

ІММОБІЛІЗАЦІЯ УРЕАЗИ НА ПОЛІ(3-МЕРКАПТОПРОПІЛ)СИЛОКСАНОВИХ НОСІЯХ

Р.П. Погорілий, В.П. Гончарик, Ю.Л. Зуб

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, roman_pogorilyi@rambler.ru*

З використанням золь-гель методу (шляхом співгідролізу тетраетоксисилану та 3-меркаптопропілтриетоксисилану) синтезовано полі(3-меркаптопропіл)силоксановий ксерогель і показано, що при співвідношенні вихідних алкоксисиланів 1:1 він є практично непористим. Вивчено вплив іммобілізації уреаз на такому носію методами адсорбції, ковалентного зв'язування та вбудування (під час перебігу реакції гідролітичної поліконденсації) на ступінь її зв'язування та збереження активності. Встановлено, що найвищий рівень зв'язування (88%) та збереження активності (55%) спостерігається при іммобілізації уреаз шляхом вбудування. Уреаза, іммобілізована цим методом, зберігає свою активність на рівні 30% протягом 170 діб.

Вступ

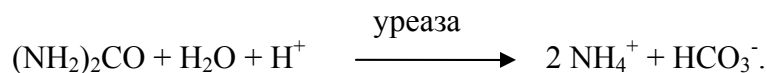
Золь-гель технологія є досить зручним методом одержання пористих і непористих оксидів металів та неметалів у формі монолітів, порошоків та тонких плівок, які знаходять використання в оптиці, каталізі, в тому числі біокаталізі, сорбції, при іммобілізації ферментів, клітин тощо [1–4]. В основі гідролітичного варіанту золь-гель методу лежить реакція гідролітичної поліконденсації прекурсорів, серед яких найпоширенішими є алкоксипохідні металів чи неметалів [5–9]. У випадку використання алкоксисиланів на першому етапі перебігу цієї реакції утворюються розчинні силанольновмісні олігомери, які в подальшому полімеризуються з формуванням гідрогелю. Контрольоване видалення рідкої фази з гідрогелю – екстракцією або випаровуванням – веде до утворення сухого, пористого аеро- чи ксерогелю, який може бути підданий високотемпературній обробці, в результаті чого формується щільний оксид. При застосуванні більш низьких температур сушки гідрогелів і використанні трифункціональних силанів як прекурсорів можна одностадійно одержати гібридні органо-неорганічні матеріали. Присутність в цих матеріалах органічних функціональних груп дуже важливе при іммобілізації ферментів, оскільки в такому випадку їх оточення стає подібним до внутрішньоклітинного середовища [10–14].

Одержані таким чином матеріали можна використовувати у вигляді гідрогелів та ксерогелів. Для останніх характерна нано- або мікроструктура, в межах якої може бути фізично зв'язаний біооб'єкт [15–19]. Встановлено, що в залежності від використаних прекурсорів і середовища білки з молекулярною масою 8000 – 15000 Да (~1,3–1,7 нм) можуть бути необоротно капсульовані в матрицях, одержаних золь-гель методом [20–22]. Під час перебігу реакції гідролітичної поліконденсації відбувається взаємодія таких молекул з олігомерами – продуктами згаданої реакції, що і обумовлює фіксацію біооб'єкта, як правило, на поверхні полімерів [23, 24].

Переваги іммобілізації біооб'єктів золь-гель методом [25] обумовлені оптичними та механічними властивостями матриць, які до того ж мають високу стійкість до хімічного і мікробіологічного впливу в порівнянні зі звичайними органічними полімерами. Такі матеріали можна одержати пористими, більше того, можна суттєво впливати на їхню пористу структуру, варіюючи природу прекурсорів та умови гідролітичної поліконденсації тощо. В полісилоксанові матриці можна легко вводити різні неорганічні та органічні компоненти. В [26] показано, що функціоналізація

поверхні носія суттєво впливає на біологічні властивості іммобілізованого ферменту. Зокрема, 3-меркаптопропільні групи, введені в поверхневий шар матриці, підвищують збереження активності уреази після її іммобілізації. Біоб'єкти, іммобілізовані в матрицях, одержаних золь-гель методом, досить активні і виявляють, зазвичай, підвищену стійкість до теплової, хімічної денатурації, а також до протеолітичної атаки. Такі матеріали мають підвищений термін зберігання та збереження біологічної активності [26].

