


АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ВІДДІЛЕННЯ ХІМІЇ ТА ХІМІЧНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ  
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ім.О.В.БОГАТСЬКОГО



На правах рукопису.

КОШЕЛЕВ СЕРГІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК 577.152.351;15(088.8)

ІММОБІЛІЗАЦІЯ УРЕАЗИ НА ПОЛІМЕРНИХ НОСІЯХ

02.00.10. - Біоорганічна хімія, хімія природних  
та фізіологічно активних сполук

АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття вченого ступеня  
кандидата хімічних наук

ОДЕСА - 1993

46 28819

Робота виконана у Фізико-хімічному інституті ім.  
О.В.Богатського АН України

Науковий керівник: доктор хімічних наук

Т.І.Давиденко

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук

П.К.Кінтя

кандидат хімічних наук

Ю.В.Гавсевиц

Головна організація: Одеський технологічний інститут  
харчової промисловості

Захист відбудеться " 4 " <sup>листо</sup>січня 1994 р. о 12 год. на  
засіданні спеціалізованої ради Д 016.58.02. при Фізико-хімічному  
інституті ім. О.В.Богатського АН України ( 270080, м.Одеса,  
Чорноморська дорога, 86).

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці  
Фізико-хімічного інституту ім. О.В.Богатського АН України.

Автореферат разіслано " 28 " грудня 1993 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради,

кандидат хімічних наук

Л.О.Літвінова

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00802885 (V)

AB-20.07

**Актуальність проблеми:** Конкретне застосування іммобілізованого ферментного препарату принципово можливе при рішенні ряду проблем, пов'язаних з добором оптимального метода іммобілізації та носія, з одночасним збереженням активності фермента. Не дивлячись на певний прогрес, досягнутий в цій області, продовжуються роботи по створенню більш економічних типів біокатализаторів на основі нових або недостатньо розглянутих раніше носіїв.

В цьому плані перспективні синтетичні полімерні носії. Це зумовлено широким набором змінних фізичних та хімічних параметрів (розміри частинок, пористість, функціональні групи на поверхні). Серед них можна виділити нерозчинні пористі та непористі полімери, іммобілізація на яких здійснюється за рахунок адсорбції чи ковалентного зв'язування або комбінації цих двох процесів, та полімери, що утворюють гелі. Кожна група має свої очевидні переваги та недоліки і застосовується в залежності від практичної мети використання одержуваних іммобілізованих препаратів.

Особливу цікавість становлять біокатализатори на основі уреаз. Уреаза - фермент, який гідролізує сечовину у водних розчинах, виділяється у промислових масштабах з рослинних та мікробіологічних джерел та активно вивчається завдяки широкому спектру можливого застосування її іммобілізованих форм. Це можуть бути методи аналітичного визначення сечовини у біологічних та промислових рідинах, системи очистки як медичного призначення ("штучна нирка"), так і промислових стоків, регенерація в апаратах замкнутого циклу.

Все вищенаведене визначає актуальність даної дисертаційної роботи, виконаної у рамках теми "Створення систем індивідуального користування для визначення сечовини, глюкози та квантину" за програмою 5.41.07. "Біосенсори" і є частиною досліджень, що виконуються у відділі фізико-хімічних основ біотехнології ФХІ ім.О.В.Богатського АН України.

**Мета роботи:** Метою даної роботи було вивчення методів іммобілізації уреаз на полімерних носіях, дослідження властивостей одержаних препаратів та можливостей їх практичного використання.

**Наукова новизна:** Розроблені способи ковалентної іммобілізації препаратів уреаз на макропористих сополімерах стиролу з дивініл-

бензолом та привитих поліетиленях, а також методи включення фермента у полі-N-вінілкапролактам з високим збереженням активності та зв'язуванням білка. Показано, що ефективність іммобілізації суттєво залежить від природи та пористості використовуваних полімерних матриць. Запропоновано використання сополімерів стиролу з дивінілбензолом для іммобілізації уреазі з рослинної сировини, а привитих поліетиленів - для зв'язування фермента з мікробного джерела.

Вивчені властивості іммобілізованих на полімерних носіях препаратів уреазі: рН- та термозалежність активності, кінетичні параметри гідролізу сечовини, стабільність при зберіганні, можливість використання препаратів в реакторах періодичної та безперервної дії для розкладу та аналізу сечовини у розчинах.

Показано, що рН-оптимум іммобілізованих препаратів уреазі має тенденцію до зсуву в кислу область, підвищена термостабільність ковалентно іммобілізованого фермента.

Розроблений метод включення уреазі у ПВК дозволяє одержати препарат з 100%-ним збереженням активності і 90-100%-ним збереженням вихідної активності після одного року зберігання.

Методами ЯМР  $C^{13}$  та ІЧ-спектроскопії показана гідрофобна природа утворення нерозчинного комплексу ПВК при термоосадженні в розчинах фенолу.

**Практична цінність:** На основі ковалентно іммобілізованих на стиролдивінілбензолних носіях та привитих поліетиленях препаратів уреазі показаний ефективний розклад розчинів сечовини з концентрацією 350 мг% на протязі 15-20 діб.

