

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
KEEMIA INSTITUUT
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Ultraheli mõju α -kümotrüpsiini aktiivsusele lahuses

Bakalaureusetöö

12 EAP

Kristen Luik

Juhendaja PhD Siim Salmar

Tartu 2017

INFOLEHT

Ultraheli mõju α -kümotrüpsiini aktiivsusele lahuses

Kristen Luik

Ultraheli põhjustab lahustes mitmeid keerulisi efekte, mis mõjutavad lahust ja lahuses olevaid osakesi. Ultraheli efektide mõistmiseks on seda juba aastakümneid uuritud. Kuigi teadmised on läinud kaasajal detailsemaks, ei ole siiski teada, kas ja kuidas ultraheli mõjutab ensüüme homogeenses lahuses. Käesolevas töös selgitatakse välja, mis toimet avaldab ultraheli α -kümotrüpsiinile homogeenses lahuses. Sellest tööst lähtuvalt näidatakse, et rakendatud tingimustel ultraheli degradeeriv toime α -kümotrüpsiinile puudub.

Märksõnad: ultraheli, ensüüm, lahus, α -kümotrüpsiin, kavitatsioon, sonokeemia

CERCS kood: P390; Orgaaniline keemia (sonokeemia, füüsikaline orgaaniline keemia)

The effect of ultrasound on α -chymotrypsin activity in solution

Kristen Luik

Ultrasound can cause a number of complex effects in solutions that affect the solution and the particles in the solution. Research in this field has been ongoing for decades but it is still not clear how ultrasound affects enzymes in homogenous solutions. This paper explains the effect of ultrasound on α -chymotrypsin in a homogeneous solution. On this basis, it is shown that there is no ultrasound caused degrading effect on α -chymotrypsin.

Keywords: ultrasound, enzyme, solution, chymotrypsin, cavitation, sonochemistry

CERCS code: P390; Organic chemistry (sonochemistry, physical organic chemistry)

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1 Sonokeemiast üldiselt.....	7
2 Ultraheli rakendamine bioprotsessidel	8
3 Ensüümid ja ultraheli.....	9
3.1 Reaktsioonikeskkonna mõju ensüümreaktsioonidele ultraheliväljas	10
3.2 Ultraheli efekti erinevus vabale ja immobiliseeritud ensüümile	11
4 α -Kümotropsiin.....	12
EKSPERIMENTAALNE OSA	13
1 Töö eesmärk	13
2 Materjal ja meetodika.....	14
2.1 Kasutatud reaktiivid.....	14
2.2 Aparatuur ja töövahendid	15
2.3 Mudelestri 4-nitrofenüülatsetaadi süntees	16
2.4 Lahuste valmistamine	16
2.5 Eelkatsed ilma ultrahelita	17
2.5.1 α -Kümotrüpsiini ensüümpreparaadi aktiivsuse test.....	17
2.5.2 4-nitrofenooli molaarse neeldumisteguri määramine	17
2.5.3 α -Kümotrüpsiini aktiivsuse määramine 4-nitrofenüülatsetaadi hüdrolyüsi algkiiruste abil	17
2.5.4 4-nitrofenüülatsetaadi ensüümkatalüütilise hüdrolyüsi kiiruse sõltuvuse määramine substraadi kontsentratsioonist.....	18
2.5.5 α -Kümotrüpsiini aktiivsuse muutuse määramine puhvri lahuses aja jooksul	18
2.6 Eksperimendid ultraheliga.....	19
2.6.1 Ultraheliseadme seadistamine	19
2.6.2 Kaaliumjodiidi dosimeetria	19
2.6.3 Ultraheli võimaliku toime määramine α -kümotrüpsiini aktiivsusele	19
2.6.4 α -Kümotrüpsiini katalüüsitud 4-nitrofenüülatsetaadi hüdrolyüsireaktsioon ultraheliväljas.....	20
3 Tulemused ja arutelu	21
3.1 Uuritava ensüümi ja substraadi valik.....	21

3.2 Eelkatsed α -kümotrüpsiini aktiivsuse määramiseks ultraheliväljas	22
3.3 Katsed ultraheliväljas	26
3.3.1 Kaaliumjodiidi dosimeetria	26
3.3.2 α -Kümotrüpsiini lahuse sonikeerimine ultraheliväljas	27
3.3.3 α -Kümotrüpsiini reaktsioon 4-nitrofenüülatsetaadiga ultraheliväljas	29
KOKKUVÕTE	32
SUMMARY	33
KASUTATUD KIRJANDUS	34
Artiklid	34
Raamatud	39
Bakalaureusetöö.....	39
Kasutatud veebiaadressid	39
LISAD	40
LIHTLITSENTS.....	45

KASUTATUD LÜHENDID

- KT – *α-chymotrypsin* – *α*-kümotrüpsiin
- PNP – *para nitrophenol* – 4-nitrofenool
- PNPA – *para nitrophenyl acetate* – 4-nitrofenüülatsetaat
- IP – *infrared spectroscopy* – infrapunaspetskoopia
- UV-Vis – *ultraviolet-visible spectroscopy* – ultraviolett-nähtava ala spektroskoopia
- HCl – *hydrochloric acid* – vesinikkloriidhape
- KI – *potassium iodide* – kaaliumjodiid
- HPLC – *high performance liquid chromatography* – kõrglahutusega vedelikkromatograafia

SISSEJUHATUS

Ultraheli keemilised ja füüsilised omadused leiavad laialdast rakendust nii labori- kui ka tööstuspraktikas väga erinevates valdkondades. Viimaste aastate trend on ultraheli kasutamine erinevate bioprotsesside mõjutajana, leides laialdast rakendust toiduainetööstuses, biokütuste tootmisel, ekstraktsioonides jne kuni igapäevaste laboritöödeni välja. Enamasti on see tähelepanu tingitud ultrahelile iseloomulikust kavitatsiooninähtusest. Lisaks mehaanilistele efektidele põhjustab kavitatsioon lahustes vabade radikaalide teket, mis kutsuvad esile ahelreaktsioone. Viimasel ajal on suuremat tähelepanu pööratud ultraheli helilainete mõjule lahustest läbiminemisel. Kõik need ultraheli nähtused võivad mõjutada lahustes toimuvaid protsesse.

Varasemalt on bioprotsesside korral ultraheli leidnud peamiselt kasutamist oma kavitatsiooni destruktiivse toime pärast, näiteks reovee puhastamisel, rakkude lõhkumisel ekstraheerimisel jne. Nüüdisajal pööratakse suurt tähelepanu ultraheli protsesse soodustavatele ja kiirendavale toimele, mis oma olemuselt on enamasti mehhaanilised ja otseselt ei mõjuta biomolekule, näiteks segamiseefektid ja keskkonna viskoossuse muutmine ensüümide ja substraatide lahustuvuse suurendamiseks, biokatalüsaatorite immobiliseerimise soodustamine pindade puhastamisega jne. Sellised efektid on enamasti saadud heterogeensetes süsteemides, kuid mille laiemat rakendamist pärsib kavitatsiooni biomolekule inaktiveeriv ja lagundav toime.

Ultraheli otsesele toimele ensüümidele, peale kavitatsioonist tingitud degradatsiooni ning ensüümkatalüüsilele homogeensetes lahustes on pööratud vähem tähelepanu. Võimalik ultraheli toime ensüümi aktiivsusele näiteks läbi struktuuri muutuste, solvatatsiooni või nõrkade interaktsioonide mõjutamise lahustes omaks suurt praktilist tähtsust.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja selgitada, kas ja milline toime on ultrahelil ensüümile lahuses. Eesmärgi saavutamiseks sonikeeritakse ensüümilahuseid ja määratakse seejärel ensüümi aktiivsus substraatreaktsiooniga.

Bakalaureusetöö teostati Tartu ülikooli Keemia instituudis orgaanilise keemia õppetoolis.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1 Sonokeemiast üldiselt

Ultraheli rakendatakse tänapäeval väga laialdaselt, sest see kiirendab paljusid keemilisi ja füüsikalisi protsesse (Tuulmets jt., 2010). Ultraheli kasutatakse näiteks puhastamisel, sterilisatsioonil, kuivatamisel, degaseerimisel, vahu ärastamisel, keevitamisel, puurimisel, filtratsioonil, homogenisatsioonil, emulgeerimisel, rakkude lõhkumisel, kristalliseerimisel ja keemiliste reaktsioonide stiimulina. Ultraheli efekte on tänapäevaks piisavalt uuritud, väitmaks, et keemilise aktiivsuse tõstmiseks või muutmiseks sobib ka lahusesüsteemi sonikeerimine ultraheliga (Mason, 2005).

Ultraheli toime tuleneb peamiselt kavitatsiooni nähtusest (Luche jt., 1998). Kavitatsiooniefekt põhineb (Mason, 2005) tohutu temperatuuri (üle 5000 K) ja rõhuga (~500 atm) mullidel, mille eluiga on väga lühike. Tegu on mikroskoopiliste mõõtmetega mullidega, mis on genereeritud ultraheli helilainetest. Kavitatsioonist tingitud füüsikalisi efekte kirjeldatakse kavitatsioonimulli kollabeerumisega, mille tagajärjel tekib suure energiaga mikrojugaga, mis võib materjale lõhkuda, osakesi disperseerida jne. Kavitatsioonist tingitud keemilised efektid põhinevad kavitatsioonimullil, mida võib käsitleda kui kõrge rõhu ja temperatuuriga suletud mikroreaktorit (Mason, 2005). Kavitatsioonimullide kollabeerumine soodustab mitmeid homogeenseid ja heterogeenseid reaktsioone, tekitades vabu radikaale ning initsieerides ahelreaktsioone lahustes (Tuulmets jt., 2010).

Kaua on arvatud, et ultraheli ei tohiks mõjutada homogeenses lahuses toimuvaid ioonseid reaktsioone (nt hüdrolüüsid, solvolüüsid), mis ei saa radikaalmehhanismile ümber lülituda (Tuulmets jt., 2010). Sellele vaatamata on avaldatud töid, milles on kirjeldatud ultraheli toimet homogeensetes vesi-orgaanilistes kaaslahusti segudes toimuvatele polaarsetele reaktsioonidele, milles kindlasti ei esine radikaalmehhanismiga reaktsioone (Tuulmets jt., 2010). Vesi-orgaanilistes solventsegudes esinevad hüdrofoobsed soluut-solvent vastastoimed ja solvatatsioonitasakaalud, mis mõjutavad reaktsioonide kiirusi ja tasakaale. On näidatud, et ultraheli suudab mõjutada hüdrofoobseid soluut-solvent vastastikmõjusid ning solvatatsioonitasakaale, kiirendades või aeglustades seeläbi kõnealuseid reaktsioone (Tuulmets jt., 2010).

Viimasel ajal on rohkem tähelepanu hakatud pöörama teistele ultraheli põhjustatud nähtustele, mis võivad samuti reaktsioonisegus efekte esile tuua. Näiteks akustiline lööklaine, mis

sarnaselt mikrojoale tekib ka kavitatsioonimulli kollabeerumise tagajärjel ja mikrohoovused (*microstreaming*), mis tekivad vedelikuosakeste võnkumisest ultraheli levimisel läbi vedeliku (Chakma ja Moholkar, 2011; Jaykumar jt., 2013). Kui algselt arvati, et ultraheli helilained ei oma piisavat energiat muutmaks süsteemi solvatatsioonitasakaalu, siis nüüdseks on tõestatud vastupidist. Mikrohoovused võivad muuta reagentide solvatatsiooni lahuses, mis omakorda mõjutab reaktsiooni kiirust (Piiskop jt., 2013).

2 Ultraheli rakendamine bioprotsessidel

Järjest populaarsemaks on muutunud madalasagedusliku (10-100 kHz) ultraheli rakendamine paljude biotehnoloogiliste protsesside läbiviimisel. Muutes ultraheliparameetreid (sagedus, võimsus, sonikeerimise aeg, seadme tüüp jne) on võimalik luua igasuguseid ultrahelist tingitud efekte (füüsikalised, keemilised, bioloogilised), mis võivad erinevate protsesside teostamisel kasuks tulla. Lisaks sellele on ultraheli kasutamine lihtne, kiire ja üsnagi odav (Rokhina jt., 2009).

Juba väga kaua on ultraheli kasutatud mitmetes biotehnoloogilistes rakendustes ja alljärgnevalt on toodud vaid mõned näited ultraheli rakendamise võimaluste laia spektrit kohta.

Näiteks on ultraheli suuteline lõhkuma rakke ning tekkinud vabad radikaalid võivad rünnata ka rakumaterjali (Mann ja Krull, 2004). Nende efektide tõttu rakendatakse ultraheli igapäevaselt tööstuses ja laboripraktikas eesmärgiga saada rakust kätte intratsellulaarseid ensüüme ja organelle (Chisti ja Moo-Yong, 1986; Sinisterra, 1992).

Ultraheli on kasutusel biokütuste tootmisel (Veljkovic jt., 2012). Biokütuste tootmisel viiakse läbi tavalisi triglütseriidide ja vabade rasvhapete transesterdamise reaktsioone ja on näidatud, et ultraheli suudab neid reaktsioone kiirendada kuni 10 korda (Kumar jt., 2011; Cintas jt., 2010; Kelkar jt., 2008). Biokütuste tootmisel rakendatakse ultraheli veel taimeõlide ja metanooli emulgeerimiseks (Hanh jt., 2009). Praegusel ajal on biokütuste tootmise sonokeemilised uuringud intensiivistunud eesmärgiga leida piisavalt efektiivne meetod, mille rakendamisel vastaks produtseeritav biokütus rahvusvahelistele standarditele (Arzamendi jt., 2014; Reyro jt., 2014).

