

МОСКОВСКИЙ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

ОТЧЕТ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ
(ДАТА ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ: 27.09.2024)

Изучение селективности глюкозооксидазы в окислении различных углеводов методом спектрофотометрии

выполнили студенты группы Б04-202

Гомзин Александр

Горячев Арсений

Игумнов Дмитрий

Долгопрудный, 2024 г.

Содержание

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Аннотация | 2 |
| 2 | Теоретические сведения | 2 |
| 2.1 | Уравнение Михаэлиса — Ментен | 2 |
| 2.2 | Ферментативное окисление углеводов кислородом в присутствии глюкозооксидазы | 3 |
| 3 | Методика измерений | 5 |
| 4 | Используемое оборудование и материалы | 6 |
| 5 | Результаты измерений | 7 |
| 5.1 | Первичные данные | 8 |
| 6 | Обработка данных | 9 |
| 7 | Выводы | 14 |

1 Аннотация

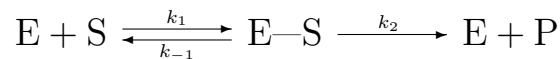
Ферменты (энзимы) — это сложные белковые молекулы, являющиеся природными катализаторами. Ферменты обладают высокой хемо-, регио-, и стереоспецифичностью по отношению к субстрату и типу реакции. Исследуемая в данной работе глюкозооксидаза активно применяется в клинических анализах для определения концентрации глюкозы в крови.

Цель работы: сравнение скоростей окисления трех моносахаридов (глюкозы, маннозы, ксилозы) растворенным кислородом воздуха в присутствии глюкозооксидазы.

2 Теоретические сведения

2.1 Уравнение Михаэлиса — Ментен

Схема ферментативной реакции в простейшем односубстратном случае может быть представлена следующим образом:



где E — фермент, S — субстрат, $E-S$ — фермент-субстратный комплекс, P — продукт реакции.

Выпишем выражение для скорости изменения концентрации фермент-субстратного комплекса:

$$\frac{d[E-S]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[E-S]$$

Для фермент-субстратного комплекса обычно применимо квазистационарное приближение: $\frac{d[E-S]}{dt} \approx 0$, т.к. в большинстве реакций скорость образования конечного продукта из комплекса много больше скорости образования самого комплекса.

Фермент, исходно находившийся только в свободной форме, в процессе реакции может находиться как в виде свободных молекул, так и в виде комплекса:

$$[E]_0 = [E] + [E-S]$$

Подставим в предыдущее уравнение:

$$\frac{d[E-S]}{dt} = k_1[E]_0[S] - (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[E-S] \approx 0$$

$$[E-S] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}$$

Скорость ферментативной реакции:

$$w = k_2[E-S] = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]}{k_1 [S] + k_{-1} + k_2} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} = \frac{w_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

где $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ — константа Михаэлиса.

2.2 Ферментативное окисление углеводов кислородом в присутствии глюкозооксидазы

Глюкоза — моносахарид из класса альдогексоз. Фрагмент глюкозы входит в состав множества природных олиго- и полисахаридов, таких как сахароза, крахмал или целлюлоза.

В природе встречается только D-глюкоза. Также различают α - и β -формы (*аномеры*), отличающиеся пространственным расположением полуацетального гидроксила в закрытой циклической форме. В водных растворах при нормальных условиях глюкоза состоит из смеси аномеров: α (36%) и β (64%). Самый термодинамически устойчивый таутомер — β -D-глюкоза в *конформации кресла*.

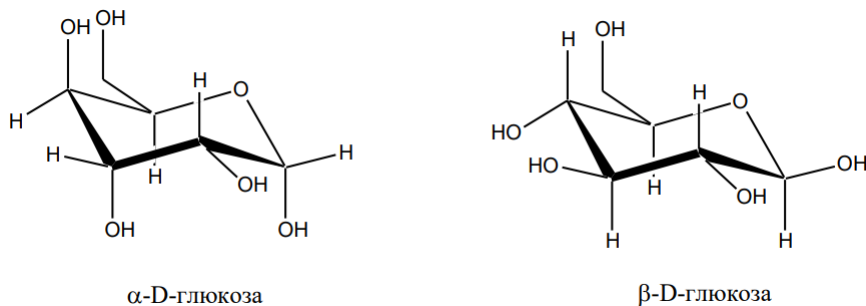


Рис. 1: Аномеры D-глюкозы в конформации кресла.

Глюкозооксидазы (D-глюкозо-1-оксидазы) — это ферменты различного происхождения, окисляющие β -D-глюкозу молекулярным кислородом до глюконо-1,5-лактона. В процессе этой трансформации образуется также перекись водорода.

Глюкозооксидазы выделены из бактерий, плесневых грибов и т.д. Молекула глюкозооксидазы имеет *четвертичную структуру*. Этот фермент состоит, как правило, из двух субъединиц (*рис. 2*).

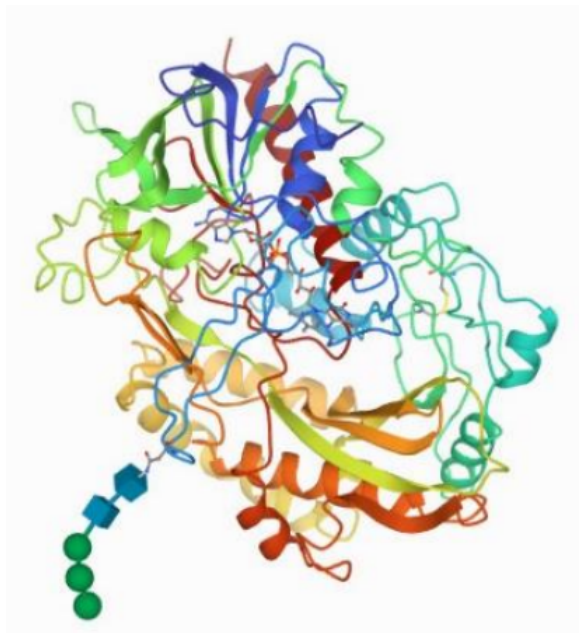


Рис. 2: 3D-структура глюкозооксидазы плесневого гриба *Aspergillus Niger*.

