

ІММОБІЛІЗАЦІЯ УРЕАЗИ НА СФЕРИЧНИХ ПОЛІСИЛОКСАНОВИХ НОСІЯХ З БІФУНКЦІОНАЛЬНИМ ПОВЕРХНЕВИМ ШАРОМ

Р.П. Погорілий, І.В. Мельник, Ю.Л. Зуб

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, pogorilyi_r@ukr.net*

З використанням реакції гідролітичної співполіконденсації тетраетоксисилану, 3-амінопропілтриетоксисилану та метилтриетоксисилану синтезовано біфункціональні кремнеземні мікросфери. На поверхні одержаних носіїв шляхом адсорбції іммобілізовано уреазу. Крім того, з метою порівняння уреазу іммобілізовано також і методом включення під час перебігу реакції гідролітичної поліконденсації алкоксисиланів. Встановлено, що найвищий ступінь зв'язування (99%) та збереження активності (18%) спостерігається при іммобілізації уреазу шляхом включення.

Вступ

Постійно зростаючі потреби використання іммобілізованих ферментів у біокаталізі та біотехнологіях, а також виробництво нових лікарських препаратів викликають підвищений інтерес до досліджень в цій області [1–4]. Основною метою цих досліджень є розробка більш досконалих та високопродуктивних виробничих процесів із спрощеним відділенням продуктів реакції від біокатализатора для його повторного використання [5]. Повторне використання ферменту забезпечує ряд переваг, зокрема скорочення витрат, що вкрай важливо для створення економічно вигідних біокаталітичних процесів. Такі дослідження спрямовані також на підвищення активності, специфічності та стабільності іммобілізованих ферментів [6 – 8]. Поряд з цим, досить важливим при фіксації ферменту на матриці є збереження високої стійкості до його вимивання та низьких дифузійних перешкод для молекул субстрату [9, 10].

Найчастіше іммобілізацію ферментів здійснюють шляхом їх ковалентного прищеплення до поверхні носія або включення в полімерну сітку матриці [11]. При цьому для збереження активності іммобілізованого ферменту необхідно зберігати структурну цілісність молекули ферменту та склад і розташування амінокислотних залишків в його активному центрі. Якщо амінокислотні залишки в активному центрі змінюють своє положення або відбувається суттєва деформація четвертинної структури білка, каталітична активність та специфічність ферменту може незворотно знизитися [12–14].

З цієї точки зору досить перспективними для іммобілізації ферментів є полісилоксанові матриці, які одержують за допомогою гідролітичного варіанту золь-гель методу. Зокрема, відносно низка вартість трифункціональних силанів надає можливість при формуванні полісилоксанового каркаса, що дозволяє створювати таке мікросередовище для зв'язаного ферменту, яке буде сприяти збереженню його біоактивності і не буде створювати дифузійних перешкод для продуктів ферментативного гідролізу. Крім того, шляхом варіювання співвідношення три-, ди- і монофункціональних силанів (прекурсорів) можна контролювати ступінь зшивки каркаса, а отже, і його жорсткість [15]. Додамо, що використання золь-гель методу дозволяє не тільки створювати поверхневий шар полісилоксанового носія необхідного складу та впливати на ступінь його гідрофобності, але й формувати носій з необхідною морфологією і необхідної форми. Все це дозволяє здійснювати ефективну

імобілізацію ферментів на полісилоксанових матрицях [16, 17]. Іншими словами, імобілізований фермент зберігає високу активність, тому кількість дорогого нативного ферменту, яка використовується для зв'язування, зводиться до мінімуму.

В цілому, зв'язування ферментів на поверхні визначається, в першу чергу, пористою структурою матриці та характером її поверхневого шару. Виникнення багатоточкового зв'язування ферменту носієм, як правило, забезпечує стабільність білкової структури ферменту [18–20]. В той же час фермент-субстратна спорідненість та швидкість реакції утворення проміжних комплексів в переважній більшості випадків зменшуються, що по суті і призводить до зниження активності імобілізованого ферменту.

Серед великої кількості ферментів цікавим та важливим є фермент уреаза, яка каталізує гідролітичний розклад сечовини [21]. Біосенсори на основі цього ферменту широко застосовуються в медицині [22] для контролю рівня сечовини в крові, оскільки він є важливою характеристикою при діагностиці функції нирок. Наприклад, нормальний рівень сечовини в сироватці крові складає 1,7–8,3 мМ, однак якщо цей рівень підвищується до 100 мМ, то це свідчить про патологічний стан організму [23]. Збільшення рівня сечовини в крові (та сечі) може бути наслідком ниркової недостатності, обструкції сечових шляхів, зневоднення, шоку, опіків та шлунково-кишкової кровотечі. Крім того, на рівень сечовини в сироватці крові впливає печінкова недостатність, нефротичний синдром і кахексія. Тому визначення вмісту сечовини в крові є важливим аналізом, що широко використовується в клінічних лабораторіях.

В [24] для імобілізації уреази було використано непористі мікросферичні полісилоксанові носії з тіольними групами, одержані реакцією гідролітичної співполіконденсації алкоксисиланів. Встановлено, що в цьому випадку спостерігається високий рівень збереження активності ферменту. Мета цієї роботи – встановлення впливу зміни природи функціональної групи в поверхневому шарі таких сферичних носіїв на ступінь зв'язування та збереження активності уреази. Як функціональні групи використано 3-амінопропільну та метильну.

Експериментальна частина

При синтезі функціоналізованих кремнеземних сфер використовувалися такі алкоксисилани: тетраетоксисилан, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (ТЕОС, Aldrich, 98 %); 3-амінопропілтриетоксисилан, $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ (АПТЕС, Aldrich, 99 %), метилтриетоксисилан, $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{SiCH}_3$, (МТЕС, 99%, Aldrich); 96%-ний етиловий спирт. Для імобілізації використовувалася уреаза з бобів сої активністю 35 од/мг, КФ 3.5.1.5 (Fluka). Окрім того, в роботі використовували 0,06 М фосфатний буфер (рН 7,0); 0,1 М розчин ЕДТА (трилон Б); 5 М розчин сечовини; реактив Несслера ($\text{K}_2[\text{HgI}_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ч.д.а.).

