

УДК 544.478.1
DOI 10.26456/vtchem2021.2.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Б.Б. Тихонов, П.Ю. Стадольникова, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман

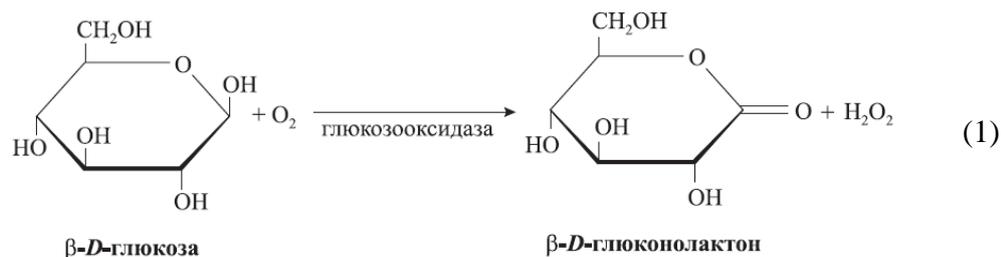
Тверской государственной технической университет, Тверь

В статье рассматривается универсальная, чувствительная, быстрая и воспроизводимая методика определения активности глюкозооксидазы, основанная на окислении пероксидом водорода йодида калия в присутствии молибдата аммония и фотометрировании образующегося синего комплекса «йод-крахмал». Построен калибровочный график для определения концентрации пероксида водорода в реакционной смеси. Проведен анализ образования пероксида водорода в реакции окисления глюкозы глюкозооксидазой при варьировании начальной концентрации глюкозы.

Ключевые слова: глюкозооксидаза, активность, спектрофотометрия, йодид калия, крахмал

Ферменты благодаря своим уникальным свойствам (высокая специфичность и скорость реакции) широко используются в различных отраслях промышленности, сельского хозяйства, медицины, экологии. В настоящее время одной из наиболее острых проблем ферментативного катализа является поиск эффективных методов определения каталитической активности ферментов. Точной оценке данного показателя мешают 2 основных фактора: многостадийность процессов, катализируемых большинством ферментов; сложность экспресс-оценки активности из-за отсутствия изменений в физико-химических свойствах реакционной смеси (например, pH, цвет, образование осадка или газа). Экспрессность метода – одно из главных требований к методикам определения активности ферментов, так как за время анализа может произойти целый ряд процессов – фермент может инактивироваться, могут образоваться побочные продукты и т.д. [1].

Глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4) – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление β -D-глюкозы до D-глюконо- δ -лактона (δ -глюконо-1,5-лактона) и H_2O_2 с использованием молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов [2]:



Основной экспресс-метод определения активности данного фермента основан на взаимодействии образующегося в реакции окисления глюкозы глюкозооксидазой пероксида водорода с органическим субстратом (например – о-дианизидином или пирокатехином) в присутствии пероксидазы хрена и 4-аминоантипирина с образованием окрашенных продуктов, количество которых определяется фотометрически [3]. Однако этот метод имеет несколько недостатков – он недостаточно чувствителен и результат определения очень сильно зависит от характеристик и чистоты пероксидазы хрена, что усложняет стандартизацию методики (требуется строить калибровочный график ежедневно для каждого приготовленного раствора фермента). Другие физико-химические методы анализа (в частности, хроматография и хроматомассспектрометрия) неприменимы для определения активности глюкозооксидазы вследствие недостаточной экспрессности.

В связи с этим целью данного исследования была разработка универсальной, чувствительной, быстрой и воспроизводимой методики определения активности глюкозооксидазы.

Экспериментальная часть

Для определения активности глюкозооксидазы был модифицирован известный ранее метод, основанный на взаимодействии образующегося в реакции окисления глюкозы глюкозооксидазой пероксида водорода с кислой среде и фотометрировании окрашенного комплекса «йод-крахмал» при длине волны 570 нм [4].