Каждая субъединица содержит одну молекулу *флавинадениндинуклеотидфосфата* (ФАД). Именно этот фрагмент энзима ответствен за окислительно-восстановительные превращения субстратов — глюкозы (углеводов) и кислорода.

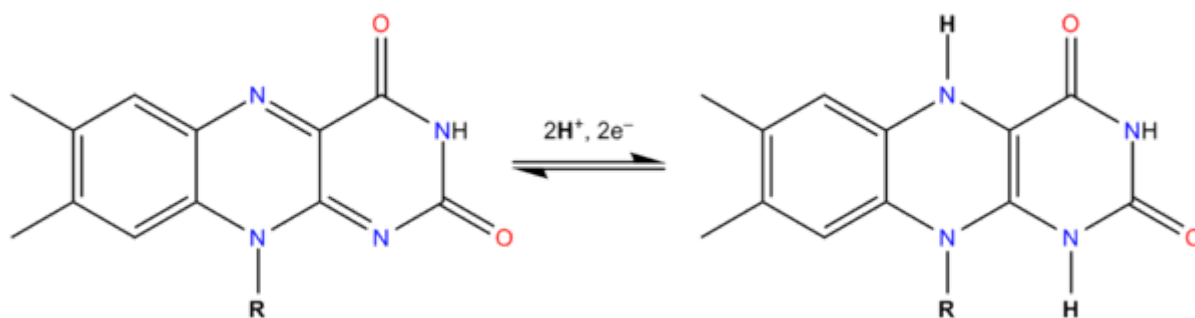


Рис. 3: Трансформация ФАД \rightleftharpoons ФАДН₂.

В процессе трансформации ФАД восстанавливается до ФАДН₂, принимая два электрона и два протона. При взаимодействии ФАДН₂ с молекулярным кислородом образуется перекись водорода и регенерируется ФАД в окисленной форме.

Ферментативное окисление β -D-глюкозы до глюконо-1,5-лактона в присутствии глюкозо-зooksидазы протекает с высокой скоростью уже при комнатной температуре (25 °C):

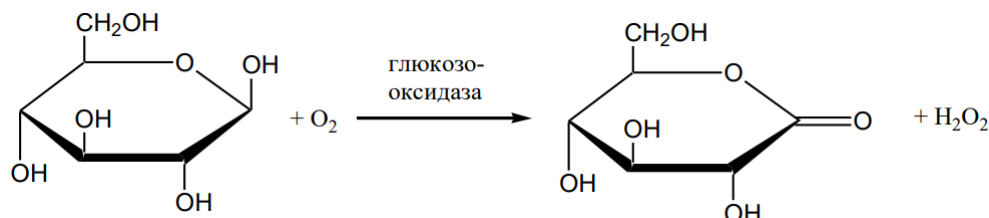


Рис. 4: Ферментативное окисление глюкозы до лактона.

Образующийся глюконо-1,5-лактон гидролизуется водой в условиях реакции до глюконовой кислоты:

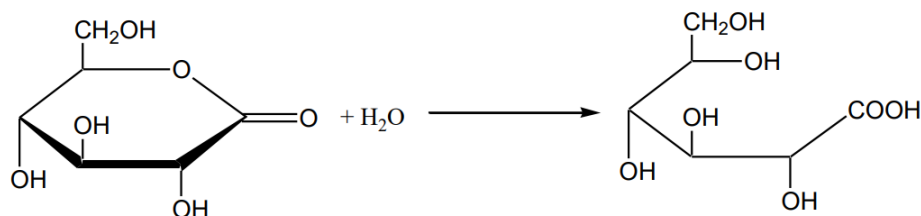


Рис. 5: Гидролиз лактона.

Постулируется, что реакция протекает по т.н. *пинг-понг*-механизму. Он предполагает поэтапность с последовательным присоединением сначала первого субстрата (глюкозы), затем второго (кислорода), без образования тройного фермент-субстратного комплекса:

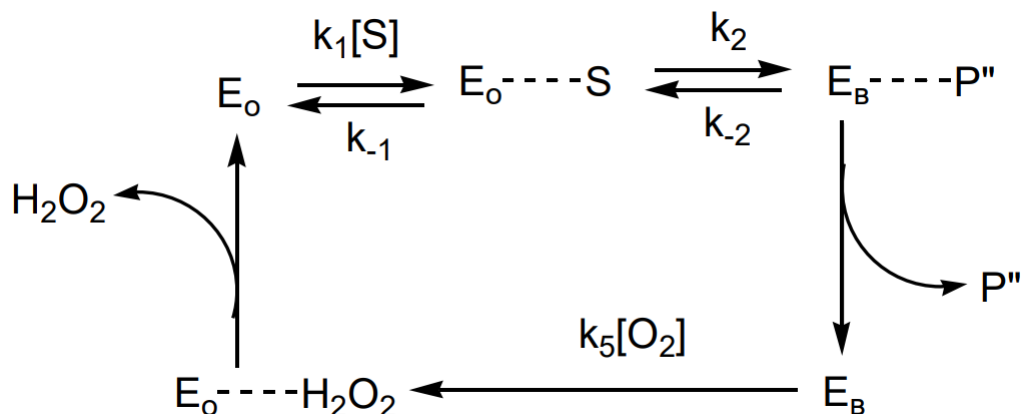
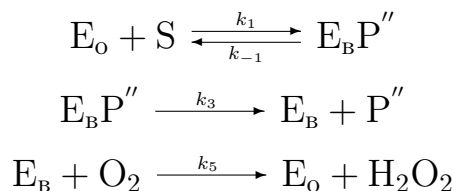


Рис. 6: Пинг-понг-механизм.

где S — глюкоза, P'' — глюконолактон, E_o — фермент с коферментом ФАД в окисленной форме, E_B — фермент с коферментом ФАДН₂ в восстановленной форме.

