

УДК 539.23, 621.372.8
PACS 42.81.-i, 42.81.Pa
DOI 10.24144/2415-8038.2019.46.48-53

I.I. Трикур, М.Ю. Січка, І.Й. Цьома, А. М. Потапчук, В.М. Різак

Ужгородський національний університет, 88000, Ужгород, вул. Волошина, 54, Україна,
 e-mail: ivan.trikur@uzhnu.edu.ua

Методика пошарового нанесення плівок та характеристики двошарових структур на основі бактеріодопсину

Запропоновано модифіковану методику пошарового нанесення плівок бактеріодопсину. Даний метод є комбінацією методу поливу та центрифугування і передбачає нанесення на підкладку плівки бактеріодопсину, яка покривається тонким шаром золь-гелю. В результаті використання даного методу нами були отримані двошарові плівкові структури на основі бактеріодопсину із задовільною оптичною якістю, які не руйнуються під дією води і можуть використовуватися як первинні перетворювачі для хімічних датчиків водних розчинів. Покриття плівки чистого бактеріодопсину тонким шаром золь-гельного скла приводить до вирівнювання поверхні плівки і зменшення розсіювання на неоднорідностях поверхні. Дослідження спектральних та динамічних характеристик показало що при нанесенні покривного шару золь-гелю бактеріодопсин зберігає характерні функціональні та оптичні властивості.

Ключові слова: золь-гель технологія, бактеріодопсин, плівкові структури, спектральний аналіз, морфологія поверхні, атомно-силова мікроскопія.

Вступ

За останні роки зріс інтерес до використання золь-гельних стекел як матриць для формування композитних структур з ферментами та білками [1, 2]. По суті, золь-гельний процес — це низькотемпературна технологія для виробництва неорганічних матеріалів шляхом гідролізу і поліконденсації лужних оксидів. Золь-гельні покриття недорогі, та мають ряд переваг над органічними полімерами, таких як механічна міцність, хімічна інертність та водонерозчинність. Ферменти та білки, які відбираються для інкапсулювання за допомогою золь-гель технології, повинні бути розчинні у воді та порівняно стійкі до денатурації спиртом, який виділяється під час підготовки золь-гелю. У літературі згадується можливість впровадження в золь-гельне скло білків [3], тому дана методика може бути використана для інкапсулювання бактеріодопсину (БР). Процес форму-

вання кремнеземних аерогелів включає два основні етапи: формування вологого гелю та його висушування. Для одержання аерогелів у більшості золь-гельних методик як вихідні матеріали використовуються тетраалкоксисилікати з низькою молекулярною вагою, такі як тетраметилортосилікат (ТМОС) і тетраетилортосилікат (ТЕОС). Однак, враховуючи високу токсичність ТМОС, при виготовленні кремнеземних аерогелів переважно використовують ТЕОС, хоча аерогелі, виготовлені з застосуванням ТЕОС у присутності кислового катализатора, часто мають певні недоліки, такі як більш тривалий час гелеутворення (мінімум 2–3 дні), більша усадка (до 30%), низьке оптичне пропускання (до 65%) і вища густина ($\sim 0,2 \text{ г/см}^3$) [4].

Фізико-хімічні властивості золь-гельних плівкових структур визначаються вихідними умовами приготування та зазнають певних змін під час старіння. При внесенні фрагментів пурпурних мембран (ПМ)

у розчин прекурсорів, гідроліз та конденсація тетраалкосиланів під час золь-гельного процесу сприяють формуванню твердої силікатної матриці навколо ПМ [5]. БР зберігає свої характерні оптичні властивості при впровадженні його до кремнієвого скла в ході золь-гельного процесу [2, 6], тому цей процес можна використати для виготовлення елементів біоелектроніки. Підготовка сухих плівок на основі БР у неорганічній матриці з високою оптичною якістю суттєво розширює можливості застосування БР для виготовлення чутливих елементів інтегрально-волоконно-оптичних сенсорів.

В даній роботі розглянуто спосіб отримання двошарових плівок на основі БР з використанням низькотемпературного золь-гель процесу та наведено результати досліджень отриманих плівкових структур.

