

Изучение специфического действия
глюкозооксидазы на различные углеводы
(глюкозу, маннозу, ксилозу) методом
спектрофотометрии.

Гарина Ольга
Аксенова Светлана
Б04-901

29 ноября 2021 г.

Содержание

| | | |
|----------|--|----------|
| 1 | Теоретическое введение | 3 |
| 1.1 | Уравнение Михаэлиса-Ментен | 3 |
| 1.2 | Окисление углеводов кислородом под действием глюкозооксидазы | 3 |
| 2 | Практическая часть | 6 |
| 3 | Вывод | 7 |
| 4 | Литература | 7 |

Цель работы: ознакомление с действием ферментов на углеводы с помощью хим. кинетики.

1 Теоретическое введение

1.1 Уравнение Михаэлиса-Ментен

Ферменты как природные катализаторы многочисленных химических превращений, происходящих в живой клетке, обладают уникальными свойствами, прежде всего высокой хемо-, регио-, стереоспецифичностью по отношению к субстрату и типу реакции. Ферментативные реакции протекают в водных средах в мягких условиях при температурах ниже 100°C и при нейтральных значениях pH. Ферменты катализируют превращение либо D-, либо L-изомера субстрата. Например, в рацемической смеси аминокислот фермент аминокорилаза гидролизует только производные L-аминокислот. В продуктах ферментативной реакции содержание одного из энантиомеров (R- или S-; D- или L-) может достигать 99,5 %. Именно регио- и стереоспецифичность биокатализа является его главным отличием от традиционного химического катализа. где E – фер-

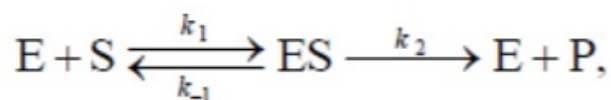


Рисунок 1 – Схема ферментативной реакции

мент, S – субстрат, ES – фермент-субстратный комплекс, P – продукт реакции. Эту схему можно анализировать в квазиравновесном или квазистационарном приближении. Оба подхода приводят к уравнению для скорости реакции, называемому уравнением Михаэлиса – Ментен: где W – начальная скорость реакции,

$$W = \frac{k_2[\text{E}_0][\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} = \frac{W_{\max} \cdot [\text{S}]}{K_M + [\text{S}]},$$

Рисунок 2 – Уравнение Михаэлиса - Ментен

$[\text{E}_0]$ – общая концентрация фермента, $[\text{S}]$ – начальная концентрация субстрата, K_M – комбинация констант k_1 , k_{-1} и k_2 , называемая константой Михаэлиса.

1.2 Окисление углеводов кислородом под действием глюкозооксидазы

Глюкозооксидаза (D-глюкозо-1-оксидаза) – фермент, окисляющий β -D-глюкозу молекулярным кислородом до глюконо-1,5-лактона. При этом образуется перекись водорода. Молекула глюкозооксидазы имеет четвертичную структуру и

состоит либо из двух, либо из четырёх субъединиц в зависимости от источника его выделения (бактерии, плесень). Каждая субъединица содержит одну молекулу прочно связанного кофермента – флавин-аденин динуклеотида (ФАД), непосредственно участвующего в окислительно-восстановительных превращениях субстратов – глюкозы и кислорода.

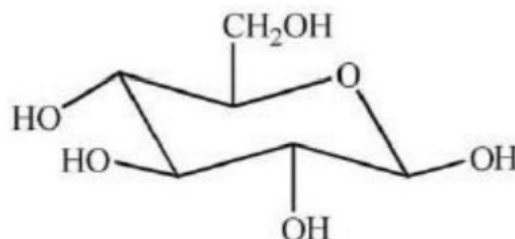


Рисунок 3 – Глюкоза в конформации кресла

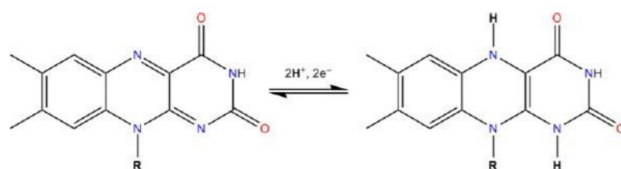


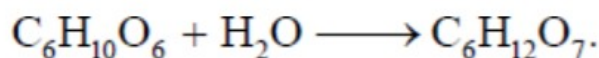
Рисунок 4 – Глюкооксидаза

В процессе реакции ФАД (окисленная форма) принимает два электрона и два протона и восстанавливается до ФАД-Н₂. При взаимодействии ФАД-Н₂ с молекулярным кислородом образуется перекись водорода и ФАД в окисленной форме.