Та же схема в упрощенном виде:



Предполагаем первую стадию равновесной:

$$\begin{aligned} K_1 &= \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[E_B P'']}{[E_o][S]} \\ \frac{d[E_B]}{dt} &= k_3[E_B P''] - k_5[O_2][E_B] \approx 0 \\ [E_B] &= \frac{k_3[E_B P'']}{k_5[O_2]} \end{aligned}$$

Выразим полную концентрацию фермента:

$$[E]_0 = [E_o] + [E_B] + [E_B P''] = \frac{[E_B P'']}{K_1[S]} + \frac{k_3[E_B P'']}{k_5[O_2]} + [E_B P'']$$

Скорость реакции — скорость образования продукта P'':

$$w = \frac{d[P'']}{dt} = k_3[E_B P''] = \frac{k_3[E]_0}{\frac{1}{K_1[S]} + \frac{k_3}{k_5[O_2]} + 1} = \frac{k_3[E]_0[S]}{\frac{1}{K_1} + \left(\frac{k_3}{k_5[O_2]} + 1\right)[S]}$$

Рассмотрим предельные случаи:

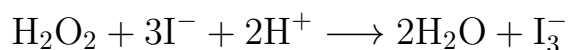
- $\frac{k_3}{k_5[O_2]} \ll 1$: $w = \frac{k_3[E]_0[S]}{\frac{1}{K_1} + [S]}$; $w_{max} = k_3[E]_0$
- $\frac{k_3}{k_5[O_2]} \gg 1$: $w = \frac{k_5[E]_0[O_2][S]}{\frac{k_5[O_2]}{k_3 K_1} + [S]}$; $w_{max} = k_5[E]_0[O_2]$

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

3 Методика измерений

Запись кинетических кривых проводится на спектрофотометре Solar (время съемки — 15 мин, шаг — 1 с) на 390 нм. С помощью термостата устанавливается температура 30°C. Для каждого углевода кинетика записывается 2 раза. Методика приготовления рабочего раствора в кювете описана в следующем пункте. Здесь отдельно отметим, что **очень важно достичь равномерного распределения фермента по раствору**.

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



Трийодид обладает интенсивным поглощением в ближней УФ-области. В максимуме линии поглощения при 350 нм коэффициент экстинкции $\varepsilon = 2.5 \cdot 10^4 \frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{см}}$, а при 390 нм $\varepsilon \approx 3 \cdot 10^3 \frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{см}}$. Результаты измерений записываются в таблицу.

4 Используемое оборудование и материалы

Оборудование и лабораторное стекло:

- мерная колба на 250 мл – 1 шт.;
- стакан на 250 мл – 1 шт.;
- стаканчики на 25 мл – 4 шт.;
- рН-метр;
- UV-VIS спектрофотометр или аналогичный;
- кварцевая кювета толщиной 1 см;
- автоматические пипетки на 20 мкл;

Реактивы:

- набор углеводов;
- дигидрофосфат калия;
- кали йодистый;
- раствор молибдата натрия (9%);
- раствор NaOH (0.1 М);
- раствор глюкозооксидазы (хранится в холодильнике);
- стандартный раствор с известным рН — для калибровки рН-метра;

1 Приготовление 0.05 М фосфатного буфера рН 6.0:

Перед началом опыта рН-метр проверяется по стандартному раствору с известным рН (25°C). 1.71 г дигидрофосфата калия растворяются в 200 мл воды в химическом стакане. рН полученного буферного раствора доводится 1 М NaOH до значения 6.0. Содержимое стакана переносят в мерную колбу на 250 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

2 Приготовление реактива йодида (I-реактив):

0.83 г йодида калия растворяются в 8 мл буферного раствора рН 6.0, добавляются 2 мл 9% раствора молибдата натрия, полученный раствор перемешивается. KI-реактив готовится непосредственно перед опытом и использоваться в течение одного занятия.

3 Приготовление 10% растворов углеводов:

0.5 г углевода (ксилозы, маннозы или глюкозы) растворяются в 5 мл буферного раствора рН 6.0.

4 **Рабочий раствор** для измерения скорости ферментативной реакции готовится непосредственно в кювете спектрофотометра. Для этого в кювете смешиваются приготовленные заранее реагенты (0.5 мл I-реактива, 0.4 мл раствора углевода, 1.1 мл буферного раствора + 20 мкл фермента при интенсивном перемешивании).

5 Результаты измерений

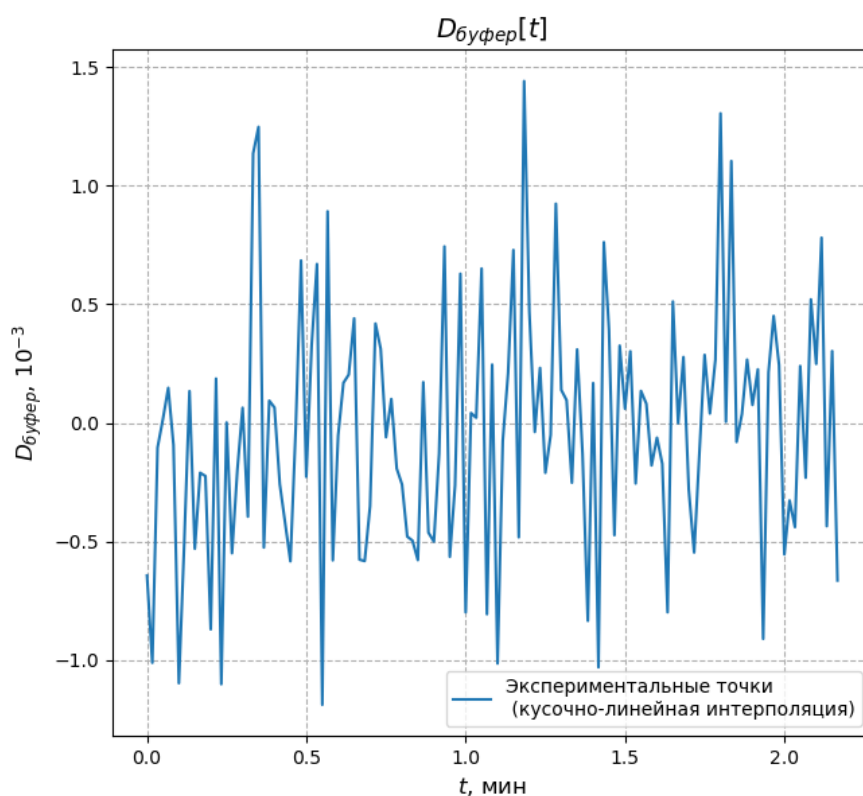


Рис. 7: Базовая линия (буферный раствор).