Цікавим об'єктом для іммобілізації є гідролітичний фермент уреаза (карбамід-аміногідролаза). Вона належить до класу гідролаз і каталізує гідролітичне розщеплення сечовини з утворенням аміаку та вуглекислого газу:



Уреаза забезпечує здійснення важливого етапу в кругообігу азоту в природі: тварини харчуються рослинними білками, виділяють сечовину; ґрунтові бактерії, маючи уреазу, розкладають сечовину на аміак і вуглекислий газ; утворений в результаті цієї реакції аміак використовується іншими бактеріями для синтезу нітратів і нітритів, які в свою чергу засвоюються рослинами для утворення білка і т.д. Висока специфічність уреази до сечовини (навіть близькі по структурі до сечовини речовини не підлягають дії ферменту, окрім оксипохідного сечовини, що частково має здатність виступати субстратом для уреази) дозволяє використовувати цей фермент для аналітичного визначення сечовини в крові та сечі, що є важливим діагностичним тестом при захворюванні печінки і нирок [27].

З урахуванням вищезгаданих переваг полісилоксанових матеріалів нами як носій була обрана полі(3-меркаптопропіл)силоксанова матриця, яку легко можна синтезувати з використанням золь-гель методу. З метою розробки методичних рекомендацій при створенні біопрепаратів нами було вивчено вплив різних способів іммобілізації уреази на такій матриці на ступінь збереження її активності.

Експериментальна частина

В роботі для синтезу полісилоксанових матриць використовувалися наступні алкоксисилани: тетраетоксисилан $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (ТЕОС, Aldrich, 98 %); 3-меркаптопропілтриетоксисилан $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{SH}$ (МПТЕС, Aldrich, 99 %); каталізатор NH_4F (98%, Fluka), абсолютизований етанол, реактив Еллмана (Aldrich, 99 %).

Об'єкт іммобілізації – фермент уреазу, який відноситься до класу гідролаз, одержано з бобів сої «Jack beans» (КФ 3.5.1.5, активність 26,7 од/мг (при рН 7), Fluka). Окрім того, в роботі використовували 0,06 М фосфатний буфер (рН 7,0); 0,1 М розчин ЕДТА (трилон Б, ч.д.а.); сечовину (х.ч.) – 2 М розчин.

Методика синтезу полі(3-меркаптопропіл)силоксанової матриці. До розчину 0,0028 г (0,075 ммоль) NH_4F в 0,495 см³ води та 2 см³ етанолу, охолодженого на льодяній бані, при перемішуванні додавали 2,4 см³ (0,01 моль) МПТЕС, а потім 2,2 см³ (0,01 моль) ТЕОС. Перемішування здійснювали протягом 1 хв. Реакційну суміш залишали в льодяній бані при 4°C на 20 хв до утворення білого осаду; при цьому спостерігалось деяке розігрівання реакційної суміші, що свідчило про перебіг процесів гідролізу та поліконденсації. Після 24 год старіння при 4°C утворений гель подрібнювали та висушували у вакуумі при 105°C протягом 6 год; промивали водою об'ємом 1 дм³ та знову сушили при вищезгаданих умовах. Одержаний ксерогель – біла порошкоподібна речовина.

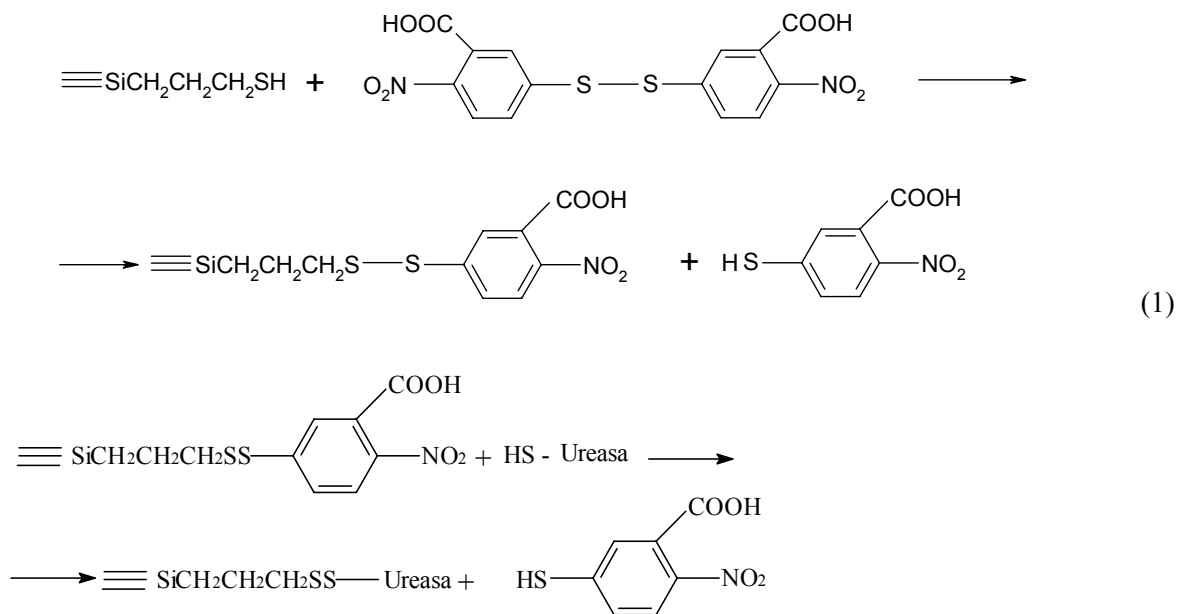
Іммобілізацію уреази здійснювали методом вбудування (уреаза вносилась в систему під час синтезу матриці), адсорбцією та ковалентним зв'язуванням за допомогою реактиву Еллмана (5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної кислоти)).