Методика синтезу кремнеземних мікросфер з монофункціональним поверхневим шаром (3-амінопропільні групи). 25 см³ фосфатного буферу змішували з 3 см³ ТЕОС (0,013 моль), після чого краплинами додавали 1 см³ АПТЕС (0,004 моль). Через 20 хв перемішування прозорий золь починав мутніти, а через 1 год утворювався білий осад. Його відділяли від маточного розчину центрифугуванням та промивали 5 разів 10 см³ етилового спирту. Одержаний зразок висушували у вакуумі при 110 °С протягом 6 год (зразок 1).

Методика синтезу кремнеземних мікросфер з біфункціональним поверхневим шаром (3-амінопропільні та метильні групи). На магнітній мішалці при постійному перемішуванні до 25 см³ фосфатного буфера додавали послідовно 3 см³ ТЕОС (0,013 моль) та 0,5 чи 1,0 см³ МТЕС (0,0025 та 0,005 моль відповідно), після чого краплинами додавали 1 см³ АПТЕС (0,004 моль). Через 20 хв перемішування золь починав мутніти,

а через 1 год перемішування утворювався білий осад. Його обробляли аналогічно вищеописаному (відповідно зразки 2 та 3).

Імобілізацію уреазу здійснювали методом включення (буферний розчин ферменту вводився в систему реагуючих алкоксисиланів під час синтезу матриці), а також методом класичної адсорбції.

Імобілізація уреазу під час одержання полісилоксанового носія. До 25 см³ фосфатного буферного розчину уреазу (концентрація ферменту – від 2% до 16%) додавали при перемішуванні 3 см³ (0,013 моль) ТЕОС, а потім до утвореної емульсії по додавали 1 см³ АПТЕС (0,004 моль). Через 20 хв перемішування прозорий розчин починав мутніти, а через 1 год перемішування утворювався білий осад. Для видалення не зв'язаного з носієм ферменту осад промивали 5 разів 5 см³ розчином фосфатного буферу рН=7.

Імобілізації уреазу шляхом адсорбції. Наважку носія (кремнеземні мікросфери з моно-чи біфункціональним поверхневим шаром) масою 10,0 мг заливали розчином уреазу в 2 см³ фосфатного буфера (концентрація ферменту становила 1,25% – 10%) та ЕДТА (при співвідношенні 9:1) та залишили на 12 год в холодильнику. Потім осад відділяли від розчину і промивали його 5 разів 5 см³ фосфатного буфера.

Визначення величини зв'язування уреазу та збереження її активності. В усіх випадках кількість зв'язаного ферменту визначали за різницею уреазу, взятої для іммобілізації та знайденої в промивних розчинах. Вміст уреазу в промивних розчинах розраховували на основі її активності, виходячи з величини питомої активності нативного ферменту.

Ферментативну активність іммобілізованої уреазу та уреазу в промивних водах визначали за швидкістю утворення аміаку в реакції гідролізу сечовини при 25°C [25]. У всіх випадках при визначенні активності брали середнє значення трьох паралельних дослідів, найбільша різниця між якими не перевищувала 10%. Похибка визначення активності уреазу з урахуванням коефіцієнта Стьюдента при надійній імовірності 0,95 не перевищує 10%.

Визначення вмісту 3-амінопропільних груп в синтезованих носіях. Вміст аміногруп визначали за методикою, описаною Парішем [26]. В її основі лежить встановлення кількості протонів, поглинутих аміногрупами після витримання наважки сорбенту (0,1 г) в надмірі 0,1 М розчину НСІ (при періодичному перемішуванні) до встановлення рівноваги. Час встановлення рівноваги становив 24 год. Надмір хлористоводневої кислоти визначався титруванням (0,1 М розчин NaOH, індикатор – метилоранж).

Термічну стійкість синтезованих зразків вивчали на дериватографі MOM Q-1500 в температурному інтервалі 20 –1000°C з швидкістю нагрівання 10°C /хв.

Мікрофотографії зразків отримували за допомогою скануючого електронного мікроскопа JSM 6060 LA (Jeol, Japan) в режимі вторинних електронів при прискорюючій напрузі 30 кВ. Зразки монтувалися на поверхні предметного столика з попередньо нанесеним адгезивним покриттям. Для запобігання накопичення поверхневого заряду та отримання контрастного зображення на поверхню зразків у вакуумі наносили тонкий суцільний шар золота методом катодного розпилення.

ІЧ-спектри відбиття записували на спектрометрі Thermo Nicolet Nexus FTIR з використанням приставок дифузного відбиття та термовакуумної приставки "SMART Collector" в області 4000 – 400 см⁻¹ при роздільній здатності 8 см⁻¹.

Низькотемпературні ізотерми адсорбції-десорбції азоту для синтезованих зразків отримували з допомогою приладу "Kelvin-1042". Зразки попередньо дегазували в струмені гелію при 110°C впродовж 2 год. Питому поверхню визначали методом БЕТ.

Сорбційний об'єм пор (V_c) визначався за об'ємом N_2 , сорбованого при відносному тиску 0.99.

Результати та їх обговорення

Для синтезу функціоналізованих кремнеземних мікросфер використовували відому реакцію гідролітичної співполіконденсації ТЕОС і АПТЕС (або ТЕОС, АПТЕС та МТЕС), в якій каталізатором виступала аміногрупа АПТЕС. У випадку сфер з монофункціональним поверхневим шаром мольне співвідношення реагуючих алкоксисиланів ТЕОС/АПТЕС становило $\sim 3:1$, а у випадку сфер з біфункціональним поверхневим шаром співвідношення ТЕОС/АПТЕС/МТЕС становило $\sim 3:1:0,5$ (або 1). Для синтезованих матеріалів були одержані низькотемпературні ізотерми адсорбції-десорбції азоту. Виявилося, що за використаних умов синтезу утворюються практично непористі матеріали, в яких переважна більшість функціональних груп знаходиться на їх поверхні і є доступними [27–29]. Дійсно, концентрація аміногруп для зразка **1** становила 3,8 ммоль/г, що досить близько до вмісту, розрахованого із співвідношення реагуючих алкоксисиланів.