Реакция окисления β-D-глюкозы в глюконо-1,5-лактон под действием глюкозооксидазы протекает с высокой скоростью при комнатной температуре: Об-



разовавшийся глюконо-1,5-лактон в водном растворе самопроизвольно гидролизуется с образованием глюконовой кислоты: Действие глюкозооксидазы можно



представить следующей кинетической схемой: где S – глюкоза, P₁ – глюконолактон, E_{ox} – фермент с окисленной формой кофермента, E_{red} – фермент с восстановленной формой кофермента.

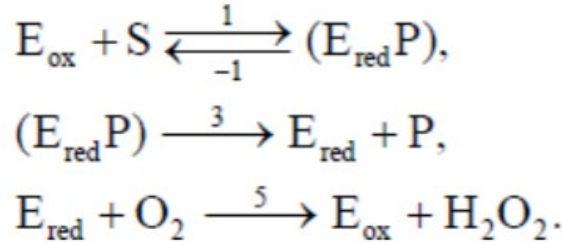
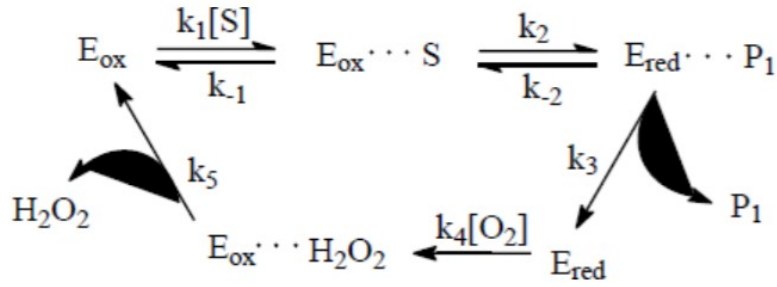


Рисунок 5 – Упрощенная схема реакции

При стационарном протекании реакции $W_3 = W_5$:

$$k_3[E_{\text{red}}P] = k_5[E_{\text{red}}][O_2]. \quad (1)$$

Предположим, что первая стадия является равновесной. Тогда общая концентрация фермента равна:

$$[E_0] = [E_{\text{ox}}] + [E_{\text{red}}] + [E_{\text{red}}P] = \frac{[E_{\text{red}}P]}{K_1[S]} + \frac{k_3[E_{\text{red}}P]}{k_5[O_2]} + [E_{\text{red}}P]. \quad (2)$$

Скорость реакции равна скорости образования продукта P: Если принять кон-

$$W = \frac{d[P]}{dt} = k_3[E_{\text{red}}P] = \frac{k_3[E_0]}{\frac{1}{K_1[S]} + \frac{k_3}{k_5[O_2]} + 1} = \frac{k_3[E_0][S]}{\frac{1}{K_1} + \left(\frac{k_3}{k_5[O_2]} + 1\right)[S]}.$$

$$W = \frac{k_3[E_0][S]}{K_1^{-1} + [S]}, \quad W_{\text{max}} = k_3[E_0],$$

$$W = \frac{k_5[O_2][E_0][S]}{k_5[O_2]/k_3 K_1 + [S]}, \quad W_{\text{max}} = k_5[O_2][E_0].$$

центрацию O_2 постоянной, то оба уравнения по форме совпадают с классическим уравнением Михаэлиса – Ментен для односубстратной реакции.

2 Практическая часть

Для определения специфичности фермента глюкозооксидазы используют набор углеводов (глюкозу, маннозу, ксилозу) и сравнивают скорости ферментативного окисления этих субстратов растворённым кислородом из воздуха.

Необходимое оборудование и материалы

- мерная колба на 250 мл – 1 шт.;
- стакан на 250 мл – 1 шт.;
- стаканчики на 25 мл – 4 шт.;
- рН-метр;
- UV-VIS спектрофотометр РВ 2201 или аналогичный,
- кварцевая кювета толщиной 1 см;
- автоматические микропипетки на 20 мкл;
- набор углеводов;
- калий фосфорнокислый однозамещённый;
- калий йодистый.

