

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 (BChE), 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, BChE является основой многих аналитических систем для контроля остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в продуктах питания. Несмотря на это, остаётся нерешённой проблема недостаточной стабильности BChE при её использовании и хранении. Одним из основных способов получения стабильных ферментных препаратов BChE 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 BChE в крахмальном и желатиновом гелях для определения возможности использования данных полимеров в качестве стабилизаторов молекулы фермента.

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

Проведен анализ температурной инактивации BChE в температурном диапазоне 50-64 °С. Установлено, что кинетика термоинактивации BChE 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 BChE, 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 BChE.

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