

ВПЛИВ СТРУКТУРНО-АДСОРБЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОЛІСИЛОКСАНОВИХ МАТРИЦЬ, ЩО МІСТЯТЬ В ПОВЕРХНЕВОМУ ШАРІ 3-АМІНОПРОПІЛЬНІ ГРУПИ, НА АКТИВНІСТЬ АДСОРБОВАНОЇ УРЕАЗИ

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

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка, Національна академія наук України,
бул. Генерала Наумова 17, м. Київ 03164 Україна
e-mail: pogoriliy_roman@isc.gov.ua*

З використанням золь-гель методу синтезовано полі(3-амінопропіл)силоксанові ксерогелі з різним вмістом функціональних груп в поверхневому шарі та функціоналізовано 3-амінопропільными групами комерційно доступний силікагель типу "Davisil". Вивчено вплив концентрації 3-амінопропілтриетоксисилану на структурно-адсорбційні характеристики одержаних носіїв. Досліджено адсорбцію уреаз на функціоналізованих 3-амінопропільными групами кремнеземах. Встановлено чинники, що впливають на ступінь іммобілізації уреазы методом сорбції та її ферментативну активність.

Вступ

Іммобілізовані ферменти знаходять все більш широке практичне застосування, оскільки після виділення ферментів з живої клітини вдається зберегти в штучних умовах їх високу активність та селективність. До того ж іммобілізовані ферменти мають ряд переваг перед нативними, а саме: можливість їх повторного використання, в тому числі у циклічних процесах; простота сепарації від продуктів реакції тощо. Проте їх широке промислове використання гальмується зниженням активності препарату при тривалому зберіганні. Тому удосконаленню процесу іммобілізації та покращенню властивостей носія з метою подовження терміну використання біокатализатора приділяється значна увага. Це, в свою чергу, обумовлює зменшення вартості кінцевого продукту ферментативного каталізу [1].

В роботі [2] розглянуто шляхи удосконалення методу іммобілізації, які дозволяють зберегти активність та селективність ферменту. Одним з важливих чинників, що визначає величину зв'язування та збереження активності ферменту, є функціональне оточення іммобілізованої біомолекули [3]. Воно суттєво може впливати на структуру і динаміку білка [4]. Тому добір носія для іммобілізації ферменту – один з головних напрямів досліджень в цій області. З одного боку, носій повинен імітувати внутрішньоклітинне оточення біомолекули (гідрофобно-гідрофільне оточення, рН середовища тощо), а з іншого – відповідати вимогам промислового застосування (зручна форма, механічна стійкість, гідролітична стабільність тощо). Цим вимогам задовольняє досить обмежений перелік матеріалів, зокрема, функціоналізовані полісилоксанові матриці (ФПМ), які одержують з використанням золь-гель техніки. Ці матеріали знаходять все більше застосування в практиці [5], оскільки їх поверхневий шар може мати широкий функціональний спектр. До того ж кремнеземні матриці, синтезовані золь-гель методом, показують високу фізичну жорсткість, хімічну та біологічну інертність, високу термостійкість. Крім того, варіюючи умови синтезу, можна відносно легко впливати на морфологію їх частинок, природу функціонального шару та структурно-адсорбційні характеристики [6, 7]. ФПМ, зазвичай, складаються з

неорганічного (полісилоксанового) або орґано-неорґанічного (гібридного) каркасу та орґанічної частини (гідрофільних або гідрофобних функціональних груп) [8, 9]. При іммобілізації ферментів на таких носіях спостерігається, як правило, стабілізація біомолекул завдяки обмеженню їх конформаційної рухливості і одночасне формування захисного мікрооточення [10]. Тому дуже важливим є вивчення фізико-хімічних властивостей ФПМ, оскільки навіть незначна зміна методики синтезу матриці та іммобілізації ферментів може суттєво зменшувати каталітичну активність останніх [11].

Золь-гель технологія останнім часом широко застосовується для іммобілізації різноманітних біоб'єктів, в тому числі активних ферментів [12] та живих мікроорґанізмів [13], а одержані нанокомпозити знаходять медичне, біохімічне та аналітичне застосування [14]. Іммобілізація ферментів за допомогою золь-гель методу запропонована і для одержання біокаталізаторів в орґанічних розчинниках [15]. Тому в цій роботі нами для іммобілізації такого гідролітичного ферменту як уреаза використано матриці, які теж одержано за допомогою золь-гель методу. Уреаза займає важливе місце в кругообігу азоту в природі, каталізуючи гідроліз сечовини до аміаку та вуглекислоти. Крім того, численні дослідження вказують на можливість використання уреаз в біотехнології. Сьогодні іммобілізована уреаза пропонується для визначення сечовини в аналітичних і біомедичних цілях [16], аналізу важких металів [17], видалення сечовини з алкогольних напоїв [18], визначення креатиніну [19], аргініну [20], антитіл [21] та *Escherichia coli* [22]. Мета цієї роботи – з'ясувати вплив концентрації 3-амінопропільних груп в поверхневому шарі ксерогелів та силікагелів, а також структурно-адсорбційних характеристик цих носіїв на ступінь адсорбції уреаз та збереження її активності.