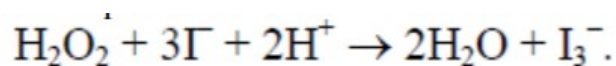
Готовые растворы

- 9 %-й раствор молибдата натрия;
- 0,1 М раствор NaOH;
- раствор глюкозооксидазы (хранится в холодильнике);
- стандартный раствор с известным рН для калибровки рН-метра.

Запись кинетических кривых проводят на спектрофотометре (вкладка “Кинетика”, режим поглощения, время накопления “малое”, время съёмки спектра - 40 минут, периодичность - 1 сек.) на длине волны $\lambda = 390$ нм. Значение температуры термостата (кнопка “Т” на нижней панели программы управления спектрофотометром) устанавливается равным 30 С. В кварцевую кювету помещают: – 0,8 мл 10 %-го раствора углевода; – 1,0 мл KI-реактива; – 1,2 мл буферного раствора рН 6,0. Общий объём раствора в кювете составляет 3 мл.

Автоматической микропипеткой вносят 20 мкл раствора фермента, интенсивно перемешивают и записывают кинетическую кривую.

Выделившаяся в результате ферментативной реакции перекись водорода взаимодействует с KI-реактивом: В результате образуется I_3^- , который обладает интенсивным поглощением в ближней УФобласти. В максимуме линии поглощения при 350 нм коэффициент экстинкции $\varepsilon = 2,5 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹, при 390



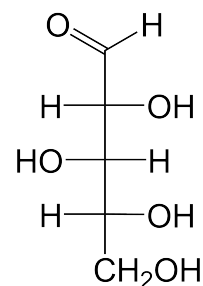
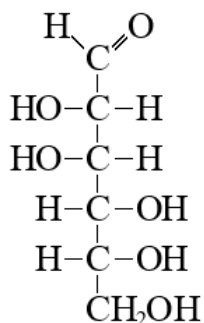
нм коэффициент экстинкции приблизительно равен $3 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Снятие кинетических кривых не на максимуме поглощения, а на спаде обусловлено спецификой работы данной модели спектрофотометра.

| Субстрат | Начальная скорость реакции, моль H_2O_2 в 1 мин на 1 мкл раствора фермента | Относительная активность % |
|--------------------|--|----------------------------|
| β -D-глюкоза | 9.565 | 100 |
| Манноза | 1.522 | 15.91 |
| Ксилоза | 0.897 | 9.38 |

Таблица 1 – Результаты измерений

3 Вывод

В результате эксперимента были получены результаты, рассчитанные по графикам (6 - 12) и приведенные в таблице 1. По этим данным можно сделать следующий вывод о специфичности действия глюкооксидазы: она обладает абсолютной специфичностью только к глюкозе, то есть ферментативная реакция идет точно так как представлено на рис (1); маннозу и, особенно, ксилозу этот фермент окисляет медленно. На рисунке ниже слева представлена манноза, справа - ксилоза.