Вбудування уреазу під час синтезу матриці. До 2 см³ етанолу на льодяній бані додавали при перемішуванні 2,2 см³ (0,01 М) ТЕОС та 2,4 см³ (0,01М) МПТЕС. Після утворення прозорого розчину додавали 0,5 см³ буферного розчину (фосфатний буфер/ЕДТА – 9:1) уреазу (10 мг) і каталізатор – 0,0028 г (0,075 мМ) NH₄F в 0,495 см³ води. Після додавання ферменту розчин мутнів – спостерігалось утворення емульсії, яка зникала при її перемішуванні протягом 25 хв. Після цього перемішування припиняли. Через ~7 хв спостерігалась поява білого осаду. Його залишали на добу в холодильнику для старіння. Наступного дня осад промивали розчином фосфатного буферу – 5 разів по 5 см³.

Імобілізації уреазу на полі(3-меркаптопропіл)силоксановій матриці шляхом адсорбції. Наважку матриці (100,0 мг) заливали розчином уреазу (10,0 мг) в 3 см³ суміші фосфатного буфера (рН 7) та ЕДТА (при співвідношенні 9:1) та залишали на 12 год в холодильнику. Потім осад відділяли від ферментного розчину і промивали його фосфатним буфером – 5 разів по 5 см³.

*Для ковалентного зв'язування уреазу на полі(3-меркаптопропіл)силоксановій матриці наважку носія (100,0 мг) заливали розчином реактиву Еллмана (1 см³). Реакційну суміш витримували 6 год при кімнатній температурі. Осад промивали водою до повного зникнення яскраво помаранчевого забарвлення аніону *n*-нітротіобензоата. До відмитого ксерогелю додавали розчин уреазу – 10,0 мг в 3 см³ фосфатного буфера (рН = 7; буфер : ЕДТА = 9:1) – та залишали в холодильнику на 18 год. Потім осад відділяли від ферментного розчину та промивали розчином фосфатного буферу – 5 разів по 5 см³.*

Процес ковалентного закріплення уреазу на поверхні полісилоксанової матриці шляхом тіол-дисульфідного обміну за участю її поверхневих меркаптогруп, дисульфідних груп реактиву Еллмана та меркаптогруп ферменту ілюструється схемою (1).



В усіх випадках кількість зв'язаного ферменту оцінювали за різницею уреазу, взятої для імобілізації та знайденої в промивних розчинах. Вміст уреазу в промивних розчинах розраховували на основі її активності, виходячи з величини питомої активності ферменту.

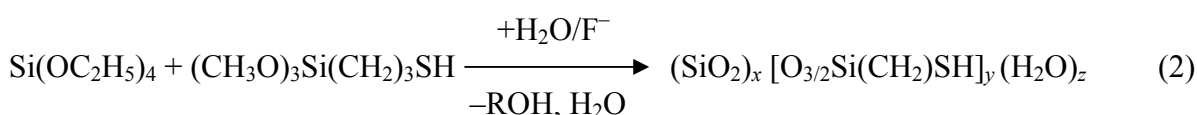
Ферментативну активність в промивних водах та імобілізованої на одержаних матрицях уреазу визначали за швидкістю утворення аміаку в реакції гідролізу сечовини

при 25°C [28]. У всіх випадках при визначенні активності брали середнє значення трьох паралельних дослідів, найбільша різниця між якими не перевищувала 10%. Похибка визначення активності уреазі з урахуванням коефіцієнта Стьюдента при надійній імовірності 0,95 не перевищує 10%.

ІЧ спектри в режимі відбиття записувалися на приладі Thermo Nicolet Nexus FT-IR з роздільною здатністю 8 см⁻¹ при кімнатній температурі в діапазоні 4000–400 см⁻¹. Зразки попередньо змішували з KBr у співвідношенні 1:30. Для запису ІЧ спектрів при більш високих температурах (200 °C) використовували спеціальну термовакuumну приставку “Collector II”. Мікрофотографії синтезованих зразків одержували з використанням скануючого електронного мікроскопа Tesla BS301. Ізотерми низькотемпературної адсорбції азоту були одержані за допомогою приладу “Kelvin-1042” (Costech Microanalytical). Попередньо зразки дегазувалися при 383 К в атмосфері гелію. Значення питомої поверхні розраховували за БЕТ [29] в діапазоні відносних тисків 0,05 – 0,35.