Сначала был построен калибровочный график для определения концентрации H_2O_2 по оптической плотности реакционной смеси по стандартным растворам пероксида водорода различной концентрации. Для этого в кювету спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ «Спектр») к 10 мкл стандартного раствора H_2O_2 добавляли строго последовательно 2,0 мл раствора HCl , 0,2 мл раствора KI , 0,2 мл раствора молибдата аммония, 0,2 мл раствора крахмала и измеряли оптическую плотность смеси относительно дистиллированной воды при длине волны 570 нм в течение 6 минут. На рисунке 1 представлены результаты экспериментов в виде зависимости оптической плотности реакционной смеси от времени при различных концентрациях пероксида водорода.

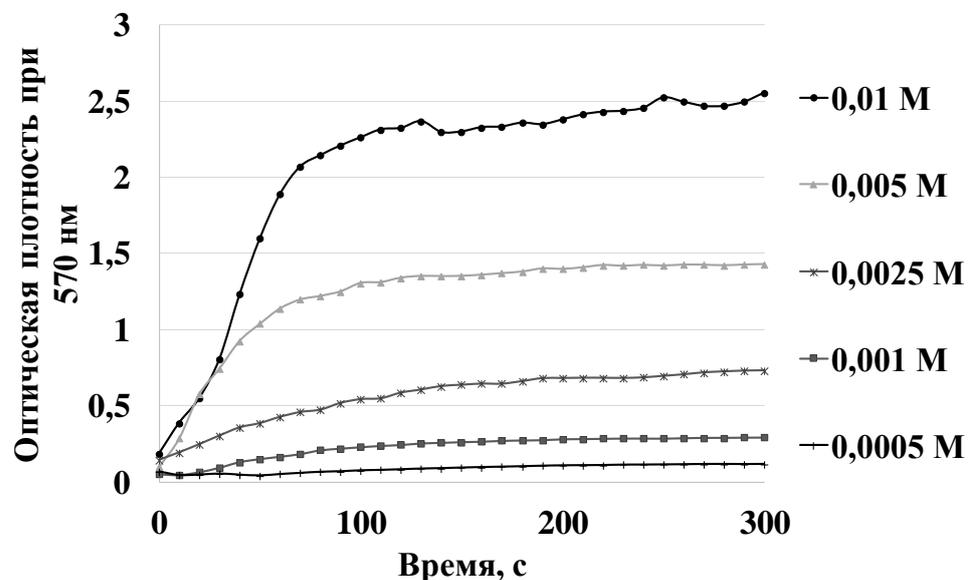


Рис. 1. Изменение оптической плотности реакционной смеси в кювете во времени при различных концентрациях пероксида водорода

Как видно из рисунка, при увеличении концентрации пероксида водорода повышается максимальное значение оптической плотности реакционной смеси при длине волны 570 нм. При этом рост оптической плотности на 95% завершается уже по истечении 3 минут.

Далее на основании полученных данных была построена зависимость оптической плотности от концентрации пероксида водорода при различном времени реакции в кювете, представленная на рисунке 2.

Из рисунка 2 видно, что при времени выдерживания в кювете более 180 секунд наблюдается прямолинейная зависимость оптической плотности реакционной смеси в конкретный момент времени от концентрации пероксида водорода. В связи с этим далее для определения концентрации пероксида водорода в реакции окисления глюкозы глюкозооксидазой использовалось именно время выдерживания 180 секунд. На рисунке 3 представлен калибровочный график для определения концентрации пероксида водорода при времени выдерживания 180 секунд.