5.1 Первичные данные

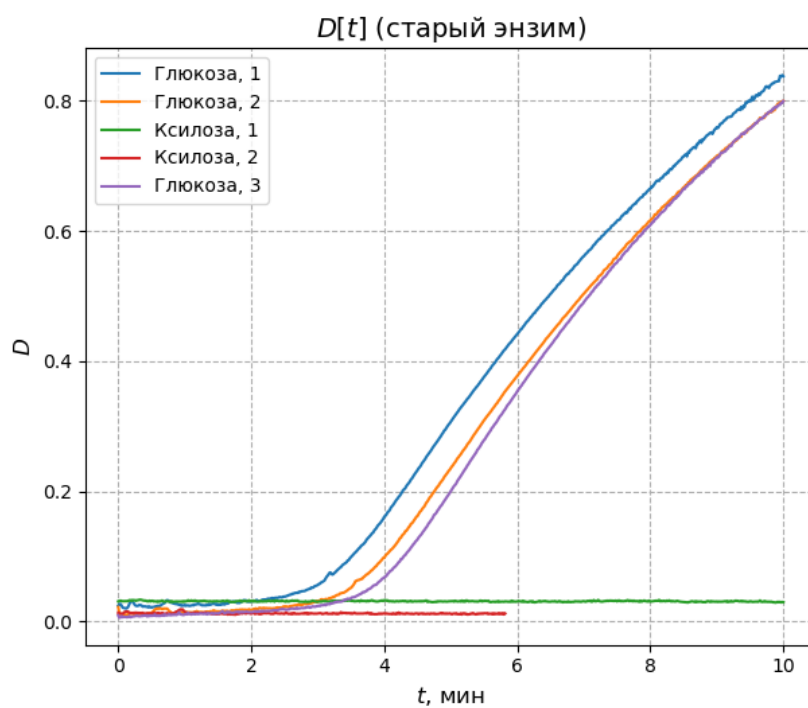


Рис. 8: Зависимости оптических плотностей растворов от времени (старый фермент).

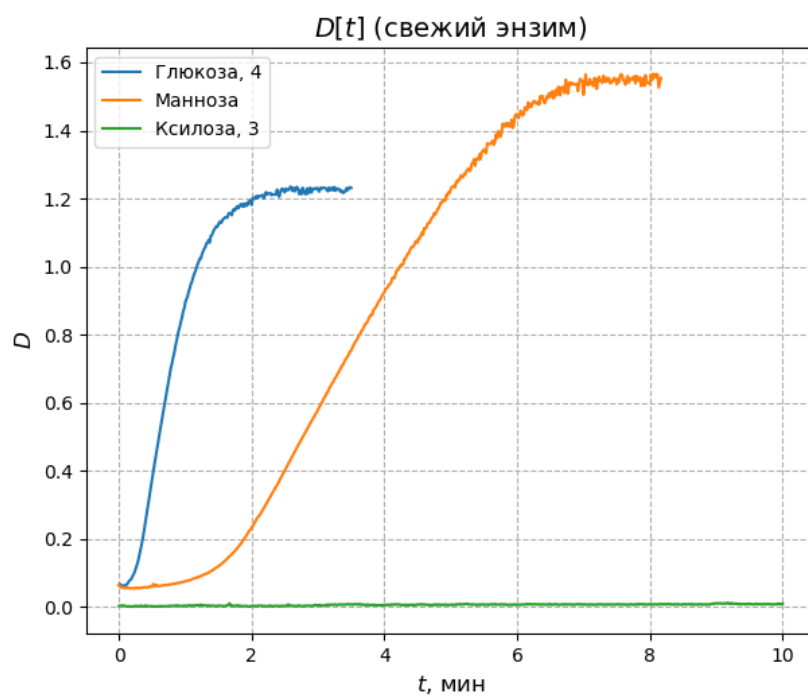


Рис. 9: Зависимости оптических плотностей растворов от времени (использован свежий фермент).

