with a larger molecular mass (66.4 kDa) changes the surface porosity of the MCF-d16 material to a larger extent than the ovalbumin with a smaller molecular mass (45 kDa).

The textural parameters of MCF-d16 modified by BSA and OVA determined from nitrogen adsorption/desorption isotherms are summarized in Table 3. One can find that after adsorption all porosity parameters (S_{BET} , S_{ext} , V_b , V_{mic} , V_{mez} , D_{av} , D_{hy}) are reduced; some of them to

Table 4

Parameters characterizing the surface texture of MCF-d16 material before and after protein adsorption obtained from AFM analysis.

Sample	^a S_a [nm]	^b S_q [nm]	^c S_{dq} [rad]	^d S_{sk}	^e S_{ku}
MCF-d16	33.3	42.7	1.17	0.08	3.72
OVA/MCF-d16	25.2	33.3	1.48	0.23	3.93
BSA/MCF-d16	17.2	23.4	1.08	0.93	6.28

^a S_a , roughness average.

^b S_q , surface roughness (root mean square, rms).

^c S_{dq} , surface waviness (surface slope).

^d S_{sk} , surface skewness.

^e S_{ku} , surface kurtosis.

a large extent. The protein adsorption significantly decreases the MCF-d16 specific surface area (S_{BET}), however, in the case of BSA this reduction is higher which is in accordance with stronger adsorption of this protein from buffer solution. Similar trends are observed in the case of total and mesopore volumes. The OVA adsorption leads to decrease of the total and mesopore volumes of about 53% in comparison to MCF-d16, however, in the case of BSA it is about 60%. It means that BSA molecules penetrate deeply the mesopores of MCF-d16 and it is in accordance with the results of adsorption equilibrium and kinetic measurements from solutions. Generally, the average BJH adsorption and desorption pore diameters ($D_{av(ads)}$, $D_{av(des)}$), and the average hydraulic pore diameter (D_{hy}) are decreased of about 34–40%. It may suggest that the molecules of both proteins are quit-packed in the mesopore channels as well as on the MCF-d16 surface [33]. The presented results markedly confirm that BSA as protein with large molecular dimensions $4 \times 4 \times 14 \text{ nm}^3$ (ellipsoidal or prolate shape at pH=7.4) exhibit higher adsorption affinity than smaller ovalbumin molecules (ellipsoidal shape) of dimensions $7 \times 4.5 \times 5 \text{ nm}^3$, which is in good agreement with the adsorbed amounts determined from the batch adsorption experiment. It may be assumed that in the case of BSA adsorption it can be related to a conformational change of the adsorbed protein or reorientation on the surface as well as strong protein–solid interactions.

3.4.2. AFM analysis

AFM studies allowed better insight into the surface morphology, topography and texture (at nanoscale) of the adsorbed protein on the

silica surface. The 2D and 3D AFM surface topography ($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$) images of MCF-d16 with the adsorbed BSA and OVA are presented in Figs. 4 and 5, respectively. Table 4 summarizes the parameters characterizing the surface texture of MCF-d16 before and after protein adsorption derived from analysis of AFM micrographs (see Fig. 4A–C).

Analysing the AFM images one can conclude that the morphology and nanostructure of MCF-d16 surface change distinctly after protein adsorption. The surfaces of samples with the adsorbed protein molecules are less porous in comparison to the pure silica. These changes are reflected in the values of textural parameters (see Table 4). Let us first analyze the surface roughness (S_q), as it can be seen it was decreased by about 45% after the BSA adsorption in comparison to the pure adsorbent. Likewise, after OVA adsorption, the value of the surface roughness (S_q) was reduced by 22%.

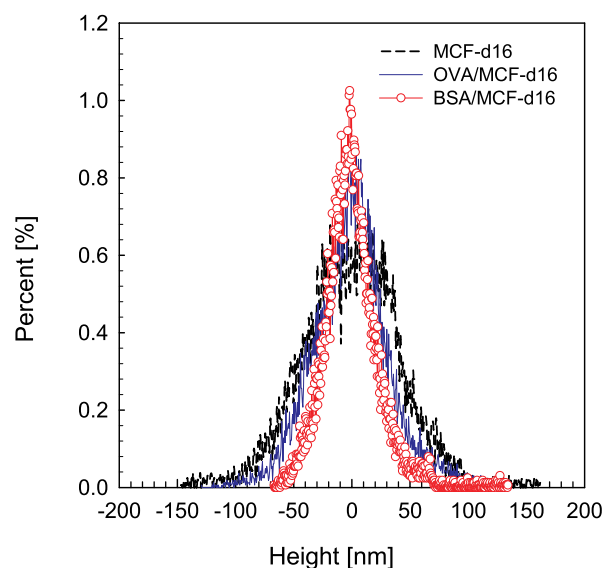


Fig. 7. The distribution function histogram of the surface roughness height ($1000 \text{ nm} \times 1000 \text{ nm}$) for studied materials.

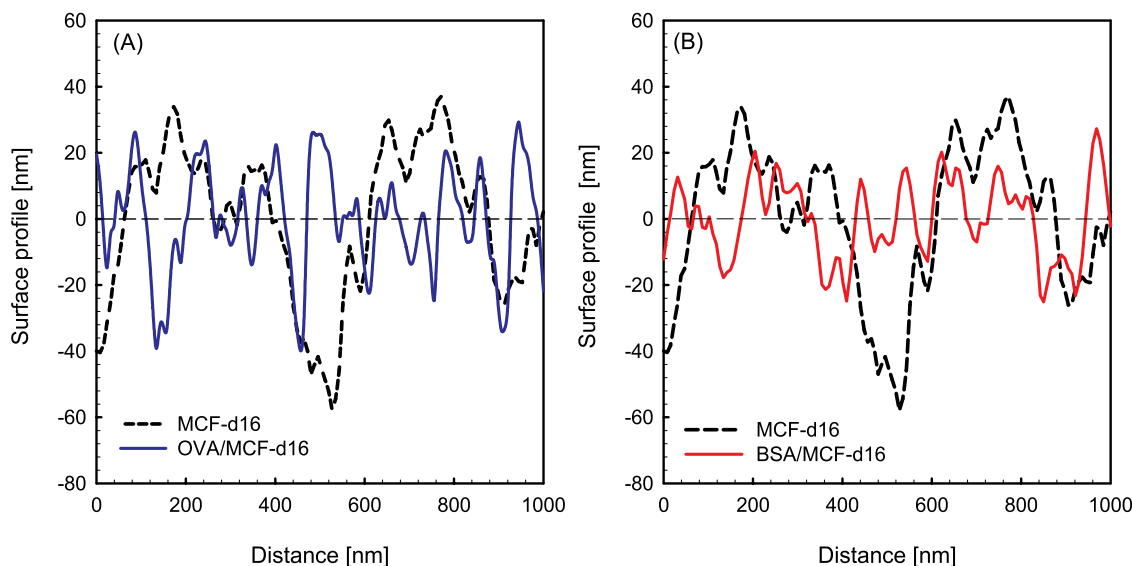


Fig. 6. Profiles deviations for the surface (taken along the marked white line on the AFM images in Fig. 7) of the MCF-d16 material before and after protein adsorption (A) OVA and (B) BSA ranging from 0 to 1000 nm.

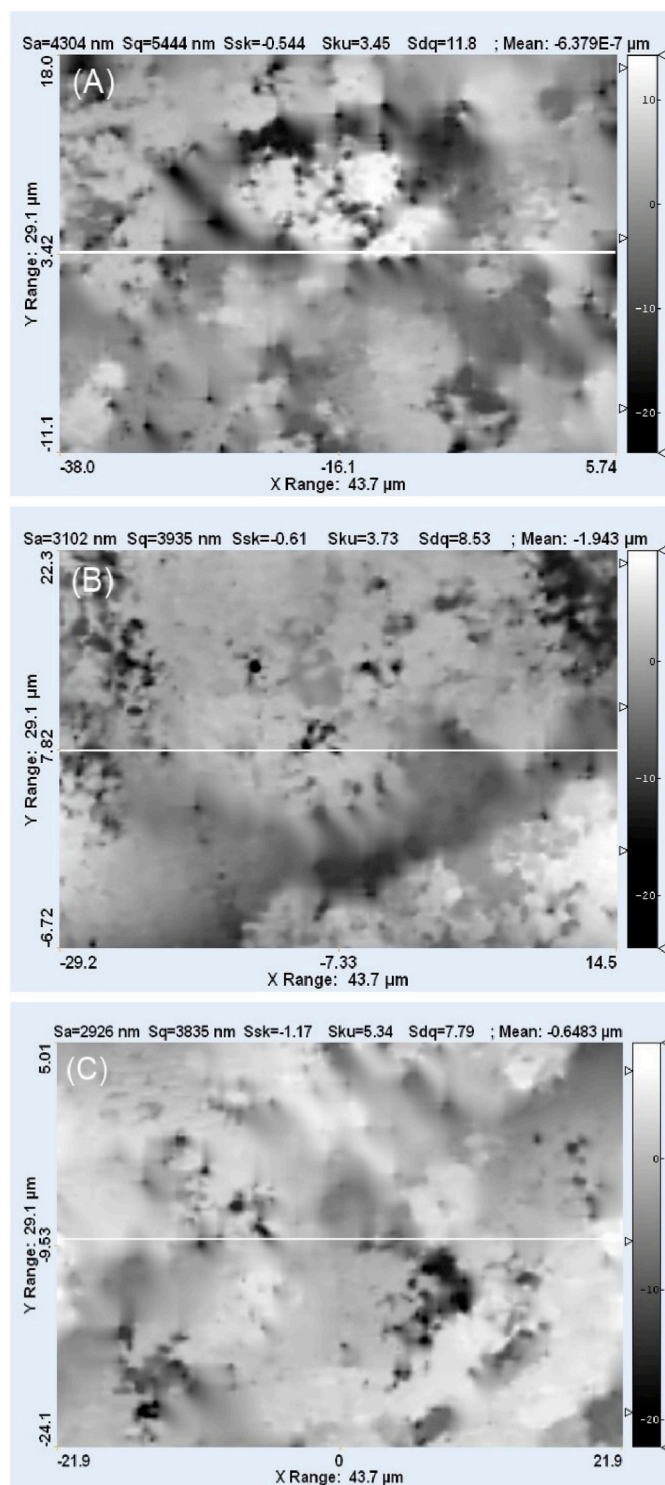


Fig. 8. The surface topography of: pure MCF-d16 (A); MCF-d16 material covered by OVA (B) and BSA molecules (C) as recorded by an optical profilometer. The selected area for these topographies are $29.1 \mu\text{m} \times 43.7 \mu\text{m}$.

To estimate the smoothing capabilities, the surface roughness profile of pure MCF-d16 was compared to the surface profile deviations of the silica covered with albumins (Fig. 6A and B). The profile deviations for the surface roughness (taken along the marked white line on the AFM images in Fig. 4) of MCF-d16 before and after protein adsorption show that the amplitudes of surface profiles in nano-scale after protein adsorption are reduced in comparison to the silica substrate. The maximum deviation amplitude (protrusions) from a zero base line for

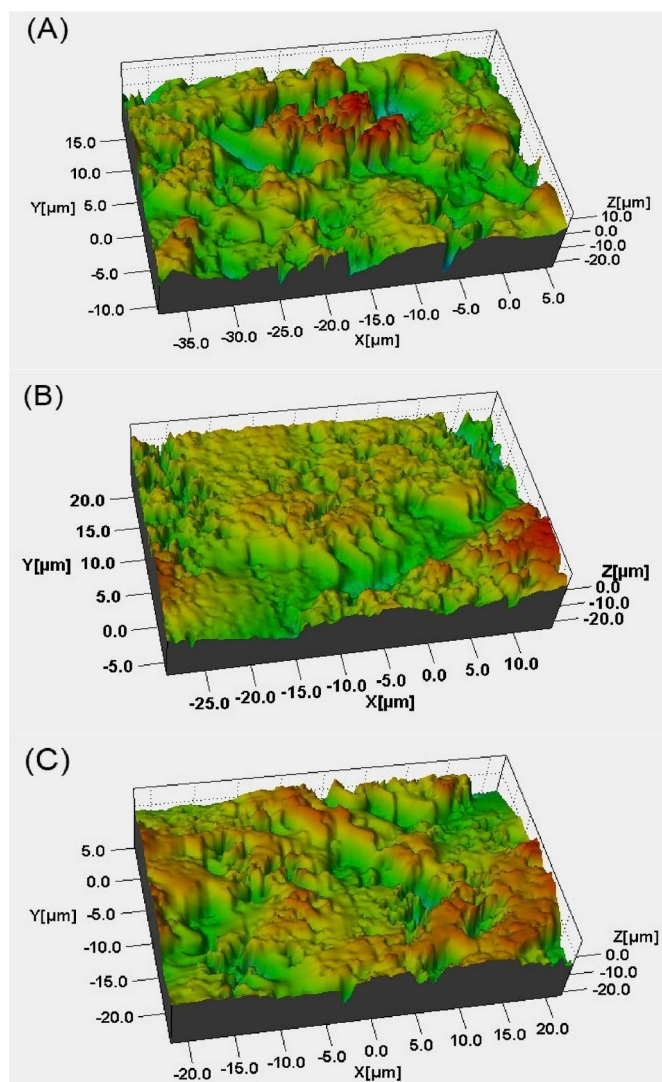


Fig. 9. (B) 3D optical profilometer images showing surface texture of the scanned surface: pure MCF-d16 material (A); MCF-d16 sample with adsorbed OVA (B) and BSA (C).

Table 5

Roughness parameters of MCF before and after protein adsorption obtained from optical profilometer measurements using VSI technique.

Sample	^a S_a (μm)	^b S_q (μm)	^c S_{dq} (rad)	^d S_{sk}	^e S_{ku}
MCF-d16	4.30	5.44	11.8	-0.54	3.45
OVA/MCF-d16	3.10	3.94	8.53	-0.61	3.73
BSA/MCF-d16	2.93	3.84	7.79	-1.17	5.34

^a S_a , roughness average.

^b S_q , surface roughness (root mean square, rms).

^c S_{dq} , surface waviness (slope error).

^d S_{sk} , surface skewness.

^e S_{ku} , surface kurtosis.

the pure MCF-d16 varies in ranges $-60 \text{ nm} + 40 \text{ nm}$ ($\Delta h = 100 \text{ nm}$), whereas, after adsorption of ovalbumin, the amplitude of the protrusions is significantly reduced and evolves in the range $-40 + 30 \text{ nm}$ ($\Delta h = 70 \text{ nm}$). This effect is stronger in the case of BSA adsorption, and hence, the surface roughness profile is characterized by much smaller oscillation of amplitude $\pm 20 \text{ nm}$ ($\Delta h = 40 \text{ nm}$) and the surface along section line is characterized by regular course.

As it can be seen from Table 4 also the surface waviness (surface

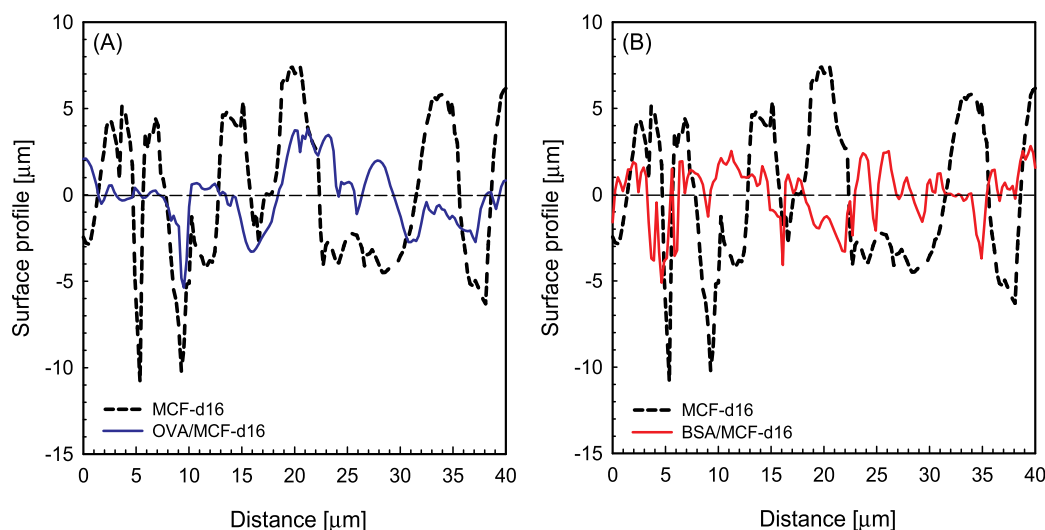


Fig. 10. Profile deviations of the surface (taken along the marked white line on the OP images in Fig. 11) for the MCF-d16 material before and after protein adsorption (A) OVA and (B) BSA ranging from 0 to 40 μm .

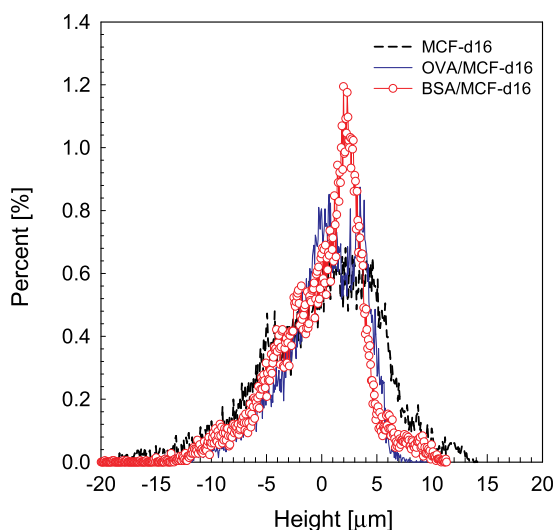


Fig. 11. The distribution function histogram of the surface roughness height ($29.1 \mu\text{m} \times 43.7 \mu\text{m}$) for the studied materials.

slope, S_{dq}) was decreased by about 8% after the BSA adsorption, however, after OVA adsorption the value of the surface slope (S_{dq}) was increased by 26% in comparison to pure MCF-d16 surface. These results may be explained by the fact that S_{dq} is affected both by texture amplitude and spacing (frequency). The surface after OVA adsorption demonstrate significantly higher frequency (finer spacing) and reduced amplitude in comparison to silica substrate (Fig. 6A). The higher frequency leads to higher surface slope (S_{dq}) while lower amplitude leads to reduced value of S_{dq} . As after OVA adsorption the frequency increases more significantly than amplitude is reduced, S_{dq} value increases for this biocomposite. On the other hand, for BSA/MCF-d16 (Fig. 6B) we can observe similar texture spacing (frequency) as for OVA/MCF-d16 composite, while the amplitude is significantly reduced, therefore, S_{dq} demonstrate the lower value.

As frequency in profile deviations is similar for both biocomposites, more reduced amplitude for BSA/MCF-d16 strongly suggests that this protein is able to efficiently adsorb in silica pores as well as on external

surface [67], demonstrating very packed texture with the lowest roughness. On the other hand, OVA molecules are weaker adsorbed in the pores and on the outer surface (higher amplitude values than for BSA/MCF-d16, Fig. 6A and B). Consequently, the adsorbed protein layer for OVA/MCF-d16 is less densely packed than for BSA/MCF-d16 composite. The differences in amplitude and frequency deviations are reflected in the histogram of height distribution (surface roughness) obtained from $1 \times 1 \mu\text{m}$ scan areas is shown in Fig. 7.

Additionally, MCF-d16 with the adsorbed proteins is characterized by slightly smaller surface isotropy (higher value of surface asymmetry and flatness coefficient i.e. skewness $S_{sk} > 0$ and kurtosis $S_{ku} > 3$) compared to the MCF-d16 surface without proteins (see Table 4). It is worth noting that the positive values of S_{sk} (this effect is enhanced after protein adsorption) confirm that the number of vertices (peaks) rather than the number of valleys (pores) predominates on silica surface. These results also confirm that albumin adsorption leads to significant change of surface roughness of silica substrate, the surfaces after adsorption become less porous and rough. Generally, more pronounced changes in the morphology, texture and microstructure were observed after adsorption of large BSA molecules on MCF-d16. This behavior is also confirmed by N_2 adsorption/desorption analysis.

3.4.3. Optical profilometer analysis

The microscale morphological properties of MCF surface with the adsorbed proteins were also evaluated using an optical profilometer. Fig. 8 (A-C) and Fig. 9 (A-C) illustrates the 2D and 3D surface morphology images ($29.1 \mu\text{m} \times 43.7 \mu\text{m}$) for silica before and after protein adsorption as recorded by an optical profilometer. The parameters of surface topography estimated on the basis of 2D topography images are presented in Table 5.

As one can find from the data presented in Table 5, the strong changes in structure, morphology and surface micro-roughness can be seen after protein adsorption. In the case of BSA adsorption, the surface roughness and waviness (surface slope) were reduced by 29.4% and 34%, respectively, compared to the pure silica material, meaning that, the surface after adsorption is smooth and flat (greater brightening effect of surface). A similar phenomenon was observed for OVA adsorption, here the surface roughness was decreased of about $\sim 28\%$ and surface slope of $\sim 27.5\%$ in relation to the initial MCF-d16 surface. A detailed comparison of the micro-roughness surface profiles for MCF-d16 before and after protein adsorption is shown in Fig. 10 (taken along the marked

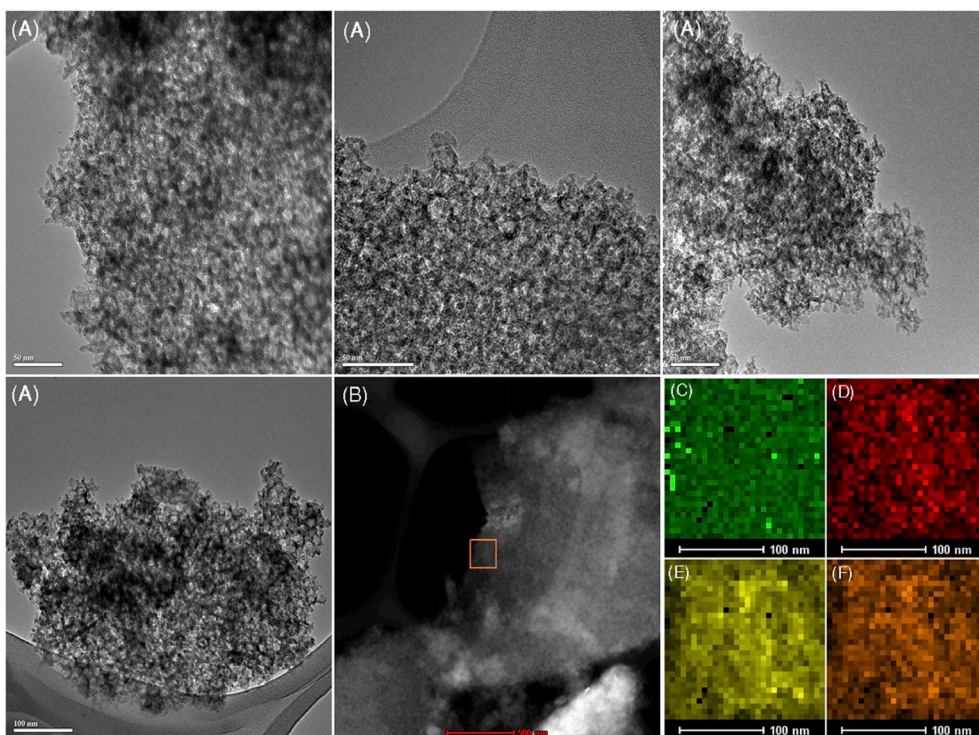


Fig. 12. (A) HRTEM-BF micrographs showing the surface structure of the pure MCF-d16 material, (B) HAADF-S/TEM image of the selected area from which the X-ray microanalysis (EDX) was performed, (C–F) EDX elemental mapping images of silicon (C-green), carbon (D-red), oxygen (E-yellow) and nitrogen (F-orange) corresponding to the orange square marked area in (B). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

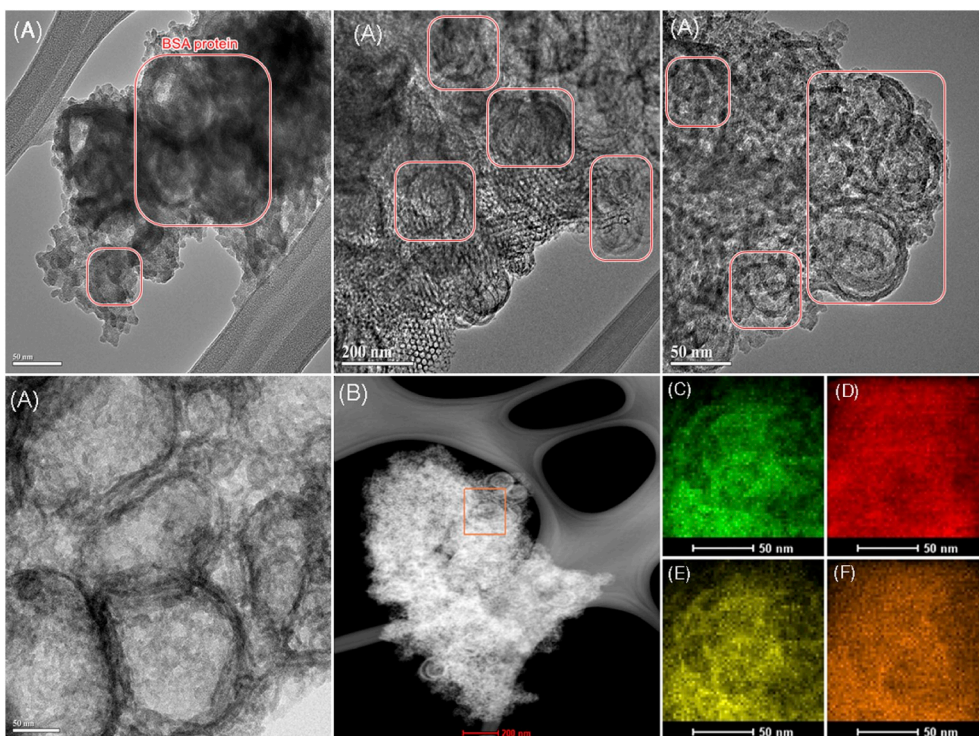


Fig. 13. (A) HRTEM-BF micrographs showing the surface structure of the MCF-d16 material covered by BSA molecules adsorbed from 5 mg/ml solution, (B) image of the selected area from which the X-ray microanalysis (EDX) was performed, (C–F) EDX elemental mapping images of silicon (C-green), carbon (D-red), oxygen (E-yellow) and nitrogen (F-orange) corresponding to the orange square marked area in (B). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

white line on the OP images in Fig. 8). It can be clearly seen that the amplitude of surface roughness for silica with proteins is about two times lower. The maximum amplitude deviations varies from $+7 \mu\text{m}$ to $-11 \mu\text{m}$ ($\Delta h = 18 \mu\text{m}$) for pure silica, from $+2.5 \mu\text{m}$ to $-5 \mu\text{m}$ ($\Delta h = 7.5 \mu\text{m}$) for silica with BSA and from $+3.8 \mu\text{m}$ to $-5.3 \mu\text{m}$ ($\Delta h = 9.1 \mu\text{m}$) for silica with OVA.

Fig. 11 shows the distribution function histogram of the surface

roughness height before and after adsorption for both proteins taken from $29.1 \mu\text{m} \times 43.7 \mu\text{m}$ scan areas. The obtained results indicate that MCF-d16 covered by the protein is characterized by considerably narrower distribution of height of surface roughness in comparison to the pure MCF-d16 adsorbent. It is associated with a fairly homogeneous protein distribution on the silica grain surface.

In accordance with the skewness ($S_{sk} < 0$) and kurtosis values ($S_{ku} > 3$),

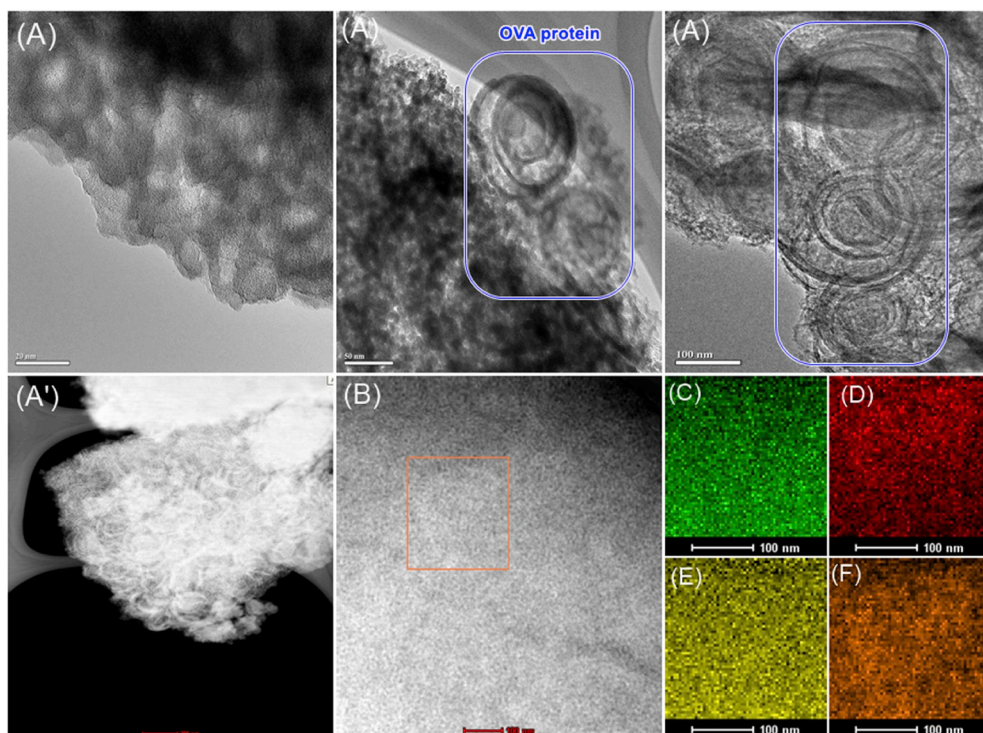


Fig. 14. (A) HRTEM-BF and (A') HAADF-S/TEM micrographs showing the surface structure of the MCF-d16 material covered by OVA molecules adsorbed from 5 mg/ml solution, (B) image of the selected area from which the X-ray microanalysis (EDX) was performed, (C–F) EDX elemental mapping images of silicon (C-green), carbon (D-red), oxygen (E-yellow) and nitrogen (F-orange) corresponding to the orange square marked area in (B). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 6

Element contents for MCF-d16 material before and after protein adsorption from EDX analysis.

Sample	Si	C	O	N	Si	C	O	N
	Atomic%				Mass%			
MCF-d16	27.46	10.07	54.31	4.53	41.12	6.45	46.33	3.50
OVA/MCF-d16	29.27	11.12	50.83	8.14	43.45	7.06	42.99	6.08
BSA/MCF-d16	26.88	25.28	54.63	8.76	41.60	16.72	48.16	6.48

the surfaces with the adsorbed proteins are relatively less isotropic (demonstrate non-symmetrical shape for the surface height distribution in comparison to the substrate that shows isotropic, Gaussian surface height distribution). The negative S_{sk} values indicate that the surface is composed of mainly valleys (surface pores) that dominate over the peaks. This effect is greater for a large BSA molecule.

3.4.4. TEM and EDX analysis

The high-resolution transmission electron microscopy TEM (HRTEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) were used in order to obtain more detailed information about the surface topography, micro-nanostructure and chemical composition of mesoporous silica material before and after protein adsorption. In Figs. 12–14 (A) HRTEM-BF (Bright Field) micrographs corresponding to the samples: MCF-d16, BSA/MCF-d16 and OVA/MCF-d16 are shown, respectively. The TEM images (Fig. 12A) confirmed that MCF-d16 material exhibits a porous structure with a pore diameter of 13 nm which is close to the values obtained by N_2 adsorption/desorption parameters. It is also worth mentioning that TEM images clearly confirm the structure and presence of the adsorbed proteins on the surface of porous MCF-d16 silica (Figs. 13,14A).

To evaluate the chemical composition and elemental distribution (relative proportion) of previously defined elements over the scanned area (Figs. 12–14 B) of pure MCF-d16 surface and covered by BSA and OVA molecules the energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) was applied. The local concentrations of Si, C, O, N (mass% and atomic%) were detected and presented in Table 6.

Figs. 12–14(C–F) present maps of the distribution of elements for pure silica surface and with adsorbed proteins that correspond to the red-square marked area in Figs. 12–14(B). It is evident from the EDX mappings, that Si, C, O and N are nearly homogeneously distributed on MCF surface with the adsorbed proteins in contrary to the pure surface of material.

The EDX analysis indicates a significantly higher C content (15.21 at. %), higher O (0.32 at.%) and higher N content (4.23 at.%) for BSA/MCF-d16 sample in comparison to pure MCF-d16 material. In the case of OVA/MCF-d16 sample the surface composition in relation to MCF-d16 is as follows: ~ 1.05 at.% more of C, ~ 3.61 at.% more of N, and ~ 3.48 at.% less of O.

TEM/EDX results markedly confirm that the BSA adsorption causes greater changes of surface topography and local concentration of chemical elements of MCF-d16 material than ovalbumin adsorption. These results are in fairly accordance with those obtained by the nitrogen sorption analysis, AFM and OP results.

4. Conclusions

The presented study describes the process of protein adsorption on mesocellular silica foam (MCF) and the changes of its physicochemical, structural and morphological properties after BSA and OVA adsorption.

- MCF-d16 with larger pores shows higher adsorption uptakes towards both proteins which can penetrate its internal structure to a larger extent. For MCF-d10 BSA adsorption is lower than OVA adsorption,

however, for MCF-d16 the opposite tendency is found. Such a behavior may be connected with some conformational changes of BSA or reorientation.

- Basing on the half-time adsorption values it may be stated that the processes of adsorption of both proteins are quicker for the MCF support with larger pores. In comparison to ovalbumin, BSA is adsorbed with higher rate on MCF-d16, however, the opposite effect is observed for MCF-d10. Generally, the adsorption process of both proteins on mesoporous MCF-d16 material is relatively slow and limited by diffusion of molecules into internal porous structure. The fastest adsorption for both albumins occurs in the initial stage of the adsorption process.
- Analysis of porous structure by nitrogen adsorption/desorption for MCF-d16 before and after protein adsorption shows that as a result of albumin adsorption all porosity parameters are reduced. The pore size distributions are shifted towards lower pore sizes. The BSA with a larger molecular mass changes the surface porosity of MCF-d16 material to a larger extent than the ovalbumin with a smaller molecular mass. This is in accordance with observed stronger adsorption of BSA from buffer solution which may be connected with its conformational change or reorientation. Such conformational changes may be also responsible for quicker adsorption of BSA in comparison to OVA. In the case of BSA molecules adsorbed at pH = 7.4 it was postulated that its adsorption behavior may be related to conformational change of the adsorbed protein or reorientation on the surface as well as strong protein–solid interactions.
- After protein adsorption, the MCF-d16 surface changes its acid/base properties into amphiphilic, pH_{PZC} is moved towards higher pH values (~6.5) confirming adsorption of protein molecules.
- AFM and OP analyses showed that the morphology and microstructure of the MCF-d16 surface after protein adsorption is less porous, rough, and, hence more homogenous and more smooth than the surface of the pure silica. Generally, more pronounced changes in the morphology and microstructure were observed after the large BSA molecules adsorption.
- TEM and UV–Vis DRS examinations before and after the adsorption confirmed the structure and presence of the adsorbed protein on the surface of porous material.
- EDX micro-analysis revealed different local concentrations of such elements as Si, C, O and N on the silica surface with the adsorbed protein molecules compared to the pure silica adsorbent.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme FP7/2007–2013/under REA grant agreement N° PIRSES-GA-2013-612484.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.109769>.

References

- [1] T.X. Bui, H. Choi, *J. Hazard Mater.* 168 (2009) 602–608.
- [2] C.H. Lee, T.S. Lin, C.Y. Mou, *Nano Today* 4 (2009) 165–179.
- [3] J.J. Kirkland, F.A. Truszkowski, R.D. Ricker, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 25–34.
- [4] C.E. Giacomelli, W. Norde, *J. Colloid Interface Sci.* 233 (2001) 234–240.
- [5] M. Malmsten, *Biopolymers at Interface*, Marcel Dekker, New York, 2003.
- [6] T.A. Horbett, *Surfactant Sci. Ser.* 110 (2003) 393–413.
- [7] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons (Eds.), *Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, San Diego, 1996.
- [8] A. Liebmann-Vinson, L.M. Lander, M.D. Foster, W.J. Brittain, E.V. Vogler, C. F. Majkrzak, S. Satija, *Langmuir* 12 (1996) 2256–2262.
- [9] T.J. Su, J.R. Lu, R.K. Thomas, Z.F. Cui, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 3727–3736.
- [10] K. Rezwani, L.P. Meier, M. Rezwani, J. Voros, M. Textor, L. Gauckler, *Langmuir* 20 (2004) 10055–10061.
- [11] K. Rezwani, L.P. Meier, L. Gauckler, *Langmuir* 21 (2005) 3493–3497.
- [12] A. Toscano, M.M. Santore, *Langmuir* 22 (2006) 2588–2599.
- [13] E.D. Kaufman, J. Beleyea, M.C. Johnson, Z.M. Nicholson, J.L. Ricks, P. K. Shah, M. Bayless, T. Petterson, Z. Feldoto, E. Blomberg, P. Claesson, S. Franzen, *Langmuir* 23 (2007) 6053–6062.
- [14] M. Desroches, N. Chaudhary, S. Omanovic, *Biomacromolecules* 8 (2007) 2836–2844.
- [15] J. Zawala, R. Todorov, A. Olszewska, D. Exerowa, K. Malysa, *Adsorption* 16 (2010) 423–435.
- [16] M. Hartmann, *Chem. Mater.* 17 (2005) 4577–4593.
- [17] A. Katiyar, S. Yadav, P.G. Smirniotis, N.G. Pinto, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 13–20.
- [18] A. Salis, M. Pisano, M. Monduzzi, V. Solinas, E. Sanjust, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 58 (2009) 175–180.
- [19] M. Shakeri, K. Kawakami, *Microporous Mesoporous Mater.* 118 (2009) 115–120.
- [20] K. Kato, S. Seelan, *J. Biosci. Bioeng.* 109 (2010) 615–617.
- [21] P. Schmidt-Winkel, W.W. Lukens Jr., D. Zhao, P. Yang, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 254–255.
- [22] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *Science* 279 (1998) 548–552.
- [23] W. Chouyyok, J. Panpranot, C. Thanachayanant, S. Prichanont, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 56 (2009) 246–252.
- [24] Y.J. Han, J.T. Watson, G.D. Stucky, A. Butler, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 17 (2002) 1–8.
- [25] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 6024–6036.
- [26] R.H. Perry, D. Green (Eds.), *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, McGraw-Hill, New York, 1984.
- [27] M.T.W. Hearn (Ed.), *HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, VCH, New York, 1991.
- [28] A. Katiyar, L. Ji, P.G. Smirniotis, N.G. Pinto, *Microporous Mesoporous Mater.* 80 (2005) 311–320.
- [29] A. Katiyar, S.W. Thiel, V.V. Gulians, N.G. Pinto, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1583–1588.
- [30] L. Ji, A. Katiyar, N.G. Pinto, M. Jaroniec, P.G. Smirniotis, *Microporous Mesoporous Mater.* 75 (2004) 221–229.
- [31] P. Schmidt-Winkel, W.W. Lukens Jr., P. Yang, D.I. Margolese, J.S. Lettow, J. Y. Ying, *Chem. Mater.* 12 (2000) 686–696.
- [32] J.S. Lettow, Y.J. Han, P. Schmidt-Winkel, P. Yang, D. Zhao, G.D. Stucky, J.Y. Ying, *Langmuir* 16 (2000) 8291–8295.
- [33] J. Kim, R.J. Desch, S.W. Thiel, V.V. Gulians, N.G. Pinto, *Microporous Mesoporous Mater.* 149 (2012) 60–68.
- [34] S. J. Gregg, K.S.W. Sing (Eds.), *Adsorption, Surface Area and Porosity*, Academic Press, New York, 1982.
- [35] S. Lu, J. He, Z. Liu, *Chem. Eng. J.* 146 (2009) 503–514.
- [36] J. Kim, R.J. Desch, S.W. Thiel, V.V. Gulians, N.G. Pinto, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7796–7803.
- [37] J. Kim, J. Desch, S.W. Thiel, V.V. Gulians, N.G. Pinto, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6697–6704.
- [38] Y.J. Han, G.D. Stucky, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 9897–9898.
- [39] P.A. Russo, M.M.L. Ribeiro Carrott, P.A.M. Mourao, P.J.M. Carrott, *Colloids Surf., A* 386 (2011) 25–35.
- [40] S. Huang, Ch Li, Zi Cheng, Y. Fan, P. Yang, C. Zhang, K. Yang, J. Lin, *J. Colloid Interface Sci.* 376 (2012) 312–321.
- [41] R. Curvale, M. Masuelli, A.P. Padilla, *Int. J. Biol. Macromol.* 42 (2008) 133–137.
- [42] C.E. Giacomelli, M.J. Avena, C.P. De Pauli, *J. Colloid Interface Sci.* 188 (1997) 387–395.
- [43] C.E. Giacomelli, M.J. Esplandiú, P.I. Ortiz, M.J. Avena, C.P. De Pauli, *J. Colloid Interface Sci.* 218 (1999) 404–411.
- [44] B. Jachimska, M. Wasilewska, Z. Adamczyk, *Langmuir* 24 (2008) 6866–6872.
- [45] L.G. Cascao-Pereira, O. Theodoly, H.W. Blanch, C. J Radke, *Langmuir* 19 (2003) 2349–2356.
- [46] F. Shahid, J.E. Gomez, E.R. Brinbaum, D.W. Darnall, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 5618–5622.
- [47] K. Ito, N. Matsudomi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (4) (2005) 755–761.
- [48] J.A. Huntington, P.E. Stein, *J. Chromatogr. B* 756 (2001) 189–198.
- [49] P.E. Stein, A.G.W. Leslie, J.T. Finch, R.W. Carrell, *J. Mol. Biol.* 221 (1991) 941–959.
- [50] S. Yu, J. Hu, X. Pan, P. Yao, M. Jiang, *Langmuir* 22 (2006) 2754–2759.
- [51] A.L. Doadrio, E.M.B. Sousa, J.C. Doadrio, J. Pérez-Pariente, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regi, *J. Control. Release* 97 (2004) 125–132.
- [52] A. Derylo-Marczewska, A.W. Marczewski, I. Skrzypek, S. Pikus, M. Kozak, *Appl. Surf. Sci.* 252 (2005) 625–632.
- [53] A. Derylo-Marczewska, A.W. Marczewski, I. Skrzypek, S. Pikus, *Pol. J. Chem.* 82 (2008) 205–212.
- [54] A.W. Marczewski, M. Seczkowska, A. Derylo-Marczewska, M. Blachnio, *Adsorption* 22 (4) (2016) 777–790.
- [55] A.J. Majewski, *Doctoral Dissertation*, Stevens Institute of Technology, 2001.
- [56] T.E. Creighton, *Protein Structure*, Oxford University Press, 1997, p. 261.
- [57] A. Derylo-Marczewska, A.W. Marczewski, *Langmuir* 15 (1999) 3981–3986.
- [58] S.J. Gregg, K.S.W. Sing, *Adsorption, Surface Area and Porosity*, Academic Press, London, 1982.
- [59] M. Jaroniec, M. Kruk, J.P. Olivier, *Langmuir* 15 (1999) 5410–5413.
- [60] B.C. Lippens, J.H. de Boer, *J. Catal.* 4 (3) (1965) 319–323.
- [61] J.H. de Boer, B.C. Lippens, B.G. Linsen, J.C. P Broekhoff, A. van den Heuvel, Th.J. Osinga, *J. Colloid Interface Sci.* 21 (4) (1966) 405–414.

