

Tartu Ülikool  
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond  
Keemia instituut

Riho Vahtras

Ultraheli toime  $\alpha$ -kümotrüpsiini  
reaktsioonile 4-nitrofenüülatsetaadiga

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Siim Salmar, PhD

Kaasjuhendaja: Morten Vaalma

Tartu 2015

## Sisukord

1. Lühendid.....	3
2. Sissejuhatus .....	4
3. Kirjanduse ülevaade .....	5
3.1. Teoreetiline taust.....	5
3.1.1. Ultraheli mõju bioprotsessidele .....	6
3.1.1. 4-nitrofenüülatsetaadi hüdrolyüsireaktsioon $\alpha$ -kümütrüpsiiniga.....	7
4. Eksperimentaalne osa.....	9
4.1. Kasutatud reaktiivid .....	9
4.1. Mõõtmismetoodika .....	10
4.2. Eelkatsed ilma ultrahelita.....	12
4.2.1. Eelkatsed ilma ensüümita .....	12
4.2.1. Eelkatsed esüümreaktsioonile.....	12
4.1. Katsed ultrahelisüsteemiga .....	13
4.1.1. Seadme kirjeldus .....	13
4.1.2. Kaaliumjodiidi dosimeetria .....	13
4.1.3. 4-nitrofenolaadi sonodegradatsiooni mõõtmine .....	14
4.1.4. Kineetilised mõõtmised ultrahelisüsteemiga .....	14
5. Tulemused ja arutelu .....	15
5.1. Eelkatsed ilma ultrahelita.....	15
5.1.1. Reaktsioonitingimuste valik .....	15
5.1.2. Mudelreaktsiooni eelkatsed UV-Vis spektrofotomeetriga .....	15
5.2. Ultraheliseadme seadistamine ja eelkatsed ensüümreaktsiooni uurimiseks ultraheliga .....	17
5.3. Eelkatsed mudelreaktsiooniga ultrahelisüsteemis.....	18
5.4. Kümotrüpsiini reaktsioon 4-nitrofenüülatsetaadiga ultraheli all .....	19
6. Kokkuvõte .....	23
7. Kasutatud kirjandus.....	24
8. Summary .....	27
9. Lisad .....	28

## 1. Lühendid

- KT –  $\alpha$ -kümüotrüpsiin
- PNPA – *para nitrophenyl acetate* – 4-nitrofenüülatsetaat
- PNP – *para nitrophenol* - 4-nitrofenool
- UV-Vis – *ultraviolet visible* - ultraviolett-nähtav
- com-signaal – ultraheliseadme digitaalne väljundsignaal
- HPLC – *High performance liquid chromatography* – kõrglahutusega vedelikkromatograafia
- PTFE – polütetrafluoroetüleen

## 2. Sissejuhatus

Ultraheli keemilisi protsesse kiirendav toime on leidnud laialdast kasutust väga erinevates valdkondades. Enamasti seostatakse seda ultrahelile iseloomuliku kavitatsiooninähtusega, mis võib peale mehaaniliste efektide tekitada lahustes vabu radikaale, soodustades mitmeid homogeeniseid ja heterogeenseid reaktsioone.

Nüüdseks on näidatud, et lisaks kavitatsiooni toimele, võib ultraheli muuta reaktsioonide kiirusi reagentide solvatatsiooni mõjutamise kaudu.

Erinevates töodes on ultraheli kasutatud solvendiefektide uurimiseks vesi-organilistes solventsegudes ning on täheldatud erinevate hüdrolüüsi- ja solvolüüsireaktsioonide kiirenemist ultraheli toimel. Nendest uuringutes on näidatud, et ultraheli võib mõjutada hüdrofoobseid soluut-solvent interaktsioone vesi-organilistes solventides. Järeldati, et heliefektid on tingitud substraatide solvatatsiooni muutusest, mis omakorda väljendub reaktsiooni kiiruse muutumises. Meie töögrupp on hiljuti näidanud, et ka väga väikestel ultraheli võimsustel, mis jäävad allapoole kavitatsiooniläve, on võimalik mõjutada nõrku solvent-soluut vastastikmõjusid ja solvatatsioonitasakaalu vesi-organilistes lahustes.

Sellest lähtuvalt oleks huvitav näha, milline toime lisaks kavitatsiooni lõhkuvale mõjule võiks ultrahelil olla ensüümreaktsioonidele, kus nõrgad interaktsioonid mängivad samuti määravat rolli.

Käesoleva bakalaureusetöö hüpotees on, et ultraheli omab destruktiivset mõju ensüümidele. Töö eesmärgiks on uurida, kas ultraheliväljas on võimalik läbi viia ensümaatilisi reaktsioone ja kui kaua võib seda teha ilma ensüümile kahju tegemata.

Eesmärgi saavutamiseks uuriti mudelreaktsiooniks valitud  $\alpha$ -kümotrüpsiini poolt katalüüsitud 4-nitrofenüülatsetaadi hüdrolüüsi kineetikat ultraheli väljas. Selleks oli vaja:

- teostada mudelreaktsiooni eeluuringud sobivate tingimuste leidmiseks,
- seadistada ultraheliseade ensüümikatalüüsi kineetika uuringuteks,
- teostada mudelreaktsiooni kineetika mõõtmised ultraheli väljas, iseloomustamaks

võimalikku ultraheli toimet ensüümikatalüüsile.

### 3. Kirjanduse ülevaade

#### 3.1. Teoreetiline taust

Tänapäeval kasutatakse ultraheli igapäevaselt nii laborites kui ka tööstuses väga erinevatel eesmärkidel, kuna see mõjutab paljusid keemilisi ja füüsikalisi protsesse [1]. Ultraheli rakendatakse erinevates valdkondades: toidutehnoloogias, pindade puhastamisel, reoveekäitluses, nanotehnoloogias, meditsiinis jne.

Klassikalise käsitluse järgi [2] tuleneb ultraheli keemiline efekt kavitatsioonist, mitte otsesest interaktsioonist osakestega. Ultrahelilained võivad tekitada vedelikes kavitatsiooni, mis kujutab endast väikseid ülikõrge temperatuuriga (üle 5000 K) ning kõrge rõhuga (~500 atm) plasmamulle. Kavitatsioonimulli kollabeerumisel tekib mikrojugaga, mis on väga suure energiaga ning võib materjale erodeerida, osakesi disperseerida jne. Lisaks mehaanilistele efektidele võib ultraheli soodustada mitmeid homogeenseid ja heterogeenseid reaktsioone tekitades vabu radikaale, mis kutsuvad lahuses esile ahelreaktsioone [1].

Vastavalt traditsioonilistele sonokeemia tõekspidamistele ei tohiks ioonsed reaktsioonid, mis ei saa radikaalmehhanismile ümber lülituda (solvolüüsid, hüdrolüüsid), olla tundlikud ultraheliefektidele [1]. Sellele vaatamata on leitud mitmeid näiteid ultraheli toimel kiirenenud homogeensetest polaarsetest reaktsioonidest vesi-orgaanilistes solventsegudes [1]. Vesi-orgaanilistes segasolventides on keeruline mikroheterogeenne vesiniksidemete struktuur, hüdrofoobsed vastastoimed ja eelissolvatatsioon, mis kõik mõjutavad reaktsioonide kiirust ja tasakaalu. Eelmainitud töödes, mida refereeritakse allikas [1], on näidatud, et erinevate reaktsioonide kiirenemine vesi-orgaanilistes süsteemides ultraheli toimel tuleneb suuresti hüdrofoobsete soluuat-solvent vastastoimete ja solvatatsiooni häiritusest.