Результати та обговорення

Синтез полі(3-меркаптопропіл)силоксанової матриці здійснювали з використанням реакції гідролітичної співполіконденсації тетраетоксисилану та 3-меркаптопропілтри-етоксисилану (схема 2).



Для перебігу цієї реакції необхідна присутність каталізатора. В даному випадку як каталізатор використовували фторид-іон (мольне співвідношення Si/F⁻ складало 100/1) [30]. Фторид-іон, котрий може бути інгібітором ферменту, досить легко відмивається від синтезованої матриці і не може знижувати активність уреазі. Використання етанолу як розчинника алкоксисиланів сприяло швидкому переходу золю в гель без утворення межі розподілу фаз. Після сушки одержаний продукт уявляв собою зернистий порошок.

Синтезований ксерогель з монофункціональним поверхневим шаром, представленого тіольними групами – це біла, порошкоподібна речовина. З його мікрофотографій, одержаних за допомогою СЕМ, видно, що зразок складається з агломератів (рис. 1а), утворених частинками з близькими до сферичної форми діаметром ≈ 3,0–4,0 мкм, які частково зрослися (рис. 1б).

Така картина не є типовою для полісилоксанових ксерогелів. Раніше вона спостерігалася для полі(3-меркаптопропіл)силоксанового ксерогелю, одержаного при співвідношенні ТЕОС/3-меркаптопропілтриметоксисилан, теж рівного 1:1 [31]. На кривій ТГ для синтезованого зразка (рис. 2) можна виділити три ділянки, що відповідають втраті маси. Перша з них, з центром близько 100°C, зв'язана з видаленням залишків адсорбованої води. На цій ділянці втрата маси зразка складає 5%. На кривій ДТА в інтервалі 70–120°C спостерігається, як і очікувалось, ендотермічний ефект. На другій ділянці кривої ТГ, з центром біля 340°C, фіксується більш значна втрата маси, яка, ймовірно, всього, відповідає видаленню (і окисненню) невеликих сірковмісних фрагментів (типу H₂S і CH₃SH). Нарешті, втрата маси вище 520°C відповідає повному випалюванню органічної частини, що залишилася. З цим пов'язана поява на кривих ДТА екзотермічних ефектів вище 340°C. Сумарні втрати маси на другій і третій ділянках кривих ТГ складають 37%.

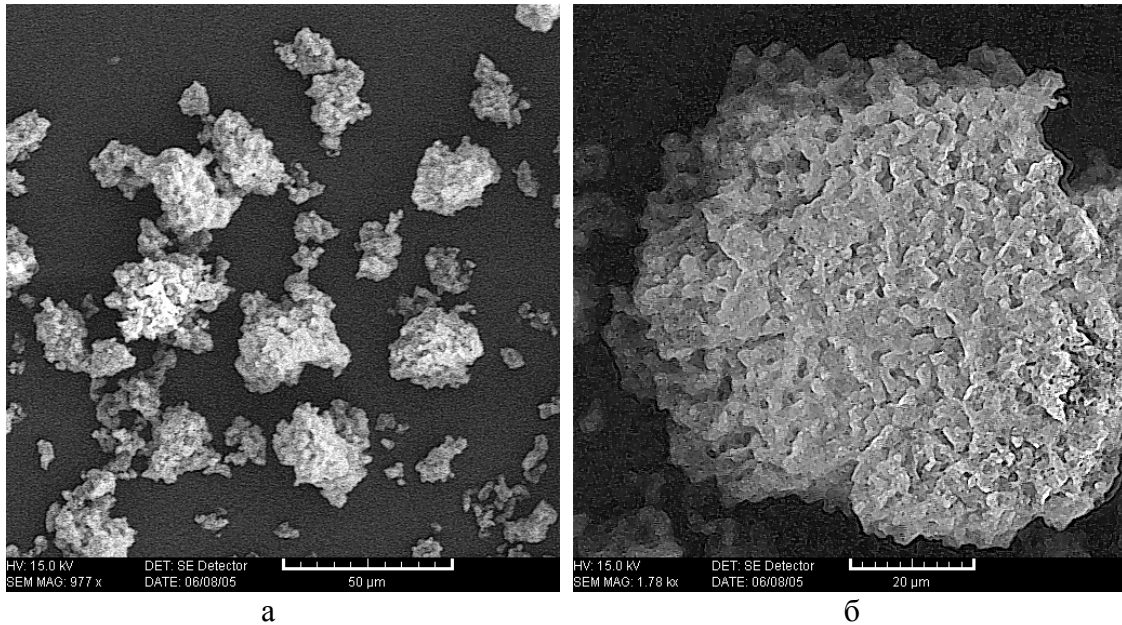


Рис. 1. Одержані за допомогою СЕМ мікрофотографії ксерогеля, що містять 3-меркаптопропільні функціональні групи: а – 1100х; б – 2000х.