Методика отримання плівок пошаровим нанесенням

Використовуючи золь-гельну технологію, у полістироловій пробірці при кімнатній температурі можна отримати об'ємні зразки високої оптичної якості. Для цього була підготовлена плівкоутворююча суміш (ТЕОС, H_2O , C_2H_5OH , HCl). Після приготування, суміш обробляли ультразвуком на протязі 1 години, додавали водну суспензію ПМ і залишали при кімнатній температурі на 2–3 години. Потрібно зазначити, що для запобігання денатурації світлочутливого білку, загальний рН золь-гельного розчину дорівнював $\sim 6,0$.

Використання методу центрифугування дає можливість отримати плівки із суміші золь-гелю і суспензії пурпурних мембран без дефектів але з товщинами на рівні 5–10 нм і неоднорідною поверхнею. Такі плівки по суті будуть являти собою окремі фрагменти пурпурних мембран покриті тонким шаром золь-гельного скла. Враховуючи, що товщина ПМ складає близько 5 нм [7], неоднорідність по товщині можна пояснити нерівномірністю розміщення фрагментів ПМ по поверхні підкладки та їх частковим накладанням. Оскільки одношарова плівка містить занадто мало БР для можливості практично-

го використання його властивостей, потрібно наносити багато шарів, що супроводжується значними втратами матеріалу в процесі виготовлення таких плівок.

У той же час, навіть при дотриманні всіх технологічних особливостей, отримання плівок з товщинами в межах 1–40 мкм і високою оптичною якістю на базі бактеріородопсину у золь-гельних матрицях досить складний процес з технологічної точки зору. Під час висушування золь-гелю пориста структура формується за рахунок випаровування розчинника, що приводить до появи внутрішніх механічних напруг у зразку. У чистому золь-гелі вони недостатні для руйнування зразка будь-якої форми. Якщо ж внести у структуру додаткові включення у виді ПМ з розмірами на два порядки більшими за розміри пор, міцність структури стає залежною від її геометричних розмірів. При формуванні об'ємного зразка “кістяк”, який утворюють молекули кремнію, має достатню міцність і гнучкість щоб витримати внутрішні навантаження, незважаючи на наявність ПМ. При формуванні ж плівкових структур, ймовірно, кількості зв'язків недостатня, тому відбувається порушення однорідності таких плівкових структур.

В процесі досліджень нами був запропонований наступний метод вирішення проблеми низької оптичної якості плівок БР у золь-гельних матрицях. Плівки чистого БР мають достатню оптичну якість, але водорозчинні. Тонкі плівки чистого золь-гелю теж однорідні та позорі і нерозчинні у воді. Тому пошарове нанесення на скляну підкладку спочатку плівку чистого БР, а зверху тонкої плівки чистого золь-гелю, має привести до утворення двошарової структури, в якій не буде великих внутрішніх напруг. Золь-гельний покривний шар буде забезпечувати нерозчинність у воді, в той же час за рахунок високої пористості золь-гелю речовини аналіти можуть вільно проникати в плівку для взаємодії з БР. Дана методика є комбінацією методу поливу та центрифугування і передбачає нанесення на підкладку плівки БР, яка покривається тонким шаром золь-гелю. Схематичне зображення методу наведено на рисунку 1.

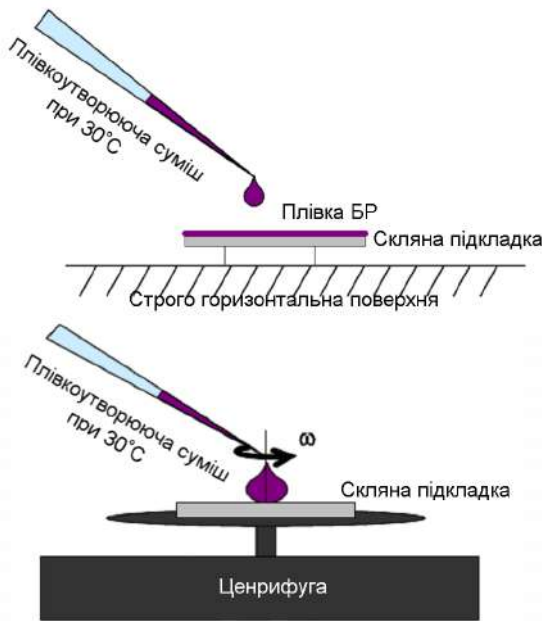


Рис. 1: Схема нанесення двошарової плівки на основі бактеріородопсину із золь-гельним покриттям.

