

SHORT COMMUNICATION

BINDING ISOTHERMS SURFACTANT-PROTEINS♦ ISOTHERMES DE LIAISON SURFACTANT-PROTEINES

Elena Irina Moater*, Cristiana Radulescu, Ionica Ionita

*Valahia University of Targoviste, Faculty of Science and Arts,
Department of Sciences, 130082, Targoviste, Romania*

*Corresponding author: irinamoater@gmail.com

Received: June 24, 2010

Accepted: July 25, 2011

Abstract: The interactions between surfactants and proteins shows some similarities with interactions between surfactants and polymers, but the hydrophobic amphoteric nature of proteins and their secondary and tertiary structure components make them different from conventional polymer systems. Many studies from the past about surfactant - proteins bonding used the dialysis techniques. Other techniques used to determine the binding isotherm, included ultrafiltration, ultracentrifugation, potentiometry, ion-selective electrode method and surface tension. High affinity isotherms which are typical of an anionic surfactant - protein bonding, exhibit an initial increase steep followed by a slow growth region and then a vertical growth above a certain concentration. This isotherm is typical of ionic surfactant to protein binding. Often the high affinity initial bond appears at very low concentrations of surfactant and therefore in some protein-surfactant systems, the exact shape of the isotherm in this region may be missing. The surfactant - protein binding is influenced by a number of variables such as the nature and chain length of surfactant, pH, ionic strength, temperature, nature of this protein and additives.

Keywords: *binding isotherm, CMC, dialysis technique, protein, surfactant*

♦ Paper presented at the 6th edition of *Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée, COFrRoCA 2010*, 7-10 July 2010, Orléans, France

TECHNIQUES POUR LA DETERMINATION DE ISOTHERMES DES LIAISON SURFACTANT - PROTEINE

Au passé, la technique de dialyse a été utilisée dans des nombreuses études, afin de déterminer la liaison entre les surfactants et les protéines [1-6].

La quantité de surfactant lié aux protéines est exprimée en moles (ν) de surfactant lié à une mole de protéine. Dans une expérience typique de dialyse, une concentration connue de la protéine désirée (C_p à un volume V_i), située dans un sac de dialyse est mise en contact avec une concentration connue de la solution de surfactant (C_{Ri} à V_0). Les molécules de surfactant diffusent à travers le sac de dialyse et le système est autorisé à atteindre l'équilibre. La concentration de surfactant à l'extérieur du sac de dialyse est déterminée par des techniques analytiques appropriées telles que le titrage, la détermination de la tension superficielle ou l'adsorption. Connaissant la concentration finale de surfactant, C_R , et en tenant compte de la dilution initiale de surfactant en ajoutant une solution de protéines, nous pouvons calculer la capacité de liaison en utilisant la relation :

$$\nu = \frac{(C_{Ri} - C_R)}{C_p} \cdot \frac{(V_i + V_0)}{V_i} \quad (1)$$

Dans la technique de dialyse il est nécessaire de prendre des précautions spécifiques. La présence de la membrane peut conduire à des inégalités. Les effets de ces inégalités peuvent être supprimés par la gestion de l'expérience dans des solutions avec une salinité élevée, mais leurs utilisation peut induire une compétition entre les ions ligand / surfactant et les sels ou les solutions tampons utilisées pour maintenir le pH à valeur constante, dont les ions ne sont pas indifférents [2]. Dans les expériences par dialyse il est essentiel de s'assurer que l'équilibre du système est possible vue que pour les solutions de protéines avec une concentration supérieure à 0,1%, ce processus peut prendre plus de 24 heures. Les électrodes sensibles aux surfactants fournissent une méthode directe de mesure de l'activité des espèces monomères de surfactant en solution, ce qui fait que cette technique soit largement utilisée pour la détermination des quantités de surfactant liées aux protéines et aux polymères [7-10]. Les progrès technologiques ont conduit à l'obtention des électrodes fixées dans les solutions micellaires [10]. Des mesures appropriées doivent être prises pour s'assurer que les protéines et les autres espèces tampon ne s'adsorbent pas sur la surface de l'électrode. En principe, différentes méthodes spectroscopiques (ultraviolet, fluorescence etc.) peuvent être utilisées pour étudier les liens surfactant-protéine, à seule condition que le signal pour le monomère soit différent de celui des micelles ou des complexes surfactant-protéine.

RESULTATS ET DISCUSSION

Isothermes de liaison surfactant – protéines

Les isothermes de liaison surfactant anionique - protéine dessous de son point isoélectrique sont des isothermes de haute affinité.

La Figure 1 illustre l'isotherme de liaison de système SDS (sodium dodécylsulfate) - lysozyme à pH 3 en fonction de nombre de moles de surfactant lié à une mole de protéine (ν) [11].

