

**Температурная инактивация бутирилхолинэстеразы в крахмальном и желатиновом гелях**

**Научный руководитель – Есимбекова Елена Николаевна**

*Лоншакова-Мукина Виктория Ивановна*

*Аспирант*

Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Кафедра биофизики, Красноярск, Россия

*E-mail: vikoriya777-7@mail.ru*

Бутирилхолинэстераза (ВChE), фермент из группы эстераз, типа гидролаз, активно применяется в ингибиторном анализе, поскольку позволяет на широком круге материалов изучить вопросы субстрат-ингибиторной специфичности и влияния иммобилизации и условий измерения на аналитические характеристики определения ингибиторов. Более того, ВChE является основой многих аналитических систем для контроля остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в продуктах питания. Несмотря на это, остаётся нерешённой проблема недостаточной стабильности ВChE при её использовании и хранении. Одним из основных способов получения стабильных ферментных препаратов ВChE является её иммобилизация в различные носители. Крахмал и желатин, полимеры природного происхождения, образующие вязкие растворы и способные к формированию геля, используются как для создания вязкого микроокружения ферментов, так и для их иммобилизации. Целью настоящей работы является определение механизмов термической инактивации ВChE в крахмальном и желатиновом гелях для определения возможности использования данных полимеров в качестве стабилизаторов молекулы фермента.

Активность ВChE определяли по методу Элмана. Регистрацию оптической плотности раствора проводили при длине волны 412 нм. По изменению оптической плотности во времени вычисляли скорость гидролиза субстрата ВChE - S-бутирилтиохолина йодистого (S-ВChI), по полученным результатам делали вывод об активности фермента. Определение оптической плотности образцов проводилось на спектрофотометре UV-2700 (Shimadzu, Япония).

Проведен анализ температурной инактивации ВChE в температурном диапазоне 50-64 °С. Установлено, что кинетика термоинактивации ВChE в крахмальном (3 %) и желатиновом (1,4 %) гелях имеет принципиально одинаковый характер на всем диапазоне исследуемых в работе температур, наблюдалась кинетика термоинактивации второго порядка, включающая два различных механизма инактивации ВChE, последовательно сменяющих друг друга и протекающих с разными скоростями (быстрая и медленная стадии). Быстрая стадия соответствует процессу диссоциации тетрамерного фермента на мономеры, а медленная стадия - процессу денатурации образовавшихся мономеров.

Используя уравнение Эйринга, были рассчитаны активационные параметры процесса температурной инактивации ВChE.

Для каждой стадии были рассчитаны энтальпия активации  $\Delta H^\ddagger$  и энтропия активации  $\Delta S^\ddagger$ . Энтальпия активации  $\Delta H^\ddagger$  для быстрой и медленной стадий температурной инактивации ВChE в крахмальном геле составила  $61 \pm 3$  и  $22 \pm 2$  ккал/моль соответственно, энтропия активации  $\Delta S^\ddagger$  составила  $136 \pm 12$  и  $-2.03 \pm 0.05$  кал $\cdot$ К $^{-1}$  $\cdot$ моль $^{-1}$ , соответственно. Аналогично значения  $\Delta H^\ddagger$  для ВChE в желатиновом геле составили  $58 \pm 6$ ,  $109 \pm 11$  ккал/моль, и значения  $\Delta S^\ddagger$  составили  $149 \pm 16$  и  $262 \pm 21$  кал $\cdot$ К $^{-1}$  $\cdot$ моль $^{-1}$  соответственно. Крахмальный гель оказывает больший стабилизирующий эффект на ВChE при длительном воздействии высоких температур по сравнению с желатиновым гелем.