4 Литература

1. Методические указания к лабораторной работе 5

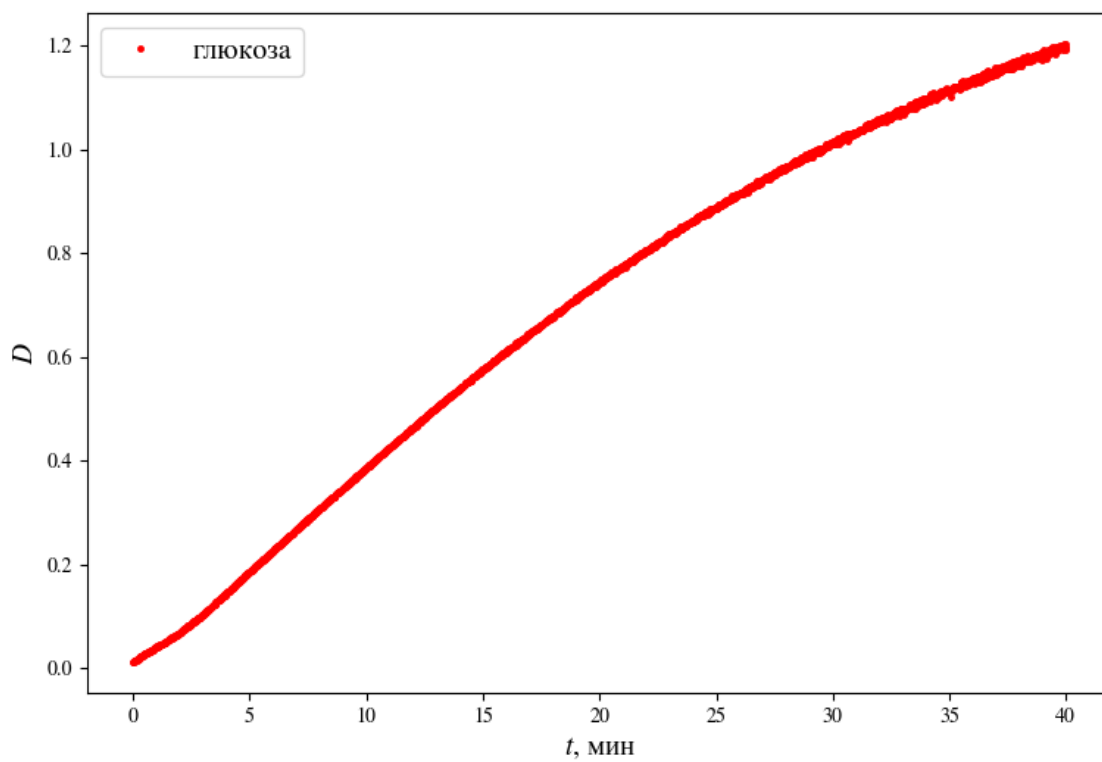


Рисунок 6 – Зависимость D от времени для глюкозы

