

**Изучение селективности глюкозооксидазы в
окислении различных углеводов методом
спектрофотометрии.**

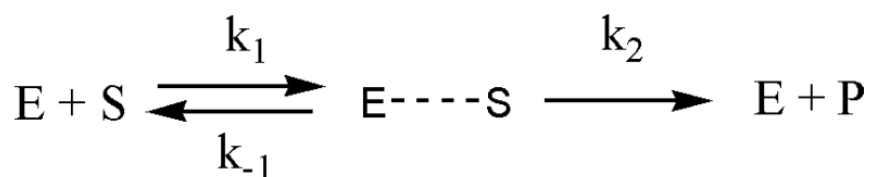
Беляев Юрий
Борисов Павел
Фейзрахманов Эмир
Группа Б04-202

**МФТИ
2024**

Теоретическая часть

Ферменты (энзимы) – это сложные белковые молекулы, ускоряющие многочисленные химические превращения в живых клетках, т.е. являющиеся природными катализаторами. Ферменты обладают высокой хемо-, регио-, стереоспецифичностью по отношению к субстрату и типу реакции. Они также очень чувствительны к значению pH, поэтому применение буферного раствора зачастую необходимо для проведения реакций, катализируемых энзимами.

Схема ферментативной реакции для простейшего односубстратного случая имеет вид



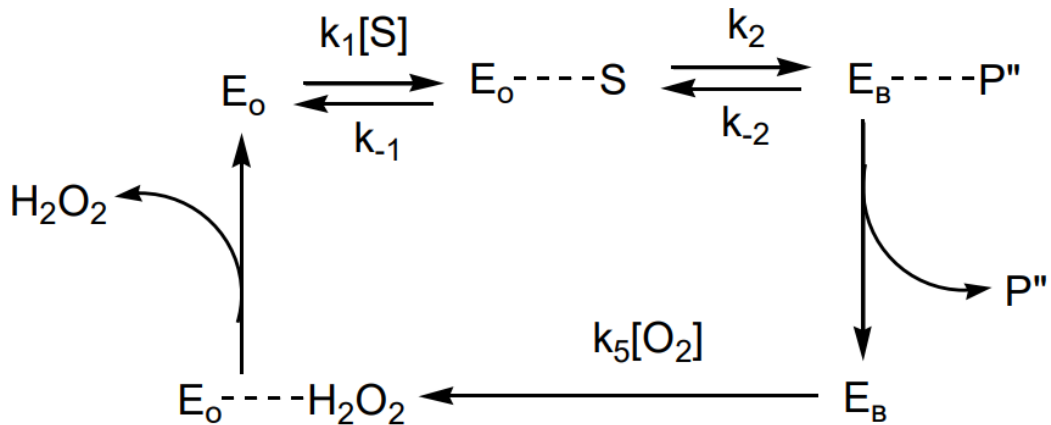
Где E – фермент (энзим), S – субстрат, E–S – фермент-субстратный комплекс, P – продукт реакции.

$$W = \frac{k_2[E_{\text{п}}][S]}{K_M + [S]} = \frac{W_{\text{max}} * [S]}{K_M + [S]}$$

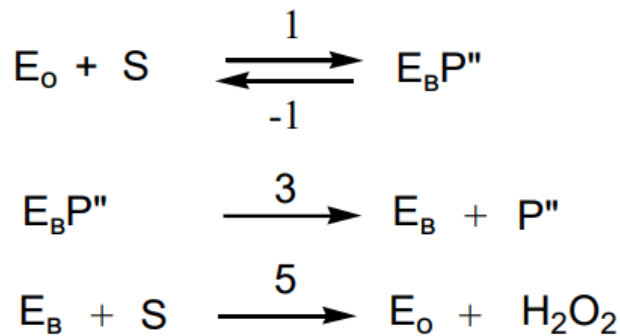
Для анализа подобной схемы можно применить квазиравновесное приближение. Это приводит к уравнению для скорости реакции, называемому уравнением Михаэлиса-Ментен. Оно описывает зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, где W – скорость реакции, $[E_{\text{п}}]$ – общая концентрация фермента, [S] – концентрация субстрата, K_M – константа Михаэлиса, являющаяся комбинацией констант k_1 , k_{-1} и k_2 .