Viimasel kümnendil on hakatud lisaks kavitatsiooninähtusele rohkem tähelepanu pöörama ka teistele ultraheli põhjustatavatele füüsikalistele nähtustele, mis võivad samuti reaktsioonikeskkonnas mehaanilisi efekte tekitada. Nendeks on mikrohoovused (*microstreaming*), mida põhjustavad helilained ja akustiline lööklaine, mis tuleneb kavitatsioonimullide kollabeerumisest. Mikrohoovus tekib vedelikuosakeste võnkliikumise ultraheli levimisel [3]. Ultraheli lisab süsteemi kineetilist energiat, mis

võib muuta solvatatsioonitasakaalu ning seega substraadi solvaatkatte koostist segasolventides, mis mõjutab omakorda reaktsiooni kiirust [4].

Meie töögrupi tehtud töös saadi hiljuti arvestatav kineetiline efekt 4-metoksüfenüüldikloroatsetaadi pH-st sõltumatu hüdrolüüsil vesi-atsetonitriil segudes allpool kavitatsiooniläve. Sellest võib järeldada, et isegi väga madala energia korral on ultraheli võimeline soluut-solvent interaktsioone ning sellega ka reaktsioonide kulgu muutma.

Seega, kui ultraheli võib mõjutada nõrkasid interaktsioone lahustes, peaks selle toime elusorganismidele olema tunduvalt keerulisem kui lihtsalt kavitatsiooni destruktiivne mõju.

### **3.1.1. Ultraheli mõju bioprotsessidele**

Madalsagedusliku (10-60 kHz) ultraheli kasutamine mitmete biotehnoloogiliste protsesside läbiviimisel pakub uurimisobjektina oma tööstusliku potentsiaali tõttu järjest enam huvi. Sonikatsiooniparameetreid varieerides on võimalik saavutada erinevaid füüsikalisi, keemilisi ja bioloogilisi efekte erinevates valdkondades näiteks biokütuste tootmisel, bioprotsesside jälgimisel, ensüümatalüüsil ja reovee töötlemisel. Ultraheli kasutamist peetakse nn roheliseks tehnoloogiaks, kuna see on lihtne, efektiivne, kiire ning suhteliselt odav viis protsesside juhtimiseks soovitud suunas [5].

Ultraheli kasutatakse näiteks intratsellulaarsete ensüümide ning organelide kättesaamiseks rakkudest [6]; massiülekanne kiirendamiseks: näiteks tsellulaasi ja pektinaasi massiülekanne puuvillaste tekstiilide töötlemisel rakumembraani läbitavuse muutmise kaudu [7]; triglütseriidide ja vabade rasvhapete transesterdamisel (on saadud ligi 10 korda kiirendav efekt [8]) ning metanooli ja taimeõli emulgeerimiseks biokütuste tootmisel; aktiivmuda töötlemisel reoveepuhastuses [9]; ensümaatilisel bioremediatsioonil [5]; kutsumaks esile valkude emulgeerumist ning põiksidemete teket, et moodustada vesikeskkonnas ensümaatilist aktiivset mikrosfääre (tehisensüüme) [10] *etc.*

Ultrahelilaine, mis on sisuliselt perioodiline rõhumuutus, võib muuta ensüümi struktuuri ning seeläbi ka aktiivsust. Ultraheli mõju kohta ensüümidele on konkreetseid andmeid vähe ning need annavad vastakat informatsiooni. Ühest küljest on näidatud kiirendavat ning teisalt aeglustava efekti [5]. Ensüüm võib keemiliselt inaktiveeruda reageerides ultraheli tekitatud radikaalidega [11]. Summaarne efekt ensüümi aktiivsusele sõltub helilaine energiast, kiiritamisperioodi pikkusest ning stabiliseerivate lisandite olemasolust [5,12].

Ultraheli on kasutatud näiteks laboratoorsel fenooli ning halogeenasendatud fenoolide ensüümikatalüütilisel sonobiodegradeerimisel ( $1,12 \text{ Wcm}^{-2}$  ja  $423 \text{ kHz}$  20–60 min jooksul) mädarõika peroksüdaasi ning  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga [11,13]. Töö tulemuseks oli 80–100%-line substraatide degradatsioon, kuid ensüümi eluiga osutus reaktsioonis tekkivate fenoksidradikaalidega reageerimise tõttu suhteliselt lühikeseks [11,13].

Parkimata nahajäätmete sonobiodegradatsioonil *Bacillus licheniformis*-elt pärineva proteaasi ning ultraheliga kiiritamise ( $0,64 \text{ W cm}^{-2}$  ja  $40 \text{ kHz}$  2 tunni jooksul) toimel [14] täheldati ensümaatilise hüdrolyüsi kiiruse kasvu ning saagise paranemist, kusjuures ensüümi aktiivsuse muutust ei esinenud. Kiiruse kasv eksperimendis tulenes ultraheli põhjustatud proteaasi paranenud liikuvusest läbi nahapooride.

Biosensorid (tihti ensüümid või antikehad), mis on tüüpiliselt seotud elektrodile ning sukeldatud uuritavasse lahusesse, interakteeruvad analüüdiga ning põhjustavad elektroodis signaali tekkimise. Biosensorite tõhusamaks ja tundlikumaks muutmiseks on võimalik ultraheli abil mikroorganisme agregeerida [15] ning sensori suunas liigutada [16]. Ultraheli võimaldab settivaid osakesi dispergeerida suurendades sellega biosensoritel põhineva analüüsi kiirust. Edu on saavutatud ka erinevate ensüümide sidumisel sonogel-süsinikmuunduritele [17]. Näiteks immobiliseeritud türosinaasi sisaldav polüfenoolide mõõtmiseks mõeldud biosensor säilitas 80% oma aktiivsusest minimaalselt kolmenädalase perioodi vältel [18]. Sarnase otstarbega immobiliseeritud türosiini sisaldav biosensor säilitas samuti 80% aktiivsusest pärast sadat fenoolisisalduse mõõtmist avastamispiiriga  $3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  [19]. Eelnevalt kirjeldatud juhtudel seisneb ultraheliefekt enamasti kavitatsioonist tingitud pindade puhastamises või poorsuse suurenemises, mis võib soodustada näiteks ensüümide immobiliseerimist.

Kokkuvõtteks võib öelda, et hetkel puudub täpne arusaam sellest, kuidas ultraheli ensüümidele mõjub. On täheldatud, et ultraheli kasutamine mõningates protsessides on aidanud ensüümi stabiliseerida, katalüütilist aktiivsust ning eluiga tõsta. Kuid nagu üldiselt teada võib ultraheli mõjuda ka destruktiivselt, takistades sellega ensümaatilisi protsesse.

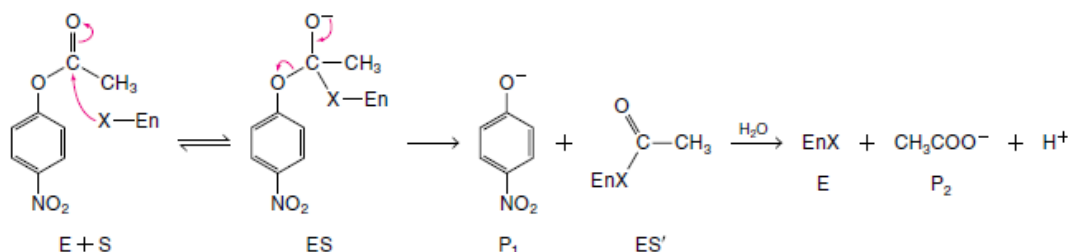
#### **3.1.1.4-nitrofenüülatsetaadi hüdrolyüsireaktsioon $\alpha$ -kümotrüpsiiniga**

KT molekulmassiga 25000 daltonit on ühe aktiivtsentriga seriin proteaas, mida sünteesib pankreas, ning mis *in vivo* katalüüsib polüpeptiidahelate hüdrolyüsi duodenumis (vahetult maole järgnev peensoole osa). KT on selektiivne peptiidsidemete suhtes, mis asuvad aromaatsel külghela (türosiin, trüptofaan, fenüülalaniin) või suure hüdrofoobse külghela (nt metioniin) läheduses [12]. KT aktiivtsenter asub madalas süvendis ensüümi

pinnal, mis moodustab nn hüdrofoobse pesa, millesse seotakse katalüüsi käigus substraadi aromaadne külghel. KT-i on põhjalikult uuritud: see on esimene ensüüm, mille puhul tõestati kovalentse ensüüm-substraat kompleksi teke [20] ning aastal 1953 tehti esimene töö, milles uuriti PNPA hüdrolyüsi KT-ga [21]. KT katalüüsitud PNPA hüdrolyüsireaktsiooni on hästi uuritud ja mehhanism on teada [22,23,20]. Reaktsiooni kineetiline skeem avaldub järgmiselt:



kus E on ensüüm, S on PNPA, ES on ensüümi kompleks PNPA-ga, P1 on PNP, ES' on ensüümi atsetaatkompleks ja P2 on atsetaatioon ning  $k_3$  on hüdrolyüsireaktsiooni kiirust määrava staadiumi kiiruskonstant. Reaktsioonimehhanism on esitatud skeemil 1.