Для виготовлення плівки БР запропонованим методом 0,5 мл водного розчину БР поміщали на очищену скляну підкладку і висушували в ексікаторі протягом 24 год. Після того, як плівка БР висихала, зверху наносився шар золь-гельного SiO_2 скла. Для нанесення золь-гелю на плівку БР використовували метод центрифугування. У нашому випадку крапля плівкоутворюючої суміші об'ємом ~ 10 мкл наносилася на скляну підкладку, швидкість обертання якої складала 750 об/хв. Як і у випадку з плівками золь-гелю отримуваними методом поливу, використовували 3 режими висушування: протягом 24 годин при кімнатній температурі, 48 годин при $4\text{ }^\circ\text{C}$ в холодильнику у відкритій чашці Петрі та протягом 6 діб при $4\text{ }^\circ\text{C}$ у закритій чашці Петрі. Мікроснімки поверхні отриманих плівок наведено на рис.2.

Як видно з результатів, у випадку повільного висушування при пониженій температурі у плівках не виникає мікротріщин. Останнє можна пояснити наступним чином. За рахунок тривалості процесу полімеризації (6 діб) і висихання в атмосфері насиченої пари розчинника, швидкість випаровування рідини із пор золь-гельного скла була дуже низькою. Останнє сповільнило процес «усадки» золь-гельного скла в процесі ста-

ріння і зробило можливим утворення додаткових зв'язків у структурі кістяка, які взяли на себе частину навантаження, спричиненого внутрішніми напругами.

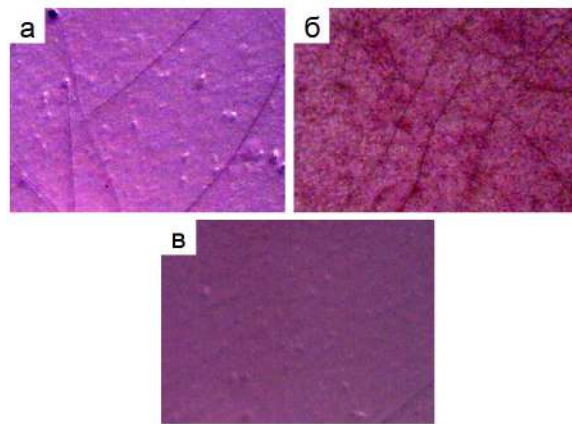


Рис. 2: Гелеутворення при кімнатній температурі (а), в холодильнику, у відкритій (б) та закритій (в) чашці Петрі.

Дослідження характеристик отриманих плівкових структур.

На рис. 3 для порівняння наведено характеристики поверхні типових плівок бактеріородопсину покритого тонким шаром золь-гелю, та плівки чистого бактеріородопсину без покриття.

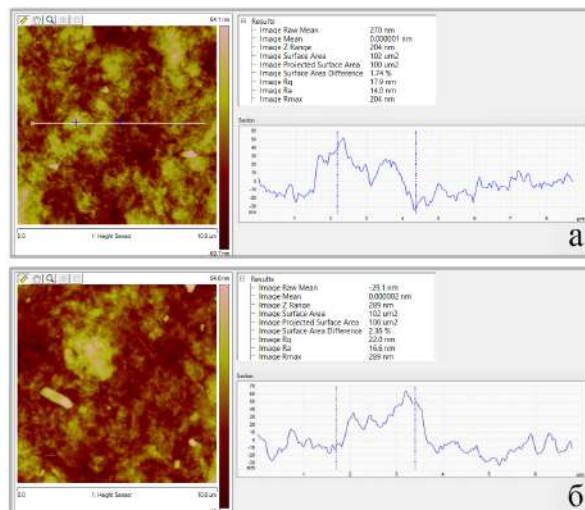


Рис. 3: Морфологія поверхні плівки чистого БР, покритої шаром золь-гелю (а), та плівки чистого БР без покриття (б).

Дослідження отриманих двошарових структур за допомогою АСМ, показало, що

після нанесення покривного шару золь-гелю, шорсткість плівок зменшується в середньому на 15–20% з 18,5 до 14,0 нм. Максимальний перепад по висоті зменшується майже на 30% — з 290 нм для плівок чистого БР до 205 нм для плівки БР, покритої шаром золь-гельного скла. Зменшення шорсткості поверхні досягається, як і у випадку зі скляною підкладкою, за рахунок заповнення нерівностей поверхні рідким розчином золь-гелю. Зменшення неоднорідностей поверхні приводить до зменшення розсіювання на неоднорідностях поверхні і підвищення оптичної якості плівки. На рис. 3 наведені спектри пропускання для плівки чистого БР, плівки золь-гелю та двошарової структури БР+золь-гель.