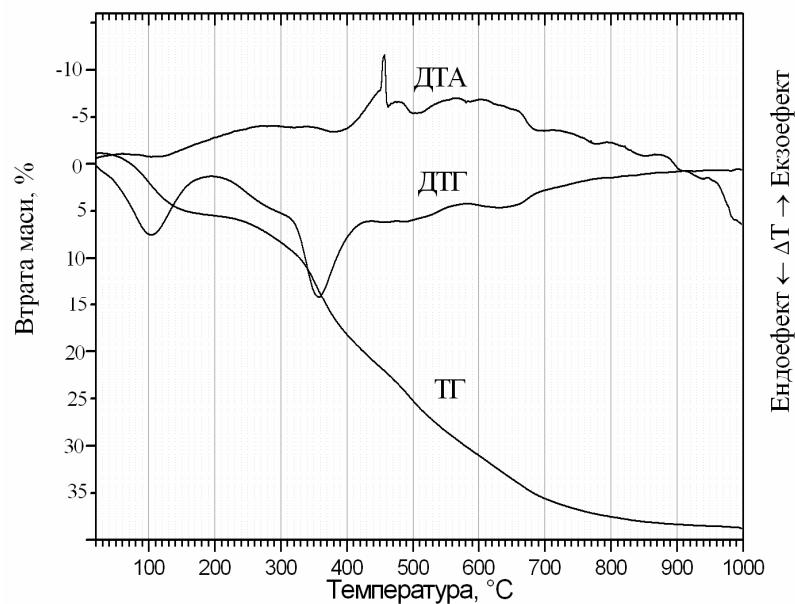


Рис. 2. Термоаналітичні криві для синтезованої полі(3-меркаптопропіл)силоксанової матриці.

ІЧ спектри одержаного зразку ПМПС мають типовий для полісилоксанових ксерогелів вигляд (рис. 3). Так, в області $1000\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ його ІЧ спектра спостерігається найбільш інтенсивна смуга поглинання, характерна для валентних коливань зв'язків $\nu_{\text{as}}(\text{SiOSi})$. Поява цієї смуги поглинання свідчить про наявність в структурі зразка тривимірного полісилоксанового каркаса [32]. В області $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ чітко фіксуються три смуги поглинання при 2935 , 2894 і 2833 см^{-1} , які відповідають валентним коливанням зв'язків С–Н в пропільному ланцюжку та в залишкових етоксигрупах. Присутність цих угруповань проявляється в ІЧ спектрах також у вигляді чотирьох смуг поглинання в області $1350\text{--}1490\text{ см}^{-1}$ (рис. 3). Зазвичай, ці смуги мають низьку інтенсивність, однак при співвідношенні реагуючих алкоксиланів 1:1 вона помітно зростає (рис. 3).

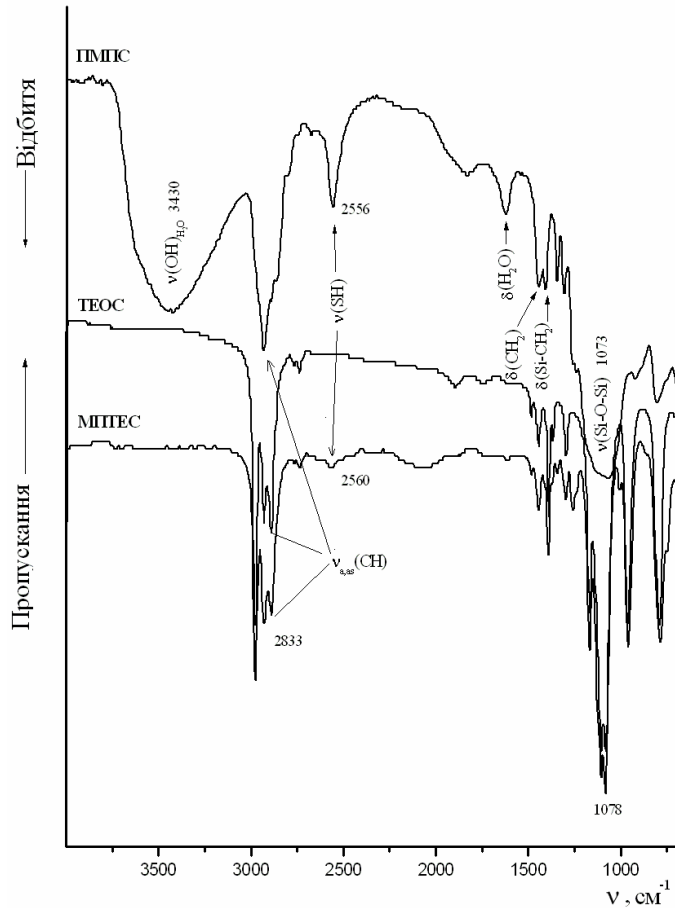


Рис. 3. ІЧ спектри вихідних алкоксиланів та синтезованої полі(3-меркаптопропільної) матриці (ПМПС).