Встановлено, що іммобілізована на СПМ стиролу та ДВЕ уреазі дозволяє проводити протягом 14-18 діб до 150 аналізів розчину сечовини в межах концентрацій  $10^{-4}$ -  $10^{-2}$ М з помилкою  $\pm$  5%.

Одержаний термоосадженням у середовищі, що містить рН-індикатор, іммобілізований у ПВК препарат уреазі дозволяє протягом 3-5 хвилин т-тестувати водні розчини сечовини при кімнатній температурі з концентрацією 150 мг% і вище, що відповідає патології вмісту сечовини в плазмі крові.

Розроблені на основі включеної у ПВК уреазі 2-х і 3-х шарові індикаторні смужки, що дозволяють за 4-8 хвилин напівкількісно визначати вміст сечовини в зразку 0,02 мл плазми або крові, пройшли успішні медико-біологічні дослідження на крові хворих.

Апробація роботи: Результати роботи доповідались на IV Всесоюзному симпозиумі "Інженерна ензимологія" (Київ, 1983), Всесоюзній конференції "Застосування ферментів в біологічних аналізах (Вільнюс, 1984), 2-й Всесоюзній конференції з гемосорбції (Ташкент, 1984), Всесоюзному симпозиумі з медичної ензимології (Махачкала, 1986), Міжнародному конгресі "Сенсорні системи та компоненти" (С.-Петербург, 1993).

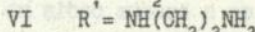
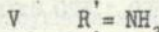
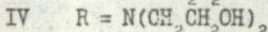
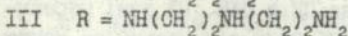
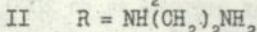
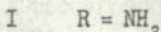
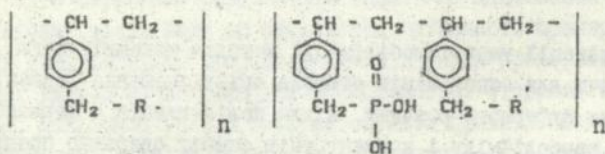
Публікації: За матеріалами дисертації опубліковано 3 статті, тези 7 доповідей, 1 стаття знаходиться в стані надрукування.

Об'єм роботи: Дисертація складається із вступу, п'яти глав, висновків, списку цитованої літератури. Робота викладена на 128 сторінках, містить 11 таблиць, 30 малюнків. Список літератури містить 189 найменувань.

#### ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ.

В роботі використані препарати уреазы, виділені з насіння капуна (ВНДІХТЛЗ, Харків), соєвих бобів (марка А, НВО "Біолар", Рига) та *Staphylococcus saprophyticus* (НВО "Фермент", Вільнюс).

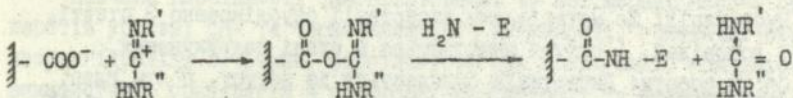
Групи носіїв, застосовані для ковалентної іммобілізації уреазы, включали макропористі сополімери стиролу з дивінілбензолом (СПЛ стиролу з ДВБ) виробництва ІРЕА, Москва, такої будови:



а також СПЛ стиролу з ДВБ Polystyrene Y-58 виробництва VEB Chem. Comb. Bitterfeld, НДР та привиті поліетилену виробництва ІФХ, Чорноголовка. Ці матриці характеризуються високою механічною стійкістю, легкістю хімічної модифікації, для СПЛ стиролу з ДВБ характерна

також розвинена пористість та зручна сферична форма частинок.

Ковалентну іммобілізацію уреазі проводили на сополімерах стирила, які містили функціональні первинні аміногрупи з різною довжиною алкільної "ніжки" за допомогою глутарового альдегіду. Для поліетиленів з привитою поліакриловою кислотою (ПЕ з ПАК) як зшивачий агент застосували карбодііміди, здійснюючи ковалентне зв'язування за схемою:



I - 1-Циклогексил-3-(2-морфоліноетил)карбодіімід-м-п-толуолсульфонат

II - 1-Етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіімід

ДЦК - N,N - Дициклогексилкарбодіімід.

Слід зауважити, що активовані глутаровим альдегідом сополімери стирила можна зберігати в сухому вигляді і використовувати для іммобілізації ферментів в мірку потреби, тоді як зв'язування уреазі з поліетиленом здійснюється безпосередньо в присутності карбодііміду без виділення активованого носія.

Активність одержаних іммобілізованих препаратів змінювалась в широких межах: від 0 до 2000 Од/г і визначалась як носієм та методом зв'язування, так і властивостями препаратів уреазі з різних джерел (Табл.1).