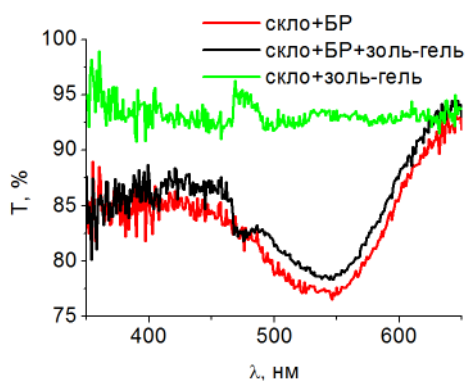


Рис. 4: Спектри пропускання плівок чистого золь-гелю, БР без матриці та плівки БР, покритої шаром золь-гелю.

Як видно з графіків, для скляної підкладки, покритої шаром золь-гельного скла, відсутні смуги поглинання в досліджуваному діапазоні. В той же час для плівки чистого БР та двошарової плівки БР, покритої шаром золь-гелю спостерігається чітка смуга поглинання в області 570 нм. Причому для двошарової плівки пропускання дещо зростає порівняно з плівкою чистого БР, незважаючи на виникнення додаткової межі поділу БР/золь-гель. Даний результат можна пояснити зменшенням розсіювання на неоднорідностях поверхні плівки.

Висновки

В результаті використання даного методу нами були отримані двошарові плівкові структури на основі бактеріородопсину із задовільною оптичною якістю, які не руйнуються під дією води і можуть використовуватися як первинні перетворювачі для хімічних датчиків водних розчинів. Як показали дослідження морфології поверхні, покриття плівки чистого БР тонким шаром золь-гельного скла приводить до вирівнювання поверхні плівки і зменшення розсіювання на її неоднорідностях. Дослідження спектральних та динамічних характеристик показало, що при нанесенні покривного шару золь-гелю БР зберігає характерні функціональні та оптичні властивості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] A Review on Bacteriorhodopsin-Based Bioelectronic Devices / Y. T. Li, Y. Tian, H. Tian, T. Tu, G. Y. Gou, Q. Wang, Y. C. Qiao, Y. Yang, T. L. Ren. // *Sensors (Basel)*. — 2018. — V. 18(5). — P. 1368–1389.
- [2] Wu S. Bacteriorhodopsin Encapsulated in Transparent Sol-Gel Glass: A New Biomaterial / S. Wu, L. M. Ellerby, J. S. Cohan // *Chem. Mater.* — 1993. — V. 5. — P. 115–120.
- [3] Dave B. C. Encapsulation of Proteins in Bulk and Thin Film Sol-Gel Matrices / B. C. Dave, J. M. Miller, B. Dunn. // *Journal of Sol-Gel Science and Technology* — 1997. — V. 8. — P. 629–634.
- [4] Rao A. V. Synthesis and physical properties of TEOS-based silica aerogels prepared by two step (acid-base) sol-gel process / A. V. Rao, S. D. Bhagat // *Solid State Sciences*. — 2004. — V. 6. — P. 945–952.

- [5] Films based on bacteriorhodopsin in sol-gel matrices / S. O. Korposh, M. Y. Sichka, I. I. Trikur, [et al.] // Proc. SPIE. — 2005. — V. 5956. — P. 312–320.
- [6] Weetall H. H. Retention of bacteriorhodopsin activity in dried sol-gel glass / H. H. Weetall // Biosensors & Bioelectronics. — 1996. — V. 11(3). — P. 327–333.
- [7] Hampp N. Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories / N. Hampp // Chem Rev. — 2000. — V. 100. — P. 1755–1776.