- [62] E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 373–380.
- [63] N. Lin, B. Drake, A.S. Lea, P.K. Hansma, J.D. Andrade, *Langmuir* 6 (1990) 509–511.
- [64] K.S.W. Sing, *Adv. Colloid Interface Sci.* 76–77 (1998) 3–11.
- [65] P. Schmidt-Winkel, C.J. Glinka, G.D. Stucky, *Langmuir* 16 (2000) 356–361.
- [66] X.Y. Huang, L. Li, H.F. Qian, C.Q. Dong, J.C. Ren, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 5140–5143.
- [67] A. Chrzanowska, A. Deryło-Marczewska, Mesoporous silica/protein biocomposites: surface, topography, thermal properties, *Int. J. Biol. Macromol.* 139 (2019) 531–542.

Supplementary material for the paper:

Morphological, structural and physicochemical characteristics of the surface of mesocellular silica foam with the adsorbed OVA and BSA proteins

Anna Deryło-Marczewska*, Agnieszka Chrzanowska, Adam W. Marczewski

Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University, M. Curie-Skłodowska Sq. 3, 20-031 Lublin, Poland

***Corresponding author:** E-mail: annad@hektor.umcs.lublin.pl (A. Deryło-Marczewska)

Atomic force microscope (AFM) and optical profilometer (OP) analyses

The surface topography parameters obtained from AFM and OP images (S_a , S_q , S_{dq} , S_{sk} , S_{ku}) were calculated using the Scanning Probe Image Processor (SPIP) v. 5.1.4 software (Image Metrology A/S, Denmark). The analyzed parameters are presented in Table S1.

Table S1. List of selected roughness parameters.

Symbol	Name	Description
S_a	Roughness average	arithmetic mean of the absolute height value
S_q	RMS surface roughness	standard deviation of the profile heights values
S_{dq}	RMS slopes –surface waviness	RMS value of the surface slope
S_{sk}	Surface skewness	height distribution asymmetry
S_{ku}	Surface kurtosis	height distribution sharpness (peakedness)

The RMS surface roughness (S_q) is the most widely used amplitude roughness parameter that gives the standard deviation of height and it was calculated according to the formula:

$$S_q = \sqrt{\frac{1}{MN} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{l=0}^{N-1} [z(x_k, y_l)]^2} \quad (S1)$$

where x and y are the coordinates, z is the perpendicular deviation from the ideally smooth surface, M is the number of points in the x direction and N is the number of points in the y

direction [E.S. Gadelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, M. Elewa, H.H. Soliman, Roughness parameters, J. Mater. Process. Technol., 123 (2002) 133-145].

The surface waviness (S_{dq}) is the RMS-value of the surface slope within the sampling area, and is defined as [L. Mummery, "Surface Texture Analysis – The Handbook", Hommelwerke, Germany, 1992.]:

$$S_{dq} = \sqrt{\frac{1}{(M-1)(N-1)} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{l=0}^{N-1} \left(\frac{z(x_k, y_l) - z(x_{k-1}, y_l)}{\delta x} \right)^2 + \left(\frac{z(x_k, y_l) - z(x_k, y_{l-1})}{\delta y} \right)^2} \quad (S2)$$

Surface skewness (S_{sk}) describes the asymmetry of the height distribution. If skewness value is equal to 0 it represents a Gaussian like surface. Negative values of S_{sk} refer to a surface-porous sample (predominance of holes), while positive skew is seen on surface with peaks. Values numerically greater than 1.0 may indicate extreme holes or peaks on the surface.

Surface kurtosis (S_{ku}), a measure of the sharpness of the surface height distribution, equals 3.0 for a Gaussian-like surface. Values smaller than 3.0 indicate a broad (heterogeneous) height distribution (spread distribution surface) whereas values much larger than 3.0 refer to a surface with almost quantized height values (centrally distribution surface) [E.S. Gadelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, M. Elewa, H.H. Soliman, Roughness parameters, J. Mater. Process. Technol., 123 (2002) 133-145].

Characterisation of mesocellular silica foams (MCFs) from gas adsorption

The porosity of the MCF materials has been investigated by nitrogen sorption analysis. In Fig. S1 the adsorption/desorption isotherms for both synthesized materials are compared. The shape of isotherms is typical for mesoporous solids with a sharp increase of adsorption at the point corresponding to the capillary condensation in mesopores [P. Schmidt- Winkel, W.W. Lukens Jr., P. Yang, D.I. Margolese, J.S. Lettow and J.Y. Ying, Chem. Mater. 12 (2000) 686-696, K. S. W. Sing, Adv. Colloid Interface Sci. 76-77 (1998) 3-11]. The nitrogen adsorption/desorption isotherms exhibit a H1 type hysteresis loop suggesting that the obtained MCF materials have cell-type mesopores connected by smaller window pores [P. Schmidt- Winkel, W.W. Lukens Jr., D. Zhao, P. Yang, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 254-255, P. Schmidt- Winkel, W.W. Lukens Jr., P. Yang, D.I. Margolese, J.S. Lettow and J.Y. Ying, Chem. Mater. 12 (2000) 686-696, J.S. Lettow, Y.J. Han, P. Schmidt- Winkel, P. Yang, D. Zhao, G.D. Stucky, J.Y. Ying, Langmuir 16 (2000) 8291-8295, P. Schmidt

-Winkel, C.J. Glinka, G.D. Stucky, Langmuir 16 (2000) 356-361]. Comparing the presented isotherms one can find the differentiation in: the adsorption values at high relative pressures (higher adsorption and pore volume for MCF-d16), the range of capillary condensation (shifted towards higher pressures for MCF-d16; connected with larger pores), the width of hysteresis loop (wider for MCF-d10; greater differentiation of pore constrictions/interconnectivities and cavities). In the range of low relative pressures the nitrogen isotherms for both are similar, which suggests similar values of specific surface area; moreover, low adsorption values indicate small amount of micropores in the total porosity.

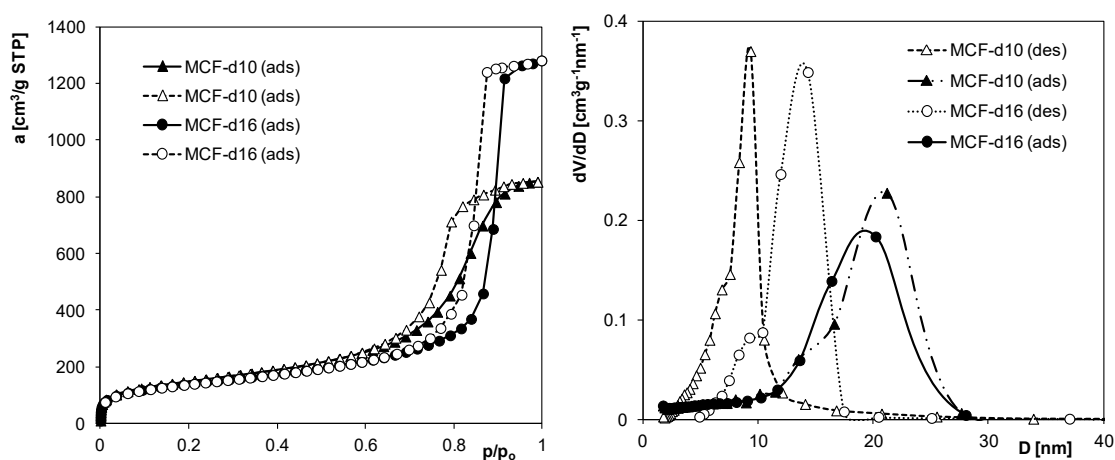


Fig. S1. Comparison of N₂ adsorption/desorption isotherms for MCF-d16 and MCF-d10 materials, and pore size distributions calculated from adsorption and desorption branches of isotherms.

The pore size distributions calculated from adsorption and desorption data for both materials are also presented in Fig. S1. The PSDs obtained from adsorption branches of isotherms are represented by the peaks situated in the range ~8 – 28 nm, and they are similar for both materials. However, the PSDs calculated on the basis of desorption data are distinctly separated for MCF-d16 and MCF-d10. The desorption PSD for MCF-d16 is shifted towards higher values of pore diameters, meaning that, this material has the wider pore interconnectivities.

Protein adsorption – kinetics

The first order equation (FOE):

$$\ln(c_{eq} - c) = \ln(c_{eq} - c_0) - k_1 t \quad (S3)$$

c - the temporary concentration, the "o" and "eq" indices correspond to the initial and equilibrium values, k_1 – the adsorption rate coefficient.

The second order equation (SOE):

$$a = a_{eq} [k_2 t / (1 + k_2 t)] \quad (S4)$$

or linear forms:

$$t/a = (1/a_{eq})(1/k_2 + t) \quad \text{and} \quad a = a_{eq} - (1/k_2)(a/t) \quad (S5)$$

where: $k_2 = k_{2a} a_{eq}$ and k_{2a} is the rate coefficient for pseudo-second order kinetics [S. Azizian, „Kinetic models of sorption: a theoretical analysis”, Journal of Colloid and Interface Science, 276 (2004) 47-52; A.W. Marczewski, „Kinetics and equilibrium of adsorption of organic solutes on mesoporous carbons”, Applied Surface Science, 253 (2007) 5818-5826; Y.S. Ho, G. McKay, „Sorption of Dye from Aqueous Solution by Peat”, Chemical Engineering Journal, 70 (1988) 115-124].

The 1,2-mixed-order kinetic equation (MOE) equation is a generalization of the first and second order kinetics and may be represented as a relative adsorption progress, F , in time:

$$F = a/a_{eq} = \frac{1 - \exp(-k_1 t)}{1 - f_2 \exp(-k_1 t)} \quad \text{or} \quad \ln \left(\frac{1-F}{1-f_2 F} \right) = -k_1 t \quad (S6)$$

$f_2 < 1$ – the normalized share of the second order process in the kinetics. In the special cases, the MOE equation is reduced to the simple kinetic equations of the first ($f_2=0$) and the second order ($f_2=1$) type [A.W. Marczewski, „Application of mixed order rate equations to adsorption of methylene blue on mesoporous carbons”, Applied Surface Science, 256 (2010) 5145-5152; A.W. Marczewski, „Analysis of kinetic Langmuir model. Part I: Integrated kinetic Langmuir equation (IKL): a new complete analytical solution of the Langmuir rate equation”, Langmuir, 26 (2010) 15229-15238; A.W. Marczewski, A. Derylo-Marczewska, A. Slota, „Adsorption and

desorption kinetics of benzene derivatives on mesoporous carbons”, Adsorption, 19 (2013) 391-406].

Fractal MOE equation (f-MOE) taking into account the nonideality effects:

$$F = \frac{1 - \exp(-k_1 t)^p}{1 - f_2 \exp(-k_1 t)^p} \quad (S7)$$

p – the fractal coefficient [A.W. Marczewski, M. Sęczkowska, A. Deryło-Marczewska, M. Błachnio, „Adsorption equilibrium and kinetics of selected phenoxyacid pesticides on activated carbon – effect of temperature”, Adsorption, 22 (2016) 777-790; A.W. Marczewski, A. Deryło-Marczewska, A. Słota, „Adsorption and desorption kinetics of benzene derivatives on mesoporous carbons”, Adsorption, 19 (2013) 391-406, M. Haerifar, S. Azizian, „Fractal-like adsorption kinetics at the solid/solution interface”, The Journal of Physical Chemistry C, 116 (2012) 13111–13119].

The Intraparticle Diffusion Model (IDM) proposed by Crank [A.W. Marczewski, M. Sęczkowska, A. Deryło-Marczewska, M. Błachnio, „Adsorption equilibrium and kinetics of selected phenoxyacid pesticides on activated carbon – effect of temperature”, Adsorption, 22 (2016) 777-790, J. Crank, Mathematics of Diffusion. Clarendon Press, Oxford (1975)]:

$$F = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-\pi^2 \cdot n^2 \cdot D_a \cdot t}{r^2}\right) \quad (9)$$

r – the radius of adsorbent particle, D_a – the effective diffusion coefficient: $D_a = \frac{D}{\tau_p \cdot (1 + \rho \cdot K_H \cdot \varepsilon_p)}$,

where: D – the molecular diffusion coefficient, τ_p – the dimensionless pore tortuosity factor, ρ – the particle density, ε_p – the particle porosity, K_H – the Henry adsorption constant.

When the adsorbate concentration varies, we get:

$$F = 1 - 6 \cdot (1 - u_{eq}) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp\left(-p_n^2 \cdot \frac{D_t}{r^2}\right)}{9 \cdot u_{eq} + (1 - u_{eq})^2 \cdot p_n^2}$$

where: p_n – the non-zero roots of the equation: $\tan p_n = \frac{3p_n}{\left[3 + \left(\frac{1}{u_{eq}} - 1\right)p_n^2\right]}$ [A.W. Marczewski, M.

Sęczkowska, A. Deryło-Marczewska, M. Błachnio, „Adsorption equilibrium and kinetics of selected phenoxyacid pesticides on activated carbon – effect of temperature”, *Adsorption*, 22 (2016) 777-790, J. Crank, *Mathematics of Diffusion*. Clarendon Press, Oxford (1975)].

The Pore Diffusion Model (PDM) proposed by McKay [A.W. Marczewski, M. Sęczkowska, A. Deryło-Marczewska, M. Błachnio, „Adsorption equilibrium and kinetics of selected phenoxyacid pesticides on activated carbon – effect of temperature”, *Adsorption*, 22 (2016) 777-790, G. McKay, M. El Geundi, M.M. Nassar, „Pore diffusion during the adsorption of dyes onto bagasse pith”, *Process Safety and Environmental Protection*, 74B (1996) 277–288] may be presented as:

$$\frac{dF}{d\tau_s} = \frac{3(1-u_{eq}\cdot F)\cdot(1-F)^{\frac{1}{3}}}{1-B\cdot(1-F)^{\frac{1}{3}}} \quad (10)$$

τ_s – the undersized model time, u_{eq} – the relative adsorbate loss, the parameter $B = 1-l / Bi$, where $Bi = K_f/D_p$ – the Biot number, D_p – the pore diffusion coefficient, K_f – the external mass

transfer coefficient; and: $\tau_s = \frac{1}{6\cdot u_{eq}} \left\{ \left(2B - \frac{1}{b}\right) \cdot \ln \left[\left| \frac{x^3 + X^3}{1 + X^3} \right| \right] + \frac{3}{a} \ln \left[\left| \frac{x+X}{1+X} \right| \right] \right\} + \frac{1}{x\cdot\sqrt{3u_{eq}}}$

$\left\{ \arctan \left(\frac{2-X}{x\cdot\sqrt{3}} \right) - \arctan \left(\frac{2\cdot x - X}{x\cdot\sqrt{3}} \right) \right\}$, where: $x = (1 - F)^{\frac{1}{3}}$, $b = \left(\frac{1}{1-u_{eq}} \right)^{\frac{1}{3}}$ [A.W. Marczewski,

M. Sęczkowska, A. Deryło-Marczewska, M. Błachnio, „Adsorption equilibrium and kinetics of selected phenoxyacid pesticides on activated carbon – effect of temperature”, *Adsorption*, 22 (2016) 777-790, G. McKay, M. El Geundi, M.M. Nassar, „Pore diffusion during the adsorption of dyes onto bagasse pith”, *Process Safety and Environmental Protection*, 74B (1996) 277–288].

Table S2. Relative standard deviations $SD(c/c_0)$ for m-exp, FOE, SOE, MOE, f-FOE, f-SOE, f-MOE, McKay pore diffusion (PDM) and IDM models (Crank).

Systems	m-exp [%]	FOE [%]	SOE [%]	MOE [%]	f-FOE [%]	f-SOE [%]	f-MOE [%]	IDM [%]	PDM [%]
BSA/MCF-d10	0.259	1.268	1.193	1.201	0.748	0.825	0.692	3.44	24.027
BSA/MCF-d16	0.426	3.314	2.151	4.389	0.834	0.640	0.646	1.38	2.994
OVA/MCF-d10	0.484	1.581	1.469	1.479	0.770	0.895	0.843	2.69	0.996
OVA/MCF-d16	0.313	1.673	1.329	1.341	3.846	4.007	0.629	2.95	0.426

Physicochemical properties of MCF adsorbent with adsorbed protein layer

Investigation of surface structures formed by adsorbed BSA and OVA proteins on mesoporous silica material was carried out by UV-Visible diffuse reflectance spectroscopy (UV-Vis DRS). The obtained spectra are presented in Fig. S2.

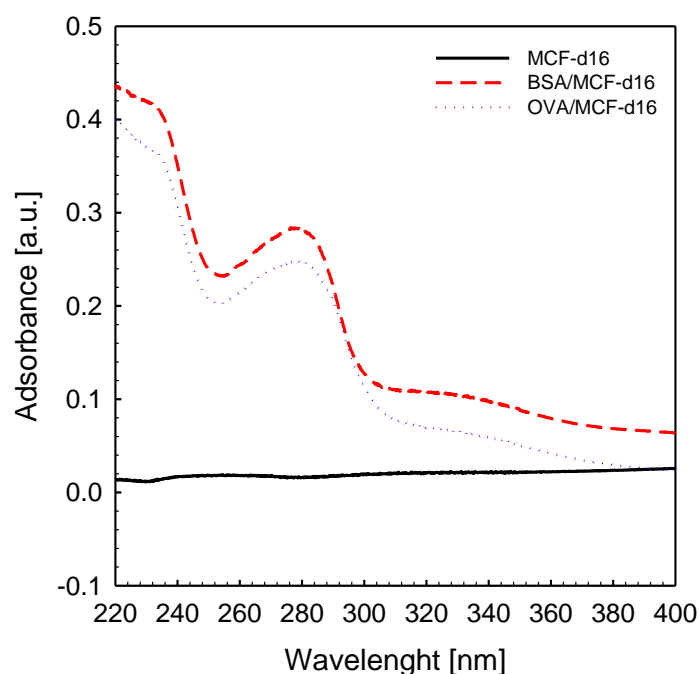


Fig. S2. Diffuse reflectance UV-Vis spectra for pure MCF-d16 material and after protein adsorption. Adsorption conditions: $c_0=5$ mg/ml (initial concentration of protein solution); $t_{ads}=24$ h; $T=298$ K; pH=7.4 (phosphate buffered saline).

PUBLIKACJA [D2]



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Mesoporous silica/protein biocomposites: Surface, topography, thermal properties

Agnieszka Chrzanowska*, Anna Derylo-Marczewska

Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University, M. Curie-Skłodowska Sq. 3, 20-031 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 May 2019

Received in revised form 9 July 2019

Accepted 2 August 2019

Available online 03 August 2019

Keywords:

Protein adsorption

Mesocellular foam

Protein/MCF characteristics

Thermal analysis

ABSTRACT

The biocomposite systems based on mesoporous MCF silica support and protein molecules are characterized with regard to their surface, topographic, thermal properties. Mesoporous silica materials (MCF) covered by the adsorbed protein molecules (BSA and OVA) were examined and characterized by using various techniques including X-ray diffraction, the Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance, X-ray photoelectron spectroscopy and scanning electron microscopy with microanalysis. The results of study focused on a detailed analysis of microstructure (topography, texture), and chemistry (chemical bonds, functional groups, elemental composition) of protein/mesoporous silica biocomposite. Moreover, the thermal properties of prepared biomaterials were investigated by means of TG/DSC-FTIR-MS-coupled technique. These powerful methods provided detailed information for understanding protein adsorption on MCF. Significant differentiation in surface chemistry and topography of MCF material was observed after protein adsorption. Basing on the results of thermal analysis stronger changes of the surface properties and more stable interactions of biomolecules with MCF-d16 support were observed for larger BSA molecules compared to smaller ovalbumin ones.

© 2019 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

With increasing application of biomolecules, especially proteins, in many different technologies, ranging from pharmaceuticals to biomaterials and biosensors, there has appeared a need for detailed analysis of protein adsorption on solid surfaces and especially interactions with supports. The protein–surface interactions are intensively investigated with regard to wide applications of biocomposite materials in the field of nano-biotechnology and material science. Fundamentally, the protein–surface interactions are responsible for the biocompatibility of medical devices (biomedical implants, biosensors, biochips, artificial organ and tissue, therapeutic nano-devices, etc.) [1–7]. After a contact of a solid material with a fluid containing the soluble proteins (e.g. blood, interstitial fluid), the rapid process of albumin adsorption is initiated saturating soon the support surface. The albumin adsorption capacity and selectivity as well as the protein layer organization on solid surface is affected by the specific properties of individual proteins, environment conditions, and properties of the surfaces. In particular, the physicochemical, structural and morphological properties of solid surface are important in adsorption process (rate, efficiency and selectivity of adsorption) of biomolecules as well as in protein–surface interactions (adhesion, stable interaction adsorbent/adsorbate) [8]. In order to increase the efficiency and selectivity of adsorption, and the affinity of

the support to adsorbed biopolymers, the proper control and modification of the support surface at the micro- and nanolevel is essential. The key parameters affecting the adhesion and stability of the protein layer are the micro- nanostructure, surface morphology, texture, chemical character of the material. Considering the above factors influencing protein adsorption, the support surface can be designed for specific proteins in order to control the interactions between the biomolecules and the material. Depending on the requirements, it is possible to design a protein-repulsive surface that prevents cell adhesion (e.g. for blood-contacting devices), or promote adhesion and cell differentiation (e.g. for skin and bone substitutes) [9]. At the same time, the important features of functional solid supports for biomedical applications are: their biotolerance, inertness and chemical stability with respect to the biopolymers tested. Mesoporous silica materials like mesocellular silica foams (MCF) due to their desirable and unique properties as well as possibility of functionalization and differentiation of the surface properties (physicochemical character, chemical composition, functional groups, acid/base features), structure (geometry, specific surface area, pore sizes and shapes, pore volumes,) and morphology (texture, roughness, porosity) in synthesis process, are very attractive group of adsorbents which can be useful as carriers for the compounds showing biological activity. Due to a large specific surface area and pore volume, these materials represent “nano-tools” for obtaining the new functional biomedical materials with strictly defined structural and surface properties which can be used as specific carriers for the analysis and characterization of model biological systems and biomedical materials.

* Corresponding author.

E-mail address: agnieszka.chrzanowska@poczta.umcs.lublin.pl (A. Chrzanowska).

The present study aims to investigate the influence of adsorption of bovine serum albumin (BSA, molecular mass: 66.5 kDa, dimensions: 4 nm × 4 nm × 14 nm (prolate ellipsoidal shape) or 8 nm × 8 nm × 3 nm (heart shape), hydrodynamic diameter: 7.3 nm, isoelectric point IEP: 4.7) [10–13] and ovalbumin from chicken egg albumin (OVA, molecular mass: 45 kDa, dimension: 7 × 4.5 × 5 nm (ellipsoidal shape), hydrodynamic diameter: 5.9 nm, isoelectric point IEP: 4.6) [14–17] on the characteristics of mesoporous silica support. The quantitative and qualitative studies of structure and surface properties of biocomposite systems consisting of mesoporous MCF silica support and protein molecules were performed by various physicochemical techniques such as XRD, ATR-FTIR, XPS, SEM/EDS and TG/DTG-DSC and TG/FTIR, TG/DSC-MS. The structural properties of the protein/silica supports were determined by the X-ray diffraction patterns (XRD). The changes in bonding character and conformation changes caused by adsorption of protein molecules on the mesoporous support, and physical interactions between the protein molecules and silica surface were monitored by using ATR-FTIR infrared spectroscopy. In order to obtain relevant information on chemical bonding and composition of the protein/silica composite surface, the photoelectron spectroscopy (XPS) was used. Additionally, the topography at the micro-nanoscale (structure imaging) and elemental composition were also investigated by using the scanning electron microscopy with X-ray microanalysis (SEM/EDS). Likewise, the thermal stability of protein/silica composites and analysis of the decomposition product through in-depth analysis of the evolved gas was studied using combination of thermogravimetric analyzer (TG) with a mass spectrometer (MS) or a Fourier transform infrared spectrometer (FTIR). Such investigations are important taking into account the application character of the systems consisting of porous material and proteins, thus, the proposed studies give the detailed characterization of textural properties, thermal stability and silica-protein interactions, being a supplement for the results presented in the literature.

2. Experimental section

2.1. Materials and reagents

The study was carried out using the ordered mesoporous MCF-d16 silica material characterized by the specific surface area 495 m²/g, the total pore volume ~1.98 cm³/g and the average hydraulic pore diameter ~16 nm (the parameter values estimated from nitrogen adsorption/desorption isotherms). The pore sizes of the support were about 2 or 2.5 times larger than the hydrodynamic diameters of BSA and OVA molecules allowing the diffusion and adsorption process of both adsorbates in internal space of MCF. The details of synthesis procedure of MCF materials are described in another paper [18].

Bovine serum albumin (BSA, purity ≥ 98%, Cat. No. A7906, Sigma-Aldrich) and ovalbumin from chicken egg albumin (OVA, purity ≥ 98%, Cat. No. A5503, Sigma-Aldrich) were employed as model protein enzymes for adsorption studies. Protein stock solutions ($V = 50$ ml, $c_0 = 5$ mg/ml) in 0.1 M phosphate buffered saline solutions (PBS at pH = 7.4) and MCF-d16 material (200 mg dried at 423 K for 24 h) were added to adsorption vessels. Next, the prepared suspension was placed in the incubator shaker (New Brunswick Scientific Innova 40R Model) and was shaken at 25 °C with 110 rpm for $t_{ads} = 24$ h (t_{ads} – time available for adsorption processes). After attaining equilibrium the mesoporous silica with adsorbed BSA and OVA molecules were separated from the solution, dried at room temperature and then, used to further analysis. From the adsorption experiment the adsorbed amounts of both proteins were estimated: 0.214 g/g for BSA, 0.205 g/g for OVA.

2.2. Analytical techniques

In order to control the albumin interactions with support surface the Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) with attenuated total

reflectance (ATR) was used. ATR-FTIR spectra were collected in a range of wavenumbers 4000–400 cm⁻¹ with 64 scans per spectrum at a resolution 4 cm⁻¹ using IR spectrometer TENSOR 27 (Bruker, Germany).

The powder X-ray diffraction (XRD) method was used for structure analysis of native MCF-d16 silica and protein/silica composites. The small angle XRD diffraction measurements were conducted using the Empyrean diffractometer (PANalytical, 2012, Netherlands) using monochromatic CuK α radiation source ($\lambda = 1.5418$ Å) in the range of 2θ from 0.13° to 5.00° in steps 0.01°.

The chemical binding and surface chemical composition of biocomposites protein/silica were analyzed using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The XPS studies were performed in a multi-chamber UHV analytical system (Prevac, Poland) equipped with a hemispherical electron analyzer VG Scienta R4000 ($U = 12$ kV, $I_e = 300$ mA) and a monochromatized AlK α source (MX 650 X Ray Source Monochromator) working at 360 W. The AlK α line at 1486.6 eV was applied for the ex situ XPS measurements. The base vacuum in the analysis chamber during the measurements was in the range $1 \cdot 10^{-9}$ mbar. The analyzer pass energy was set at 200 eV (0.5 eV/step) and 50 eV (0.1 eV/step) for high resolution core level C 1s, O 1s, N 1s spectra. All the core level binding energies were calibrated for C 1s line at 284.8 eV. Data processing and curve-fitting procedure were carried out by using Gaussian-Lorentzian curve fitting function with a Shirley type background subtraction method in the CasaXPS software (v 2.3.17 PR 1.1).

Characterization of the surface morphology at the micro-nanoscale and quantitative analysis of elemental composition (i.e. Si, C, O, N) of native support and composites were verified using scanning electron microscope (SEM) Quanta 3D FEG (FEI, Field Electron and Ion Co.) with the energy dispersive X-ray spectrometry (EDS).

The thermal analysis of the MCF-d16 material without and with the adsorbed proteins was made on a STA 449 Jupiter F1 Netzsch (Germany) at the following measurement conditions: heating rate of 10 °C/min under a dynamic atmosphere of synthetic air conditions with flow rate 50 ml/min, temperature range from 30 to 950 °C, mass samples ~18 mg, sensor thermocouple type S TG-DSC. The gaseous products of decomposition were identified by means of FTIR spectrometer Bruker (Germany) and then, analyzed by Quadrupole Mass Spectrometer QMS 403C Aëolos (Germany) coupled on-line to the STA instrument. The QMS data were collected in the range from 10 to 300 amu. The FTIR spectra were gathered in the spectral range 600–4000 cm⁻¹ with 16 scans per spectrum at a resolution of 4 cm⁻¹

3. Results and discussion

3.1. Structural characterization of protein/MCF silica composites

To study the structure of MCF-d16 silica support and to prove that OVA and BSA molecules are effectively located in its mesopores the small angle X-ray diffraction (XRD) measurements were carried out. Fig. 1A shows XRD patterns recorded in a small diffraction range of 2θ for pure silica and after immobilization with BSA and OVA molecules adsorbed from protein solutions at pH = 7.4 (PBS). The powder XRD patterns of studied materials with the background subtracted are presented in Fig. 1B. The obtained small-angle XRD results recorded in the 2θ range 0.13°–3.0° for native MCF-16d material revealed three Bragg's reflections: one intense well-resolved reflex at $2\theta = 0.51^\circ$ and two higher-ordered weak and broader reflections at $2\theta = 0.86^\circ$ and 1.22° with exponentially reducing intensities, confirming the regular structure (pore arrangement) of the studied support. This behavior is characteristic for native mesoporous MCF silica supports, due to their ultra-large spherical pores (cells) that are interconnected by uniform windows to generate a continuous 3D pore system [19,20]. For the studied materials the total integrated areas (A_{peak}) and interplanar spacing (d) for the strong primary diffraction peaks are also given in Fig. 1B

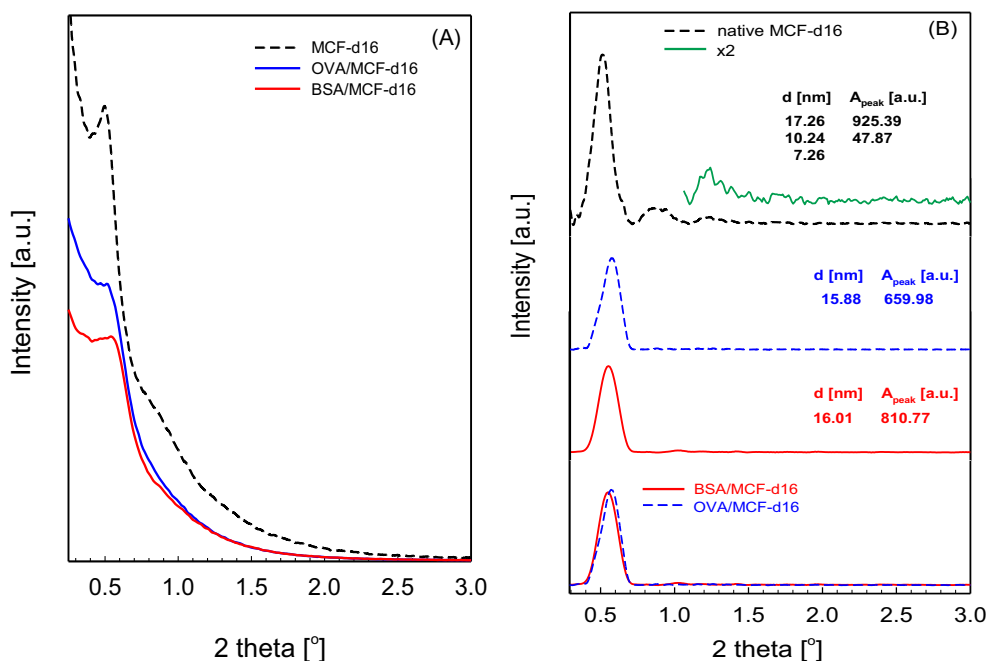


Fig. 1. (A) XRD patterns recorded in small diffraction range of 2θ for native MCF-16d material, BSA/MCF-16d and OVA/MCF-d16 composites; (B) the patterns with the background subtracted.

(inset). The interplanar spacing, d , reflecting pore size for the native MCF-d16 sample was estimated at 17.26 nm, 10.24 nm, 7.26 nm. In the case of samples with the adsorbed proteins only one intense well-resolved diffraction peak was observed (Fig. 1B). It can be seen that the first diffraction peaks for BSA/MCF-d16 and OVA-d16 composites are shifted towards higher values of 2θ ($2\theta = 0.55^\circ$ for BSA/MCF-d16 and $2\theta = 0.57^\circ$ for OVA/MCF-d16 samples) in comparison to MCF-d16 ($2\theta = 0.51^\circ$). It means that the pore sizes upon protein adsorption are decreased (the interplanar spacing $d = 15.88$ nm for OVA adsorption and $d = 16.01$ nm for BSA adsorption). Moreover, for the samples with adsorbed proteins the significant decrease of intensity of the first Bragg's reflections is observed (the peak heights for BSA/MCF-d16 are reduced about $\sim 38.8\%$, while for OVA/MCF-d16 are dropped about $\sim 37.2\%$ in relation to the pure silica material). Likewise, the total areas of the XRD peaks for the samples with adsorbed proteins are lower in comparison to pure support. The disappearance of two diffraction reflections, and the decrease of peak intensity and area after protein adsorption indicate the diminishing of biocomposite structure ordering. This fact indicates the presence of protein molecules inside the silica pores, and it is probably related to the higher electron density contrast between the silica walls and the open pores in comparison to this contrast between the silica walls and the protein molecules [21].

3.2. Protein/MCF interactions

Protein-solid surface interactions frequently results in conformation and/or orientation changes within the adsorbed layers [22]. The structures of albumins are relatively unstable, the proteins tend to unfold which results in additional interactions between the internal molecule regions and solid surface [23]. The changes in adsorbate-adsorbent interactions were monitored by using ATR-FTIR spectroscopy. The comparison of typical ATR-FTIR spectra collected in the range of $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ for the pure MCF material, the protein/silica composites and the native albumins are presented in Fig. 2. In the case of the native MCF-d16 silica, the typical bands for siliceous Si—O—Si material are observed. A broad and intensive band at 1067 cm^{-1} is assigned to Si—O—Si asymmetric stretching vibrations of the silicate network;

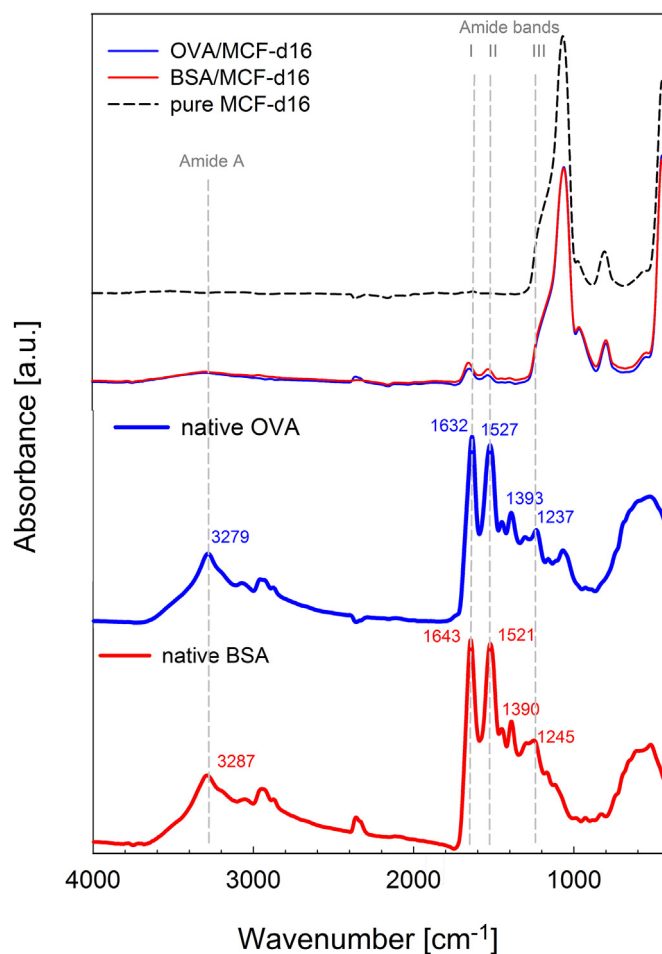


Fig. 2. ATR-FTIR spectra for the native BSA and OVA proteins, MCF-d16 support, BSA/MCF-d16 and OVA/MCF-d16 composites.

band at 965 cm^{-1} – to Si—OH stretching vibrations of the hydrogen-bonded silanol groups; a band at 808 cm^{-1} – to Si—O—Si symmetric stretching vibrations of the silicate network; a band at 450 cm^{-1} – to bending vibrations of Si—O—Si moieties [24–26]. These bands compared with the bands recorded for MCF-d16 material covered by proteins are slightly red shifted. These shifts are probably due to the existence of protein molecules on the surface of porous silica material. Additionally, for both protein/silica composites the change in the shape of the band assigned to stretching of Si—O—Si moieties is caused by differentiations in the interactions of BSA and OVA with the silica surface.

As can be seen in Fig. 2, the ATR-FTIR spectra of protein/silica composites (BSA/MCF-d16; OVA/MCF-d16) confirm the presence of protein functional groups. It is apparent that the characteristic bands found in the ATR-FTIR spectra of native proteins and polypeptides include the Amide I, Amide II, and Amide III bands (arising from the Amide bonds that link the amino acids), as well as Amide A band. The Amide bands give information on the secondary structure of polypeptides and proteins. Analysis of the shape and position of bands in the Amide I region allows identification of α -helical ($1650\text{--}1658\text{ cm}^{-1}$ for aqueous solution), antiparallel, and parallel β -sheet ($1620\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ for aqueous solution) structures. Interpretation of this region of FTIR spectra for proteins is difficult as a result of overlapping of the bands assigned to α -helical and random structures [27,28]. The absorption band associated with the Amide I band ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$; 1643 cm^{-1} for BSA and 1632 cm^{-1} for OVA) is connected with the stretching vibrations of the C=O bond (ca. 80% contribution from the local C=O stretching vibration in the normal mode) of the peptide linkages the frequency of which depends on the strength of hydrogen bond and the interactions between the amide units. Generally, the changes of hydrogen bonds in the peptide linkages result in the vibrational frequency changes of different Amide bands. The absorption associated with the Amide II band ($1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$; 1521 cm^{-1} for BSA and 1527 cm^{-1} for OVA) is connected primarily with the bending vibrations (rocking) of the N—H (ca. 60%) bond coupled with the C—N (ca. 40%) stretching vibrations of peptide groups. The Amide III band ($1200\text{--}1330\text{ cm}^{-1}$; 1245 cm^{-1} for BSA and 1237 cm^{-1} for OVA) is a result of the C—N stretching (ca. 40%) and N—H bending (rocking) modes (ca. 30%) [29–33]. A broad band with maximum near 3280 cm^{-1} (Amide A band) for both native proteins is attributed to the hydrogen bonded N—H stretching vibration, the peaks between 2800 and 3000 cm^{-1} are attributed to the C—H stretching vibration [34]. The peak near 1400 cm^{-1} can be assigned to the protein side-chain COO— symmetric stretching vibration (the COO— asymmetric stretching vibration probably overlaps with the Amide I band).

As compared with the native BSA, the Amide I band for BSA/MCF-d16 composite is blue shifted up to 1658 cm^{-1} (i.e., by $\sim 15\text{ cm}^{-1}$ to higher wavenumber). Such a blue shift may indicate weakening of the intermolecular C=O \cdots H—N hydrogen bonds between the protein chains and/or intramolecular hydrogen bonds of a chain forming the α -helix. The same applies to the Amide II band, which for the BSA/MCF-d16 composite is also blue shifted up to 1532 cm^{-1} (i.e., by $\sim 11\text{ cm}^{-1}$) [35,36]. In the case of the native OVA/MCF composite, similar shifts of the Amide I and Amide II bands in ATR-FTIR spectrum were also found for OVA/MCF composite. This time, the positions were blue shifted by 25 and 5 cm^{-1} for Amide I and Amide II bands, respectively. It is worth mentioning that the blue shift of the Amide I band upon protein adsorption is consistent with the observed blue shift of the Amide A band (by 11 and 17 cm^{-1} for BSA/MCF-d16 and OVA/MCF-d16, respectively).

For both protein/silica composites, the higher Amide I band position corresponds to weaker hydrogen bonding, leading to more flexible helices, probably as a consequence of the interactions between the proteins and porous silica surface [37]. However, this issue was not elucidated further. These results suggest that the structure of both proteins upon adsorption on MCF silica surface was altered.