Шляхом оптимізації умов іммобілізації методом математичного планування змінюючи для сополімерів стирила співвідношення фермент: носій, час і об'єм буферного розчину, а для поліетиленів - фермент: носій, кількість карбодііміду і концентрацію спирту одержано препарати з активністю до 550 і 520 Од/г для уреазі із *Staphylococcus sarophyticus* та з соєвих бобів на сополімерах стирила та до 2000 Од/г для уреазі із *St. sarophyticus* на ПЕ з ПАК. Ці дані перевищують відомі з літератури, наприклад 495 Од/г для уреазі на макропористих вугільних носіях та 880 Од/г для непористих силохромів. Оптимальні умови іммобілізації становили 120-200 мкг препарату фермента на 1г носія; pH 6,8; 10-16-годинна інкубація при струшуванні; 0-65 мг карбодііміда у 35-7% спирті для поліетилену.

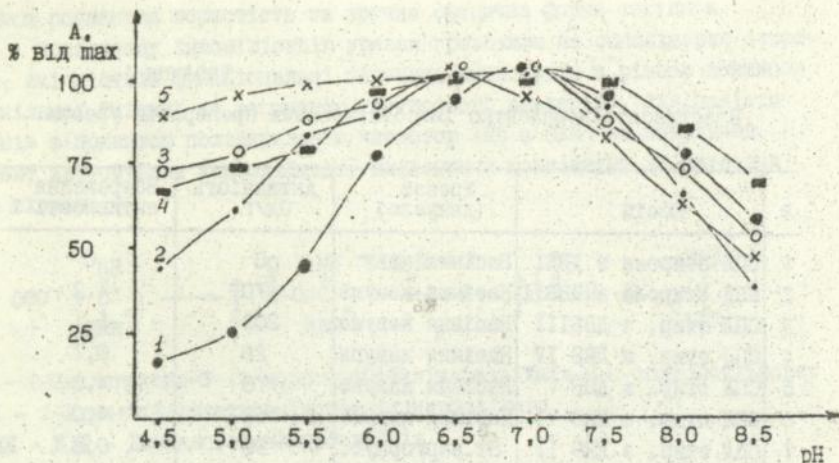
Таблиця 1.

Властивості ковалентно іммобілізованих препаратів уреаз.

№	Носій	Уреаза (джерело)	Активність Од/г	Збереження активності %
1	СПЛ стирола з ДВБ I	Насіння каву	0	0
2	СПЛ стирола з ДВБ II	Насіння кавуна	170	4,2
3	СПЛ стир. з ДВБ III	Насіння кавуна	203	5,1
4	СПЛ стир. з ДВБ IV	Насіння кавуна	28	0,7
5	СПЛ стир. з ДВБ V	Насіння кавуна	178	4,3
6	СПЛ стир. з ДВБ VI	Насіння кавуна	163	4,0
7	СПЛ стир. з ДВБ II	St.saprophyt.	90	0,8
8	СПЛ стир. з ДВБ II	Соеві боби	340	6,1
9	Polystyrene Y-58	St.saprophyt.	550	4,2
10	Polystyrene Y-58	Соеві боби	520	9,4
11	ПЕ з ПАК (карб. I)	Насіння кавуна	362	7,6
12	ПЕ з ПАК (карб. I)	St.saprophyt.	465	3,2
13	ПЕ з ПАК (карб. II)	St.saprophyt.	765	4,9
14	ПЕ з ПАК ( ДДК )	St.saprophyt.	2000	13,5

З одержаних результатів видно, що подовження модифікаційної "ніжки" носія веде до збільшення активності препарата (№№ 1-3). Можна вважати більш доцільним іммобілізацію препаратів уреаз з рослинних джерел на макропористих сополімерах стирола, а для більш активної мікробної уреаз використовувати привиті поліетилені. Відносно невисокий ступінь збереження активності, характерний для ковалентно іммобілізованих ферментів, компенсується високою стабільністю та багаторазовим використанням.

Для вивчення впливу процесу іммобілізації на фермент та для оптимального застосування одержаних препаратів досліджували комплекс біохімічних властивостей фіксованих форм уреаз порівняно з нативним ферментом. На прикладі трьох активних препаратів: уреаз із *St. saprophyticus* на Polystyrene Y-58 і поліетилені, а також уреаз із соєвих бобів на Polystyrene Y-58 нижче наведені характерні властивості іммобілізованих препаратів.

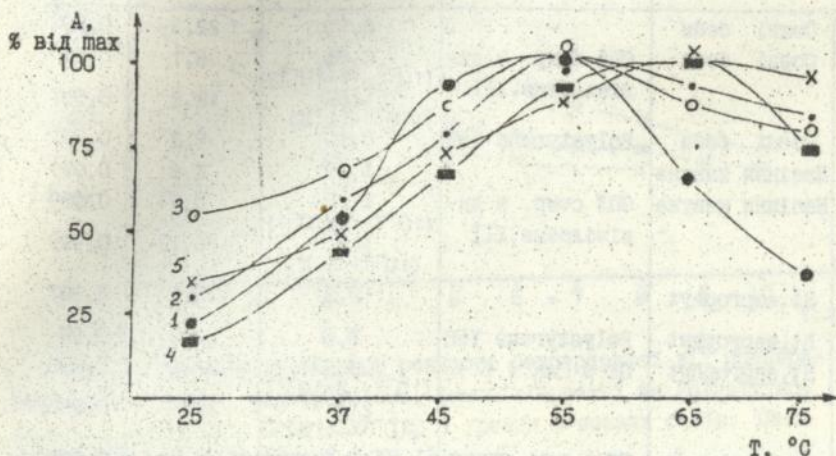


Мал.1. Залежність активності препаратів уреазы із *St.sapr.* (1) та із соєвих бобів (2), іммобілізованих на Polystyrene (3), ПЕ з ПАК (ДПК) (4) та на Polystyrene (5), відповідно, від pH інкубаційного середовища.