Матеріали і методи

Для синтезу полі(3-амінопропіл)силоксанових ксерогелів (далі ПАПСК) та функціоналізації 3-амінопропільними групами силікагелю (марки "Davisil", Aldrich, $S_{\text{плт}} = 300 \text{ м}^2/\text{г}$, $d = 15 \text{ нм}$) використовували: тетраетоксисилан (ТЕОС, 98 %, Aldrich); 3-амінопропілтриетоксисилан (АПТЕС, 98 %, Aldrich); ацетонітрил (ч.д.а.); *n*-гексан (ч.д.а.); абсолютизований етиловий спирт; уреазу (з бобів сої (Jack beans) КФ 3.5.1.5 з активністю 35 од/г, Fluka); 0,06 М фосфатний буфер (рН 7,0), (Na_2HPO_4 , (ч.д.а.), KH_2PO_4 , (ч.д.а.)); 0,05 М розчин етилендіамінтетраацетату натрію (трилон Б, ч.д.а.); 5 М розчин сечовини ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, х.ч.).

Для вивчення впливу концентрації поверхневих 3-амінопропільних груп на ступінь іммобілізації та величину збереження активності уреаз були синтезовані зразки ПАПСК з різним вмістом функціональних груп. Методика синтезу полі(3-амінопропіл)силоксанових ксерогелів передбачала змішування вихідних алкоксисиланів (ТЕОС:АПТЕС) у співвідношенні (мол.) 2:1 (зразок К1); 4:1 (К2); 8:1 (К3); та 12:1 (К4). Нижче, як приклад, наведена методика синтезу зразка К1 при співвідношенні вихідних алкоксисиланів 2:1.

До розчину 96 ммоль ($21,4 \text{ см}^3$) ТЕОС та 48 ммоль ($11,2 \text{ см}^3$) АПТЕС в 20 см^3 етанолу, охолодженого на крижаній бані (до $2-3^\circ\text{C}$), при постійному перемішуванні на магнітній мішалці додавали по краплинам воду в кількості 264 ммоль ($4,7 \text{ см}^3$). Після додавання води спостерігалось підвищення температури розчину до $8-10^\circ\text{C}$. Протягом наступних кількох хвилин відбувалось утворення прозорого гелю. Утворений гель залишали на добу при кімнатній температурі для дозрівання, після чого його подрібнювали та сушили протягом 6 год у вакуумі при температурі 120°C . Висушений зразок промивали водою (1000 см^3) і знову сушили за тих же умов.

Методика функціоналізації силікагелю марки "Davisil" 3-амінопропільними групами полягала в наступному. В скляну колбу з розчином 0,012 ммоль ($2,7 \text{ см}^3$) ТЕОС та 0,006 ммоль ($1,42 \text{ см}^3$) АПТЕС в 100 см^3 ацетонітрилу додавали 5 г силікагелю

"Davisil". При постійному перемішуванні розчин нагрівали на водяній бані з оберненим холодильником до кипіння і добавляли краплями воду ($0,5 \text{ см}^3$). Після 3 год кип'ятіння розчин охолоджували, силікагель відфільтровували і промивали *n*-гексаном. Одержаний зразок сушили у вакуумі при 120°C протягом 6 год. В результаті одержували частинки силікагелю з тонкою полісилоксановою плівкою, яка містила 3-амінопропільні групи. Вихід білого порошкоподібного продукту складав 5,68 г.

Для порівняння було синтезовано полісилоксановий ксерогель (ПСК), що не містить 3-амінопропільних груп [23].

Визначення концентрації амінопропільних груп на поверхні синтезованих зразків проводили шляхом оберненого титрування $0,1\text{M}$ розчином луку надлишкового розчину соляної кислоти після встановлення кислотно-основної рівноваги протягом 3 діб.

Для іммобілізації уреазі методом сорбції $0,1 \text{ г}$ носія заливали розчином 10 мг уреазі в 5 см^3 фосфатного буфера і залишали на ніч в холодильнику при 4°C . Через 12 год розчин відділяли шляхом декантації, а зразок промивали 5 разів по 5 см^3 фосфатним буферним розчином. Після аналізу розчинів на вміст уреазі за різницею між взятою кількістю уреазі для іммобілізації та знайденою в цих розчинах оцінювали кількість іммобілізованої уреазі.