Ultraheli intensiivistab tselluloosi ja pektinaasi ensüümide massiülekanet lahusesse puuvillatekstiilide bioprotsessimisel (Yachmenev jt., 2002) ja dekoloriseerimisel (Tauber jt., 2008). Parkimata naha jäätmete proteaaskatalüüsitud oksüdatsioon ja piiritusetehase reovee tsellulaaskatalüütiline puhastamine ultraheliga (Jian jt., 2008; Sangave ja Pandit, 2006). Veelgi

enam, ultraheli on edukalt kasutatud, et vähendada trüpsiini, pepsiini ja a-amülaasi ensüümaatilise hüdrolyüsi aega (Pena-Farfal jt., 2005) ning suurendamiseks paberijääkide konversioonikiirusi tsellulaasi manusel (Li jt., 2005). Ultraheli on kasutatud, et uurida ensüümatalüütilisi reovee puhastamise võimalusi. Laboratoorses tingimustes viidi läbi katsed, kus kirjeldati fenooli ning halogeenasendatud fenoolide sonobiodegradeerimist läbi ensüümreaktsiooni. Tähelepanu väärtustati 80-100%-list fenoolide degradatsiooni, kui kasutati määratõika peroksüdaasi ning H₂O₂-te (Entezari ja Petrier, 2004).

Ultraheli leiab tänapäeval üllatavalt palju rakendust toiduainete tööstuses, nii säilitamisel kui ka tootmisprotsessides. Paljudele inimestele teadmata töödeldakse ultraheliga näiteks piimatooteid, puu- ja köögiviljamahlasid säilivuse parandamiseks, kasutatakse endogeensete ensüümide inaktiveerimiseks toidus, allergeenide eemaldamiseks, ekstraheerimisprotsessides, toidu kvaliteedi ja aroomi tõstmiseks ning toidutööstuse reovee puhastamisel, näiteks rasvade lagundamine ensüümide kaasabil (Bermudez-Aguirre, 2017).

Järjest rohkem on hakatud kasutama paljude protsesside teostamisel erinevaid biokatalüsaatoreid, sealhulgas ka ensüüme. Ensüümide kasutamise kasvuga bioprotsesside läbiviimisel soovitakse vähendada energia- ja materjalikulu, sealjuures vähendades ka saaste ja/või mürgiste kõrvalproduktide teket (Alcalde jt., 2006).

3 Ensüümid ja ultraheli

Ultraheli kasutamine ensümaatiliste protsesside mõjutamisel on olnud kasvav trend nii teaduslikus kui rakenduslikus mõttes juba viimase paarikümne aasta jooksul. Tähelepanu all on ultraheli mõjud ensüümidele, mis soodustavad metaboliitide, polümeeride või valkude tootmist kui ka biokatalüsaatori lagunemine, inhibeerimine või aktiveerimine ultraheli rakendamisel. Samuti kasutatakse ultraheli ensüümide tootmisel (Delgado-Povedano ja Luque de Castro, 2015; Rokhina jt., 2009).

Ultraheli võimalik mõju ensüümidele on sarnane esimeses peatükis kirjeldatud efektide toimele. Arvatakse olevat kolm peamist mehhanismi, läbi mille võib ultraheli ensüüme mõjutada: kavitatsioonimullide soojusefektiga, tekitatud radikaalide läbi või mehaaniliste jõududega. Nimetatud mehhanismide üksik või kombineeritud toimed tavaliselt ensüümi katalüüsivõime paraneb või toimub biokatalüsaatori degradeerimine (Delgado-Povedano ja Luque de Castro, 2015).

Kaasaegsema kirjanduse kohaselt võib ultraheli rakendamise ensüümreaktsioonide mõjutamiseks jagada kahte suuremasse gruppi:

- Esimesel juhul rakendatakse ultraheli vahetult enne ensümaatiliste protsesside teostamist (Tian jt., 2004). Nii saab vähendada reaktsioonis osalevate osakeste suurusi ja sellest tulenev katalüütilise pindala kasv on kasulikud, et langetada massiülekandest tulenevaid limitatsioone. Aastal 2014 uuriti ühe töö raames tsellulaasi aktiivsuse muutust pärast 30 minutilist ultraheliga sonikeerimist (Subhedar ja Gogate, 2014). Tulemuseks oli 25%-line ensüümi aktiivsuse kasv. Seda kirjeldati katalüütilise pindala kasvuga, seega sai substraat ensüümi aktiivtsentritele hõlpsamini ligi. Sama efekti täheldati pähkli allergeeniliste valkude eeltöötlemisel ultraheliga (Li jt., 2013). Enne α -kümotrüpsiini (KT) katalüüsitud allergeenide hüdrolüüsi reaktsiooni teostamist sonikeeriti siinpuhul allergeenide lahust ultraheliga. Tulemusena paranes kõnealuste allergeeniliste valkude lahustuvus, mis aitas kaasa allergeenide ensüümikatalüütilisele hüdrolüüsile.
- Teise lähenemise puhul rakendatakse ultraheli ensümaatilise reaktsiooni kestuse vältel. Arvatakse, et kavitatsioonist tulenev energia kiirendab reaktsiooni, kuid seda mehhanismi pole veel täpselt kirjeldatud. On pakutud, et reaktsiooni kiirenemise juhtudel toimub ultrahelist tingitud vedeliku osakeste liikumiskiiruse kasv lahuses, mis omakorda parandab substraadi ligipääsu biokatalüsaatori aktiivtsentrisse. Aastal 1996 kirjeldati ensüümi aktiivsuse kasvu, kui sonikeeriti sahharoosi ensüümikatalüütilist reaktsiooni invertaasiga (Sakakibara jt., 1996). Samuti ei pruugi alati toimuda ensümaatilise reaktsiooni kiirenemine ning on täheldatud nii ensüümi aktiivsuse langemist kui ka täielikku pöördumatut inaktivatsiooni (Ozbek ja Ulgen, 2000).

Vastakate tulemuste peamisteks põhjusteks võivad olla näiteks erinevate ultraheli sageduste ja võimsuste kasutamine, sonikeerimise perioodi pikkus, erinevad ultraheli rakendamise meetodid, erinevat tüüpi biokatalüsaatorite kasutamine, stabiliseerivate lisandite olemasolu ning neid uurides on suur tähtsus ka valitud reaktsioonitingimustel (Vercet jt, 2001; Froment jt, 1998).

3.1 Reaktsioonikeskkonna mõju ensüümreaktsioonidele ultraheliväljas

On tõestatud, et ensüümi töövõimet mõjutab suuresti reaktsioonikeskkonna loomus (Yu jt., 2010). Näiteks kirjeldati ensüümi aktiivsuse kasvu ioonvedelikes (Liu jt., 2005). Sellise keskkonna puhul langeb ultraheli toimele ioonvedeliku viskoossus, mille tagajärjel paraneb

substraadi ja ensüümi lahustuvus. Mida parema lahustuvusega on substraat, seda intensiivsemad on ensüüm-substraat interaktsioonid ning seda kiiremini kulgeb ensüümkatalüütiline reaktsioon. Kuigi võib toimuda ka ensüümi aktiivsuse langemine või inaktivatsioon (Bradley jt., 2003).

3.2 Ultraheli efekti erinevus vabale ja immobiliseeritud ensüümile

Ultraheli võib avaldada mõju nii vabalt lahuses olevale ensüümile kui ka immobiliseeritud kujul lahuses olevale ensüümile. Aastal 2012 kirjeldati (Wang jt., 2012) nii vaba kui ka immobiliseeritud tsellulaasi sonikeerimist samadel tingimustel. Kõrgeim, 18%-lise tõusuga aktiivsus vaba ensüümiga saavutati pärast 10-minutilist ultraheliga töötlemist. Analüüsides selgus, et sonikeerimise tagajärjel pääses substraat ensüümi tsesse hõlpsamini ligi ning oli näha osalist deformatsiooni tsellulaasi α -heeliksi struktuuris. Kõrgeim, 25%-lise tõusuga aktiivsus immobiliseeritud ensüümiga saavutati samuti pärast 10-minutilist sonikeerimist. Analüüsides selgus, et ultraheli suurendas ka siinpuhul ensüümi katalüütilist pindala, kuid struktuurilisi muutusi ei esinenud. Nagu arvata võib, on immobiliseeritud kujul ensüümid sonikatsioonile vastupidavamad.

Ultraheli võib samuti soodustada ensüümide immobilisatsiooni näiteks kontrollides mesopoorse silikaadi morfoloogiat, puhastades pindu, soodustades adsorptsiooni, transporti pooridesse jne (Sun jt., 2015).

Nagu eelpool toodud näidetest ilmneb, on ultraheli põhjustatud efekte rohkem täheldatud heterogeensetes süsteemides, mille põhjuseks on valdavalt kavitatsiooni füüsikalised efektid: aktiivse pinna suurendamine emulgeerimisel, dispergeerimisel, puhastamisel, lahustuvuse parandamine jne. Samas on hakanud järjest rohkem huvi pakkuma ultraheli efektid ensüümile homogeensetes lahustes. Võib öelda, et hetkel puudub täpne arusaam sellest, kuidas ultraheli mõjutab homogeenses lahuses olevat ensüümi ning seda pole meile teadaolevalt ka väga täpselt uuritud.

Ultraheli lainetest tingitud efektidele homogeensetes lahustes on hakatud tähelepanu pöörama alles viimasel kümnendil (Chakma ja Moholkar, 2011; Jaykumar jt., 2013; Tuulmets jt., 2014). Helilaine, mis on ju sisuliselt perioodiline rõhumuutus, võiks muuta ensüümi struktuuri, mis kindlasti avaldab mõju ensüümi aktiivsusele. Samas ultraheli lainete mõju kohta ensüümidele kindlaid tõendeid meie parima teadmise juures ei ole.

Meie töögrupis tehti hiljuti üks eeluuring, kus uuriti KT ensüümkatalüütilist estri hüdrolyüsi ultraheliväljas ning täheldati reaktsioonikiiruse kasvu (Vahtras, 2015). Selles töös ei

vaadeldud, kuidas käitub ensüüm ise ultraheliväljas. Sellest lähtuvalt tekkis huvi detailsemalt teada saada, kuidas ultraheli võib KT mõjutada.

4 α -Kümotropsiin

KT on proteaaside hulka kuuluv ensüüm, mida sünteesib kõhunääre ning mis *in vivo* katalüüsib peptiidide hüdrolyüsi peensooles. Antud ensüümi molekulmass on 24800 Da, 246 aminohappejääki ja igal ensüümi molekulil on üks aktiivtsenter Aktiivtsenter asub ensüümi pinnal olevas süvendis, mis sisaldab katalüütilist triaadi Ser-195, His-57, Asp-102, mille tõttu muutub seriin väga tugevaks nuklofiiliks. Sellesse hüdrofoobsesse tsentrisse seotakse katalüüsi käigus substraadi aromaadne külgahel (Chang, 2005). Tegu on põhjalikult uuritud ensüümiga ning see on esimene ensüüm, mille puhul tõestati kovalentse ensüüm-substraat kompleksi teke (Gutfreund ja Sturtevant, 1956). Selle ensüümi valiku üle on arutletud peatükis 3.1.

EKSPERIMENTAALNE OSA

1 Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja selgitada, kas ja kuidas mõjutab ultraheli KT-d lahuses. Sellest lähtuvalt leida tingimused, kus kavitatsioonist tingitud degradeeriv toime ensüümile oleks minimaalne.

Selleks oli vaja:

- Teostada eeluuringud, et leida sobivad tingimused ultraheliga katsete läbiviimiseks
- Teostada KT lahuse sonikeerimine erinevatel ultraheli võimsustel ja mõõta KT katalüüsitud 4-nitrofenüülatsetaadi (PNPA) hüdrolyüsi kineetikat ensüümi aktiivsuse hindamiseks.

2 Materjal ja meetoodika

2.1 Kasutatud reaktiivid

- α -Kümotrüpsiin

Ensüüm, mis pärineb veise pankreasest, on ostetud Sigma-Aldrich'ist lüofiliseeritud pulbrina. KT CAS number on 9004-07-3, lubatud minimaalne suhteline aktiivsus 40 U/mg ning molaarmass 25 kDa.

- *N*-Bensoüül-L-türosiinetüülester (BTEE)

Ostetud Sigma-Aldrich'ist, CAS numbriga 3483-82-7, molaarmassiga 313,35 g/mol ning sulamistemperatuuriga 118-121 °C.

- Tris alus (tris(hüdroksümetüül)aminometaan)

Ostetud Sigma-Aldrich'ist, CAS numbriga 77-86-1, molaarmassiga 121,14 g/mol ning sulamistemperatuuriga 167-172 °C.

- Atsetonitriil

Vedelikkromatograafias kasutamiseks mõeldud puhtusastmega atsetonitriil, CAS numbriga 75-05-8, molaarmassiga 41,05 g/mol ning keemistemperatuuriga 81-82 °C osteti Merck Millipore'ist.

- 4-Nitrofenool (PNP)

Osteti Sigma-Aldrich'ist, CAS numbriga 100-02-7, molaarmassiga 139,11 g/mol ja sulamistemperatuuriga 110-115 °C.

- Etaanhappeanhüdriid

Osteti Sigma-Aldrich'ist, CAS numbriga 108-24-7, molaarmassiga 102,09 g/mol ning keemistemperatuuriga 138-140 °C.

- Dietüüleeter

Osteti Sigma-Aldrich'ist, CAS numbriga 60-29-7, molaarmassiga 74,12 g/mol ning keemistemperatuuriga 34,6 °C.

- Kaaliumjodiid

Osteti Sigma Aldrich'ist, CAS numbriga 7681-11-0, molaarmassiga 166 g/mol.

- Absoluutne veevaba etanool saadi dotsent Uno Mäeorg laborist.