При вивченні залежності активності препаратів від pH (Мал.1) можна прийти до висновку про стабілізацію ковалентно іммобілізованих форм уреазы в кислому середовищі, що відбувається розширенням pH-оптимуму. Це можна пояснити тим, що при гідролізі сечовини уреазою виділяється аміак, який утворює більш лужне мікросередовище навколо активного центра фермента, зв'язаного на поверхні та у порах носія, а закислення інкубаційного середовища компенсує цей ін-активуючий вплив.

Термооптимум активності уреазы (Мал.2), який для фермента із *St. saporhyticus* знаходиться в межах 45–55°C, для фермента із соєвих бобів – 55–65°C, для іммобілізованих препаратів підвищується. Збільшення стабільності препаратів при високих температурах, характерне для фіксованих форм ферментів, підтверджується як даними по зниженню енергії активації процесу гідролізу сечовини з 10 кДж/моль для нативного фермента до 4,3 кДж/моль для іммобілізованої на ПЕ уреазы, так і результатами вивчення термостійкості ковалентно зв'язаних препаратів при 50°C. Показано збереження 86% і 77% вихідної

активності іммобілізованих препаратів уреазі із *St. saprophyticus* після 5-ти годинної інкубації проти 50% для нативного фермента.



Мал. 2. Залежність активності препаратів уреазі із *St. saprophyticus* (1) та з соєвих бобів (2), іммобілізованих на Polystyrene Y-58 (3), ПЕ з ПАК (ДПК) (4) та на Polystyrene Y-58 (5), відповідно, від температури.

Вивчення кінетики гідролізу сечовини нативною та іммобілізованою уреазою методом рН-статкування показало спорідненість препарата із соєвих бобів до субстрата, ніж у фермента із насіння кавуна та *St. saprophyticus*, для яких значення  $K_m$  на порядок вище (Табл.2).

Лінеаризацією експериментальних даних за методом найменших квадратів у межах двох ділянок — при низьких та високих концентраціях субстрата з високою кореляцією для препаратів, іммобілізованих на носії III та привитих поліетиленях визначені два значення константи Міхаеліса. Підібрана наявність другого, на порядок вищого, значення  $K_m$  при високих концентраціях сечовини описана для уреазі, іммобілізованої на пористих органокремнеземках та пояснюється з одного боку, стеричним впливом матриці носія на активний центр ковалентно зв'язаного фермента, а з другого боку, дифузійними обмеженнями носія по субстрату.

Таблиця 2.

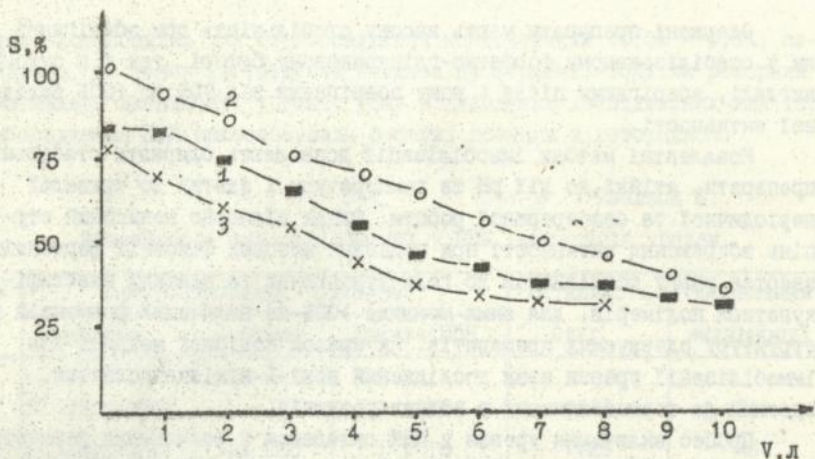
Кінетичні параметри ковалентно іммобілізованих препаратів.