**Skeem 1.** PNPA hüdrolyüsi mehhanism KT-ga. [20]

Reaktsiooni alguses laguneb ES kompleks kiirelt ning vabaneb ensüümi kontsentratsiooniga stöhhiomeetriliselt võrdses koguses PNP-d. Seejärel toimub aeglane ensüüm-atsetaatkompleksi hüdrolyüs, ensüüm regenereerub ning järgneb uuesti kiire ensüümi atsüleerimine PNPA poolt [20].

PNPA lahus on värvitu, tekkiva 4-nitrofenolaatiooni oma aga erkkollane, mille neelduvusmaksimum UV-vis spektris on 400 nm juures. See võimaldab teha kineetilisi mõõtmised lihtsalt ning reprodutseeritavalt UV-vis spektromeetri abil PNP-iiooni neelduvust määrates. KT on kergesti kättesaadav ning väga stabiilne.

Kirjanduses saadaoleva info ning eelnevalt nimetatud omaduste tõttu valiti antud töös ultraheliuuringute mudelreaktsiooniks PNPA hüdrolyüs KT-ga.



## 4. Eksperimentaalne osa

### 4.1. Kasutatud reaktiivid

- $\alpha$ -Kümotrüpsiin

Eksperimentides kasutati veise pankreasest pärinevat Sigma-Aldrich'ist ostetud lüofiliseeritud  $\alpha$ -KT-i CAS numbriga 9004-07-3 ning molaarmassiga 25000 daltonit.

- 4-nitrofenüülatsetaat

Ensüümreaktsiooni substraadina kasutati PNPA ehk 4-nitrofenüülatsetaati CAS numbriga 830-03-5, summaarse molekulvalemiga  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ , molaarmassiga 181,15 ning sulamistemperatuuriga 75-77 °C. PNPA osteti Sigma-Aldrichist ning kasutati täiendavalt puhastamata.

- Fosfaatpuhver

KT on optimaalselt katalüütiliselt aktiivne pH väärtustel vahemikus 7,5...8,0. Ensüümilahused valmistati kasutades fosfaatpuhvrit pH-ga 7,5. Puhverlahus valmistati lahustades liitris Millipore MilliQ vees 1,36 g tahket  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,74 g NaCl ning tiitriti NaOH-lahusega pH 7,5-ni kasutades klaaselektrood pH-meetrit Metrohm 744. Ioontugevus pandi paika NaCl-ga.

- Atsetonitriil

Vedelikkromatograafias kasutamiseks sobiva puhtusastmega atsetonitriil summaarse molekulvalemiga  $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ , CAS numbriga 75-05-8, molaarmassiga 41,05 ning keemistemperatuuriga 82 °C osteti Merck Millipore'ist.

- 1,4-dioksaan

1,4-dioksaan summaarse molekulvalemiga  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ , CAS numbriga 123-91-1, molaarmassiga 88,11, keemistemperatuuriga 101 °C osteti Lach-Ner'ist.

- 4-nitrofenool

Spektrofotomeetriliseks kasutamiseks mõeldud PNP molekulvalemiga  $\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OH}$ , CAS numbriga 100-02-7, molekulmassiga 139,11, sulamistemperatuuriga 110-115 °C osteti Sigma-Aldrichist.

#### 4.1. Mõõtmismetoodika

Kõik lahused valmistati kaalumise teel vahetult enne katset ning kasutati ühe päeva jooksul. Kasutati analüütilist kaalu Mettler Toledo Excellence Plus XP205 ( $\pm 0,1$  mg) või kaalu Kern EW420-3NM ( $\pm 1$  mg). Ensüümlahuste kontsentratsioonid on suhtelised, täpset aktiivse esnüümi hulka ei määratud. PNPA emalahused valmistati atsetonitriili kaalumise teel nii, et reaktsioonisegus oli atsetonitriili vol% alla 0,1. Vastavas koguses PNPA või PNP emalahused süstiti mikrosüstla või automaatpipetiga eelnevalt termostateeritud puhvri või ensüümlahusesse spektrofotomeetri küvetti või ultrahelireaktsioonirakku. Kõiki lahuseid hoiti külmkapis ning tahket ensüümi sügavkülmas. Kõik katsed teostati fosfaatpuhvriga pH=7,5 ja temperatuuril 25 °C. Kõik kineetilised mõõtmised prooviti teha ensüümreaktsiooni statsionaarses alas ja kasutati algkiirusi.

Selles töös rakendati andmetöötlemises ühe meetodina Michaelis-Menteni kineetilist mudelit, mille abil leiti ensüümi iseloomustamiseks vajalikke arvulisi väärtusi. Lihtsustatult võib ensüümaatilisi reaktsioone kirjeldada järgnevalt:



kus E on ensüüm, S substraat, ES ensüüm-substraat kompleks ning P saadus [20]. Ensüümkinetika põhivõrrand avaldub kujul:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m} \quad (3)$$

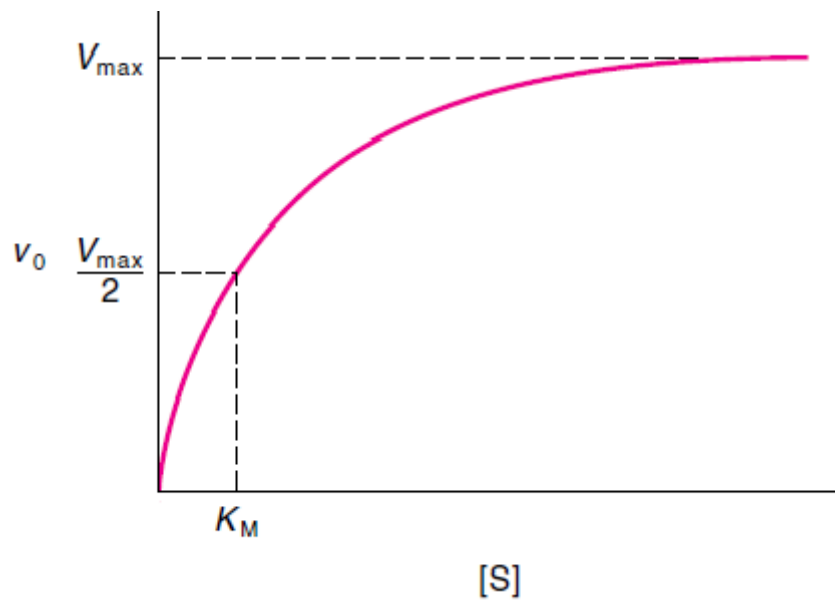
$$\text{kus } V_{max} = k_2[E_0] \quad (4)$$

$$\text{ja } K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (5)$$

Michaelis-Menteni võrrandi järgi (valem (2)) avaldub ensüümreaktsiooni algkiirus kujul:

$$v_0 = \left( \frac{d[P]}{dt} \right)_0 = k_2[ES] \quad (6)$$

kus  $v_0$  tähistab algkiirust [20].



