**Взаимодействие гуминовых кислот со щелочной фосфатазой на границе раздела вода – толуол**

***Павлова М.А., Михайлов Г.С.***

*Студент, 6 курс специалитета*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

*E-mail: maria.pavlova135@mail.ru*

Гуминовые кислоты - сложные природные вещества, имеющие большое положительное влияние на экологию почв, но также проявляющие различное воздействие на биологические молекулы. Щелочная фосфатаза (ЩФ) – один из самых распространенных ферментов в живых организмах, отвечающий за обмен и усвоение фосфора организмами. Это мембранный фермент, который встречается в почве, в частности, в составе бактерий *E.coli*. Изучение влияния гуминовых кислот на коллоидно-химические свойства ЩФ позволит лучше понять происходящие в природе процессы, определить возможность использования гуминовых кислот как защитного или активирующего агента в неблагоприятных для фермента условиях, что может найти применение в сельском хозяйстве или медицинских областях. Исследование проводили в система вода-толуол, моделирующей естественную среду нахождения ЩФ - мембрану клетки.

В данной работе изучали взаимодействие гуминовых кислот (ГК) с ЩФ по изменению таких свойств, как адсорбция на границе раздела вода-толуол, коэффициент распределения, ферментативная активность. Для этого были проведены эксперименты: влияние буферов на поведение ГК в системе вода-толуол, взаимное влияние ЩФ и ГК при распределении в системе раствор-толуол и адсорбции на границе раздела фаз жидкость-жидкость. Было изучено влияние pH (7, 8.4, 10) водной фазы на взаимодействие ГК и ЩФ. Для исследований были взяты ГК «Иркутский гумат» (АгроТех ГУМАТ, Россия), полученные из бурого угля Иркутской области и ЩФ, выделенная из бактерий *E.coli (SibEnzyme, Россия)*. Во всех экспериментах с ЩФ использовали фиксированную концентрацию фермента 30 мкг/мл, концентрацию ГК варьировали от 10 до 50 мкг/мл. Для определения адсорбции и коэффициента распределения использовали меченные тритием вещества, которые получали методом термической активации трития. Концентрации веществ в объёме и на границе фаз определяли с помощью жидкостной сцинтилляционной спектроскопии в варианте сцинтиллирующей фазы. Ферментативную активность ЩФ определяли кинетическим методом по количеству 4-нитрофенола, образующего при гидролизе 4-нитрофенилфосфата в присутствии ЩФ. Для этого раствор 4-нитрофенилфосфата натрия в диэтаноламиновом буфере термостатировали при 37°С, добавляли раствор ЩФ в трис-буфере и фиксировали изменение окраски раствора спектрофотометрически при длине волны 405 нм в течение нескольких минут. За единицу активности брали количество 4-нитрофенола, мкмоль, образующегося за 1 мин при 37°С.

Установлено, что адсорбция ГК в Tris-буфере выше, чем в фосфатном, и составляет 9.24 мг/м2, а коэффициент распределения составляет 5.6×10-3. ЩФ не влияет на адсорбцию и коэффициент распределения ГК. Гумат также практически не влияет на адсорбцию и коэффициент распределения ЩФ, при pH 8.4 эти показатели составляют 0.3 мг/м2 и 3.8×10- 3 соответственно. Также при pH 8.4 с увеличением концентрации ГК относительная ферментативная активность ЩФ повышается в 3 раза.

В результате статистической обработки полученных данных с помощью дисперсионного анализа с применением плана Плакетта – Бермана установлены условия взаимодействия ГК с ЩФ, при которых достигаются максимальные значения адсорбции, коэффициента распределения и относительной ферментативной активности ЩФ: рН 9.25, концентрация ГК 10 мкг/мл.