№	Уреаза	Носій	$K_m * 10^3 M$	$K_m * 10^6 M$	$\rho$
1	Соеві боби	-	0,11	22,3	0,997
2	Соеві боби	СПМ стир. з дивінілбенз.ІІІ	$10^{-3} \begin{matrix} 0,04 \\ - 7 * 10^{-2} \end{matrix}$	8,1	0,99
			$10^{-2} \begin{matrix} 1,68 \\ - 1 M \end{matrix}$	12,2	0,987
3	Соеві боби	Polystyrene Y58	0,10	8,2	0,991
4	Насіння кавуна	-	5,29	2,8	0,999
5	Насіння кавуна	СПМ стир. з дивінілбенз.ІІІ	$10^{-3} \begin{matrix} 11,5 \\ - 2 * 10^{-2} \end{matrix}$	5,94	0,989
			$10^{-2} \begin{matrix} 117 \\ - 1 M \end{matrix}$	6,13	0,999
6	St.saprophyt	-	12,3	33,8	0,987
7	St.saprophyt	Polystyrene Y58	8,6	21,6	0,99
8	St.saprophyt	ПЕ з ПАК ( I )	$10^{-3} \begin{matrix} 23,6 \\ - 2 * 10^{-1} \end{matrix}$	31,2	0,998
			$10^{-1} \begin{matrix} 212 \\ - 1 M \end{matrix}$	48,1	0,986
9	St.saprophyt	ПЕ з ПАК (ДПК)	$10^{-3} \begin{matrix} 10,5 \\ - 2 * 10^{-2} \end{matrix}$	46,4	0,999
			$10^{-1} \begin{matrix} 131 \\ - 1 M \end{matrix}$	67,7	0,999

Незначні зміни  $K_m$  при іммобілізації на Polystyrene Y-58 свідчать про більш м'який характер зв'язування фермента, який не чіпає активний центр фермента.

Можливість практичного застосування одержаних препаратів вивчена в умовах проточного колоночного реактора періодичної і безперервної дії при концентраціях субстрата 350 мг%. Для реактора періодичної дії показано, що після втрати вихідної активності за перші 20-25 циклів по 100 мл розчину на протязі 10-14 діб ( 50 циклів ) активність зберігається на рівні 35-40% вихідної. При безперервному гідролізі сечовини в колоночному реакторі ковалентно іммобілізовані препарати показали високу активність і стабільність (Мал.3).

Колонка з 1г препарата не сополімері стирола з дивінілбензолем та з 200мг препарата не поліетилені після пропускання 8-10 л



Мал.3. Розклад сечовини в реакторі безперервної дії препаратами уреазы із *St. saprophyticus*, іммобілізованої на Polystyrene Y-58 (1) та на ПЕ з ПАК (ДПК) (2) і уреазы з соєвих бобів, іммобілізованої на Polystyrene Y-58 (3);

S - ступінь конверсії сечовини, % від повної.

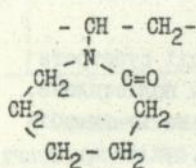
розчину сечовини зберігала 25-30%-ний ступінь конверсії субстрата при вихідній 76-84% для сополімера стиролу і 100% для поліетилена. За цей період кількість гідролізованої у перерахунку на 1г іммобілізованого препарату сечовини складала від 14 до 100 г.

Вивчена можливість застосування одержаних препаратів для аналізу концентрації сечовини у водних розчинах. З цією метою через колонку з 200 мг іммобілізованої на сополімері стиролу уреазы пропускали проби 10мл розчину сечовини в діапазоні концентрацій  $4 \cdot 10^{-4}$ - $10^{-2}$ М, визначаючи фотометрично за допомогою реактива Несслера кількість аміаку на виході. Побудована за одержаними даними калібрівочна пряма мала коефіцієнт кореляції 0,94-0,99. Рівень конверсії сечовини становив 46-78% для різних концентрацій субстрата, а кількість аналізованих на протязі 14-18 діб без порушення вірогідності зразків становила від 58 до 150 для препаратів з різною активністю, що співвідноситься з описаними в літературі аналізаторами.

Одержані препарати мають високу стабільність при зберіганні як у стабілізованому фосфатно-гліцериновому буфері, так і в сухому вигляді, зберігаючи після 1 року зберігання від 70% до 100% вихідної активності.

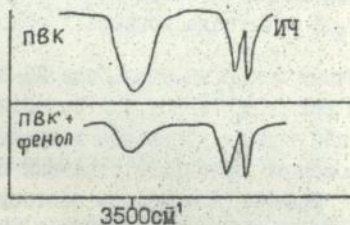
Ковалентні методи іммобілізації дозволяють одержати стабільні препарати, стійкі до дії рН та температури і здатні до тривалої періодичної та безперервної роботи. Однак відносно невисокий ступінь збереження активності при подібних методах фіксації ферментів звертає увагу дослідників до гелю-утворюючих та здатних пластифікуватися полімерів, для яких можливе 100%-не включення ферментів в структуру одержуємих препаратів. Як зразок подібної матриці для іммобілізації уреазі нами досліджений полі-N-вінілкапролактан, здатний до термоосадження з водних розчинів.

Процес включення уреазі у ПВК складався з розчинення фермента у водному розчині полімера з наступним термоосадженням одержаного розчину у фосфатному буфері, рН 6,0-6,5, який містив фенол або резорцин, при 45°C.



$C^{13}$

C=O	C-OH
1,753	16,98
1,926	9,324



Методами ЯМР  $C^{13}$  по збільшенню часу релаксації карбоніла ПВК та зменшенню часу релаксації гідроксила фенола, а також ІЧ-спектроскопії по зменшенню інтенсивності поглинання присутньої у фенольному комплексі ПВК води показана гідрофобна природа взаємодії фенола з ПВК, яка супроводжується витісненням молекули води із сфери сольватації карбонільної групи полі-N-вінілкапролактама, що веде до зміцнення структури полімера і утворення стабільних гранул.