На рис. 1 представлено термоаналітичні криві для зразка, що містить 3-амінопропільні групи (1а), та зразка з включеною уреазою (1б). Зазначимо, що термоаналітичні криві для всіх інших синтезованих зразків мають подібний характер. Як видно з рис. 1, в області температур 90 – 112°C спостерігається ендотермічний ефект, який супроводжується невеликою втратою маси (2 – 4%). Це, скоріш за все, свідчить про видалення зі зразків адсорбованої води. Вище 280 – 310°C спостерігається екзотермічний ефект, викликаний деструкцією 3-амінопропільних груп, який має кілька екстремальних точок.

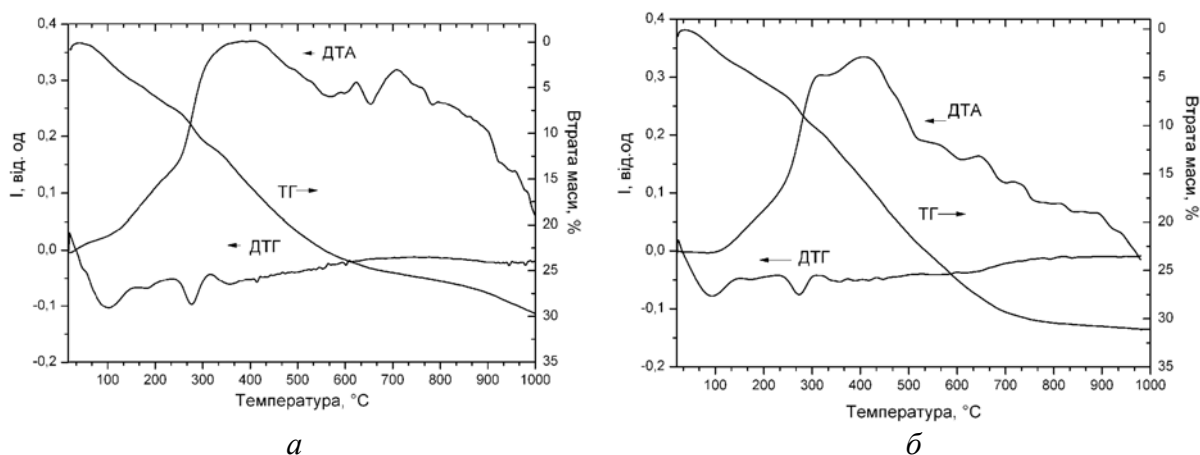


Рис. 1. Термоаналітичні криві для мікросфер з 3-амінопропільними групами (а) та такого ж зразка з вбудованою уреазою (б).

З ускладненням поверхневого шару кількість екстремальних точок зростає. Цей ефект, безумовно, пов'язаний з термічним розкладом (випалюванням) органічної складової зразків (та ферменту) і супроводжується втратою маси близько 30%. Оскільки нижня межа цього ефекту лежить при $\sim 280^\circ\text{C}$, можна зробити висновок щодо високої термічної стійкості поверхневого шару в одержаних матеріалах.

Присутність функціональних груп в синтезованих зразках також підтверджується даними ІЧ-спектроскопії. Зазначимо, що в ІЧ-спектрах всіх одержаних мікросфер (рис. 2) в області $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ спостерігається найбільш інтенсивна смуга поглинання з плечем у високочастотній області, яка належить валентним коливанням $\nu_{\text{as}}(\text{SiOSi})$ [30, 31]. Вона свідчить про наявність полісилоксанового каркаса. Присутність

в синтезованих зразках пропільного ланцюжка, пов'язаного з атомом кремнію, знаходить своє відображення в ІЧ-спектрах у вигляді групи смуг середньої інтенсивності в області $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, які характерні для валентних коливань $\nu_{s,as}(\text{CH})$, а також групи смуг поглинання слабкої інтенсивності в області $1300\text{--}1500\text{ см}^{-1}$, які відносяться, в першу чергу, до деформаційних коливань метиленової ланки (рис. 2).