3.3. Microstructure and surface composition of biomaterials

The surface composition analysis of protein/silica biocomposite and chemical binding state between the protein molecules and silica surface were investigated by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). In order to identify components and functional groups on the MCF-d16 and composite surface, survey and high-resolution core-level XPS spectra of the O 1s, N 1s, C 1s were measured. Fig. 3 shows typical XPS survey spectra of MCF-d16 and silica/protein composite. The qualitative and quantitative chemical analysis obtained from XPS data are given in Table 1. As follows from the data presented in Fig. 3 and Table 1 the surface of pure silica material was mainly composed of silicon ($29.6 \pm 0.1\text{ at.}\%$), oxygen ($57.6 \pm 0.2\text{ at.}\%$) and very small amount of carbon ($2.8 \pm 0.2\text{ at.}\%$); clearly visible photoelectron peaks of O 1s at 532.5 eV , C 1s at 284 eV and Si 2p at 103.5 eV and directly linked O 2s (154.5 eV) and Si 2s (25.6 eV). As a result of biomolecules immobilization three main elements, O, C, and N (from amino acids in protein) with traces of Na, Cl (derived from PBS solution) and Si atoms (related to the organic matrix of silica support) were detected (Fig. 3). The survey scan obtained for OVA/MCF-d16 composite surface showed a major peak at binding energy 532.5 eV and 285.5 eV , corresponding to relative atomic concentration of O ($41.8 \pm 0.2\text{ at.}\%$) and C ($24.3 \pm 0.2\text{ at.}\%$), respectively, and minor peak at 400 eV corresponding to N ($6.3 \pm 0.2\text{ at.}\%$) (Fig. 3, Table 1). For BSA/MCF-d16 silica composite surface, the XPS survey scan revealed a major photoelectron signal of O at binding energy 532.5 eV and signals at 285 and 400.5 eV corresponding to C and N with atomic concentration of around $\sim 38.8 \pm 0.2\text{ at.}\%$, $29.9 \pm 0.2\text{ at.}\%$ and $6.4 \pm 0.2\text{ at.}\%$, respectively (Fig. 3, Table 1). For OVA/MCF-d16 composite, the surface composition revealed a higher C level ($21.5 \pm 0.2\text{ at.}\%$, $14.4 \pm 0.2\text{ wt.}\%$) and lower O level ($15.8 \pm 0.2\text{ at.}\%$, $8 \pm 0.2\text{ wt.}\%$), in comparison to the pure silica surface. Significant increases in C and decreases in O concentrations were found in the case of large BSA molecules: $27.1 \pm 0.2\text{ at.}\%$ ($18.7 \pm 0.2\text{ wt.}\%$) more of C and $\sim 18.8 \pm 0.2\text{ at.}\%$ ($9.5 \pm 0.2\text{ wt.}\%$) less of O. The relative elemental composition of C, O, N for BSA/MCF-d16 surface compared to OVA/MCF-d16 was proved to be $\sim 5.6\text{ at.}\%$ more of C content, $\sim 0.1\text{ at.}\%$ more of N, and $\sim 3\text{ at.}\%$ less of O. Moreover, for both composites the O 1s photoelectron signal is broader, especially upon BSA adsorption. Furthermore, the full width at half maximum calculated for O 1s signals was: 2.33 eV for MCF-d16, 2.58 eV for OVA/MCF-d16, and 2.51 eV for BSA/MCF-d16. As mentioned above, the oxygen concentration is also reduced for the composites (Table 1), because large part of MCF-d16 material is covered by the adsorbed protein molecules less rich in oxygen atoms [38]. It is interesting to note that the N 1s signal is specific for the proteins since no nitrogen was found on pure silica surface in contrary to the C 1s and O 1s signals which were detected for all materials. The change in the atomic and mass ratios for nitrogen to carbon (N/C), often used as a detection marker for proteins [39], are compared in Table 1. According to these data, markedly higher values for atomic

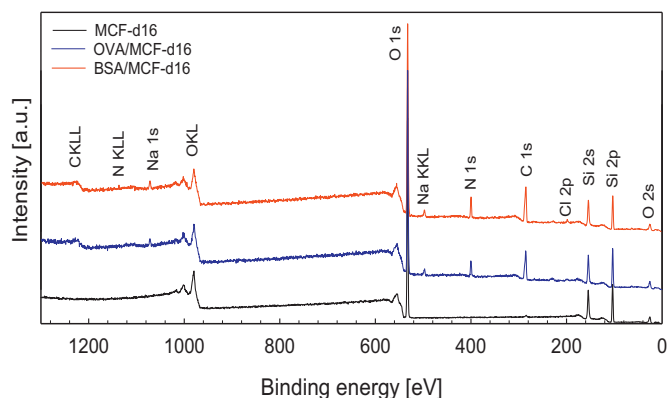


Fig. 3. XPS survey spectra for MCF-d16 and protein/silica composites.

Table 1

XPS survey spectra data, chemical compositions, and elemental concentration (atomic% and mass%) for MCF-d16 and protein/silica composites.

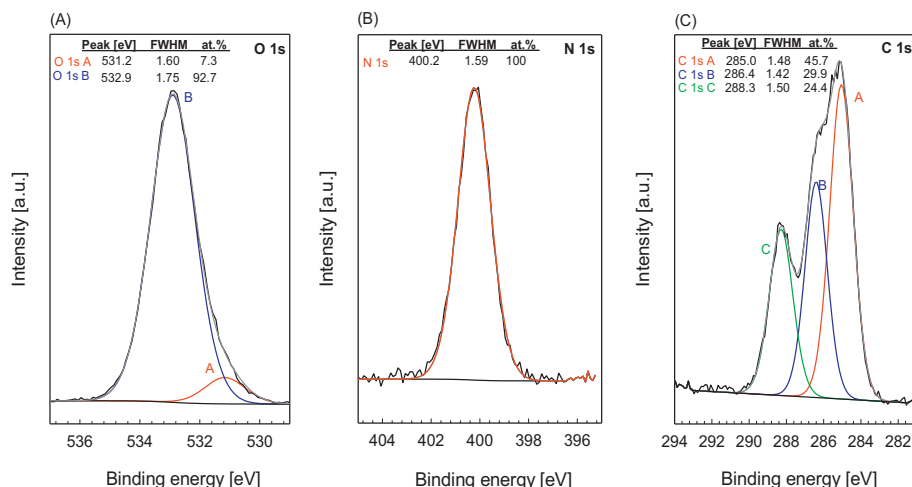
Sample	Peak	Binding energy [eV]	Full width at half maximum (FWHM)	Concentration		Ratio C/N	
				at.%	wt%	at.%	wt%
MCF-d16	Si 2p	103.5	2.49	29.6 ± 0.1	40.2 ± 0.1		
	O 1s	532.5	2.33	57.6 ± 0.2	44.6 ± 0.2		
	C 1s	284.0	3.63	2.8 ± 0.2	1.6 ± 0.1	–	–
	Si 2s	154.5	3.04	–	–		
	O 2s	25.6	3.79	–	–		
OVA/MCF-d16	Si 2p	103.5	2.49	26.4 ± 0.1	40.7 ± 0.1		
	O 1s	532.5	2.58	41.8 ± 0.2	36.6 ± 0.2		
	N 1s	400.0	2.36	6.3 ± 0.2	4.9 ± 0.2	3.86	3.26
	C 1s	285.5	3.63	24.3 ± 0.2	16.0 ± 0.2		
	Na 1s	1071.5	3.08	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1		
	Cl 2p	198.5	1.80	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1		
	Si 2s	154.3	3.05	–	–		
	O 2s	25.9	3.70	–	–		
BSA/MCF-d16	Si 2p	103.5	2.32	23.6 ± 0.1	37.4 ± 0.1		
	O 1s	532.5	2.51	38.8 ± 0.2	35.1 ± 0.2		
	N 1s	400.5	2.61	6.4 ± 0.2	5.0 ± 0.2	4.67	4.06
	C 1s	285.0	3.77	29.9 ± 0.2	20.30 ± 0.2		
	Na 1s	1072.0	2.85	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1		
	Cl 2p	200.0	1.34	0.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1		
	Si 2s	154.4	2.78	–	–		
	O 2s	25.5	3.46	–	–		

and mass N/C ratios were obtained for the BSA/MCF-d16 (atomic N/C ratio ~4.67 and mass N/C ratio ~4.06) compared to the OVA/MCF-d16 (atomic N/C ratio ~3.86 and mass N/C ratio ~3.26). It is apparent that, the smaller ovalbumin (45 kDa) in comparison to the large BSA (66.4 kDa) generates a lower signal of nitrogen reflecting the thickness of albumin layer [40]. It was also stated that the N 1s survey spectrum for the sample BSA/MCF-d16 was evidently broader (higher value of FWHM) than for the OVA/MCF-d16. It was also observed that the C 1s peaks were shifted to higher binding energies after protein adsorption (this effect is enhanced for BSA) compared to pure silica. These facts suggest that more aliphatic carbons of the amino acid groups of BSA, such as tyrosine residues [41] were exposed on the MCF-d16 support.

For identification of the possible functional groups with a specific element (O, N, C) the high-resolution XPS studies were performed. The deconvoluted O 1s, N 1s and C 1s high-resolution core-level XPS spectra and their properties are presented in Fig. 4(A–C) and Fig. 5(A–C), respectively. The XPS analysis of deconvolution of O 1s high resolution core-level spectrum of the OVA/MCF-d16 (Fig. 4A) and BSA/MCF-d16 (Fig. 5A) samples revealed two components of oxygen (O 1s A and O

1s B). The O 1s A photoelectron peak was attributed mainly to oxygen forming a double bond with carbon (O=C=O and O=C–N) at a binding energy around 531.0 eV for OVA/MCF-d16 and 531.2 eV for BSA/MCF-d16. On the other hand, the O 1s B component located at 532.8 eV for OVA and 532.9 eV for BSA was related to oxygen singly bonded with hydrogen (C–OH). In addition, the detected positions of deconvolution of O 1s XPS core level photoelectron signals indicate that the O 1s photoelectrons distinctly correspond to peptidic oxygen of proteins [42,43].

The deconvoluted N 1s high resolution XPS spectra for OVA/MCF-d16 and BSA/MCF-d16 are depicted in Figs. 4B and 5B, accordingly. The deconvolution of N 1s core-level spectra for OVA/MCF-d16 (Fig. 4B) exposes only one component, positioned at binding energy 400.2 eV, characteristic for amine (C–NH₂) groups [44,45]. In the case of BSA/MCF-d16 two components (N 1s A and N 1s B) were found in the N1s high-resolution XPS spectra (Fig. 5B). The first peak for component N 1s A with a binding energy of 400.2 eV is attributed to nitrogen in amine groups and second N 1s B peak detected around 402.2 eV is assigned to HN–C(O)O/N–C=C functions [46]. Generally, the N 1s

**Fig. 4.** The high-resolution (A) O 1s, (B) N1s and (C) C 1s core-level XPS spectra for OVA/MCF-d16.

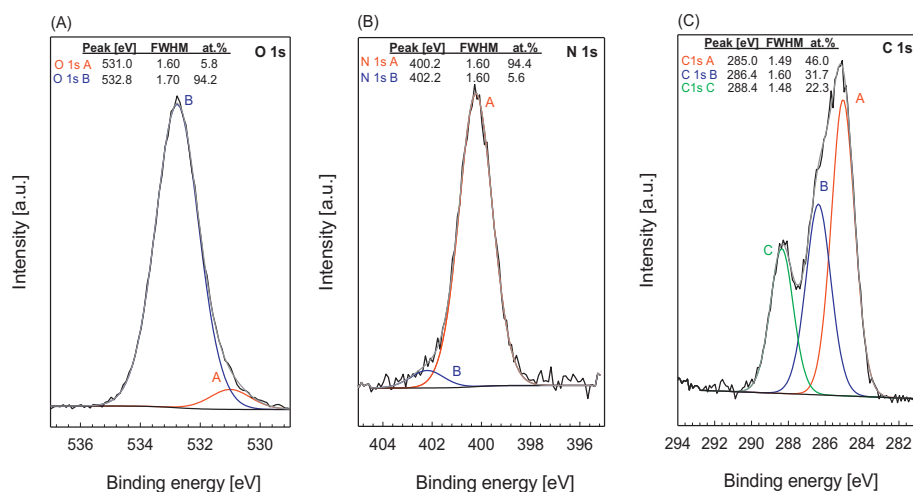


Fig. 5. The high-resolution O 1s, N 1s and C 1s core-level XPS spectra of BSA/MCF-d16.

photoelectron peaks close to 400 eV are specific for nitrogen in organic matrix, assigned to carbon with one nitrogen bond (C—N), confirming protein immobilization on MCF surface [47].

Figs. 4, 5C present the deconvolution of C 1s core-level XPS spectra registered for silica surface with immobilized proteins. The XPS data (binding energies positions, FWHM, at.%) for the detected high-resolution C 1s core-level photoelectron signals were also performed (Figs. 4, 5C inset). Analyzing the region deconvolution of C 1s photoelectron peaks on high-resolution core-level XPS spectra for OVA/MCF-d16 and BSA/MCF-d16 composites one can state that C 1s photoelectron peaks were decomposed in accordance with the binding energies of carbon bonds in proteins. For both studied samples the C 1s peaks are well decomposed (Figs. 4, 5C) with three components (C 1s A, C 1s B, C 1s C); at a binding energy of around 285 eV corresponding to C—C or C—H bonds (C 1s A); at ~286.4 eV assigned to C—O bond (C 1s B); and at

~288.4 eV assigned to C=O bond (C 1s C) [31,48,49]. According to Lebugle et al. [50] and Deligianni et al. [51] these are typical carbon bonds occurring in proteins: C 1s photoelectron signals in the C 1s spectrum recorded for BSA protein were well decomposed with one main component centred at 285 eV assigned to aliphatic carbons of the amino acid pending groups and two additional components positioned at 286.5 and 288.2 eV assigned to NH—CHR—CO carbon of the protein backbone and —C(—O)—NH₂ peptide carbon, respectively.

The scanning electron microscopy (SEM) with the energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) was used for characterization of microstructure, morphology and chemical composition of pure mesoporous silica surface and protein/silica composites. The two-dimensional (2D) visualization of surface morphology and microstructure of the pure MCF-d16 silica support and the biocomposites registered by SEM, are depicted in Fig. 6(A–C). Comparing the presented 2D SEM topographic

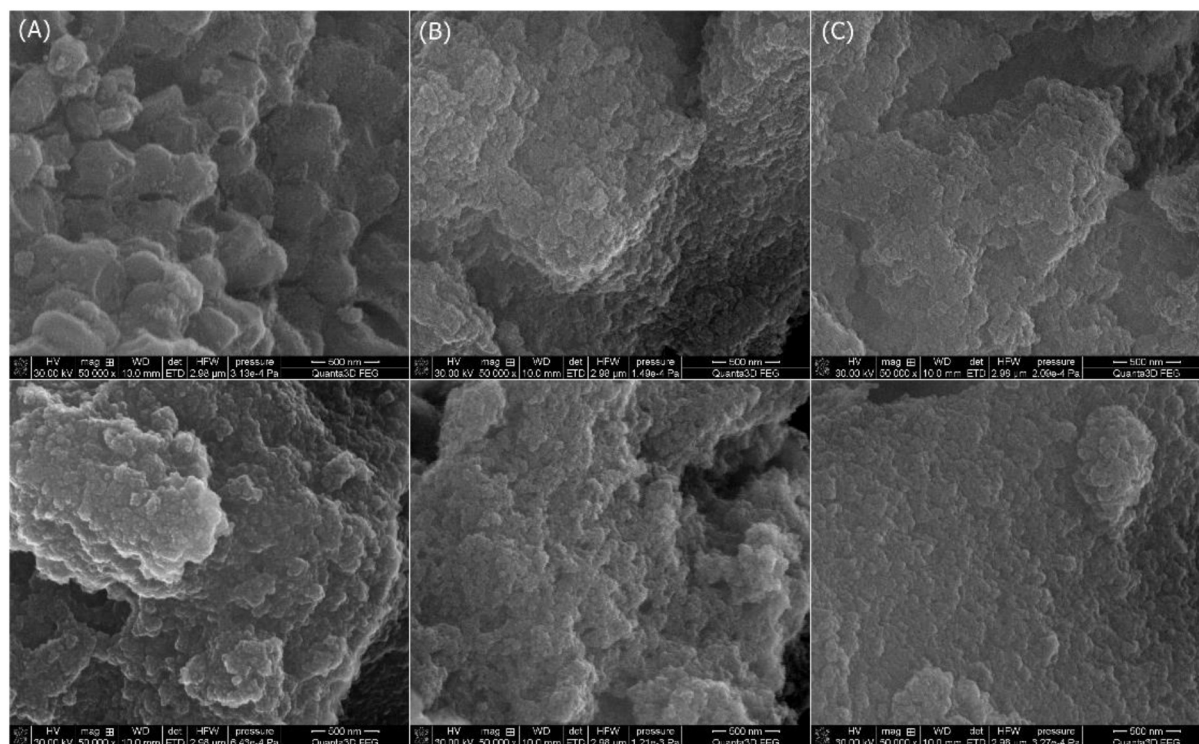


Fig. 6. SEM micrographs of MCF-d16 silica (A), OVA/MCF-d16 (B) and BSA/MCF-d16 (C) composites.

images for the MCF-d16 surface without/with proteins the significant changes in the surface morphology and microstructure can be observed. The SEM micrographs of the MCF-d16 silica support show relatively large grains with differentiated sizes. In the case of biocomposites OVA/MCF-d16 and BSA/MCF-d16, the surface topography and texture change to a large extent in contrary to the pure MCF-d16 surface, the topography and microstructure of biocomposite surface become less porous and rough. This effect is especially evident for BSA/MCF composite and is connected with larger sizes of BSA molecules and its concentration.

The qualitative and quantitative (wt%, at.%) analysis of the chemical composition of MCF-d16 silica support covered by the proteins was conducted by using SEM/EDS measurements (Table 2). From EDS microanalysis, the surface composition (at.%) of OVA/MCF-d16 composite in contrary to the pure MCF-d16 is as follows: ~1.7 at.% (8.55 wt%) less of oxygen, ~1.9 at.% (3.18 wt%) more of carbon, ~1.3 at.% (0.97 wt%) more of nitrogen. In the case of BSA/MCF-d16 composite the EDS results indicate markedly higher content of C ~4.87 at.% (3.19 wt%), higher content of N ~1.66 at.% (1.25 wt%), and lower content of O ~3.26 at.% (9.82 wt%) in relation to pure silica. This is also confirmed by the N:C ratio before/after protein adsorption; higher value of N:C ratio for the BSA than for the OVA containing composites in relation to pure MCF-d16 silica support are found. It may be concluded that BSA adsorption leads to larger variation in surface morphology and local concentration of chemical elements of reference MCF-d16 silica surface than in the case of OVA albumin adsorption. These results are in fairly accordance with those obtained by the XPS analysis.

3.4. TG/DTG-DSC, TG/FTIR and TG/DSC-MS analysis

The thermogravimetric methods TG, DTG and DSC were performed to provide information about interactions between biomolecules and silica particles as well as thermal stability of the composites. Fig. 7 presents the TG curves as mass changes vs. temperature and DTG curves as mass changes vs. time during material heating. The DSC curves of thermal decomposition are compared in Fig. 8. The corresponding values of TG mass loss, DTG and DSC peaks are given in Tables 3 and 4, respectively. Analyzing the TG/DTG-DSC results for pure MCF-d16 one can distinguish two stages in the heating processes in atmosphere of synthetic air in the range 30–900 °C. The first region ranges from 30 to 165 °C with the minimum at 85 °C on the DTG curve and the mass loss of 0.19% corresponds to the endothermic evaporation of hygroscopically and physically adsorbed water. The second region in the temperature range 165 to 900 °C with mass loss of 2.05% is associated with the desorption of structural water resulting from condensation and elimination of the silica surface hydroxyl groups. The total mass loss for pure silica material is approximately 2.24%. The observed results are in good accordance with the data reported by Zaharescu et al. [52] After protein adsorption, the thermal stability of composites was changed. As follows from the TG, DTG and DSC results, it is clearly visible that the processes of thermal degradation of both materials are significantly different in comparison

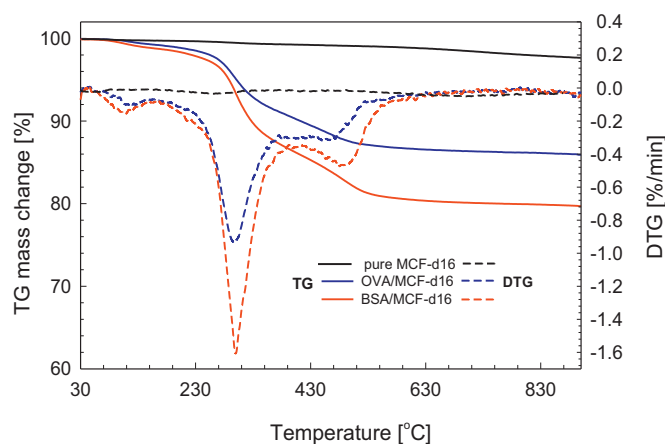


Fig. 7. TG, DTG profiles for MCF-d16 support and protein/silica composites.

to pure silica. The initial decomposition stage covers the temperature range 30–165 °C for both samples (minimum at $T_{max,IDS} = 116.1$ °C, $M_{loss,IDS} = 0.73\%$ and $T_{max,IDS} = 109$ °C, $M_{loss,IDS} = 1.13\%$ for OVA/MCF-d16 and BSA/MCF-d16, respectively), and is related to the removal of physically adsorbed water. The process is endothermic as it results from the DSC curves (Fig. 8). Decomposition of the protein/silica composites occurs in two major stages in the temperature ranges 165–420 °C and 420–900 °C with T_{max1} and T_{max2} on the DTG curves (Fig. 7, Table 3), and with T_{peak1} and T_{peak2} on the DSC curves (Fig. 8, Table 4), corresponding to the exothermic processes of protein molecules breakdown [53,54]. For OVA/MCF-d16 composite, the first major stage covers the temperature range 165–420 °C with T_{max1} at 296.4 °C and the mass loss of 9.43%. For the BSA/MCF-d16 sample, the mass loss for first stage with T_{max1} at 299.7 °C was estimated as 13.10%. The thermal degradation processes for this predominant stage are associated with the removal of weakly bound protein molecules from the silica surface (van der Waals forces). The second main decomposition step (above 420 °C) with the minimum at $T_{max2} = 451.1$ °C ($M_{loss2} = 3.69\%$) for OVA, and at $T_{max2} = 478.8$ °C ($M_{loss2} = 5.79\%$) for BSA corresponds to decomposition of protein molecules strongly associated with the MCF-d16 surface (electrostatic interactions) [55,56]. Comparing the total mass loss ($M_{loss,TOTAL}$) during the heating process of biomaterials, the BSA adsorption leads to increase the total mass loss of about 6.17% compared to OVA adsorption, which is in accordance with stronger adsorption of large BSA molecules on the MCF-d16 support. The differences in thermal stability of both adsorbed proteins are connected with their various physicochemical properties (different heat denaturation and conformational transitions in the protein structure) as well as protein-silica surface interactions. Due to BSA adsorption, the main peaks at $T_{max1,2}$ on the DTG curve and the peaks at $T_{peak1,2}$ on the DSC curve were shifted towards higher temperatures (more stable state) in contrary to OVA adsorption. Moreover, the larger values of enthalpy of decomposition

Table 2
Element contents for MCF-d16 and protein/silica composites from EDX analysis.

Sample	Si	O	C	N	Ratio N:C
Atomic%					
MCF-d16	25.61 ± 2.83	44.62 ± 5.83	28.52 ± 2.17	1.02 ± 0.17	0.031
OVA/MCF-d16	25.55 ± 3.69	42.92 ± 0.29	30.42 ± 4.16	2.32 ± 0.24	0.081
BSA/MCF-d16	25.21 ± 3.12	41.36 ± 2.41	33.39 ± 4.84	2.68 ± 0.13	0.088
Mass%					
MCF-d16	36.64 ± 4.08	46.96 ± 4.96	20.69 ± 2.09	0.85 ± 0.15	0.036
OVA/MCF-d16	36.24 ± 2.35	38.41 ± 0.95	23.87 ± 4.31	1.82 ± 0.21	0.087
BSA/MCF-d16	35.16 ± 1.51	37.14 ± 2.48	23.88 ± 4.32	2.10 ± 0.04	0.088

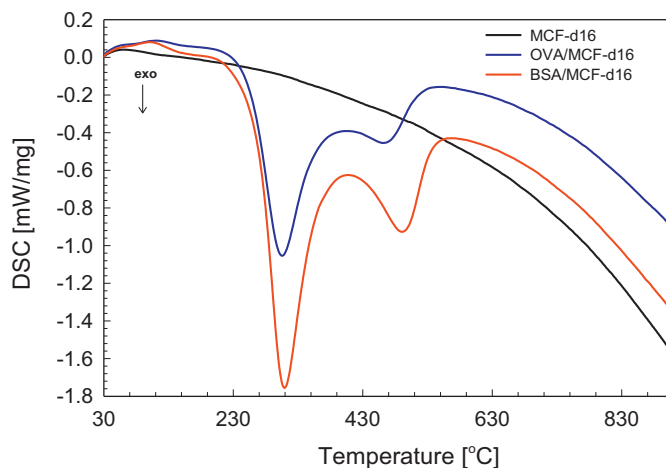


Fig. 8. DSC curves for MCF-d16 support and protein/silica composites.

(ΔH) estimated as the peak area from DSC curves (Fig. 8, Table 4) for BSA/MCF-d16 sample may indicate more favourable intramolecular interactions in the albumin [57,58].

To recognize the mechanism of thermal decomposition pathways of the adsorbed BSA and OVA on the silica surface, the analysis of the gaseous products was conducted by IR-spectroscopy with the Fourier transformation–thermogravimetry (TG/FTIR) and differential scanning calorimetry – mass spectrometry (TG/DSC-MS). 3D FTIR-TG spectra of the gas phase produced during thermal destruction of both composites in inert atmosphere gathered at different temperatures are displayed in Fig. 9(A,B). The MS profiles of the characteristic ion current (m/z) of gaseous decomposition products (m/z): 15 (CH_3); 17 (NH_3); 18 (H_2O); 26 (CN); 30 (NO); 44 (CO_2), 46 (NO_2); 64 (SO_2) are presented in Fig. 10(A–H). Fig. 10I demonstrates the MS profile of the main products (H_2O , CO_2) formed during decomposition of pure MCF-d16 support.

According to the obtained results, MCF-d16 support shows absorption bands in the ranges 1850 cm^{-1} – 1350 cm^{-1} and 3910 cm^{-1} – 3560 cm^{-1} as a result of rotation-vibration transitions within water molecules in the vapor (symmetric bending and both stretching vibrations, respectively). Carbon dioxide (from the residues of polymer matrix in silica material) gives an absorption band of medium intensity at 669 cm^{-1} (symmetric bending) and two very strong peaks at 2340 cm^{-1} and 2362 cm^{-1} (R and P branches of the asymmetric stretching vibration, respectively). The presence of these components is evidenced in the MS spectra (signals $m/z = 18$ for H_2O and $m/z = 44$ for CO_2 , Fig. 10I).

In 3D FTIR spectra corresponding to thermal decomposition of both protein/silica composites registered at the main degradation decomposition stages at T_{peak1} and T_{peak2} (Table 4), the absorption bands at ca. 2330 cm^{-1} , ca. 2350 cm^{-1} and 669 cm^{-1} (Fig. 9A,B) correspond to asymmetric stretching vibration (two first bands) and symmetric bending vibrations (the third band) of CO_2 . Additionally, the absorption bands at 3503 cm^{-1} and 3736 cm^{-1} as well as at ca. 1760 cm^{-1} at

Table 4
DSC data for OVA/MCF-d16 and BSA/MCF-d16 composites.

Sample	DSC							
	T_{onset1} [°C]	T_{peak1} [°C]	T_{end1} [°C]	ΔH [J/g]	T_{onset2} [°C]	T_{peak2} [°C]	T_{end2} [°C]	ΔH [J/g]
OVA/MCF-d16	252.8	305.4	352.9	−350.9	424.1	460.9	521.7	−62.39
BSA/MCF-d16	263.1	309.0	359.2	−542.6	443.7	491.1	540.0	−153.8

T_{onset} , temperature of the decomposition initiation; T_{peak} , peak maximum decomposition temperature; T_{end} , final decomposition temperature; ΔH , the heat generated during the decomposition reaction obtained by the integration of the thermal peaks (area).

T_{peak1} and T_{peak2} for both biocomposites correspond to the O–H stretching vibrations of water in the vapor phase (both stretching vibrations) as well as symmetric bending, respectively. The presence of these components is evidenced in the MS spectra of the gas phase formed during thermal destruction of the studied samples (Fig. 10C,F). The signals recorded for H_2O and CO_2 are present at $m/z = 18$ and $m/z = 44$, respectively. It is a result of a larger content of carboxyl groups which undergo decomposition with the CO_2 formation. Furthermore, 3D FTIR-TG spectra registered in the first main thermal decomposition process for both composites ($T_{peak1} = 309\text{ °C}$ for BSA; $T_{peak1} = 305.4\text{ °C}$ for OVA) reveal also the presence of NH_3 besides CO_2 and H_2O (965 cm^{-1} and 930 cm^{-1} corresponding to maxima of rotational branches of the symmetric bending vibration, and 1620 cm^{-1} corresponding to the Q-branch of asymmetric bending vibration; signal $m/z = 17$ on the MS spectrum, Fig. 10B). Quite intense bands at 714 cm^{-1} are attributed to bending vibrations of the HCN (a signal at $m/z = 27$ at the MS spectrum) [59]. The maxima of the CH stretching vibrations of the aliphatic groups present in the gaseous decomposition products of protein are located at 2895 cm^{-1} and 2971 cm^{-1} . It seems to be difficult to identify them precisely; it is possible that a number of aliphatic groups-containing gaseous products are released during thermal decomposition of the considered proteins which can be concluded from the presence of a number of the low-intensity bands exhibiting fine rotational structures in the fingerprint range. The presence of methyl groups in the gaseous decomposition products is confirmed by the presence of $m/z = 15$ signal corresponding to CH_3 (Fig. 10A). In this decomposition stage, the presence of sulfonate group in biocomposites was confirmed by the absorption bands at ca. 1370 cm^{-1} (asymmetric stretching vibration of the SO_2 molecule) (signal at $m/z = 64$ corresponding to SO_2). Other identified compounds were NO and NO_2 that give the signals $m/z = 30$ and $m/z = 46$ (1909 cm^{-1} and 1614 cm^{-1} corresponding to simple stretch of NO and asymmetric stretch NO_2 , respectively). Finally it should be noted that MS spectra show the higher characteristic ion current at m/z : 15 (CH_3), 17 (NH_3), 18 (H_2O), 44 (CO_2), 40 (NO), 46 (NO_2), 64 (SO_2), and 27 (HCN) of gaseous products formed during decomposition of BSA/MCF-d16 composite in comparison to OVA/MCF-d16 sample. This is a consequence of stronger adsorption of BSA on MCF-d16 support as compared with OVA. In conclusion, TG/FTIR and TG/DSC-MS analysis strongly indicates the formation of various additional gaseous products during the decomposition of protein/silica composites as compared

Table 3
TG and DTG data for OVA/MCF-d16 and BSA/MCF-d16 composites.

Sample	TG				DTG		
	$M_{loss,IDS}$ [%]	M_{loss1} [%]	M_{loss2} [%]	$M_{loss,TOTAL}$ [%]	$T_{max,IDS}$ [°C]	T_{max1} [°C]	T_{max2} [°C]
	30–165 [°C]	165–420 [°C]	420–900 [°C]				
OVA/MCF-d16	0.73	9.43	3.69	13.85	116.1	296.4	451.1
BSA/MCF-d16	1.13	13.10	5.79	20.02	109.0	299.7	478.8

$M_{loss,IDS}$, mass loss in initial decomposition step; M_{loss} , mass loss in main decomposition step, $M_{loss,TOTAL}$, total mass loss; $T_{max,IDS}$, maximum temperature in initial decomposition step; $T_{max1,2}$, temperature at the maximum degradation step.

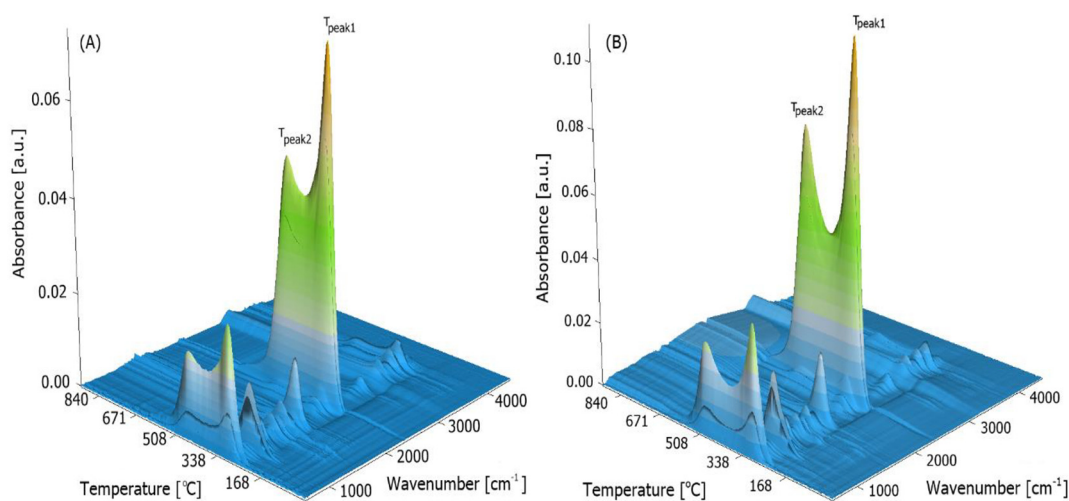


Fig. 9. 3D FTIR-TG spectra of the gas phase evolved during thermal decomposition of OVA/MCF-d16 (A) and BSA/MCF-d16 (B).

with pure MCF-d16 silica. This behavior is also confirmed by ATR-FTIR, XPS, SEM/EDS results.

4. Conclusions

In the present work, the structural, surface and thermal properties of the MCF-d16 material immobilized with BSA (the adsorbed amount 0.214 g/g) and OVA (the adsorbed amount 0.205 g/g) are analyzed. The porous MCF-d16 support structural characteristics are as follows: the specific surface area: 495 m²/g, the average hydraulic pore diameter: 16 nm (about 2 or 2.5 times larger than the hydrodynamic diameters of BSA and OVA molecules), and the total pore volume: 1.98 m³/g. The XRD, ATR-FTIR, XPS, SEM/EDS, and TG-DTG-DSC, TG-FTIR, DSC-MS techniques are used for determination of biocomposite properties.

- (i) Small-angle XRD patterns of the pure MCF-16d material reveal regular 3D pore structure with large spherical cells interconnected by narrow interconnectivities (three Bragg's reflections confirming the structure well-ordering). For both biocomposites significantly dropped intensity of Bragg's reflections, decrease of the total integrated areas (A_{peak}) and the interplanar spacing (d) in contrary to pure silica support is an indication for the presence of protein molecules inside the silica mesopores. The reduction of intensity of the diffraction peaks and disappearance of two Bragg's reflections for MCF/protein composites is a result of the decrease of electronic density difference between mesopores filled with biomolecules and pore walls. Additionally it indicates the diminishing of biocomposite structure ordering.
- (ii) ATR-FTIR results indicate the changes of chemical structure of the MCF-16d support after protein adsorption. For protein/silica composites new types of bonds between protein molecules and silica surface (Amide-I band derived from C=O stretching vibration of the peptide backbone, Amide-II band is connected primarily with the bending vibrations (rocking) of the N—H bond coupled with the C—N stretching vibrations of peptide groups, and Amide A band is attributed to the hydrogen bonded N—H stretching vibration) are found. When comparing with the native BSA the Amide I band for BSA/MCF-d16 composite is blue shifted up to 1658 cm⁻¹, the Amide II band up to 1532 cm⁻¹. These blue shifts may indicate weakening of the intermolecular C=O...H—N hydrogen bonds between the protein chains and/or intramolecular hydrogen bonds of a chain forming the α -helix. For the OVA/MCF composite, similar shifts of the Amide I and Amide II bands were also found: for Amide I up to 1657 cm⁻¹, and for Amide II up to 1532 cm⁻¹. The blue shift of the Amide I band upon protein adsorption is consistent with the observed blue shift of the Amide A band (3298 cm⁻¹ for BSA/MCF-d16 and 3296 cm⁻¹ OVA/MCF-d16, respectively). For both protein/silica composites, the higher Amide I band position corresponds to weaker hydrogen bonding, leading to more flexible helices. It may be a consequence of the interactions between the proteins and porous silica surface. It suggests that the structure of both proteins upon adsorption on MCF surface was altered.
- (iii) By applying the XPS technique the quantitative and qualitative identification of components and functional groups of biocomposites was performed. The O 1s, N 1s, C 1s XPS photoelectrons signals decomposed at specific binding energies (~532.5 eV; ~400 eV; ~285 eV) for various components and assigned to well-identified functional groups (e.g. O—C=O, O=C—N; HN—C(O)O/N—C=C, C—N; C—C, C—H, C=O, NH—CHR—CO, —C(—O)—NH₂) are characteristic for protein molecules. In addition, the analysis of XPS chemical composition and elemental concentration of C, N, O (atomic% and mass%) for pure MCF-d16 silica and for the biocomposites indicate higher C, N content and lower O content for BSA/MCF-d16 and OVA/MCF-d16. This effect is stronger for BSA/MCF-d16 composite (for BSA/MCF-d16 the atomic and mass N/C ratios are ~4.67 and ~4.06, for OVA/MCF-d16 the atomic and mass ratios are ~3.86 and ~3.26). These data suggest that more aliphatic carbon and nitrogen of the amino acid groups of BSA, such as tyrosine residues are exposed on the MCF-d16 surface. The reduction of oxygen concentration for the composites is a result of coverage of large part of support surface by the adsorbed protein molecules less rich in oxygen atoms.
- (iv) SEM analysis shows that topography and microstructure of biocomposite surface become less porous and rough, and in consequence smoother as compared to the pure silica surface. Moreover, the EDS micro-analysis reveals different elemental concentration (C, N, O) of protein/silica materials in comparison to pure silica. The BSA/silica material shows greater changes of surface topography and local concentration of chemical elements than OVA/silica (at.% N/C: MCF-d16 = 0.031, OVA/MCF-d16 = 0.081, BSA/MCF-d16 = 0.088).
- (v) The TG/DTG-DSC studies prove that the thermal properties of pure MCF-d16 change considerably after protein adsorption. The differences in thermal stability of adsorbed BSA and OVA may depend on the heat denaturation and conformation transitions in the protein structure as well as protein-silica interactions. The obtained biocomposites are thermally stable up to 165 °C and above this temperature the thermal decomposition

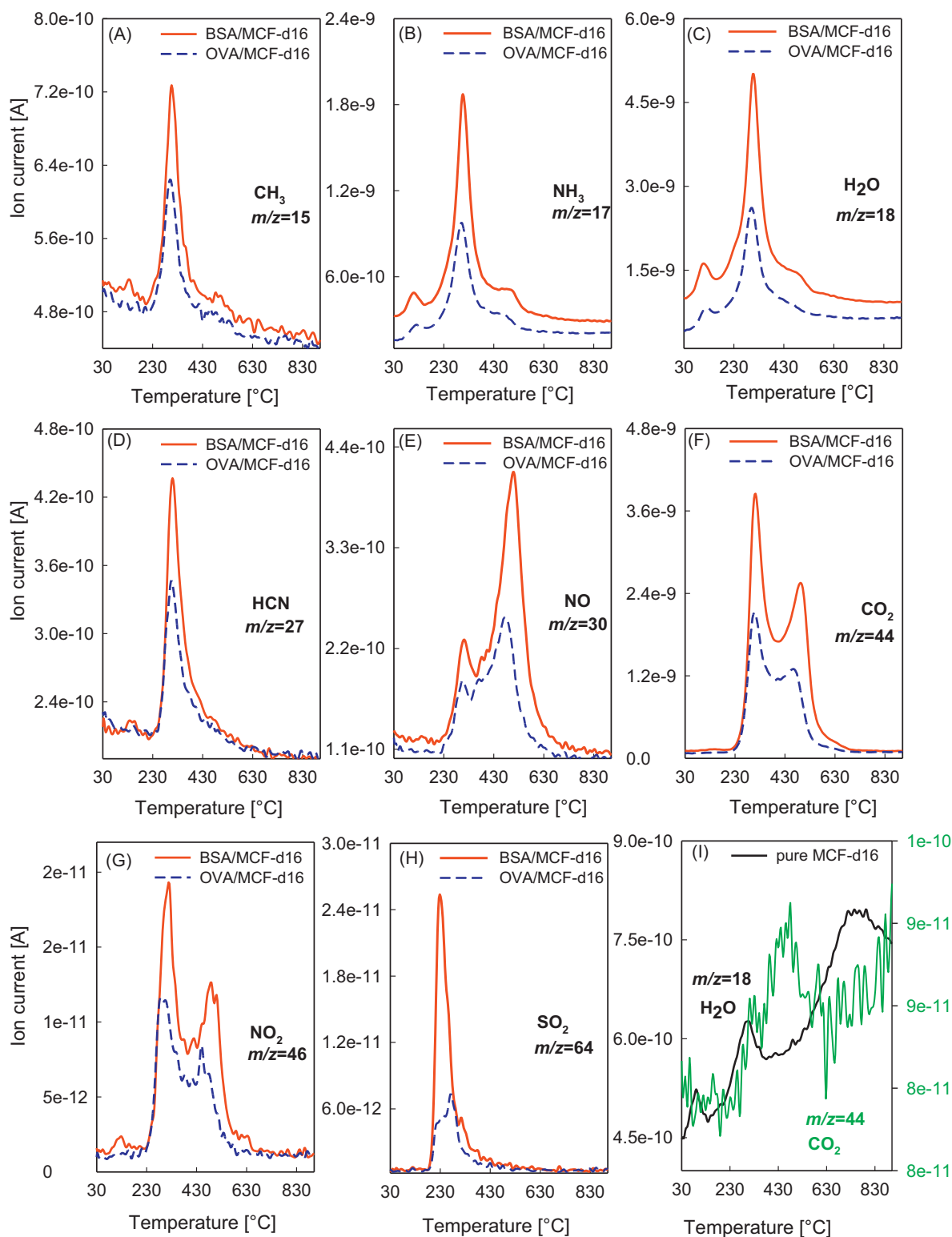


Fig. 10. MS profiles of main gaseous products of decomposition (A); CH_3 ; (B) NH_3 ; (C) H_2O ; (D) HCN ; (E) NO ; (F) CO_2 ; (G) NO_2 ; (H) SO_2 vs. temperature for protein/MCF composites. MS profiles of H_2O and CO_2 vs. temperature for pure MCF-d16 material.

takes place in two steps between 165–420 °C and 420–900 °C with significant mass losses. Stronger changes of the thermal stability of MCF-d16 support as well as more stable interaction adsorbent/adsorbate are observed after adsorption of larger BSA molecules (main peaks at $T_{max1,2}$ on the DTG curve and peaks at $T_{peak1,2}$ on the DSC curve are shifted towards higher temperatures; higher values of decomposition enthalpy) than for

adsorption of ovalbumin with a smaller molecular mass. The larger values of enthalpy of decomposition for BSA/MCF-d16 sample may indicate more favourable intramolecular interactions in the albumin. It is also confirmed that more BSA molecules are immobilized on the surface of MCF-16d silica in contrary to the OVA/MCF-d16 sample (the higher total mass loss of about 6.17% for BSA).

(vi) TG/FTIR/QMS coupled analysis method strongly indicates the formation of various additional gaseous products during the decomposition of protein/silica composites (different decomposition mechanism of protein molecules) as compared with pure MCF-d16 silica. In the case of the BSA/MCF-d16 composite the MS spectra show the higher characteristic ion current at m/z : 15 (CH_3), 17 (NH_3), 18 (H_2O), 44 (CO_2), 30 (NO), 46 (NO_2), 64 (SO_2), and 27 (HCN) of gaseous products in comparison to OVA/MCF-d16 sample. This is a consequence of stronger adsorption of BSA on MCF-d16 support as compared with OVA.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union Seventh Framework Programme FP7/2007–2013/ under REA grant agreement N° PIRSES-GA-2013-612484.