Постулируется, что ферментативные реакции окисления, которые мы будем изучать, протекают по так называемому «пинг-понг» механизму. Данный механизм предполагает постадийность с последовательным присоединением сначала первого субстрата

(например, глюкозы), затем второго субстрата (кислорода), без образования тройного фермент-субстратного комплекса:



где например, S – глюкоза, P'' – глюконолактон, E₀ – фермент с коферментом FAD в окисленной форме, E_B – фермент с коферментом FADH₂ в восстановленной форме. Эта же схема в упрощённом виде:



Предполагая первую стадию равновесной, получаем выражение общей концентрации фермента

$$[E_{\text{п}}] = [E_0] + [E_B] + [E_0 \cdots P''] = [E_0 \cdots P''] / K_1[S] + k_3[E_0 \cdots P''] / k_5[O_2] + [E_0 \cdots P'']$$

Скорость реакции равна скорости образования продукта P:

$$W = \frac{d[P]}{dt} = k_3[E_0 \cdots P''] = \frac{k_3[E_{\text{п}}]}{1/K_1[S] + k_3/k_5[O_2] + 1} = \frac{k_3[E_{\text{п}}][S]}{1/K_1 + (k_3/k_5[O_2] + 1)[S]}$$

$$\text{При } \left(\frac{k_3}{k_5[O_2]} \ll 1 \right) \text{ имеем } W = \frac{k_3[E_{\text{п}}][S]}{K_1^{-1} + [S]}; W_{\text{max}} = k_3[E_{\text{п}}]$$

$$\text{При } \left(\frac{k_3}{k_5[O_2]} \gg 1 \right) \text{ имеем } W = \frac{k_5[E_{\text{п}}][O_2][S]}{\frac{k_3}{k_5[O_2]} + [S]}; W_{\text{max}} = k_5[E_{\text{п}}][O_2]$$

Если принять, что концентрация кислорода постоянна, то оба уравнения по форме совпадают с классическим уравнением Михаэлиса-Ментен для односубстратной реакции.

Практическая часть

Цель работы: изучить хемо- и стереоспецифичность ферментативного катализа по отношению к ряду биологически важных углеводов.

Оборудование: мерная колба 250 мл – 1 шт.,

стакан на 250 мл – 1 шт.,

стаканчики на 25 мл – 4 шт.,

pH метр,

спектрофотометр UV-VIS PB 2201 Solar,

кварцевые кюветы толщиной 1 см,

автоматические микропипетки

Необходимые реактивы: набор углеводов: глюкоза, манноза и ксилоза;

дигидрофосфат калия,

калий йодистый,

9%-й раствор молибдата натрия,

0,1 М раствор NaOH,

раствор глюкозооксидазы

Выполнение работы

Приготовление 0,05 М фосфатного буфера pH 6,0

1,71 г дигидрофосфата калия растворяем в 200 мл

дистиллированной воды в химическом стакане. pH полученного

буферного раствора доводим 1 М раствором NaOH до значения 6,0.

Содержимое стакана переносим в мерную колбу на 250 мл и

доводим до метки дистиллированной водой.

Приготовление реактива йодида (I-реактив)

Растворим 0,83 г йодид калия в 8 мл буферного раствора pH 6,0,

добавим 2 мл 9%-го раствора молибдата натрия, перемешаем. KI-реактив должен быть приготовлен непосредственно перед опытом.

Приготовление 10%-х растворов углеводов

Раствор 0,5 г углевода (ксилоза, маннозы или глюкозы) в 5 мл буферного раствора pH 6,0.