Ферментативну активність іммобілізованої на одержаних матрицях уреазі визначали за швидкістю утворення аміаку в реакції гідролізу сечовини при 25°C , концентрації сечовини $0,1 \text{ моль/л}$ та $\text{pH } 7$ (фосфатний буфер). Концентрацію аміаку визначали колориметрично за допомогою реактиву Несслера [24]. За одиницю активності уреазі приймали перетворення 1 мкмоль сечовини за 1 хв ферментативної реакції. У всіх випадках при визначенні активності брали середнє значення трьох паралельних дослідів. Похибка визначення активності уреазі не перевищувала 10% .

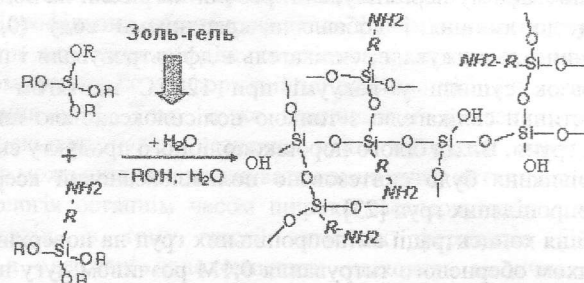
Структурно-адсорбційні характеристики одержаних носіїв – величину питомої поверхні ($S_{\text{пт}}$), сорбційний об'єм пор ($V_{\text{с}}$) та їх ефективний діаметр ($d_{\text{еф}}$) – визначали за ізотермами адсорбції-десорбції азоту. Ці дані одержували за допомогою приладу "Kelvin-1042" (Costech Microanalytical). Зразки попередньо дегазували в потоці гелію при 120°C протягом 2 год. Об'єм адсорбованого газу визначався в момент встановлення квазірівноваги в потоці газу, що контролювалось детектором теплопровідності (точність вимірювання $\pm 3\%$). Величину $S_{\text{пт}}$ визначали за методом БЕТ [25]. Розрахунок діаметра пор проводили за десорбційною гілкою ізотерми методом ВДН [26].

ІЧ спектри одержаних зразків записували на спектрометрі Nicolet NEXUS FTIR з використанням приставки дифузного відбиття "SMART Collector" в області частот $400 - 4000 \text{ см}^{-1}$ (при роздільній здатності 8 см^{-1}). Для цього зразки попередньо змішували з KBr (Fluka). Масове співвідношення зразок / KBr складало 1:30.

Результати та їх обговорення

Для одержання полі(3-амінопропіл)силоксанових ксерогелів (ПСК) використовували реакцію гідролітичної співполіконденсації ТЕОС і АПТЕС у співвідношенні 2:1; 4:1; 8:1; 12:1 та 14:1 (див. схему). Цю ж реакцію було використано і при нанесенні полісилоксанової плівки з 3-амінопропільними групами на поверхню силікагелю.

В ІЧ спектрах всіх зразків (рис. 1) в області $1070 - 1150 \text{ см}^{-1}$ ідентифікується найбільш інтенсивна смуга поглинання з плечем у високочастотній області. Її виникнення пов'язане з існуванням тривимірного каркасу силоксанових зв'язків $\equiv \text{SiOSi} \equiv$ [27].



В ІЧ спектрах також ідентифікуються малоінтенсивні смуги пропільного ланцюжка в області $1300-1480\text{ см}^{-1}$ і $2800-3000\text{ см}^{-1}$, характерні відповідно для деформаційних та валентних коливань метиленових груп. Всі одержані ксерогелі також містять воду – вище 3000 см^{-1} спостерігається широка та інтенсивна смуга поглинання, характерна для коливань $\nu(\text{OH})$ молекул води, які беруть участь у водневому зв'язку. На її тлі при ~ 3300 і $\sim 3375\text{ см}^{-1}$ з'являються дві слабоінтенсивні смуги поглинання, які можна пов'язати з коливаннями $\nu_{\text{s,as}}(\text{NH})$ аміногруп. Для функціоналізованих силікагелів інтенсивність смуг поглинання в області $3300-3380\text{ см}^{-1}$ збільшується зі збільшенням відносної кількості АПТЕС в реакційному розчині. Крім того, в ІЧ спектрах цих же зразків при 1530 см^{-1} проявляється слабка смуга поглинання, інтенсивність якої теж наростає при переході від зразку С1 до С4. Поява цієї смуги обумовлена деформаційним коливанням $\delta(\text{NH}_2)$ аміногрупи. Зазначимо також, що в ІЧ спектрах при $\sim 3740\text{ см}^{-1}$ ідентифікується малоінтенсивна гостра смуга поглинання, характерна для $\nu(\text{OH})$ силанольних груп.