2.2 Aparatuur ja töövahendid

- Reaktiivide kaalumised teostati vastavalt vajadusele analüütilistel digitaalsetel kaaludel Mettler Toledo Excellence Plus XP205 ($\pm 0,01$ mg), Kern EW420-3NM ($\pm 0,1$ mg) ning Radwag AS 220/C/2 (± 1 mg).
- Lahuste pH mõõtmiseks kasutati klaaselektrood pH-meetrit Metrohm 744 ($\pm 0,01$ pH).
- Sulamistemperatuur määrati Gallenkampi digitaalse sulamistemperatuuri määramise seadmega.
- Infrapunaspetskoopilised (IP) analüüsid teostati FT-IR Perkin Elmer PC16 spektromeetril ja kasutati ATR peegeldustehnikat.
- Spektrofotomeetrisel mõõtmisel viidi läbi Thermo Spectronic UNICAM UV300 UV-Vis spektrofotomeetriga. Arvutiga ühendatud spektromeetri juhtprogrammiks oli VISIONlite 4.0.
- Spektromeetri küvetihoidja oli ühendatud Huber K6s-NR termostaadiga ($25 \pm 0,05$ °C). Termostaadi temperatuuri reguleeriv seade oli Microprocessor Control MPC-E.
- Spektrofotomeetrisel mõõtmisel kasutati klaasküvette, mille optiline teepikkus oli 1 cm ja ruumala 0,4 ml ning kvartsküvette, mille optiline teepikkus oli 1 cm ja ruumala 3 ml.
- Lahuste valmistamisel, proovide võtmisel, lahuste üle kandmisel reaktsiooniküveti jne kasutati automaatpipette ning mikrosüstlaid.
- Ultraheli allikaks oli ultrahelivann Elma TI-H-5 MF2 (25/45 kHz, 100W, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG).
- Ultrahelivann ja reaktsioonirakk termostateeriti Huber Ministat 125-cc termostaadiga ($25 \pm 0,05$ °C).
- Temperatuuri kontrollimiseks oli reaktsioonirakus digitaalne termomeeter Velleman DTP6 ($\pm 0,05$ °C).
- Ultrahelivannis oleva destilleeritud vee segamiseks kasutati segajat IKA RW 11.
- Kaaliumjodiidi dosimeetria teostamisel kasutati KI lahuse neelduvuse mõõtmiseks läbivoolusüsteemi, mis koosnes HPLC pumbast Gilson Piston Pump 302 (Gilson Medical Electronics Inc) ning Shimadzu SPD-20A HPLC UV-Vis detektorist (Shimadzu Corporation).
- Andmeanalüüs teostati arvutiprogrammidega Microsoft Office Excel 2013 ning GraphPad Prism 5.

2.3 Mudelestri 4-nitrofenüülatsetaadi süntees

4-nitrofenüülatsetaadi (PNPA) sünteesiti kirjandusest leitud meetodi modifitseerimisel (Park jt., 1961). Magnetsegaja pulgaga varustatud 100 ml kolbi kaaluti 6,05g etaanhappeanhüdriidi ning lisati mõned tilgad kontsentreeritud väävelhapet. Seejärel lisati osade kaupa 5,46g 4-nitrofenooli. Reaktsioonisegu kuumutati CaCl_2 toruga varustatud püstjahuti all 80 °C juures 30 minutit. Reaktsiooni lõppedes jahutati segu maha ning valati keeduklaasi, milles oli 15 ml destilleeritud vett. Jaotuslehtis eraldati ülemine estri kiht ning alumist veekihti pesti veel 2 korda 10 ml dietüüleetriga. Ühendatud orgaanilisi kihte pesti 20 ml 10 % NaHCO_3 lahusega ja veega. Segu kuivatati veevaba MgSO_4 -ga suletud koonilises kolvis üleöö. Järgmisel päeval eemaldati MgSO_4 filtreerimisega. Dietüüleeter eemaldati rotaatoraurutil. Saadud PNPAga viidi kaks korda läbi ümberkristalliseerimine absoluutses etanoolis ja filtriti klaasfiltriga. Saadi 5,45g PNPA-d. Produkti sulamitemperatuuriks määrati 78 °C ja tehti IP analüüs. Produkt hoiustati vaakumeksikaatoris kuivatusaine P_2O_5 kohal.

IP: 1760 cm^{-1} (C=O); 1520 cm^{-1} ja 1345 cm^{-1} (N=O); 1591 cm^{-1} ja 1487 cm^{-1} (Ar C=C); 1191 cm^{-1} (C-O)

2.4 Lahuste valmistamine

Antud töös valmistati kõik lahused kaalumise teel. Valmistatud lahuseid hoiustati +4 C ja ostetud tahket ensüümi-20 C juures.

- 80 mM Tris-HCl puhvri valmistamiseks lahustati Millipore MilliQ vees vajalik kogus tahket Tris alust ning seejärel tiitriti saadud lahuse pH HCl-ga 25 °C juures 7,8-ni.
- 0,1 M KI lahuse valmistamiseks lahustati vajalik kogus tahket kaaliumjodiidi Millipore MilliQ vees.
- PNP lahuse valmistamiseks lahustati vajalik kogus PNP-d atsetonitriilis nii, et reaktsiooniseigus oleks atsetonitriili ruumala% ~1,5.
- Substraadilahuse valmistamiseks lahustati vajalik kogus sünteesitud PNPA-d atsetonitriilis nii, et reaktsiooniseigus oleks atsetonitriili ruumala% ~1,5.
- Ensüümilahuse valmistamiseks lahustati vajalik kogus tahket KT ensüümpreparaadi pulbrit eelnevalt valmistatud Tris puhvris.

Ostetud ensüümi täpset aktiivset hulka polnud antud töös vaja määrata ning valmistatud ensüümilahuste kontsentratsioonid on töös antud kaalutud ensüümpreparaadi mass lahusti ruumala kohta. Ensüümi- ja substraadilahused tehti valmis vahetult enne katsete läbi viimist ja kasutati eksperimendis sama päeva jooksul.

2.5 Eelkatsed ilma ultrahelita

2.5.1 α -Kümotrüpsiini ensüümpreparaadi aktiivsuse test

Ensüümi suhtelise aktiivsuse määramiseks kasutati Sigma-Aldrich'i lehel pakutud meetodit (<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-chymotrypsin.html>, 2016). Selleks viidi läbi ensüümkatalüütiline substraatreaktsioon, mille kineetikat mõõdeti UV-Vis spektrofotomeetriga. Substraadina kasutati BTEE-d (N-bensoüül-L-türosiinetüülester). Saadud tulemuste põhjal arvutati ostetud KT ühikuline aktiivsus (Ühiku U definitsioon - 1 U KTd hüdrolüüsib 1 μ mol BTEE-d minutis pH 7,8 ja 25 °C juures).

2.5.2 4-nitrofenooli molaarse neeldumisteguri määramine

Valmistati viis PNP lahust kontsentratsioonidega: 5×10^{-5} M, 4×10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-6} M ning mõõdeti nende spektrid UV-Vis spektromeetriga kvartsküvetis vahemikus 230-460 nm Tris puhvril pH 7,8 juures temperatuuril $25 \pm 0,05$ °C. Küveti pipeteeriti 2,955 ml Tris puhvrit ning 45 μ l PNP lahust. Tehti kaks kordusseeriat. Leitud 4-nitrofenolaadi neeldumismaksimumil 400 nm saadud neelduvuste ja vastavate kontsentratsioonide vahel saadud sirge tõusust leiti molaarne neeldumistegur ϵ .

2.5.3 α -Kümotrüpsiini aktiivsuse määramine 4-nitrofenüülatsetaadi hüdrolüüsi algkiiruste abil

Valmistati kolm erineva KT sisaldusega ensüümpreparaadi puhvri lahust: 0,51 mg/ml, 0,25 mg/ml ja 0,13 mg/ml, millega viidi läbi ensüümkatalüütilised reaktsioonid PNPA-ga. Kõigepealt pipeteeriti reaktsiooniküveti 394 μ l ensüümilahust, mis termostateeritakse temperatuurile $25 \pm 0,05$ °C. Seejärel pipeteeriti küveti reaktsiooni initsieerimiseks 6 μ l substraadilahust, mida segatakse intensiivselt. PNPA hüdrolüüsi kineetikat jälgiti tekkiva PNP

neelduvuse järgi UV-Vis spektromeetriga lainepikkusel 400 nm 2 minuti jooksul. Samuti mõõdeti PNPA spontaanse hüdrolyüsi kineetikat samas puhverlahuses ilma ensüümita. Kõikides nendes katsetes oli küvetis PNPA algkontsentratsioon 1×10^{-4} M. Määrati reaktsioonide algkiirused v_0 , mis leitakse produkti tekkimise ajast sõltuvuse tõusust alghetkel, kui pöördreaktsiooni olulisus on väike. Kõikidele mõõtmistele tehti viis kordusseeriat.

2.5.4 4-nitrofenüülatsetaadi ensüümatalüütilise hüdrolyüsi kiiruse sõltuvuse määramine substraadi kontsentratsioonist

Valmistati ensüümilahus Tris puhvris KT sisaldusega 0,25 mg/ml. Kõigepealt pipeteeriti reaktsiooniküveti 394 μ l ensüümilahust, mis termostateeriti temperatuurile $25 \pm 0,05$ °C. Seejärel lisati 6 μ l PNPA lahust atsetonitriilis, mille segunemiseks raputati küveti intensiivselt. PNPA algkontsentratsioonid mõõteküvetis olid 1×10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 1×10^{-5} M ja 5×10^{-6} M. Mõõdeti UV-Vis spektromeetriga reaktsioonikineetikat lainepikkusel 400 nm 2 minuti jooksul. Määrati reaktsioonide algkiirused v_0 . Antud katsetele tehti kaks kordusseeriat. Koostati [S] vs v_0 sõltuvused, kust leiti konstandid K_m ja V_{max} .

2.5.5 α -Kümotrüpsiini aktiivsuse muutuse määramine puhverilahuses aja jooksul

Valmistati kaks KT lahust Tris-puhverlahuses pH 7,8 juures KT sisaldusega 0,25 mg/ml ja 0,13 mg/ml. Neid ensüümilahuseid hoiti sarnastes tingimustes nagu järgnevatel ultraheliga läbiviidavates eksperimentides kasutatavaid ensüümilahuseid Tris puhvris. Ensüümilahuse aktiivsuse muutumist mõõdeti 6 tunni jooksul, iga 40 minuti järel pipeteeriti ensüümilahust küveti ja teostati PNPA hüdrolyüsi reaktsioonikineetika mõõtmised sarnaselt alapeatükis 2.5.4 kirjeldatule. PNPA algkontsentratsioon mõõteküvetis oli 1×10^{-4} M. Määrati hüdrolyüsi reaktsioonide algkiirused v_0 . Antud katseseeriale tehti 2 kordust.

2.6 Eksperimendid ultraheliga

2.6.1 Ultraheliseadme seadistamine

Katsed ultraheliga teostati ultrahelisagedusel 25 kHz. Selleks, et katsed ultraheliga oleksid võrreldavad, peab jälgima väga erinevaid asjaolusid (Mason, 1991). Igal mõõtmisel peab rakk olema kinnitatud samas asendis vältimaks võimsuse kõikumisi, mis võib tulla näiteks heli peegeldustest raku seintel või raku klaasist, põhja paksuse erinevustest jne. Samuti on tähtis hoida ultrahelivannis konstantset vee hulka. Selleks tehti vannile vastavad märgised ja kasutati fikseeritud statiive, mille abil sai reaktsioonirakk täpselt kinnitatud. Kasutati spetsiaalselt valmistatud läbivoolujahutussärgiga klaasist reaktsioonirakku, mis oli kinnitatud tsentreeritult ultrahelivanni heligeneraatori kohale kõrgusele 35 mm raku põhjast, sukeldatuna vannis olevasse destilleeritud vette. Nii rakk kui ka ultrahelivannis olev vesi olid termostateeritud temperatuurile $25\pm 0,05$ °C. Rakku, põhja läbimõõduga 22 mm, pandi igal katsel 10 ml lahust. Sonikeerimise ajal juhiti reaktsioonirakust inertse keskkonna tekitamiseks läbi argooni, mis aitas samuti lahuseid segada.

2.6.2 Kaaliumjodiidi dosimeetria

Valmistati 0,1 M KI lahus ning 10 ml antud lahust viidi ultraheliseadme reaktsioonirakku ning termostateeriti temperatuurile $25\pm 0,05$ °C. Lahust sonikeeriti 30 minuti jooksul ühel valitud nominaalvõimsusel. Kokku viidi eksperiment läbi üheksal erineval nominaalvõimsusel: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 90% ja 100%. Lahuse neelduvuse muutust mõõdeti HPLC UV-Vis detektoriga lainepikkusel 355 nm ning määrati I_3^- ionide kontsentratsioon. I_3^- molaarne neeldumistegur lainepikkusel 355 nm on $\epsilon_{\lambda=355\text{ nm}} = 26300 \text{ dm}^3 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Tuulmets jt., 2014).

2.6.3 Ultraheli võimaliku toime määramine α -kümüotrüpsiini aktiivsusele

Enne katseseeria alustamist valmistati 100 ml ensüümilahust Tris-puhvris KT ensüümpreparaadi sisaldusega 0,13 mg/ml, 0,25 mg/ml või 0,51 mg/ml. Antud emalahusega viidi läbi terve katseseeria, ca 6 tunni jooksul. 10 ml ensüümilahust viidi ultraheliseadme reaktsioonirakku termostateerides $25\pm 0,05$ °C-le. Ühe katse vältel hoiti KT lahust ultraheliväljas 30 minutit ning hüdrolüüsi kineetika mõõtmised teostati viiel erineval doosil: 0 minutil (enne ultraheliga töötlemist), 5 minutil, 10 minutil, 20 minutil ja 30 minutil. Üks seeria sisaldas üheksat

katset, sest sama katse teostati üheksal erineval ultraheliseadme nominaalvõimsusel: 10%, 20%, 30%, 45%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%. KT aktiivsuse muutuse määramiseks võeti reaktsioonirakust pipetiga 394 µl lahust spektrofotomeetri küveti ja seejärel lisati substraadi PNPA lahust 6 µl. PNPA algkontsentratsioon reaktsiooniküvetis oli 1×10^{-4} M. Määrati reaktsioonide algkiirused v_0 sarnaselt eelnevatele ultrahelita eksperimentidele (vt. 2.5.4). KT sisaldustega 0,13 mg/ml ja 0,25 mg/ml viidi läbi kuus katseseeriat ning KT sisaldusega 0,51 mg/ml viidi läbi üks katseseeria.