**Joonis 1.** Ensüümreaktsiooni algkiiruse sõltuvus substraadi kontsentratsioonist, kus  $V_{\max}$  on reaktsiooni suurim võimalik kiirus ning  $K_m$  Michaelise konstant [20].

Kõigist katsetest saadud andmed töödeldi programmiga Microsoft Excel 2010 ja/või programmiga GraphPad Prism 5. Leiti neelduvuse järgi määratud PNP kontsentratsiooni ajast sõltuvuse graafikutelt regressioonisirgete abil algkiirused iga uuritava reaktsiooni või reaktsiooniosa jaoks.

## 4.2. Eelkatsed ilma ultrahelita

### 4.2.1. Eelkatsed ilma ensüümita

Kõik eelkatsed ilma ultrahelita teostati Thermo Scientific Evolution 160 UV-Vis spektromeetriga. Eksperimentides mõõdeti tekkiva PNP ioniseeritud vormi neelduvust 400 nm juures. Esmalt teostati UV-Vis spektromeetriga neelduvuse lineaarsuse ala kontroll vastavalt Lambert-Beer'i seadusele  $A = \epsilon lc$ , kus  $A$  on neelduvus adsorptsiooniühikutes,  $\epsilon$  aine molaarse neelduvuse konstant ning  $l$  optiline teepikkus. Küveti temperatuuri hoiti  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$  juures termostaadiga Huber MPC-E. PNP kontsentratsiooni ja neelduvuse näidu kvantitatiivse seose leidmiseks teostati mõõtmised nelja erineva puhvrise tehtud PNP lahuse kontsentratsiooni juures minimaalselt kolmes korduses. Kasutatud PNP kontsentratsioonid olid:  $1,22 \cdot 10^{-4}$  M,  $6,80 \cdot 10^{-5}$  M,  $2,45 \cdot 10^{-5}$  M ja  $1,23 \cdot 10^{-5}$  M. Mõõtmised viidi läbi spektrivahemikus 390-410 nm fosfaatpuhvrise pH=7,5. Maksimaalse neelduvusega lainepikkuseks oli 400 nm. Tulemuseks saadi Lambert-Beer'i seadusele vastavuse graafik (vt Lisa 1). Molaarseks neelduvuseks saadi  $\epsilon = 12361 \pm 77 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (400 nm).

Teostati ilma ensüümita PNPA (algkontsentratsioon  $1,00 \cdot 10^{-4}$  M) hüdrolyüüsi reaktsioon fosfaatpuhvrise pH 7,5 juures ja määrati algkiirus ja pseudo-esimest järku kiiruskonstant.

### 4.2.1. Eelkatsed esüümreaktsioonile

Teostati katsed leidmaks ensüümi suhtelise kontsentratsiooni ja algkiiruse  $v_0$  vahelist seost optimaalsete tingimuste leidmiseks. Puhvrise valmistati ensüümilahused suhteliste kontsentratsioonidega  $5,1 \cdot 10^{-6}$  M,  $4,0 \cdot 10^{-6}$  M ja  $1,0 \cdot 10^{-6}$  M, millesse süstiti mikrosüstlaga PNPA lahust atsetonitriilis (reaktsiooniseigus jäi atsetonitri hulk alla 0.1 vol%). PNPA algkontsentratsioon UV-Vis spektrofotomeetri küvetis oli  $1,00 \cdot 10^{-4}$  M. Mõõdeti spektromeetriga temperatuuril  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$  juures 400 nm lainepikkusel reaktsioonis tekkiva PNP-iooni neelduvust. Lisas 2 on ensüümatalüütilisest reaktsioonist eri ajahetkedel võetud neelduvusspektreid.

Ensüümi kineetiliste konstantide  $K_m$  ja  $V_{\max}$  leidmiseks teostati mõõtmised UV-Vis spektromeetriga KT suhtelisel kontsentratsioonil  $4,2 \cdot 10^{-6}$  M, kus varieeriti PNPA molaarset kontsentratsiooni:  $2,02 \cdot 10^{-4}$  M,  $1,01 \cdot 10^{-4}$  M,  $5,06 \cdot 10^{-5}$  M,  $2,02 \cdot 10^{-5}$  M,  $1,01 \cdot 10^{-5}$  M,  $5,00 \cdot 10^{-6}$  M.

## 4.1. Katsed ultrahelisüsteemiga

### 4.1.1. Seadme kirjeldus

Ultraheli all tehtud eksperimentides kasutati katseseadet [24], mis koosnes ultrahelivannist Elma TI-H-5 MF2 (25/45 kHz, 100W, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG), kus kasutatav sagedus oli 25 kHz; HPLC pumbast Gilson Piston Pump 302 (Gilson Medical Electronics Inc), mida kasutati töörežiimil kiirusega 4 ml minutis; Shimadzu SPD-20A HPLC UV-Vis detektorist (Shimadzu Corporation) küveti laiusega 1,000 cm ja mahuga 12 µl ning termostaadist Refridgerated Heating Circulator Bath (Ministat 125, Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH). millega hoiti reaktsiooniraku sisu temperatuuril  $25 \pm 1$  °C. Kõik katsed ultraheliseadmega viidi läbi topeltseintega jahutusvee läbivooluga rakus, mis fikseeriti ultrahelivanni põhjast 2 cm kaugusele, et ultraheli efektiivne võimsus oleks maksimaalne. Reaktsioonirakust juhiti inertse keskkonna tekitamiseks läbi argooni. Ultrahelirakku oli sukeldatud digitaaltermomeeter ja kasutati segajat IKA RW 11. Pumba sissetõmbevooliku otsas kasutati PTFE HPLC solvendifiltrit (diameeter 10 mm, poorsus 2 µm) ja roostevabast terasest solvendifiltrit (diameeter 10 mm, poorsus 10 µm). UV-Vis detektori signaali arvutisse salvestamiseks kasutati muundurit, mille minimaalne väljund neelduvusühikutesse ümberarvutatuna oli 0 AU ning maksimaalne väljund 0,4980 AU ja programmi AD\_com.exe.

Kõik katsed teostati 20 ml reaktsioonilahusega.

### 4.1.2. Kaaliumjodiidi dosimeetria

1,667 g KI lahustati 100-s ml-s Millipore MilliQ vees. Ultrahelirakku võeti 20 ml KI lahus, mida kiiritati ühe ja sama katse jooksul ultraheliga seadme reguleeritavatel võimsustel 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75 ja 100 %, igal tasemel 4 minuti jooksul 4-minutiliste pausidega eri võimsusnivoode vahel. Lahuses stabiliseeriti temperatuur ja kiiritati ultraheliga ning mõõdeti valitud ajavahemiku jooksul spektrofotomeetriliselt  $I_3^-$  ionide neelduvust lainepikkusel 355 nm iga sekundi järel.  $I_3^-$  molaarseks neelduvuseks saadi  $\epsilon = 26300 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Pärast ultraheli väljalülitamist stabiliseeriti temperatuur uuesti ning mõõdeti stabiilse signaaliga platoon, seejärel valiti järgmine helivõimsus *etc.* Iga võimsusnivoo juures mõõdetud andmetest arvutati 170 sekundi jooksul tekkinud kontsentratsiooni muutus, mis kanti graafikule ultraheli võimsuse protsendi funktsioonina (Joonis 4 tulemustes ja arutelus). Lisaks teostati kalorimeetrilised katsed saamaks hinnanguline ultraheli võimsuse väärtus ( $\sim 1,2 \text{ W}$ ) rakendatavas süsteemis 20 ml vees.