Вміст 3-амінопропільних груп, розрахований за результатами кислотно-основного титрування одержаних зразків ксерогелів та функціоналізованих силікагелів, представлено в табл. 1. Як і очікувалось, зі зменшенням в реакційному розчині відносного вмісту АПТЕС концентрація аміних груп в зразках синтезованих ксерогелів теж зменшується.

Таблиця 1. Структурно-адсорбційні характеристики ксерогелів та силікагелів з 3-амінопропільними групами в поверхневому шарі

Зразок	$S_{\text{пит.}}$ $\text{м}^2/\text{г}$	V_c $\text{см}^3/\text{г}$	$d_{\text{сф}}$ нм	$C_{\text{ф.гр.}}$ ммоль/г (мкмоль/м ²)
Ксерогелі				
K1 (2:1)^a	202	0,25	4,6	3,3 (14,4)
K2 (4:1)	315	0,62	10,3	2,4 (7,6)
K3 (8:1)	304	1,54	14,9; 22,4	1,3 (4,2)
K4 (12:1)	389	1,32	15,0	0,9 (2,3)
Ксерогель	570	0,37	2,6	-
Силікагелі				
Davisil	277	1,12	11,9	-
C2 (2:1)	260	0,974	9,3	0,9
C3 (2:1)^b	228	0,690	11,2	1,35
C4 (1:1)	235	0,925	11,7	1,35

^a Співвідношення ТЕОС:АПТЕС (мол.);

^b Співвідношення (ТЕОС+АПТЕС): Davisil вдвічі більше ніж для зразків C2 і C4.

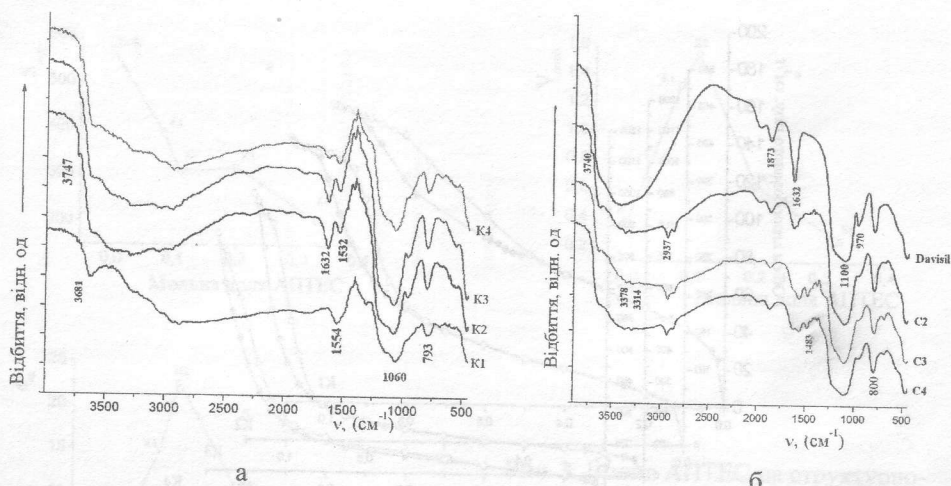
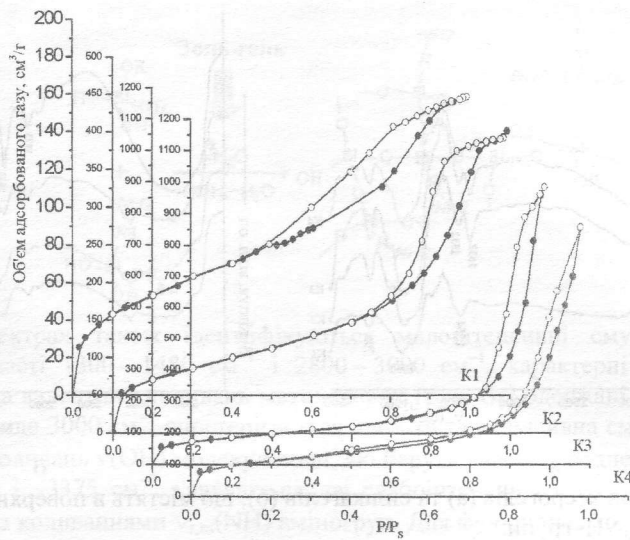