2.6.4 α -Kümotrüpsiini katalüüsitud 4-nitrofenüülatsetaadi hüdrolyüsireaktsioon ultraheliväljas

Valmistati ensüümilahus KT sisaldusega 0,13 mg/ml. Reaktsioonirakku pipeteeriti 9,925 ml ensüümilahust ning rakk termostateeriti temperatuurile $25 \pm 0,05$ °C. Seejärel lisati rakku 75 µl PNPA atsetonitriili lahust ja lülitati sisse ultrahelivann. Eksperimendid viidi läbi kolmel erineval ultraheliseadme nominaalvõimsusel: 10%, 45% ja 100%. Nendes katsetes oli atsetonitriili kogu ruumala% $\sim 0,75$. PNPA algkontsentratsioon rakus oli 1×10^{-4} M. Kineetikat jälgiti proovide võtmise meetodil. Selleks pipeteeriti reaktsioonirakust välja 400 µl reaktsioonisegu, viidi see reaktsiooniküveti ning mõõdeti selle neelduvus UV-Vis spektromeetriga 400 nm juures temperatuuril $25 \pm 0,05$ °C. Seejärel võeti 1 ml mahuga mikrosüstlaga küvetist antud lahus välja ja süstiti tagasi reaktsioonirakku, mis võimaldas hoida ultraheliväljas oleva lahuse ruumala muutumatuna. Üks katse kestis 15 minutit, seega saadi kokku 15 punkti (üks punkt iga minutiga), mille alusel määrati reaktsiooni algkiirus. Ultrahelita võrdluskatsed viidi läbi spektrofotomeetri reaktsiooniküvetis, mitte ultraheliseadme reaktsioonirakus. Sarnaselt teostati PNPA spontaanse hüdrolyüsi katsed ilma ensüümita puhvri lahuses ja seda nii ultrahelita kui ka ultraheliväljas seadme nominaalvõimsustel 10%, 45% ja 100%. Määrati kõikide reaktsioonide algkiirused v_0 . Kõikidele katsetele tehti vähemalt kaks kordust.

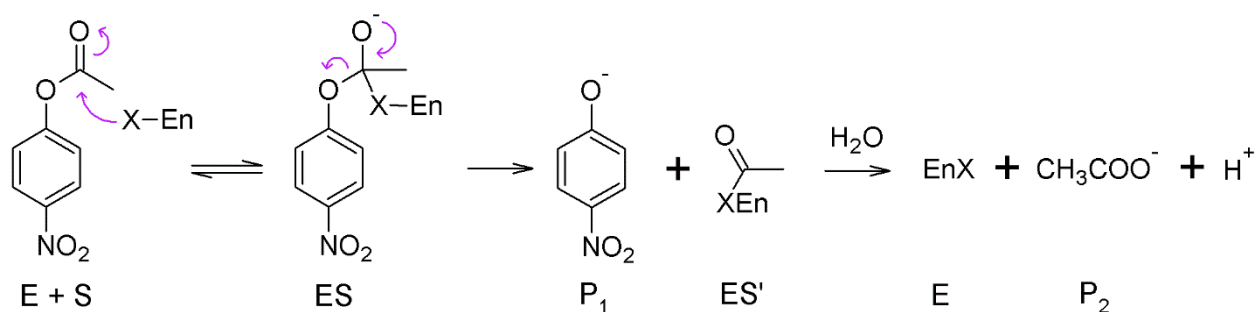
3 Tulemused ja arutelu

3.1 Uuritava ensüümi ja substraadi valik

Antud töö teravik oli suunatud uurimaks ultraheli mõju ensüümile ja selle aktiivsusele homogeenises lahuses, seega sobib ensüüm, mis lahustuks vesilahuses. Mudelensüümiks valiti α -kümotrüpsiin, sest tegu on ensüümiga, mille molekul on suhteliselt väike. See on üsna stabiilne, kergesti kättesaadav ja odav ning seda on tänapäevaks väga põhjalikult uuritud. Töö koostati eeldusega, et ensüüm lahustub valitud hulkade juures juures puhvris täielikult. Lisaks on KT teatavasti tundlik just hüdrofoobsete substraatide suhtes (Kumar ja Venkatesu, 2012). Kuna on leitud, et ultraheli mõjutab näiteks hüdrolüüsi ja solvolüüsi reaktsioone vesi-orgaanilistes segalahustites läbi hüdrofoobsetest vastastoimetest tingitud substraatide solvatatsiooni häirimisega, siis KT valik on intrigeeriv (Tuulmets jt., 2010).

Järgmiseks oli vaja leida KT-le sobilik mudelreaktsioon ensüümi aktiivsuse muutuste määramiseks. Siinjuures lähtuti samuti kirjandusest leitud info ning õppetoolis läbiviidud töedest. Substraadiks valiti PNPA, kuna KT katalüüsitud PNPA hüdrolüüsireaktsiooni on läbi aegade väga põhjalikult uuritud (Chang, 2005; Gutfreund ja Sturtevant, 1956; Kezdy ja Bender, 1962). Juba aastal 1954 kirjutati esimene töö, milles uuriti PNPA hüdrolüüsi KT-ga (Hartley ja Kilby, 1954). Lisaks on võimalik hüdrolüüsi kineetikat väga lihtsalt jälgida spektrofotomeetriselt PNP-iiooni (Skeem 1, P₁) tekkimise järgi. KT katalüüsitud PNPA hüdrolüüsi reaktsioonimehhanism on kujutatud skeemil 1.

Käesolevas töös kasutati enda poolt sünteesitud PNPA-d, nagu peatükis 2.3 kirjeldatud.



Skeem 1. KT katalüüsitud PNPA hüdrolüüsi reaktsioonimehhanism.

3.2 Eelkatsed α -kümotrüpsiini aktiivsuse määramiseks ultraheliväljas

Selleks, et saaks läbi viia vajalikke eksperimente ultraheliga, oli vaja esmalt teostada rida eeluuringuid. Eeluuringute tulemuste põhjal leiti sobivad reaktsioonitingimused ning tehti kindlaks, milliste PNPA kontsentratsioonide ja KT preparaadi hulkade puhul oleks kõige ratsionaalsem määrati ensüümi aktiivsusi. Esmalt määrati ostetud KT suhteline aktiivsus. Selleks kasutati Sigma-Aldrich'i poolt pakutud meetodit, milles oli defineeritud ensüümi aktiivsuse ühik. Värske kümotrüpsiini minimaalne lubatud aktiivsus peab olema vähemalt 40 U/mg ning üks ühik (U) kümotrüpsiini hüdrolüüsib 1 μmol BTEE-d minutis pH 7,8 ja 25 °C juures. Aktiivsuse määramine oli vajalik, kuna antud töös tehtud katsetes kulus kokku ligi 500 mg ensüümi ning seda osteti kahes erinevas anumas, mis sisaldasid 250 mg KT-d. Selleks, et töös teostatud eksperimentide tulemused oleksid võrreldavad, pidid erinevate ensüümpreparaatide suhtelised aktiivsused klappima või olema ligilähedased. Esimese ning teise anuma KT aktiivsused olid vastavalt 89,63 U/mg ning 92,11 U/mg, mis on väga sarnased.

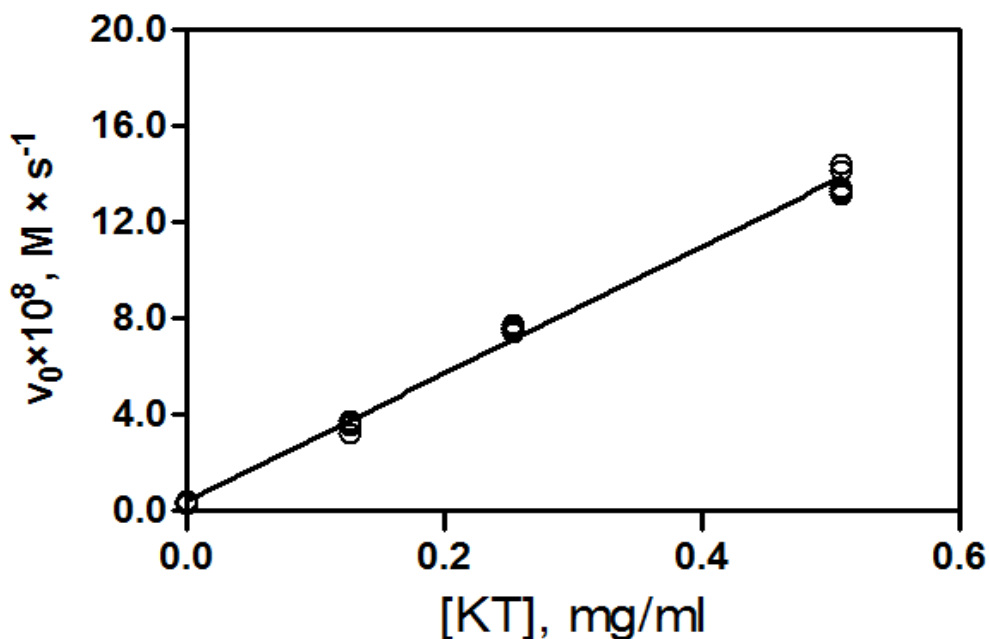
Kuna enamik katseid, nii ultraheli väljas kui ka ultrahelita, teostati alati samades reaktsioonilahustes, siis polnud KT täpse aktiivsuse määramine selles töös oluline.

Sigma-Aldrich'i poolt pakutavas meetodis kasutatavad reaktsioonitingimused osutusid sobivaks ka edasistes eksperimentides. Reaktsioonikeskkonna pH 7,8 jääb KT aktiivsuse optimumi, mis on vahemikus 7,5...8,0 (Kumar ja Venkatesu, 2012) ning temperatuuriks valiti standardtemperatuur 25 °C.

Järgnevates eksperimentides mõõdeti PNPA-st hüdrolüüsi produktina tekkiva PNP ioniseeritud vormi (4-nitrofenolaat) neelduvust. PNP pK_a 25 °C juures on 7,15, seega esineb PNP lahuses valdavalt dissotsieerunud kujul, kuid on üsna tundlik keskkonna pH muutustele. Mudelreaktsiooni algkiiruse määramiseks oli vaja kontrollida eri PNP kontsentratsioonide Lambert-Beerri seadusele vastavust, leida PNP kontsentratsiooni ja neelduvuse vahel kvantitatiivne seos (ϵ) ning määrata maksimaalse neelduvusega lainepikkus pH 7,8 juures. Lambert-Beerri seadus on $A = \epsilon lc$, kus A on neelduvus adsorbtsiooniühikutes, ϵ aine molaarne neeldumistegur, l optiline teepikkus ning c on aine kontsentratsioon. Eri PNP kontsentratsioonidega lahuste spektrid mõõdeti vahemikus 230-460 nm (Lisa 1). Maksimaalse neelduvusega lainepikkuseks oli 400 nm. Lambert-Beerri seaduse kohaselt on neelduvus lineaarses sõltuvuses kontsentratsiooniga. Spektrite mõõtmiste tulemustest saadud korrelatsiooni alusel määrati PNP ioniseeritud vormi molaarne neeldumistegur maksimaalse lainepikkuse (400 nm) ja reaktsioonides kasutatava pH=7,8 juures $\epsilon_{\lambda=400 \text{ nm}} = 16106 \text{ dm}^3 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Lisa 2).

Ensüümi aktiivsuse muutuste hindamiseks ultraheli all oli vaja leida sobivad KT ensüümpreparaadi ja PNPA kontsentratsioonid, mille leidmiseks teostati rida katseid. Selleks määrati PNPA hüdrolüüsireaktsiooni algkiiruse v_0 sõltuvus nii erinevatel KT kontsentratsioonidel kui ka PNPA algkontsentratsiooni varieerimisel.

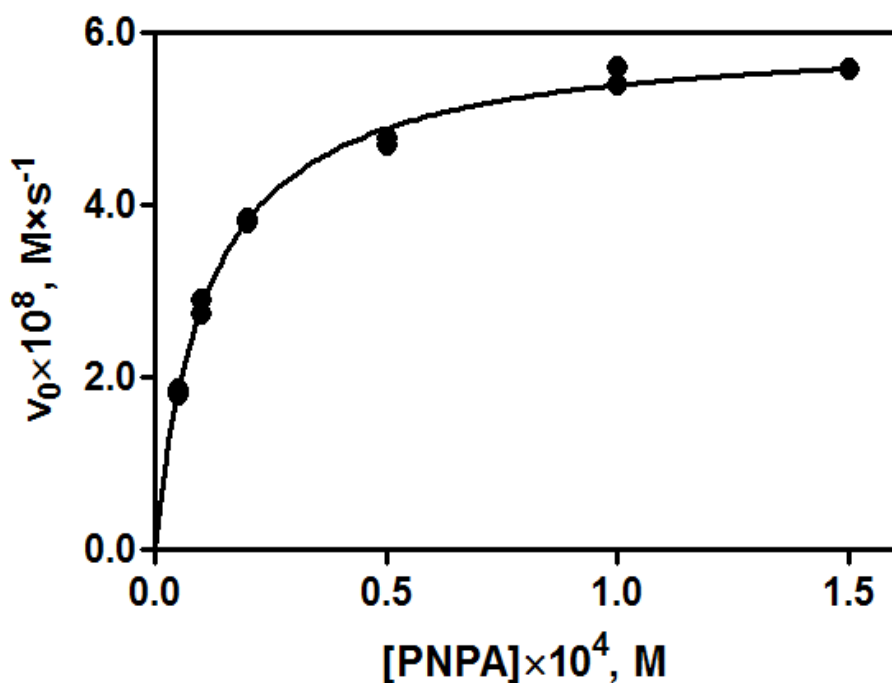
PNPA hüdrolüüsi algkiiruse v_0 sõltuvuse määramiseks KT sisaldusest teostati kineetilised mõõtmised PNPA algkontsentratsioonil 10^{-4} M, muutes ensüümi kontsentratsiooni. Samuti teostati PNPA spontaanse hüdrolüüsi kineetika mõõtmine puhverlahuses ilma ensüümita. Produkti PNP tekkimine ajas erinevatel ensüümi kontsentratsioonidel on esitatud lisas 3. Saadud sõltuvuste tõusudest leiti vastavad algkiirused v_0 (Lisa 4). Ensüümi hulga ja mudelreaktsiooni algkiiruse vahel saadi lineaarne sõltuvus, mis on esitatud joonisel 1. Antud graafiku lineaarsuse põhjal võib väita, et kasutatud PNPA algkontsentratsioonil on reaktsioon ensüümi suhtes pseodoesimest-järku.