References

- [1] L. Tang, J.W. Eaton, Fibrin(ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 2147–2156.
- [2] H.R. Byon, H.C. Choi, Network single-walled carbon nanotube-field effect transistors (SWNT-FETs) with increased Schottky contact area for highly sensitive biosensor applications, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2188–2189.
- [3] B.D. Martin, B.P. Gaber, C.H. Patterson, D.C. Turner, Direct protein microarray fabrication using a hydrogel “stamper”, *Langmuir* 14 (1998) 3971–3975.
- [4] V.N. Vasilets, A.V. Kuznetsov, V.I. Sevastianov, Vacuum ultraviolet treatment of polyethylene to change surface properties and characteristics of protein adsorption, *J. Biomed. Mater. Res.* A 69 (3) (2004) 428–435.
- [5] B. Kasemo, Biological surface science, *Surf. Sci.* 500 (1–3) (2002) 656–677.
- [6] M. Ferrari, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nature* 5 (3) (2005) 161–17.
- [7] O.C. Farokhzad, R. Langer, Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (14) (2006) 1456–1459.
- [8] S. Mitragotri, J. Lahann, Physical approaches to biomaterial design, *Nature Mater.* 8 (2009) 15–23.
- [9] E. Pamula, P. Dobrzynski, B. Szot, M. Kretek, J. Krawciow, B. Plytycz, M. Chadzinska, Cytocompatibility of aliphatic polyesters – in vitro study on fibroblasts and macrophages, *J. Biomed. Mater. Res.* 87A (2008) 524–535.
- [10] R. Curvale, M. Masuelli, A.P. Padilla, Intrinsic viscosity of bovine serum albumin conformers, *Int. J. Biol. Macromol.* 42 (2008) 133–137.
- [11] C.E. Giacomelli, M.J. Avena, C.P. De Pauli, Adsorption of bovine serum albumin onto TiO₂ particles, *J. Colloid Interface Sci.* 188 (1997) 387–395.
- [12] C.E. Giacomelli, M.J. Esplandiú, P.I. Ortiz, M.J. Avena, C.P. De Pauli, Ellipsometric study of bovine serum albumin adsorbed onto Ti/TiO₂ electrodes, *J. Colloid Interface Sci.* 218 (1999) 404–411.
- [13] J. Zawala, R. Todorov, A. Olszewska, D. Exerowa, K. Malysa, Influence of pH of the BSA solutions on velocity of the rising bubbles and stability of the thin liquid films and foams, *Adsorption* 16 (2010) 423–435.
- [14] K. Ito, N. Matsudomi, Structural characteristics of hen egg ovalbumin expressed in yeast *Pichia pastoris*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (4) (2005) 755–761.
- [15] J.A. Huntington, P.E. Stein, Structure and properties of ovalbumin, *J. Chromatogr. B* 756 (2001) 189–198.
- [16] P.E. Stein, A.G.W. Leslie, J.T. Finch, R.W. Carrell, Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 221 (1991) 941–959.
- [17] S. Yu, J. Hu, X. Pan, P. Yao, M. Jiang, Stable and pH-sensitive nanogels prepared by self-assembly of chitosan and ovalbumin, *Langmuir* 22 (2006) 2754–2759.
- [18] A. Deryło-Marczewska, A.W. Marczewski, I. Skrzypek, S. Pikus, M. Kozak, Effect of addition of pore expanding agent on changes of structure characteristics of ordered mesoporous silicas, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2008) 2851–2858.
- [19] Yong-Mei Liu, Wei-Liang Feng, Ting-Cheng Li, He-Yong He, Wei-Lin Dai, Wei Huang, Yong Cao, Kang-Nian Fan, Structure and catalytic properties of vanadium oxide supported on mesocellular silica foams (MCF) for the oxidative dehydrogenation of propane to propylene, *J. Catal.* 239 (2006) 125–136.
- [20] L.A. Feigin, D.I. Svergun, *Structure Analysis by Small-angle X-Ray and Neutron Scattering*, Plenum, New York, 1987.
- [21] P.R.A.F. Garcia, R.N. Bicev, C.L.P. Oliveira, O.A. Sant’Anna, M.C.A. Fantini, Protein encapsulation in SBA-15 with expanded pores, *Microporous Mesoporous Mater.* 235 (2016) 59–68.
- [22] S. Servagent-Noinville, M. Revault, H. Quiquampoix, M. Baron, Conformational changes of bovine serum albumin induced by adsorption on different clay surfaces: FTIR analysis, *J. Colloid Interface Sci.* 221 (2000) 273–283.
- [23] A. El-Ghannam, P. Ducheyne, I.M. Shapiro, Effect of serum proteins on osteoblast adhesion to surface-modified bioactive glass and hydroxyapatite, *J. Orthop. Res.* 17 (1999) 340–345.
- [24] D. Steri, M. Monduzzi, A. Salis, Ionic strength affects lysozyme adsorption and release from SBA-15 mesoporous silica, *Microporous Mesoporous Mater.* 170 (2013) 164–172.
- [25] H. Beydagh, M. Javanbakht, H.S. Amoli, A. Badiei, Y. Khaniani, et al., Synthesis and characterization of new proton conducting hybrid membranes for PEM fuel cells based on poly(vinylalcohol) and nanoporous silica containing phenyl sulfonic acid, *Int. J. Hydrog. Energy* 36 (2011) 13310–13316.
- [26] H. Geidel, J. Lechert, H. Döbler, G. Jobic, G. Calzaferri, F. Bauer, Characterization of mesoporous materials by vibrational spectroscopic techniques, *Microporous Mesoporous Mater.* 65 (2003) 31–42.
- [27] P.I. Haris, F. Severcan, FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 7 (1999) 207–221.
- [28] K.K. Chittur, FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces, *Biomaterials* 19 (1998) 357–369.
- [29] W.K. Surewicz, H.H. Mantsch, New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra, *Biochim. Biophys. Acta- Protein Structure and Molecular Enzymology* 952 (1988) 115–130.
- [30] G. Reiter, N. Hassler, V. Weber, D. Falkenhagen, U.P. Fringeli, In situ FTIR ATR spectroscopic study of the interaction of immobilized human tumor necrosis factor- α with a monoclonal antibody in aqueous environment, *Biochim. Biophys. Acta* 1699 (2004) 253–261.
- [31] G. Falini, E. Foresti, I.G. Lesci, B. Lunelli, P. Sabatino, N. Roveri, Interaction of bovine serum albumin with chrysotile: spectroscopic and morphological studies, *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 1968–1974.
- [32] A. Papadopolou, R.J. Green, R.A. Frazier, Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 158–163.
- [33] P. Huang, Y. Kong, Z. Li, F. Gao, D. Cui, Copper selenide nanosnakes: bovine serum albumin-assisted room temperature controllable synthesis and characterization, *Nanoscale Res. Lett.* 5 (2010) 949–956.
- [34] A. Márquez, T. Berger, A. Feinle, N. Hüsing, M. Himly, A. Duschl, O. Diwald, Bovine serum albumin adsorption on TiO₂ colloids: the effect of particle agglomeration and surface composition, *Langmuir* 33 (2017) 2251–2258.
- [35] H. Gao, X.P. Geng, B.H. Wang, Y. Zhou, Studies on the conformational change of adsorbed BSA onto a moderately hydrophobic surface at different denaturant concentrations and surface coverages, *J. Colloid Interface Sci.* 344 (2010) 468–474.
- [36] M.A. Jhonsi, A. Kathiravan, R. Renganathan, Spectroscopic studies on the interaction of colloidal capped CdS nanoparticles with bovine serum albumin, *Colloids Surf., B* 72 (2009) 167.
- [37] S.A. Tatulian, Toward understanding interfacial activation of secretory phospholipase A2 (PLA2): membrane surface properties and membrane-induced structural changes in the enzyme contribute synergistically to PLA2 activation, *Biophys. J.* 80 (2001) 789–800.
- [38] E. Vanea, K. Magyari, V. Simon, Protein attachment on aluminosilicates surface studied by XPS and FTIR spectroscopy, *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 12 (2010) 1206–1212.
- [39] A. Arvidsson, F. Currie, P. Kjellin, Y.T. Sul, V. Stenport, Nucleation and growth of calcium phosphates in the presence of fibrinogen on titanium implants with four potentially bioactive surface preparations. An in vitro study, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 (2009) 1869–1879.
- [40] R. Michel, S. Pasche, M. Textor, D.G. Castner, The influence of PEG architecture on protein adsorption and conformation, *Langmuir* 21 (2005) 12327–12332.
- [41] X. Zhao, H. Zhu, B. Zhang, J. Chen, Q. Ao, X. Wang, XRD, SEM, and XPS analysis of soybean protein powders obtained through extraction involving reverse micelles, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 92 (2015) 975–983.
- [42] G. Iucci, G. Polzonetti, G. Infante, L. Rossi, XPS and FT-IR spectroscopy study of albumin adsorption on the surface of a π -conjugated polymer film, *Surf. Interface Anal.* 36 (2004) 724–728.
- [43] A. Omoike, J. Chorover, Spectroscopic study of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*: aqueous chemistry and adsorption effects, *Biomacromolecules* 5 (2004) 1219–1230.
- [44] M. Advincula, X. Fan, J. Lemons, R. Advincula, Surface modification of surface sol-gel derived titanium oxide films by self-assembled monolayers (SAMs) and non-specific protein adsorption studies, *Colloid Surf. B* 42 (2005) 29–43.
- [45] P.A. Gerin, P.B. Dengis, P.G. Rouxhet, Performance of XPS analysis of model biochemical compounds, *J. Chim. Phys.* 92 (1995) 1043–1065.
- [46] G.W. Nelson, M. Perry, S.M. He, D.L. Zechel, J.H. Horton, Characterization of covalently bonded proteins on poly(methyl methacrylate) by X-ray photoelectron spectroscopy, *Colloid Surf B Biointerfaces* 78 (2010) 61–68.
- [47] A.P. Serro, M.P. Gispert, M.C.L. Martins, P. Brogueira, R. Colaco, B. Saramago, Adsorption of albumin on prosthetic materials: implication for tribological behaviour, *Biomed. Mater. Res.* 78A (2006) 581–589.
- [48] M.M. Browne, G.V. Lubarsky, M.R. Davidson, R.H. Bradley, Protein adsorption onto polystyrene surfaces studied by XPS and AFM, *Surf. Sci.* 553 (2004) 155–167.
- [49] J. Serra, P. Gonzalez, S. Liste, C. Serra, S. Chiussi, B. Leon, M. Perez-Amour, H.O. Ylanen, M. Hupa, FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses, *J. Non-Cryst. Solids* 332 (2003) 20–27.
- [50] A. Lebugle, M. Subirade, J. Gueguen, Structural characteristics of a globular protein investigated by X-ray photoelectron spectroscopy: comparison between a legumin film and a powdered legumin, *Biochim. Biophys. Acta* 1248 (1995) 107–114.
- [51] D.D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, Y.F. Missirlis, Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption, *Biomaterials* 22 (2001) 1241–1251.
- [52] M. Zaharescu, A. Jitianu, A. Braileanu, J. Madaras, C. Novalk, G. Pokol, Composition and thermal stability of SiO₂-based hybrid materials TEOS-MTEOS system, *J. Therm Anal Cal* 71 (2003) 421–428.

- [53] S.K. Swain, D. Sarkar, Study of BSA protein adsorption/release on hydroxyapatite nanoparticles, *Appl Surf Sci* 286 (2013) 99–103.
- [54] Y. Han, S. Li, X. Wang, L. Jia, J. He, Preparation of hydroxyapatite rod-like crystals by protein precursor method, *Mat Res Bull* 42 (2007) 1169–1177.
- [55] S. Dasgupta, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Zn and Mg doped hydroxyapatite nanoparticles for controlled release of protein, *Langmuir* 26 (2010) 4958–4964.
- [56] A.M. Puziy, O.I. Poddubnaya, A. Derylo Marczewska, A.W. Marczewski, M. Blachnio, M.M. Tsyba, V.I. Sapsay, D.O. Klymchuk, Protein adsorption by nanostructured carbons with different pore sizes, *Adsorption* 22 (4) (2016) 541–552.
- [57] C.E. Giacomelli, W. Norde, The adsorption-desorption cycle, reversibility of the BSA-silica system, *J. Colloid Interface Sci.* 233 (2001) 234–240.
- [58] W. Norde, C.E. Giacomelli, BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states, *J Biotech* 79 (2000) 259–268.
- [59] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007) 1073–1101.

PUBLIKACJA [D3]



Article

Mesocellular Silica Foams (MCFs) with Tunable Pore Size as a Support for Lysozyme Immobilization: Adsorption Equilibrium and Kinetics, Biocomposite Properties

Agnieszka Chrzanowska *, Anna Derylo-Marczewska and Malgorzata Wasilewska

Department of Physical Chemistry, Institute of Chemical Sciences, Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University in Lublin, M. Curie-Skłodowska Sq. 3, 20-031 Lublin, Poland; annad@hektor.umcs.lublin.pl (A.D.-M.); malgorzata.seczkowska@umcs.pl (M.W.)

* Correspondence: agnieszka.chrzanowska@poczta.umcs.lublin.pl

Received: 10 July 2020; Accepted: 29 July 2020; Published: 31 July 2020



Abstract: The effect of the porous structure of mesocellular silica foams (MCFs) on the lysozyme (LYS) adsorption capacity, as well as the rate, was studied to design the effective sorbent for potential applications as the carriers of biomolecules. The structural (N_2 adsorption/desorption isotherms), textural (SEM, TEM), acid-base (potentiometric titration), adsorption properties, and thermal characteristics of the obtained lysozyme/silica composites were studied. The protein adsorption equilibrium and kinetics showed significant dependence on silica pore size. For instance, LYS adsorption uptake on MCF-6.4 support (pore diameter 6.4 nm) was about 0.29 g/g. The equilibrium loading amount of LYS on MCF-14.5 material (pore size 14.5 nm) increased to 0.55 g/g. However, when the pore diameter was larger than 14.5 nm, the LYS adsorption value systematically decreased with increasing pore size (e.g., for MCF-30.1 was only 0.27 g/g). The electrostatic attractive interactions between the positively charged lysozyme (at pH = 7.4) and the negatively charged silica played a significant role in the immobilization process. The differences in protein adsorption and surface morphology for the biocomposites of various pore sizes were found. The thermal behavior of the studied bio/systems was conducted by TG/DSC/FTIR/MS coupled method. It was found that the thermal degradation of lysozyme/silica composites was a double-stage process in the temperature range 165–420–830 °C.

Keywords: mesocellular silica foams; adsorption equilibrium; adsorption kinetics; protein/silica biocomposites; microscopic analysis; thermal analysis

1. Introduction

The biomolecules adsorption (i.e., proteins, enzymes, pharmaceuticals) on liquid/solid interfaces is a common and complex phenomenon, important in its prominent role in biology, medicine, biotechnology, and food processing applications. Therefore, it is very important to fully understand mechanisms of adsorption processes of the compounds showing biological activity at different interface boundaries, as well as their practical and potential application as modified biological materials (BioSS—Biological Surface Science) [1,2].

The adsorption capacity and selectivity depend on several factors, including the protein properties (size, shape, charge, structure, stability, isoelectric point, and unfolding rate), the process conditions (solution pH, ionic strength, temperature), and especially the physicochemical properties of materials (surface porosity, morphology, hydrophobicity, heterogeneity, electric charge) [3–7]. For the large biological molecules immobilized on a porous support, the selection of optimal adsorbent is of great

importance. In the case of mesoporous materials with pore sizes comparable with the biomolecule diameter, the internal loading of biomolecules should be lower due to the sieving effects. For materials with a pore diameter greater than the size of the adsorbed molecules, a possibility of penetration of biomolecules into mesopores and stronger interactions in the confined space results in higher adsorption. There is some evidence in the literature that the adsorbent pore diameter, which is at least two times larger than the adsorbate molecular diameter, enables full access to the internal space of mesoporous materials [8,9]. Thus, many efforts were undertaken to tune the mesopore size and structure of the well-ordered mesoporous molecular sieves (MMSes) and mesoporous silica nanoparticles (MSNs) to promote their bioapplications in catalysis, separation, disease diagnostics or as biosensors [10–15]. Many reports focused on usage of the most popular MMSes (MCM-41, SBA-15, MCM-48, MCM-21, MSE, FSM) as the efficient supports for the immobilization of various enzymes (cytochrome C, lysozyme, bovine serum albumin, ovalbumin, myoglobin, hemoglobin, trypsin, lipase, chloroperoxidase), to find the optimal size relation between mesopores and molecular dimensions of biomolecules for better control of adsorption process [16–25].

Among several types of high ordered mesoporous silica materials available for macromolecules immobilization, mesocellular silica foam (MCF) is one of the most suitable adsorbents for protein adsorption and separation, because of its unique structural properties (high surface area $\sim 500\text{--}1000\text{ m}^2/\text{g}$, large pore volume $\sim 2\text{ cm}^3/\text{g}$, large pore size up to 50 nm, uniformity of pore structure, high adsorption capacity, and especially the possibility of precise adjusting the structure and particle morphology). There are only a few reports regarding adsorption of myoglobin, lysozyme (LYS), bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OVA), chloroperoxidase, trypsin, α -amylase, glucoamylase on the MCF silica support [26]. For example, Russo et al. [27] studied the influence of surface functionalization on the adsorption capacity of BSA and LYS on the MCF silica with 31.5 nm pores. Essa et al. [28] found that adsorption of myoglobin on MMSes with differential porosities is relatively high for the MCF silica (pore size 14 nm) and SBA-15 (pore size 6.2 nm) in comparison to other silicas (MCM-41 pore size 3.1 nm, MSE pore size 6.0 nm, CNS pore size 14.7 nm). Han et al. [29] studied that the catalytic activity of chloroperoxidase enzyme on MCF (pore size 15 nm) and observed that it is higher than on MCM-48 (pore size 3.2 nm) and SBA-15 (pore size 4.2 nm and 7.0 nm). In our previous work, we found that MCF material with larger pores (pore size 10 nm and 16 nm) shows higher adsorption uptakes towards BSA and OVA proteins which can penetrate its internal structure to a larger extent [30]. However, there is still a lack of deeper analysis of the pore size – adsorption value relations in a wider range of pore diameters.

In the paper, the wide analysis of the dependence between the MCF pore size and specific surface area, and lysozyme adsorption capacity and rate is presented to optimize the adsorbent structural characteristics with regard to adsorbate uptake and density. It was found that there is an optimum relation between pore diameter and protein size in order to attain the maximum adsorption or surface density with regard to possible applications. Thus, the studies are important to obtain the material with desired porosity, which can be used as the effective support for biomolecules. We aim at the analysis of the influence of MCF pore size in a wider range of pore diameters on the adsorption capacity and rate of lysozyme, which is a comparatively small protein enzyme. A lysozyme from chicken egg white (LYS) was chosen as a model protein enzyme for immobilization on MCF supports due to its physicochemical properties and biological function: high structural stability (due to four disulfide bridges (S-S) and inflexibility between pH = 1.5 and 12; it makes lysozyme a fine model protein for interfacial adsorption in a wide range of pH); “hard model protein” which can undergo interfacial reorientations but does not unfold at an interface; small globular protein of molecular mass 14.3 kDa and hydrodynamic radius $\sim 2\text{ nm}$ (LYS molecules adsorbed on the surface and inside MCF pores); positively charged at pH = 7.4 (electrostatic attraction between the protein and the silica material); strong antibacterial activity against Gram-positive organism, anti-inflammatory, immune-modulatory, and anti-tumor properties.

Several samples of MCF materials with tunable porosity and pore size were synthesized as carriers for immobilizing LYS molecules. The adsorption processes of lysozyme from phosphate-buffered saline (PBS) solutions in physiological conditions (pH = 7.4) on the series of MCF materials with different porosity were investigated. The equilibrium adsorption isotherms and kinetic dependences (concentration vs. time profiles) for the adsorption processes of biomolecules were determined. The dependences between pore diameter and kinetic rate were analysed. The acid-base character and surface charge density of the MCF supports covered by protein molecules were determined by using the potentiometric titration. Likewise, the structural, morphological, and textural properties of protein/silica composites were characterized employing the nitrogen adsorption/desorption isotherms, the Scanning Electron Microscopy (SEM), and Transmission Electron Microscopy (TEM). Additionally, the thermal stability and characteristics of the decomposition products of lysozyme/silica were studied by using a combination of the Thermogravimetric Analyzer (TG) with Mass Spectrometer (MS) or a Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR). The applied powerful methods (TG/FTIR/MS) provided comprehensive information for understanding enzyme protein immobilization on the silica support.

2. Results and Discussion

2.1. Structure Characterization of MCF Supports

The porosity of the synthesized series of siliceous mesocellular foams (MCFs) was investigated by the nitrogen adsorption/desorption method. The comparison of nitrogen adsorption/desorption isotherms for three selected mesoporous MCF materials: MCF-6.4 with small pore size ($D_h = 6.4$ nm, the average hydraulic pore diameter), MCF-14.5 with medium pore size ($D_h = 14.5$ nm), MCF-30.1 with large pore size ($D_h = 30.1$ nm) is presented in Figure S1A (Supplementary Material). The isotherms for the studied MCF adsorbents correspond to IV type according to IUPAC classification. They reveal well-defined H1 hysteresis loops with very steep and parallel adsorption and desorption branches at higher relative pressures [31,32]. The maximum adsorption is the smallest for MCF-6.4 material; however, it is comparable for MCF-14.5, and MCF-30.1 supports what is associated with similar large total pore and mesopore volumes of these materials. Moreover, the shift of hysteresis loops towards higher relative pressures for MCF-14.5 and MCF-30.1 carriers in comparison to MCF-6.4 is associated with larger pore diameters.

The parameters characterizing the textural properties of all synthesized MCF supports are compared in Table 1. It should be noted that the obtained MCF materials are characterized by a differentiated mesoporous structure concerning the values of specific surface areas, pore volumes, and pore diameters. All MCF materials show a well-developed porous structure with a high BET (Brunauer–Emmett–Teller) surface area varying from 250 to 720 m²/g, total pore volume 1–2 cm³/g, and a hydraulic pore diameter in the range 6–30 nm. As can be seen, the average pore diameters obtained from adsorption and desorption branches of isotherms using the Barrett–Joyner–Halenda (BJH) procedure are 6–38 nm and 5–30 nm, respectively. It is worthy to note that the pore sizes of synthesized MCF adsorbents are larger than the size of the lysozyme molecule (the hydrodynamic diameter ~4 nm). The specific surface area of MCF-6.4 (716 m²/g) is by ca. 3 times higher than for MCF-30.1 material. No micropores are detected for MCF-6.4, however, in the case of the other materials slight micropores are found which confirm the high quality of the obtained adsorbents with uniform porosity.

Pore size distributions (PSDs) for three selected materials calculated from the adsorption and desorption data using the BJH method are demonstrated in Figure S1B,C (Supplementary Material). The PSD plots for MCF-6.4 and MCF-14.5 show sharp peaks, suggesting that porous structure is fairly homogeneous with narrow pore sizes, however, for MCF-30.1 the pore size distribution is wider. The PSDs calculated from the adsorption and desorption data are shifted towards higher values of pore diameter as follows MCF-6.4 < MCF-14.5 < MCF-30.1.

Table 1. Textural parameters of the obtained mesoporous silica materials.

Material	Surface Area [m ² /g]		Pore Volume [cm ³ /g]		Pore Diameter by BJH Adsorption		Pore Diameter by BJH Desorption		Pore Size (Average Hydraulic) [nm]
					PSD Average [nm]	Mode [nm]	PSD Average [nm]	Mode [nm]	
	^a S _{BET}	^b S _{ext}	^c V _t	^d V _{mes}	^e D _{av,ads.}	^f D _{mo,ads.}	^g D _{av,des.}	^h D _{mo,des.}	ⁱ D _h
MCF-6.4	716	29	1.15	1.09	5.8	6.6	5.2	4.9	6.4
MCF-7.4	685	38	1.26	1.18	7.2	7.9	6.5	6.4	7.4
MCF-8.7	522	63	1.14	1.03	8.3	8.9	7.4	8.3	8.7
MCF-10.1	533	72	1.32	1.19	9.9	10.1	8.8	9.3	10.1
MCF-12.4	569	65	1.76	1.63	13.4	13.7	11.9	10.8	12.4
MCF-14.5	547	135	1.98	1.74	16.5	16.6	13.6	12.6	14.5
MCF-15.5	494	262	1.91	1.44	20.1	17.0	16.9	17.9	15.5
MCF-20.3	435	41	2.21	2.00	25.2	27.7	20.6	22.2	20.3
MCF-25.8	301	231	1.94	1.45	32.3	27.9	23.3	21.8	25.8
MCF-27.7	267	67	1.85	1.73	34.5	38.0	26.8	29.6	27.7
MCF-30.1	250	61	1.88	1.76	37.5	38.7	30.2	30.9	30.1

^a S_{BET}, BET specific surface area; ^b S_{ext}, external surface area; ^c V_t, total pore volume; ^d V_{mes}, mesopore volume; ^{e,g} D_{av,ads.,des.}, BJH average pore diameters for cylinder pores geometry from adsorption and desorption branch of isotherms; ^{f,h} D_{mo,ads.,des.}, pore diameters from the PSD maxima by BJH (mode) obtained from adsorption/desorption isotherms for cylinder pores geometry; ⁱ D_h, average hydraulic pore diameter.

2.2. Adsorption Equilibrium and Kinetics

In Figure 1A the adsorption isotherms of lysozyme are compared for all synthesized MCF supports. Moreover, in Figure 1B the experimental isotherms are compared for three selected materials with the medium, small, and large pore sizes. One can find that the strongest adsorption is observed for MCF-14.5. In the case of other materials of lower and higher pore sizes, a decrease of LYS adsorption is found. Moreover, the lowest adsorption is observed for MCF-6.4 and MCF-30.1, the supports with the narrowest and the most widened pores. This tendency is well presented in Figure 1C. Such a behavior may be correlated with the values of specific surface areas and pore sizes of investigated adsorbents. It is evident that the optimum pore size for lysozyme adsorption is around 14.5 nm. The other MCF materials with comparable specific surface areas, however, with different pore sizes (lower and higher than 14.5 nm) reveal weaker adsorption affinity. It may be explained by the relation of protein size and pore diameter, which in the case of MCF-14.5 and LYS is responsible for the increase of the adsorption forces. However, when we regard the adsorption surface density (adsorption/specific surface area) it occurs that the density maximum is shifted to MCF-25.8 (see Figure 1D). Thus, in the case of this material, the protein layer of the highest density is formed. We can compare our adsorption results with those obtained by other authors for the silica materials with pore sizes in the range of 3.9–19.2 nm. The lysozyme adsorption isotherms on SBA-15 with different pore sizes (9.8–19.2 nm) at pH = 10.6 have been reported by Santos et al. [33] the adsorbed amounts were equal to 0.2 g/g (pore size 9.8 nm), 0.28 (11.7 nm), 0.47 (17.3 nm) and 0.79 (19.2 nm). In another study, MCM-41 (pore size 3.9 nm) and SBA-15 (8.8 nm) were used and LYS adsorption capacity was estimated to be 0.19 and 0.38, and 0.41 and 0.48 g/g at pH = 6 and 10.5, respectively [34]. According to Moerz et al. [35], the amount of LYS adsorbed on SBA-15 (pore size 6.6 nm) at pH = 6 and 10.6 was: ~0.12 g/g (~8.5 μmol/g) and ~0.29 (~20.5 μmol/g), respectively; however, at pH~7.3, it was about 1.5 times lower (~13.5 μmol/g; ~0.19 g/g) than in the case of our material. The adsorption capacities characterizing our MCF materials are as follows (pH = 7.4): 0.29 g/g (pore size 6.4 nm), 0.42 (10.1 nm), 0.49 (12.4 nm), 0.55 (14.5 nm), 0.49 (20.3 nm). Considering the dependence of protein adsorption on solution pH and ionic strength we can state that our materials reveal good sorption properties.

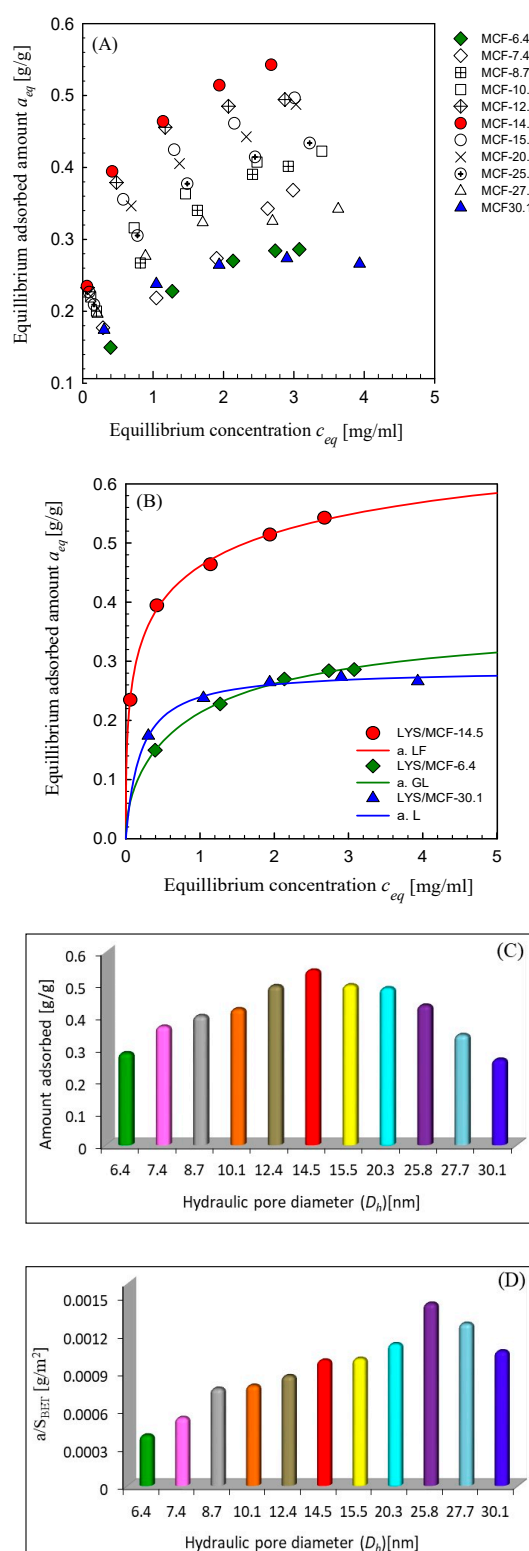


Figure 1. (A) Comparison of lysozyme (LYS) adsorption isotherms on mesoporous silica materials with different pore diameters; (B) LYS adsorption isotherms on three selected mesocellular silica foams (MCF) silica materials. Solid lines correspond to the fitted Generalized-Langmuir (GL) isotherm; (C) Relationships between the LYS adsorbed amounts, and (D) the LYS adsorption density versus the hydraulic pore diameter. Adsorption conditions: the initial concentration of protein solution ($c_0 = 5$ mg/mL) in phosphate-buffered saline (pH = 7.4) at 25 °C.

For the analysis of these data, the Generalized Langmuir equation was used. As one can find the GL isotherm well fitted the experimental data. The parameters of this equation (and its special forms) are presented in Table 2. One can find that the optimized values of adsorption capacities (a_m) agree quite well with the experimental uptakes, the observed small differences (lower theoretical a_m values in comparison to experimental ones) result from the fact that the experimental systems did not yet reach equilibrium. For two systems LYS/MCF-14.5 and LYS/MCF-6.4, the values of heterogeneity parameters m and n lower than 1 indicate their high nonhomogeneity. However, for LYS/MCM-30.1 energetic homogeneity is observed ($m, n = 1$), which may be correlated with the largest pores of adsorbent and resulting in a more homogeneous distribution of protein molecules on the surface.

Table 2. Parameters of the Generalized Langmuir (GL) isotherm equation (optimized to (LF) Langmuir–Freundlich or (L) Langmuir Isotherms) characterizing the adsorption systems investigated.

Adsorption System	Fitted Isotherm	a_m	m	n	$\log K$	R^2	SD(a)
LYS/MCF-14.5	LF	0.82	0.40	0.40	0.25	0.997	0.008
LYS/MCF-6.4	GL	0.37	0.50	1	−0.32	0.997	0.004
LYS/MCF-30.1	L	0.29	1	1	0.71	0.985	0.006

a_m , adsorption capacity; m, n , heterogeneity parameters describing the shape (asymmetry) of adsorption energy distribution function; K , equilibrium constant related to characteristic adsorption energy; R^2 , determination coefficients; SD, standard deviations.

In Figure 2, the experimental concentration and adsorption profiles are compared for the selected MCF supports. The concentration vs. time curves was analyzed by using the multi-exponential (m-exp) equation (theoretical lines in Figure 2A) (the parameters of this equation are presented in Table 3), and the other kinetic equations and models (first-order (FOE), second-order (SOE), mixed-order (MOE), fractal first-order (f-FOE), fractal second-order (f-SOE), fractal mixed-order (f-MOE) equation, intraparticle diffusion model (IDM), McKay pore diffusion model (PDM)). The choice of m-exp equation for the description of experimental data was based on the lowest values of standard deviation SD. The optimization results for m-exp equation to other equations and models are compared in Table S1 (Supplementary Material) in which the values of relative standard deviations $SD(c/c_0)$ are given. Basing on the average SD values one can find that m-exp equation gives the best optimization results, for the PDM model the poorest results were found. However, it should be stated that in the case of the system LYS/MCM-6.4 the lowest SD values were found for two fractal models f-FOE and f-SOE (SD = 0.246% and 0.247%, respectively), but for m-exp equation SD is only slightly higher (SD = 0.337%).

Table 3. Optimized parameters of m-exp eq.

System	$f_1,$ $\log k_1$	$f_2,$ $\log k_2$	$f_3,$ $\log k_3$	$t_{1/2}$ [min]	SD(c/c_0) [%]	1- R^2
LYS/MCF-6.4	0.054, −2.24	0.946, −3.91	0	358.7	0.337	0.0037
LYS/MCF-14.5	0.231, 0.21	0.125, −2.48	0.644, −9.99	1.7	0.414	0.0027
LYS/MCF-30.1	0.187, 0.55	0.813, −4.02	0	0.5	0.723	0.021

f_i ($i = 1, 2, \dots, n$), coefficients determining a fraction of adsorbate adsorbed with the rate constant k_i ; $\log k_i$, rate constant logarithms; $t_{1/2}$, adsorption half-time; SD(c/c_0), standard deviation; 1- R^2 , indetermination coefficient.

In Table 3, the values of optimized m-exp eq. parameters characterizing adsorption kinetics are compared: the rate constant logarithms ($\log k_i$) and the f_i coefficients determining a fraction of a solute adsorbed with rate k_i , moreover, the adsorption half-time is presented. The quality of optimization results is confirmed by low standard deviation, SD, values (0.337–0.723%), and indetermination coefficient, 1- R^2 (0.0027–0.021). The kinetic experimental systems are well optimized by 2 or 3 terms of m-exp equation. The values of $\log k_i$ and f_i parameters characterizing the stages of the adsorption

process indicate that the initial stage is quicker for all systems investigated. It may be attributed to adsorption on the external surfaces which are accompanied by the second slower stage connected with adsorption in the pore system. Analyzing the experimental kinetic curves one can find that the adsorption process is the slowest for MCF-6.4 ($t_{1/2} = 358.7$) with the narrowest pores which indicates some problems with the diffusion of protein molecules into the internal pore space. The range near adsorption equilibrium was attained in the shortest period for MCF-30.1 ($t_{1/2} = 0.5$) which may be explained by easier diffusion of protein molecules into large pores. The adsorption process is slightly slower for MCF-14.5 ($t_{1/2} = 1.7$) which means that the pore sizes of this material do not disturb protein diffusion. Moreover, the kinetic profiles for MCF-30.1 and MCF-6.4 achieve the comparable close to equilibrium adsorption values, however, for MCF-14.5 the equilibrium adsorption is higher, and these results are in accordance with batch experiment (Figure 2B).

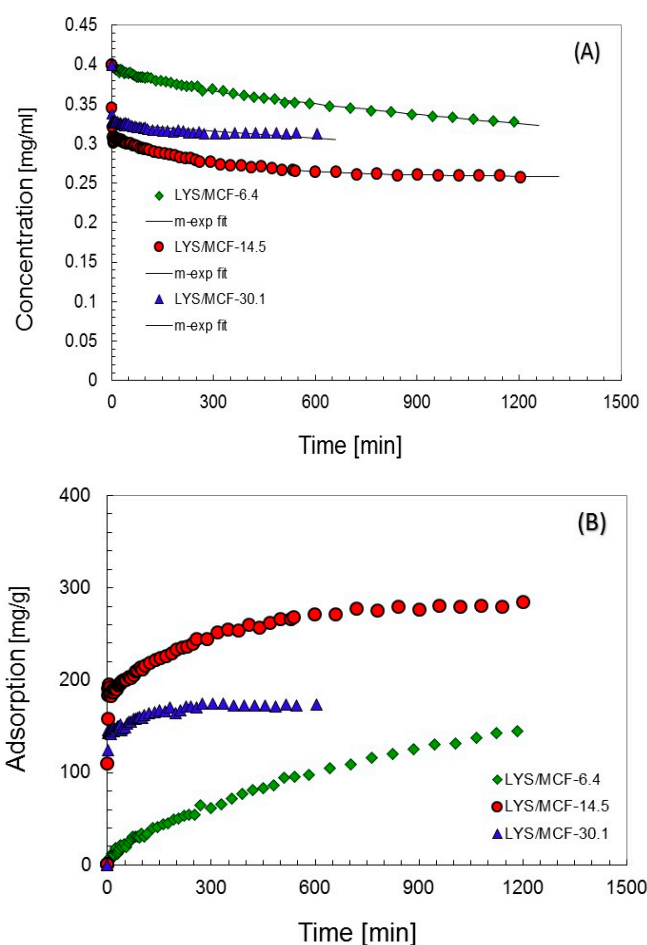


Figure 2. The comparison of concentration (A) and adsorption (B) profiles measured for lysozyme adsorption on MCF-14.5, MCF-6.4, and MCF-30.1 supports. Adsorption conditions: $c_0 = 0.4$ mg/mL, $T = 25$ °C; pH = 7.4.

2.3. Physicochemical Properties of Protein/MCF Composites

2.3.1. Structural Analysis

The N_2 adsorption/desorption measurements were used to determine semi-qualitatively whether the adsorbed biomolecules were situated inside the pores of the MCF materials and/or at the external surface. The nitrogen adsorption/desorption isotherms for pure supports (MCF-6.4, MCF-14.5, MCF-30.1) and biocomposites are compared in Figure S2A (Supplementary Material). The parameters characterizing the changes in the pore structure of MCF materials after protein adsorption are

summarized in Table 4. It can be found in Figure S2A (Supplementary Material) that the amount of nitrogen adsorbed on biocomposite is decreased with the increasing amount of LYS (the LYS adsorbed amounts from solution are as follows: for MCF-6.4 (pore size 6.4 nm) is ca. 0.29 g/g, for MCF-14.5 (pore size 14.5 nm) increased to 0.55 g/g, for MCF-30.1 (pore size 30.1 nm) is ca. 0.27 g/g.

Table 4. Pore structure parameters of the investigated pure supports and biocomposites calculated from N₂ adsorption/desorption isotherms. Adsorption conditions: $c_0 = 5$ mg/mL; $t_{ads} = 24$ h; $T = 25$ °C; pH = 7.4.

Material	Surface Area [m ² /g]		Pore Volume [cm ³ /g]		Pore Diameter by BJH Adsorption		Pore Diameter by BJH Desorption		Pore Size (Average Hydraulic) [nm]
	^a S_{BET}	^b S_{ext}	^c V_t	^d V_{mes}	PSD Average [nm]	Mode [nm]	PSD Average [nm]	Mode [nm]	
MCF-6.4	716	29	1.15	1.09	5.8	6.6	5.2	4.9	6.4
MCF-14.5	547	135	1.98	1.74	16.5	16.6	13.6	12.6	14.5
MCF-30.1	250	61	1.88	1.76	37.5	38.7	30.2	30.9	30.1
LYS/MCF-6.4	346	7	0.49	0.48	5.2	6.3	4.7	5.5	5.7
LYS/MCF-14.5	38	22	0.12	0.08	12.5	12.2	10.9	10.7	12.6
LYS/MCF-30.1	114	25	0.50	0.44	18.5	20.7	14.9	17.6	17.5

^a S_{BET} , BET specific surface area; ^b S_{ext} , external surface area; ^c V_t , total pore volume; ^d V_{mes} , mesopore volume; ^{e,g} $D_{av,ads,des}$, BJH average pore diameters for cylinder pores geometry from adsorption and desorption branch of isotherms; ^{f,h} $D_{mo,ads,des}$, pore diameters from the PSD maxima by BJH (mode) obtained from adsorption/desorption isotherms for cylinder pores geometry; ⁱ D_h , average hydraulic pore diameter.

Furthermore, the analysis of structural properties (Table 4) of the MCF silica supports before and after LYS adsorption shows that the porosity parameters (S_{BET} , the BET specific surface area; V_t , the total pore volume; V_{mes} , the mesopore volume; D_{hy} , the average hydraulic pore diameter) estimated from N₂ adsorption/desorption data are strongly reduced. The strongest reduction of pore characteristics is observed for LYS/MCF-14.5 biocomposite which is very well correlated with the highest adsorption of protein. It can be seen that for MCF-14.5 material with immobilized LYS the BET surface area decreased from 547 m²/g to 38 m²/g (93%). On the other hand, for LYS/MCF-6.4 and LYS/MCF-30.1 S_{BET} values diminished by approximately 52% and 54%, respectively. Additionally, LYS adsorption leads to decrease of the total pore volume of approximately: 94% for MCF-14.5, 57% for MCF-6.4, and 73% for LYS/MCF-30.1. The values of average pore diameter (D_{av}) and the mean hydraulic pore diameter (D_{hy}) also decrease after protein adsorption. The reduction in the specific surface area, pore volume, and size after LYS adsorption observed for all MCF materials indicates that the protein molecules are adsorbed inside the mesopores of MCF material as well as on the external surfaces. The evolution of pore-size distribution functions obtained from BJH model for isotherm desorption branches for MCF-14.5, MCF-6.4, and MCF-30.1 after protein adsorption are presented in Figure S2B (Supplementary Material). One can find a strong decrease of the peak heights for all biocomposites in comparison to pure supports: 96% for MCF-14.5, 26% for MCF-6.4, 61% for MCF-30.1.

2.3.2. Acid-Base Properties

To evaluate the acid-base character, surface charge, and nature of the interactions between lysozyme and porous MCF the potentiometric titration measurements were applied. The surface charge density (Q_s) curves as a function of pH calculated from the experimental data for the pure MCF materials and LYS/MCF systems are illustrated in Figure 3A,B.

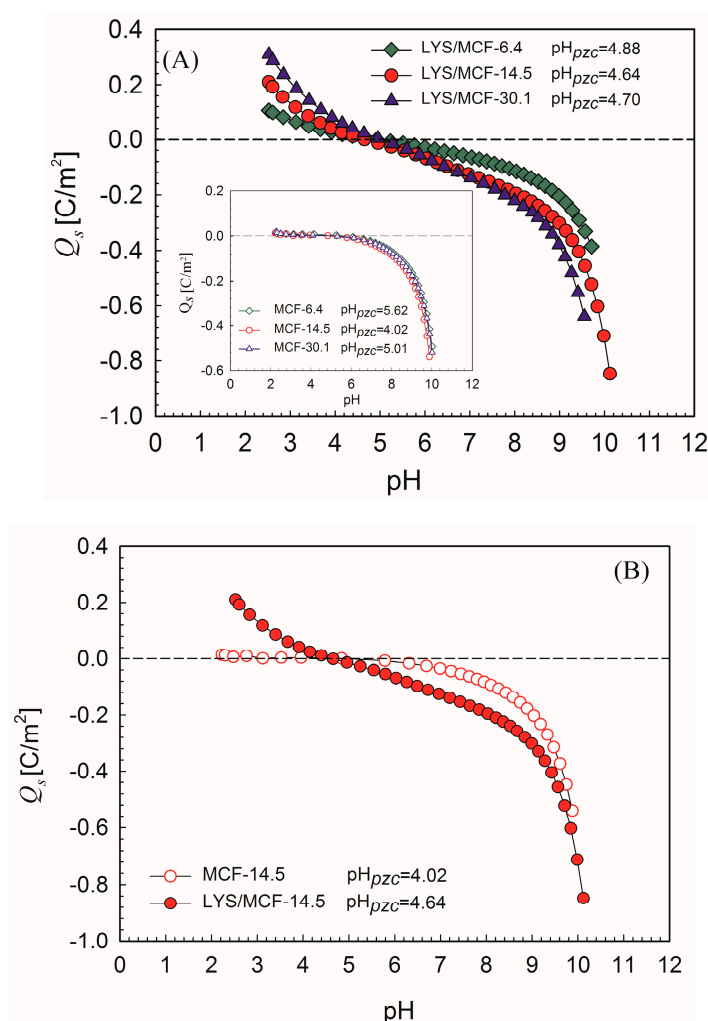


Figure 3. (A) Dependence of surface charge density, Q_s , on pH for MCF-6.4, MCF-14.5, MCF-30.1 materials with immobilized lysozyme. Inset: dependence of Q_s vs. pH for pure MCF-6.4, MCF-14.5, MCF-30.1 silicas; (B) Surface charge density, Q_s , for MCF-14.5 before and after LYS adsorption. The measurements were carried out by potentiometric titration for ionic strength $I = 0.1$ mol/L.