#### 4.1.3.4-nitrofenolaadi sonodegradatsiooni mõõtmine

Esmalt teostati programmi AD\_com.exe väljundsignaali teisendamine PNP kontsentratsiooniühikuteks. Selleks mõõdeti com-signaali (digitaalne signaal, mis on muunduri abil UV-Vis detektori analoogsignaalist teisendatud) puhvrise tehtud PNP lahustes kontsentratsioonidel  $3,01 \cdot 10^{-5}$  M,  $2,53 \cdot 10^{-5}$  M,  $2,03 \cdot 10^{-5}$  M,  $9,80 \cdot 10^{-6}$  M,  $5,50 \cdot 10^{-6}$  M, mille põhjal koostati [PNP] vs. com-signaali graafik (vt Lisa 3). Regressioonisirge võrrandist leiti com-signaali jaoks üleminekukoefitsiendid, mida kasutati kõigi järgnevate ultraheliseadmega läbi viidud eksperimentide korral.

PNP sonodegradatsiooni mõõtmiseks valmistati puhvrise  $10^{-5}$  M kontsentratsiooniga PNP lahus. Ultrahelirakku kaaluti 20 g lahust, asetati rakk ultrahelivanni, termostateeriti 25 °C-ni ning lasti neelduvussignaali stabiilsele platoole jõuda. Seejärel kiiritati ultraheliga 30, 40 ja 60 % võimsusel 30 minutit.

#### 4.1.4.Kineetilised mõõtmised ultrahelisüsteemiga

Ultraheli mõju ilma ensüümita PNPA (algkontsentratsioon  $1,00 \cdot 10^{-4}$  M) hüdrolyüsile määrati erinevatel ultrahelivanni võimsustel kiiritades 20 ml puhvrilahust 30 min.

Ensüümkatalüütilise hüdrolyüsi korral kaaluti ensüümilahust puhvris ultraheli reaktsioonirakku nii, et lahuse ruumala oleks 25 °C juures 20 ml. *On-line* ultrahelisüsteemist pumbati läbi kõigepealt MilliQ vett ja seejärel fosfaatpuhvrit. Pärast aparatuuris oleva puhverlahuse asendumist KT lahusega lasti pumbal mõnda aega töötada – oodati, kuni lahuse temperatuur stabiliseerus 25 °C-l ning nulliti UV-Vis detektori näit. Seejärel käivitati programm AD\_com.exe ning lisati kolbi mikropipeti või -süstlaga vajalik kogus substraadilahust.

Enamikul katsetel registreeriti esmalt ilma ultrahelita toimuv protsess, seejärel lülitati sisse ultraheli soovitud võimsusel, termostateeriti raku sisemine temperatuur 25 °C-ni ning registreeriti reaktsiooni kulg ultraheli all. Ultraheliga kiiritamise aega varieeriti 4 minutist kuni 1 tunnini, olenevalt katsetest. Pärast ultraheli välja lülitamist mõõdeti PNP teket edasi, et näha, kas kogu ultraheliga mõõtmisperiood viidi läbi statsionaarses alas ning et võrrelda reaktsiooni kiirusi enne ja pärast ultraheliga kiiritamist. Seega, ultraheliga ja võrdluseks tehtud ilma ultrahelita reaktsioonid toimusid samas lahuses, mis tähendab, et kiirust määravad parameetrid, näiteks suhteline ensüümi kontsentratsioon, jäid konstantseks. Mõõtmiste aeg prooviti valida nii, et kõik kolm etappi jääksid statsionaarse kineetika alasse, et oleks võimalik määrata algkiirused  $v_0$  ning neid omavahel võrrelda.

## 5. Tulemused ja arutelu

### 5.1. Eelkatsed ilma ultrahelita

#### 5.1.1. Reaktsioonitingimuste valik

Reaktsioonikeskkonna pH-ks valiti 7,5, sest KT aktiivsuse optimum on pH vahemikus 7,5...8,0 [12]. Madalaim väärtus sellest vahemikust valiti, sest suurema pH juures on PNPA mitteensümaatilise aluselise hüdrolüüs kiirus suhteliselt suur [25]. Valitud mudelreaktsioonis tekkiva PNP pKa 25 °C juures on 7,15 ning seega esineb PNP lahuses valdavalt dissotsieerunud kujul. PNP-ioonil on intensiivne neeldumismaksimum lainepikkusel 400 nm, mis võimaldab selle kontsentratsiooni UV-Vis spektromeetriga lihtsalt ja täpselt mõõta. Temperatuuriks valiti standardtemperatuur 25 °C.

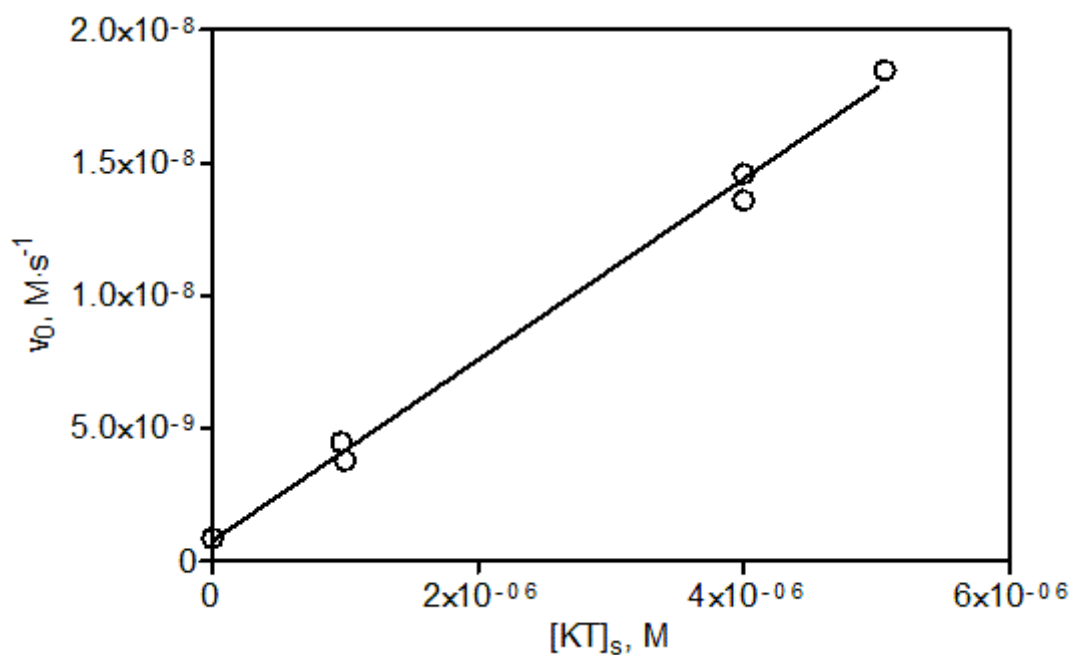
#### 5.1.2. Mudelreaktsiooni eelkatsed UV-Vis spektrofotomeetriga

Esimese asjana kontrolliti valitud PNP kontsentratsioonide vahemiku Lambert-Beeri seadusele vastavust, mille kohaselt peab neelduvuse sõltuvus kontsentratsioonist olema lineaarne. Saadud lineaarsest sõltuvusest määrati molaarne neeldumistegur  $\varepsilon = 12361 \pm 77 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Lisa 1).