Joonis 1. PNPA hüdrolüüsi algkiiruse sõltuvus KT sisaldusest.

Järgmiseks leiti kindlal ensüümi kontsentratsioonil (KT ensüümpreparaadi sisaldus 0,25 mg/ml) hüdrolüüsireaktsiooni algkiiruse v_0 sõltuvus substraadi PNPA kontsentratsioonist. Selleks teostati hüdrolüüsi kineetika mõõtmised viie erineva PNPA algkontsentratsiooniga. Saadud tulemused on esitatud tabelina (Lisa 5) ja graafiliselt joonisel 2 ning määratud kineetilised konstandid $K_m = 1,15 \times 10^{-5}$ M ja $V_{max} = 6,01 \times 10^{-8}$ M \times s $^{-1}$.

Eelnevate eelkatsete tulemuste põhjal valiti välja ultraheliga katsete läbiviimiseks sobilikud KT ensüümpreparaadi kontsentratsioonid (0,51 mg/ml, 0,25 mg/ml ja 0,13 mg/ml) Valitud KT kontsentratsioonid sobisid, kuna nende puhul jäi reaktsiooni algkiirus spektrofotomeetriga mõõtmiseks sobivasse vahemikku ning spontaanse hüdrolyüsi algkiirus oli rohkem kui ühe suurusjärgu võrra väiksem. Veelgi suurem ensüümi kontsentratsioon aga ei olnud otstarbekas kasutada, kuna tekivad lahustuvuse probleemid.

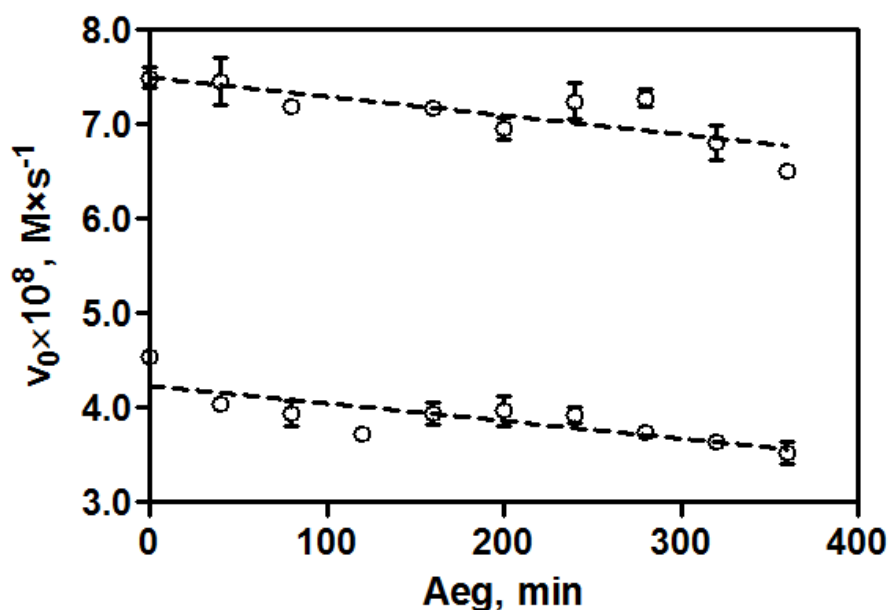


Joonis 2. Kümotrüpsiini katalüüsitud hüdrolyüsi algkiiruse v_0 sõltuvus substraadi PNPA molaarsest algkontsentratsioonist.

Ensüümi aktiivsuse hindamiseks sobilikuks PNPA algkontsentratsiooniks valiti 1×10^{-4} M, millega viidi läbi kõik edasised substraatreaktsiooni katsed. Nagu jooniselt 2 võib näha, siis substraadi kontsentratsioonil $[\text{PNPA}] = 1 \times 10^{-4}$ M on reaktsioonikiirus väga lähedal maksimaalsele väärtusele V_{max} , kus ensüüm on substraadiga täielikult küllastunud ja hüdrolyüs toimub nullindat järku reaktsioonikineetika järgi. Seega kõikumised substraadi kontsentratsioonid ei mõjuta sisuliselt määratavat algkiirust v_0 . See on väga oluline, kuna ensüümi aktiivsuse määramisel pipeteeritakse küveti ensüümi lahusesse vaid väike hulk PNPA lahust. Nendes tingimustes aga ei mõjuta pipeteerimise võimalik viga algkiiruse v_0 määramist. Suuremat substraadi kontsentratsiooni ei kasutatud lahustuvusprobleemide vältimiseks.

Kuna KT on proteolüütiline ensüüm, mis lagundab ka iseennast, siis viimase ultrahelita eelkatsena uuriti, kas ja kuidas muutub KT aktiivsus puhvris aja jooksul. Antud teadmine oli oluline, sest ultraheli väljas tehtavad katseseeriad viidi läbi ensüümilahusega, mis valmistati puhvrisesse vahetult enne katseseeria teostamist. Ühe katseseeria jaoks kulus umbes 6 tundi ning sellise ajaga võib optimaalse pHga puhvris oleva ensüümi aktiivsus langeda. Terve seeria sooviti läbi viia ühe kaalumise teatud KT lahusega eesmärgil, et ühe seeria raames tehtud ultraheli katsed oleksid omavahel paremini võrreldavad ja ilma võimalikest ensüümi algkontsentratsiooni kõikumistest.

Katsed viidi läbi kahe KT ensüümpreparaadi sisaldusega: 0,13 mg/ml ja 0,25 mg/ml. Mõõdeti ensüümi suhtelist aktiivsust 6 tunni vältel. Tulemused on toodud lisa 6. Jooniselt 3 on selgelt näha, et KT aktiivsus langeb aja jooksul mõlema ensüümi kontsentratsiooni korral sarnase trendiga. KT aktiivsus langeb 6 tunni jooksul ca 15-20%. Sellest tulenevalt määrati alati vahetult enne ultraheliga katseid ensüümi aktiivsus uuesti (vt. all pool).

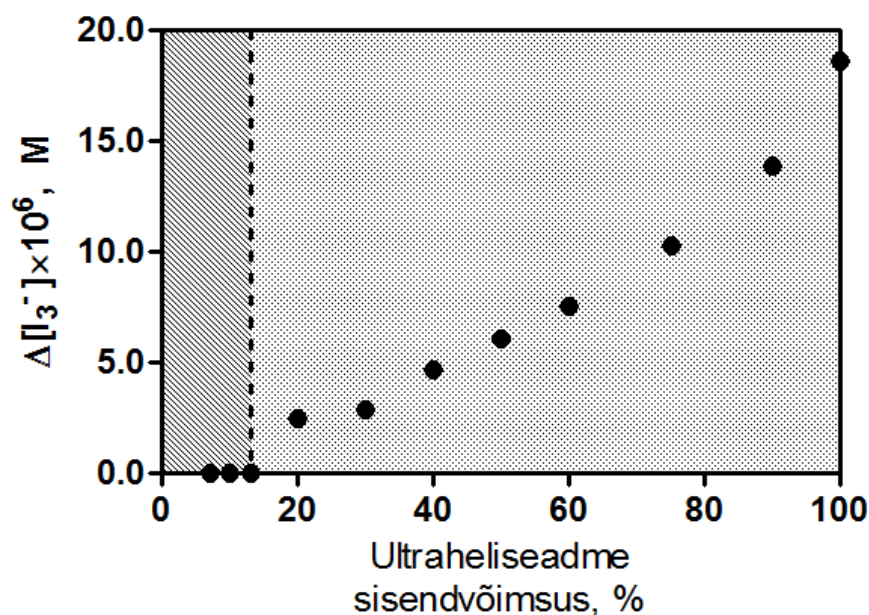


Joonis 3. Ensüümi aktiivsuse sõltuvus ajast KT ensüümpreparaadi sisaldustel 0,13 mg/ml ja 0,25 mg/ml.

3.3 Katsed ultraheliväljas

3.3.1 Kaaliumjodiidi dosimeetria

Ultraheliseadme efektiivse võimsuse ja kavitatsiooni hindamiseks viidi läbi KI dosimeetria, mis on klassikaline meetod kavitatsiooni olemasolu tõestamiseks (Mason, 1991). Kavitatsioon põhjustab vee degradatsiooni genereerides OH^\bullet , H^\bullet ja muid radikaale. Kahe OH-radikaalmolekuli kombineerumise tagajärjel tekib aga H_2O_2 , mis on teatavasti väga tugev oksüdeerija. KI dosimeetria baseerub sellel, et lahuses olevad I^- ioonid oksüdeeritakse H_2O_2 abil I_2 -ks. Lahusesse tekkinud suures ülehulgas I^- ioonid reageerivad I_2 -ga ning tekib I_3^- . Tekkivat I_3^- saab hästi määrata spektrofotomeetriliselt 355 nm juures (Mason, 2005). I_3^- molaarne neeldumistegur lainepikkusel 355 nm on $\epsilon_{\lambda=355 \text{ nm}} = 26300 \text{ dm}^3 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Tuulmets jt., 2014).



Joonis 4. KI dosimeetria vastus ultraheli võimsuse muutusele, väljendatuna vastavalt I_3^- molaarse kontsentratsiooni muutusena ja ultraheli seadme protsendilise sisendenergiaga.

KI tulemused on esitatud tabelina lisa 7 ja graafiliselt joonisel 4 ultraheliseadme sisendvõimsuse funktsioonina. Nagu näha joonisel 4, et antud töös kasutatavatel tingimustel tuvastab dosimeeter radikaale alates 14%-st ultraheli sisendvõimsusest, seega ei esine lahustes kavitatsiooni 30-minutilisel sonikeerimisel 13% ja sellest madalamatel ultraheli võimsustel. Sarnaseid efekte on täheldatud mitmel juhul (Tuulmets jt., 2014).

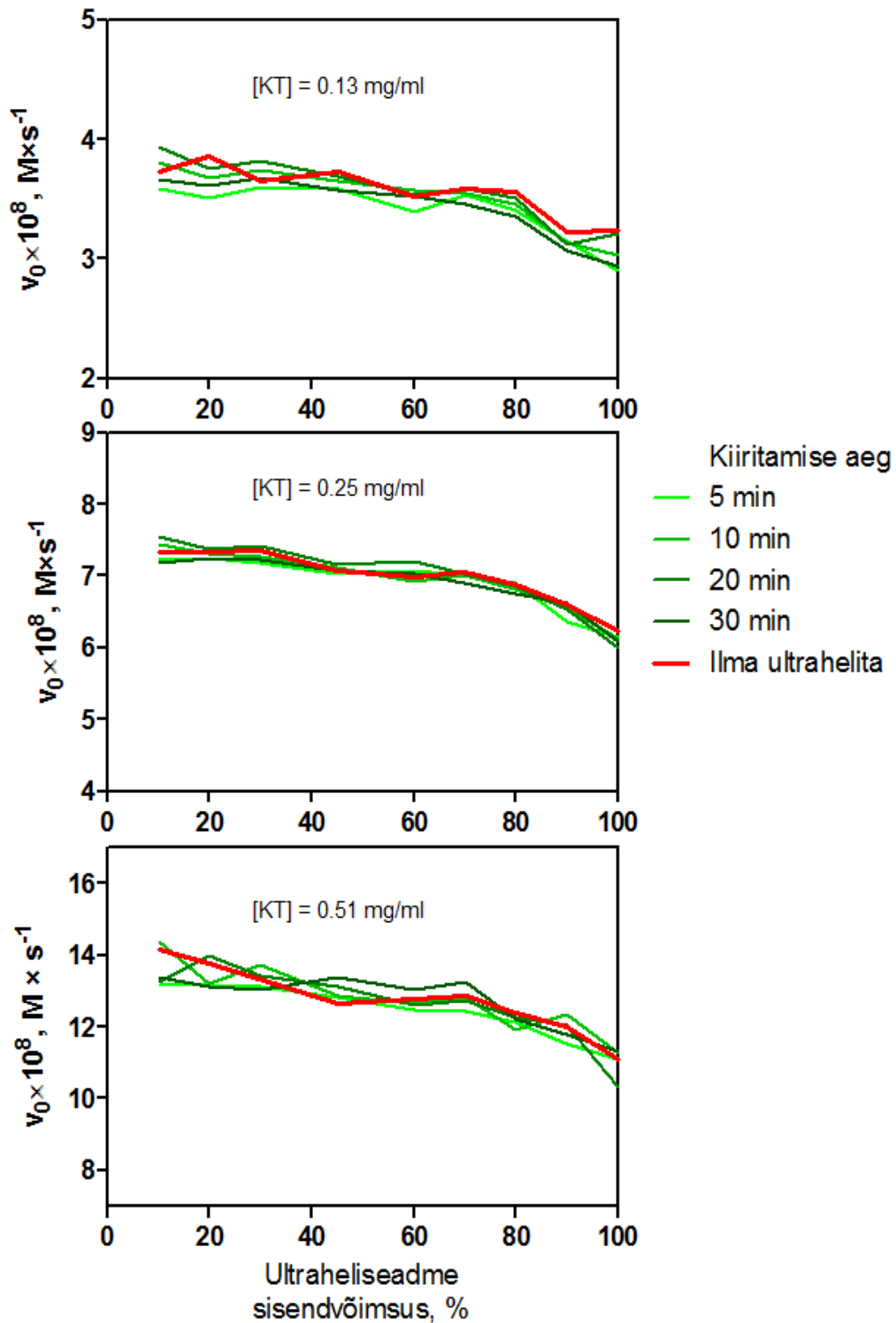
Seega on võimalik antud tingimustel uurida nii ultraheli helilainete (mikrohoovuste) kui ka kavitatsioonist tingitud efekte lahustes.

