

pH daroma įtaka gliukozės oksidazės spektroskopinėms savybėms

pH influence on spectroscopic properties of glucose oxidase

Raminta Mazėtytė^{1,2}, Urtė Bubnienė³, Arūnas Ramanavičius^{2,3}, Renata Karpič²

¹Vilniaus universitetas, Fizikos fakultetas, Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius

²Fizinių ir technologijos mokslų centras, Saulėtekio al. 3, LT-10257 Vilnius

³Vilniaus universitetas, Chemijos ir geomokslų fakultetas, Naugarduko g. 24, LT-03225 Vilnius
raminta.mazetyte@gmail.com

Biologinių jutiklių naudojimas leidžia greitai ir tiksliai nustatyti įvairių biologiškai aktyvių medžiagų koncentracijas [1]. Šiomis dienomis žinomiausi ir dažniausiai naudojami amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai, kurie skirti laisvos gliukozės kiekiui kraujyje nustatyti [2]. Veikloji biojutiklio dalis yra elektrodo paviršiuje imobilizuotas gliukozės oksidazės (GOx) fermentas. Siekiant kurti biojutiklį iš pradžių reikia atlikti įvairius fermento savybių tyrimus. Nepaisant didėjančio GOx tyrimų skaičiaus, yra pakankamai mažai informacijos apie šio fermento kitimus skirtingo rūgštingumo terpėse (pH) [3].

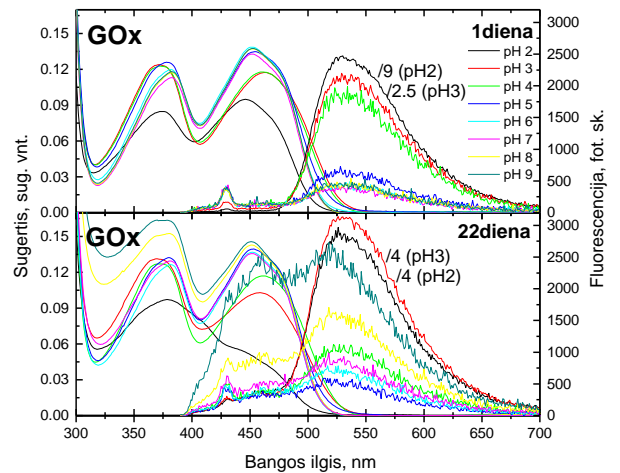
Šio darbo metu buvo tiriami GOx ir flavinadenindinukleotido (FAD) spektroskopinių savybių kitimai skirtingo rūgštingumo terpėse 22–ų dienų laikotarpyje. Tyrimo metu sugerties ir fluorescencijos spektrų registravimas bei relaksacijos trukmių matavimai buvo atliekami naudojant acetatinius-fosfatinius buferinius tirpalus, kurių pH vertės kito nuo 2 iki 9.

Darbo metu nustatėme, kad 1–4 dienų laikotarpyje rūgštiniuose (pH 2–3) FAD tirpaluose pradeda formuotis katijoninė FAD struktūra. Jos susidarymas lemia sugerties bei fluorescencijos spektrų kitimus: antrosios sugerties juostos ties 450 nm intensyvumas sumažėja, o pirmosios juostos maksimumo padėtis pasislenka į ilgesnių bangų pusę. Stebint fluorescencijos spektrus, matomas juostos ties 530 nm intensyvumo mažėjimas tolimesnių matavimų metu, kuris taip pat siejamas su katijonine FAD struktūra.

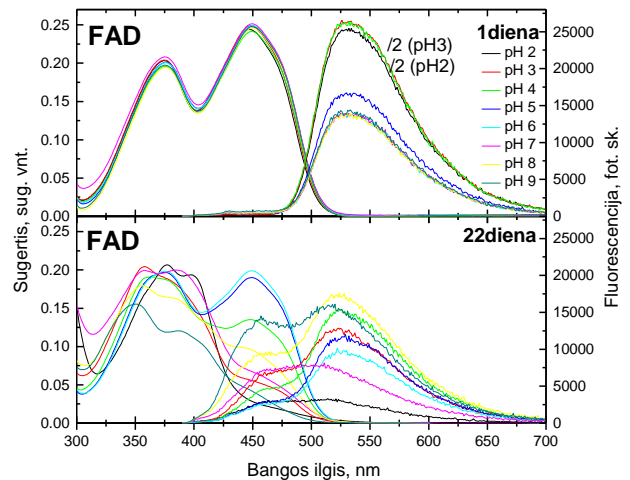
Esant pH 2–3 tirpalo rūgštingumui stebima intensyviausia FAD ir GOx fluorescencija. Lyginant integralinius fluorescencijos intensyvumo kitimus 1–ąją matavimo dieną, nustatėme, kad pH 2 tirpaluose FAD bei GOx integraliniai fluorescencijos intensyvumai beveik sutampa. Tai leidžia patvirtinti prielaidą, kad esant šiam rūgštingumui FAD disocijuoja iš GOx fermento.

Esant optimaliam pH 6 rūgštingumui, GOx fluorescencijos intensyvumas ties 530 nm yra pats mažiausias. Tai siejama su didžiausiu fermento aktyvumu bei FAD kvantinio našumo savybėmis.

Nuo 8-osios matavimo dienos FAD ir GOx fluorescencijos spektruose atsiranda fluorescencijos juosta ties 450 nm, kuri siejama su redukuotos FADH₂ struktūros susiformavimu. Šios struktūros atsiradimą patvirtina ir pakitę sugerties spektrai. Laikui bėgant, stebimas fluorescencijos juostos ties 450 nm intensyvumo didėjimas bei juostos ties 530 nm intensyvumo slopinimas.



1 pav. GOx sugerties ir fluorescencijos spektrai užregistruoti 1 ir 22 dienomis.



2 pav. FAD sugerties ir fluorescencijos spektrai užregistruoti 1 ir 22 dienomis.

Reikšminiai žodžiai: gliukozės oksidazė, flavinadenindinukleotidas, pH.

Literatūra

- [1] Eun-Hyung Yoo et al, Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice, *Sensors* (2010), 10, 4558–4576.
- [2] S. Ferri et al., Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases: A Bird's Eye View of Glucose Sensing Enzymes, *Journal of Diabetes Science and Technology* Volume 5, Issue 5, September (2011).
- [3] L. Dumitrascu et al, pH and heat-dependent behaviour of glucose oxidase down to singlemolecule level by combined fluorescence spectroscopy and molecular modelling, *J Sci Food Agric* 2016; 96: 1906–1914.