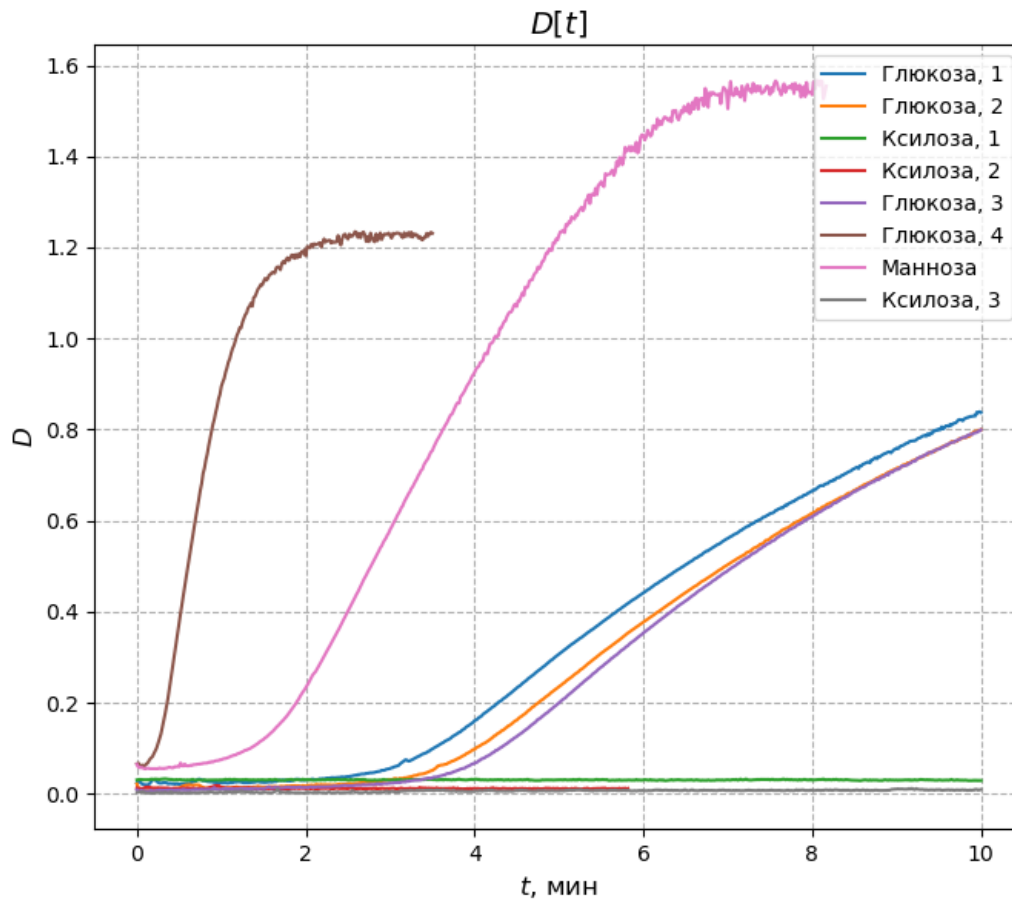


Рис. 10: Полный набор полученных первичных данных.

6 Обработка данных

Для сравнения активностей субстратов в реакции ферментативного окисления оценим максимальные скорости реакций, достигаемые на начальных участках полученных зависимостей.

Подберем эмпирические формулы для начальных участков кривых, соответствующих реакциям с участием глюкозы и маннозы, в следующем виде (параметры D_0 , D_∞ , τ_0 , T определим численно):

$$D(t) = D_0 + D_\infty \int_{-\infty}^t \frac{1}{\sqrt{2\pi T^2}} e^{-\frac{(\tau-\tau_0)^2}{2T^2}} d\tau$$

Все данные для ксилозы аппроксимируем линейными зависимостями.

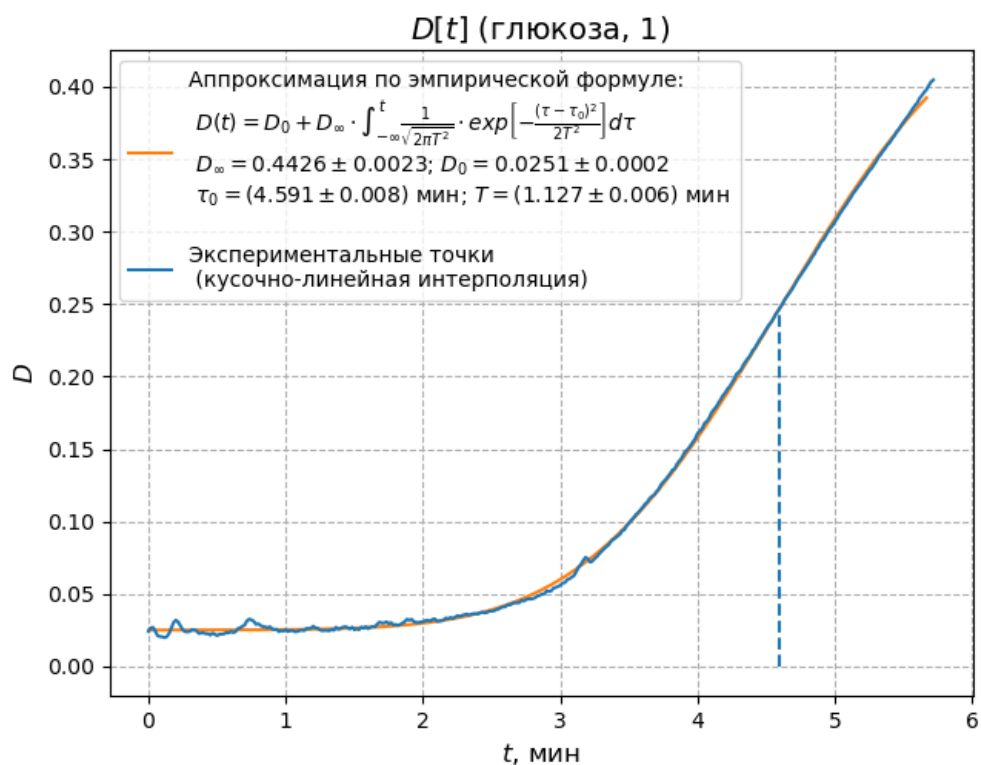


Рис. 11: Начальный участок зависимости $D(t)$ (глюкоза, первое измерение).