3.3.2 α -Kümotrüpsiini lahuse sonikeerimine ultraheliväljas

Ultraheli toimet KT aktiivsusele uuriti kolmel erineval ensüümi kontsentratsioonil (0,13; 0,25; 0,51 mg/ml) ja seda erinevatel ultraheli võimsustel (0-100%). Aktiivsuse hindamiseks määratud PNPA hüdroolüüsi algkiirused v_0 on tabuleeritud lisades 8-10. Igal ultraheli võimsusel määrati KT aktiivsus pärast 5, 10, 20 ja 30 minutit sonikeerimist. Antud eksperimendid teostati kõigil juhtudel sarnaselt alustades 10% ja lõpetades 100% ultraheli nominaalvõimsusega ja ühe mõõtmisreeia kestvusega 6 tundi. See on tähtis märkida, et oleks võimalik arvestada KT iseenesliku aktiivsuse langusega kasutatud puhverlahuses ja võimaldaks erinevate eksperimentide tulemusi võrrelda. Samal põhjusel teostati pika mõõtmisreeia jooksul enne iga järgmist ultraheli võimsuse rakendamist ensüümi aktiivsuse määramine ilma ultrahelita, et hinnata KT spontaanset lagunemist.

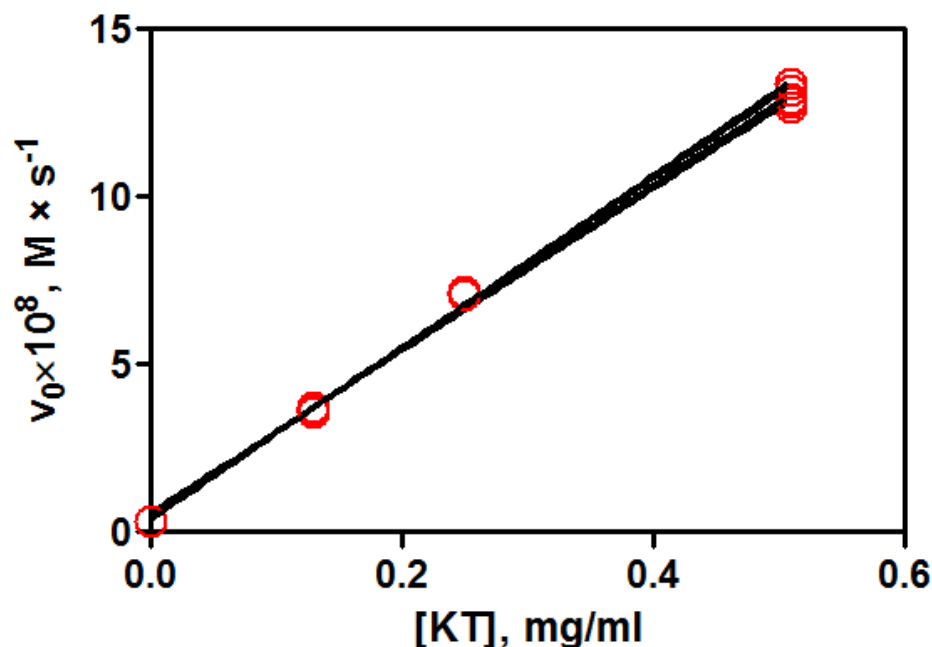
Piltlikustamiseks saadud eksperimentaalseid tulemusi kõigi kolme ensüümi kontsentratsiooni korral on joonisel 5 esitatud PNPA hüdroolüüsi algkiirused v_0 , mis on saadud erinevatel ultraheliga töötlemise aegadel ja pandud vastakuti ultraheli võimsusega. Kõigil kolmel graafikul on punase joonega tähistatud KT aktiivsus vahetult enne ultraheli rakendamist (seega ei sõltu see ultraheli võimsusest) ehk kajastab proteolüütilise KT ebastabiilsust puhverlahuses pH-l 7,8, kus on KT aktiivsusmaksimum. Ensüümi aktiivsuse langus selle aja jooksul on kõigil jälgitud kontsentratsioonidel 20% kandis, mis kattub eelkatsetes leitud tulemustega (joonis 3).

Nagu jooniselt 5 ilmneb, puudub antud tingimustel ultrahelil märgatav mõju ensüümi aktiivsusele homogeenses lahuses sõltumata ensüümi hulgast, sonikeerimise ajast või rakendatud võimsusest. Seda nii allpool kavitatsiooniläve, mida võiks oodatagi (nominaalvõimsus 10%) kui ka suurematel ultraheli võimsustel, kus kavitatsiooni degradeeriv toime võiks ilmned. Kuigi KT on antud puhverlahuses ise küll teatud määral ebastabiilne, siis ultraheliväljal mingit toimet pole. Seega on olemas tingimuste piirkond, kus ensüümidega saab töötada ultraheli väljas nii, et ei toimu ensüümi lagunemist.



Joonis 5. KT aktiivsus vs ultraheliseadme sisendvõimsus erinevatel ensüümi algkontsentratsioonidel. Punased jooned kajastavad KT aktiivsuse iseeneslikku langust ilma ultrahelita 6 tunni jooksul. Rohelised jooned kajastavad aktiivsusi erinevatel ultraheli doosidel.

Samade järelduste ilmestamiseks on joonisel 6 toodud veel üks näide, mis on sarnane sõltuvus nagu on esitatud joonisel 1, kuid antud juhul PNPA hüdrolüüsi algkiiruste v_0 sõltuvus KT kontsentratsioonist on saadud pärast ensüümilahuse töötlemist ultraheliga 45%-lise võimsuse juures erinevatel doosidel (0 min, 5 min, 10 min, 20 min ja 30 min). Nagu näha, ei esine mingisugust ultraheli efekti KT aktiivsusele ka erinevatel ensüümi kontsentratsioonidel. Sarnased sõltuvused saadi kõigi ultraheliseadme sisendvõimsuste kasutamise korral. Seega algkiirus v_0 ega V_{max} ei sõltu ultrahelist.



Joonis 6. PNPA hüdrolüüsi algkiiruse v_0 sõltuvus KT sisaldusest pärast ensüümilahuse töötlemist ultraheliga 45%-lise võimsuse juures erinevatel doosidel (0 min, 5 min, 10 min, 20 min ja 30 min).

3.3.3 α -Kümotrüpsiini reaktsioon 4-nitrofenüülatsetaadiga ultraheliväljas

Olgugi, et eespool kirjeldatud eksperimentide käigus ei täheldatud KT aktiivsuse muutust ultraheli toimetel, siis see veel ei tähenda, et ensüümiga mingisuguseid muutusi ei toimunud. Ensüümi aktiivsust mõõdeti väljaspool ultrahelivälja proovi võtmise abil. Sõltumata sellest milline on ensüüm heliväljas, kui just ei toimu kavitatsioonilist lagunemist, siis ultraheli välja lülitamisel taastab ensüüm oma omadused. Sellest mõttest tulenevalt soovisime vaadata, kuidas käitub substraadireaktsioon ensüümiga otse ultraheliväljas ja ka ilmneb mingeid muutusi reaktsiooni kineetikas.

Selleks viidi läbi KT katalüüsitud PNPA hüdrolyüsireaktsioon otse ultraheliväljas kolmel sisendvõimsusel (10%, 45%, 100%) ja ilma ultrahelita. Sarnaselt teostati spontaanse PNPA hüdrolyüsi kineetika mõõtmised ultraheli all ilma ensüümita, kuna on leitud, et ultraheli mõjutab 4-nitrofenüülataatide hüdrolyüsi kiirusi, eriti vesi-orgaanilistes solventsegudes (Salmar jt., 2006; Tuulmets jt., 2014). Saadud algkiirused v_0 ensüümikatalüütilise PNPA hüdrolyüsile on esitatud tabelis 1 ja vastavad spontaanse hüdrolyüsi kiirused tabelis 2. Nagu tabelist 1 võib näha, kahaneb PNPA ensüümikatalüüsitud hüdrolyüsi kiirus ühtlaselt ultraheli võimsuse kasvuga. Tabelites 1 ja 2 on samuti esitatud ultraheli kineetilised efektid ehk hüdrolyüsireaktsiooni algkiirus $v_0(\text{UH})$ ultraheli all jagatud algkiirus $v_0(\text{ilma})$ ilma ultrahelita. Samas ei saa seda kohe ultraheli efektiks lugeda, kuna ka nende eksperimentide puhul kasutati ühist KT puhvri lahust ja pikaks veninud eksperimendiseeria tõttu (ca 6 tundi) võib eeldada KT iseeneslikku lagunemist ja sellest tulenevat aktiivsuse langust, mis jääb samuti 15% juurde. Seega ei ilmne ka siin, et ultrahelil oleks mingi mõju ensüümile.

Tabel 1. Ultraheliväljas teostatud PNPA ensüümikatalüütilise hüdrolyüsi keskmised algkiirused v_0 ja vastavad keskmisest absoluuthälbest saadud määramatused. Algkiirused v_0 on määratud ilma ultrahelita tingimustes ja kolmel erineval ultraheli võimsusel. KT ensüümpreparaadi sisaldus 0,13 mg/ml.

Ultraheli võimsus, %	Algkiirus v_0 , $\text{M} \times \text{s}^{-1}$ ($\times 10^8$) ja vastav määramatus	Ultraheli efekt $v_0(\text{UH})/v_0(\text{ilma})$	Katsete arv
Ultrahelita	$2,94 \pm 0,02$	1,00	2
10	$2,76 \pm 0,02$	0,94	2
45	$2,59 \pm 0,03$	0,88	2
100	$2,50 \pm 0,08$	0,85	2

Tabel 2. Ultraheliväljas teostatud PNPA spontaanse hüdrolüüsi keskmised algkiirused v_0 ja vastavad keskmisest absoluuthälbest saadud määramatused. Algkiirused v_0 on määratud ilma ultrahelita tingimustes ja kolmel erineval ultraheli võimsusel.

Ultraheli võimsus, %	Algkiirus v_0 , $M \times s^{-1}$ ($\times 10^9$) ja vastav määramatus	Ultraheli efekt $v_0(\text{UH})/v_0(\text{ilma})$	Katsete arv
Ultrahelita	$3,27 \pm 0,20$	1,00	4
10	$2,97 \pm 0,15$	0,91	3
45	$3,31 \pm 0,08$	1,01	3
100	$3,99 \pm 0,26$	1,22	2

Samas ilmneb tabelist 2, et ilma ensüümita hüdrolüüsil on ultraheli kineetiline efekt üsna huvitav. 10% ultraheli võimsuse juures, kus ei esine kavitatsiooni, oleks nagu aeglustav efekt ja seda 9%, mis on kogu lahuse peale väga märkimisväärne. Samas aga 100% võimsusel, kus on juba märkimisväärne kavitatsioon (vt joonis 4), on 22%-ne ultraheli kiirendav efekt. Siiski on need mõlemad efektid suhteliselt väikesed võrreldes ensüümkatalüüsitud kiirustega ja ei avaldu ensüümkatalüüsitud hüdrolüüsi kiiruses.

Kuigi ilma ensüümita ja veel reaktsiooni uurimine ultraheli all polnud selle töö peamine eesmärk ning sellele jõuti keskenduda vaid lühikese aja jooksul, on need esmased tulemused siiski huvitavad. Kuigi ultraheli ei suuda meie valitud tingimustel mõjutada ensüümis toimuvat, siis näiteks läbi reagentide solvatatsiooni häirimise tundub olevat tal mõju lahuses toimuvale, mida on täheldatud ka varasemates töodes (Tuulmets jt., 2010). Need asjaolud vajavad edasisi põhjalikke uuringuid.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks oli välja selgitada, kas ja milline toime on ultrahelil KT-le lahuses kasutatud ultrahelisüsteemi karakteristikute juures.

Selleks teostati eeluuringud, et leida sobivad tingimused ensüümi ja selle aktiivsuse määramiseks substraatreaktsiooniga ultraheli katseteks.

Viidi läbi ultrahelisüsteemi seadistus ja karakteriseerimine standardse kaaliumiodiidi (KI) dosimeetria abil. KI dosimeetria viidi läbi erinevatel ultrahelivanni sisendvõimsustel ja leiti, et allpool 13%-i nominaalvõimsust ei esine antud süsteemis kavitatsiooninähtus.