As shown in Figure 3A (inset), for pure MCF supports with different pore sizes (MCF-6.4, MCF-14.5, and MCF-30.1), the point of zero charge, pH_{pzc} , is in the range 4 to 5.6. As a result of protein adsorption, the change of biocomposites acid-base properties into amphiphilic is observed with pH_{pzc} in the range 4.64–4.88 (Figure 3A). In the case of pure MCF-6.4, MCF-14.5 and MCF-30.1 their surfaces at experimental conditions (PBS, $pH = 7.4$) are slightly negatively charged with Q_s ca. -0.05 , -0.06 , -0.04 C/m^2 , respectively (inset in Figure 3A). It is interesting to note that the surface charge density after LYS adsorption increases up to -0.08 C/m^2 for LYS/MCF-6.4, -0.15 C/m^2 for LYS/MCF-14.5 and -0.17 C/m^2 for LYS/MCF-30.1 (Figure 3A,B). The presented results indicate the small negative surface charge for all studied MCF supports at $pH = 7.4$. Thus, regarding the positive charge of lysozyme at $pH = 7.4$, the electrical attraction between the silica surface and the protein molecule can be supposed. Considering high protein adsorption values, it should be assumed that the electrostatic attractive interactions play a significant role in the immobilization process [36]. In (Supplementary Material) the relation among the pore diameters and specific surface areas of MCF adsorbents and biocomposites, and the points of zero charge (pH_{pzc}) is demonstrated in Figure S3. One can find that the acid-base character of the studied pure silica surface changes in comparison to the silica modified by LYS. Generally, as demonstrated in Figure S3 (Supplementary Material), for MCF silica materials after adsorption of lysozyme pH_{pzc} stabilizes.

2.4. Thermal Analysis (TG/DSC/FTIR/MS)

The use of thermogravimetry (TG), derivative thermogravimetry (DTG), and differential scanning calorimetry (DSC) is a widely applied method for characterizing the thermal properties by measuring changes in physical and chemical properties (transition, dehydration, decomposition) during the heating process of materials. By enhancing temperature the protein, degradation is induced, leading to the removal of organic material from the inorganic support. The mass loss during thermal decomposition corresponds to the amount of protein adsorbed on the support [37,38].

TG/DTG/DSC curves of thermal decomposition of native lysozyme, pure silica carriers, and silica/LYS composites in the air are presented in Figure 4A,A'-C,C'. The mass losses (TG), the corresponding derivatives (DTG), and differential scanning calorimetry values (DSC) for MCF-14.5, MCF-6.4, MCF-30.1 without and with immobilized protein analyzed in oxidation atmosphere are gathered in Tables 5 and 6. Basing on the presented results one can see that pure MCF materials decompose in one main step under oxidative conditions. The total mass losses in the range 185 °C to 830 °C estimated for MCF-14.5, MCF-6.4, MCF-30.1 materials were about 1.57%, 3.09% and 1.03%, respectively (Figure 4A'). The LYS/MCF composites are thermally stable up to the temperature ~165 °C in the atmosphere of synthetic air. Afterwards, the decomposition of the LYS/MCF composites runs as two major stages in the temperature range 165–420–830 °C with T_{max1} (the maximum temperatures of mass loss in first decomposition step) and T_{max2} (the maximum temperatures of mass loss in second decomposition step) given in Table 5. It should also be noted that for LYS/MCF composites, the weight loss (1.2 to 2%) in initial decomposition temperature ($M_{loss,IDT}$) 30–165 °C is attributed to the removal of water (endothermic process, Figure 4A, Table 5). In turn, the mass loss in the first main step (M_{loss1}) at temperatures 165–420 °C is related to the removal of weakly bound albumin from the silica supports (van der Waals forces) and in the second one (M_{loss2}) above 420 °C for LYS/MCF composites are associated to the removal of protein molecules strongly linked with the silica materials (electrostatic interactions) [39,40]. TG/DTG analysis (Figure 4A,B and Table 5) for MCF-14.5/LYS composite shows that the first main decomposition step appears in the temperature range 165–420 °C with T_{max1} ~323 °C, and with the mass loss 17.3%. The second step of decomposition is visible in the temperature range 420–830 °C with the mass loss of 10.8% occurred in T_{max2} ~508 °C. Considerably smaller mass losses 13.4%, 9.9% (M_{loss1}), and 8.9%, 8% (M_{loss2}) were obtained for LYS/MCF-6.4, LYS/MCF-30.1 composites, respectively. For MCF-6.4 silica with a small pore size the first step of decomposition occurs with T_{max1} ~327 °C and in the second step with T_{max2} ~498 °C. Likewise, in the case of MCF-30.1 sample with wider pores the first and second stage of decomposition is found at T_{max1} ~321 °C and T_{max2} ~520 °C (Table 5). These decomposition stages are directly connected to the presence of LYS in the studied materials. These results significantly confirm that increasing the adsorption of lysozyme on MCF leads to greater weight loss during the heating process of the studied biomaterials. This effect is greater for MCF-14.5 material with a pore diameter of about 3.5 times larger than the hydrodynamic diameter of protein (4 nm). It may be concluded that the total mass loss ($M_{loss,TOTAL}$) for LYS/MCF-14.5 composite is ca. 5.7% higher than for LYS/MCF-6.4, and almost 9.4% greater in comparison to LYS/MCF-30.1.

Table 5. TG and DTG data obtained in air atmosphere for LYS/MCF composites.

Material	TG			$M_{loss,TOTAL}$ [%]	DTG	
	$M_{loss,IDT}$ [%]	M_{loss1} [%]	M_{loss2} [%]		T_{max1} [°C]	T_{max2} [°C]
	30–165 [°C]	165–420 [°C]	420–830 [°C]			
LYS/MCF-14.5	1.2	17.3	10.8	29.3	323	508
LYS/MCF-6.4	1.3	13.4	8.9	23.6	327	498
LYS/MCF-30.1	2.0	9.9	8.0	19.9	321	520

$M_{loss,IDT}$, mass loss at initial decomposition temperature; $M_{loss1,2}$, mass loss in main (first or second) decomposition step $M_{loss,TOTAL}$, total mass loss; $T_{max1,2}$, maximum temperatures of mass loss in first or second decomposition step.

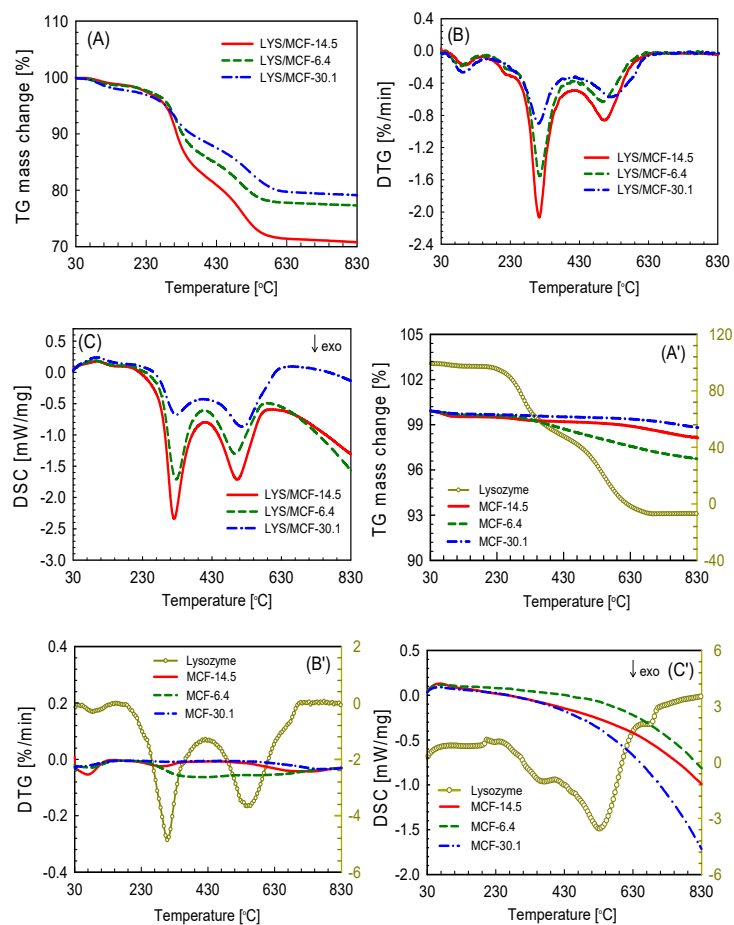


Figure 4. Thermogravimetric analyzer (TG) profiles in synthetic air for selected LYS/MCF composites (A), native protein and pure MCF supports (A'); DTG curves in synthetic air for selected LYS/MCF composites (B), native lysozyme and pure MCF supports (B'); DSC curves for biocomposites (C), pure lysozyme and MCF silica supports (C').

Table 6. DSC data obtained in synthetic air for MCF materials before and after lysozyme adsorption.

Material	DSC							
	T_{onset1} [°C]	T_{peak1} [°C]	T_{end1} [°C]	ΔH [J/g]	T_{onset2} [°C]	T_{peak2} [°C]	T_{end2} [°C]	ΔH [J/g]
LYS/MCF-14.5	283	321	366	−654	448	503	587	−452
LYS/MCF-6.4	282	327	372	−491	447	498	588	−338
LYS/MCF-30.1	270	328	373	−197	455	519	620	−408

T_{onset} , temperature of the decomposition initiation; T_{peak} , maximum decomposition temperature; T_{end} , final decomposition temperature; ΔH , the heat generated during the decomposition process obtained by the integration of the thermal peaks.

Additionally, the DSC curves (Figure 4C) for three studied MCF/protein composites reveal two exothermic peaks in the region of high temperatures. The presence of the first exothermic peak situated in the range 270–373 °C with T_{peak} ca. 321–328 °C, and the second exothermic peak in the range 447–620 °C with T_{peak} ca. 498–519 °C (Table 6) is directly connected with the main decomposition step of LYS, which corresponds to the TG mass losses. Also, the characteristic temperatures (T_{onset} , the temperature of decomposition initiation; T_{peak} , the maximum decomposition temperature; T_{end} , the final decomposition temperature) obtained from DSC (Figure 4C and Table 6) are comparable to those obtained from TG analysis.

To explain the thermal decomposition routes, as well as its mechanisms for the studied biomaterials, the analysis of the gaseous products emitted during their decomposition was conducted by TG/FTIR

and TG/QMS technique. 3D FTIR spectrum of the studied LYS/MCF composites gathered at the temperatures corresponding to the main thermal degradation stages on the DSC curves (T_{peak1} and T_{peak2}) in the air atmosphere are presented in Figure 5A–C. The typical QMS spectra of the characteristic ion currents (m/z) of gaseous products formed during the decomposition of three selected MCF supports with immobilized lysozyme obtained in the air are shown in Figure 6A–G.

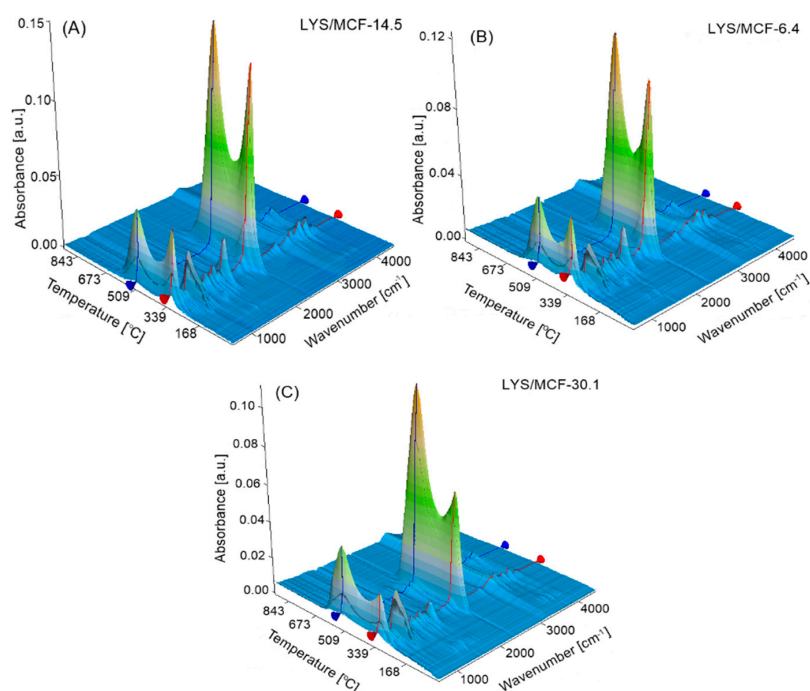


Figure 5. 3D FTIR spectrum of (A) LYS/MCF-14.5, (B) LYS/MCF-6.4, and (C) LYS/MCF-30.1 composites registered at two peaks temperatures T_{peak1} (red line) and T_{peak2} (blue line) marked from DSC curves.

Figure 6H presents QMS profiles of the main product, H_2O , formed during the decomposition of pure MCF-14.5, MCF-6.4, MCF-30.1 materials. According to these results for all native silica materials, the ion current signal at $m/z = 18$ is observed which is characteristic for water forming as the main decomposition product (Figure 6H). It is confirmed by the FTIR spectra in the ranges 3570 cm^{-1} to 3900 cm^{-1} , 1390 cm^{-1} and 1870 cm^{-1} corresponding to rotation/vibration transition within water molecules in the vapor phase—stretching vibration and symmetric bending.

TG/QMS/FTIR results significantly indicate the formation of various gaseous products during the decomposition process of three studied biocomposites. At the main thermal degradation stages at T_{peak1} and T_{peak2} , the absorption bands at 2310 cm^{-1} , 2360 cm^{-1} and 669 cm^{-1} characteristics for carbon dioxide (Figure 5A–C) are observed. Two first bands correspond to R and P-branches of asymmetric stretching vibration and the third band is connected with symmetric bending vibrations of CO_2 . The presence of this compound is also evidenced in the MS spectra of the characteristic ion current at $m/z = 44$ (Figure 6A). Moreover, the absorption bands at 3735 cm^{-1} , 3503 cm^{-1} , 1756 cm^{-1} correspond to the O-H stretching vibrations of water molecules in the vapor phase (both stretching vibrations and symmetric bending) (Figure 5). The MS signal corresponding to $m/z = 18$ confirms the appearance of water vapor in the mixture of gases evolved during thermal decomposition of protein/silica composites (Figure 6B). Among the decomposition products, one can find also the signals recorded for SO_2 (at $m/z = 64$) (Figure 6C) which comes from the sulfonate groups in biocomposites. It is also confirmed by the FTIR absorption bands at ca. 1370 cm^{-1} (asymmetric stretching vibration of the SO_2 molecule). In this decomposition stage, the FTIR absorption bands at 2896 cm^{-1} and 2972 cm^{-1} (Figure 5) are found which may be attributed to the CH stretching vibrations characteristic for the aliphatic groups appearing in the gaseous decomposition products of protein. They give the MS signal

$m/z = 15$ (Figure 6D) corresponding to methyl groups CH_3 . Moreover, the FTIR absorption band at ca. 1617 cm^{-1} is also identified. It corresponds to the asymmetric stretch of NO_2 (the signal at $m/z = 46$ on the MS spectrum, Figure 6E). Additionally, among the products observed during the thermal decomposition NH_3 presence at $m/z = 17$ (Figure 6F) is detected and proved by FTIR absorption bands of medium intensities at 930 cm^{-1} and 965 cm^{-1} (maxima of rotational branches of the symmetric bending vibration), and 1626 cm^{-1} (the Q-branch of asymmetric bending vibration) (Figure 5). Moreover, the presence of HCN in the gaseous phase is found on the MS spectrum at $m/z = 27$, and on the FTIR absorption band at 714 cm^{-1} (Figures 5 and 6G).

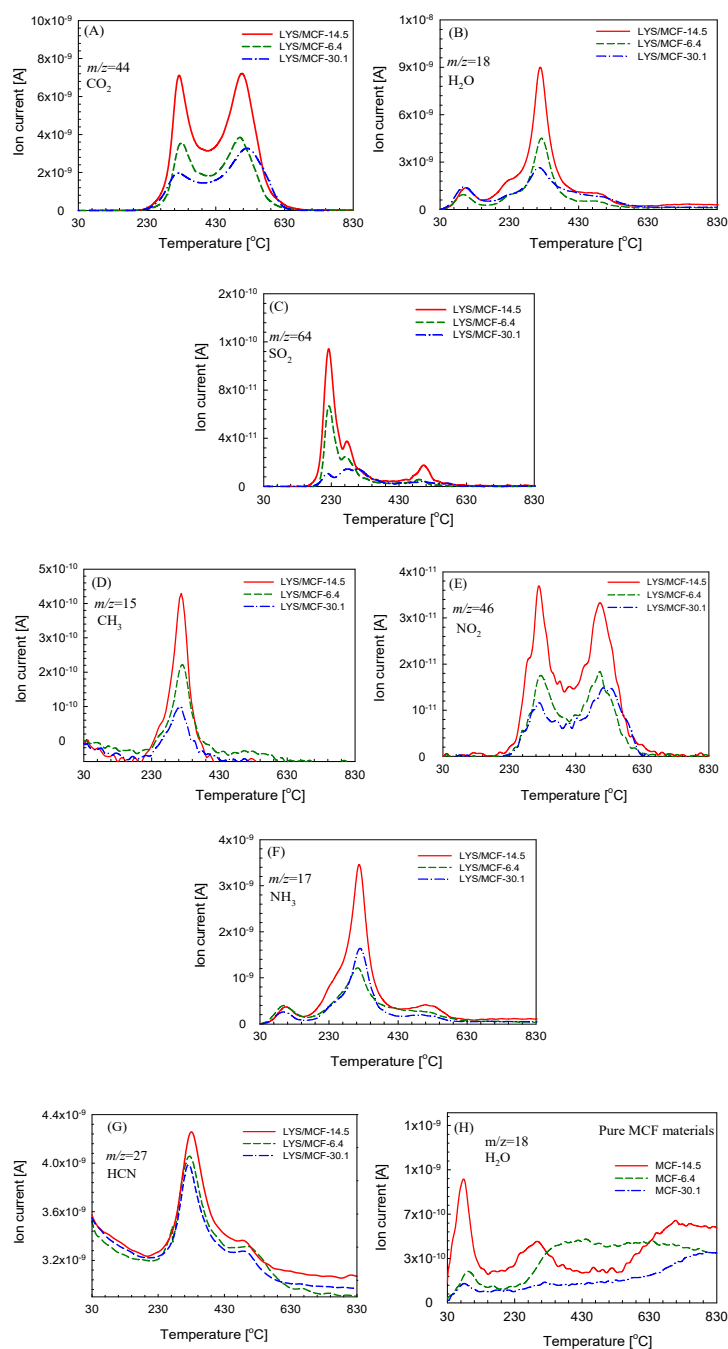


Figure 6. QMS profile of gaseous products emitted during decomposition of three selected LYS/MCF-14.5, LYS/MCF-6.4, LYS/MCF-30.1 composites vs. temperature at m/z : (A) 15 (CO_2); (B) 18 (H_2O); (C) 64 (SO_2); (D) 15 (CH_3); (E) 46 (NO_2); (F) 17 (NH_3); (G) 27 (HCN) in air atmosphere; (H) MS profile of H_2O vs. temperature for pure MCF-14.5, MCF-6.4 and MCF-30.1 supports.

It is worth noting that for LYS/MCF-14.5 the QMS spectra show the higher ion currents ($m/z = 15, 17, 18, 27, 44, 46, 64$) of gaseous products formed during the decomposition of protein/silica material: $\text{CH}_3, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}, \text{HCN}, \text{CO}_2, \text{NO}_2, \text{SO}_2$ in comparison to LYS/MCF-6.4 and LYS/MCF-30.1. It confirms that more protein molecules are immobilized on the MCF-14.5 support. The same conclusions are supported by the analysis of TG/FTIR spectra for the studied biomaterials by higher intensities of absorption bands. It may be concluded that this effect decreases in the series: MCF-14.5 > MCF-6.4 > MCF-30.1. These results are in good agreement with the N_2 adsorption/desorption analysis and batch adsorption experiment.

2.5. Microscopic Analysis (SEM, TEM)

The scanning electron microscopy (SEM) and the high-resolution transmission electron microscopy HRTEM-BF (bright field) allow comparing the surface morphology, texture, and micro-nanostructure of the native MCF supports with different pore sizes and protein/silica composites. The two-dimensional (2D) micro-nano surface morphology visualization of the pure MCF-6.4, MCF-14.5, MCF-30.1 supports, and the biocomposites registered by SEM are presented in Figure 7(A–C) and Figure 7(A'–C'), respectively. As can be seen, the lysozyme immobilization on the silica support with different pore sizes changes the grain surface morphology. In the case of all biocomposites the surface becomes smoother and more uniform comparing with the pure silica material [41]. Moreover, one can observe that the surface roughness changes as follows: MCF-6.4 > MCF-14.5~MCF-30.1. This observation confirms the changes in adsorption density obtained from the batch adsorption experiment (see Figure 1D). Figure 8A–C shows a comparison of TEM texture/topography micrographs at nano-level of pure MCF-6.4, MCF-30.1, and MCF-14.5 silica support as well as LYS/MCF-14.5 composite (Figure 8C'). It can be seen that HRTEM-BF micrographs for pure MCF-14.5, MCF-6.4, and MCF-30.1 silica materials confirm a porous structure of studied materials with regular 3D pore system with large spherical cells interconnected by narrow interconnectivities. The pore diameter estimated from HRTEM micrographs is ~15 nm for MCF-14.5, ~7 nm for MCF-6.4 and ~31 nm for MCF-30.1, which is consistent with N_2 sorption parameters. Moreover, the TEM micrographs show the immobilized lysozyme (as a circle-spiral form) on the surface of the MCF-14.5 support (Figure 8C') [41].

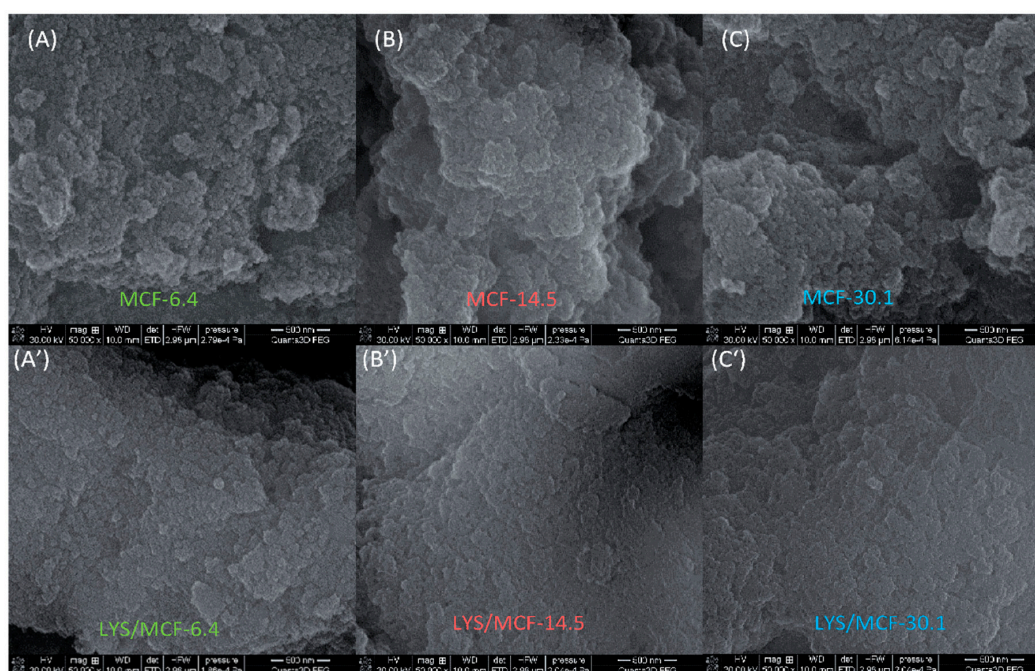


Figure 7. SEM micrographs of MCF-6.4 (A, magnification 50,000), MCF-14.5 silica (B, magnification 50,000), and MCF-30.1 (C, magnification 50,000) and after protein adsorption (A', B', C', magnification 50,000), respectively.

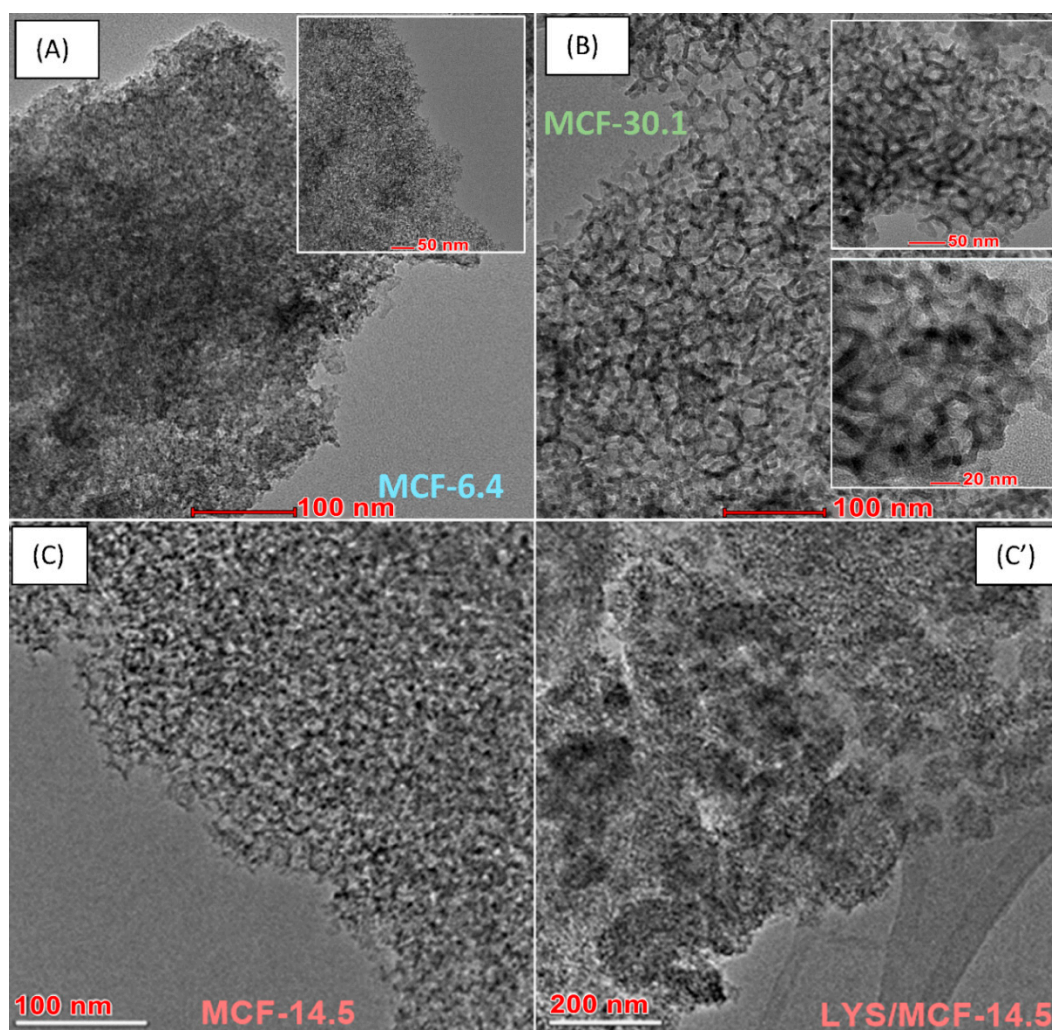


Figure 8. (A) HRTEM-BF micrographs showing the surface morphology and nanostructure of the MCF-6.4 (A), MCF-30.1 (B), and MCF-14.5 support before (C), and (C') after immobilization of LYS molecules.

3. Materials and Methods

3.1. Reagents

Lysozyme from chicken egg white (lyophilized powder, protein $\geq 90\%$, $\geq 40,000$ units/mg protein Cat. No. L6876) and 0.1 M phosphate buffer saline pH = 7.4, (BioPerformance Certified Buffers, Cat. No. P5368) were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). The non-ionic triblock copolymers Pluronic PE9400 ($\text{EO}_{21}\text{PO}_{47}\text{EO}_{21}$, $M_{av} = 4600$) from BASF (Baden Aniline and Soda Factory, Warsaw, Poland) and Pluronic P123 ($\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$, $M_w = 5800$) from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) were used as structure-directing agents. Tetraethylorthosilicate used as a silica source (TEOS 98%), 1,3,5-trimethylbenzene (TMB) as a pore expanding agent, ammonium fluoride, ($\text{NH}_4\text{F} \geq 98.0\%$) as a tuning window pore size-mineralizing agent, hydrochloric acid (37%) and other reagents of analytical grade were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) and used without further purification. Water was purified using a Millipore apparatus (resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ at 25°C).

Lysozyme with its well-determined structure is a small molecular protein (14.3 kDa) with a hydrodynamic radius of ~ 2 nm and is composed of a single polypeptide chain of 129 amino acids in the form of five α -helices, three antiparallel β -sheets and a large number of random coils and β -turns [42,43]. It has a prolate spheroid shape with two characteristic cross-sections: a side of approximate dimensions

$4.5 \times 3.0 \text{ nm}^2$ (shape similar to an ellipsoid) and an end of dimensions $3.0 \times 3.0 \text{ nm}^2$ [44]. The isoelectric point for lysozyme is $\text{pH}_{\text{IEP}} \sim 11$, at $\text{pH} = 7$ it is positively charged [45,46]. This enzyme has high structural stability and inflexibility within pH wide range 1.5 to 12 because the rigidity of the single-chained LYS molecule is imposed by four internal disulphide bonds that help maintain its tertiary structure [47]. This globular protein belongs to the family of hydrolases which, thanks to its biological function (the hydrolysis of the polysaccharide forming the bacterial cell wall), can be applied as an antimicrobial, anti-inflammatory, antiviral, antiseptic, antitumor agents [48].

3.2. Synthesis of Mesocellular Foam

Mesoporous MCF silica adsorbents with different pore structures were synthesized according to a previously published procedure [49,50] with some modifications described in the papers [51,52]. In the preparation of pure MCF support, Pluronic (P123 or PE9400) (4 g) was dissolved in 180 mL of 1.6 M aqueous HCl solution and stirred over 2 h at room temperature. Then, the established amount of TMB (polymer/TMB mass ratios were varied) was introduced to the mixture, and the resulting liquid was heated to $40 \text{ }^\circ\text{C}$ under continuous vigorous stirring by using a digitally controlled mechanical stirrer (250 rpm, 45 min). Then, the desired amounts of TEOS (the mass proportions of polymer/TEOS were changed) was introduced to the reaction mixture, and it was stirred for another 20 h at the same temperature. The resulting solution was transferred to an autoclave and aged at elevated temperatures ($110\text{--}120 \text{ }^\circ\text{C}$) for 24–144 h. In the case of some samples, 46 mg of NH_4F in 0.3 mL H_2O was added if desired as the mineralizing agent to increase the window pore size. Finally, the synthesized precipitate was thoroughly washed with distilled water and dried in air. Detailed synthesis conditions of MCF samples are given in Table S2 (Supplementary Material).

3.3. Adsorption Experiment

3.3.1. Adsorption Equilibrium

The equilibrium studies of LYS adsorption on the series of MCF adsorbents with varied porosity were performed by using the static methods. Before the experiment, the MCF material was dried at $150 \text{ }^\circ\text{C}$. A series of stock protein solutions at different concentrations (1–5 mg/mL) was prepared by dissolving appropriate amounts of protein in phosphate-buffered saline solutions at $\text{pH} = 7.4$. Then, 100 mg of pure MCF materials were contacted with the protein solution. The Erlenmeyer flasks with resulting suspensions were placed in the incubator shaker (New Brunswick Scientific Innova 40R Model, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and stirred at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ at 110 rpm speed until equilibrium was reached (24 h). After attaining equilibrium the equilibrium concentrations of proteins were determined using UV–Vis spectrophotometer Cary 100 (Varian Inc., Melbourne, Australia) at the wavelength of 281 nm. The adsorbed amount of protein was calculated from the mass balance equation:

$$a_{eq} = \frac{(c_0 - c_{eq}) \cdot V}{w} \quad (1)$$

where: a_{eq} is the equilibrium adsorbed amount [mg/g], c_0 is the initial concentration of protein solution [mg/mL], c_{eq} is the protein equilibrium concentration [mg/mL], V is the solution volume [ml], and w is the MCF mass [mg].

The experimental protein adsorption isotherms from aqueous solutions were analyzed by applying the Generalized Langmuir (GL) isotherm equation [53]:

$$a_{eq}/a_m = \left[\frac{(Kc_{eq})^m}{1 + (Kc_{eq})^m} \right]^{m/n} \quad (2)$$

where: a_m is the adsorption capacity; m, n is the heterogeneity parameters ($0 < m, n \leq 1$) describing the shape (asymmetry) of adsorption energy distribution function; K is the equilibrium constant related to characteristic adsorption energy.

GL equation is applied for the analysis of the localized physical adsorption on energetically heterogeneous solids. For the specific values of m and n parameters GL equation changes form into 4 simpler isotherms equations: Langmuir (L) (GL: $m = n = 1$); Langmuir-Freundlich (LF) (GL: $0 < m = n \leq 1$); Generalized Freundlich (GF) (GL: $n = 1, 0 < m \leq 1$); Tóth (T) (GL: $m = 1, 0 < n \leq 1$).

3.3.2. Adsorption Kinetics

The adsorption kinetic measurements were performed by means of the UV-Vis spectrophotometer Cary 100 (Varian Inc., Melbourne, Australia) with a quartz flow cell to analyze a solute concentration in a closed system [54–56]. The LYS solution (200 mL) with an established initial concentration of 0.4 mg/mL was conducted with a known amount of mesoporous silica (250 mg) in a thermostated vessel at constant temperature (25 °C). The suspension was stirred during the experiment by applying a digitally controlled mechanical stirrer (110 rpm). At definite time intervals the sample of protein solution was collected automatically to the flow cell of the spectrophotometer and the absorbance UV spectra in the wavelength range 200–400 nm were collected. Afterwards, the protein solution was returned to the reaction vessel. Finally, the concentration vs. time and the adsorption vs. time profiles for the protein adsorption system were calculated from the obtained spectra.

The measured kinetic data were analyzed by using the multi-exponential (m-exp) equation [30]:

$$c = (c_0 - c_{eq}) \sum_{i=1}^n f_i \exp(-k_i t) + c_{eq} \quad (3)$$

where: c —the actual adsorbate concentration, k_i —the rate constant ($i = 1, 2, \dots, n$), f_i —the coefficient determining a fraction of a solute adsorbed with rate k_i . Moreover, the adsorption kinetic half-time was estimated as a time needed for attaining $\frac{1}{2}$ of concentration change.

The kinetic experimental data were also studied by applying the other kinetic equations and models: first-order (FOE), second-order (SOE), mixed-order (MOE), fractal first-order (f-FOE), fractal second-order (f-SOE), fractal mixed-order (f-MOE) equations, and the intraparticle diffusion (IDM, Crank) and pore diffusion (PDM, McKay) models (Supplementary Material) [30]. The non-linear LSQ optimization was applied in the calculations taking into account the difference between the experimental and fitted adsorbate concentrations.

3.4. Potentiometric Titration

The surface acid-base character (surface charge and pH of zero charge— pH_{pzc}) of the pure MCF materials and MCF with the immobilized LYS were determined by potentiometric titration. The measurements were carried out in the thermostatic vessel at 25 °C applying a Dosimat 765 automatic burette (Metrohm, Herisau, Switzerland) connected with a precision pH-meter (PHM 240, Radiometer, Copenhagen, Denmark). The details of the potentiometric titration measurements for pure MCF sorbents were as follows: 30 mL of the stock electrolyte (0.1 M NaCl) was acidified with 0.3 mL of 0.5 M HCl solution and transferred into a thermostatic quartz vessel. To prevent contamination with CO₂, the pure nitrogen flow was used throughout the titration (1–2 bubbles per second). The determined amounts of MCF samples (0.1 g) were added into the electrolyte solution and then the resulting suspension of adsorbent was titrated by using 0.2 M NaOH recording pH changes.

The potentiometric titration experiment for MCF adsorbents with immobilized lysozyme was carried out as follows: the MCF samples (0.1 g) were added to a thermostatic vessel containing 30 mL of lysozyme solution of concentration 5 mg/mL in 0.1 M NaCl. Then, the system was acidified (0.3 mL of 0.5 M HCl solution), and the adsorption process was carried out at 25 °C for 24 h and finally the resulting mixture protein/sorbent suspension was also titrated using 0.2 M NaOH.

The obtained potentiometric titration curves (pH solution vs. NaOH volume) for MCF materials and LYS/MCF systems were converted into the surface charge density curves, using the equation [57]:

$$q_s = \frac{F \cdot \Delta n_{H^+}}{S_{BET}} \quad (4)$$

where: q_s —the surface charge, Δn_{H^+} —the ion mole number for 1 g of material, F —the Faraday's constant, S_{BET} —the specific surface area of adsorbents.

3.5. Nitrogen Adsorption/Desorption Isotherms

The porous structure evaluation of mesoporous silica before and after lysozyme adsorption were thoroughly characterized by using a low-temperature adsorption/desorption of nitrogen at -196 °C applying the automatic ASAP 2020 sorption analyzer (Micromeritics Instrument Corp., Norcross, GA, USA). Prior to the measurement, the pure MCF supports and LYS/MCF composites were outgassed (4 μ mHg), respectively, at 150 °C and 30 °C for 24 h in degas port of analyzer. The obtained adsorption/desorption isotherms were used to evaluate the porous structure of the studied MCF adsorbents as well as protein/silica composites. The specific surface area (S_{BET}) was calculated using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) equation. Meanwhile, the total pore volumes (V_t) were estimated from the single point adsorption value at the relative pressure (p/p_0) of 0.99. To assess the values of the external surface area (S_{ext}) and the mesopore volume (V_{mes}) the α_s plot was used [58]. Calculation of the pore size distributions (PSD) were determined using the adsorption and desorption branches of the isotherms by means of the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) procedure for cylinder pores [59]. The pore diameters were derived from the PSD maxima (mode, D_{mo}) and PSD average (D_{av}). In turn, the mean hydraulic pore diameters were calculated from the BET surface areas and total pore volumes $D_h = 4 \cdot V_t / S_{BET}$.

3.6. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM)

The surface morphology, topography, and structure at the micro and nano level of silica support without and with adsorbed protein was examined by using the scanning electron microscope (SEM) Quanta 3D FEG (FEI, Field Electron and Ion Co., Hillsboro, OR, USA) and the high-resolution transmission electron microscope S/TEM Titan3TM G2 60-300 (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) equipped with a field-emission electron gun (FEG) in high-resolution bright-field imaging (HRTEM-BF) in TEM mode.

3.7. Thermal Analysis Coupled with FTIR and MS

The thermal analysis was used to examine the thermal stability, behavior, and decomposition of the MCF materials before and after LYS adsorption, as well as to determine the presence of protein on the silica surface or in the pores. The thermal experiment was carried out on the apparatus STA 449 Jupiter F1 (Netzsch, Selb, Germany). The samples (~ 18 mg) in aluminum crucibles were heated in the temperature range 30 – 950 °C with a heating rate of 10 °C/min under a dynamic atmosphere of synthetic air with a flow rate of 50 mL/min. The sensor thermocouple type S TG-DSC and empty Al_2O_3 crucible as a reference were used. The identification of gas products emitted during decomposition of the studied materials was detected and analyzed by quadrupole mass spectrometer QMS 403C Aëolos (Netzsch, Selb, Germany) and Fourier transform infrared spectroscopy FTIR spectrometer Bruker (Ettlingen, Germany) coupling on-line to STA instrument. The QMS data were collected in the range of 10 to 300 amu. The FTIR spectra in the spectral range 600 – 4000 cm^{-1} with 16 scans per spectrum at a resolution 4 cm^{-1} were recorded.

4. Conclusions

The synthesized series of mesoporous MCF silica supports differentiated by pore diameters (6–30 nm) and surface areas (250–720 m²/g) were applied for lysozyme immobilization by physical adsorption. For the first time, special attention was paid to the correlation between the MCF pore size and specific surface area, and lysozyme adsorption capacity and rate. The obtained results allow to optimize/design the structural characteristics of the solid support with respect to biomolecule adsorption and surface density for potential biomedical/biophysical applications. We found that the strongest adsorption was obtained for MCF-14.5 with the medium pore size which might be explained by the optimum relation of lysozyme molecular size and support pore diameter responsible for the increase of the adsorption forces. In the case of other materials with lower and higher pore sizes, the protein adsorbed amount decreased proportionally to a relation: pore diameter/protein diameter. The lysozyme adsorption process was the slowest for MCF-6.4 with the narrowest pores due to the hindered diffusion of protein molecules into the support pores. However, it is the quickest for MCF-30.1 with the largest pores facilitating the diffusion and adsorption. In the case of MCF-14.5, the adsorption process is slightly slower in comparison to MCF-30.1 which means that the pore sizes of this material do not disturb protein diffusion. The kinetic profiles for MCF-30.1 and MCF-6.4 achieved the comparable close to equilibrium adsorption values, however, for MCF-14.5 the equilibrium adsorption was higher. The changes in pore characteristics after lysozyme adsorption revealed that the protein molecules were adsorbed inside the channels of mesoporous adsorbents as well as located on the surface. Considering the positive charge of lysozyme at pH = 7.4 and the negative charge of silica, one can assume that the electrostatic attractive interactions play a significant role in the immobilization process. After protein adsorption pH_{pzc} for biomaterials stabilizes. The microscopic analyses revealed that topography, texture, and micro/nanostructure of the biocomposite surface were completely different from that of pure silica. The morphology and texture of the biocomposite surface were less porous, more homogeneous, and flat. The differences in protein adsorption and surface density for the biocomposites of various pore sizes are evident.

In further research, we will focus on estimating the LYS activity after adsorption on the mesoporous support and on studying the possible pore size effect to design a protein-containing biocomposite with better stability/activity for attaining effective mesoporous support for enzyme delivery and potential biotechnological applications [60].