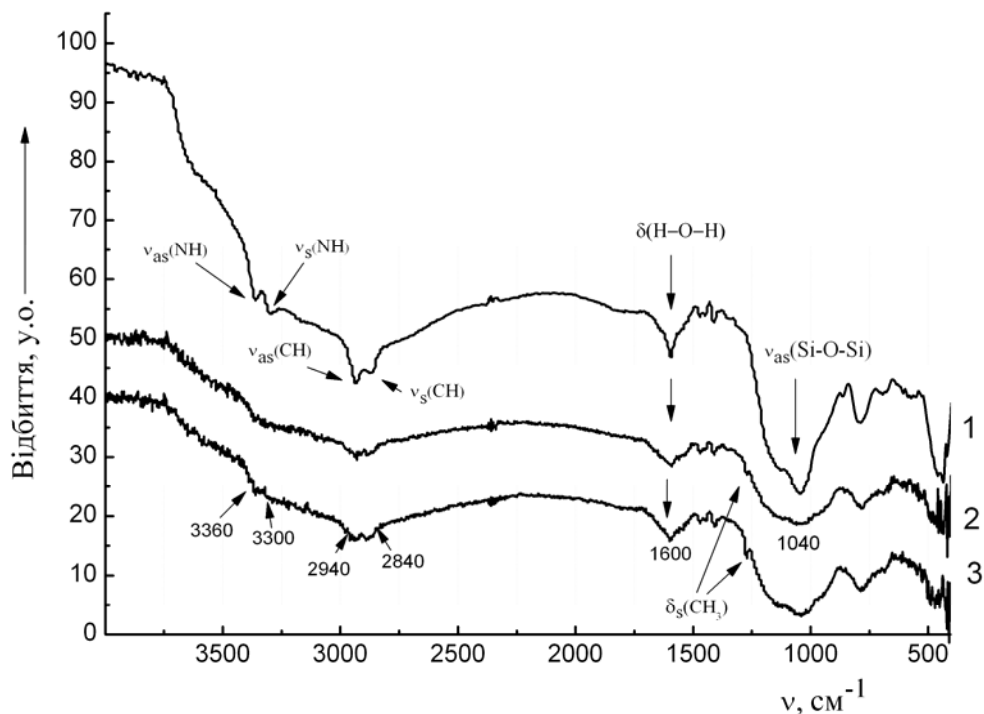


Рис. 2. ІЧ- спектри одержаних функціоналізованих кремнеземних мікросфер.

Смуга середньої інтенсивності при 1600 см^{-1} в ІЧ-спектрах одержаних зразків (рис. 2) належить деформаційному коливанню аміногрупи $\delta(\text{NH}_2)$ [32]. В ІЧ-спектрах всіх зразків також ідентифікуються дві слабоінтенсивні смуги поглинання при 3300 і 3360 см^{-1} , які відносяться до коливань $\nu_{s,as}(\text{NH})$ цих же груп. Слід зазначити, що в результаті вакуумної сушки синтезованих зразків з них була видалена практично вся сорбована вода – про це свідчить відсутність смуг поглинання як при 1630 см^{-1} , так і в області вище 3400 см^{-1} . Цей висновок узгоджується з даними термогравіметрії (див. вище).

В ІЧ-спектрах зразків з біфункціональним поверхневим шаром (рис. 2, криві **2** та **3**), що містять, окрім 3-амінопропільних, ще й метильні групи, які зв'язані безпосередньо з атомом кремнію, ідентифікується гостра смуга поглинання при 1280 см^{-1} , яку можна віднести до деформаційних коливань $\delta_s(\text{CH}_3)$ метильної групи. Отже, аналіз ІЧ-спектрів вказує, що синтезовані мікросфери містять полісилоксановий каркас, до якого прикріпленні функціональні групи, що під час синтезу вводилися трифункціональними силанами.

На рис. 3 представлені фотографії синтезованих зразків, одержані за допомогою СЕМ. З них видно, що у більшості випадків за запропонованих умов синтезу утворюються частинки, які за своєю формою нагадують сфери.

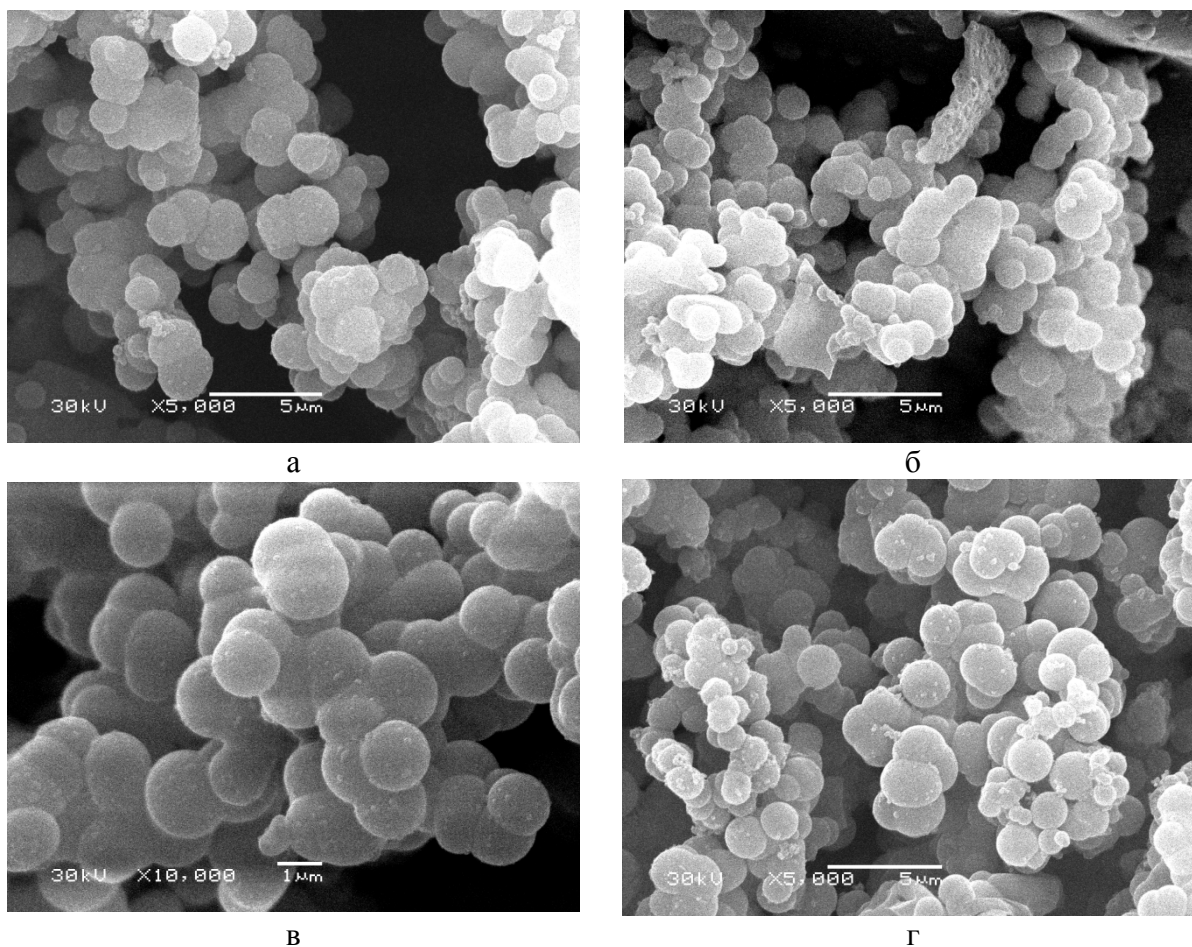


Рис. 3. Мікрофотографії кремнеземних мікросфер, одержані за допомогою СЕМ: а – зразок 1; б – зразок 1 з включеною уреазою; в – зразок 2; г – зразок 3.