Ultraheli toimet KT aktiivsusele uuriti kolmel erineval ensüümi kontsentratsioonil: 0,13; 0,25 ja 0,51 mg/ml, erinevatel ultraheli võimsustel (0-100%) ja neljal kiiritamise ajal (5; 10; 20; 30 min). Kuna katseseeria oli pikk, pidi siinkohal arvestama võimaliku KT aktiivsuse spontaanse langemisega. Ensüümilahuseid sonikeeriti ultraheliga ja määrati seejärel ensüümi aktiivsuse muutuse hindamiseks KT katalüüsitava PNPA hüdrolyüsi algkiirus. Tulemustest ilmneb, et ultraheliga on KT aktiivsuse langus sarnane spontaanse KT aktiivsuse langusega ajas. Seega võib väita, et antud tingimustel puudub ultrahelil igasugune destruktivne mõju ensüümile homogeenes puhverlahuses, sõltumata ensüümi hulgast, rakendatud ultraheli võimsusest või kiiritamise ajast. Seega leiti tingimuste piirkond, kus ensüümidega saab töötada ultraheliväljas nii, et ei toimuks tavapäraselt suureks probleemiks olev ensüümi lagunemine.

Kuna ensüümi aktiivsuse muutuse hindamine ei toimunud otse ultraheliväljas, siis ei saa väita, et ultrahelil polnud ensüümile mingit mõju. Selleks viidi KT poolt katalüüsitud PNPA hüdrolyüsireaktsioon otse ultrahelivälja ja vaadati kuidas muutub substraadireaktsiooni kiirus. Ultraheli toimet nii KT katalüüsitud kui spontaansele PNPA hüdrolyüsireaktsioonile uuriti ultraheliväljas kolmel võimsusel (10%, 45%, 100%) ja ilma ultrahelita. PNPA ensüümkatalüüsitud hüdrolyüsi kiirus kahaneb ühtlaselt ultraheli võimsuse kasvuga. See on sarnane KT iseeneslikule lagunemisele ja sellest tulenevale aktiivsuse langusele. Seega ei paista ka siin, et ultrahelil oleks mingi mõju nendel tingimustel KT aktiivsusele. Samas ilmneb ultraheli mõju spontaansele PNPA hüdrolyüsireaktsioonile. Madalal ultraheli võimsusel (10%) on aeglustav efekt (9%) ja kõrgel ultraheli võimsusel (100%) kiirendav efekt (22%). Antud efektid on küll suhteliselt väikesed võrreldes ensüümkatalüüsitud kiirustega, kuid sellegipoolest märkimisväärsed. Tundub, et ultraheli mõjutab PNPA spontaanse hüdrolyüsi lahuses, kuid need esmased tulemused vajavad kindlasti edasist uurimist.

The effect of ultrasound on α -chymotrypsin activity in solution

Kristen Luik

SUMMARY

It is known that ultrasound causes numerous complex effects in solutions which can affect a great deal of chemical and physical processes. Ultrasound caused effects include mainly cavitation, microjets, acoustic shockwave and microstreaming. Because of these phenomena it has applications in a wide spectrum of fields. For example ultrasound can be used for cleaning, sterilization, drying, degassing, defoaming, welding, drilling, filtration etc.

Research in this field has been ongoing for decades and as of late ultrasound has become more and more popular in assisting to carry out different processes in the area of biotechnology. Ultrasound is used to help increase productivity of biodiesels, treat wastewater, both process and preserve food products, cell disruption to release intracellular enzymes and organelles etc. For these applications, ultrasound is mostly used in heterogeneous solutions. However it is not known how ultrasound affects homogeneous solutions and especially enzymes in this case.

The main aim of this bachelor's thesis was to find out if ultrasound has an effect on α -chymotrypsin in a homogeneous solution. To achieve this we carried out extensive experiments with enzyme solutions under ultrasound irradiation and measured changes in the activity of the enzyme. In addition to that we also carried out kinetics measurements with α -chymotrypsin-catalyzed and spontaneous 4-nitrophenyl acetate hydrolysis reactions. This was done both with and without ultrasonic irradiation.

The results showed that ultrasound had no destructive effect on α -chymotrypsin however, ultrasound had an effect on spontaneous hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate. At low ultrasonic power we saw a retardation and at high ultrasonic intensity an acceleration of the spontaneous hydrolysis. Further studies are required.

KASUTATUD KIRJANDUS

Artiklid

Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J., Ballesteros, A. (2006). Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol.* 24: 281-287.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.04.002>.

Bradley, M., Ashokkumar, M., Grieser, F. (2003). Sonochemical production of fluorescent and phosphorescent latex particles. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 525-529.
<https://doi.org/10.1021/ja0268581>.

Chisti, Y., Moo-Yong, M. (1986). Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 194-204. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90087-6).

Cintas, P., Mantegna, S., Gaudino, E. C., Cravotto, G. (2010). A new pilot flow reactor for high-intensity ultrasound irradiation. Application to the synthesis of biodiesel. *Ultrason. Sonochem.* 17: 985-989. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.12.003>.

Chakma, S., Moholkar, V. S. (2011). Mechanistic features of ultrasonic desorption of aromatic pollutants. *Chem. Eng. J.* 175: 356-367. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.123>.

Delgado-Povedano, M. M., Luque de Castro, M. D. (2015). A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta*, 889: 1-21.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.004>.

Entezari, M. H., Petrier, C. (2004). A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-biodegradation of phenol. *Appl. Catal B: Environ.* 53: 257-263.
<https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2004.01.025>.

Froment, M. T., Lockridge, O., Masson, P. (1998). Resistance of butyrylcholinesterase to inactivation by ultrasound: effects of ultrasound on catalytic activity and subunit association. *Biochim. Biophys. Acta.* 1387: 53-64. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00105-8).

Gutfreund, H., Sturtevant, J. M. (1956). The mechanism of the reaction of chymotrypsin with p-nitrophenyl acetate. *Biochem. J.* 63: 656–661.

Hanh, H. D., Dong, N. T., Okitsu, K., Nishimura, R., Maeda, Y. (2009). Biodiesel production by esterification of oleic acid with short-chain alcohols under ultrasonic irradiation condition. *Renew. Energ.* 34: 780–783. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.04.001>.

Hartley, B. S., Kilby, B. A. (1954). The reaction of p-nitrophenyl esters with chymotrypsin and insulin. *Biochem. J.* 56: 288-297.

Jaykumar, B. B., Chakma, S., Moholkar, V. S. (2013). Mechanistic features of oxidative desulfurization using sono-Fenton-peracetic acid (ultrasound/ Fe^{2+} - CH_3COOH - H_2O_2) system. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52: 9038-9047. <https://doi.org/10.1021/ie400879j>.

Jian, S., Wenyi, T., Wuyong, C. (2008). Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste. *J. Clean. Prod.* 16: 591–597. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2006.12.005>.

Kelkar, M. A., Gogate, P. R., Pandit, A. B. (2008). Intensification of esterification of acids for synthesis of biodiesel using acoustic and hydrodynamic cavitation. *Ultrason. Sonochem.* 15: 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.04.003>.

Kezdy, F. J., Bender, M. L. (1962). The Kinetics of the α -Chymotrypsin-Catalyzed Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetate. ACS Publications, 6: 1097–1106. <https://doi.org/10.1021/bi00912a021>.

Kumar, G., Kumar, D., Poonam, Johari, R., Singh, C. P. (2011). Enzymatic transesterification of *Jatropha curcas* oil assisted by ultrasonication. *Ultrason. Sonochem.* 18: 923-927. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.03.004>.

Kumar, A., Venkatesu, P. (2012). Overview of the Stability of α -Chymotrypsin in Different Solvent Media. *Chemical Reviews*, 112: 4283–4307. <https://doi.org/10.1021/cr2003773>.

Li, C., Yoshimoto, M., Ogata, H., Tsukuda, N., Fukunaga, K., Nakao, K. (2005). Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks. *Ultrason. Sonochem.* 12: 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.02.004>.

Li, H., Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I. (2013). Reduction of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2, in roasted peanuts by ultrasound assisted enzymatic treatment. *Food Chem.* 141: 762-768. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.049>.

Liu, Q., Janssen, M. H. A., Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (2005). Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations. *Green Chem.* 7: 39-42. <https://doi.org/10.1039/B412848F>.

Mann, T. L., Krull, U. J. (2004). The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 20: 945-955. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.06.021>.

Park, J. H., Meriwether, P. C., Cunningham L. W. (1961). The Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetate Catalyzed by 3-Phosphoglyceraldehyde Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 236: 136-141.

Pena-Farfal, C., Moreda-Pineiro, A., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P., Pinochet-Cancino, H., Gregori-Henriquez, I. (2005). Speeding up enzymatic hydrolysis procedures for the multi-element determination in edible seaweed. *Anal. Chim. Acta* 548: 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.06.004>.

Piiskop, S., Salmar, S., Tuulmets, A., Kuznetsov, A., Järv, J. (2013). Kinetic sonication effects in aqueous acetonitrile solutions. Reaction rate levelling by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* 20: 1414-1418. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.03.014>.

- Rokhina, E. V., Lens, P., Virkutyte, J. (2009). Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends Biotechnol.* 27: 298-306. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.001>.
- Saez-Bastante, J., Pinzi, S., Arzamendi, G., Luque de Castro, M.D., Priego-Capote, F., Dorado, M. P. (2014). Influence of vegetable oil fatty acid composition on ultrasound-assisted synthesis of biodiesel. *Fuel.* 125: 1818-1825. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.02.015>.
- Saez-Bastante, J., Pinzi, S., Reyero, I., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M. D., Dorado, M. P. (2014). Biodiesel synthesis from saturated and unsaturated oils assisted by the combination of ultrasound, agitation and heating. *Fuel.* 131: 6-16. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.04.066>.
- Sakakibara, M., Wang, D., Takahashi, R., Takahashi, K., Mori, S. (1996). Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase. *Enzyme Microb. Technol.* 18: 444-448. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00128-X](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00128-X).
- Salmar, S., Cravatto, G., Tuulmets, A., Hagu, H. (2006). Effects of Ultrasound on the Base-Catalyzed Hydrolysis of 4-Nitrophenyl Acetate in Aqueous Ethanol. *J. Phys. Chem. B.* 110: 5817-5821. <https://doi.org/10.1021/jp057405w>.
- Sangave, P. C., Pandit, A. B. (2006). Ultrasound and enzyme assisted biodegradation of distillery wastewater. *J. Environ. Manage.* 80: 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.08.010>.
- Sinisterra, J. V. (1992). Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics* 30: 180-185. [https://doi.org/10.1016/0041-624X\(92\)90070-3](https://doi.org/10.1016/0041-624X(92)90070-3).
- Subhedar, P. B., Gogate, P. R. (2014). Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 101: 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.01.002>.
- Sun, S., Wang, S., Wang, P., Wu, Q., Fang, S. (2015). Ultrasound assisted morphological control of mesoporous silica with improved lysozyme adsorption, *Ultrason. Sonochem.* 23: 21-25. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.002>.

Tauber, M. M., Gübitz, G. M., Rehorek, A. (2008). Degradation of azo dyes by oxidative processes – laccase and ultrasound treatment. *Bioresour. Technol.* 99: 4213–4220.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.085>.

Tian, Z. M., Wan, M. X., Wang, S. P., Kang, J. Q. (2004). Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11: 399-404.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2003.09.004>.

Tuulmets, A., Piiskop, S., Järv, J., Salmar, S. (2014). Sonication effects on non-radical reactions. A sonochemistry beyond the cavitation? *Ultrason. Sonochem.* 21: 997-1001.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.11.001>.

Veljkovic, V. B., Avramovic, J. M., Stamenkovic, O. S. (2012). Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: state of the art and the perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16: 1193-1209. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.11.022>.

Vercet, A., Burgos, J., Crelier, S., Lopez-Buesa, P. (2001). Inactivation of proteases and lipases by ultrasound. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 2: 139-150. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00037-0](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00037-0).

Wang, Z., Lin, X., Li, P., Zhang, J., Wang, S., Ma, H. (2012). Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. *Bioresour. Technol.* 117: 222-227.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.015>.

Özbek, B., Ülgen, K. Ö. (2000). The stability of enzymes after sonication. *Process Biochem.* 35: 1037-1043. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00141-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00141-2).

Yachmenev, V. G., Bertoniere, N. R., Blanchard, E. J. (2002). Intensification of the bio-processing of cotton textiles by combined enzyme/ultrasound treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77: 559–567. <https://doi.org/10.1002/jctb.579>.

Yu, D., Tian, L., Wu, H., Wang, S., Wang, Y., Ma, D., Fang, X. (2010). Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. *Process Biochem.* 45: 519-525. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.012>.

Raamatud

Bermudez-Aguirre, D. (2017). *Ultrasound: Advances in Food Processing and Preservation. Technology and Engineering.* Academic Press.

Chang, R. (2005). Enzyme Kinetics. In *Physical Chemistry for the Biosciences*, p. 363-400. University Science Books, California.

Luche, J.-L. (1998). *Synthetic Organic Sonochemistry*, p. 1-4. Springer Science+Business Media, New York.

Mason, T. J. (1991). *Practical Sonochemistry: User's guide to applications in chemistry and chemical engineering*, p. 43-46. Ellis Horwood.

Mason, T. J. (2005). *Sonochemistry*, p. 1-20. Oxford University Press Inc. New York.

Tuulmets, A., Salmar, S., Järv, J. (2010). Ultrasound and hydrophobic interactions in solutions, p. 129-156. In: Nowak, Filip M. (Ed.). *Sonochemistry: Theory, Reactions and Synthesis, and Applications.* Nova Science Publishers.

Bakalaureusetöö

Vahtras, R. *Ultraheli toime α -Kümotrüpsiini reaktsioonile 4-nitrofenüülatsetaadiga.* (2015). Tartu Ülikool.