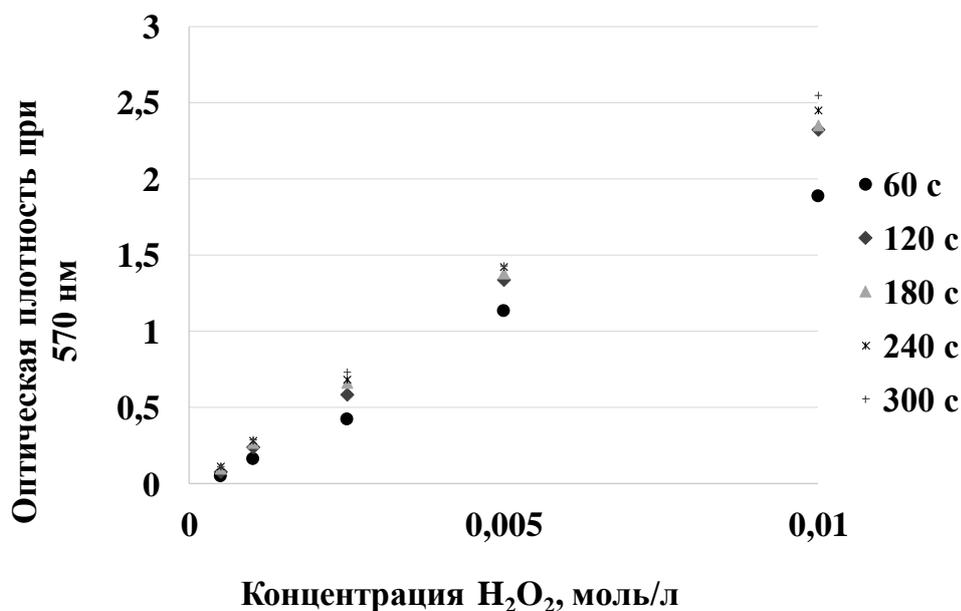


Рис. 2. Изменение оптической плотности реакционной смеси в кювете во времени при различных концентрациях пероксида водорода

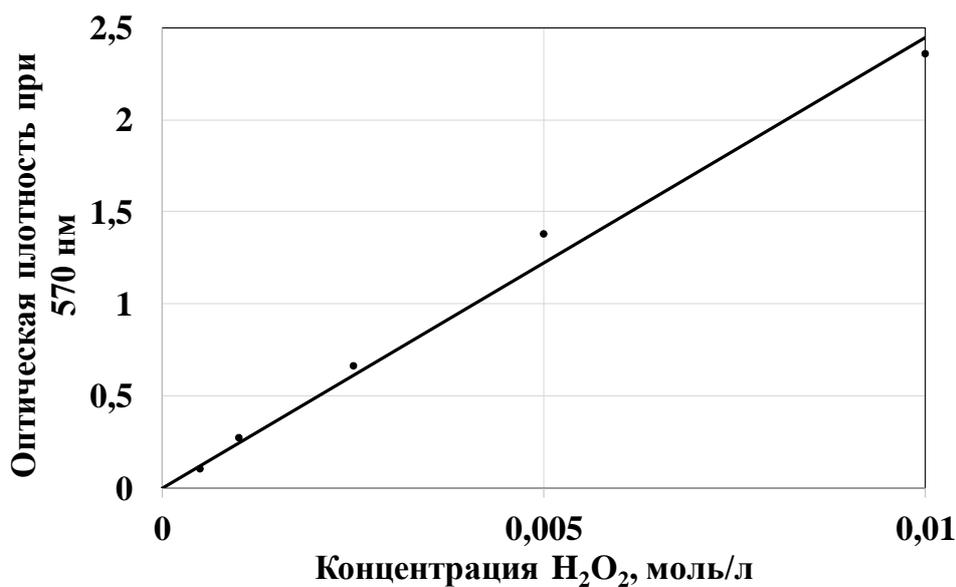


Рис. 3. Калибровочный график для определения концентрации пероксида водорода (время удерживания в кювете – 180 с)

Для определения активности глюкозооксидазы были смешаны 40 мл раствора глюкозы (22 ммоль/л) и 20 мл раствора глюкозооксидазы (250 мг/л) и проведена реакция окисления при постоянном перемешивании при температуре 25 °С в течение 60 минут с

периодическим отбором 10 мкл реакционной смеси микропипеткой и проведением реакции в кювете спектрофотометра аналогично использованному при построении калибровочного графика методу. На рисунке 4 представлен ход реакции в кювете спектрофотометра для проб, отобранных через 5, 10, 20, 30, 45 и 60 минут после начала реакции.