Хоча утворені частинки не є монодисперсними, їх розміри відрізняються несуттєво. Особливо це характерно для зразка, синтезованого при співвідношенні $\text{TEOS}/\text{АПТЕС}/\text{МТЕС} = \sim 3:1:0,5$ (рис. 3в); розмір його частинок знаходиться в межах 1,2 – 1,5 мкм. На рис. 3б наведено мікрофотографію зразка з 3-амінопропільною групою, що містить включену уреазу. Як видно, присутність уреазу суттєво не впливає на морфологію зразка. Розмір мікросфер також не змінюється. Однак, вочевидь, є незначна домішка частинок, які відрізняються по формі від сферичної. При порівнянні мікрофотографій зразків на рис. 3в та 3г, можна зробити висновок, що з підвищенням вмісту метильних груп кількість частинок, які зрослися між собою, стає меншою і з'являється їх фракція меншого розміру (0,3-0,5 мкм). Цей факт можна пояснити збільшенням в поверхневому шарі частинок складової з гідрофобним характером.

На рис. 4 представлена залежність між кількістю уреазу, взятої для іммобілізації, і кількістю включеної в матрицю уреазу. Вочевидь, фермент практично повністю (на 99%) і незворотно зв'язується полісилоксановим каркасом. З рис. 4 також видно, що навіть при високих концентраціях в розчині уреазу, взятої для включення в полісилоксановий каркас, не вдається досягти виходу ізотерми на плато. Однак збереження активності включеної в полі(3-амінопропіл)силоксанові сфери уреазу спостерігається на рівні 18% від активності взятого ферменту (див рис. 7). Це в декілька разів менше у порівнянні з уреазою, включеною до полі(3-меркаптопропіл)силоксанових сфер [33].

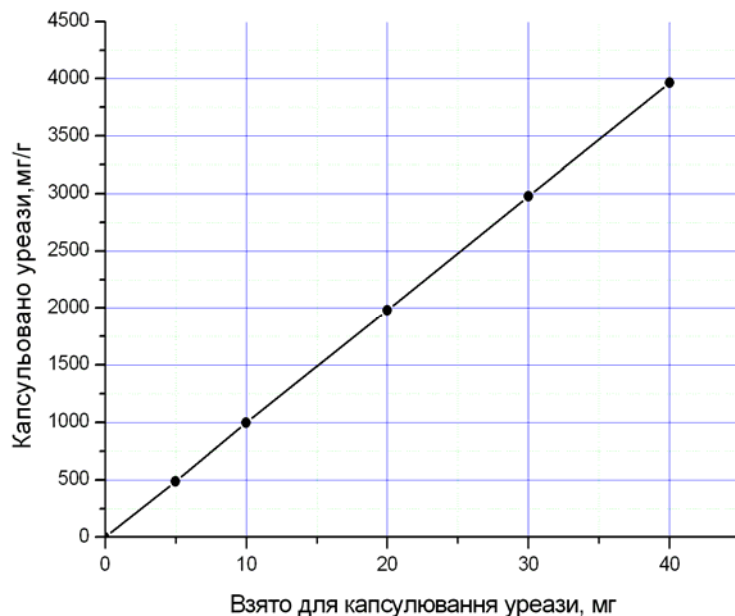


Рис. 4. Залежність між кількістю уреазі, взятої для іммобілізації, і кількістю уреазі, включеної в полі(3-амінопропіл)силоксанову матрицю.

Раніше нами було показано [33], що полісилоксановим матрицям з аміновмісним поверхневим шаром притаманна висока спорідненість до зв'язування уреазі, обумовлена, в першу чергу, утворенням іонних зв'язків між позитивно зарядженою аміногрупою носія та боковими, негативно зарядженими групами ферменту. Отже, можна припустити, що при включенні уреазі в полі(3-амінопропіл)силоксанові сфери спостерігається подвійний ефект: фермент зв'язується як за рахунок взаємодії з полісилоксановими ланцюгами, так і за рахунок іонних зв'язків (в останньому випадку це проблематично в присутності 3-меркаптопропільних груп, які є досить слабкою кислотою). А при сильнішій взаємодії ферменту з іммобілізуючою матрицею слід очікувати більшої втрати активності зв'язаного ферменту внаслідок обмеження конформаційної рухливості білкової молекули, що негативно впливає на роботу його активного центру.

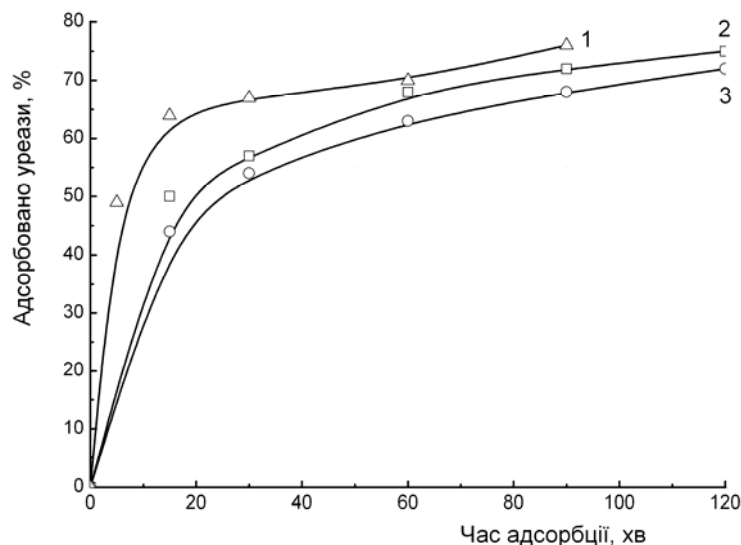


Рис. 5. Кінетика адсорбції уреазі на синтезованих зразках з моно- (зразок 1) та біфункціональним поверхневим шаром (зразки 2 і 3).