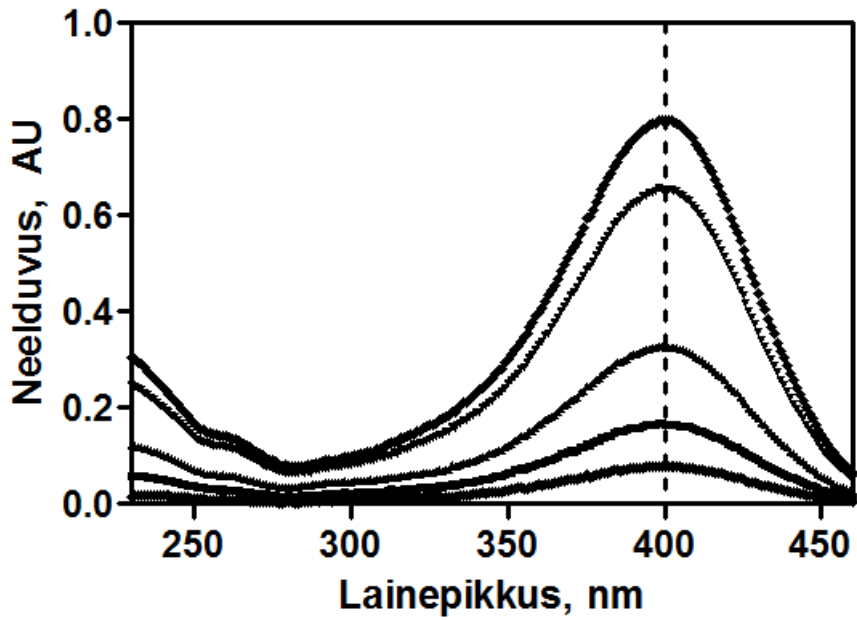
Kasutatud veebiaadressid

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-chymotrypsin.html>, (2016)

LISAD

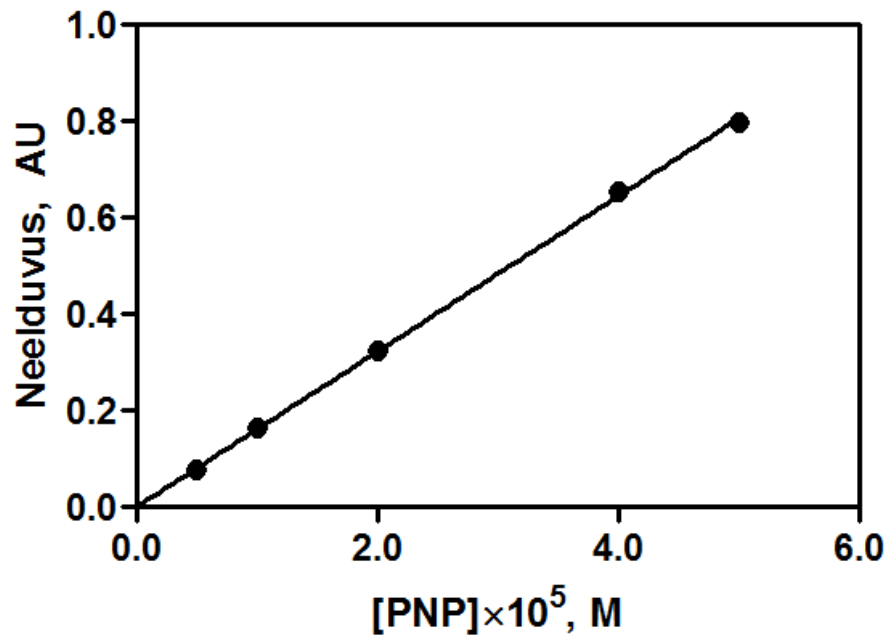
Lisa 1.

Valitud PNP molaarsete kontsentratsioonidega lahuste neelduvusspektrid vahemikus 230 kuni 460 nm. PNP-iooni neelduvusmaksimum 400 nm juures.



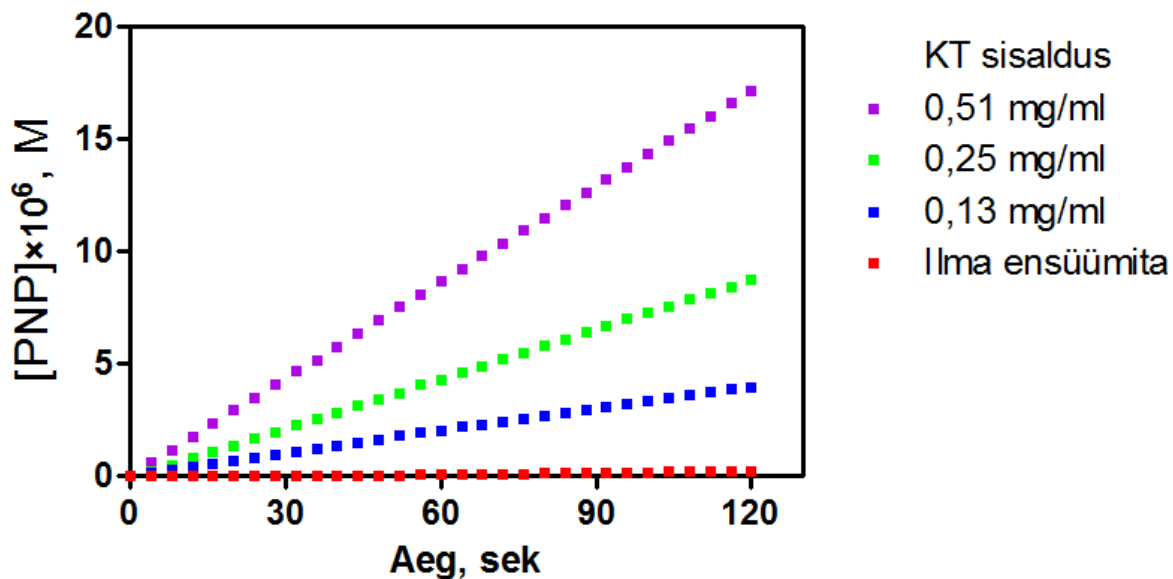
Lisa 2.

Valitud PNP molaarsed kontsentratsioonid vs vastavad neelduvused 400 nm juures.



Lisa 3.

Erinevate KT sisaldustega läbi viidud PNPA ensüümkatalüütilisel hüdrolüüsil tekkinud PNP kontsentratsioonide muutus ajas.



Lisa 4.

PNPA hüdrolüüsi algkiirused v_0 ja vastavad keskmisest absoluuthälbest saadud määramused kolmel erineval KT sisaldusel ning ilma ensüümita.

KT sisaldus, mg/ml	Algkiirus v_0 , $M \times s^{-1}$ ja vastav määramatus ($\times 10^8$)	Katsete arv
0	$0,33 \pm 0,02$	4
0,13	$3,53 \pm 0,09$	5
0,25	$7,57 \pm 0,06$	5
0,51	$13,67 \pm 0,25$	5

Lisa 5.

PNPA ensümkatalüütilise hüdrolüüsi algkiirused v_0 vastavate PNPA algkontsentratsioonide korral ning keskmisest absoluuthälbest saadud määramatused. KT sisaldus 0,25 mg/ml.

[PNPA], M ($\times 10^4$)	Algkiirus v_0 , M \times s ⁻¹ ja vastav määramatus ($\times 10^8$)	Katsete arv
1,5	5,58	1
1	5,50 \pm 0,09	2
0,5	4,74 \pm 0,04	2
0,2	3,82 \pm 0,02	2
0,1	2,82 \pm 0,09	2
0,05	1,83 \pm 0,04	2

Lisa 6.

KT aktiivsuse muutus puhvrilahuses säilitamisel toatemperatuuril aja jooksul. Muutust mõõdeti kahel KT ensümpreparaadi sisaldusel ning tehti kaks korduskatset.

Aeg, min	Algkiirus v_0 , M \times s ⁻¹ ($\times 10^8$) ja vastav määramatus	
	KT sisaldus 0,25 mg/ml	KT sisaldus 0,13 mg/ml
0	7,49 \pm 0,11	4,53 \pm 0,04
40	7,45 \pm 0,25	4,05 \pm 0,05
80	7,19 \pm 0,06	3,94 \pm 0,13
120	-	3,72 \pm 0,03
160	7,18 \pm 0,04	3,94 \pm 0,11
200	6,96 \pm 0,12	3,97 \pm 0,16
240	7,24 \pm 0,19	3,93 \pm 0,09
280	7,27 \pm 0,09	3,74 \pm 0,04
320	6,80 \pm 0,18	3,64 \pm 0,04
360	6,51 \pm 0,01	3,52 \pm 0,11

Lisa 7.

Ultraheli võimsuse mõju KI dosimeetrile 30 minutilisel sonikeerimisel.

Ultraheliseadme sisendvõimsus, %	$\Delta[I_3^-]$, M ($\times 10^6$)
100	18,63
90	13,88
75	10,25
60	7,53
50	6,09
40	4,65
30	2,89
20	2,43
13	0
10	0
7	0

Lisa 8.

PNPA ensüümatalüütilise hüdrolyüsi keskmised algkiirused v_0 , mis on saadud kuuel korduskatsel ja vastavad keskmisest absoluuthälbest saadud määramatused. Algkiirused v_0 on määratud ilma ultrahelita tingimustes ja varieeruvatel ultraheli võimsustel ning seda erineva sonikeerimise aja jooksul. Ensüümpreparaadi sisaldus 0,13 mg/ml.

Ultraheli võimsus %	Algkiirus v_0 , M \times s ⁻¹ ja vastav määramatus ($\times 10^8$)				
	Sonikeerimise aeg (doos)				Ultrahelita
	5 min	10 min	20 min	30 min	
10	3,59 \pm 0,18	3,81 \pm 0,19	3,94 \pm 0,14	3,67 \pm 0,09	3,73 \pm 0,19
20	3,51 \pm 0,12	3,68 \pm 0,16	3,75 \pm 0,19	3,61 \pm 0,15	3,85 \pm 0,16
30	3,60 \pm 0,07	3,74 \pm 0,13	3,81 \pm 0,18	3,68 \pm 0,15	3,65 \pm 0,12
45	3,59 \pm 0,12	3,66 \pm 0,12	3,69 \pm 0,07	3,57 \pm 0,12	3,73 \pm 0,18
60	3,39 \pm 0,11	3,57 \pm 0,12	3,54 \pm 0,13	3,53 \pm 0,11	3,52 \pm 0,13
70	3,54 \pm 0,16	3,55 \pm 0,13	3,59 \pm 0,15	3,46 \pm 0,11	3,59 \pm 0,17
80	3,41 \pm 0,09	3,46 \pm 0,12	3,51 \pm 0,14	3,35 \pm 0,10	3,56 \pm 0,16
90	3,14 \pm 0,06	3,14 \pm 0,14	3,12 \pm 0,14	3,07 \pm 0,07	3,22 \pm 0,22
100	2,90 \pm 0,20	3,03 \pm 0,18	3,21 \pm 0,16	2,94 \pm 0,15	3,24 \pm 0,24

Lisa 9.

PNPA ensüümatalüütilise hüdrolyüsi keskmised algkiirused v_0 , mis on saadud kuuel korduskatsel ja vastavad keskmisest absoluuthälbest saadud määramatused. Algkiirused v_0 on määratud ilma ultrahelita tingimustes ja varieeruvatel ultraheli võimsustel ning seda erineva sonikeerimise aja jooksul. Ensüümpreparaadi sisaldus 0,25 mg/ml.

Algkiirus v_0 , $M \times s^{-1}$ ja vastav määramatus ($\times 10^8$)					
Ultraheli võimsus	Sonikeerimise aeg (doos)				Ultrahelita
	%	5 min	10 min	20 min	
10	7,23 ± 0,14	7,44 ± 0,14	7,55 ± 0,12	7,18 ± 0,12	7,34 ± 0,12
20	7,25 ± 0,09	7,31 ± 0,15	7,38 ± 0,13	7,24 ± 0,09	7,34 ± 0,09
30	7,18 ± 0,08	7,27 ± 0,10	7,42 ± 0,15	7,23 ± 0,04	7,37 ± 0,17
45	7,04 ± 0,08	7,13 ± 0,07	7,17 ± 0,07	7,08 ± 0,07	7,08 ± 0,07
60	7,08 ± 0,06	6,93 ± 0,09	7,21 ± 0,04	7,03 ± 0,07	6,98 ± 0,06
70	7,00 ± 0,03	7,01 ± 0,07	7,02 ± 0,06	6,90 ± 0,07	7,05 ± 0,04
80	6,91 ± 0,07	6,82 ± 0,09	6,85 ± 0,09	6,75 ± 0,07	6,88 ± 0,08
90	6,37 ± 0,09	6,55 ± 0,09	6,53 ± 0,17	6,62 ± 0,08	6,60 ± 0,07
100	6,15 ± 0,19	6,14 ± 0,22	5,99 ± 0,20	6,09 ± 0,21	6,24 ± 0,21

Lisa 10.

PNPA ensüümatalüütilise hüdrolyüsi keskmised algkiirused v_0 , mis on saadud ühel katsel. Algkiirused v_0 on määratud ilma ultrahelita tingimustes ja varieeruvatel ultraheli võimsustel ning seda erineva sonikeerimise aja jooksul. Ensüümpreparaadi sisaldus 0,51 mg/ml.

Algkiirus v_0 , $M \times s^{-1}$ ($\times 10^8$)					
Ultraheli võimsus	Sonikeerimise aeg (doos)				Ultrahelita
	%	5 min	10 min	20 min	
10	13,16	14,38	13,27	13,38	14,16
20	13,17	13,22	13,97	13,15	13,75
30	13,10	13,71	13,44	13,02	14,04
45	12,81	12,89	13,15	13,37	12,65
60	12,49	12,67	12,62	13,04	12,78
70	12,45	12,81	12,74	13,27	12,86
80	12,13	11,94	12,28	12,21	12,38
90	11,54	12,33	12,06	11,79	11,99
100	11,11	11,26	10,33	11,31	11,12

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Kristen Luik**,

(sünnikuupäev: 17.07.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Ultraheli mõju α -kümotrüpsiini aktiivsusele lahuses**“, mille juhendaja on Siim Salmar PhD,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.08.2017