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5479/s1>. Figure S1. (A) Comparison of nitrogen adsorption/desorption isotherms for selected MCF materials with different pore sizes (MCF-6.4 nm, MCF-14.5 nm, MCF-30.1 nm). (B, C) Pore size distributions calculated by using BJH method for the adsorption and desorption branches of isotherms. Figure S2. (A) Comparison of N₂ adsorption/desorption isotherms before and after LYS adsorption for MCF-14.5, and MCF-6.4, MCF-30.1 (inset plots). (B) Differential pore size distributions (PSDs) evaluated from the BJH model based on desorption data for pure MCF-14.5 support and covered by the LYS molecules. Inset is the pore size distributions for pure MCF-6.4, MCF-30.1 supports, and after LYS adsorption. Figure S3. Influence of hydraulic pore diameter (D_h) and surface area (S_{BET}) on the point of zero charge (pH_{pzc}) of MCF materials after LYS adsorption. Inset: variations pH_{pzc} as a function of D_h and S_{BET} for pure supports. Table S1. Relative standard deviations SD(c)/co for m-exp, FOE, SOE, MOE, f-FOE, f-SOE, F-MOE, McKay pore diffusion (PDM) and IDM model (Crank). Table S2. Preparation conditions in MCF synthesis.

Author Contributions: Conceptualization, A.C., A.D.-M.; methodology, A.C.; investigation, A.C.; formal analysis, A.C., formal analysis (kinetic models), M.W.; visualization, A.C.; writing—original draft preparation, A.C.; writing—reviewing & editing, A.D.-M., A.C.; funding acquisition, A.D.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research leading to these results has received funding from the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013/under REA grant agreement N° PIRSES-GA-2013-612484.

Conflicts of Interest: There are no conflicts of interest to declare.

References

1. Kirkland, J.J.; Truszkowski, F.A.; Ricker, R.D. Atypical silica-based column packings for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *965*, 25. [[CrossRef](#)]
2. Giacomelli, C.E.; Norde, W. The adsorption-desorption cycle. Reversibility of the BSA-Silica System. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *233*, 234–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Steri, D.; Monduzzi, M.; Salis, A. Ionic strength affects lysozyme adsorption and release from SBA-15 mesoporous silica. *Microporous Mesoporous Mater.* **2013**, *170*, 164–172. [[CrossRef](#)]
4. Kubiak-Ossowska, K.; Cwieka, M.; Kaczynska, A.; Jachimska, B.; Mulheran, P.A. Lysozyme adsorption at a silica surface using simulation and experiment: Effects of pH on protein layer structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 24070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. van den Heuvel, D.B.; Stawski, T.M.; Tobler, D.J.; Wirth, R.; Peacock, C.L.; Benning, L.G. Formation of Silica-Lysozyme Composites Through Co-Precipitation and Adsorption. *Front. Mater.* **2018**, *5*, 19. [[CrossRef](#)]
6. Gustafsson, H.; Johansson, E.M.; Barrabino, A.; Odén, M.; Holmberg, K. Immobilization of lipase from *Mucor miehei* and *Rhizopus oryzae* into mesoporous silica—the effect of varied particle size and morphology. *Colloids Surf. B* **2012**, *100*, 22–30. [[CrossRef](#)]
7. Moerz, S.T.; Huber, P. Protein Adsorption into Mesopores: A Combination of Electrostatic Interaction, Counterion Release, and van der Waals Forces. *Langmuir* **2014**, *30*, 2729–2737. [[CrossRef](#)]
8. Vinu, A.; Murugesan, V.; Tangermann, O.; Hartmann, M. Adsorption of Cytochrome c on Mesoporous Molecular Sieves: Influence of pH, Pore Diameter, and Aluminum Incorporation. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3056–3065. [[CrossRef](#)]
9. Diao, X.; Wang, Y.; Zhao, J.; Zhu, S. Effect of pore-size of mesoporous SBA-15 on adsorption of bovine serum albumin and lysozyme protein. *Chin. J. Chem. Eng.* **2010**, *18*, 493–499. [[CrossRef](#)]
10. Lin, C.Y.; Yang, C.M.; Lindén, M. Influence of serum concentration and surface functionalization on the protein adsorption to mesoporous silica nanoparticles. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 33912–33921. [[CrossRef](#)]
11. Ran, R.; You, L.; Di, B.; Hao, W.; Su, M.; Yan, F.; Huang, L. A novel chiral mesoporous binaphthyl-silicas: Preparation, characterization, and application in HPLC. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 1854–1862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Katiyar, A.; Yadav, S.; Smirniotis, P.G.; Pinto, N.G. Synthesis of ordered large pore SBA-15 spherical particles for adsorption of biomolecules. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1122*, 13–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Nguyen, T.P.B.; Lee, J.W.; Shim, W.G.; Moon, H. Synthesis of functionalized SBA-15 with ordered large pore size and its adsorption properties of BSA. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *110*, 560–569. [[CrossRef](#)]
14. Chen, S.; Shaoai, S.; Xiaoqiong, Z.; Qiang, H.; Liu, J.; Mingyu, D. Synthesis of large-pore mesostructured cellular foam silica spheres for the adsorption of biomolecules. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 2411–2417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zhifang, M.; Jing, B.; Yichen, W.; Xiue, J. Impact of Shape and Pore Size of Mesoporous Silica Nanoparticles on Serum Protein Adsorption and RBCs Hemolysis. *Acs Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 2431–2438.
16. Galarneau, A.; Muresanu, M.; Atger, S.; Renard, G.; Fajula, F. Immobilization of lipase on silicas. Relevance of textural and interfacial properties on activity and selectivity. *New J. Chem.* **2006**, *30*, 562. [[CrossRef](#)]
17. Cai, C.; Gao, Y.; Liu, Y.; Zhong, N.; Liu, N. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto SBA-15 and their application in glycerolysis for diacylglycerols synthesis. *Food Chem.* **2016**, *212*, 205–212. [[CrossRef](#)]
18. Zhong, N.; Chen, W.; Liu, L.; Chen, H. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto the organic functionalized SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production. *Food Chem.* **2019**, *274*, 739–746. [[CrossRef](#)]
19. Miyahara, M.; Vinu, A.; Ariga, K. Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 232–236. [[CrossRef](#)]
20. Li, J.; Xiong, Z.; Zhou, L.; Han, X.; Liu, H. Effects of pore structure of mesoporous silicas on the electrochemical properties of hemoglobin. *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *130*, 333–337. [[CrossRef](#)]
21. Vinu, A.; Hartmann, M. Adsorption of cytochrome c on MCM-41 and SBA-15: Influence of pH. *Stud. Surf. Sci. Catal.* **2004**, *154*, 2987–2994.
22. Meissner, J.; Prause, A.; diTommaso, C.; Bharti, B.; Findenegg, G.H. Protein Immobilization in Surface-Functionalized SBA-15: Predicting the Uptake Capacity from the Pore Structure. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 2438–2446. [[CrossRef](#)]

23. Pegah, S.N.Z.; Akerman, B. Immobilization of Enzymes in Mesoporous Silica Particles: Protein Concentration and Rotational Mobility in the Pores. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 2575–2583.
24. Katiyar, A.; Ji, L.; Smirniotis, P.G.; Pinto, N.G. Adsorption of bovine serum albumin and lysozyme on silicious MCM-41. *Microporous Mesoporous Mater.* **2005**, *80*, 311–320. [[CrossRef](#)]
25. Atyaksheva, L.F.; Kasyanov, I.A.; Ivanova, I.I. Adsorptive Immobilization of Proteins on Mesoporous Molecular Sieves and Zeolites. *Pet. Chem.* **2019**, *59*, 327–337. [[CrossRef](#)]
26. Hudson, S.; Cooney, J.; Magner, E. Proteins in Mesoporous Silicates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8582–8594. [[CrossRef](#)]
27. Russo, P.A.; Ribeiro Carrott, M.M.L.; Mourao, P.A.M.; Carrott, P.J.M. Tailoring the surface chemistry of mesocellular foams for protein adsorption. *Colloids Surf. A* **2011**, *386*, 25–35. [[CrossRef](#)]
28. Essa, H.; Magner, E.; Cooney, J.; Hodnett, B. Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates. *J. Mol. Catal. B* **2007**, *49*, 61. [[CrossRef](#)]
29. Han, Y.; Watson, J.T.; Stucky, G.D.; Butler, A. Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase. *J. Mol. Catal. B* **2002**, *17*, 1. [[CrossRef](#)]
30. Deryło-Marczewska, A.; Chrzanowska, A.; Marczewski, A.W. Morphological, structural and physicochemical characteristics of MCF surface with the adsorbed OVA and BSA proteins. *Microporous Mesoporous Mater.* **2020**, *293*, 109769. [[CrossRef](#)]
31. Sing, K.S.W. Adsorption methods for the characterization of porous materials. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1998**, *76–77*, 3–11. [[CrossRef](#)]
32. Schmidt-Winkel, P.; Lukens Jr., W.W.; Yang, P.; Margolese, D.I.; Lettow, J.S.; Ying, J.Y. Microemulsion Templating of Siliceous Mesostructured Cellular Foams with Well-Defined Ultralarge Mesopores. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 686–696. [[CrossRef](#)]
33. Santos, S.M.L.; Cecilia, J.A.; Vilarrasa-García, E.; Junior, I.J.S.; Rodríguez-Castell, E.; Azevedo, D.C.S. The effect of structure modifying agents in the SBA-15 for its application in the biomolecules adsorption. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, *232*, 53–64. [[CrossRef](#)]
34. Vinu, A.; Murugesan, V.; Hartmann, M. Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7323–7330. [[CrossRef](#)]
35. Moerz, S.T.; Huber, P. pH-Dependent Selective Protein Adsorption into Mesoporous Silica. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 27072–27079. [[CrossRef](#)]
36. Puziy, A.M.; Poddubnaya, O.I.; Deryło Marczewska, A.; Marczewski, A.W.; Blachnio, M.; Tsyba, M.M.; Sapsay, V.I.; Klymchuk, D.O. Protein Adsorption by Nanostructured Carbons with Different Pore Sizes. *Adsorption* **2016**, *22*, 541–552. [[CrossRef](#)]
37. David, A.E.; Wang, N.S.; Yang, V.C.; Yang, A.J. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. *J. Biotechnol.* **2006**, *125*, 395–407. [[CrossRef](#)]
38. Moelans, D.; Cool, P.; Baeyens, J.; Vansant, E.F. Using mesoporous silica materials to immobilise biocatalysis-enzymes. *Catal. Commun.* **2005**, *6*, 307–311. [[CrossRef](#)]
39. Wisniewska, M.; Szewczuk-Karpisz, K.; Sternik, D. Adsorption and thermal properties of the bovine serum albumin–silicon dioxide system. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2015**, *120*, 1355–1364. [[CrossRef](#)]
40. Chrzanowska, A.; Deryło-Marczewska, A. Mesoporous silica/protein biocomposites: Surface, topography, thermal properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *139*, 531–542. [[CrossRef](#)]
41. Chrzanowska, A.; Deryło-Marczewska, A.; Borowski, P. Comprehensive characterization of biocomposite surface based on the mesoporous silica and lysozyme molecules: Chemistry, morphology, topography, texture and micro-nanostructure. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *525*, 146512. [[CrossRef](#)]
42. Sheng, L.; Wang, J.; Huang, M.; Xu, Q.; Ma, M. The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *92*, 600–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Khan, J.M.; Chaturvedi, S.K.; Rahman, S.K.; Ishtikhar, M.; Qadeer, A.; Ahmad, E.; Khan, R.H. Protonation favors aggregation of lysozyme with SDS. *Soft Matter.* **2014**, *10*, 2591–2599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Meissner, J.; Prause, A.; Bhuvnesh, B.; Findenegg, G.H. Characterization of protein adsorption onto silica nanoparticles: Influence of pH and ionic strength. *Colloid Polym. Sci.* **2015**, *293*, 3381–3391. [[CrossRef](#)]
45. Perez, D.E.L.; Aradilla, D.; Del Valle, L.J.; Aleman, C. Capacitive composites made of conducting polymer and lysozyme: Toward the biocondenser. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 6607–6619. [[CrossRef](#)]

46. Fang, Y.; Yi, L.; Fang, Y. Unfolding of lysozyme induced by urea and guanidine hydrochloride studied by “Phase Diagram” method of fluorescence. *Acta Chim. Sin.* **2003**, *61*, 803–807.
47. Buijs, J.; Hlady, V. Adsorption Kinetics, Conformation, and Mobility of the Growth Hormone and Lysozyme on Solid Surfaces, Studied with TIRF. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *190*, 171–181. [[CrossRef](#)]
48. Shanmugaraj, K.; Umadevi, P.; Senthilkumar, L.; Ilanchelian, M. Elucidation of Binding Mechanism of Photodynamic Therapeutic Agent Toluidine Blue O with Chicken Egg White Lysozyme by Spectroscopic and Molecular Dynamics Studies. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93*, 1043–1056. [[CrossRef](#)]
49. Zhao, D.; Feng, J.; Huo, Q. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science* **1998**, *279*, 548–552. [[CrossRef](#)]
50. Doadrio, A.L.; Sousa, E.M.B.; Doadrio, J.C.; Pérez-Pariente, J.; Izquierdo-Barba, I.; Vallet-Regí, M. Mesoporous SBA-15 HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery. *J. Control. Release* **2004**, *97*, 125–132. [[CrossRef](#)]
51. Derylo-Marczewska, A.; Marczewski, A.W.; Skrzypek, I.; Pikus, S.; Kozak, M. The effect of aging temperature on structure characteristics of ordered mesoporous silicas. *Appl. Surf. Sci.* **2005**, *252*, 625–632. [[CrossRef](#)]
52. Derylo-Marczewska, A.; Marczewski, A.W.; Skrzypek, I.; Pikus, S. Effect of Block Copolymer Type on Formation of Mesoporous Silica Structure. *Pol. J. Chem.* **2008**, *82*, 205–212.
53. Marczewski, A.W. Application of mixed order rate equations to adsorption of methylene blue on mesoporous carbons. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *256*, 5145–5152. [[CrossRef](#)]
54. Jaroniec, M.; Madey, R. *Physical Adsorption on Heterogeneous Solids*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1988.
55. Brandt, A.; Bülow, M.; Derylo-Marczewska, A.; Goworek, J.; Schmeißer, J.; Schöps, W.; Unger, B. Novel zeolite composites and consequences for rapid sorption processes. *Adsorption* **2007**, *13*, 267–279. [[CrossRef](#)]
56. Marczewski, A.W. Analysis of kinetic Langmuir model. Part I: Integrated kinetic Langmuir equation (IKL): A new complete analytical solution of the Langmuir rate equation. *Langmuir* **2010**, *26*, 15229–15238. [[CrossRef](#)]
57. Derylo-Marczewska, A.; Marczewski, A.W. Non-homogeneity Effects in Adsorption from Gas and Liquid Phases on Activated Carbons. *Langmuir* **1999**, *15*, 3981–3986. [[CrossRef](#)]
58. De Boer, J.H.; Linsen, B.G.; Osinga, T.J. Studies on pore systems in catalysts: VI. The universal t curve. *J. Catal.* **1965**, *4*, 643–648. [[CrossRef](#)]
59. Barrett, E.P.; Joynt, L.G.; Halenda, P.P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373–380. [[CrossRef](#)]
60. Kao, C.K.; Lin, T.S.; Mou, C.Y. Enhanced Activity and Stability of Lysozyme by Immobilization in the Matching Nanochannels of Mesoporous Silica Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 6734–6743. [[CrossRef](#)]



Supplementary material for the paper:

Mesocellular Silica Foams (MCFs) with Tunable Pore Size as a Support for Lysozyme Immobilization: Adsorption Equilibrium and Kinetics, Biocomposite Properties

Agnieszka Chrzanowska*, Anna Derylo-Marczewska and Malgorzata Wasilewska

Department of Physical Chemistry, Institute of Chemical Sciences, Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University in Lublin, M. Curie-Skłodowska Sq. 3, 20-031 Lublin, Poland; annad@hektor.umcs.lublin.pl (A.D.-M.); malgorzata.seczkowska@umcs.pl (M.W.)

* Correspondence: agnieszka.chrzanowska@poczta.umcs.lublin.pl

Received: 10 July 2020; Accepted: 29 July 2020; Published: date

Structure Characterization of MCF Supports

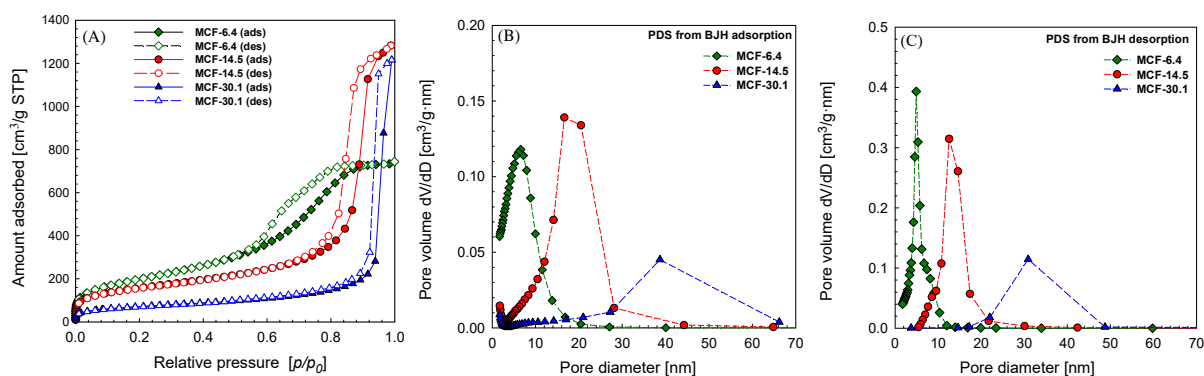


Figure S1. (A) Comparison of nitrogen adsorption/desorption isotherms for selected MCF materials with different pore sizes (MCF-6.4 nm, MCF-14.5 nm, MCF-30.1 nm). (B, C) Pore size distributions calculated by using BJH method for the adsorption and desorption branches of isotherms.

Adsorption Kinetics

Table S1. Relative standard deviations $SD(c)/c_0$ for m-exp, FOE, SOE, MOE, f-FOE, f-SOE, F-MOE, McKay pore diffusion (PDM) and IDM model (Crank).

System	m-exp	FOE	SOE	MOE	f-FOE	f-SOE	f-MOE	IDM	PDM
LYS/MCF-6.4	0.337%	0.430%	0.389%	0.392%	0.246%	0.247%	2.242%	2.897%	4.495%
LYS/MCF-14.5	0.414%	4.587%	4.422%	3.499%	3.360%	2.625%	2.414%	7.196%	20.949%
LYS/MCF-30.1	0.723%	3.066%	3.033%	1.274%	2.478%	2.466%	3.776%	4.357%	22.187%
average	0.491%	2.694%	2.615%	1.722%	2.028%	1.779%	2.811%	4.817%	15.877%

The kinetic equations and models: multi-exponential equation (m-exp), first-order equation (FOE), second-order equation (SOE), mixed-order equation (MOE), fractal first-order equation (f-FOE), fractal second-order equation (f-SOE), fractal mixed-order equation (f-MOE), intraparticle diffusion model (IDM), McKay pore diffusion model (PDM).

Structural Analysis

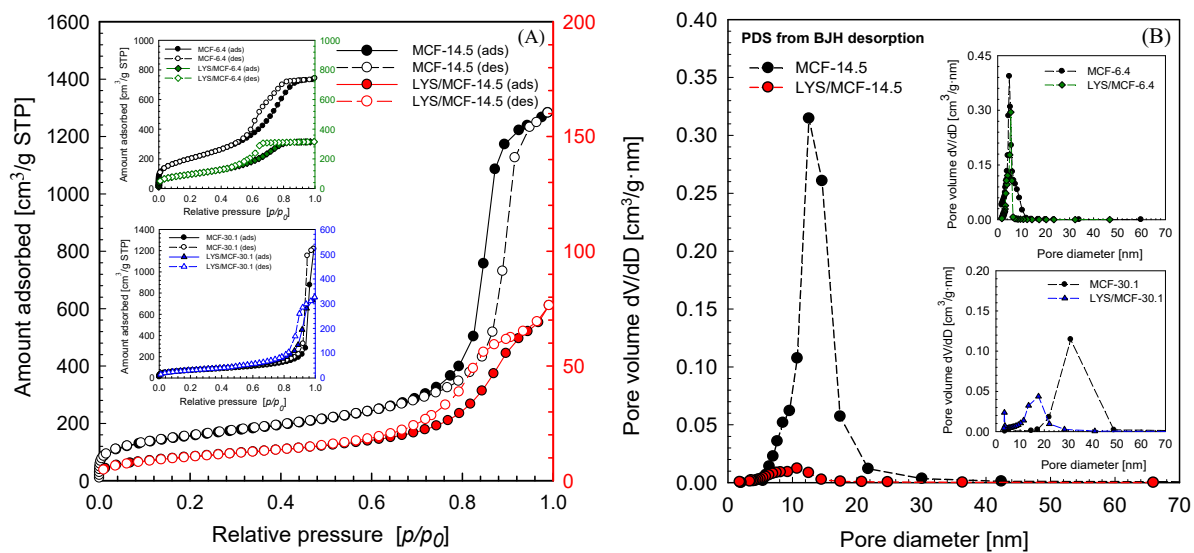


Figure S2. (A) Comparison of N₂ adsorption/desorption isotherms before and after LYS adsorption for MCF-14.5, and MCF-6.4, MCF-30.1 (inset plots). (B) Differential pore size distributions (PSDs) evaluated from the BJH model based on desorption data for pure MCF-14.5 support and covered by the LYS molecules. Inset is the pore size distributions for pure MCF-6.4, MCF-30.1 supports, and after LYS adsorption.

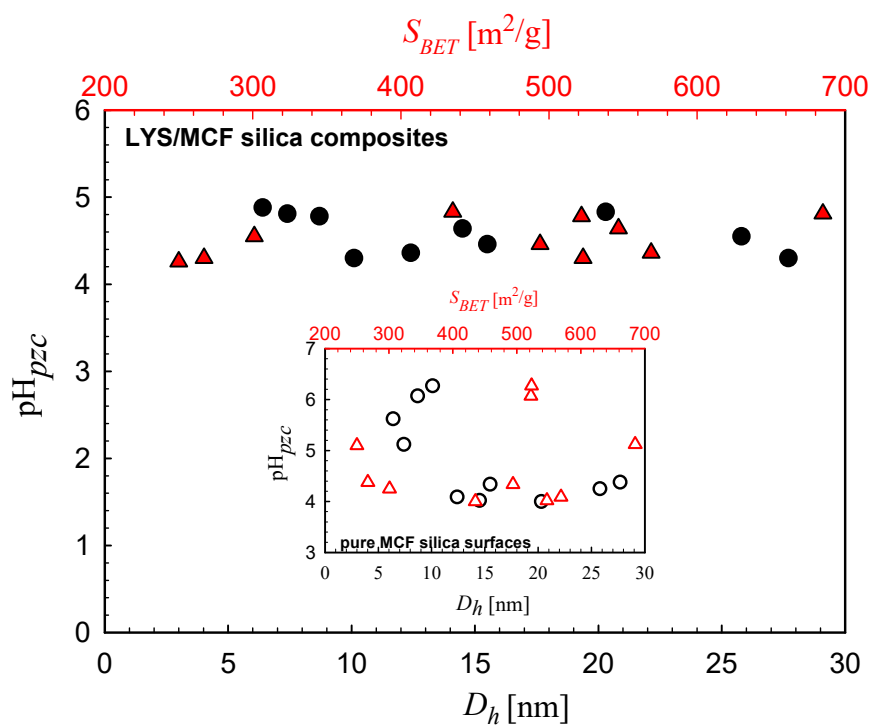


Figure S3. Influence of hydraulic pore diameter (D_h) and surface area (S_{BET}) on the point of zero charge (pH_{pzc}) of MCF materials after LYS adsorption. Inset: variations pH_{pzc} as a function of D_h and S_{BET} for pure supports.

Synthesis of Mesocellular Foam

Table S2. Preparation conditions in MCF synthesis.

Material	Polymer Type	Polymer/TMB Mass Ratios [g/g]	Polymer/TEOS Mass Ratios [g/g]	Aging Temp./Time [°C/h]
MCF-6.4	PE9400	1:1	1:0.9	120/24
MCF-7.4	PE9400	1:1	1:0.9	122/24
MCF-8.7	PE9400	1:1	1:0.7	122/24
MCF-10.1	PE9400	1:1	1:1.8	120/24
MCF-12.4	PE9400	1:1	1:2.2	120/24
MCF-14.5	PE9400	1:1	1:2.2	110/144
MCF-15.5	P123	1:1	1:2.2	110/72
^a MCF-20.3	P123	1:2.5	1:3	120/24
^a MCF-25.8	P123	1:2.5	1:3	120/96
^a MCF-27.7	P123	1:3.5	1:3	120/96
^a MCF-30.1	P123	1:5	1:3	120/96

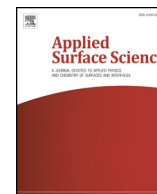
^a The mineral agent NH₄F.

PUBLIKACJA [D4]



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsusc

Comprehensive characterization of biocomposite surface based on the mesoporous silica and lysozyme molecules: Chemistry, morphology, topography, texture and micro-nanostructure



Agnieszka Chrzanowska*, Anna Derylo-Marczewska, Piotr Borowski

Institute of Chemical Sciences, Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University in Lublin, M. Curie-Skłodowska Sq. 3, 20-031 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Lysozyme/MCF biocomposite
Micro-nanostructure
Surface morphology
Topography analysis

ABSTRACT

The results presented in this paper focus on a detailed analysis of surface composition, texture, morphology and micro-nanostructure of mesocellular silica foam (MCF) covered by the lysozyme (LYS) molecules from aqueous solutions at pH = 7.4. The physicochemical and structural properties of the LYS/MCF biocomposite were characterized by various techniques including attenuated total reflection (ATR) Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), elemental analysis (CHN), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), diffuse reflectance spectroscopy (UV-Vis DRS), X-ray diffraction (XRD). Moreover, the morphology, micro-nanostructure, topography and elemental composition of biocomposite surface were determined using atomic force microscopy (AFM), optical profilometry (OP), high resolution transmission electron microscopy (HRTEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and scanning electron microscopy with X-ray microanalysis (SEM/EDS). AFM, OP, TEM and SEM methods (with regard to morphology, topography, structure at a micro-nanometer level) demonstrate that the surface of the support with immobilized protein is less rough, porous, wavy, sharp, and hence more smooth, flat and uniform due to the proteins adsorbed on support surface. EDX and EDS demonstrated the homogeneous distribution of protein molecules on silica surface. XRD confirmed that the lysozyme molecules were located on the support surface and inside the pores, and XPS revealed the specific interactions between the albumin and silica.

1. Introduction

The processes of adsorption, immobilization, encapsulation and incorporation of enzymes, especially proteins, onto different solid surfaces play an important role in modern biology, medicine, and in numerous technical, biochemical, pharmaceutical and food processing applications. It is generally known that the protein adsorption at solid/liquid interfaces is an important phenomenon from the scientific and practical point of view, including disease diagnostics [1], biosensors [2], biomedical implants [3], artificial organ [4], tissue engineering [5], therapeutic micro- and nano-devices [6], drug delivery system [7], immunological tests [8], immunomagnetic cell separation [9], immobilized enzyme or catalyst [10] etc.

The properties of protein films formed on solid surfaces are highly dependent on a few factors: the medium (ionic strength, pH, temperature), the biomolecule attributes (size, structure, stability, unfolding rate, net charge, isoelectric point, etc.), and the protein behavior at interfaces (adsorption, encapsulation, exchange, supramolecular

organization) [11,12]. In addition to the above mentioned parameters affecting the features of the resulting protein layers, the physicochemical properties of solid supports like porosity, surface roughness, chemical composition, polarity, heterogeneity, hydrophobicity, surface electric charge etc. also have crucial significance.

In biomaterials and nanosystems, the interactions between solid surface and the biological molecules are controlled by the protein affinity to the surface, reversibility of the adsorption process, extent of deformation and unfolding capabilities of protein, and solid surface properties. It is generally known that physical, electrochemical, structural and textural properties of the surface strongly influence the biocompatibility of artificial biomaterial devices and regulate biological responses. In particular, the nanoscale surface morphology influences significantly the cellular adhesion, growth, spread, and differentiation of biological systems [13,14]. It is very important to know how the surface properties (chemistry, micro-nanostructure, morphology and texture) determine the amount, structure, orientation/organization and distribution of the adsorbed proteins. It is essential for understanding

* Corresponding author.

E-mail address: agnieszka.chrzanowska@poczta.umcs.lublin.pl (A. Chrzanowska).

the cell-nanostructured surface interaction and cell-protein interactions in order to achieve productivity of biomaterial *in vitro* and *in vivo* [15,16]. Despite years of extensive experimental [17–22], theoretical and computational simulation studies [23–25], the details of protein adsorption process, structure of the formed surface biofilms as well as quantitative structure–property relationships between protein and solid surface are still not completely explained.

In recent years, the biochemical and physical properties of protein adsorbed layers on silica supports were extensively investigated with regard to the applications of such systems in modern medicine and nano-biotechnology for enzyme immobilization, encapsulation as well as biocatalysis purposes [26]. Mesoporous silicon particles, due to their weak interactions with proteins, may be used as possible carriers for therapeutic protein delivery [27], while other silicate media, primarily in the form of sol–gel composites and/or functionalized mesoporous silicas due to strong protein adsorption capacities, can be used in biochemical technologies (enzymatic catalysis [28,29], protein crystallization [30,31] and the fractionation of biological fluids such as blood into their individual components [32]). Mesoporous silica materials characterized by high specific surface area, large pore volume and size, uniform well-organized pore structure of defined dimensions and narrow pore-size distributions may pose attractive supports for biological molecules. In this group of materials used for enzyme immobilization, the mesocellular silica foams (MCFs) with unique three-dimensional pore structure of uniform ultralarge spherical cells (22–42 nm) interconnected by narrow window pores (~10 nm) [33] and hydrothermally robust frameworks are highly beneficial for a wide range of applications in catalysis, separations, purifications and biosensing [34–36]. Additionally, the surface features, structure, pore size and particle morphology of MCF supports can be precisely designed during their synthesis, in order to achieve the desired physicochemical and functional properties for specific applications.

In this paper, the lysozyme extracted from chicken egg white (LYS) was taken as a model enzyme protein for immobilization on the mesoporous MCF support. Its properties are as follows: a number of amino acid residues – 129, molecular weight – 14.3 kDa, isoelectric point – IEP ~ 11, net protein charge – +8e at pH = 7, hydrodynamic radius – ~2 nm, and ellipsoidal dimension – $3.0 \times 3.0 \times 4.5 \text{ nm}^3$ [37,38]. Lysozyme exhibits anti-bacterial properties against grampositive bacteria and is largely applied in the food preservation, medicinal and pharmaceutical industries [39,40].

In many reports the lysozyme adsorption layers onto various surfaces were extensively characterized by using a great variety of experimental techniques, including optical and spectroscopic methods such as neutron reflection [41], total internal reflectance fluorescence (TIRF) [42], circular dichroism (CD) spectroscopy [43], surface plasmon resonance [44], surface-enhanced Raman spectroscopy (SARS) [45], dual polarisation interferometry (DPI) [17], dynamic light scattering (DLS) [46], streaming potential [47], ellipsometry [48] and acoustic biosensing techniques such as quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) [49]. In our previous studies the series of MCF materials of divergent porosity were synthesized, covered by lysozyme, and characterized with different physicochemical methods [50].

The present work provides information about characteristics of protein layers on the MCF surface and describes in detail the chemical, morphological, textural and micro-nanostructural properties of porous silica/lysozyme biocomposite. For analysis the mesoporous material showing the best adsorption properties towards lysozyme was chosen. The studies of structural changes of protein/silica composite surface were performed by means of the small angle X-ray diffraction (XRD) and the diffuse reflectance spectroscopy (UV–Vis DRS). The proper characterization of morphology, texture and micro-nanostructure were conducted using the atomic force microscopy (AFM) and the optical profilometry (OP). Additionally, the surface topography and elemental analysis of porous silica support before and after lysozyme adsorption were verified by the scanning electron microscopy with X-ray

microanalysis (SEM/EDS), the high resolution transmission electron microscopy (HRTEM) and the energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX). Moreover, infrared Fourier transform spectroscopy (FT-IR) operating in the attenuated total reflection (ATR) mode, the elemental analysis (CHN) and the X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) yield complementary information on the chemical structure, the interactions between lysozyme and silica surface, the elemental composition and the chemical binding state of the studied biocomposite. XRD, AFM, OP, TEM and SEM techniques revealed the changes in surface roughness, morphology, topography, and structure after protein immobilization on MCF support. The surface of biocomposite at micro and nano scale occurred to be less porous, rough, wavy, sharp, and hence more smooth, flat, homogenous and uniform. These methods also confirmed that the lysozyme molecules were located on the support surface and inside the pores. EDX and EDS qualitatively and quantitatively confirmed the homogeneous distribution of protein molecules on silica surface, and XPS revealed the specific interactions between the biomolecules and support. Such studies are substantial in view of applications of systems consisting of porous material and albumin to obtain model biological systems and new bio-functional medical composites characterized by high biocompatibility and chemical passivity in relation to biological organisms.

2. Experimental

2.1. Materials

Lysozyme from chicken egg white (LYS) in the form of lyophilized powder containing $\geq 90\%$ of protein (Sigma-Aldrich L6876) was used in this work without further purification. The protein solution (5 mg/ml) was prepared by dissolving an appropriate amount of the lysozyme powder in 0.1 M phosphate buffered saline solution (PBS) of pH = 7.4 (Bio Reagent, Sigma-Aldrich, P5368). The non-ionic triblock copolymer Pluronic PE9400 ($\text{EO}_{21}\text{PO}_{47}\text{EO}_{21}$, $M_{av} = 4600$) was purchased from BASF (Poland). Tetraethylorthosilicate (TEOS), of purity 98%, 1,3,5-trimethylbenzene (TMB), hydrochloric acid (37%) and other reagents of analytical grade were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. The Millipore Simplicity with UV device was used for water purification (resistivity of pure water at 25 °C was 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$).

The mesostructured cellular foam (MCF) was prepared by following a modified version of the method outlined in the literature, and using the Pluronic copolymer PE9400 as pore creating agent [50–52]. The porosity characteristics of the synthesized MCF-14.5 support were obtained on the basis of nitrogen adsorption/desorption isotherms: i.e., specific surface area 547 m^2/g , the average hydraulic pore diameter 14.5 nm and the total pore volume 1.98 cm^3/g .

2.2. Lysozyme adsorption

In adsorption experiment an amount of 200 mg of MCF-14.5 adsorbent (dried at 150 °C) was contacted with 50 ml of 5 mg/ml lysozyme solution (c_0) in 0.1 M phosphate buffered saline solutions (PBS) of pH = 7.4. The prepared suspension was placed in the incubator shaker (New Brunswick Scientific Innova 40R Model) and shaken at 25 °C with speed 110 rpm until equilibrium was reached (t_{ads} , time available for attaining adsorption equilibrium, was 24 h). The obtained biocomposite (LYS/MCF-14.5) was filtered, dried on air and used in further analysis. The adsorbed amount of LYS estimated from the adsorption experimental data was 0.55 g/g.

2.3. Analysis techniques

2.3.1. UV–Vis diffuse reflectance spectroscopy (UV–Vis DRS)

The physicochemical properties of pure MCF support (MCF-14.5) and covered by protein molecules were studied by using UV–Vis diffuse

reflectance spectroscopy (UV–Vis DRS). The reflectance UV–Vis spectra of the studied samples were registered on a Varian Carry 4000 spectrophotometer equipped with an integration sphere diffuse reflectance accessory. The studied MCF-14.5 material and the obtained protein/silica composite were placed in the powder cell and DR spectra were collected in the range $\lambda = 200\text{--}800$ nm with a scan rate of 300 nm/min.

2.3.2. Attenuated total reflection (ATR) with Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

The surface properties of MCF-14.5 support and LYS/MCF-14.5 composite were characterized by using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) with attenuated total reflectance (ATR) accessory. ATR-FT-IR spectra were collected over the $4000\text{--}400$ cm^{-1} spectral range with 64 scans per spectrum at a resolution of 4 cm^{-1} by means of IR spectrometer TENSOR 27 (Bruker, Germany) equipped with a diamond crystal.

2.3.3. Elemental analysis (CHN)

The chemical composition and concentration of elements such as carbon, hydrogen and nitrogen for MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 were estimated by using Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer System. The combustion process was carried out in a quartz tube in the presence of a catalyst at a temperature of 950 °C. Then, the nitrogen oxides formed in the combustion process were reduced in the reduction tube at 650 °C.

2.3.4. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

The elemental composition and chemical binding in the studied materials were investigated by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). In an XPS experiment, the sample was placed in a multi-chamber UHV (ultra-high vacuum) analytical system (Prevac, Poland) equipped with monochromatized AlK α radiation source of energy 1486.6 eV generated by Scienta MX 650 X-Ray Source Monochromator operating at 360 W and high-resolution electron energy hemispherical analyzer VG Scienta R4000 ($U = 12$ kV, $I_e = 300$ mA). The base pressure in the analytical UHV chamber during the measurements was maintained at 10^{-8} mbar. The survey scans were performed using a pass energy 200 eV and energy step size 0.5 eV in order to detect the elemental composition on the surface. The high resolution core level C 1 s, O 1 s, N 1 s and S 2p spectra were collected using a pass energy 50 eV and 0.1 eV step to determine the different structure configurations of each elements. The core level binding energies were calibrated for C 1 s line at 284.8 eV as the charge reference. The data processing analysis and curve-fitting (line shape: Gaussian-Lorentzian function combination) with a Shirley type background subtraction were performed by means of CasaXPS software (v 2.3.17).

2.3.5. Small angle X-ray diffraction (XRD)

Structures of the obtained MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 were analyzed by the small angle X-ray diffraction (XRD) technique. These experiments were performed using the Empyrean diffractometer (PANalytical) with monochromatic CuK α radiation source ($\lambda = 1.5418$ Å). The small angle X-ray diffraction patterns were scanned in an angular range 2θ from 0.13° to 5.00° with a step size of 0.01° .

2.3.6. Atomic force microscopy and optical profilometry (AFM and OP)

The surface morphology studies, texture properties and micro-nanostructure of the studied materials were monitored by an atomic force microscopy (AFM) and an optical profilometry (OP). The nanoscale roughness and nanostructure were determined by an AFM microscope (NanoScope V AFM Controller system, Bruker-Veeco, USA) operating in non-contact mode (tip radius < 8 nm, resonance frequency of 280 kHz) with a resolution of 256×256 pixels and scan area of $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$. The surface micro-roughness (also named surface

waviness, slope error or surface slope) was measured using an optical profilometer (Contour GT, Bruker-Veeco, USA). The objective lens magnification was set to $20\times$, which corresponds to $0.24 \mu\text{m}$ sampling (pixel) size and $156 \times 117 \mu\text{m}$ scanned area. The basic parameters characterizing the surface texture (S_a , S_q , S_{dq} , S_{sk} , S_{ku}) obtained from AFM and OP micrographs were estimated by means of the Scanning Probe Image Processor (SPIP, Image Metrology A/S, Denmark). The detailed description of the morphology parameters is in [Supplementary Material \[53\]](#).

2.3.7. Scanning electron microscopy with X-ray microanalysis (SEM/EDS)

The morphological properties, evaluation of external surface structure and chemical composition of the investigated materials were characterized using scanning electron microscope (SEM, FEI QuantaTM 3D FEG) equipped with energy dispersive X-ray spectrometer (EDS) operating at a voltage of 30 kV. The EDS microanalysis of native MCF-14.5 adsorbent and LYS/MCF-14.5 composite was carried out, and, ultimately, the chemical composition and elements concentrations (i.e., silicon, carbon, oxygen, nitrogen, and sulfur) in the materials were estimated.

2.3.8. Transmission electron microscopy and energy dispersive X-ray spectrometer (TEM/EDX)

A high resolution transmission electron microscopy S/TEM Titan3TM G2 60–300 (FEI Company) equipped with a field-emission electron gun (FEG) in high resolution bright-field imaging (HRTEM-BF) in TEM mode and high angle annular dark field detector (HAADF-STEM) in scanning mode, working with an accelerating voltage of 300 kV was used in analysis of surface topography and surface structure of the investigated samples. The energy dispersive X-ray spectrometer (EDX) was also employed to determine the chemical composition, estimate the local elements concentrations (Si, C, O, N, S) and visualize the quantitative elemental distribution of previously identified chemical elements over the scanned area of mesoporous silica surface before and after protein adsorption. The EDAX detector with energy resolution 134 eV in scanning HAADF-STEM mode was also used.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical properties and chemical composition of protein/silica composite

Physicochemical properties of LYS/MCF-14.5 composite were specified by UV–Vis diffuse reflectance spectroscopy. It is well known that the native lysozyme consists of 129 amino acids containing six tryptophan molecules (Trp), three tyrosine molecules (Tyr), eight cysteine molecules (Cys) that form four disulfide bonds and, hence, the absorption spectrum exhibits a characteristic strong absorption band at a wavelength ~ 220 nm and weak band at ~ 280 nm. The maximum of spectrum situated at about 280 nm corresponds to transitions in the aromatic amino acid residues: tryptophan, tyrosine and cysteine (i.e., disulphide bonds). Furthermore, the maximum of spectrum at approx. 220 nm is attributed to the carboxylic group in peptide bond [54].

The UV–Vis DRS spectra for the pure MCF and the biocomposite are compared in [Fig. 1S \(Supplementary Material\)](#). The differences for both studied samples are clearly visible. Generally, in the case of pure MCF-14.5 surface no intense bands in the UV–Vis DRS absorption spectrum is registered. Upon protein adsorption, the UV–Vis DRS spectrum reveals two absorbance bands: a medium-width band with a maximum absorption located at ~ 240 nm and a broad band with a maximum absorption at about ~ 282 nm. Comparing the absorption spectra for the native LYS and LYS/MCF-14.5 composite one can observe a shift of the first peak (~ 20 nm) which may be attributed to the change in secondary structure of albumin upon adsorption, whereas essentially no shift of the second peak is observed.

The ATR-FTIR spectra of native lysozyme, pure MCF-14.5 silica and

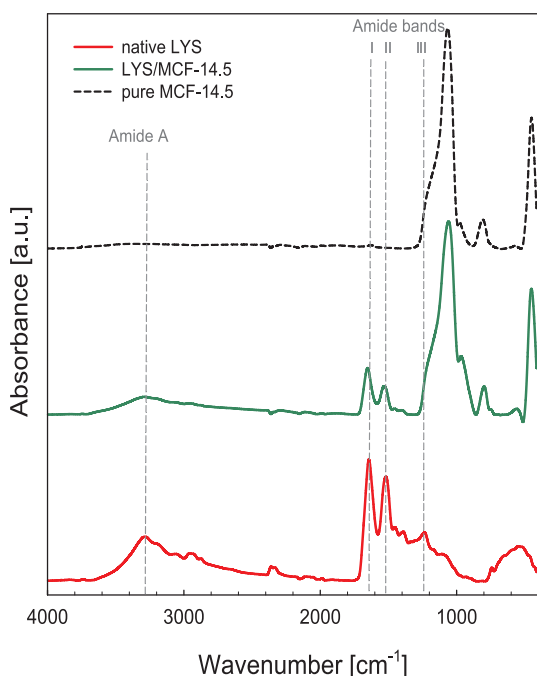


Fig. 1. ATR-FTIR spectra of the native lysozyme, MCF-14.5, and LYS/MCF-14.5.