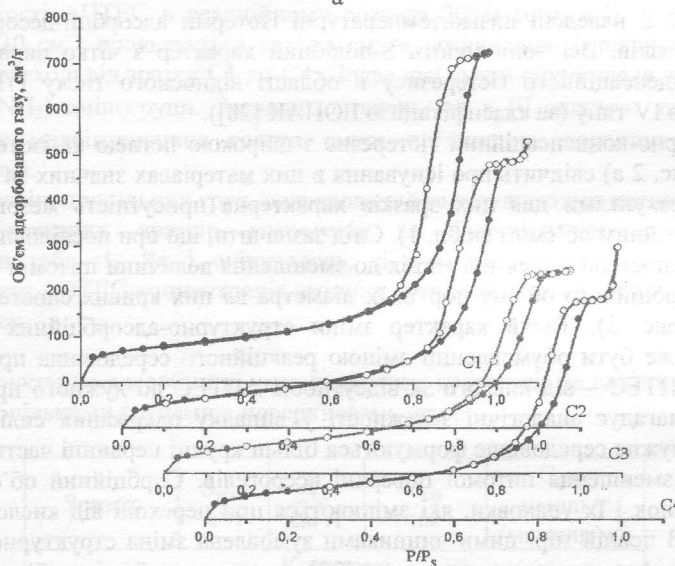
Рис. 1. ІЧ спектри ксерогелів (а) та силікагелів (б), що містять в поверхневому шарі $\equiv\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ групи.

На рис. 2 наведені низькотемпературні ізотерми адсорбції-десорбції азоту для одержаних зразків. Всі вони мають S-подібний характер з чітко вираженою петлею капілярно-конденсаційного гістерезису в області відносного тиску $P/P_s \sim 0,5 - 0,8$ і відносяться до IV типу (за класифікацією ІЮПАК [28]).

Капілярно-конденсаційний гістерезис з широкою петлею на ізотермах адсорбції ксерогелів (рис. 2 а) свідчить про існування в цих матеріалах значних за розмірами пор. Згідно з розрахунками для цих зразків характерна присутність мезопор з відносно високим сорбційним об'ємом (табл. 1). Слід зазначити, що при послідовному наростанні долі АПТЕС спостерігається тенденція до зменшення величини питомої поверхні, в той час як для сорбційного об'єму пор та їх діаметра на цих кривих спостерігаються чіткі максимуми (рис. 3). Такий характер зміни структурно-адсорбційних характеристик ксерогелів може бути обумовлений зміною реакційного середовища при збільшенні в ньому долі АПТЕС – від кислого за відсутності АПТЕС до лужного при високій долі АПТЕС – і нагадує аналогічні залежності у випадку одержання силікагелів [29]. З переходом у лужне середовище формуються більш крупні первинні частинки (глобули), що викликає зменшення питомої поверхні ксерогелів. Сорбційний об'єм є функцією розміру частинок і їх упаковки, які змінюються при переході від кислого до лужного середовища. В певній мірі цими чинниками зумовлена зміна структурно-адсорбційних характеристик. Але, як зазначають автори [29], причина такої зміни об'єму пор не зовсім зрозуміла. Слід зауважити, що при переході від нейтрального до лужного середовища при утворенні силікагелю сорбційний об'єм його зменшується на ~40 % [29], в той час як при утворенні аміновмісного ксерогелю при збільшенні мольної долі АПТЕС від 0,1 до 0,3 сорбційний об'єм зменшується у ~5 разів (табл. 1). Очевидно, при утворенні аміноксерогелів зміна кислотно-основного середовища не є головним чинником. Імовірно, до такої суттєвої зміни структурно-адсорбційних характеристик (діаметра пор і сорбційного об'єму) призводить зростання концентрації поверхневих 3-амінопропільних груп, котрі якимось чином сприяють щільності упаковки глобул. Крім того, за великих концентрацій 3-амінопропільних груп та за умов їх острівкового розміщення діаметр пор буде зменшуватись на 1–2 довжини 3-амінопропільного радикалу і, відповідно, буде зменшуватись сорбційний об'єм.



а



б

Рис. 2. Ізотерми адсорбції (○) – десорбції (●) азоту ксерогелями (а) та функціоналізованими силікагелями (б).

Вочевидь, співвідношення ТЕОС/АПТЕС, рівні 8:1 та 12:1, що відповідають мольній долі АПТЕС 0,11 – 0,08, є оптимальними для формування ксерогелю з порами максимального розміру і максимальним сорбційним об'ємом (табл. 1 та рис. 3).

З цієї ж таблиці видно, що функціоналізація 3-амінопропільными групами частинок силікагелю з застосуванням золь-гель методу при використаних в даній роботі співвідношеннях ТЕОС/АПТЕС та (ТЕОС+АПТЕС)/Davisil не викликає суттєвих змін в їх структурно-адсорбційних характеристиках.