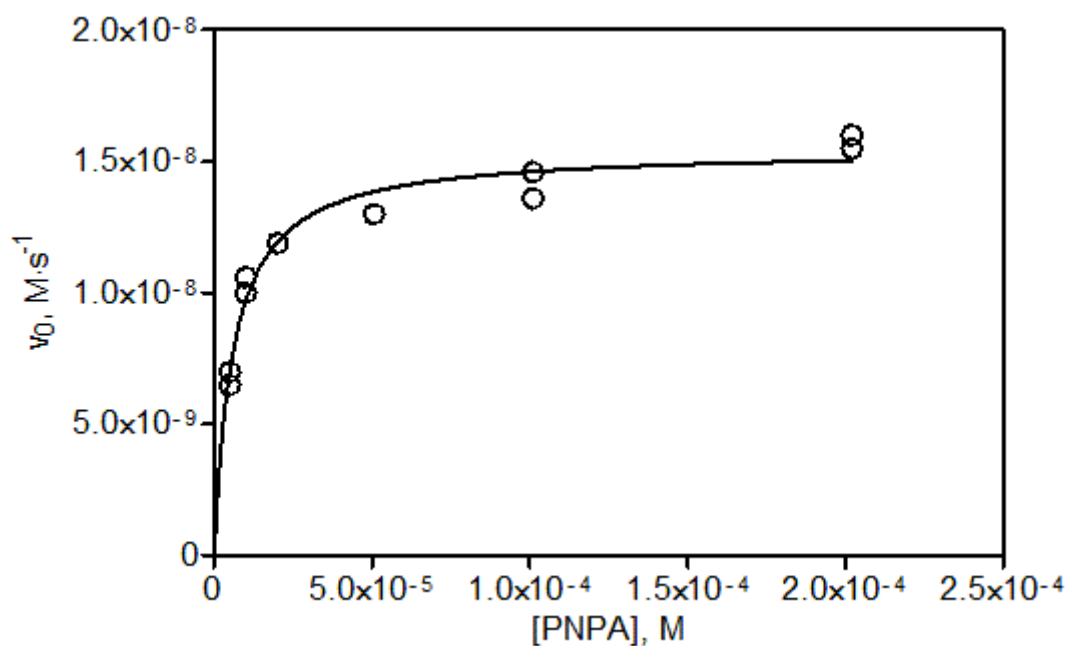
Seejärel mõõdeti PNPA hüdrolüüsi kineetikat puhverlahuses ilma ensüümita. Määrati hüdrolüüsi pseudo-esimest järku kiiruskonstant  $k_1 = 8,85 \pm 0,01 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ja PNPA algkontsentratsioonil  $1,01 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  saadi algkiiruseks  $v_0 = 8,92 \cdot 10^{-10} \pm 0,06 \cdot 10^{-10} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Edasi tehti rida katseid konstantsel PNPA kontsentratsioonil ( $1,01 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) muutuva suhtelise ensüümi kontsentratsiooniga, määramaks algkiiruse sõltuvust ensüümi suhtelisest kontsentratsioonist. Ensüümi täpsema kontsentratsiooni määramine pole antud töös oluline, kuna peamised katsed ilma ultrahelita ja ultraheli väljas teostati alati samas reaktsioonilahuses. Tulemuseks saadi lineaarne sõltuvus reaktsiooni algkiiruse ja ensüümi suhtelise kontsentratsiooni vahel (Joonis 2).  $[KT]_s$  vs.  $v_0$  graafiku lineaarsus näitab, et valitud PNPA kontsentratsioonil on reaktsioon ensüümi suhtes esimest järku.

Järgnevate hüdrolüüsireaktsioonide läbiviimiseks kasutati ensüümi suhtelist kontsentratsiooni  $4,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , kuna algkiirus jäi sobivasse vahemikku ultrahelisüsteemis kasutamiseks ning mitteensümaatilise hüdrolüüsi algkiirus on rohkem kui ühe suurusjärgu võrra väiksem.



**Joonis 2.** PNPA hüdrolüüsi algkiiruse sõltuvus KT suhtelisest kontsentratsioonist.



**Joonis 3.** Algkiiruse  $v_0$  sõltuvus PNPA molaarsest kontsentratsioonist [PNPA].

Seejärel leiti konstantsel KT suhtelisel kontsentratsioonil ( $4,2 \cdot 10^{-6}$  M) reaktsiooni algkiiruse  $v_0$  sõltuvus PNPA kontsentratsioonist [PNPA] (Joonis 3). Antud reaktsioonile saadi kineetilised konstandid  $K_m = 5,96 \cdot 10^{-6} \pm 0,70 \cdot 10^{-6}$  ja  $V_{max} = 1,549 \cdot 10^{-8} \pm 0,04 \cdot 10^{-8}$  vastavalt võrrandile (2).

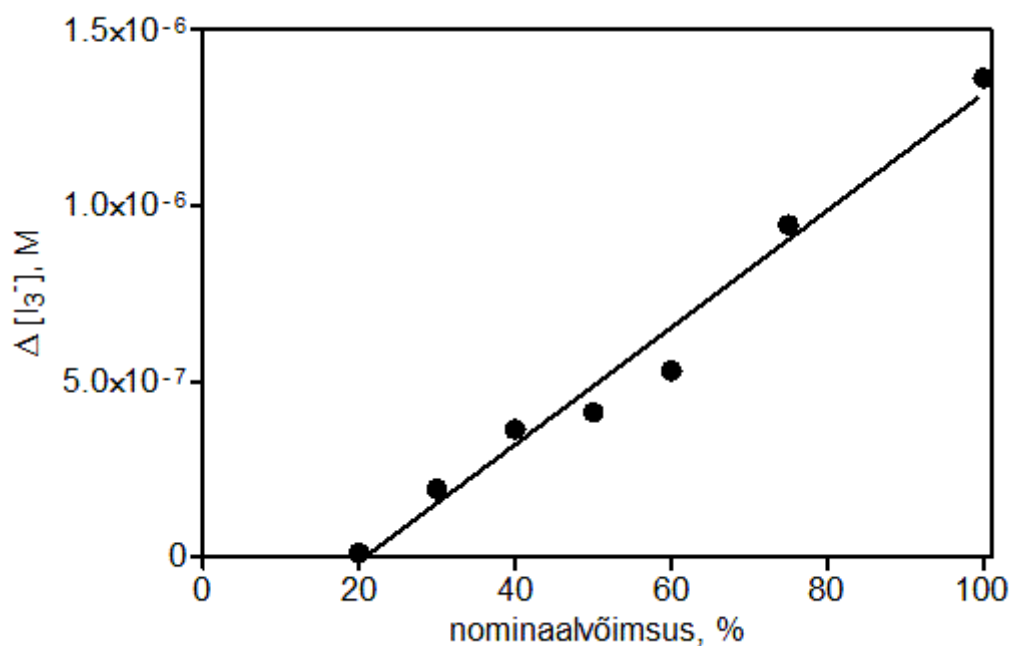


## 5.2. Ultraheliseadme seadistamine ja eelkatsed ensüümreaktsiooni uurimiseks ultraheliga

Selles töös kasutati meie töögrupis varasemalt kineetiliste uuringute tegemiseks konstrueeritud ultraheliaparatuuri [24], mis seadistati ümber ensüümatalüütiliste kineetiliste mõõtmiste läbiviimiseks. Antud süsteem oli mõeldud suurte lahusekoguste jaoks, mis aga pole otstarbekas ensüümireaktsioonide uurimiseks. Valmistati uus klaasist reaktsioonirakk põhja diameetriga 22 mm, mis oli mahult piisavalt väike, et kasutatavad ainekogused oleks minimaalsed. Kuid vastavalt seadme omapärale oli minimaalne lahusehulk siiski 20 ml. Tuli tagada piisav ultraheli võimsustihedus, milleks peaks reaktsioonisegu ruumalasse jääma nii pool- kui ka täislainepikkus [26], seega on tähtis lahuse samba kõrgus. Kuna heli kiirus vees on helisagedus korda lainepikkus ( $v=f \cdot \lambda$ , ( $v(25^\circ\text{C}) = 1497 \text{ ms}^{-1}$ ,  $f = 25000 \text{ Hz}$ ), siis poollainepikkus on umbes 3 cm ja täislainepikkus 6 cm. Uue raku positsioneerimiseks kasutati KI dosimeetria reaktsiooni, millest tuleb hiljem põhjalikumalt juttu. Reaktsioonirakku erinevatele sügavustele sukeldades ning ultrahelivanni horisontaaltasandi suhtes erinevatesse punktidesse pannes leiti, et suurim efekt esines, kui raku põhi oli vahetult heligeneraatori kohal vanni põhjast 2 cm kõrgusel.