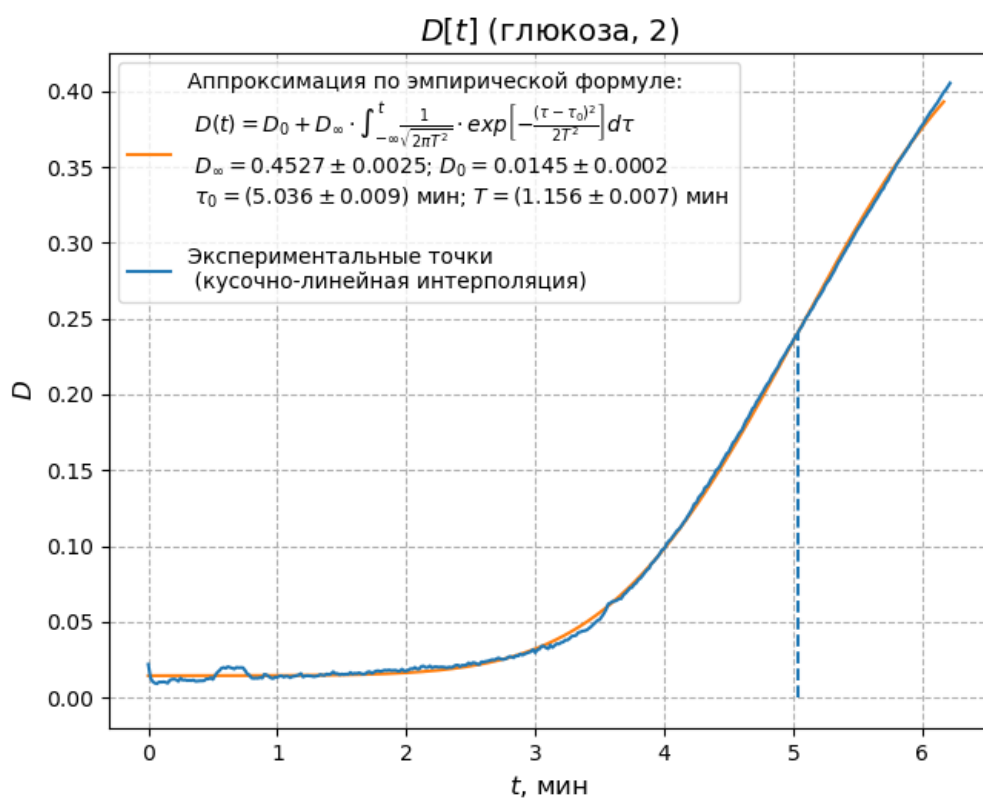


Рис. 12: Начальный участок зависимости $D(t)$ (глюкоза, второе измерение).

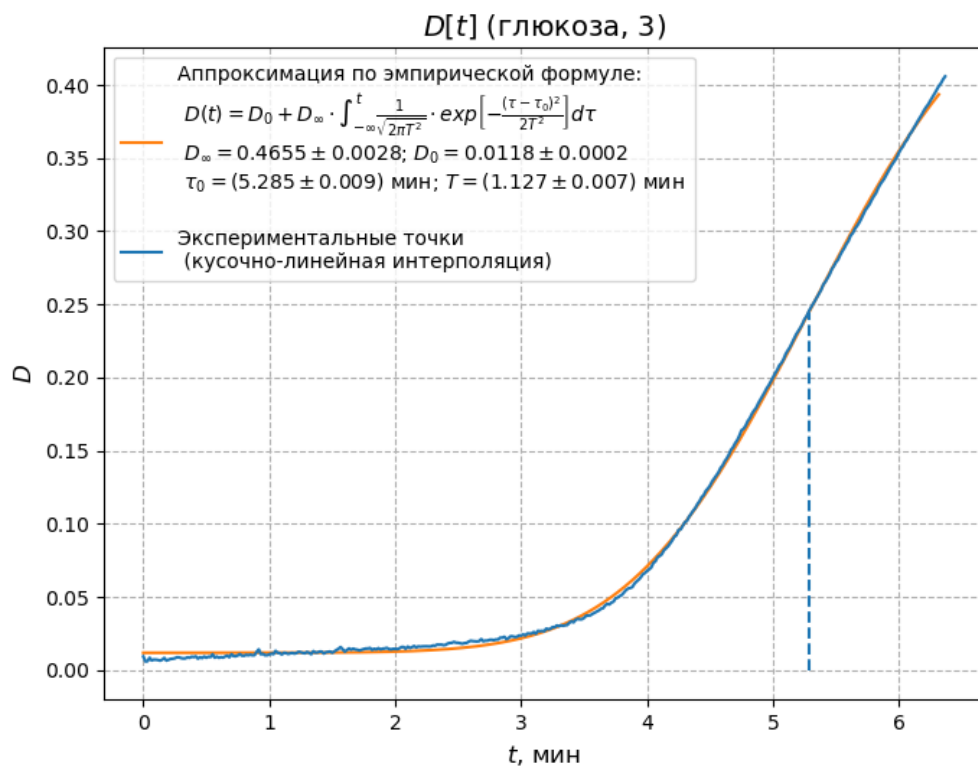


Рис. 13: Начальный участок зависимости $D(t)$ (глюкоза, третье измерение).

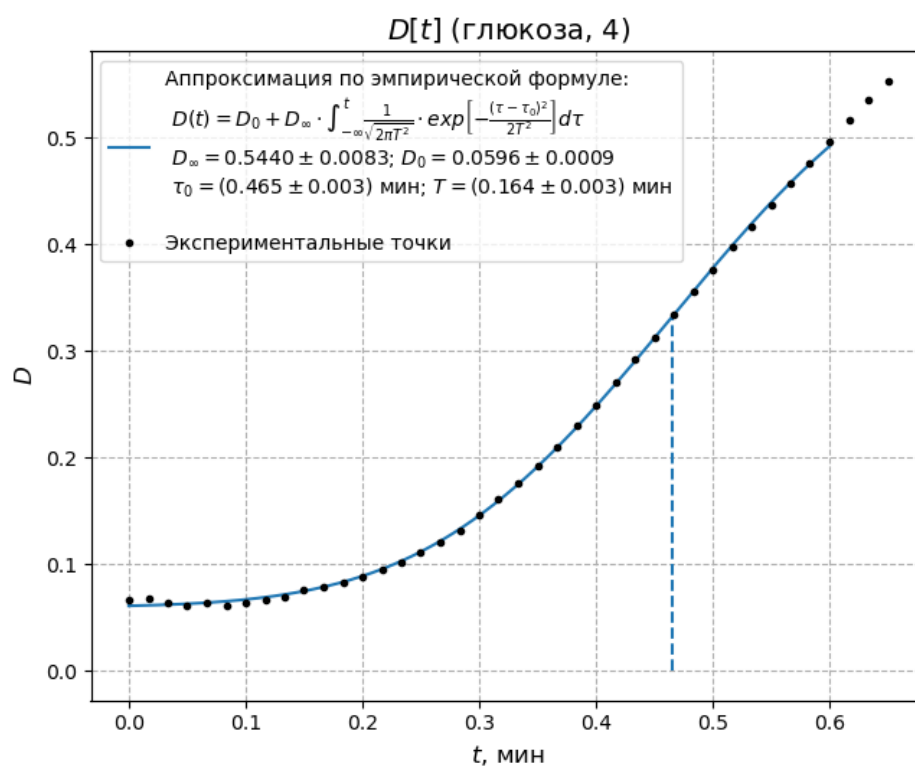


Рис. 14: Начальный участок зависимости $D(t)$ (глюкоза, четвертое измерение).