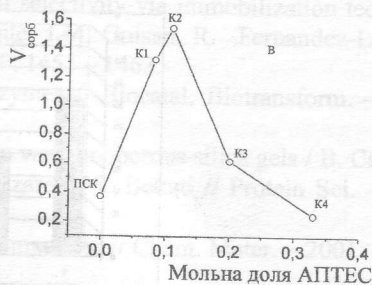
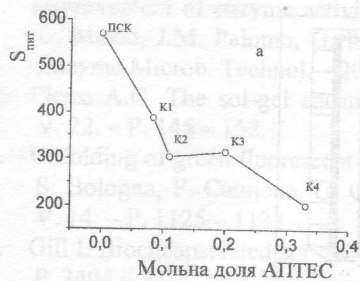
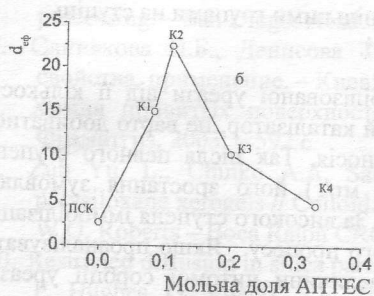


Рис. 3. Вплив АПТЕС на структурно-адсорбційні характеристики ФІМ.



Зразки як функціоналізованих, так і не функціоналізованих ксерогелів та силікагелів були використані для іммобілізації уреазы методом адсорбції. Як і слід було сподіватись, величина адсорбції уреазы зростає зі збільшенням сорбційного об'єму пор (рис. 4). Саме цей параметр є визначальним при іммобілізації уреазы, котрий в свою чергу залежить від співвідношення функціоналізуючого і структуруючого алкоксисиланів (рис. 3 в).

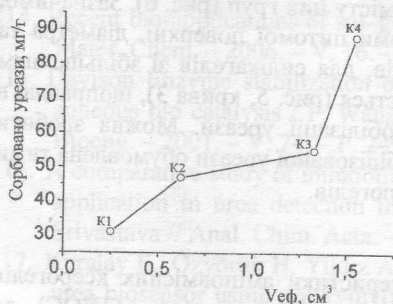


Рис. 4. Вплив сорбційного об'єму пор на кількість уреазы, іммобілізованої на поверхні ксерогелів.

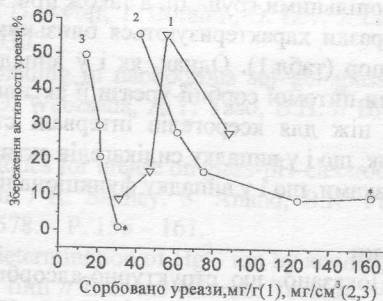


Рис. 5. Вплив ступеню іммобілізації уреазы на аміновмісних ксерогелях (1, 2) та силікагелях (3) на збереження її активності (точки, позначені *, стосуються нефункціоналізованих зразків).

З наведеного вище впливає, що оптимальними умовами для одержання ефективної матриці для іммобілізації уреазы способом сорбції є використання при синтезі ксерогелів співвідношень ТЕОС:АПТЕС (мол.), рівних 8:1 – 12:1, що дозволяє одержувати функціоналізовану матрицю з діаметром пор ~ 15 нм, сорбційним об'ємом пор $\sim 1,5$ см³ і концентрацією 3-амінопропільних груп на рівні 0,9 – 1,3 ммоль/г (2 – 4 мкмоль/м²).

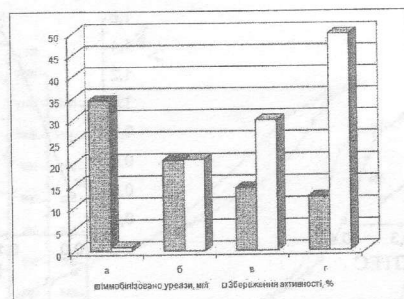


Рис. 6. Вплив функціоналізації силікагелю 3-амінопропільними групами на ступінь іммобілізації уреазі та збереження її активності.

Однак з аналізу залежності активності іммобілізованої уреазі від її кількості випливає що, створюючи ефективний ферментативний каталізатор, не варто добиватись високого ступеня іммобілізації уреазі на поверхні носія. Так після певного ступеня іммобілізації (в нашому випадку на рівні 50–60 мг/г) його зростання зумовлює зниження питомої активності уреазі (рис. 5, крива 1). За високого ступеня іммобілізації, вочевидь, не вся уреаза доступна для ферментативного процесу. Якщо проаналізувати залежність активності іммобілізованої уреазі від величини питомої сорбції уреазі, вираженої в мг на см³ сорбційного об'єму носія (рис. 5, крива 2), то можна побачити, що чим менша величина питомої сорбції уреазі, тим вищий ступінь збереження її активності. Зумовлено це, скоріше всього, як підвищеною доступністю активних центрів уреазі за низьких її концентрацій (поверхневих та об'ємних) для ферментативної реакції, так і зниженням впливу дифузійного чинника.