LYS/MCF-14.5 composite were recorded and analysed in order to get some insight into the possible protein-support interactions (Fig. 1). Native LYS spectrum contains bands characteristic of proteins. A broad band with maximum at 3279 cm^{-1} , the so-called Amide A band, is due to hydrogen bonded NH group stretching vibration. On its red wing fairly weak bands with maxima at 3053 , 2955 , 2932 , and 2874 cm^{-1} correspond to the ArH (the first one of the above-mentioned) and aliphatic groups (the remaining three) stretching vibrations. In the middle range of the spectrum the Amide I and Amide II bands at 1643 and 1518 cm^{-1} , respectively, are observed. The first one is mostly due to C = O stretching vibrations, and the second – mostly the NH rocking. The range $1350\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ with maximum at 1232 cm^{-1} (see Fig. 1) is attributed to the so-called Amide III range. In fact various contributions from local modes to the observed normal modes are reported in the literature. Indeed, the contributions are strongly dependent on the molecular force field. Mixing of local modes is due to (i) closeness of the diagonal force constants and (ii) magnitude of the off-diagonal (coupling) force constants. To get better insight into that problem we carried out some initial calculations (DFT/B3LYP/6–311 + +G** level). At this point we merely mention that a few representative protein fragments containing hydrogen bonded moieties depicted in Fig. 2S (Supplementary Material) that are likely to exist in the bulk protein

were selected and contributions (the so-called PED coefficients [55]) were calculated. We will concentrate on the structure presented in Fig. 2Sa (Supplementary Material) since *trans* arrangement in the O = C–N–H peptide link is energetically favourable (by ca. 3.5 kcal mol^{-1}). The contribution of ca. 65% from the C = O stretching vibration was found in the case of the Amide I band. It was found to be only weakly coupled with neighbouring CN stretching (ca. 5%), and no contribution from NH rocking [56] was present. The Amide II band was found to be composed of NH rocking (ca. 50%) coupled to the neighbouring CN bond stretch (ca. 30%), just as reported elsewhere [56]. The major contributions to the Amide III band follow from the CN stretch (ca. 35%) coupled with equal amounts of NH rocking and C^(R)N stretch (ca. 10% each; C^(R) refers to the neighbouring methylene group carbon atom). The remaining contributions to the Amide III band follow from bending of aliphatic groups. Finally the band at the 1452 cm^{-1} is attributed to the symmetric bending of the methylene group and/or asymmetric bending of the methyl group (or both at the same time due to their frequent coupling).

The less favourable, but in our opinion also possible structure reported in Fig. 2Sb (Supplementary Material), has totally different force field. Although the Amide I band is dominated by C = O stretching (ca. 60%), it was found to be additionally coupled with CN stretching and NH rocking (similar contributions of 10–15%). The Amide II band was found to be composed of NH rocking (40–50%); this time it was coupled to C = O (20–30%) rather than CN stretching vibration. The latter one strongly contributed to the band at 1389 cm^{-1} (ca. 50%) observed in Fig. 1. Thus assuming that structures like those considered here are also present in the bulky protein it seems that the reported range of $1350\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ for the Amide III band needs to be extended to cover higher frequencies.

The pure MCF-14.5 spectrum (Fig. 1) shows the bands characteristic of the silica materials in the low-frequency range. The most intense band with maximum at 1065 cm^{-1} and a shoulder close to 1200 cm^{-1} is attributed to the (frequently delocalized) Si–O–Si asymmetric stretching vibrations. A low-intensity band at 976 cm^{-1} is attributed to the Si–O stretching in the SiOH fragments. Calculations show that this vibration is frequently coupled with the SiOH in-plane bending vibration. The bands at 808 and 450 cm^{-1} are due to the symmetric Si–O–Si stretching and in-plane bending vibrations, respectively. The former one is frequently coupled with the SiOH twisting.

Slight red shifts of the first three bands characteristic of the silica matrix, by 6, 10, and 10 cm^{-1} , respectively, are observed upon the protein adsorption. In addition, bands characteristic of peptide links are clearly visible, indicating the successful protein sorption. They are all blue shifted, up to 1653 (Amide I) and 1531 (Amide II), respectively. This clearly indicates weakening of hydrogen bonds which tend to elongate the involved bonds leading to the force constants decrease and, consequently, frequency decrease. This observation is fully consistent with the blue shift of the Amide A band (by 8 cm^{-1}).

To evaluate the elemental composition of pure MCF-14.5, the native

Table 1

XPS survey spectra results and the determined elemental compositions (as atomic% and mass% concentrations) for MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5.

Sample	Name	Peak position [eV]	Full width at half maximum (FWHM)	Atomic concentration [at.%]	Mass concentration [wt.%]	Ratio N:C at.%	wt.%
MCF-14.5	Si 2p	103.5	2.51	40.2 ± 0.1	54.3 ± 0.1	–	–
	O 1s	532.5	2.46	57.7 ± 0.2	44.4 ± 0.2		
	Si 2 s	154.0	3.11	–	–		
	O 2 s	26.0	3.3	–	–		
LYS/MCF-14.5	Si 2p	103.5	2.41	25.8 ± 0.1	40.0 ± 0.1	0.24	0.29
	O 1s	532.5	2.42	41.8 ± 0.2	36.9 ± 0.2		
	N 1 s	399.5	2.26	6.00 ± 0.2	4.70 ± 0.2		
	C 1 s	285.0	4.00	24.5 ± 0.2	16.3 ± 0.2		
	S 2p	164.0	0.97	0.30 ± 0.2	0.50 ± 0.2		
	Si 2 s	154.5	2.86	–	–		
	O 2 s	26.1	3.1	–	–		

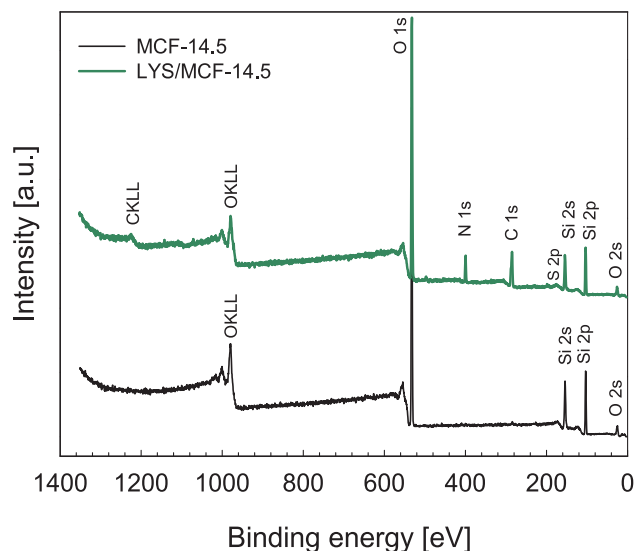


Fig. 2. XPS survey spectra of pure MCF-14.5 support and after LYS adsorption.

LYS and LYS/MCF-14.5 composite the elemental analysis (CHN) was conducted, and the obtained results summarized in Table 1S (Supplementary Material). The changes in chemical composition of LYS/MCF-14.5 composite compared to pure MCF-14.5 silica are as follows: the content of C and H upon LYS adsorption increased by 17.67% and 2.57%, respectively. Appearance of nitrogen in the biocomposite (6.38%) is strictly connected with protein adsorption in internal space of silica support. The N:C (0.36%) ratio is typically used as a detection marker for albumin confirming presence of the adsorbed protein molecules.

For a complete characterization of the elemental composition of the silica and biocomposite surfaces and chemical binding between the protein molecules and the silica surface, XPS analysis was carried out. In order to determine the uptake of protein on MCF-14.5 support, the survey and O 1 s, N 1 s, C 1 s and S 2p high resolution spectra were examined.

Fig. 2 presents typical survey scan XPS spectra for the pure MCF-14.5, and LYS/MCF-14.5 composite. The XPS survey scan analysis of the studied samples is presented in Table 1. As expected, in the XPS survey spectrum recorded before protein adsorption, only major photoelectron peaks of O 1 s at 532.5 eV, Si 2p at 103.5 eV and directly linked O 2 s (154 eV) and Si 2 s (26 eV) signals were detected. After lysozyme adsorption, XPS survey spectra show additional O 1 s, N 1 s, C 1 s and S 2p signals at binding energies 532.5, 399.5, 285 and 164.0 eV, respectively, which are characteristic of proteins. It was recognized that the presence of well defined N 1 s photoelectron peak at 399.5 eV derived from the amino acids of the protein can be interpreted as an indirect measure (detection marker) of the protein content in a studied material [57]. The determined mass concentrations of the studied elements are as follows: 41.8 at.% (36.9 wt%) of oxygen, 6 at.% (4.7 wt%) of nitrogen, 24.5 at.% (16.3 wt%) of carbon and small amount 0.3 at.% (0.5 wt%) of sulfur (see Table 1). Moreover, the N:C (0.24 at.%, 0.29 wt %) ratio for biocomposite confirms the presence of the immobilized protein molecules on the silica substrate (aliphatic carbon and nitrogen of the amino acid groups of lysozyme containing tyrosine residues are exposed on the MCF-14.5 surface).

The deconvolution of the high resolution core-level O 1 s, N 1 s, C 1 s and S 2p spectral data for LYS/MCF-14.5 composite are illustrated in Fig. 3. As can be seen in Fig. 3A the core-level spectrum of O 1 s consists of two distinct peaks at 530.9 eV (O 1 s A) and 532.6 eV (O 1 s B), which correspond to peptidic oxygen of protein (O–C = O, O = C–N and C–OH structural motifs) [58]. It was also found that the deconvolution of N 1 s core level XPS spectra reveals two components (N 1 s A

and N 1 s B) at binding energies 400 eV and 401.8 eV, respectively (Fig. 3B). These energies correspond to nitrogen in C–NH₂ (amine) and –C(=O)–NH– (amide) groups present in protein molecules. Moreover, the binding energy of the N 1 s photoelectron peak found at ~ 401 eV is typical for N in organic matrix (associated to N–H/C–N bonds) [59], indicating that the protein was successfully immobilized on the silica surface. Additionally, presence of the protein on the silica surface was confirmed by deconvolution of the C 1 s spectra (Fig. 3C). The C 1 s photoelectron peak was decomposed based on binding energies of characteristic bonds of carbon atoms with carbon/hydrogen/oxygen in the protein. The peak well fitted to three components at 284.8 eV (C 1 s A), 286.1 eV (C 1 s B) and 288.2 eV (C 1 s C) which is connected with the presence of C–C/C–H bonds, C–O bonds and C = O bonds, respectively [60]. Lebugle et al. [61] and Deligianni et al. [62] found that in the case of BSA protein the binding energy of the C1s photoelectron peak at 285.0 eV is assigned to aliphatic carbon atoms of the amino acid pending groups; the peak at 286.5 eV – to NH–CHR–CO carbon atoms of the albumin backbone; the peak at 288.2 eV – to CO–NH–peptidic carbon atoms.

The high resolution S 2p spectrum for LYS/MCF-14.5 shows a spin-orbit doublet that follows from S 2p_{3/2} and S 2p_{1/2} split levels at binding energies 164.8 eV and 163.6 eV (Fig. 3D). The binding energies of the components of this doublet are typical of unbound thiol species and disulfide bonds [63,64]. In the case of lysozyme the range of these binding energies can be assigned to S-containing amino acids, i.e. cysteine residues.

The results obtained from the XPS data are consistent with UV-Vis DRS, ATR-FTIR and CNH analysis.

3.2. Structural and morphological characterization of protein/silica composite surface

Complex characterization of pore structure, particle morphology, surface topography and micro- nanostructure of the mesoporous materials with immobilized protein demands a combination of various analytical methods. Hence, several experimental techniques such as XRD, AFM, OP, HRTEM/EDX and SEM/EDS were employed.

To determine structure of the studied samples and verify whether the biomolecules are mainly adsorbed on external surface of a particle or located inside the mesoporous structure, the small-angle X-ray diffraction (XRD) technique was used. The intensity variations of XRD curves for the pure MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 materials are presented in Fig. 4(A,B). It is clear that native MCF-14.5 exhibits three Bragg's reflection peaks registered in the range of small diffraction angles 2θ: one well-resolved reflex with strong intensity at 2θ value of ca. 0.52° and two broad reflexes with decreasing intensities at 2θ = 0.93° and 1.36°. This means that mesoporous material is characterized by a regular ordered 3D pore structure of uniform large spherical pore cells linked by narrow interconnectiveness, usually described as ink-bottle pore type [33]. The total integrated areas (A_{peak}) and the interplanar spacing (d) reflecting pore size for silica support before and after LYS adsorption, are summarized in Fig. 4B inset. It is interesting to note that after lysozyme adsorption intensities of these diffraction reflexes are clearly diminished. LYS adsorption leads to decrease of a reflex with the highest intensity (first XRD peak at 2θ = 0.53°) by about 33%, while in the case of reflex with low intensity (second XRD peak centered at 2θ = 0.98°) – by 76% compared to the pure MCF-14.5 silica support. Moreover, these diffraction reflexes after protein adsorption are moved towards higher 2θ values, confirming that pore size after LYS adsorption diminishes (interplanar spacing (d) estimated for LYS/MCF-14.5 is lower in comparison to the values calculated for the pure MCF-14.5, Fig. 4B inset). It is worth noting that the last diffraction reflex at 2θ value of ca. 1.36° disappeared after protein adsorption. Likewise, the total integrated area A_{peak} for MCF-14.5 material modified by LYS was lower than A_{peak} for MCF-14.5 support without protein. The obtained results can't be interpreted as a loss of

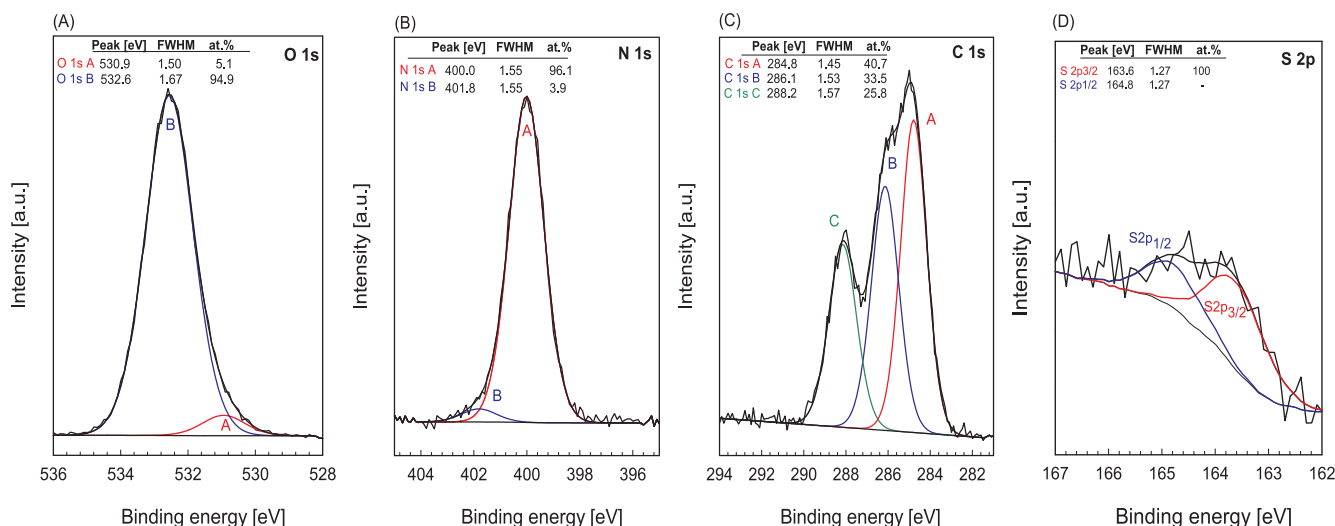


Fig. 3. Deconvoluted (A) O 1 s, (B) N 1 s, (C) C 1 s, (D) S 2p high resolution core-level XPS spectra of LYS/MCF-14.5 composite.

structural order of mesoporous MCF-14.5 after lysozyme adsorption. Larger differences between electron density of the porous silica walls and the open pores in comparison to lower differences between the porous silica walls and the lysozyme molecules is responsible for the observed reduction in the intensity. Generally, XRD data indicate that the surface of MCF support is covered by LYS, and, more importantly, LYS molecules are tight-packed inside the mesopores of silica [65,66].

The AFM technique was used to evaluate the nanoscale surface morphology (roughness, waviness, skewness, flatness), and visualize nanotexture of the protein layer on silica surface. Two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) projection of the AFM micrographs of $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ region for the MCF-14.5 silica before and after lysozyme adsorption are shown in Figs. 5 and 6, respectively. Table 2 lists the surface texture parameters at the nanometre scale for MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 obtained from $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ AFM micrographs. The quantitative analysis of surface topography clearly shows the textural changes in the morphology and surface nano-roughness of MCF-14.5 surface after lysozyme adsorption. The 3D AFM observation (Fig. 6) of

MCF-14.5 without protein layers shows some greater valleys and hills (peaks) over surface. Unlike for the protein/silica composite the surface morphology and texture become completely different. Almost all peaks disappear, but those that remain on the surface have a reduced diameter and height. In addition, the surface of protein/MCF composite is characterized by greater uniformity of grain distributions over surface in comparison to the pure silica surface. As shown in Table 2, upon the LYS adsorption the texture parameters such as surface roughness (S_q) and waviness (surface slope, S_{dq}) were diminished by ca. 74% and 67%, respectively, compared to the surface of initial MCF-14.5 substrate. This implies that MCF-14.5 surface after protein adsorption is less rough, wavy, and hence more smooth and flat than the native MCF-14.5 support surface. Fig. 7 represents a detailed comparison of the nano-roughness surface profiles of the MCF-14.5 support without/with lysozyme layer (obtained along the white line marked on the $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ AFM micrographs in Fig. 5). By comparing the oscillation of amplitude and frequency (texture spacing) of the surface profile at the nanometre level for the studied samples (Fig. 7) one can find

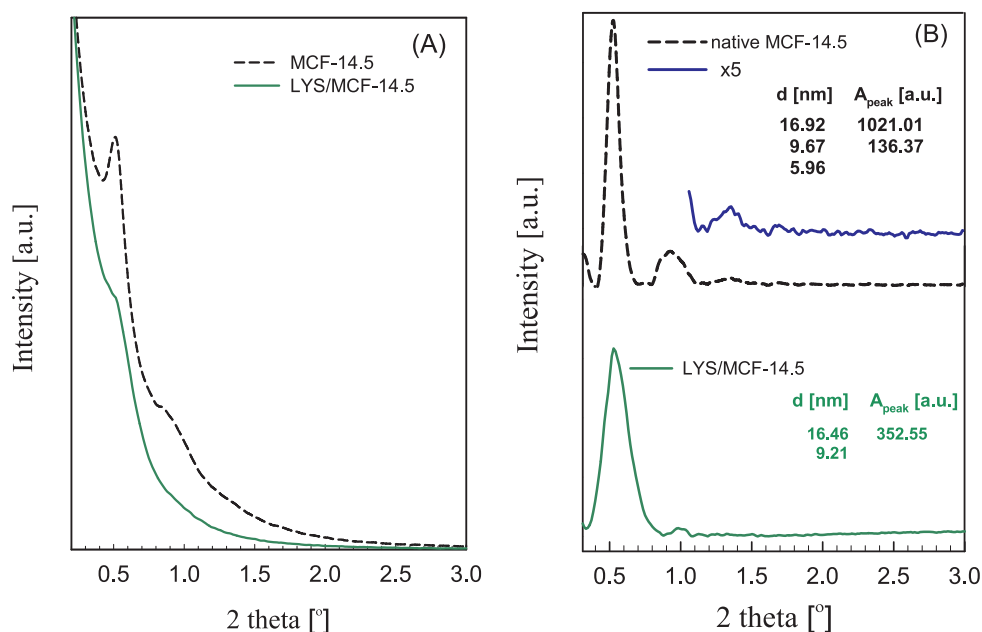


Fig. 4. (A) Small angle X-ray diffraction patterns for native MCF-14.5 material and LYS/MCF-14.5 composite; (B) the patterns of studied samples with the background subtracted.

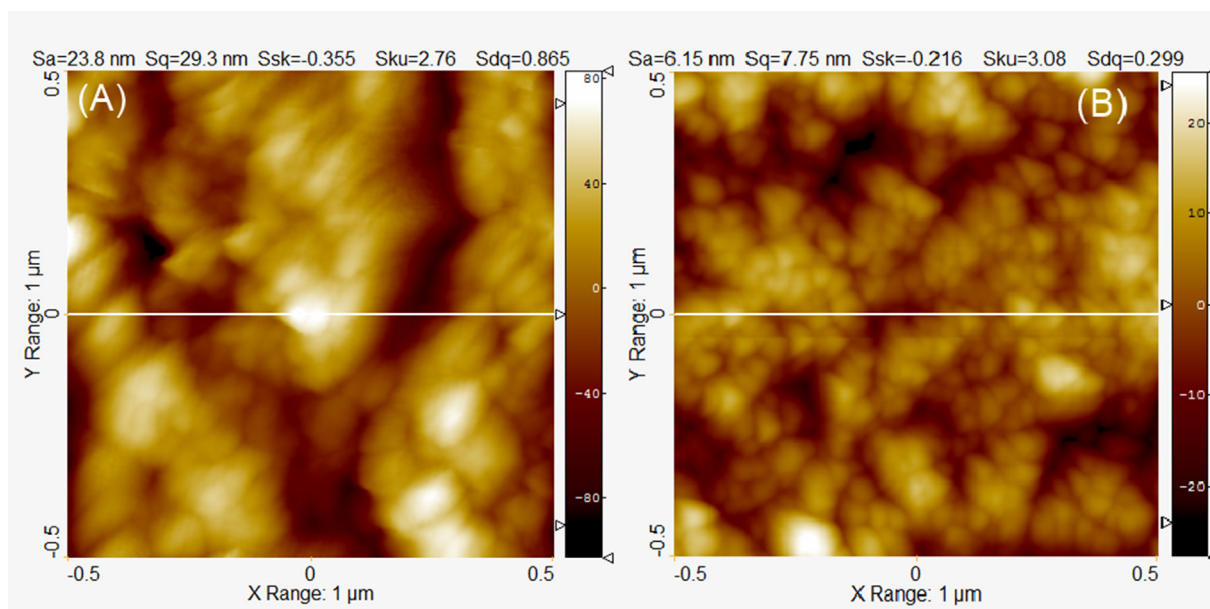


Fig. 5. 2D AFM micrographs (scan size: 1 μm \times 1 μm) for the native MCF-14.5 support (A) and LYS/MCF-14.5 composite (B). Adsorption conditions: $c_0 = 5$ mg/ml, $t_{\text{ads}} = 24$ h; $T = 25^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7.4$.

differentiations in (i) the amplitude of deviations of surface roughness for LYS/MCF-14.5 composite which is about tenfold lower than for MCF-14.5 (maximum amplitude of protrusions from a zero base line for the surface of pure MCF-14.5 support varies in the ranges from -60 nm to $+70$ nm ($\Delta h = 130$ nm); in the case of biocomposite it is in the range -7 nm to $+7$ nm ($\Delta h = 14$ nm), (ii) the surface profile along the section line which, for LYS/MCF-14.5, is characterized by regular course in contrast to the surface profile for pure MCF material, (iii) the frequency distribution of silica surface, which after LYS adsorption, is significantly higher (finer spacing) in comparison to silica substrate. Histogram of height distribution functions of surface roughness before and after lysozyme adsorption (Fig. 8) confirms that silica surface becomes more uniform (narrower height of S_q distribution) after LYS adsorption. In addition, for MCF-14.5 surface covered by the LYS layers the void volumes calculated from the histogram decreased from $6.46 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ to $2.20 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ (i.e., by 66%). It is thus evident that LYS molecules are situated inside the mesopore channels of silica support. Moreover, they are also homogeneously distributed on the surface grains. Special attention was paid to the values of parameters describing the nature of inequality of the surface, i.e., skewness (S_{sk}) and kurtosis (S_{ku}) coefficients. The silica surface with immobilized protein is characterized by relatively smaller asymmetry and more isotropic surface ($S_{sk} < 0$; $S_{ku} \approx 3$; surface follows symmetrical Gaussian height

Table 2

Nanoscale surface texture parameters for MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 derived from AFM analysis.

Sample	^a S_a [nm]	^b S_q [nm]	^c S_{dq} [rad]	^d S_{sk}	^e S_{ku}
MCF-14.5	23.8	29.3	0.87	-0.36	2.76
LYS/MCF-14.5	6.15	7.75	0.29	-0.22	3.08

^a S_a - roughness average; ^b S_q - surface roughness (root mean square, rms); ^c S_{dq} - surface waviness (surface slope); ^d S_{sk} - surface skewness; ^e S_{ku} - surface kurtosis.

distribution function compared with the silica substrate). More importantly, the negative value of S_{sk} (this effect is diminished after protein adsorption) confirms that the surface of the studied materials is composed of mainly valleys rather than the vertices (peaks). The presented AFM results clearly confirm that adsorption of protein molecules on mesoporous silica surface leads to relevant change of physical surface properties at nanometer scale, including morphology, topography, texture and nanostructure.

The optical profilometry (OP) was used in order to obtain supplementary information about surface morphology and surface roughness at micrometer level. The 2D and 3D overviews of surface texture of MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 registered by an optical profilometer are

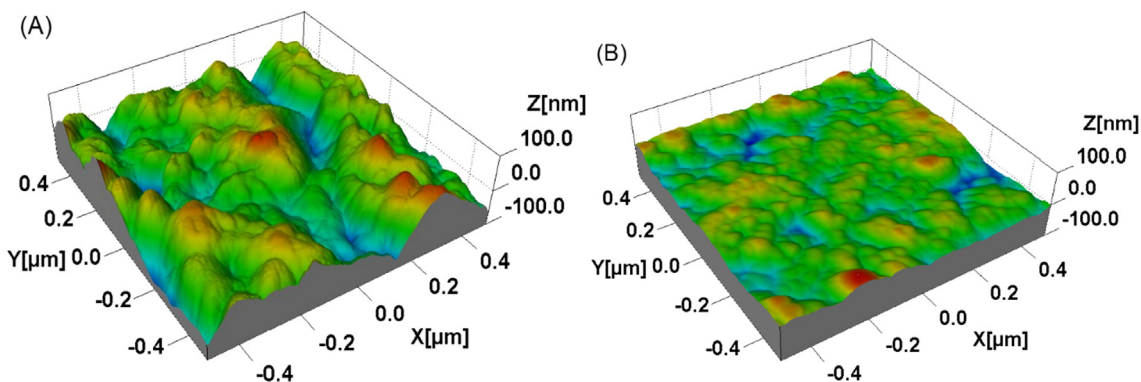


Fig. 6. Visualization of 3D AFM topographic images of the analyzed surfaces: MCF-14.5 (A) and LYS/MCF-14.5 (B). Adsorption conditions: $c_0 = 5$ mg/ml; $t_{\text{ads}} = 24$ h; $T = 25^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7.4$.

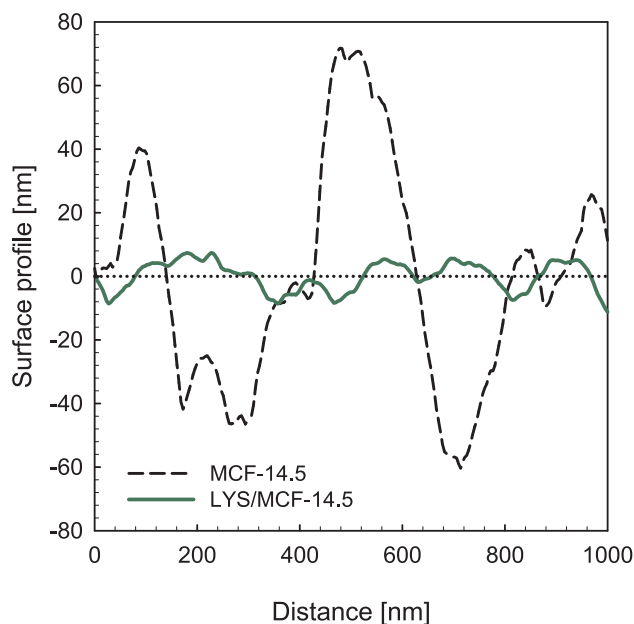


Fig. 7. A comparison of the surface roughness profiles of the MCF-14.5 support and LYS/MCF-14.5 composite (corresponding to the white-lines marked on the AFM micrographs in Fig. 5) ranging from 0 to 1000 nm.

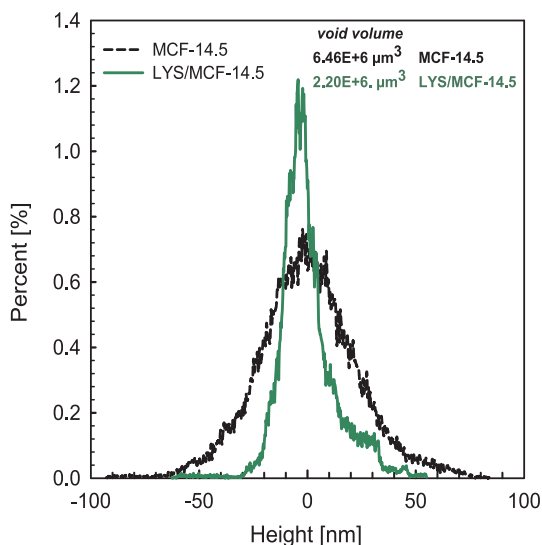


Fig. 8. The histogram of height distribution of surface roughness obtained from 1000 nm × 1000 nm scan areas for MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5.

depicted in Figs. 9 and 10. The surface microroughness parameters describing the surface morphology of the investigated materials are given in Table 3. The microscale metrological studies of MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 confirmed again that the values of microroughness parameters (S_a , S_q , S_{dq}) obtained from OP 20 × 40 μm scan areas were reduced by protein adsorption. For the biocomposite (Table 3) the surface roughness and surface slope were diminished by ca. 73% and 75%. It is clearly visible (Figs. 9, 10) that the surface covered by LYS is less rough (porous) and bumpy, as well as more smooth and flat in comparison to the surface without protein. By comparing (Fig. 11) the height of the surface microroughness profile (S_q) for MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 measured along a single white-line marked on the OP micrographs (Fig. 9A',B'), the brightening effect is found after lysozyme adsorption. As observed in Fig. 11, the vertical amplitude deviations for the surface roughness profile at microscale level for LYS/MCF-14.5 are greatly diminished in contrast to the pure support. For the reference

MCF-14.5 support maximum amplitudes of the protrusions with different frequencies and different shapes vary from $-17 \mu\text{m}$ to $+11 \mu\text{m}$ ($\Delta h = 28 \mu\text{m}$). The protein immobilization results in attenuation of the amplitude of the deviations and frequency of protrusion domains which varies from $-2 \mu\text{m}$ to $2 \mu\text{m}$ ($\Delta h = 4 \mu\text{m}$), and it maintains almost at the same level (the smoothing capabilities are reached). Fig. 12 shows the surface height distribution functions for MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 obtained from 20 μm × 40 μm scan areas. The histogram of distribution function of surface microroughness for MCF-14.5 silica becomes narrow and uniform after adsorption of lysozyme. It is related to the homogeneous distribution of the protein molecules on the silica surface. Apart from that, the statistical analysis of surface roughness height distribution functions (at microscale level) also confirms that the molecules of lysozyme do occupy pores of mesoporous silica adsorbent because the void volume computed from histogram dropped by ~65% due to adsorption of lysozyme molecules. According to the values of surface skewness ($S_{sk} < 0$) and kurtosis ($S_{ku} > 3$), it turned out that the surface covered by LYS molecules is fairly symmetric and isotropic (surface represents leptokurtic height distribution with relatively high peak and longer or fatter tail than a normal distribution; the distribution "tail" extends towards negative values than the tail on the positive side) in comparison with the surface of pure silica substrate. As a matter of fact, the negative values of S_{sk} indicate that number of valleys (pores) dominate over the vertices (peaks) on the surface of porous silica; this effect is smaller after protein adsorption. Finally it can be concluded that the adsorbed lysozyme results in significant changes of surface morphology and microstructure of the native MCF material. It emerged that silica surface covered by protein molecules is more smooth, flat and homogenous, and, thereby less rough, porous, wavy and sharp due to the lysozyme molecules located on silica surface and inside the pores. These results are in fairly good agreement with those obtained from AFM analysis.

For the detailed characterization of the topography, microstructure and chemical composition of the studied samples HRTEM/EDX (Figs. 13, 14 and Supplementary Material Fig. 3S), and SEM/EDS (Fig. 15, Table 4) techniques were applied. HRTEM-BF (bright field), HAADF-S/TEM (high angle annular dark field) and SEM micrographs of pure MCF-14.5 and protein/silica composite are shown in Figs. 13(A), 14(A,A') and 15(A,B). TEM results (Fig. 13A) reveal that pure MCF-14.5 silica in 3D structure consists of the ordered mesoporous channels with uniform spherical cells interconnected by narrow windows, which is the characteristic structural feature of the MCF material. The presented results are in good accordance with those obtained from the N_2 adsorption/desorption [50] and XRD analyses. Likewise, HRTEM-BF bright-field (Fig. 14A) and HAADF-S/TEM in the dark-field mode micrographs (Fig. 14A') for LYS/MCF-14.5 composite visibly confirm structure and presence of protein molecules immobilized on the composite surface (visible as spiral forms).

The SEM micrographs (Fig. 15A,B) allow to compare the surface morphology of the native MCF-14.5 support and LYS/MCF-14.5. One can see that the composite surface is markedly smoother and more uniform compared to pure MCF-14.5 one. It is worth noting that protein adsorption causes also a modification in grain surface morphology. In the case of protein/silica composite SEM micrographs (Fig. 15B) show more homogeneous surface consisting of small smooth grains. This high homogeneity is partly a result of small sizes of lysozyme molecules which are closely packed on the surface and in the pores of the material.

The energy dispersive X-ray (EDX) analysis was applied to obtain the qualitative and quantitative data concerning the local elemental composition and determination of the concentration of elements present on the pure MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 surfaces. Moreover, TEM/EDX and SEM/EDS techniques allow precise identification of biomolecules on MCF-14.5 support. Fig. 13C,D and Fig. 14C-G illustrate two-dimensional elemental distribution maps and relative proportions (intensities) of pre-defined elements like silicon, oxygen, carbon, nitrogen and sulfur (Si, O, C, N, S) over the investigated area (orange-

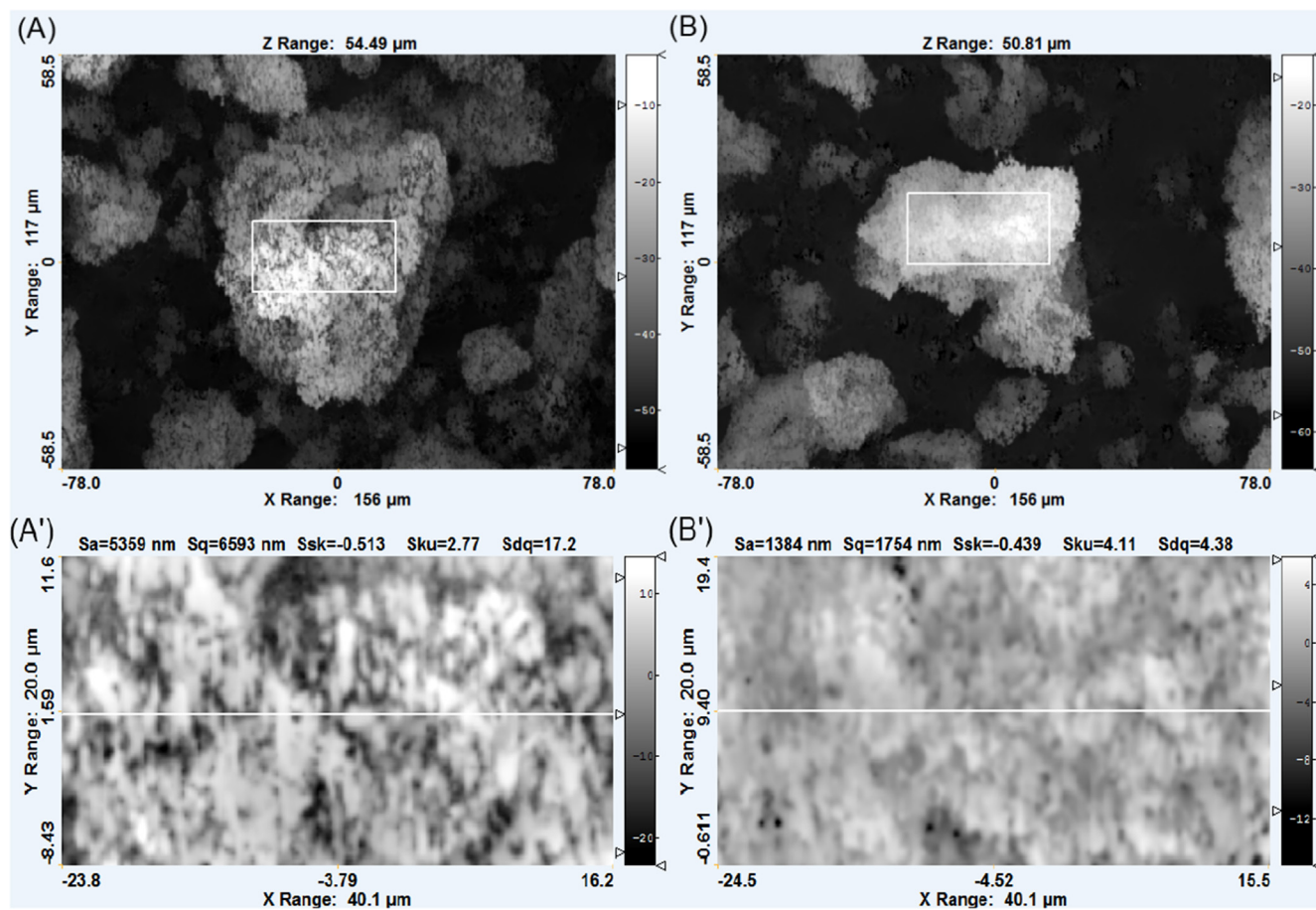


Fig. 9. 2D OP projection of surface texture and microstructure of the scanned surface of size $117 \mu\text{m} \times 156 \mu\text{m}$ for MCF-14.5 (A) and LYS/MCF-14.5 (B). The selected area (marked by the white-rectangle in A, B micrographs) of size $20 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ is representative for the surface topography of pure MCF-14.5 material (A') and LYS/MCF-14.5 composite (B'). Adsorption conditions: $c_0 = 5 \text{ mg/ml}$; $t_{\text{ads}} = 24 \text{ h}$; $T = 25^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7.4$.

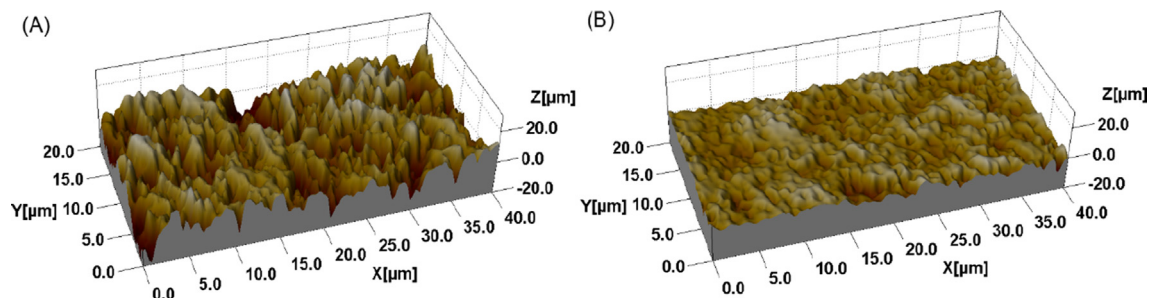


Fig. 10. 3D OP surface topographic images ($20 \times 40 \mu\text{m}$) of native MCF-14.5 support (A) and LYS/MCF-14.5 composite (B). Adsorption conditions: $c_0 = 5 \text{ mg/ml}$; $t_{\text{ads}} = 24 \text{ h}$; $T = 25^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7.4$.

Table 3

Microroughness parameters of MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 composite determined from OP measurements using VSI mode.

Sample	^a S_a [μm]	^b S_q [μm]	^c S_{dq} [rad]	^d S_{sk}	^e S_{ku}
MCF-14.5	5.36	6.59	17.2	-0.51	2.77
LYS/MCF-14.5	1.38	1.75	4.38	-0.44	4.11

^a S_a - roughness average; ^b S_q - surface roughness (root mean square, rms); ^c S_{dq} - surface waviness (surface slope); ^d S_{sk} - surface skewness; ^e S_{ku} - surface kurtosis.

square marked in Figs. 13B and 14B) of the silica support and composite. Based on the EDX mappings, it is clearly visible that C, O, N, and S are nearly homogeneously distributed on the protein/silica composite

surface.

The chemical characterization and element contents (wt.%, at.%) for MCF-14.5 material before and after protein adsorption from TEM/EDX and SEM/EDS analysis are summarized in Fig. 3SA,B inset (Supplementary Material) and Table 4. The EDX spectrum in Fig. 3SA (Supplementary Material) indicates the presence of two elements: silicon (intense peak at 1.74 keV) and oxygen (large peak at 0.52 keV) in the structure of native MCF-14.5 silica. After lysozyme adsorption the EDX spectrum (Fig. 3SB, Supplementary Material) shows the presence of two strong peaks at 1.74 keV, 0.52 keV associated with Si and O, respectively. Additionally, peaks corresponding to carbon (at 0.26 keV), nitrogen (at 0.37 keV) and sulfur atoms (at 2.31 keV) are observed. TEM/EDX analysis unambiguously indicates changes in chemical composition and local element concentrations (see Fig. 3SA,B inset,

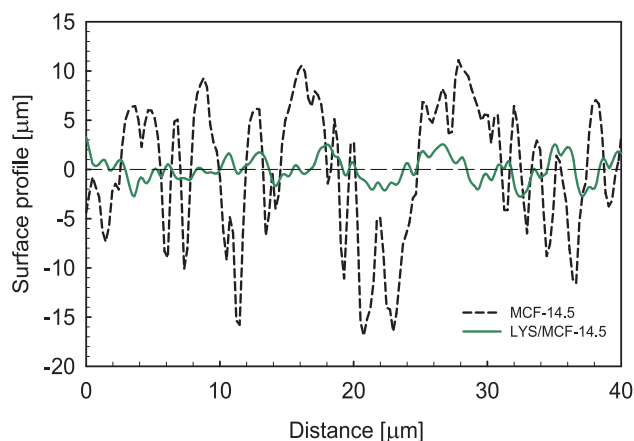


Fig. 11. A comparison of the surface roughness profiles (taken along the marked white-line on the OP micrographs in Fig. 9) of the MCF-14.5 material before and after protein adsorption (ranges from 0 to 40 μm).