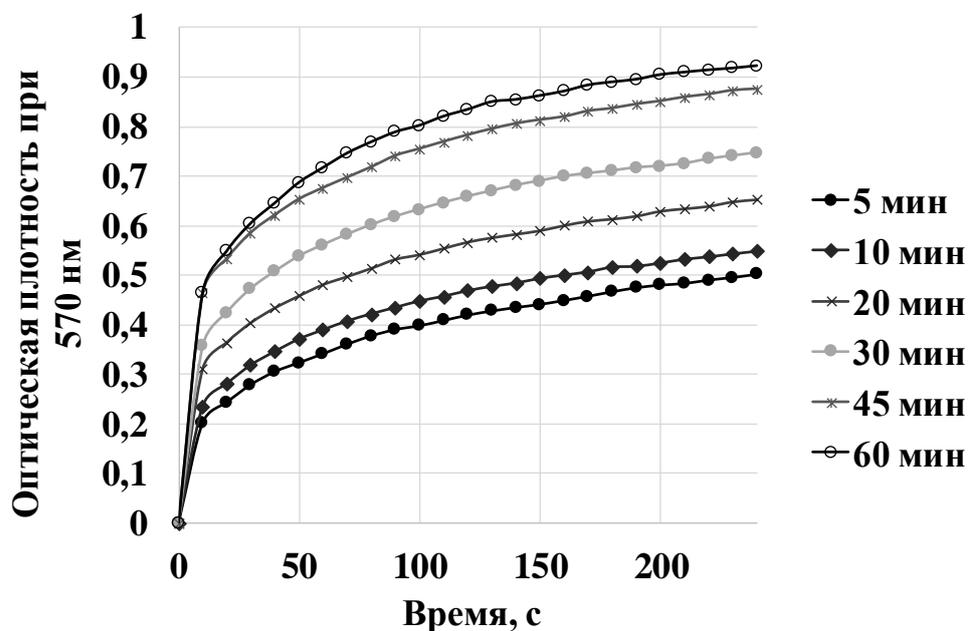


Рис. 4. Ход реакции в кювете спектрофотометра для проб, отобранных через различное время после начала реакции

Были проведены эксперименты по варьированию начальной концентрации глюкозы в реакции окисления глюкозооксидазой. Полученные значения оптической плотности реакционной смеси при времени выдерживания 180 секунд были пересчитаны в концентрации пероксида водорода с помощью калибровочного графика. Ход реакции представлен на рисунке 5.

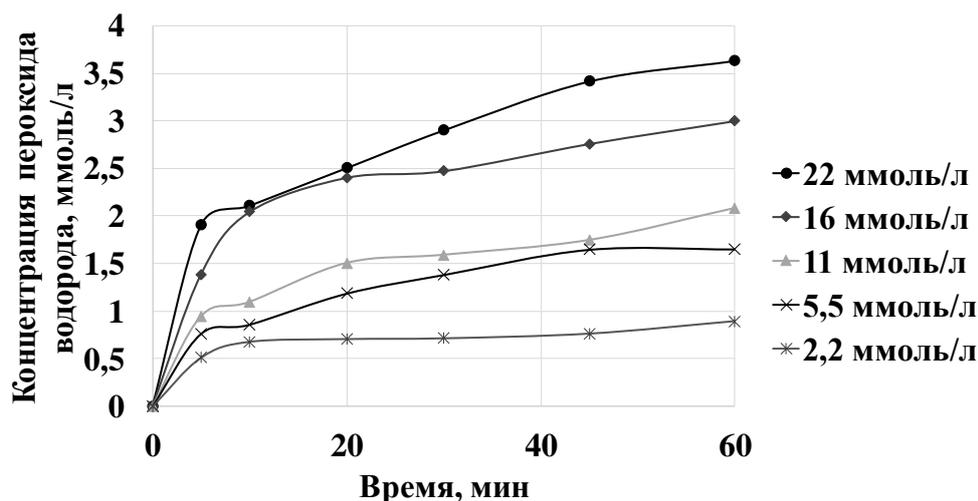


Рис. 5. Ход реакции окисления глюкозы глюкозооксидазой в виде изменения концентрации пероксида водорода во времени при различных концентрациях глюкозы