Одержані гранули, які містили включену уреазу, промивали, висушували і зберігали при 3 - 4°C.

Вивчення впливу фенола і резорцина на активність уреазі в ме-

жах застосованих для термоосадження концентрацій (0,05 - 0,5%) показало, що фенол інгібує впливає на фермент, тоді як резорцин не знижує активності уреаз. Тому в подальших дослідженнях для термоосадження ПВК застосовували буферні розчини з резорцином.

Таблиця 3.

Властивості іммобілізованих у ПВК препаратів уреаз.

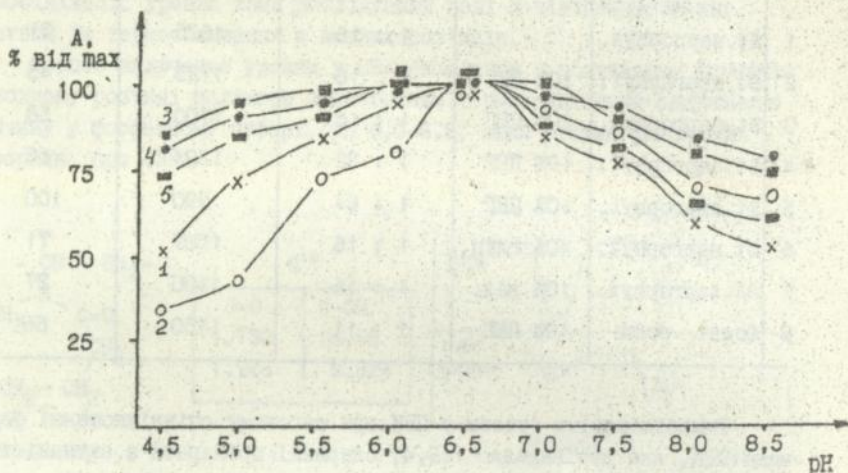
№	Іммобілізований препарат			Активність Од/г	Збереження активності, %
	Уреаза	Добавка	Уреаза:ПВК		
1	St.saprophyt.	-	1 : 16	1625	31
2	St.saprophyt.	10% ПЕГ	1 : 16	1725	45
3	St.saprophyt.	20% ПЕГ	1 : 16	1700	58
4	St.saprophyt.	10% ПЕГ	1 : 32	1394	65
5	St.saprophyt.	10% ПЕГ	1 : 64	990	100
6	St.saprophyt.	40% глиц.	1 : 16	1087	71
7	St.saprophyt.	10% жел.	1 : 16	1100	27
8	Соеві боби	10% ПЕГ	1 : 11	1150	66

Іммобілізацію уреаз у ПВК при ваговому співвідношенні фермент:ПВК, яке дорівнювало 1:6,4, одержані препарати з активністю 1300 Од/г для уреаз із *St. saprophyticus* і 510 Од/г для фермента із соєвих бобів. Шляхом оптимізації співвідношення фермент:ПВК і введення у середовище термоосадження добавок поліетиленгліколя, глицерина або желатина (Табл.3) одержані препарати з активністю до 1725 Од/г і ступенем збереження активності до 100%.

Введення добавок у середовище термоосадження збільшує активність препаратів, напевне, через підвищення в'язкості середовища, що перешкоджає виходу фермента у розчин з гранул, які утворюються. Зменшення вагового співвідношення фермент : ПВК з 1:16 до 1:64 призводить до зниження питомої активності препарату з 1725 до 990 Од/г, однак ступінь збереження активності при цьому зростає з

45% до 100%.

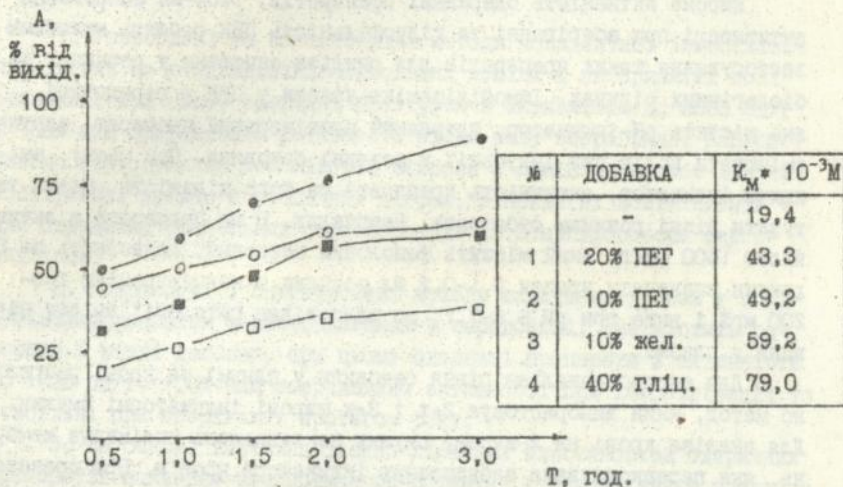
Для одержаних препаратів уреазы досліджено комплекс біохімічних властивостей. При визначенні залежності активності від рН (Мал.4) показано, що включена у ПВК уреазы має більш широкий оптимум рН - від 5,5 до 7,0 ніж нативна. Більшу стабільність іммобілізованих препаратів як в області кислих, так і лужних рН крім компенсуючого впливу закислення середовища на залужуючу дію гідролізу субстрата, як у випадку ковалентно іммобілізованих препаратів, можна зв'язати з буферними властивостями оточуючої фермент полімерної матриці.