При адсорбції уреазі на силікагелях ступінь фіксації ферменту поступово знижується при переході від нефункціоналізованого зразка до функціоналізованих 3-амінопропільними групами, а також при збільшенні вмісту цих груп (рис. 6). Зазначимо, що ці зразки характеризуються близькими величинами питомої поверхні, діаметра та об'єму пор (табл.1). Однак, як і у випадку ксерогелів, для силікагелів зі збільшенням величини питомої сорбції уреазі її активність знижується (рис. 5, крива 3), що правда, в іншому ніж для ксерогелів інтервалі ступенів іммобілізації уреазі. Можна зробити висновок, що і у випадку силікагелів активність іммобілізованої уреазі обумовлена тими ж чинниками, що і у випадку функціоналізованих ксерогелів.

Висновки

Показано, що структурно-адсорбційні характеристики аміновмісних ксерогелів визначаються взятим для синтезу співвідношенням структуруючого (ТЕОС) та функціоналізуючого (АПТЕС) агентів, а також відповідною зміною кислотності середовища. Встановлено, що активність іммобілізованої шляхом сорбції на поверхні аміновмісних ксерогелів та силікагелів уреазі зростає зі зменшенням величини питомої сорбції уреазі, вираженої в мг на см³ сорбційного об'єму носія. Отже, при створенні ефективного ферментативного каталізатора з використанням функціоналізованих 3-амінопропільними групами ксерогелів чи силікагелів не варто добиватись максимального ступеня іммобілізації уреазі.

Література

1. Roger A.S. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance // Adv. Synth. Catal. – 2007. – V. 349. – P. 1289 – 307.

2. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques / C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente // *Enzyme Microb. Technol.* – 2007. – V. 40. – P. 1451 – 1463.
3. Pierre A.C. The sol-gel encapsulation of enzymes // *Biocatal. Biotransform.* – 2004. – V. 22. – P. 145 – 152.
4. Unfolding of green fluorescent protein mut 2 in wet nanoporous silica gels / B. Campanini, S. Bologna, F. Cannone, G. Chirico, A. Mozzarelli, S. Bettati // *Protein Sci.* – 2005. – V. 14. – P. 1125 – 1133.
5. Gill I. Bioencapsulated sol-gel polymer nanocomposites // *Chem. Mater.* – 2001. – V. 13. – P. 3404 – 3421.
6. Brinker C.J., Sheerer G.W. Sol-gel science. The physics and chemistry of sol-gel processing. – San Diego. Acad. Press, 1990. – 908 p.
7. Слиякова И.Б., Денисова Т. И. Кремнийорганические адсорбенты: Получение, свойства, применение. – Киев: Наук. думка, 1988. – 192 с.
8. Химия привитых поверхностных соединений / Под ред. Лисичкина Г.В. – М.: Физматгиз, 2003. – 592 с.
9. Zub Yu. L., Chuiko A.A. Salient features of synthesis and structure of functional polysiloxane xerogels // *Colloid. Silica: Fundamentals and Applications* / Ed. H.E. Bergna, W.O. Roberts – Boca Raton CRC Press. – 2006. – P. 397 – 424.
10. Restricted diffusion in silica particles measured by pulsed field gradient NMR / S.R. Veith, E. Hughes, G. Vuataz, S.E. Pratsinis // *J Colloid. Interface Sci.* – 2004. – V. 274. – P. 216 – 228.
11. Encapsulating bimolecules in sol-gel matrices / B.C. Dave, J.M. Miller, B. Dunn, J.S. Valentine, J.I. Zink // *J. Sol-Gel Sci. Technol.* – 1997. – V. 8. – P. 629 – 634.
12. Biochemically active sol-gel glasses. The trapping of enzymes / S. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, M. Ottolenghi // *Mater. Lett.* – 1990. – V. 10. – P.1 – 8.
13. Livage J, Coradin T. Living cells in oxide glasses // *Rev. Miner. Geochem.* – 2006. – V. 64. – P. 315 – 32.
14. Recent bio-applications of sol-gel materials / D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livage // *J. Mater. Chem.* – 2006. – V. 16. – P. 1013 – 1030.
15. Davison Enzyme stabilization by covalent binding in nanoporous sol-gel glass for non aqueous bio catalysis / P. Wang, S. Dai, S.D. Waezsada, A.Y. Tsao, B.H. // *Biotechnol. Bioeng.* – 2001. – V. 74. – P. 249 – 255.
16. A comparative study of immobilization techniques for urease on glass-pH-electrode and its application in urea detection in blood serum / R. Sahney, S. Anand, B.K. Puri, A.K. Srivastava // *Anal. Chim. Acta.* – 2006. – V. 578. – P. 156 – 161.
17. Kuralay F., Özyörük H, Yildiz A. Inhibitive determination of Hg^{2+} ion by anamperometric urea biosensor using poly(vinylferrocenium) film // *Enzyme Microb. Technol.* – 2007. – V. 40. – P. 1156 – 1159.
18. Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis* / K. Miyagawa, M. Sumida, M. Nakao, M. Harada, H. Yamamoto, T. Kusumi, et al. // *J. Biotechnol.* – 1999. – V. 68. – P. 227 – 236.
19. Cullen D.C., Sethi R.S., Lowe C.R. Multi-analyte miniature conductance biosensor // *Anal. Chim. Acta.* – 1990. – V. 231. – P. 33 – 40.
20. Enzyme immobilization on an epoxy matrix. Determination of l-arginine by flow-injection techniques / A. Alonso, M.J. Almendral, M.D. Baez, M.J. Porras, C. Alonso // *Anal. Chim. Acta.* – 1995. – V. 308. – P. 164 – 169.
21. Sansubirino A., Mascini M. Development of an optical fibre sensor for ammonia, urea, urease and IgG // *Biosens. Bioelectron.* – 1994. – V. 9. – P. 207 – 216.