Из кинетических данных, представленных на рисунке 5, могут быть рассчитаны начальные скорости реакций (V_0), а также с помощью варьирования начальных концентраций глюкозы определены параметры уравнения Михаэлиса – максимальная скорость реакции (V_m) и константа Михаэлиса (K_M), что позволяет полностью охарактеризовать каталитическую активность как растворимой, так и иммобилизованной форм глюкозооксидазы.

Разработанный метод позволяет определять микроколичества H_2O_2 , он в несколько раз чувствительнее традиционного дианизидинового метода [3]. Изменение окраски линейно зависит от концентрации пероксида и цвет сформированного комплекса стабилен в течение нескольких часов. В диапазоне длин волн, которые используются в данном методе (около 570 нм), не поглощают другие биологические комплексы, что делает данный метод применимым для большинства исследований.

Выводы

В работе была разработана универсальная, чувствительная, быстрая и воспроизводимая методика определения активности глюкозооксидазы, основанная на окислении пероксидом водорода йодида калия в присутствии молибдата аммония и фотометрировании образующегося синего комплекса «йод-крахмал». По стандартным растворам пероксида водорода построен калибровочный график для определения концентрации пероксида водорода в реакционной смеси. Проведен анализ образования пероксида водорода в реакции окисления глюкозы глюкозооксидазой при варьировании начальной концентрации глюкозы. Разработанный метод позволяет охарактеризовать

каталитическую активность как растворимой, так и иммобилизованной форм глюкозооксидазы.

Авторы благодарят Российский научный фонд (проект № 21-19-00192) за финансовую поддержку.

Список литературы

1. Вяткина О. В., Бажин В. Ю., Александрова Д. Д. Анализ проблемы определения активности ферментных препаратов // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. Том 5 (71). 2019. № 4. С. 248–261.
2. Bankar S., Bule M, Singhal R., Ananthanarayan L. Glucose Oxidase – An Overview // *Biotechnology advances*. 2009. 27. 489-501.
3. Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. and Grassl, M. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U. ed) Volume I, Second Edition, 457-458, Academic Press, Inc., New York.
4. Graf E., Penniston J. T. Determination of Hydrogen Peroxide, with its Application Illustrated by Glucose Assay // *Clinical Chemistry*. 1980. V. 26 (5). P. 658–660.

Об авторах:

ТИХОНОВ Борис Борисович – доцент, кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», e-mail: tiboris@yandex.ru

СТАДОЛЬНИКОВА Полина Юрьевна – аспирант ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», e-mail: p.stadolnikova@mail.ru

СИДОРОВ Александр Иванович - профессор, кандидат химических наук, профессор кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», e-mail: sidorov@science.tver.ru

СУЛЬМАН Михаил Геннадьевич - профессор, доктор химических наук, заведующий кафедрой Биотехнологии, химии и стандартизации ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», e-mail: sulman@online.tver.ru

**DETERMINATION OF GLUCOSE OXIDASE ACTIVITY
BY SPECTROPHOTOMETRIC METHOD**

B.B. Tikhonov, P.Yu. Stadolnikova, A.I. Sidorov, M.G. Sulman

Tver State Technical University

The article developed a universal, sensitive, fast and reproducible method for determining glucose oxidase activity, based on the oxidation of potassium iodide by hydrogen peroxide in the presence of ammonium molybdate and photometry of the resulting blue iodine-starch complex. A calibration graph is constructed to determine the concentration of hydrogen peroxide in the reaction mixture. Analysis of hydrogen peroxide formation in glucose oxidation reaction with glucose oxidase at variation of initial glucose concentration was performed.

Keywords: *glucose oxidase, activity, spectrophotometry, potassium iodide, starch*