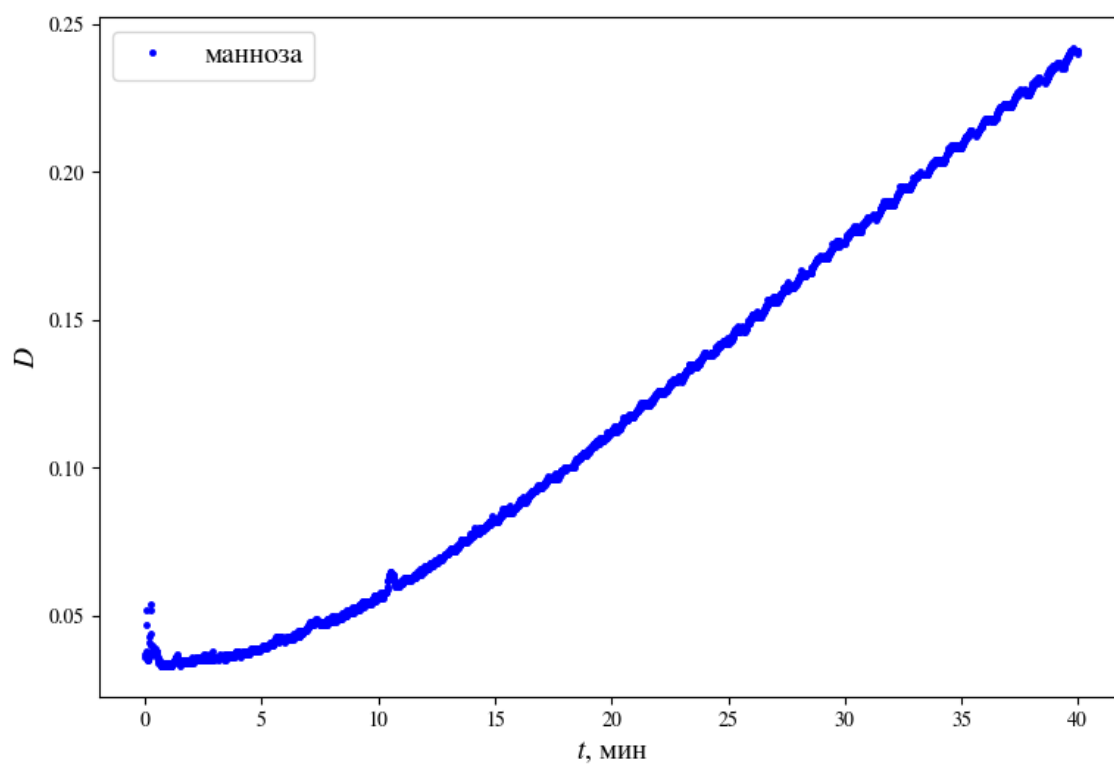


Рисунок 7 – Зависимость D от времени для маннозы

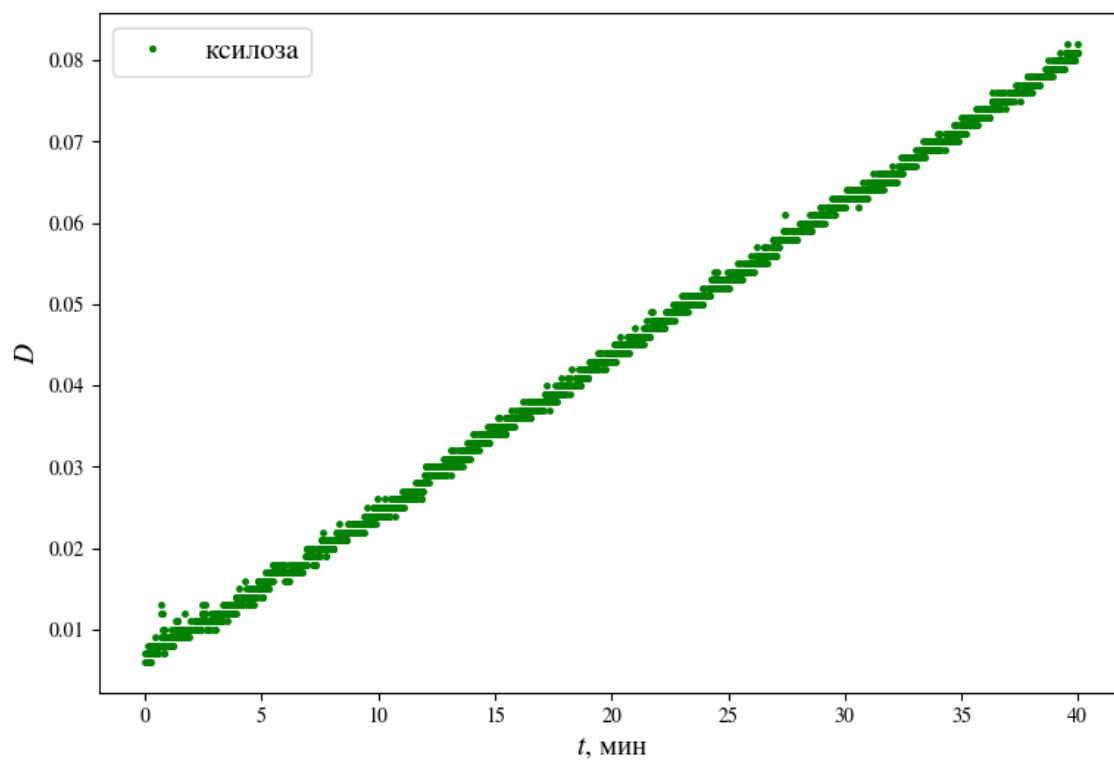