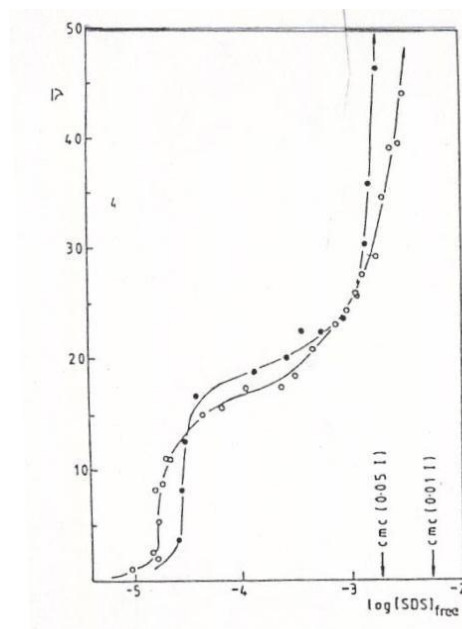


Figure 1. Isothermes de liaison pour le sodium dodécyl sulfate (SDS) en interaction avec lysozyme à pH 3,2, 25°C ;

○ $I = 0,019$;

● $I = 0,0519$.

La concentration de lysozyme est 0,0125%. Le maximum de moles de surfactant lié à une mole de protéine basée sur $[SDS]_{\text{libre}}$ à pH 3,2, $I = 0,119$ est représenté.

Les isothermes présentent une croissance initiale abrupte, suivie d'une région de croissance lente, puis une croissance chargée au-dessus d'une certaine concentration, typique des isothermes de haute affinité. La croissance initiale est attribuée à la liaison dans les positions de haute affinité de la protéine. Ces positions pour les surfactants anioniques ont été identifiées comme des restes des aminoacides cationiques de lysine, d'hystidine et d'arginine [7, 8]. La lysozyme présente 11 groupes d'arginyl, 6 de lysyl et 1 d'hystidyl [11]. Dans la Figure 1 on peut observer que le premier palier correspond à 18 molécules de surfactant (SDS) lié à protéine. La saturation de ces positions d'haute énergie conduit à la précipitation de la protéine, suivie par la dissolution du précipité à des concentrations plus élevées de surfactant, correspondant à la deuxième croissance verticale sur l'isotherme. Cette région de l'isotherme est généralement appelée isotherme de liaison coopérative ; dans cette région est la séparation de la protéine, résultant dans une exposition des positions et la liaison des quantités énormes de surfactant. Il est très important d'observer que la saturation de la liaison se produit à des concentrations inférieures à la Concentration Micellaire Critique (CMC) de surfactant. La forme de l'isotherme présentée dans la Figure 1 est typique pour la liaison de surfactant ionique-protéines. Souvent, l'isotherme d'haute affinité initiale apparaît à de très faibles concentrations de surfactant et, par conséquent, dans certains systèmes surfactant-protéine, la forme exacte de l'isotherme dans cette région peut être absente. La précipitation de la protéine par un surfactant anionique, à un pH en dessous du point isoélectrique de la protéine, est commune à des faibles concentrations de surfactant. La dissolution du précipité a été attribuée à la formation de la deuxième couche de surfactant avec une orientation inverse sur des molécules SDS connexes.

La saturation de toutes les positions de liaison correspond à environ 1-2 g de surfactant à un gramme de protéine. L'isotherme présente un maximum (Figure 1). Des points similaires ont été observés également pour d'autres valeurs de pH. Pour le système SDS - lysozyme ces maximums disparaissent à des valeurs de pH de 3,2 et 4. Le maximum à pH 5 a été maintenu lorsque les liens disulfure de lysozyme ont été réduites par un traitement préalable de l'enzyme avec du mercaptoctanol. Ce maximum de liaison a été attribué à un maximum de l'activité de surfactant monomère rapporté pour les solutions micellaires, mais la corrélation n'est pas quantitative [12 – 14]. Un mécanisme auxiliaire peut être l'exclusion des micelles libres chargées dans le complexe très chargé protéine-surfactant.

La liaison surfactants-protéines est influencée par une série de variables telles que la nature et la longueur de la chaîne hydrocarbonée de surfactant, le pH, la force ionique, la température, la présence des additifs et la nature des protéines.

La liaison surfactants-protéines dépend de la nature du groupement hydrophile du surfactant. Généralement, les surfactants anioniques interagissent plus fortement avec les protéines que ceux cationique ou non ioniques.

L'ordre de la liaison entre les surfactants anioniques avec une longueur équivalente de chaîne varie comme suit : $\text{SO}_4^- > \text{SO}_3^- > \text{benzène SO}_3^- > \text{COO}^-$ [2, 9].