Оскільки синтезований зразок згідно термічного аналізу містить воду, то при 1630 см^{-1} в ІЧ спектрі постерігається смуга поглинання, характерна для деформаційних коливань молекул H_2O , а вище 3000 см^{-1} – широка та інтенсивна смуга поглинання, обумовлена валентними коливаннями ОН-груп молекул води, які беруть участь в утворенні водневих зв'язків. В ІЧ спектрі також чітко фіксується смуга поглинання при 2556 см^{-1} , яка відноситься до $\nu(\text{S-H})$ меркаптогрупи, а при 685 см^{-1} спостерігається малоінтенсивна смуга поглинання, пов'язана з валентними коливаннями зв'язку C-SH .

ІЧ спектри всіх інших зразків аналогічні. Отже, за даними аналізу ІЧ спектрів синтезованих зразків можна зробити висновок, що вони містять полісилоксановий каркас, а в поверхневому шарі – функціональні групи (3-меркаптопропільні), які вводилися під час синтезу, та молекули води.

Одержані полі(3-меркаптопропіл)силоксанові зразки були досліджені структурно-адсорбційним методом. Встановлено, що вони не мають розвинутої поруватої структури – їх питома поверхня складає $\approx 13\text{ м}^2/\text{г}$, тобто вони є практично непористими. На підставі цього можна припустити, що більшість функціональних груп знаходиться на поверхні утворених сферичних частинок.

Результати іммобілізації уреазі, представлені на рис. 4, свідчать, що шляхом адсорбції та ковалентного зв'язування фіксується приблизно однакова кількість ферменту (46% та 35% відповідно). Дещо нижча величина іммобілізації уреазі шляхом ковалентного зв'язування обумовлена, досить імовірно, стеричними перешкодами, що виникають після утворення дисульфідних ковалентних зв'язків. В той же час величина

іммобілізації урези шляхом її вбудування практично вдвічі вища (88%). Високий рівень зв'язування при використанні цього методу можна пояснити тим, що фермент під час синтезу матриці фіксується як при формуванні її первинних полісилоксанових частинок (глобул), так і при формуванні агрегатів глобул, з яких він вже не може бути вимитий. При цьому збереження активності вбудованої урези сягає 55%, тобто теж практично вдвічі вище, ніж при адсорбції чи ковалентному зв'язуванні.



Рис. 4. Порівняльна характеристика методів іммобілізації урези на полі(3-меркаптопропіл)силоксановій матриці.

Оскільки полі(3-меркаптопропіл)силоксанова матриця з вбудованою уреазою показала кращі результати, було вивчено вплив часу її зберігання (при 4°C) на величину активності іммобілізованої таким чином урези. Як видно з рис. 5, протягом перших 20 діб зберігання зразка активність іммобілізованої урези суттєво знизилася (приблизно у два рази). Цей факт можна пояснити тим, що протягом цього часу завершуються процеси формування матриці (з утворенням нових силоксанових зв'язків), її скелет стає більш жорстким. Наслідком цього є конформаційні зміни у певній частини глобул урези і навіть їх недоступність для субстрату. При подальшому зберіганні активність ферменту стабілізується на рівні 30% активності вихідного ферменту (рис. 5). Зазначимо, що збереження активності урези, вбудованої в мезопоруваті ксерогелі, не перевищує 1% [12].

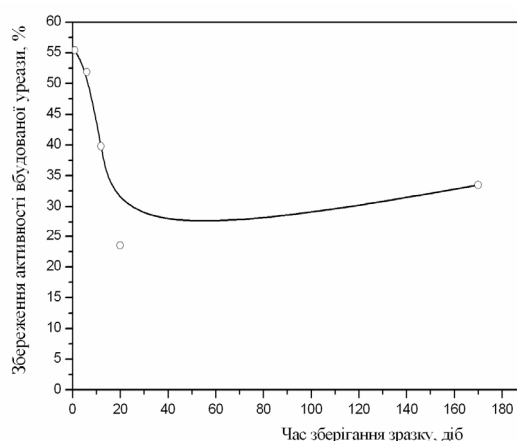


Рис. 5. Залежність збереження активності вбудованої урези від часу зберігання полі(3-меркаптопропіл)силоксанової матриці.

Отже, найефективніша іммобілізація урези здійснюється методом вбудування. Очевидним є і той факт, що, використовуючи метод вбудування, можна в значній мірі скоротити час на здійснення іммобілізації, оскільки вбудування

передбачає одностадійність процесу. До того ж вказаний метод дозволяє обходитися без дорогих реагентів, необхідних при ковалентних методах іммобілізації ферментів.