Рисунок 8 – Зависимость D от времени для ксилозы

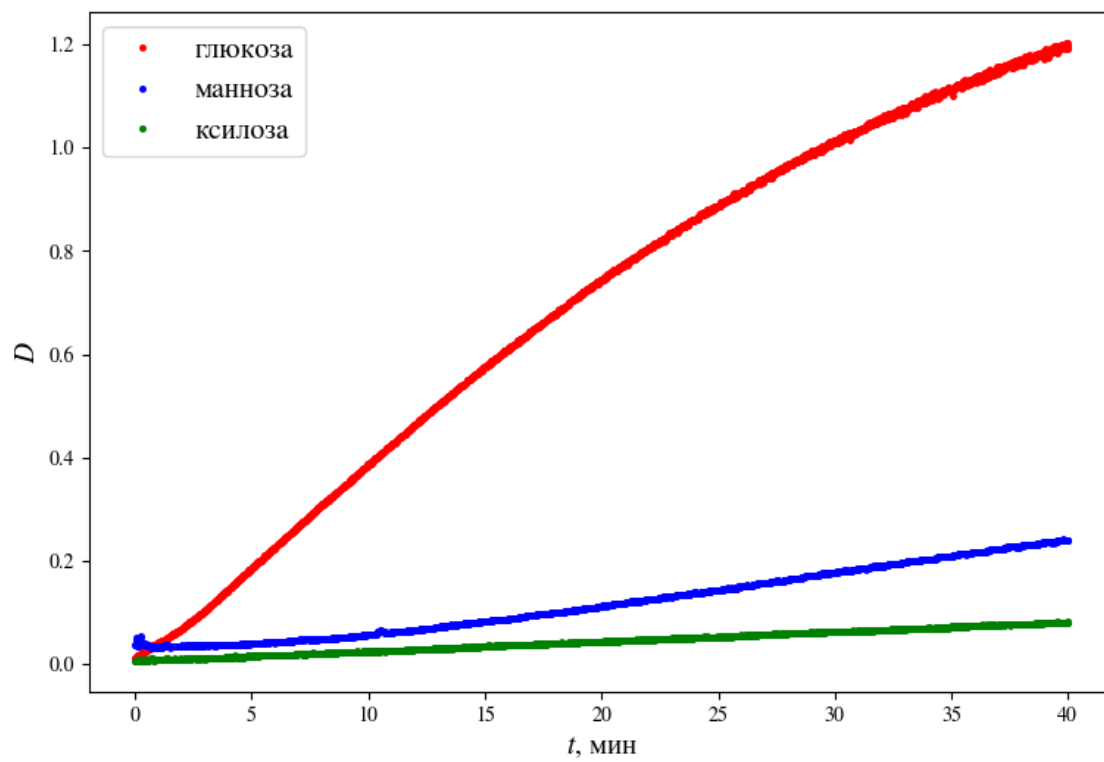


Рисунок 9 – Общий график

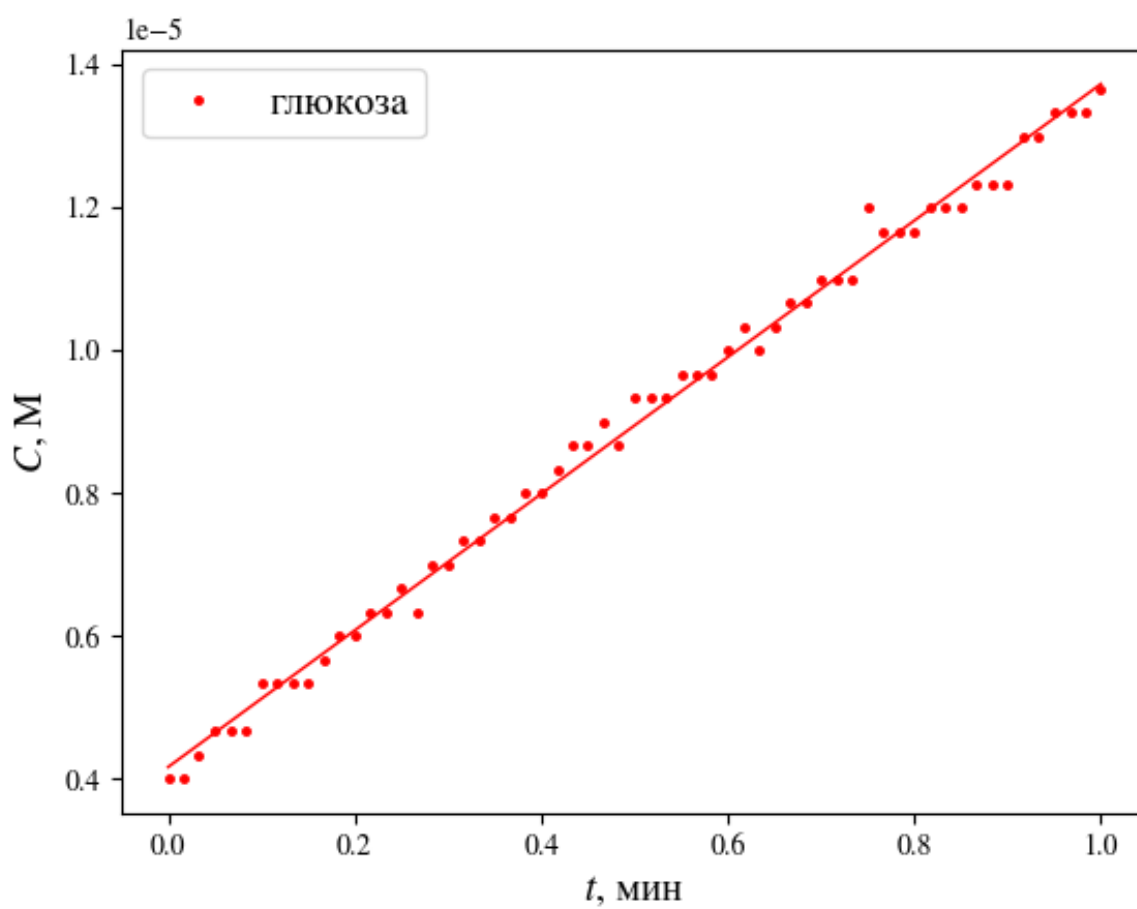