Для оцінки білокзв'язуючих властивостей синтезованих зразків була вивчена кінетика адсорбції ними уреазу (рис. 5). З нього видно, що переважна кількість ферменту (65%) адсорбується вже протягом перших 15 хв, хоча адсорбційна рівновага досягається протягом 90 хв. Різкий підйом кінетичної кривої в перші хвилини адсорбції підтверджує факт високої спорідненості поліаміносилоксанових зразків до уреазу. Введення в поверхневий шар додатково метильних груп призводить до деякого уповільнення адсорбції та зниження її величини за однаковий час адсорбції у порівнянні зі зразком **1**, що несе тільки 3-амінопропільні групи.

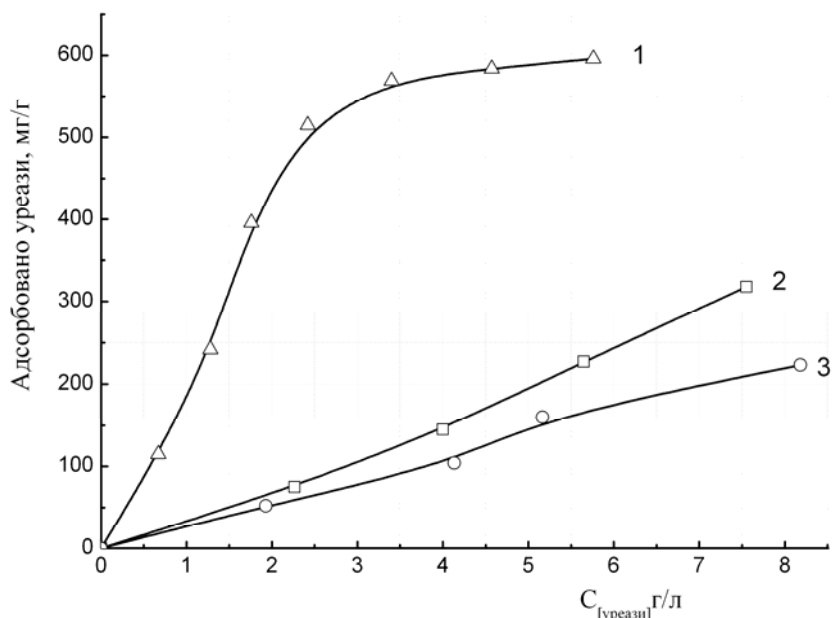


Рис. 6. Ізотерми адсорбції уреазу з моно- (зразок **1**) та біфункціональним поверхневим шаром (зразки **2** і **3**).

На рис. 6 представлені ізотерми надлишкової адсорбції уреазу з буферного розчину мікросферами синтезованих зразків. За формою ізотерми відрізняються, що обумовлено різним складом поверхневого шару і дещо різним характером взаємодії адсорбат – адсорбент. Ізотерма для зразка **1**, що несе в поверхневому шарі тільки 3-амінопропільні групи, має типовий вигляд і відноситься до ленгмюровського типу [33]. Ця ізотерма адсорбції має досить різкий підйом при низьких концентраціях уреазу у вихідному розчині, що може свідчити про сильну взаємодію адсорбент – адсорбат. При подальшому збільшенні концентрації уреазу в розчині спостерігався вихід кривих на плато. Вважають, що ізотерми такої форми спостерігаються тоді, коли при адсорбції немає сильної конкуренції молекул розчинника або коли між адсорбуючими молекулами існує сильна взаємодія [34]. Можливо, в нашому випадку вплив мають обидва ці чинники.

Уреаза – це фермент з високою молекулярною масою, який за рахунок численних зв'язків між функціональними групами знаходиться у водних розчинах у вигляді значних за розмірами асоціатів. Тому слід очікувати багатоточкову адсорбцію, при якій конкуренція молекул води буде незначною. У випадку зразків з гідрофобними (метильними) групами в поверхневому шарі кремнеземних мікросфер (зразки **2** і **3**) спостерігається зниження величини адсорбції уреазу, а форма ізотерм для таких зразків набуває лінійного характеру: величина адсорбції прямо пропорційна концентрації взятої для адсорбції уреазу (рис. 6). Більше того, для зразка **3**, який має більш високий вміст алкільних груп, при зростанні рівноважної концентрації уреазу в розчині спостерігається менше її зв'язування у порівнянні зі зразком **2** (рис. 6).

На рис. 7 для порівняння представлено рівень збереження активності іммобілізованої уреазы в залежності від способу фіксації ферменту (при іммобілізації використовувалася однакова кількість ферменту). Як вказувалося вище, включення уреазы призводить до незворотної фіксації ферменту, проте саме в такому випадку її активність зберігається краще. З рис. 7 також видно, що методом включення вдається зв'язати набагато більше ферменту (втричі), ніж методом адсорбції. Цим, вочевидь, пояснюється вища активність препаратів з включеною уреазою у порівнянні з адсорбованою. Проте зроблений перерахунок активності на одиницю зв'язаного ферменту показує, що дані по активності адсорбованої уреазы приблизно в два рази вищі, ніж включеної.



Рис. 7. Вплив способу іммобілізації уреазы на рівень збереження активності зв'язаного ферменту та величину його зв'язування.