Aussi, la variation de la concentration micellaire critique de surfactants anioniques avec différents groupes polaires, pour une longueur de la chaîne hydrocarbonée suit l'ordre : carboxylates > sulfonés > sulfates. Évidemment, l'augmentation de la tendance du surfactant de former des micelles plus puissantes entraîne une augmentation de l'affinité du surfactant pour les protéines. La variation du pH de la solution en fonction du point isoélectrique de la protéine détermine le chargement de la protéine et donc sa capacité d'attirer des surfactants cationiques ou anioniques. La température peut influencer des nombreux facteurs du système protéine-surfactant. Ainsi, la croissance de la température peut agir considérablement sur la nature de la protéine et peut même conduire à sa déformation. De plus, la température peut affecter les interactions coopératives hydrophobes telles que les interactions électrostatiques.

Généralement, les additifs qui réduisent la CMC d'un surfactant ionique réduiront aussi sa tendance de se lier à la protéine. Une exception est l'ajout du sel qui, lui aussi, diminue la CMC de surfactant. L'utilisation d'un électrolyte ne réduit pas toujours la liaison surfactant-protéines. L'ajout des surfactants non ioniques ou de petites quantités de surfactants cationiques ou amphotères, réduira la liaison surfactants anioniques-protéines. Ces constatations sont applicables autant pour les protéines solubles que celles insolubles. La nature du substrat, respectivement la nature des protéines kératineuses solubles et insolubles présente une importance significative dans le mécanisme de liaison.

CONCLUSIONS

Ce travail met en évidence l'influence de toute une série des variables (la nature et la longueur de la chaîne du surfactant, le pH, la force ionique, la température, la nature de la protéine et la présence des additifs) sur la liaison surfactants-protéines. L'ajout des

additifs réduit à la fois la concentration micellaire critique des surfactants ioniques et leurs tendances de se lier aux protéines.

REFERENCES

1. Goddard, E.D.: Polymer-surfactant interaction Part I. Uncharged water-soluble polymers and charged surfactant, *Colloids and Surfaces*, **1986**, 19 (2-3), 255-300;
2. Steinhardt, J., Reynolds, J.A.: *Multiple Equilibria in Proteins*, Academic Press, New York, **1969**;
3. Tanford, C.: *The Hydrophobic Effect: Formation of micelles and Biological Membranes*, 2nd edition, Wiley-Interscience, New York, **1980**, 14;
4. Schwuger, M.J., Bartnik, F.G.: Interaction of Anionic Surfactant with Proteins, Enzymes and Membranes in: *Anionic Surfactant*, Surfactant Sci. Ser. (Editor: Gloxhuber, C.), Marcel Dekker, New York, **1980**, 10, 1-49;
5. Makino, S.: Interactions of proteins with amphipathic substances in: *Advances in Biophysics* (Editor: Kotani, M.), Japanese Science Society Press, **1979**, 12, 131-184;
6. Jones, M.N.: Physico-chemical studies on the interaction between surfactants and globular proteins, *Comunicaciones presentadas a las Jornadas del Comité Espanol de la Detergencia*, CA 99 101122, **1983**, 14, 117-131;
7. Jones, M.N., Brass, A.: Interaction between small amphipathic molecules and proteins in: *Food polymers, Gels and Colloids* (Editor: Dickinson, E.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1991**, 65-80;
8. Jones, M.N.: Surfactant interactions with biomembranes and proteins, *Chemical Society Review*, **1992**, 21, 127-136;
9. Rendall, H.M.: Use of a surfactant selective electrode in the measurement of the binding of anionic surfactants to bovine serum albumin, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, **1976**, 72, 481-484;
10. Cutler, S.G., Meares P., Hall, D.J.: Ionic activities in sodium dodecyl sulphate solutions from electromotive force measurements, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, **1978**, 74, 1758-1767;
11. Jones, M.N., Manley, P.: *Surfactant Solutions* (Editors: Mittal, K.L., Lindmann, B.), Plenum Press, New York, **1984**, 2, 1403;
12. Jones, M.N., Manley, P., Midgley P.J.W.: Adsorption maxima in a protein surfactant solution, *Journal of Colloid and Interface Science*, **1981**, 82 (1), 257-259;
13. Koga, J., Chen K.-M., Yamazaki, Y., Kuroki, N.: Binding saturation of *n*-alkyl trimethylammonium bromide on bovine serum albumin, *Journal of Colloid and Interface Science*, **1983**, 91 (1), 283-285;
14. Chatteraj D.K., Birdi, K.S.: *Adsorption and the Gibbs Surface Excess*, Plenum Press, New York, **1984**, 339.