В кварцевую кювету помещаем:

0,4 мл 10%-го раствора углевода,

0,5 мл I-реактива,

1,1 мл буферного раствора рН 6,0

Вводим в кювету 20 мкл раствора фермента, интенсивно перемешиваем и записываем кинетическую кривую на протяжении 10 минут при 28°C. Повторяем эксперимент 2 раза для всех углеводов.

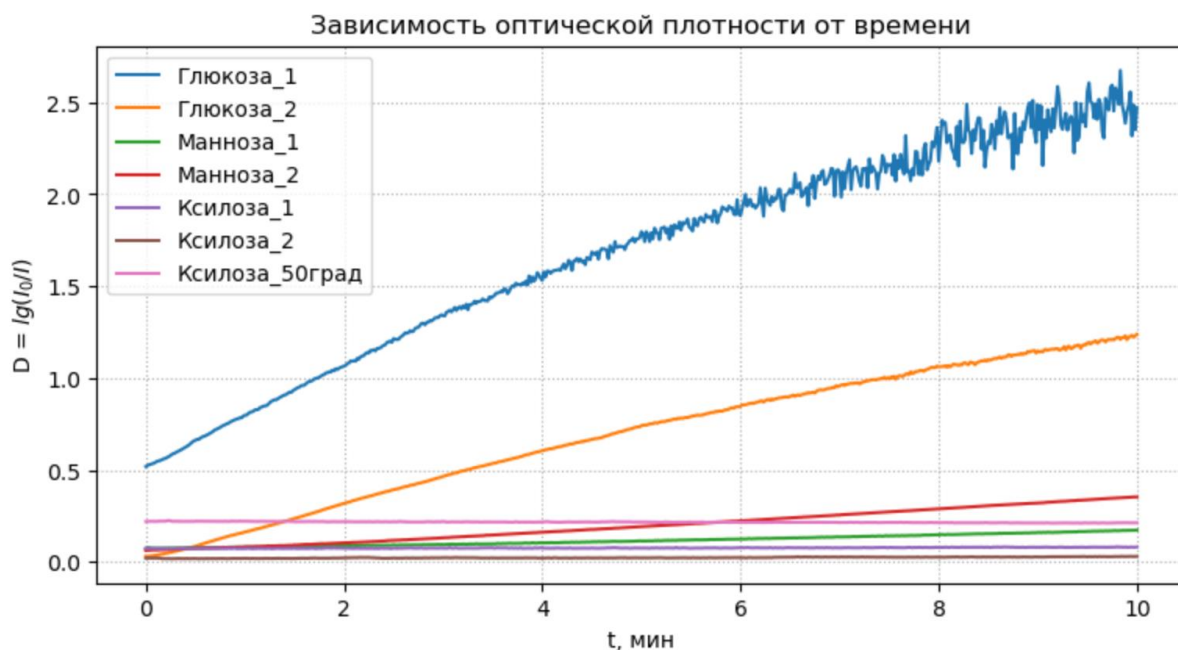
Выделившаяся в результате ферментативной реакции перекись водорода взаимодействует с I-реактивом с образованием трийодид аниона I_3^- :