При введенні в поверхневий шар кремнеземних мікросфер поряд з 3-амінопропільною групою метильної рівень зв'язування ферменту зберігається (рис. 8). Однак спостерігається зниження активності включеної уреазы від 18 до 10%. Ця тенденція зберігається і при зростанні кількості метильних груп в поверхневому шарі зразка (рис. 8, зразок 2). Такий вплив на активність гідрофільного ферменту можна пояснити гідрофобним характером метильної групи. Вочевидь, відбувається уповільнення кінетики ферментативного гідролізу сечовини внаслідок погіршення змочування іммобілізованого ферментного препарату водою.

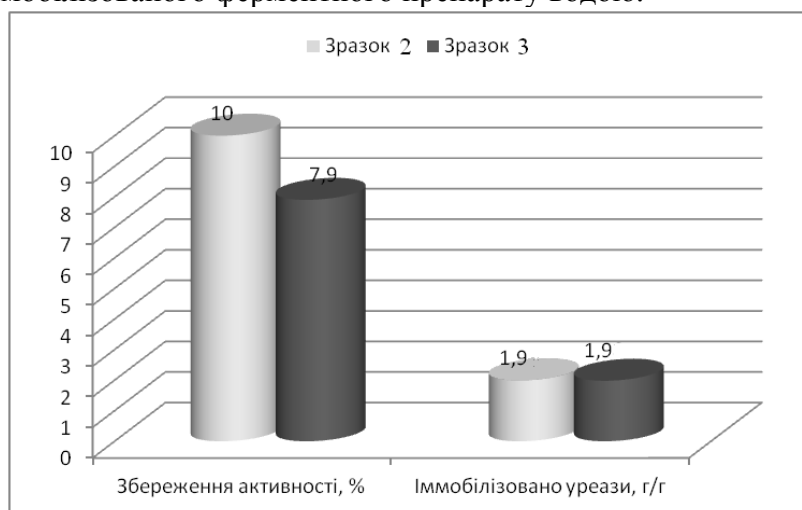


Рис. 8. Вплив гідрофобності на величину збереження активності зв'язаного ферменту та величину його зв'язування.

Висновки

Реакція гідролітичної співполіконденсації ТЕОС і АПТЕС (та МТЕС) при співвідношенні реагуючих компонентів 3:1 (або 3:1:0.5 чи 3:1:1) дозволяє одностадійно синтезувати кремнеземні мікросфери (розміром 1.2-1.5 мкм) з моно- чи біфункціональним поверхневим шаром. Вміст 3-амінопропільних груп в таких мікросферах знаходиться в межах 1,2–3,8 ммоль/г. Показано, що під час перебігу реакції гідролітичної поліконденсації можливе включення уреази в полісилоксановий каркас мікросфер. При цьому спостерігається практично повне зв'язування ферменту.

Встановлено, що як включена в кремнеземні мікросфери уреаза, так і сорбована на їх поверхні проявляє ферментативну активність. Однак рівень збереження активності включеного ферменту сягає тільки 18%, а при введенні в поверхневий шар метильних груп він зменшується практично удвічі. Адсорбована уреаза проявляє ще менший рівень збереження активності. Однак при перерахунку активності на одиницю зв'язаного ферменту активність адсорбованої уреази вища приблизно удвічі у порівнянні з включеною.

Література

1. Zhai R., Zhang B., Liu L., Xie Y., Zhang H., Liu J. Immobilization of enzyme biocatalyst on natural halloysite nanotubes // *Catalysis Communications*. – 2010. – V. 12. – P. 259–263.
2. Betancor L., Luckarift H.R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis // *Trends Biotechnol.* – 2008. – V. 26. – P. 566–572.
3. Theron J., Walker J.A., Cloete T.E. Nanotechnology and water treatment: applications and emerging opportunities // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2008. – V. 34. – P. 43–69.
4. Rusmini F., Zhong Z., Feijen J. Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips // *Biomacromolecules*. – 2007. – V. 8. – P. 1775–1789.
5. Kato K., Nakagaki Sh., Nishida M., Hirao K. Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol–gel reactions in ionic liquids // *Journal of the Ceramic Society of Japan*. – 2011. – V. 119(2). – P. 140–143.
6. Aim C., Coradin Th. Nanocomposites from biopolymer hydrogels: blueprints for white biotechnology and green materials chemistry // *Journal of polymer science part B: Polymer physics*. – 2012. – V. 50. – P. 669–680.
7. Parlak M., Ustek D., Tanriseven A. A novel method for covalent immobilization of dextranase // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2013. – V. 89. – P. 52– 60. Ruiz-Hitzky E., Aranda P., Darder M., Ogawa M. Hybrid and biohybrid silicate based materials: molecular vs. block-assembling bottom–up processes // *Chem. Soc. Rev.* – 2011. V. 40. – P. 801–828.
9. Ariga K., Vinu A., Yamauchi Y., Ji Q., Hill J.P. Nanoarchitectonics for mesoporous materials // *J. P. Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 2012. – V. 85. – P. 1–32.
10. Corici L.N., Frissen A.E., Zoelen D.J., Eggen I.F., Petera F., et al. Sol–gel immobilization of alcalase from bacillus licheniformis for application in the synthesis of C-terminal peptide amides // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2011. V. 73. – P. 90– 97.
11. Sahoo B., Sahu S.K., Pramanik P. A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2011. – V. 69. P. 95–102
12. Iler R.K. The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry. – New York: Wiley, 1979. – 896 p.
13. Koutsopoulos S., Patzsch K., Bosker W.T.E., Norde W. Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces // *Langmuir*. – 2007. V. 23. – P. 2000–2006.