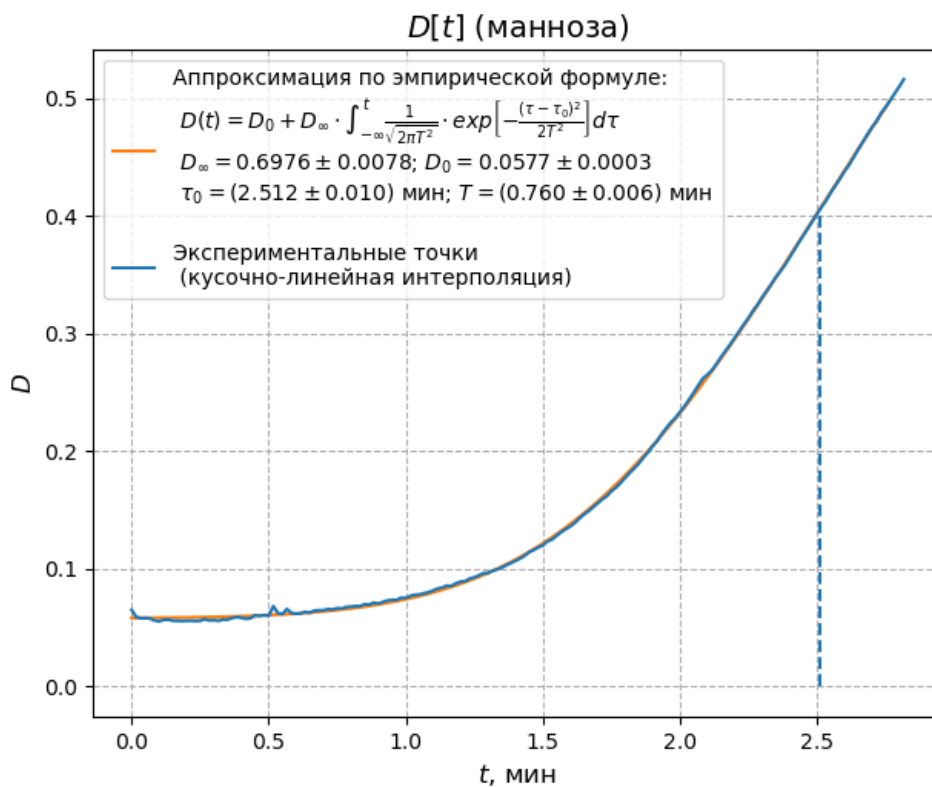


Рис. 15: Начальный участок зависимости $D(t)$ (манноза).

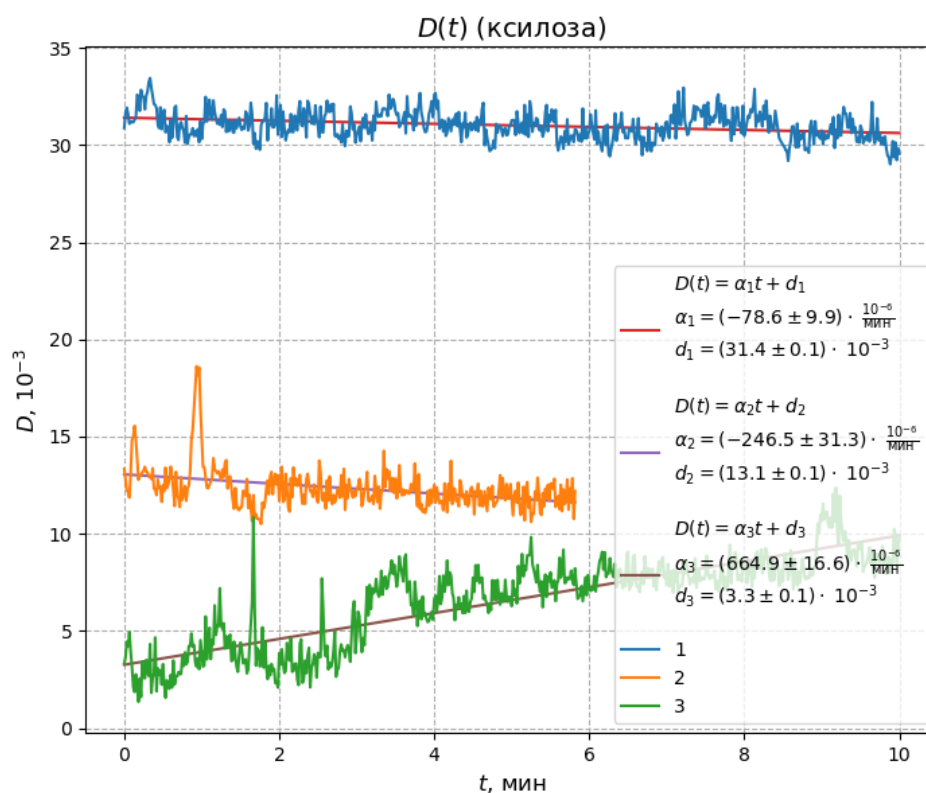


Рис. 16: Зависимости $D(t)$ для реакционных смесей с участием ксилозы, аппроксимированные линейными законами.

Считая известными коэффициент экстинкции $\varepsilon = 3 \cdot 10^3 \frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{см}}$ и толщину кюветы $l = 1 \text{ см}$, а основании данных о временных зависимостях оптических плотностей оценим зависимость скорости образования трийодид-иона от времени: $\frac{d[I_3^-]}{dt} = \frac{1}{\varepsilon l} \frac{dD}{dt}$.