Висновки

Показано, що використання під час реакції гідролітичної співполіконденсації вихідних алкоксисиланів (ТЕОС та МПТЕС) співвідношення 1:1 (мол.) веде до утворення непористої матриці. Згідно даних скануючої електронової мікроскопії така матриця утворена агломератами частинок, які близькі по формі до сферичних, мають розмір $\approx 3,0\text{--}4,0$ мкм і сильно зрослися. Методом ІЧ спектроскопії встановлено присутність в цих частинках полісилоксанового каркасу з прикріпленими до нього 3-меркаптопропільними групами. Вивчено вплив іммобілізації уреазы методом адсорбції, ковалентного зв'язування та вбудування на ступінь її зв'язування та збереження активності. Показано, що найефективнішим методом іммобілізації ферменту є його вбудування під час синтезу полісилоксанової матриці. При цьому ступінь зв'язування ферменту сягає 88%, а збереження його активності – 55%. Уреаза, іммобілізована методом вбудування, зберігає свою активність на рівні 30 % протягом 170 діб.

Література

1. Braun S., Rappoport S., Zusman R., Avnir D., Ottolenghi M. Biochemically active sol-gel glasses. The trapping of enzymes // *Mater. Lett.* – 1990. – V. 10. – P. 1–8.
2. Ellerby L.M., Nishida C.R., Nishida F. Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method // *Science.* – 1992. – V. 255. – P. 1113–1115.
3. Alvarez G.S., Desimone M.F., Diaz L.E. Immobilization of bacteria in silica matrices using citric acid in the sol-gel process // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – V. 73. – P. 1059–1064.
4. Desimone M.F., De Marzi M.C., Copello G.J., Fernandez M.M., Malchiodi E.L., Diaz L.E. Efficient preservation in a silicon oxide matrix of *Escherichia coli*, producer of recombinant proteins // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – V. 68. – P. 747–752.
5. Bond R., McAuliff J.C. Silicon biotechnology: new opportunities for carbohydrate science // *Aust. J. Chem.* – 2003. – V. 56. – P. 7–11.
6. Sumper M., Kroger N. The biochemistry of silica polyamines and silaffins // *J. Mater. Chem.* – 2004. – V. 14. – P. 2059–2065.
7. Lopez P.J., Gautierb C., Livage J., Coradin T. Mimicking biogenic silica nanostructures formation // *Curr. Nanosci.* – 2005. – V. 1. – P. 73–83.
8. Ribot F., Sanchez C. Organically functionalized metallic oxo-clusters: structurally well-defined nanobuilding blocks for the design of hybrid organic-inorganic materials // *Comm. Inorg. Chem.* – 1999. – V. 20, N 4–6. – P. 327–371.
9. Laine R.M. Nanobuilding blocks based on the $[\text{OSiO}_{1.5}]_x$ ($x = 6, 8, 10$) octasilsesquioxanes // *J. Mater. Chem.* – 2005. – V. 15. – P. 3725–3744.
10. Avnir D., Coradin T., Lev O., Livage J. Recent bio-applications of sol-gel materials // *J. Mater. Chem.* – 2006. – V. 16. – P. 1013–1030.
11. Coradin T., Boissiere M., Livage J. Sol-gel chemistry in medicinal science // *Curr. Med. Chem.* – 2006. – V. 13. – P. 99–108.
12. Погорілий Р.П., Гончарик В.П., Юрченко Г.Р. Іммобілізація уреазы на функціоналізованих полісилоксанових ксерогелях і гідрогелях, одержаних золь-гель методом // *Вопросы химии и хим. технологии.* – 2005. – № 6. – С. 103–106.