Мал. 4. Залежність активності препаратів уреазы із *St.sapr.* (1) та із соєвих бобів (2), іммобілізованих у ПВК (3), ПВК з добавкою ПЕГ (4), 1 у ПВК з ПЕГ (5), відповідно, від рН інкуваційного середовища.

Дослідження термооптимума та термостійкості активності іммобілізованої у ПВК уреазы показано близькість властивостей нативного і включеного ферментів, що свідчить про м'який, нековалентний характер іммобілізації у полі-N-вінілпипіраміди, оскільки при ковалентній іммобілізації термостійкість зростає.

Можливість застосування одержаних гранул з уреезою для розкладу сечовини вивчена в реакторі проточного типу. Показано, що препарат ефективно гідролізує субстрат лише на початковому етапі, потім ступінь конверсії різко падає. Причиною такого різкого падіння активності є вимивання фермента з гранул ПВК. Спеціально проведеними експериментами показано (Мал.5), що вже через півгодини у розчин з гранул переходить від 20 до 50% вихідної активності. Через три години у розчині визначено від 30 до 85% вихідної активності.



Мал. 5. Вимиваємість активності уреазы із *St. carprophyticus* з гранул, іммобілізованих у ПВК у середовищі 20% ПЕГ (1), 10% ПЕГ (2), 10% желатина (3) та 40% глицерина, препаратів.

Для одержаних препаратів методом рН-статкування при 50°C і рН 6,0 визначені кінетичні параметри. Збільшення  $K_m$  при включенні уреазы у ПВК (Мал.5) пояснюється виникненням дифузійних утруднень для проникнення субстрата в структуру полімера, а також різною швидкістю вихода фермента з ПВК у розчин. Це підтверджується тим, що найбільше значення  $K_m$  (79 мМ) спостерігається для препарату, який містить глицерин, і для цього ж препарату встановлено найбільше включення фермента у гранули (71% зберігання активності)

і найменша вимиваємість.

Для препарату уреазу із соєвих бобів таке збільшення  $K_m$  не спостерігається. Це зв'язано з більш низькою активністю фермента, для якого швидкість дифузії сечовини у ПВК та швидкість виходу уреазу з гранул забезпечують здійснення розкладу сечовини у кінетичному режимі.

Одержані препарати зберігають майже 100% вихідної активності при зберіганні протягом 10-12 місяців.

Висока активність одержаних препаратів, 100%-не збереження активності при зберіганні та гідрофільність ПВК роблять можливим застосування таких препаратів для аналізу сечовини у розчинах та біологічних рідинах. Імобілізацією уреазу у ПВК в середовищі, яке містить рН-індикатор, одержаний оригінальний препарат, здатний змінювати колір при інкубації у розчині сечовини. При цьому, змінюючи індикатор, активність препарату та його кількість, можна тестувати різні розчини субстрата. Наприклад, 5 мг препарату з активністю 1500 Од/г, який містить феноловий червоний, дозволяють за 5 хвилин визначати зразок 0,1-0,2 мл розчину з концентрацією 150-200 мг% і вище при рН 6,8-7,1, що відповідає патології вмісту сечовини у плазмі.

Для експрес-аналізу рівня сечовини у плазмі та крові розроблено метод, який використовує 2-х і 3-х шарові індикаторні смужки. Для аналізу крові на 2-шарову смужку наклеювалась полімерна мембрана, яка перешкоджувала забарвленню індикатора кров'ю. При проведенні аналізу зразок досліджуваної рідини (0,02мл) наносився на горішню смужку, яка містила уреазу у стабілізованому розчині ПВК (у випадку крові - на мембрану). Час аналізу становив 4-10 хв., за інтенсивністю забарвлення, яке розвивалось на нижній смужці, що містила індикатор, визначався рівень сечовини в аналізованому зразку, нижня межа чутливості - 50 мг%.

Розроблений нами метод тестування патології вмісту сечовини у плазмі та крові має ряд суттєвих переваг над тими, що зараз приміняються, наприклад, індикаторними смужками "Уреатест" виробництва НВО "Біолар", у яких застосовується газовий метод аналізу, який вимагає 30-ти хвилинної інкубації у термостаті в закритій пробірці, крім того, блідо-блакитне забарвлення, яке розвивається, є малоконтрастним, а строк зберігання смужок "Уреатест" всього 6 місяців.

Індикаторні смужки для визначення сечовини у плазмі та крові пройшли успішні медико-біологічні дослідження на крові хворих та рекомендовані до застосування в амбулаторних умовах та на швидкій допомозі для експрес-аналіза уремічних станів.

Розроблені нами індикаторні системи стабільні і зберігають вихідні параметри після року зберігання.