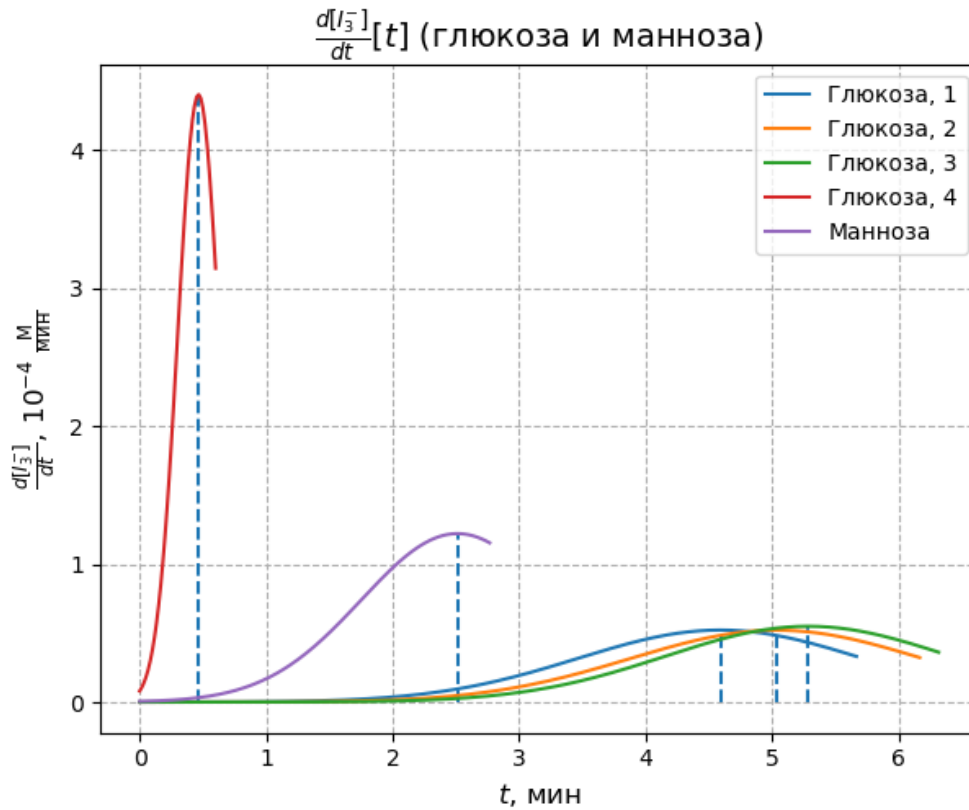


Рис. 17: Зависимости скоростей образования трийодида от времени — функции Гаусса (пунктиром отмечены максимумы).

Приведем максимальные значения скоростей:

Таблица 2. Максимальные скорости образования трийодид-иона в опытах с участием глюкозы и маннозы.

| Опыт | Глюкоза, 1 | Глюкоза, 2 | Глюкоза, 3 | Глюкоза, 4 | Манноза |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|---------------|-----------------|
| $\left(\frac{d[I_3^-]}{dt}\right)_{max}, 10^{-4} \frac{\text{М}}{\text{мин}}$ | 0.522 ± 0.004 | 0.521 ± 0.004 | 0.549 ± 0.005 | 4.4 ± 0.1 | 1.22 ± 0.02 |

- Среднее по первым трем опытам: $(5.307 \pm 0.025) \cdot 10^{-5} \frac{\text{М}}{\text{мин}}$

Наконец, воспользуемся тем, что $\frac{d[I_3^-]}{dt} = \frac{d[H_2O_2]}{dt}$ и представим скорость реакции в виде величины $\frac{V_{\Sigma}}{N_{\text{мкл}}[V_{\text{р-ра}}(GOx)]} \left(\frac{d[H_2O_2]}{dt}\right)_{max}$, где V_{Σ} — полный объем раствора в кювете, $N_{\text{мкл}}[V_{\text{р-ра}}(GOx)]$ — число добавленных микролитров раствора энзима (глюкозооксидазы). Представим полученные результаты в виде таблиц со значениями этой скорости и относительных активностей субстратов (отношений скоростей к соответствующим максимальным значениям).

Таблица 3. Скорости реакций и относительные активности субстратов при использовании старого фермента.

| Опыт | Глюкоза (среднее) | Ксилоза, 1–2 |
|--|-----------------------------------|---|
| $\frac{V_{\Sigma}}{N_{\text{мкл}}[V_{\text{р-ра}}(GOx)]} \left(\frac{d[H_2O_2]}{dt} \right)_{\text{max}}, \frac{\text{МОЛЬ}}{\text{МИН}}$ | $(5.307 \pm 0.025) \cdot 10^{-9}$ | ~ 0 (более точная оценка невозможна) |
| Отн. активность, % | 100 | ~ 0 |

Таблица 4. Скорости реакций и относительные активности субстратов при использовании свежего фермента.

| Опыт | Глюкоза, 4 | Ксилоза, 3 | Манноза |
|--|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| $\frac{V_{\Sigma}}{N_{\text{мкл}}[V_{\text{р-ра}}(GOx)]} \left(\frac{d[H_2O_2]}{dt} \right)_{\text{max}}, \frac{\text{МОЛЬ}}{\text{МИН}}$ | $(4.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-8}$ | $(2.22 \pm 0.06) \cdot 10^{-11}$ | $(1.22 \pm 0.02) \cdot 10^{-8}$ |
| Отн. активность, % | 100 | 0.05 | 27.7 ± 0.7 |

7 Выводы

По результатам измерений, как и ожидалось, была выявлена специфичность глюкозооксидазы к глюкозе, что видно по оцененным величинам скоростей соответствующих реакций: при использовании в качестве субстратов ксилозы и маннозы скорости падали до $\sim 30\%$ и $\sim 0\%$ соответственно, считая от уровня скорости с субстратом — глюкозой.

В условиях опыта было выявлено интересное явление — наличие у всех реакций некоторого варьирующегося инкубационного периода, когда реакции практически не идет, с более или менее плавным переходом к пику скорости реакции. Затем, как и ожидалось, наблюдается спад скорости. В данной работе начальные участки кинетических кривых были приближены с помощью эмпирической формулы, вид которой позволил оценить время достижения максимальной скорости реакции и само значение скорости в максимуме.

Наличие инкубационного периода во всех данных, в том числе при применении свежеприготовленного фермента, может быть связано, например, с недостаточным количеством молибдат-ионов в растворе. Данная гипотеза требует экспериментальной проверки.