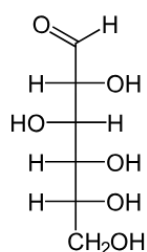
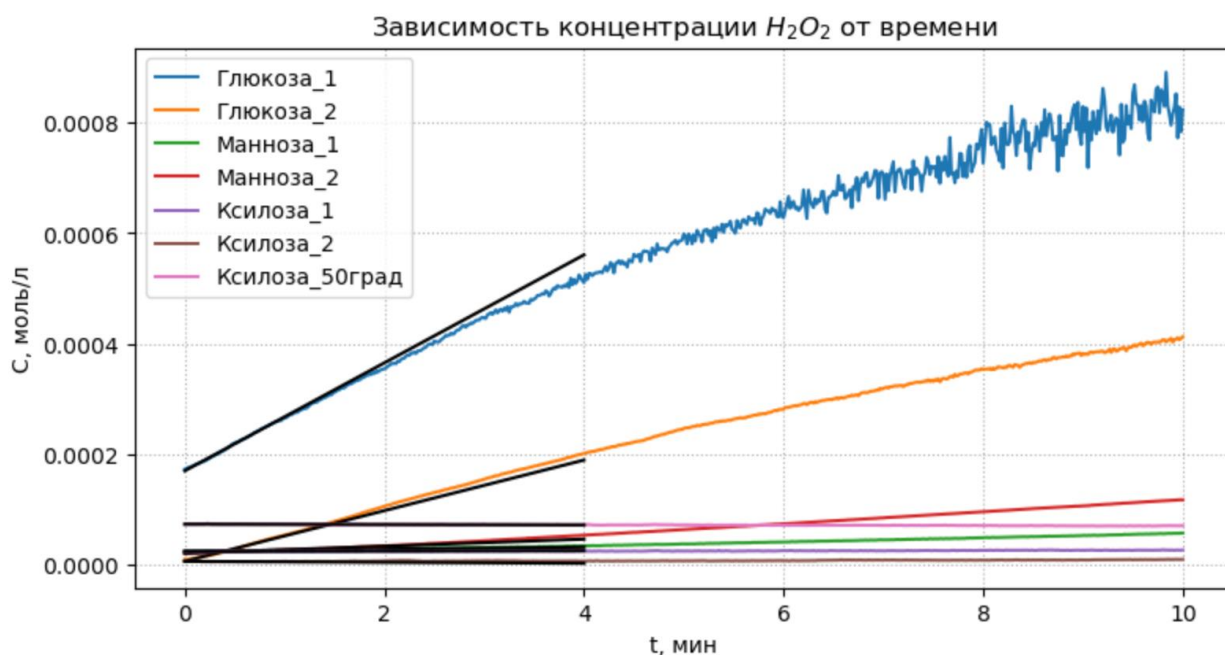


Трийодид (I_3^-) обладает интенсивным поглощением в ближней УФ-области. При 390 нм коэффициент экстинкции $\varepsilon \approx 3 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

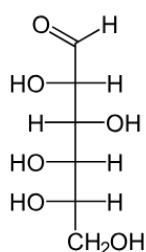
Результаты записываем в таблицу:

Субстрат	Начальная скорость реакции, моль H_2O_2 в мин на 1 мкл р-ра ГО	Относительная активность
Глюкоза (1)	$9,75 \cdot 10^{-9}$	100%
Глюкоза (2)	$4,57 \cdot 10^{-9}$	46,9%
Манноза (1)	$1,94 \cdot 10^{-10}$	1,99%
Манноза (2)	$6,37 \cdot 10^{-10}$	6,53%
Ксилоза (1)	$3,15 \cdot 10^{-11}$	0,32%
Ксилоза (2)	0	0%
Ксилоза (50°C)	0	0%

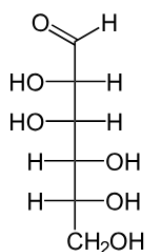




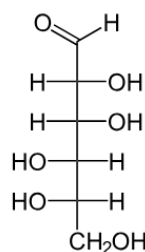
D-Glucose



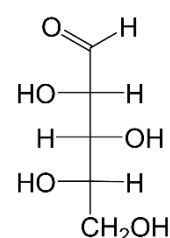
L-Glucose



D-Mannose



L-Mannose



L-Xylose

Вывод

Глюкозооксидаза обладает высокой хемо- и региоспецифичностью. Она отлично катализирует реакцию окисления глюкозы, но слабо проводит реакцию окисления маннозы и ксилозы (относительные активности равны соответственно 4,26% и 0,16%). Однако можно заметить, что данный опыт не является точным: для двух идентичных опытов скорость реакции различается в 2-3 раза. Это объясняется тем, что нельзя количественно определить «степень распространения» фермента в растворе. А также нельзя зафиксировать начало реакции. Но оценить величины скоростей реакции в пределах порядка можно.