13. Kandimalla V.B., Tripathi V.S., Ju H. Immobilization of biomolecules in sol-gels: biological and analytical applications // *Crit. Rev. Anal. Chem.* – 2006. – V. 36. – P. 73–106.
14. Takahashi H., Li B., Sasaki T., Miyazaki C., Kajino T., Inagaki S. Immobilized enzymes in ordered mesoporous silica materials and improvement of their stability and catalytic activity in an organic solvent // *Microporous Mesoporous Mater.* – 2001. – V. 44–45. – P. 755–62.
15. Погорілий Р.П., Гончарик В.П., Кожара Л.І., Зуб Ю.Л., Чуйко О.О. Порівняльна характеристика активності уреазы, включеної в полісилоксанові гідрогелі та ксерогелі, одержані золь-гель методом // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – Т. 78, № 1. – С. 94–101.
16. Soldatkin A.P., Montoriol J., Sant W., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. A novel urea sensitive biosensor with extended dynamic range based on recombinant urease and ISFETs // *Biosens. Bioelectron.* – 2003. – V. 19. – P. 131–135.
17. Lakard B., Herlem G., Lakard S., Antoniou A., Fahys B. Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – V. 19. – P. 1641–1647.
18. Mizutani F., Yabuki S., Sato Y. Voltammetric Enzyme Sensor for Urea Using Mercaptohydroquinone-Modified Gold Electrode as the Base Transducer // *Biosens. Bioelectron.* – 1997. – V. 12. – P. 321–328.
19. Luo Y.C., Do J.S. Urea biosensor based on PANi(urease)-Nation (R)/Au composite electrode // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – V. 20. – P. 15–23.
20. Lee W.Y., Kim S.R., Kim T.H., Lee K.S., Shin M.C., Park J.K. Sol-gel-derived thick-film conductometric biosensor for urea determination in serum // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – V. 404. – P. 195–203.
21. Sanchez C., Julian B., Belleville P., Popall M. Applications of hybrid organic-inorganic nanocomposites // *J. Mater. Chem.* – 2005. – V. 15. – P. 3559–3592.
22. Kuncova G., Podrazky O., Ripp S., Trogl J., Saylor G., Demnerova K., Vankova R. Monitoring of the Viability of Cells Immobilized by Sol-Gel Process // *J. Sol-Gel Sci. Technol.* – 2004. – V. 31. – P. 335–342.
23. Eggers D.K., Valentine J.S. Molecular confinement influences protein structure and enhances thermal protein stability // *Protein Sci.* – 2001. – V. 10. – P. 250–261.
24. Frenkel-Mullerad H., Avnir D. Sol-gel materials as efficient enzyme protectors: preserving the activity of phosphatases under extreme pH conditions // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127. – P. 8077–8081.
25. Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi, M. Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials // *Chem. Mater.* – 1994. – V. 6. – P. 1605–1614.
26. Погорилый Р.П., Гончарик В.П., Кожара Л.І., Зуб Ю.Л. Ковалентная иммобилизация уреазы на полисилоксановых матрицах, содержащих 3-аминопропильные и 3-меркаптопропильные группы // *Прикл. биохимия и микробиология.* – 2008. – Т. 44, № 6. – С. 621–625.
27. P. A. Karplus, M.A. Pearson, R.P. Hausinger. 70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned? // *Acc. Chem. Res.* – 1997. – V. 30. – P. 330–337.
28. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – Москва: Химия, 1984. – 330 с.
29. Brunauer J.S., Emmet P.H., Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1938. – V. 60. – P. 309–319.
30. Corriu R.J.P., Perz R., Reye C. Activation of silicon-hydrogen, silicon-oxygen, silicon-nitrogen bonds in heterogeneous phase : some new methods in organic synthesis // *Tetrahedron.* – 1983. – V. 39. – P. 999–1009.

31. Добрянська Г.И., Мельник И.В., Зуб Ю.Л. Влияние соотношения $\text{Si}(\text{O}_2\text{H}_5)_4/(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{SH}$ на структурно-адсорбционные характеристики образующихся ксерогелей и доступность функциональных групп в их поверхностном слое // Журн. физ. химии. – 2006. – Т. 80, № 6. – С. 1–7.
32. Финн Л.П., Слиякова И.Б. Строение и термодеструкция ксерогелей полиорганосилоксанов по данным ИК-спектров // Коллоид. журн. – 1975. – Т. 37, № 4. – С. 723–729.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ УРЕАЗЫ НА ПОЛИ(3-МЕРКАПТОПРОПИЛ)СИЛОКСАНОВЫХ НОСИТЕЛЯХ

Р.П. Погорелый, В.П. Гончарик, Ю.Л. Зуб

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко, Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина*

С использованием золь-гель метода, путем совместного гидролиза тетраэтоксисилана и 3-меркаптопропилтриэтоксисилана, синтезировано поли(3-меркаптопропил)силоксановый ксерогель и показано, что при соотношении исходных алкоксисиланов 1:1 он является практически непористым. Изучено влияние иммобилизации уреазы на таком носителе методами адсорбции, ковалентного связывания и встраивания (во время протекания реакции гидролитической поликонденсации) на степень ее связывания и сохранения активности. Установлено, что самый высокий уровень связывания (88%) и сохранения активности (55%) наблюдается при иммобилизации уреазы путем встраивания. Уреаза, иммобилизованная этим методом, сохраняет свою активность на уровне 30% на протяжении 170 суток.

IMMOBILIZATION OF UREASE ON POLY(3-MERCAPTOPROPYL)SILOXANE CARRIERS

R.P. Pogoriliy, V.P. Goncharik, Yu.L. Zub

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine*

Sol-gel method was used to synthesize poly(3-mercaptopropyl)siloxane xerogels due to co-hydrolysis of tetraethoxysilane and 3-mercaptopropyltriethoxysilane. When the ratio of initial reagents was 1:1, nonporous matrixes with high content of functional groups in the surface layer were formed. Composition, structure, and structural-adsorption characteristics of the synthesized materials were studied. Silicas functionalized with 3-mercaptopropyl groups were used to study urease immobilization by adsorption, covalent binding, and incorporation in polysiloxane network during synthesis. The highest levels of immobilization (91 %) and activity retention (55 %) were observed when urease was incorporated into network during synthesis. Urease immobilized by this method retains its activity at 30% for 170 days.