22. Lepidi *Escherichia coli* detection in vegetable food by a potentiometric biosensor / C. Ercole, M.D. Gallo, L. Mosiello, S. Baccella, A. // *Sensor and Actuators B: Chem.* – 2003. – V. 91. – P. 163 – 168.
23. Порівняльна характеристика активності уреазі, включеної в полісилоксанові гідрогелі та ксерогелі, одержані золь-гель методом / Р.П. Погорілий, В.П. Гончарик, Л.І. Кожара, Ю.Л. Зуб, О.О. Чуйко // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – Т.78, № 1. – С. 94 – 100.
24. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – 447 с.
25. Brunauer J.S., Emmet P.H., Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1938. – V 60. – P. 309 – 319.
26. Barret E.P., Joyner L.G., Halenda P.P. The Determination of pore volume and area distributions in porous substances. 1. Computations from nitrogen isotherms // *Amer. Chem. Soc.* – 1951. – V. 73. – P. 373 – 380.
27. Финн Л.П., Слиянова И.Б. Строение и термодеструкция ксерогелей полиорганосилоксанов по данным ИК-спектров // *Коллоид. журн.* – 1975. – Т. 37, № 4. – С. 723 – 729.
28. Rouquerol F., Rouquerol J., Sing K. Adsorption by powders and porous solids. Principles, methodology and application. – Acad. Press., 1999. – 467 p.
29. Неймарк И.Е. Синтетические минеральные адсорбенты и носители катализаторов. – Киев: Наук. думка, 1982. – 216 с.

EFFECT OF STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF POLYSILOXANE MATRIXES, CONTAINING THE SURFACE LAYER 3-AMINOPROPYL GROUPS ON ACTIVITY ADSORBED UREASE

R.P. Pogorilyi, V.P. Honcharyk, L.I. Kozhara, Y.L. Zub

*Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: pogorilyi_roman@isc.gov.ua*

Using sol-gel method poly(3-aminopropyl)siloxanes xerogels with different content of functional groups in the surface layer and functionalized 3-aminopropyl groups commercially available silica gel-type have been synthesized. The influence of the concentration of APTES in sol-gel system on porous structure characteristics of aminoxerogels has been studied. The influence of established parameters on sorption immobilization of urease and its enzymatic activity has been discussed.

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНО-АДСОРБЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОЛИСИЛОКСАНОВЫХ МАТРИЦ, СОДЕРЖАЩИХ В ПОВЕРХНОСТНОМ СЛОЕ 3- АМИНОПРОПІЛЬНІ ГРУППИ, НА АКТИВНІСТЬ АДСОРБІРОВАНОЇ УРЕАЗИ

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

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова 17, 03164, Киев-164 e-mail: pogorilyi_roman@isc.gov.ua*

С использованием золь-гель метода синтезированы поли(3-аминопропил)силоксановые ксерогели с разным содержанием функциональных групп в поверхностном слое, а также функционализирован 3-аминопропильными группами коммерчески доступный силикагель типа "Davisil". Изучено влияние концентрации аминопропилтриэтоксисилана в золь-гель системе на структурно-адсорбционные характеристики аминосодержащих ксерогелей. Исследована адсорбция уреазы на функционализированных аминопропильными группами кремнеземах. Установлены параметры, влияющие на иммобилизацию уреазы методом адсорбции и ее ферментативную активность.