Стаття надійшла до редакції 19.11.2019

И.И. Трикур, М.Ю. Сичка, И.Й. Цьома, А.М. Потапчук, В.М. Ризак

Ужгородский национальный университет, 88000, Ужгород, ул. Волошина, 54, Украина,
e-mail: ivan.trikur@uzhnu.edu.ua

Метод послойного нанесения пленок и характеристики двухслойных структур на основании бактериородопсина

Предложена модифицированная методика послойного нанесения пленок бактериородопсина. Данный метод является комбинацией метода полива и центрифугирования и предусматривает нанесение на подложку пленки бактериородопсина, которая покрывается тонким слоем золь-геля. В результате использования данного метода, нами были получены двухслойные пленочные структуры на основе бактериородопсина с удовлетворительными оптическими свойствами, которые не разрушаются под действием воды и могут быть использоваться в качестве первичных преобразователей для химических датчиков водных растворов. Покрытие пленки чистого бактериородопсина тонким слоем золь-гельного стекла приводит к выравниванию поверхности пленки и уменьшения рассеивания на неоднородностях поверхности. Исследование спектральных и динамических характеристик показало, что при нанесении покровного слоя золь-геля бактериородопсин сохраняет характерные функциональные и оптические свойства.

Ключевые слова: золь-гель технология, бактериородопсин, пленочные структуры, спектральный анализ, морфология поверхности, атомно-силовая микроскопия.

I. I. Trikur, M. Yu. Sichka, I. Y. Tsoma, A. M. Potapchuk, V. M. Rizak

Uzhhorod National University, 88000, Uzhhorod, Voshyna Str., 54, Ukraine,
e-mail: ivan.trikur@uzhnu.edu.ua

Methods of layer-by-layer deposition of films and characteristics of two-layer structures based on bacteriorhodopsin

A modified technique of layer-by-layer deposition of bacteriorhodopsin (BR) films is proposed. This method is a combination of the casting and centrifugation method and involves the application of a pure BR film to the substrate, which

is covered with a thin layer of sol-gel glass. As a result of using this method we have obtained two-layer film structures based on BR with satisfactory optical quality, which are not destroyed by water and can be used as primary transducers for chemical sensors of aqueous solutions. Surface of the obtained structures coating the film of pure BR with a thin layer of sol-gel glass leads to the leveling of the film surface and reducing the scattering on its inhomogeneities. The film roughness decreases by an average of 15-20% from 18.5 to 14.0 nm. The maximum height difference decreases by almost 30% - from 290 nm for pure BR films to 205 nm for BR films coated with a sol-gel glass layer. The study of the spectral characteristics of the obtained films showed that the deposition of a layer of sol-gel glass does not affect the characteristic functional and optical properties of BR.

Keywords: sol-gel technology, bacteriorhodopsin, film structures, spectral analysis, surface morphology, atomic force microscopy

REFERENCES

- [1] Li, Y. T., Tian, Y., Tian, H., Tu, T., Gou, G. Y., Wang, Q., Qiao, Y. C., Yang, Y., Ren, T. L. (2018) "A Review on Bacteriorhodopsin-Based Bioelectronic Devices", *Sensors (Basel)*. — 2018. — V. 18(5). — P. 1368–1389.
- [2] Wu, S., Ellerby, L. M., Cohan, J. S. (1993) "Bacteriorhodopsin Encapsulated in Transparent Sol-Gel Glass: A New Biomaterial" *Chem. Mater.* — 1993. — V. 5. — P. 115–120.
- [3] Dave, B. C., Miller, J. M., Dunn, B. (1997) "Encapsulation of Proteins in Bulk and Thin Film Sol-Gel Matrices" *Journal of Sol-Gel Science and Technology* — 1997. — V. 8. — P. 629–634.
- [4] Rao, A. V., Bhagat, S. D. (2004) "Synthesis and physical properties of TEOS-based silica aerogels prepared by two step (acid-base) sol-gel process" *Solid State Sciences*. — 2004. — V. 6. — P. 945–952.
- [5] Korposh, S.O., Sichka, M.Y., Trikur, I.I., Sharkany, Y.P., Yang, D.H., Lee, S.W., Ramsden, J.J. (2005) "Films based on bacteriorhodopsin in sol-gel matrices" *Proc. SPIE*. — 2005. — V. 5956. — P. 312–320.
- [6] Weetall, H. H. (1996) "Retention of bacteriorhodopsin activity in dried sol-gel glass" *Biosensors & Bioelectronics*. — 1996. — V. 11(3). — P. 327–333.
- [7] Hampp, N. (2000) "Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories" *Chem Rev.* — 2000. — V. 100. — P. 1755–1776.

©Ужгородський національний університет