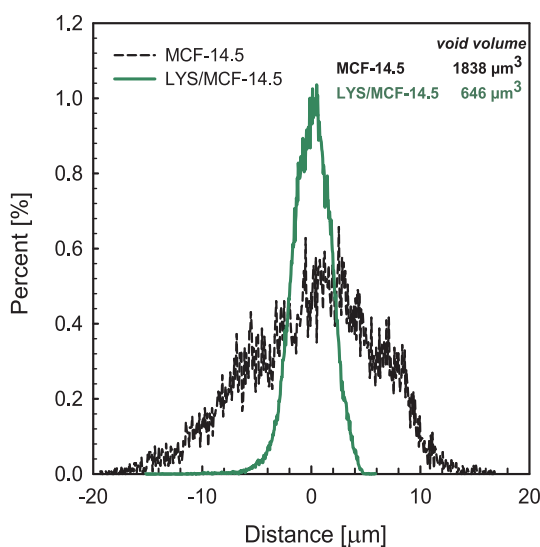


Fig. 12. The height histogram of surface roughness obtained from the scanned area of size of 20 $\mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ of initial MCF-14.5 sample and LYS/MCF-14.5 composite.

Supplementary Material) of MCF-14.5 material after protein adsorption. As expected, the content of Si (28.52 at.%) in biomaterial LYS/MCF-14.5 is lower about 1.9 at.% in comparison with reference silica material (30.42 at.%). More pronounced difference between composition of biocomposite and the reference is observed with regard to the content of O, C, N, and S. The values found are: 44.65 at.%, 24.56 at.%, 5.44 at.% and 0.3 at.%, respectively. Furthermore, for biocomposite the atomic and mass N:C ratios (so-called detection marker for albumin) are: 0.22 at.% and 0.26 wt%. These results are also confirmed by SEM/EDS analysis as presented in Table 4. According to the reported results, the native MCF support consists mostly of Si (29.82 at.%) and O (49.35 at.%), while N and C are not detected. After protein adsorption, SEM/EDS elemental analysis of biocomposite surface reveals not only the presence of Si and O, but also C, N, and S. The chemical composition and contents of the studied elements on biocomposite surface are as follows: 37.11 at.% of O, 25.09 at.% of C, 6.08 at.% of N and ~ 0.28 at.% of S. Similarly, the N:C ratio (0.24 at.% and 0.33 wt%) also confirms the presence of the adsorbed protein molecules in the considered biocomposite.

Main conclusion which can be drawn from TEM/SEM/EDX results is that the adsorbed layer of the LYS molecules on porous surface of silica material leads to the changes of surface topography, chemical

composition and local element concentration.

4. Conclusions

The paper presents a complete physicochemical, structural, morphological, and compositional analysis of mesoporous MCF silica support with immobilized lysozyme by using various techniques, i.e., UV-Vis DRS, ATR-FTIR, CHN elemental analysis, XPS, XRD, AFM, OP, HRTEM/EDX, and SEM/EDS. The used porous MCF-14.5 support is characterized by well-developed porous structure: specific surface area – 547 m^2/g , the average hydraulic pore diameter – 14.5 nm, and the total pore volume – 1.98 cm^3/g . In the case of the obtained biocomposite LYS/MCF-14.5 the protein adsorbed amount was estimated to be equal to 0.55 g/g.

The experimental results obtained for the prepared lysozyme/silica composite can be summarized as follows:

- (i) UV-Vis DRS spectrum has two absorbance maxima: at ~ 282 nm corresponding to transition within the aromatic amino acid residues: tryptophan, tyrosine and cysteine, and at ~ 240 nm attributed to the carboxylic group in peptide bond. In comparison to a native lysozyme the first band is essentially not shifted, while the second one is red shifted by which may be connected with the change in secondary structure of albumin upon adsorption;
- (ii) upon protein adsorption, ATR-FTIR analysis reveals somewhat different chemical structure of the adsorbed protein which follows from blue shifts of amide A, amide I and amide II bands as a consequence of weakening of hydrogen bonds in the secondary protein structure;
- (iii) analysis of chemical composition (C, H, and N) by the elemental analysis for the MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5 materials reveals that after protein adsorption the mass percentage of elements is increased by 17.67% for C, 2.57% for H, and 6.38% for N. The N:C ratio (a detection marker for albumin) equal to 0.36% confirms protein presence in the studied biocomposite;
- (iv) interactions of MCF-14.5 with LYS molecules are clearly pointed out by N 1 s, C 1 s, O 1 s and S 2p XPS photoelectron signals specific for protein. Deconvoluted high resolution core-level spectra of N 1 s (at $\sim 400, 402$ eV) correspond to nitrogen in C-NH₂ (amine) and -C(=O)-NH₂ (amide) groups in protein molecules. The core-level spectra of O 1 s (at $\sim 531, 533$ eV) correspond to peptidic oxygen of protein and C-OH components. The high-resolution C 1 s spectra (at $\sim 285\text{--}288$ eV) are connected with the C-C or C-H bonds, NH-CHR-CO carbon of the protein backbone and -C(O)-NH₂ peptide carbon atoms. The high resolution S 2p spectra (doublet at $\sim 165, 164$ eV) are typical for unbound thiol species and disulfide bonds;
- (v) small-angle XRD data reveal that after protein adsorption two diffraction reflexes characteristic of the pure support diminish and the third one disappears. Moreover, they are moved towards higher 2θ values, confirming diminishing of pore size after LYS adsorption. XRD data indicate that the surface of MCF support is covered by LYS (the reduced intensity of Bragg's reflections), and, more importantly, LYS molecules are tight-packed inside the mesopores of silica (the total integrated areas (A_{peak}) and the interplanar spacing (d) reduce upon LYS adsorption);
- (vi) AFM and OP methods demonstrate that the surface morphology and the surface roughness at a nano-micrometer level for the support with immobilized protein is less rough, porous, wavy, sharp, and, hence more smooth, homogenous and uniform due to the lysozyme molecules adsorbed on the silica surface. In addition, they are located inside the pores;
- (vii) TEM/EDX and SEM/EDS analysis visibly confirm that LYS adsorption on silica surface leads to more pronounced changes of surface topography, nanostructure and local concentration of such elements as O, C, N, S;

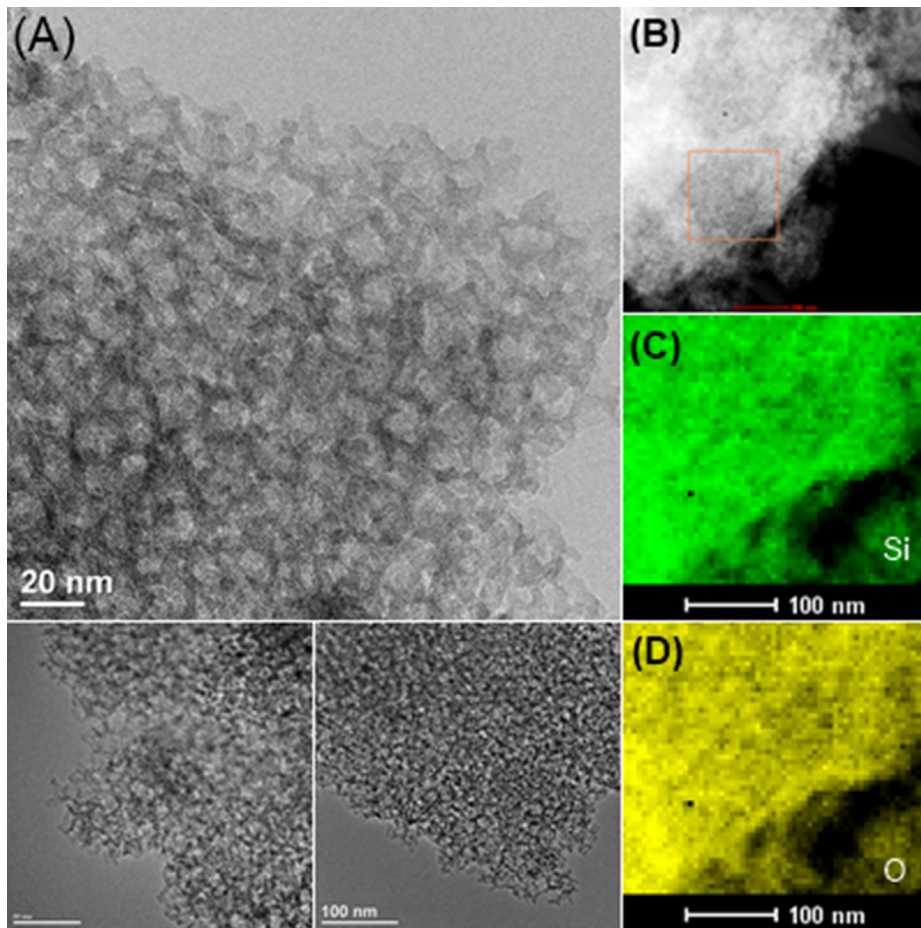


Fig. 13. (A) HRTEM-BF micrographs presenting the surface structure of the pure MCF-14.5 support, (B) HAADF-S/TEM image of the selected area from which the X-ray microanalysis (EDX) was carried out, (C, D) EDX elemental mapping images of silicon (C) and oxygen (D) taken from to the orange square marked area in (B).

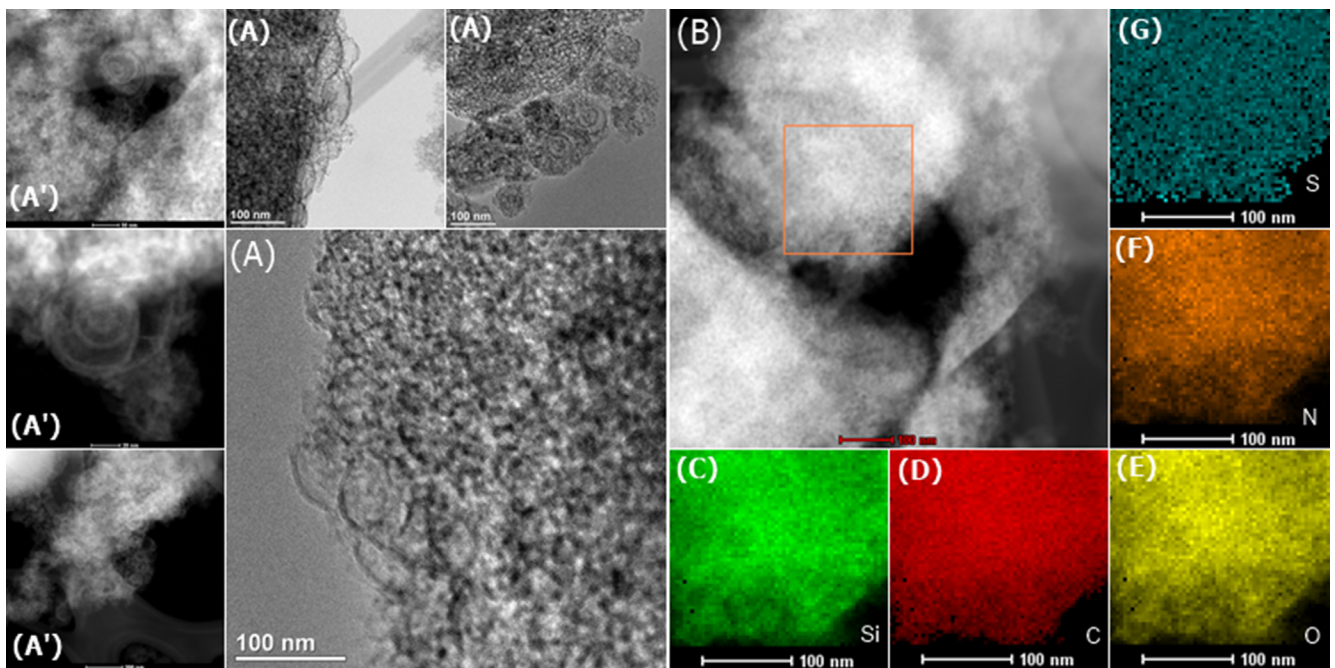


Fig. 14. (A) HRTEM-BF and (A') HAADF-S/TEM micrographs showing the surface structure of the MCF-14.5 material covered by the LYS molecules, (B) HAADF-S/TEM image of the selected area from which the X-ray microanalysis (EDX) was performed, (C-G) EDX elemental mapping images of silicon (C), carbon (D), oxygen (E), nitrogen (F) and sulfur (G) corresponding to the orange square marked area in (B). Protein adsorption conditions: $c_0 = 5$ mg/ml; $t_{\text{ads}} = 24$ h; $T = 25$ °C; pH = 7.4.

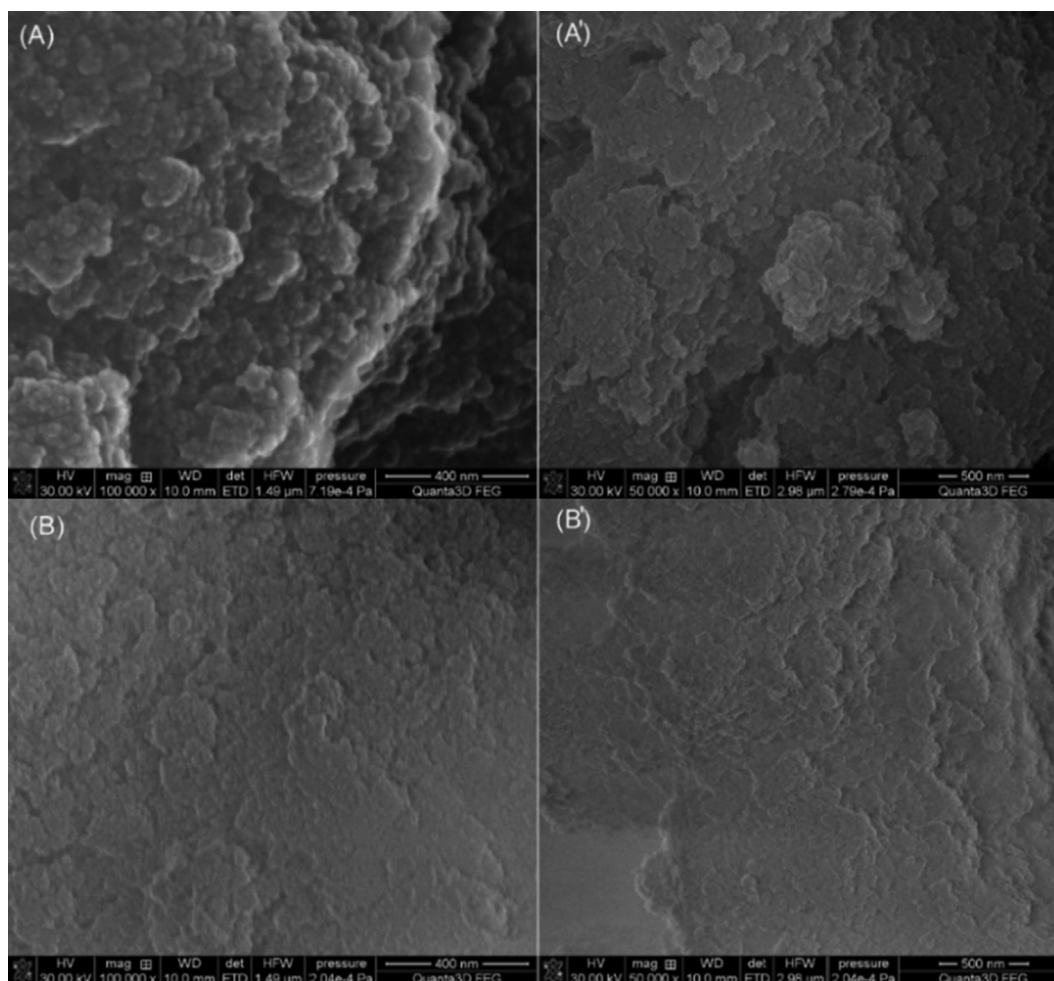


Fig. 15. Scanning electron microscopy micrographs of the pure MCF-14.5 material (A, magnification 100 000), (A', magnification 50 000) and LYS/MCF-14.5 (B, magnification 100 000), (B', magnification 50 000). Protein adsorption conditions: $c_0 = 5$ mg/ml; $t_{\text{ads}} = 24$ h; $T = 25^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7.4$.

Table 4

Contents of elements for MCF-14.5 material before and after protein adsorption from EDS analysis.

Sample	Si	O	C	N	S	Ratio N:C
Atomic%						
MCF-14.5	29.82	49.35	–	–	–	–
LYS/MCF-14.5	28.70	37.11	25.09	6.08	0.28	0.24
Mass%						
MCF-14.5	45.32	44.04	–	–	–	–
LYS/MCF-14.5	40.31	38.59	16.01	5.22	0.22	0.33

(viii) EDX quantitative maps at the microstructural level and spatial distribution of O, C, N, S for MCF-14.5 support and LYS/MCF-14.5 composite apparently indicate that chemical elements are nearly homogeneously distributed on silica surface after albumin adsorption in contrast to the pure porous silica.

Such complete characterization of chemistry, nano-microstructure, morphology (roughness, texture, waviness) of the surface of protein/porous support using spectroscopic and microscopic methods is necessary from both the physicochemical point of view, and biomedical/biophysical applications (design/modification of solid-support surface properties for specific applications, e.g., fabrications of model biophysical systems and new bio-functional medical composites).

CRediT authorship contribution statement

Agnieszka Chrzanowska: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft. **Anna Derylo-Marczewska:** Conceptualization, Writing - review & editing, Validation. **Piotr Borowski:** Writing & formal analysis (FTIR).

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013/ under REA grant agreement N° PIRSES-GA-2013-612484.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146512>.

References

- [1] W. Inglis, G.H. Sanders, P.M. Williamsan, M.C. Davies, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, A simple method for biocompatible polymer based spatially controlled adsorption of blood plasma proteins to a surface, *Langmuir* 17 (2001) 7402–7405.
- [2] H.R. Byon, H.C. Choi, Network single-walled carbon nanotube-field effect transistors (SWNT-FETs) with increased schottky contact area for highly sensitive biosensor applications, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2188–2189.
- [3] L. Tang, J.W. Eaton, Fibrin(ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 2147–2156.

- [4] V.N. Vasilets, A.V. Kuznetsov, V.I. Sevastianov, Vacuum ultraviolet treatment of polyethylene to change surface properties and characteristics of protein adsorption, *J. Biomed. Mater. Res.* A 69 (3) (2004) 428–435.
- [5] B. Kasemo, Biological surface science, *Surf. Sci.* 500 (1–3) (2002) 656–677.
- [6] O.C. Farokhzad, R. Langer, Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (14) (2006) 1456–1459.
- [7] N.O. Sahin, D.J. Burgess, Competitive interfacial adsorption of blood proteins, *II Farmaco* 58 (10) (2003) 1017–1021.
- [8] H. Zhang, M.E. Meyerhoff, Gold-coated magnetic particles for solid-phase immunoassays: enhancing immobilized antibody binding efficiency and analytical performance, *Anal. Chem.* 78 (2) (2006) 609–616.
- [9] J.E. Butler, Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays, *Methods* 22 (1) (2000) 4–23.
- [10] C.H. Jang, B.D. Stevens, P.R. Carlier, M.A. Calter, W.A. Ducker, Immobilized enzymes as catalytically-active tools for nanofabrication, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (41) (2002) 12114–12115.
- [11] D. Steri, M. Monduzzi, A. Salis, Ionic strength affects lysozyme adsorption and release from SBA-15 mesoporous silica, *Micropor. Mesopor. Mater.* 170 (2013) 164–172.
- [12] K. Kubiak-Ossowska, M. Cwieka, A. Kaczynska, B. Jachimska, P.A. Mulheran, Lysozyme adsorption at a silica surface using simulation and experiment: Effects of pH on protein layer structure, *PCCP* 17 (2015) 24070–24077.
- [13] S. Mitragotri, J. Lahann, Physical approaches to biomaterial design, *Nature Mater.* 8 (2009) 15–23.
- [14] R.L. Price, M.C. Waid, K.M. Haberstroh, T.J. Webster, Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers, *Biomaterials* 24 (2003) 1877–1887.
- [15] Y.X. Wang, T.J. Robertson, J.W.B. Spillman, R.O. Claus, Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility, *Pharm. Res.* 21 (8) (2004) 1362–1373.
- [16] L.T. Allen, M. Tosetto, I.S. Miller, D.P. O'Connor, S.C. Penney, I. Lynch, A.K. Keenan, S.R. Pennington, K.A. Dawson, W.M. Gallagher, Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction, *Biomaterials* 27 (16) (2006) 3096–3108.
- [17] J.R. Lu, M.J. Swann, L.L. Peel, N.J. Freeman, Lysozyme adsorption studies at the silica/water interface using dual polarization interferometry, *Langmuir* 20 (2004) 1827–1832.
- [18] F. Dimer, J. Hubbuch, A novel approach to characterize the binding orientation of lysozyme on ion-exchange resins, *J. Chromatogr. A* 1149 (2007) 312–320.
- [19] B. Jachimska, M. Wasilewska, Z. Adamczyk, Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements, *Langmuir* 24 (2008) 6866–6872.
- [20] F. Felsovalyi, P. Mangiagalli, Ch. Bureau, S.K. Kumar, S. Banta, Reversibility of the adsorption of lysozyme on silica, *Langmuir* 27 (2011) 11873–11882.
- [21] H. Hahl, F. Evers, S. Grandthyll, M. Paulus, C. Sternemann, P. Loskill, M. Lesell, A.K. Huseken, T. Brenner, M. Tolan, K. Jacobs, Subsurface influence on the structure of protein adsorbates as revealed by in situ X-ray reflectivity, *Langmuir* 28 (2012) 7747–7756.
- [22] A.G. Richter, I. Kuzmenko, Using in situ X-ray reflectivity to study protein adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces: benefits and limitations, *Langmuir* 29 (2013) 5167–5180.
- [23] D. Pellenc, R.A. Bennett, R.J. Green, M. Sperrin, P.A. Mulheran, New insights on growth mechanisms of protein clusters at surfaces: an AFM and simulation study, *Langmuir* 24 (2008) 9648–9655.
- [24] K. Kubiak-Ossowska, P.A. Mulheran, Multiprotein interactions during surface adsorption: a molecular dynamics study of lysozyme aggregation at a charged solid surface, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 8891–8900.
- [25] A. Steudle, J. Pleiss, Modelling of lysozyme binding to a cation exchange surface at atomic detail: The role of flexibility, *Biophys. J.* 100 (2011) 3016–3024.
- [26] H.R. Luckarift, J.C. Spain, R.R. Naik, M.O. Stone, Enzyme immobilization in a biomimetic silica support, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 211–213.
- [27] E. Pastor, E. Matveeva, A. Valle-Gallego, F.M. Goycoolea, M. Garcia-Fuentes, Protein delivery based on uncoated and chitosan-coated mesoporous silicon microparticles, *Colloids Surf. B* 88 (2011) 601–609.
- [28] M. Hartmann, Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis, *Chem. Mater.* 17 (2005) 4577–4593.
- [29] D.I. Friedl, F.J. Brieler, M. Froeba, Designing inorganic porous materials for enzyme adsorption and applications in biocatalysis, *ChemCatChem* 5 (2013) 862–884.
- [30] N.E. Chayen, E. Saridakis, R.P. Sear, Experiment and Theory for Heterogeneous Nucleation of Protein Crystals in a Porous Medium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 597–601.
- [31] J.A. van Meel, R.P. Sear, D. Frenkel, Design principles for broad-spectrum protein-crystal nucleators with nanoscale pits, *Phys. Rev. Lett.* 105 (2010) 205501.
- [32] S.Y. Yang, I. Ryu, H.Y. Kim, J.K. Kim, S.K. Jang, T.P. Russell, Nanoporous membranes with ultrahigh selectivity and flux for the filtration of viruses, *Adv. Mater.* 18 (2006) 709–712.
- [33] P. Schmidt-Winkel, W.W. Lukens, D. Zhao, P. Yang, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, Mesocellular Siliceous Foams with Uniformly Sized Cells and Windows, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 254–255.
- [34] M. Shakeri, C.W. Tai, E. Göthelid, S. Oscarsson, J.E. Bäckvall, Small Pd nanoparticles supported in large pores of mesocellular foam: an excellent catalyst for racemization of amines, *Chem. Eur. J.* 17 (2011) 13269–13273.
- [35] Y. Han, S.S. Lee, J.Y. Ying, Spherical siliceous mesocellular foam particles for high-speed size exclusion chromatography, *Chem. Mater.* 19 (2007) 2292–2298.
- [36] S. Wu, H.X. Ju, Y. Liu, Conductive mesocellular silica-carbon nanocomposite foams for immobilization, direct electrochemistry, and biosensing of proteins, *Adv. Fun. Mater.* 17 (2007) 585–592.
- [37] K.P. Wilson, B.A. Malcolm, B.W. Matthews, Structural and thermodynamic analysis of compensating mutations within the core of chicken egg white lysozyme, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10842.
- [38] J. Buijs, V. Hlady, Adsorption kinetics, conformation, and mobility of the growth hormone and lysozyme on solid surfaces, studied with TIRF, *J. Colloid Interface Sci.* 190 (1997) 171–181.
- [39] Y. Mine, Recent advances in the understanding of egg white protein functionality, *Trends Food Sci. Technol.* 6 (1995) 225–232.
- [40] M.C. Vachier, M. Piot, A.C. Awade, Isolation of hen egg white lysozyme, ovalbumin, and transferrin and ovalbumin, using a quaternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix, *J. Chromatogr. B* 664 (1995) 201–210.
- [41] T.J. Su, J.R. Lu, R.K. Thomas, Z.F. Cui, J. Penfold, The adsorption of lysozyme at the silica-water interface: a neutron reflection study, *J. Colloid Interface Sci.* 203 (1998) 419–429.
- [42] J.L. Robeson, R.D. Tilton, Spontaneous reconfiguration of adsorbed lysozyme layers observed by total internal reflection fluorescence with pH-sensitive fluorophore, *Langmuir* 12 (1996) 6104–6113.
- [43] K.P. Fears, B. Sivaraman, G.L. Powell, Y. Wu, R.A. Latour, Probing the conformation and orientation of adsorbed enzymes using side-chain modification, *Langmuir* 25 (16) (2009) 9319–9327.
- [44] M. Mrksich, G.B. Sigal, G.M. Whitesides, Surface plasmon resonance permits in situ measurement of protein adsorption on self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold, *Langmuir* 11 (1995) 4383–4385.
- [45] X.X. Han, B. Zhao, Y. Ozaki, Surface-enhanced Raman scattering for protein detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1719–1727.
- [46] B. Jachimska, A. Kozłowska, A. Pajor-Świerzy, Protonation of lysozymes and its consequences for the adsorption onto a mica surface, *Langmuir* 28 (2012) 11502–11510.
- [47] J. Ethève, P. Déjardin, Adsorption kinetics of lysozyme on silica at pH 7.4: Correlation between streaming potential and adsorbed amount, *Langmuir* 18 (2002) 1777–1785.
- [48] M. van der Veen, W. Norde, M.C. Stuart, Electrostatic interactions in protein adsorption probed by comparing lysozyme and succinylated lysozyme, *Colloids Surf.* 35 (2004) 33–40.
- [49] K.R. Xu, M.M. Ouberaï, M.E. Welland, A comprehensive study of lysozyme adsorption using dual polarization interferometry and quartz crystal microbalance with dissipation, *Biomaterials* 34 (2013) 1461–1470.
- [50] A. Chrzanowska, A. Deryło-Marczewska, M. Wasilewska, Mesocellular silica foams (MCFs) with tunable pore size as a support for Lysozyme immobilization: adsorption equilibrium and kinetics, biocomposite properties, sent for publication.
- [51] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores, *Science* 279 (1998) 548–552.
- [52] A. Deryło-Marczewska, A. Chrzanowska, A.W. Marczewski, Morphological, structural and physicochemical characteristics of the surface of mesocellular silica foam with the adsorbed OVA and BSA proteins, *Micropor. Mesopor. Mater.* 293 (2020) 109769.
- [53] E.S. Gadelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, M. Elewa, H.H. Soliman, Roughness parameters, *J. Mater. Process. Technol.* 123 (2002) 133–145.
- [54] M. Voicescu, Y.E. Khoury, D. Martel, M. Heinrich, P. Hellwig, Spectroscopic analysis of tyrosine derivatives: on the role of the tyrosine-histidine covalent linkage in cytochrome c oxidase, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 13429–13436.
- [55] Y. Morino, K. Morino, Kuchitsu, A note on the classification of normal vibrations of molecules, *J. Chem. Phys.* 20 (1952) 1809–1810.
- [56] Singh B. R. Singh, D. B. DeOliveira, F.-N. Fu, M. P. Fuller, Fourier transform infrared analysis of amide III bands of proteins for the secondary structure estimation, *Proceedings of Biomolecular Spectroscopy III, Book Series: Proceedings of The Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) 1890 (1993) 47-55.*
- [57] A. Arvidsson, F. Currie, P. Kjellin, Y.T. Sul, V. Stenport, Nucleation and growth of calcium phosphates in the presence of fibrinogen on titanium implants with four potentially bioactive surface preparations. An in vitro study, *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 20 (2009) 1869–1879.
- [58] G. Iucci, G. Polzonetti, G. Infante, L. Rossi, XPS and FT-IR spectroscopy study of albumin adsorption on the surface of a n-conjugated polymer film, *Surf. Interface Anal.* 36 (2004) 724–728.
- [59] A.P. Serro, M.P. Gispert, M.C.L. Martins, P. Brogueira, R. Colaco, B. Saramago, Adsorption of albumin on prosthetic materials: implication for tribological behaviour, *Biomed. Mater. Res.* 78A (2006) 581–589.
- [60] M.M. Browne, G.V. Lubarsky, M.R. Davidson, R.H. Bradley, Protein adsorption onto polystyrene surfaces studied by XPS and AFM, *Surf. Sci.* 553 (2004) 155–167.
- [61] A. Lebugle, M. Subirade, J. Gueguen, Structural characteristics of a globular protein investigated by X-ray photoelectron spectroscopy: comparison between a legumin film and a powdered legumin, *BBA* 1248 (1995) 107–114.
- [62] D.D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, Y.F. Missirlis, Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption, *Biomaterials* 22 (2001) 1241–1251.
- [63] D.G. Castner, K. Hinds, D.W. Grainger, X-ray photoelectron spectroscopy sulfur 2p study of organic thiol and disulfide binding interactions with gold surfaces, *Langmuir* 12 (1996) 5083.
- [64] G.W. Nelson, M. Perry, S.M. He, D.L. Zechel, J.H. Horton, Characterization of covalently bonded proteins on poly(methyl methacrylate) by X-ray photoelectron spectroscopy, *Colloids Surf., B* 78 (2010) 61–68.
- [65] P.R.A.F. Garcia, R.N. Bicev, C.L.P. Oliveira, O.A. Sant'Anna, M.C.A. Fantini, Protein encapsulation in SBA-15 with expanded pores, *Micropor. Mesopor. Mater.* 235 (2016) 59–68.
- [66] A. Chrzanowska, A. Deryło-Marczewska, Mesoporous silica/protein biocomposites: Surface, topography, thermal properties, *Int. J. Biol. Macromol.* 139 (2019) 531–542.

Supplementary material for the paper:

Comprehensive characterization of biocomposite surface based on the mesoporous silica and Lysozyme molecules: chemistry, morphology, topography, texture and micro-nanostructure

Authors: Agnieszka Chrzanowska*, Anna Derylo-Marczewska, Piotr Borowski

Institute of Chemical Sciences, Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University in Lublin, M. Curie-Skłodowska Sq. 3, 20-031, Lublin, Poland

***Corresponding author:** E-mail: agnieszka.chrzanowska@poczta.umcs.lublin.pl

Morphology parameters

Roughness average S_a is arithmetic mean of the absolute height value; surface roughness S_q is the root mean square (RMS) of arithmetic average of the absolute values of the surface roughness, and is defined as [E.S. Gadelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, M. Elewa, H.H. Soliman, Roughness parameters, J. Mater. Process. Technol. 123 (2002) 133-145]:

$$S_q = \sqrt{\frac{1}{MN} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{l=0}^{N-1} [z(x_k, y_l)]^2} \quad (1)$$

where x and y are the coordinates, z is the perpendicular deviation from the ideally smooth surface, M is the number of points in the x direction and N is the number of points in the y direction; surface waviness S_{dq} is the RMS value of the surface slope within the sampling area computed according to the equation [E.S. Gadelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, M. Elewa, H.H. Soliman, Roughness parameters, J. Mater. Process. Technol. 123 (2002) 133-145]:

$$S_{dq} = \sqrt{\frac{1}{(M-1)(N-1)} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{l=0}^{N-1} \left(\frac{z(x_k, y_l) - z(x_{k-1}, y_l)}{\delta x} \right)^2 + \left(\frac{z(x_k, y_l) - z(x_k, y_{l-1})}{\delta y} \right)^2} \quad (2)$$

surface skewness S_{sk} is a measure of the profile asymmetry about mean line. If $S_{sk} = 0$ then the profile is symmetric relative to the mean line (represents symmetrical distribution functions, including Gaussian), if $S_{sk} < 0$, then the profile is skewed downwards about the mean line (indicates a predominance of valleys on surface), if $S_{sk} > 0$ then the profile is skewed upwards (surface consist

mostly of peaks). Finally surface kurtosis S_{ku} is a measure of the "spikiness" (also called the peakedness) of the surface, or the distribution of spikes above and below the mean line. For spiky surfaces, $S_{ku}>3$ (leptokurtic distribution); for bumpy surfaces $S_{ku}<3$ (platykurtic distribution); for perfectly random surfaces $S_{ku}=3$ (symmetric Gaussian distribution). More detailed information about surface roughness parameters can be found elsewhere [E.S. Gadelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, M. Elewa, H.H. Soliman, Roughness parameters, J. Mater. Process. Technol. 123 (2002) 133-145]. They are sometimes specified for the control of stress fracture.

The UV-Vis DRS spectra

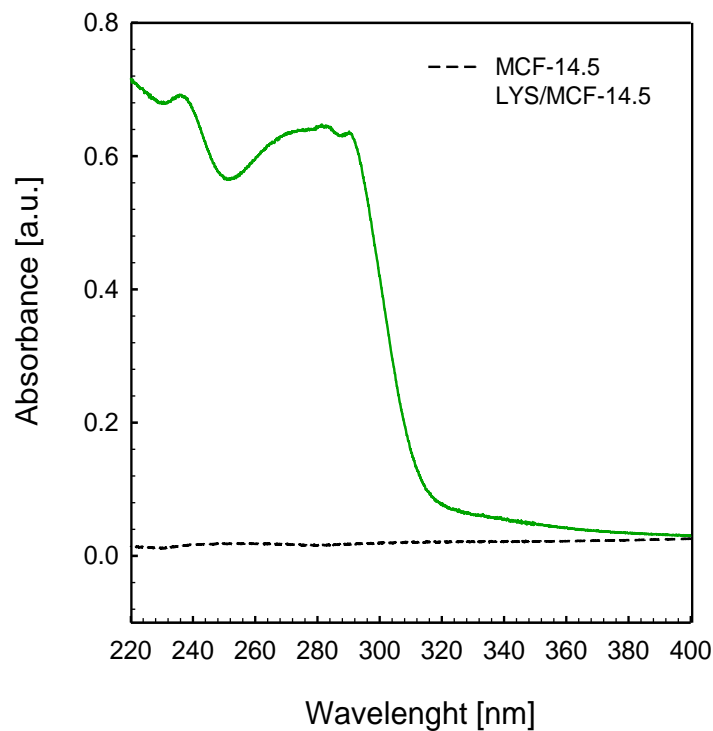


Fig. 1S. UV-Vis DRS spectra of pure MCF-14.5 and LYS/MCF-14.5.

The ATR-FTIR spectra

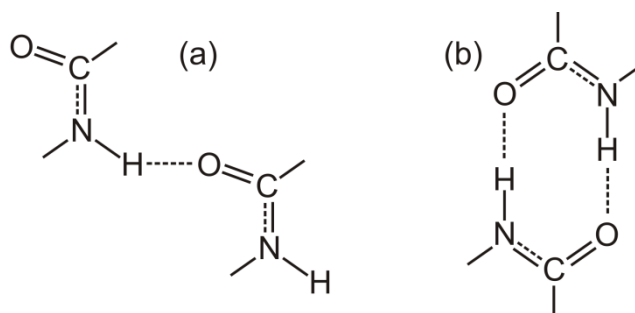


Fig. 2S. The representative protein fragments containing hydrogen bonded moieties.

The elemental analysis (CHN)

Table 1S. Percentage content of elements for the native lysozyme, MCF-14.5, and LYS/MCF-14.5.

Sample	%C	%H	%N	Ratio N:C
LYS	48.46	6.76	17.44	0.36
LYS/MCF-14.5	17.82	3.06	6.38	0.36
MCF-14.5	0.15	0.49	-	-

The TEM/EDX analysis

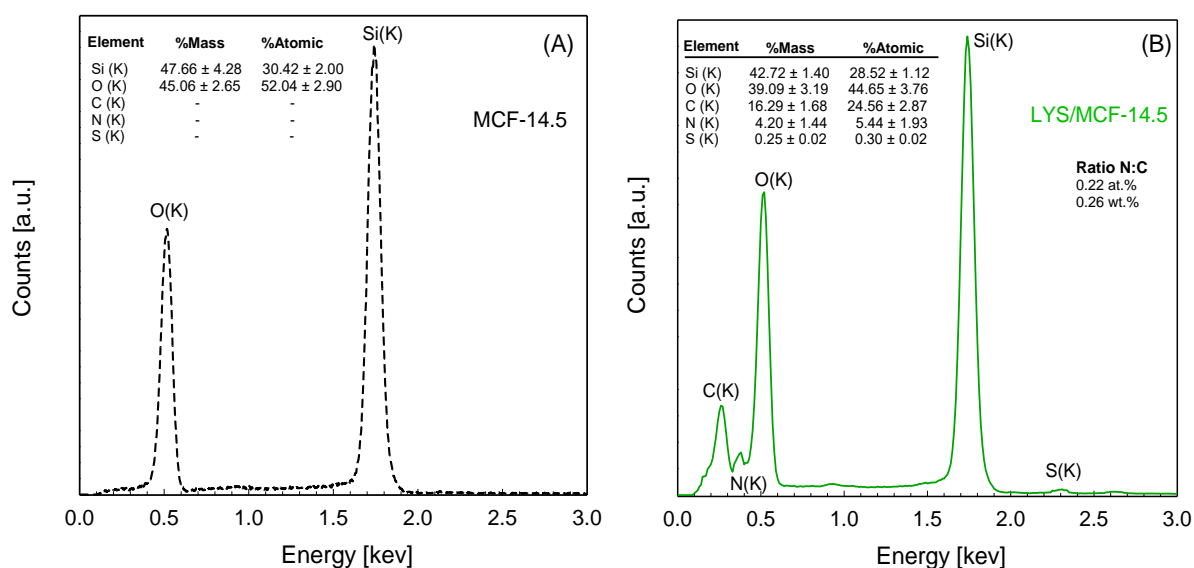
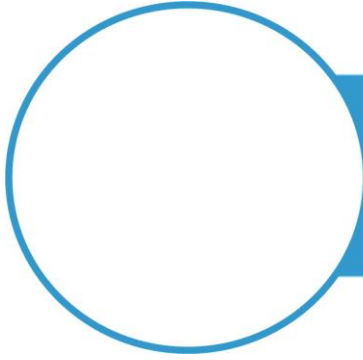


Fig. 3S. Energy-dispersive X-ray (EDX) spectra of native MCF-14.5 material (A) and the material covered by the adsorbed lysozyme layer (B). Insets report the element contents for the MCF-14.5 material before and after protein adsorption from EDX analysis.



OŚWIADCZENIA



Prof. dr hab. Anna Deryło-Marczewska
Katedra Chemii Fizycznej
Instytut Nauk Chemicznych
Wydział Chemii UMCS w Lublinie
e-mail: annad@hektor.umcs.lublin.pl
tel. 81-537-56-46

Lublin, dnia 10.06.2021

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Deryło-Marczewska, A.; **Chrzanowska, A.**; Marczewski, A.W. *Morphological, structural and physicochemical characteristics of the surface of mesocellular silica foam with the adsorbed OVA and BSA proteins. Microporous and Mesoporous Materials* **2020, 293, 109769.**; mój udział wynosił **25%** i polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie oryginalnego maszynopisu pracy, zredagowaniu i edycji manuskryptu oraz współredagowaniu odpowiedzi na recenzje pracy.

Chrzanowska, A.; Deryło-Marczewska, A. *Mesoporous silica/protein biocomposites: Surface, topography, thermal properties. International Journal of Biological Macromolecules* **2019, 139, 531-542.**; mój udział wynosił **20%** i polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie oryginalnego maszynopisu pracy, zredagowaniu i edycji manuskryptu oraz współredagowaniu odpowiedzi na recenzje pracy.

Chrzanowska, A.; Deryło-Marczewska, A.; Wasilewska, M. *Mesocellular Silica Foams (MCFs) with Tunable Pore Size as a Support for Lysozyme Immobilization: Adsorption Equilibrium and Kinetics, Biocomposite Properties. International Journal of Molecular Sciences* **2020, 21, 5479.**; mój udział wynosił **27%** i polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie oryginalnego maszynopisu pracy, zredagowaniu i edycji manuskryptu oraz współredagowaniu odpowiedzi na recenzje pracy.

Chrzanowska, A.; Deryło-Marczewska, A.; Borowski, P. *Comprehensive characterization of biocomposite surface based on the mesoporous silica and lysozyme molecules: Chemistry, morphology, topography, texture and micro-nanostructure. Applied Surface Science*, **2020, 525, 146512.**; mój udział wynosił **20%** i polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie oryginalnego maszynopisu pracy, zredagowaniu i edycji manuskryptu oraz współredagowaniu odpowiedzi na recenzje pracy.

Podpis





UMCS

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Chemii

Lublin, dnia 19.07.2021

Dr hab. Piotr Borowski, prof. UMCS
Katedra Chemii Teoretycznej
Instytut Nauk Chemicznych
Wydział Chemii UMCS w Lublinie
e-mail: piotr.borowski@poczta.umcs.lublin.pl
tel. 81-537-56-71

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: **Chrzanowska, A.**; Derylo-Marczewska, A.; Borowski, P. *Comprehensive characterization of biocomposite surface based on the mesoporous silica and lysozyme molecules: Chemistry, morphology, topography, texture and micro-nanostructure*. **Applied Surface Science 2020, 525, 146512.**; mój udział wynosił **10%** i polegał na wykonaniu interpretacji widm FTIR, obliczeń kwantowo-chemicznych oraz edycji tekstu manuskryptu.


.....
Podpis





UMCS

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Chemii

Lublin, dnia 27.05.2021

Mgr Małgorzata Wasilewska
Katedra Chemii Fizycznej
Instytut Nauk Chemicznych
Wydział Chemii UMCS w Lublinie
e-mail: malgorzata.wasilewska@poczta.umcs.lublin.pl
tel. 81-537-56-46

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Chrzanowska, A.; Deryło-Marczewska, A.; Wasilewska, M. *Mesocellular Silica Foams (MCFs) with Tunable Pore Size as a Support for Lysozyme Immobilization: Adsorption Equilibrium and Kinetics, Biocomposite Properties. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 5479.*; mój udział wynosił **3%** i polegał na dopasowaniu modeli oraz krzywych kinetycznych.

Małgorzata Wasilewska
Podpis