Ultraheliseadme efektiivse võimsuse ja kavitatsiooni hindamiseks tehti KI dosimeetria, mis on klassikaline meetod kavitatsiooni olemasolu tõestamiseks. Teatavasti tekitab kavitatsioon vees OH-radikaale ja H-aatomeid. OH-radikaalid annavad kombineerumisel  $\text{H}_2\text{O}_2$  [3]. Klassikaline KI dosimeetria põhineb sellel, et  $\text{I}^-$  ioonid oksüdeeritakse  $\text{I}_2$ -ks. Lahuses tekib suur ülehulk  $\text{I}^-$  ioone, mis reageerivad  $\text{I}_2$ -ga ja tekib  $\text{I}_3^-$ . Tekkivat  $\text{I}_3^-$  määratakse spektrofotomeetriliselt 355 nm juures.

Mõõdeti spektrofotomeetriliselt kavitatsioonil radikaalmehhanismiga tekkiva  $\text{I}_3^-$  kontsentratsiooni kiiritades ultraheliga 4 minuti jooksul, mis esitati graafiliselt ultraheli seadme võimsuse funktsioonina (Joonis 4). Katsest nähtus, et antud tingimustel on kavitatsioon tuvastatav alates seadme võimsusest 20 %.



**Joonis 4.**  $I_3^-$  molaarse kontsentratsiooni muutuse ja ultrahelivanni nominaalvõimsuste suhe.

Lisaks oli vaja läbi viia ultraheliseadme muunduri com-signaali ja PNP kontsentratsiooni suhte mõõtmine, et registreeritav signaal oleks teisendatav PNP molaarseks kontsentratsiooniks (Lisa 3).

Kuna ultraheli võib sonodegradeerida ka PNP-d, nt OH-radikaalid võivad PNP-ga reageerides anda katekooli ja mitmeid teisi laguprodukte, võib see näiliselt mõõdetava PNP kontsentratsiooni vähendada ja moonutada kineetiliste mõõtmiste tulemusi. Selle hüpoteesi kontrollimiseks tehti eksperimentid ultraheli seadme 20, 40 ja 60 % nominaalvõimsustel, saamaks teada kas ja kui palju väheneb PNP kontsentratsioon heliga kiiritamisel. Mõõtmistest selgus, et 30 min sonikeerimise jooksul ei vähenenud PNP kontsentratsioon üheligi valitud võimsusel, seega välistati ultraheli mõju PNP kontsentratsiooni määramisele.

### 5.3. Eelkatsed mudelreaktsiooniga ultrahelisüsteemis

Esmalt teostati PNPA mitteensümaatilise hüdrolüüsi mõõtmised ultrahelisüsteemiga standardiks valitud tingimustel puhverlahuses, samuti viidi läbi eksperimentid ultraheligaga mõnel valitud nominaalvõimsusel (20, 40, 60 %). Pseudo-esimest järku kiiruskonstandid olid võrreldavad spektrofotomeetriga saadud tulemustega ja ei täheldatud ultraheliefekte ka 60 % nominaalvõimsusel.

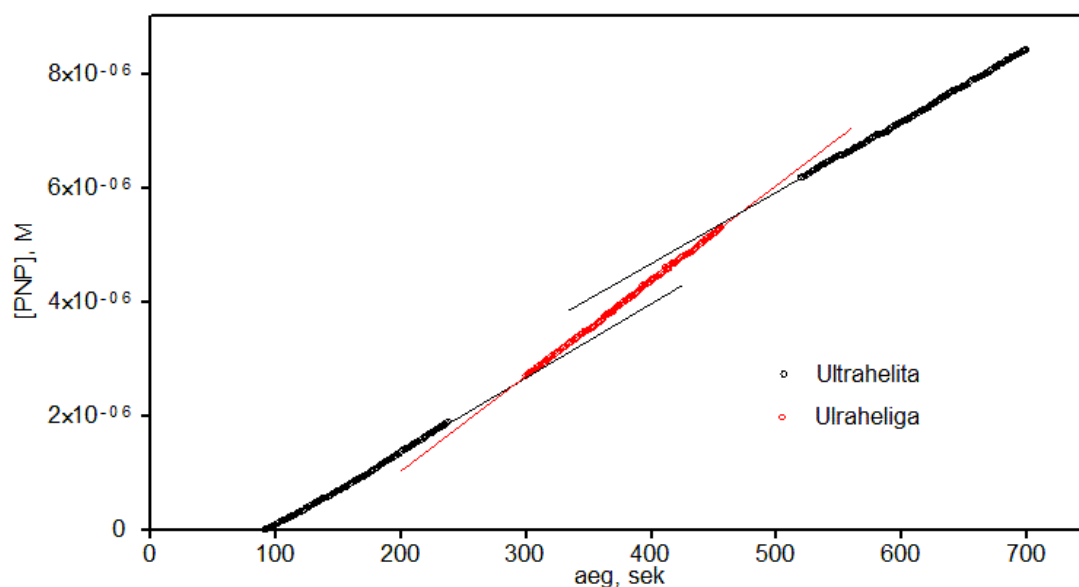
Samuti jälgiti ensüümkatalüütilise hüdrolyüsi kineetikat ultrahelisüsteemiga ilma ultraheli sisse lülitamata. Kuid siin tulid esimesed tõsised raskused. Nimelt ei suudetud reprodutseerida spektrofotomeetriliselt saadud reaktsiooni algkiirusi. Reaktsioonid osutusid tunduvalt aeglasemaks, mõnikord isegi lähedaseks mitteensümaatilise hüdrolyüsi kiirusele. Samuti täheldati, et ensüümi kontsentratsiooni muutmine ei muutnud kuigi palju hüdrolyüsi kiirust. Oletati, et see võib olla seotud PTFE HPLC solvendifiltriga (diameeter 10 mm, poorsus 2  $\mu\text{m}$ ), mida kasutati ultrahelirakus detektori sisendtoru otsas. KT puhvri lahust valati enne mõõtmiste alustamist reaktsioonirakku, lahuse termostateerimise ajal töötas HPLC pump kineetika mõõtmise režiimil. Arvati, et antud filter võib mingil põhjusel ensüümi desaktiveerida. Pole teada, kas see oli tingitud filtri omadustest või saastatusest, kuid ilma selle filtrita läbiviidud eksperimendid andsid oodatud reaktsiooni algkiirused.

Samas ilma filtri kasutamiset tekkisid uued probleemid: gaasimullid, mis jõudsid UV-Vis detektorisse, raskendasid tunduvalt andmete korrektset registreerimist. Samuti ummistus süsteem järjepidevalt, mille tõttu tuli eksperimendid korduvalt pooleli jätta. Lahendusena võeti kasutusele roostevabast terasest solvendifilter (diameeter 10 mm, poorsus 10  $\mu\text{m}$ ), mis lahendas eelmainitud probleemid.

#### **5.4. Kümüotrüpsiini reaktsioon 4-nitrofenüülatsetaadiga ultraheli all**

Esmased katsed ultraheliga viidi läbi nii, et reaktsioonisegu kiiritati pikema aja vältel (pool tundi kuni tund) ja vaadati, kas toimub ärakeeramisi statsionaarse faasi kineetikast. Erinevatel nominaalvõimsustel (20, 40, 60%) läbi viidud katsed andsid registreeritava signaali lineaarsed sõltuvused kogu mõõdetud aja jooksul (vt näidet Lisa 4). On tähelepanuväärne, et nagu näitas KI-i dosimeetria, esineb 40 ja 60 % nominaalvõimsustel kavitatsioon, kuid sellel ei paista tuvastatavat mõju olevat.