Рисунок 10 – Зависимость концентрации I_3 от времени для глюкозы

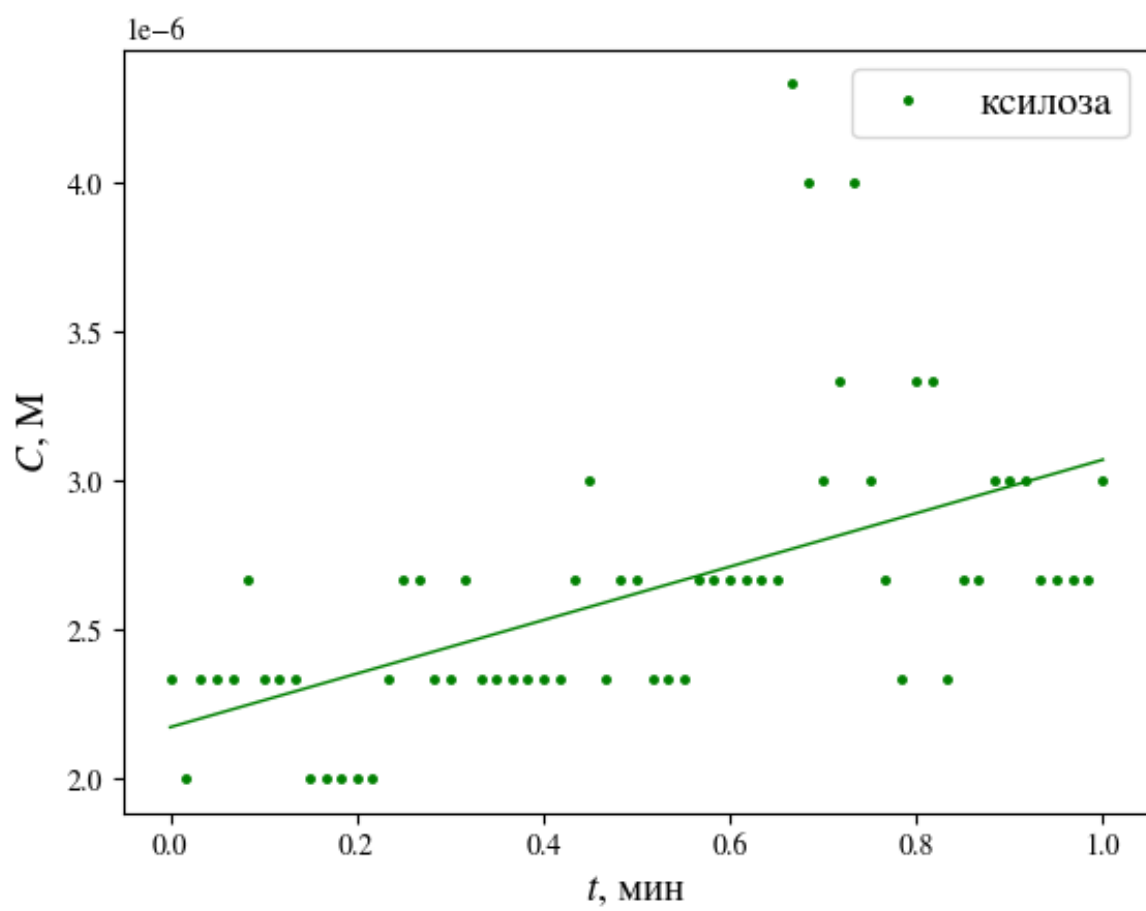


Рисунок 12 – Зависимость концентрации I_3 от времени для ксилозы