## В И С Н О В К И

1. Розроблені та оптимізовані методи ковалентної іммобілізації уреаз на стиролдивінілбензолних носіях і на привитих поліетиленах, при цьому одержані препарати з активністю до 2000 Од/г і 100%-ним збереженням активності після року зберігання. Запропоновано застосування сополімерів стирола з дивінілбензолом для іммобілізації уреаз з різними джерелами, а привитих поліетиленів - для одержання фіксованих форм фермента із *Staphylococcus aureus*.

2. Розроблені і оптимізовані методи включення уреаз у полі-N-вінілпипіраміди термоосадженням у середовищі, яке містить резорцин і різні добавки, при цьому одержані препарати з активністю до 1725 Од/г, 100%-ним збереженням активності при іммобілізації та стабільні при зберіганні протягом року.

3. На основі вивчення фізико-хімічних властивостей одержаних препаратів показано розширення рН-оптимуму і стабілізацію уреаз в кислому середовищі, збільшення термостабільності і підвищення значення  $K_m$  при ковалентній іммобілізації фермента за рахунок дифузійного впливу носія.

4. Встановлено, що іммобілізовані на сополімерах стирола з дивінілбензолом та на привитих поліетиленах препарати уреаз гідролізують у колоночному реакторі безперервної дії протягом 15-20 діб розчин сечовини з концентрацією 350 мг% при максимальному ступені гідролізу до 100%, а при періодичному використанні дозволяють одержувати до 150 аналізів розчину сечовини з концентрацією  $10^{-4}$  -  $10^{-2}$  М.

5. На основі включених у ЦБК форм уреаз розроблені індикаторні системи у вигляді гранул та смужок, які дозволяють за 4-10 хв. тестувати вміст сечовини 50 мг% і вище у промислових та біологічних рідинах. Індикаторні смужки для визначення патології вмісту

сечовини у плазмі 1 крові пройшли успішні медико-біологічні дослідження на крові хворих, їх застосування можливе в амбулаторних умовах та на швидкій допомозі для експрес-аналіза уремічних станів.

Основний зміст дисертації викладено в наступних публікаціях:

1. Давиденко Т.И., Севастьянова Е.В., Кошелев С.А., Картель Н.Т. и др. Адсорбция уреазы на углях. // I Белорусская конференция по гемосорбции "Сорбционные методы детоксикации в клинике": Тез. докл., Минск, 1983.- С. 26.

2. Давиденко Т.И., Севастьянова Е.В., Кошелев С.А., Андронати С.А. и др. Иммунизация уреазы для гидролиза мочевины в биологических растворах. // IV Всесоюзный симпозиум "Инженерная энзимология": Тез. докл., М., 1983.- С. 34.

3 Давиденко Т.И., Севастьянова Е.В., Кошелев С.А., Глемжа А.А. и др. Применение иммобилизованной уреазы для сточных вод и биологических жидкостей. // Всесоюзная конференция "Применение ферментов в биологических анализах": Тез. докл., Вильнюс.- 1984.- С. 72.

4. Давиденко Т.И., Севастьянова Е.В., Кошелев С.А., Тарковская И.А. и др. Применение иммобилизованной уреазы для очистки биологических жидкостей. // II Всесоюзная конференция по гемосорбции.: Тез. докл., Ташкент.- 1984.- С. 244-245.

5. Давиденко Т.И., Севастьянова Е.В., Кошелев С.А. Стабилизация уреазы. // Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии.: Тез. докл., Махачкала.- 1986.- С.110.

6. Давиденко Т.И., Севастьянова Е.В., Кошелев С.А., Морозова А.А., Ставицкая С.С. Стабилизация иммобилизованной уреазы. // Конференция "Новые средства и сферы клинического применения сорбционной детоксикации организма".: Тез. докл., Днепропетровск.- 1985.- С. 246-247.

7. Давиденко Т.И., Кошелев С.А., Макарова С.Б. Иммунизация уреазы на стиролдивинилбензолных матрицах. // Химия природ. соедин.- 1986.- №5.- С. 624-629.

8. Давиденко Т.И., Кошелев С.А. Иммунизация уреазы на привитых полиэтиленах. // Биотехнология.- 1988.- 4, №2.- С. 225-230.

9. Кошелев С.А., Давиденко Т.И. Иммунизация уреазы. // Деп. в ВИНТИ, № 3699-В91.- 1991.- 20с.

10. Кошелев С.А., Давиденко Т.И. Бисистемы индивидуального пользования для определения мочевины в биологических и промышленных жидкостях.// Международный конгресс "Сенсорные системы и компоненты".:Тез. докл., С.-Петербург.- 1993.- С. 238.

11. Кошелев С.А., Давиденко Т.И., Кириш Ю.Э., Пашкин И.И. и др. Имобилизация уреазы в поли-N-винилкапролактаме.// Прикл. биохимия и микробиол. (в печати).

Подп. к печати 21.12.93г. Формат 60x84 1/16.  
Объем 0,7уч.изд.л. 1,0п.л. Заказ № 2099. Тираж 50экз.  
Гортипография Одесского управления по печати, цех №3.  
Ленина 49.

AB 28819  
**AB 28.819**