14. Hossain K., Monreal C.M., Sayari A. Adsorption of urease on PE-MCM-41 and its catalytic effect on hydrolysis of urea // *Colloids Surf.* – 2008. – V. 62 (B). – P. 42–50.
15. Avnir D, Coradin T, Lev O, Livage J. Recent bio-applications of sol-gel materials // *J Mater Chem.* – 2006. V. 16. – P. 1013–1030.
16. Reetz M.T, Tielmann P, Wiesenhofer W, Konen W, Zonta A. Second generation sol-gel encapsulated lipases: robust heterogeneous biocatalysts // *Adv Synth Catal.* – 2003. – V. 345. – P. 717–28.
17. Погорілий Р.П., Гончарик В.П., Кожара Л.І., Зуб Ю.Л., Чуйко О.О. Порівняльна характеристика активності уреаз, включеної в полісилоксанові гідрогелі та ксерогелі, одержані золь-гель методом // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – Том. 78, № 1. – С. 94-101.
18. Gabrovska K., Georgieva A., Godjevargova T., Stoilova O., Manolova N. Poly(acrylonitrile) chitosan composite membranes for urease immobilization // *J. Biotechnol.* – 2007. – V. 129. – P. 674–680.
19. Yu A., Liang Z., Caruso F. Enzyme multilayer-modified porous membranes as biocatalysts // *Chem. Mater.* – 2005. V. 17. – P. 171–175.
20. Погорілий Р.П., Гончарик В.П., Кожара Л.І., Зуб Ю.Л. Вплив структурно-адсорбційних характеристик полісилоксанових матриць, що містять в поверхневому шарі 3-амінопропільні групи, на активність адсорбованої уреаз // *Поверхня.* – 2009. – Вип. 1(16). – С. 35 - 45.
21. Mobley H.L.T., Cortesia M.J., Rosenthal L.E., Jones B.D. Characterization of urease from *Campylobacter pylori* // *J. Clin. Microbiol.* 26 (1988) 831–836.
22. Gabrovska K., Ivanov J., Vasileva I., Dimova N., Godjevargova T. Immobilization of urease on nanostructured polymer membrane and preparation of urea amperometric biosensor // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2011. V. 48. – P. 620–626.
23. Rick W. *Klinische Chemie und Mikroskopie.* – Berlin: Springer Verlag, 1990. – pp. 245 – 247.
24. Погорілий Р.П., Гончарик В.П., Зуб Ю.Л., Імобілізація уреаз на полі(3-меркаптопропіл)силоксанових носіях // *Поверхность.* 2011. Вип. 3(18). С. 132–141.
25. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – 330 с.
26. Khatib I.S. and Parish R.V. Insoluble Ligands and Their Application. I.A Comparison of Silica-immobilized Ligands and Functionalized Polysiloxanes // *J. Organomet. Chem.* – 1989. – V. 369. – P. 9 – 16.
27. Добрянская Г.И., Мельник И.В., Зуб Ю.Л., Чуйко А.А., Барчак М., Дабровский А. Влияние соотношения $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4/(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{SH}$ на структурно-адсорбционные характеристики образующихся ксерогелей и доступность функциональных групп в их поверхностном слое // *Журнал физической химии.* – 2006. – Т. 80 №6. – С. 1071–1077.
28. Venton D.L., Gudipati E. Entrapment of enzymes using organo-functionalized polysiloxane copolymers // *Boichimica et biophysica acta.* – 1995. – V. 1250. – P. 117-125.
29. Melnyk I.V., Fatnassi M., Cacciaguerra T., Zub Yu.L., Alonso B. Spray-dried porous silica microspheres functionalised by phosphonic acid groups // *Microporous and Mesoporous Materials.* – 2012. – V. 152. – P. 172–177.
30. Daimay Lin-Vien, N.B. Colthup, W. G. Fateley, J.G. Grasselli. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules.* – London: Academic Press, 1991. – 503 p.
31. Смит А. *Прикладная ИК-спектроскопия,* – М.: Мир, 1982. – 328 с.
32. Giles C.H., MacEwan T.H., Nakhwa S.N. et al. *System of Classification of Solution*

- Adsorption Isotherms, and its Use in Diagnosis of Adsorption Mechanisms and in Measurement of Specific Surface Areas of Solids // J.Chem. Soc. – 1960. – No. 10. – P. 3973-3993.
33. Погорилый Р.П., Гончарик В.П., Кожара Л.И., Зуб Ю.Л. Ковалентная иммобилизация уреазы на полисилоксановых матрицах, содержащих 3-аминопропильные и 3-меркаптопропильные группы // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. – № 6. – С. 621 - 625.
34. Tsapikouni Th. S., Missirlis Y.F. Protein-material interactions: From micro-to-nano scale // Mat. Sci. Eng. BV. – 2008. – V. 152. – P. 2–7.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ УРЕАЗЫ НА СФЕРИЧЕСКИХ ПОЛИСИЛОКСАНОВЫХ НОСИТЕЛЯХ С БИФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ПОВЕРХНОСТНЫМ СЛОЕМ

Р.П. Погорилый, И.В. Мельник, Ю.Л. Зуб

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

С использованием реакции гидролитической поликонденсации (путем совместного гидролиза тетраэтоксисилана, 3-аминопропилтриэтоксисилана и метилтриэтоксисилана) синтезированы бифункциональные кремнеземные микросферы. На поверхности полученных носителей путем адсорбции иммобилизовано уреазу. Кроме того, с целью сравнения уреазу иммобилизовано также методом включения во время реакции гидролитической поликонденсации алкоксисиланов. Установлено, что высшая степень связывания (99%) и сохранение активности (18%) наблюдается при иммобилизации уреазы путем включения.

IMMOBILIZATION OF UREASE ON SPHERIC CARRIERS POLYSILOXANE WITH A BIFUNCTIONAL SURFACE LAYER

R.P. Pogorilyi, I.V. Melnyk, Yu.L. Zub

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

The reaction of hydrolytic co-polycondensation of tetraethoxysilane, 3-aminopropyltriethoxysilane and methyltriethoxysilane was used to synthesize bifunctional silica microspheres. Urease was immobilized on the surface of the obtained carriers via adsorption. In order to compare, urease was also immobilized by inclusion during the reaction of hydrolytic polycondensation of alkoxy silanes. It was determined that the highest degree of binding (99%) and residual activity (18%) are observed when urease is immobilized by inclusion.