Järgnevalt teostati ultraheliefektide leidmiseks katsed, kus alustati kineetika mõõtmist ilma ultrahelitata, jätkati ultraheli all ning lõpuks mõõdeti jälle ilma ultrahelitata. Selline meetod on väga hea nägemaks, kas ultrahelil on mingisuguseid pöördumatuid efekte ensüümprotsessile, mille tooks kohe välja reaktsioonikiiruse muutus järgnevas ultrahelita etapis. Nominaalvõimsustel 20 ja 40 % ei täheldatud ultraheliefekte – ei kiirendavaid ega ka aeglustavaid. Samas leiti väike kiirendav ultraheli toime 60 % nominaalvõimsusel. Joonisel 6 on toodud näide kineetilistest mõõtmistest ultraheliseadmega.



**Joonis 5.** Hüdrolüüsil tekkiva PNP molaarse kontsentratsiooni ajast sõltuvus, mis on saadud järjestikusel mõõtmisel ilma ultrahelita, ultraheliga ja ilma ultrahelita.  $[PNPA] = 1,01 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[E] = 4,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7,5$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

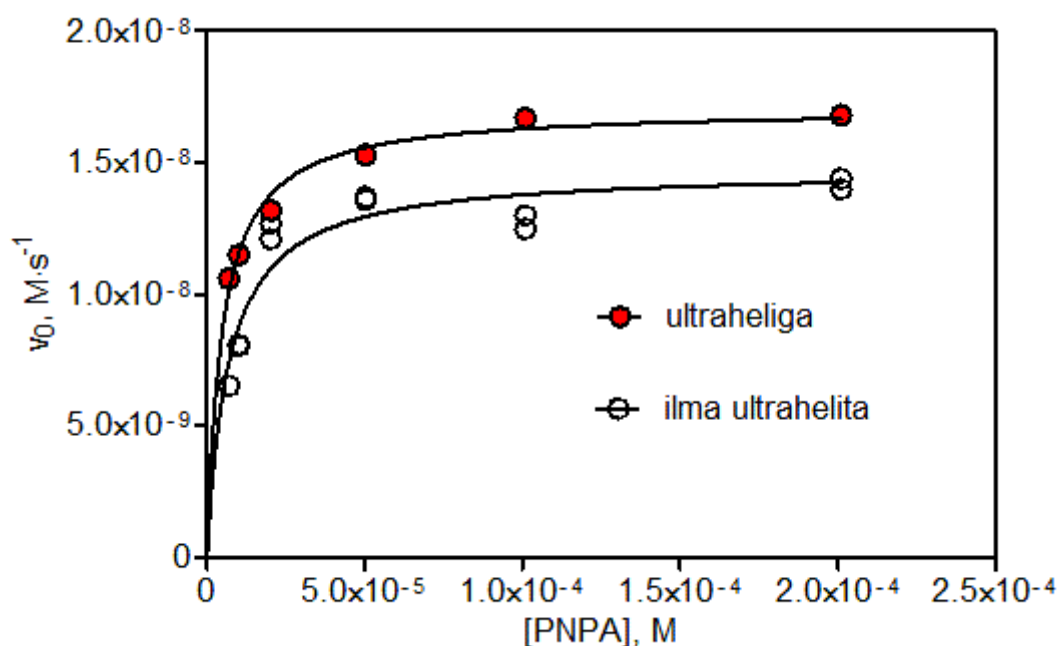
Seejärel määrati eelmainitud viisil konstantsel ensüümi suhtelisel kontsentratsioonil ( $4,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ) reaktsiooni algkiiruse  $v_0$  sõltuvus PNPA kontsentratsioonist kasutades ultrahelivanni nominaalvõimsust 60%. Saadud algkiirused on esitatud tabelis 1. Samas tabelis on toodud ka ultraheliefektid, mida väljendatakse sonokeemias reaktsiooni kiiruse ultraheli all ja ilma ultrahelitata kiiruse suhtena.

**Tabel 1.** Ultraheli all ning ilma ultrahelita läbi viidud katsete algkiirused ning ultraheliefekt vastavalt PNPA kontsentratsioonile.

<b>[PNPA]</b> <b><math>10^{-5}</math></b>	<b><math>v_0</math></b> <b>(enne ultraheli)</b> <b><math>10^{-8}</math></b>	<b><math>v_0</math></b> <b>(ultraheliga)</b> <b><math>10^{-8}</math></b>	<b><math>v_0</math></b> <b>(pärast ultraheli)</b> <b><math>10^{-8}</math></b>	<b>Ultraheliefekt</b> <b><math>v_0(\text{ultraheliga}) /</math></b> <b><math>v_0(\text{ilma ultrahelita})</math></b>
<b>20,10</b>	1,40	1,68	1,44	1,18
<b>10,10</b>	1,30	1,67	1,25	1,31
<b>5,0</b>	1,37	1,53	1,36	1,12
<b>2,0</b>	1,21	1,32	1,27	1,06
<b>1,0</b>	0,80	1,15	0,81	1,43
<b>0,7</b>	0,65	1,06	-	1,62

Nagu võib näha tabelist 1, on tõesti märgata ultraheli teatavat kiirendavat efekti. Maksimaalne efekt on 60 % ja minimaalne 6 % ning keskmine 30 %. Loomulikult peaks sellele eksperimendile tegema arvukalt korduskatseid, et teha lõplikke järeldusi. Selle töö raames ei jõutud kahjuks ajapuudusel korduskatsete tegemiseni. Siiski, kuna kõik eksperimendid on tehtud samas ensüümi emalahuses, võib neid tulemusi teatud mõõndustega vaadata kui korduskatseid. Kuid kõige tähtsam tulemus paistab silma just ultrahelita tehtud tulemustest. On selgesti näha, et valitud tingimustel ei täheldatud ultraheli ensüümi kahjustavat toimet, kuna pärast ultraheli väljalülitamist algkiirused sisuliselt ei muutu võrreldes enne ultraheli sisselülitamist saadutega. On tähelepanuväärne, et KI dosimeetria näitas 60 % võimsusel lahuses kavitatsiooni.

Järgnevalt viidi programmiga GraphPad Prism läbi andmete Micaelis-Menteni kineetika analüüs. Saadi PNPA kontsentratsioon- $v_0$  sõltuvuse graafikud nii ultraheliga kui ultrahelita reaktsioonide jaoks (Joonis 6). Sama programmiga leiti  $K_m$  ning  $V_{max}$  väärtused (Lisa 5).



**Joonis 6.** KT ( $4,2 \cdot 10^{-6}$  M) katalüüsitud PNPA hüdrolüüsi algkiirused vs. PNPA molaarsed kontsentratsioonid (pH=7,5; T=25 °C) ilma ultrahelita (○) ja ultraheli all (●).

**Tabel 2.** Kineetilised konstandid ultrahelita ja ultraheliga KT ( $4,2 \cdot 10^{-6}$  M) katalüüsitud PNPA hüdroolüüsile pH=7,5, T=25 °C juures.

Kineetilised konstandid	Ilma ultrahelita	Ultraheliga
$V_{\max}$ ( $M \cdot s^{-1}$ ) $10^8$	1,47±0,06	1,71±0,03
$K_m$ (M) $10^6$	6,93±1,33	4,82±0,50

Need esmased andmed on osutunud väga huvitavaks. Nagu näha tabelist 2, on ultraheli all leitud sidumiskonstant  $K_m$  väiksem kui vastav number ultrahelita reaktsioonile. Sellest võiks järeldada, et paraneb substraadi sidumine, millest tuleneb ka reaktsiooni kiiruse kasv ultraheliväljas. Kui see korduskatsetes kinnitust leiab, on tegemist väga huvitava tulemusega.

Kui tugineda kirjandusele [4], siis ultraheli läbiminekuul lahustest tekkivad mikrohoovused põhjustavad substraatide solvatatsiooni muutusi vesi-orgaanilistes segudes, mis omakorda mõjutavad reaktsiooni kiirust. Seega avaldub ultraheli toime solvatatsiooni muutustes. Ensümaatiliste reaktsioonide korral võib ultraheli muuta nii ensüümide kui ka substraatide solvatatsiooni. Selle tõttu võib muutuda reaktsioonide kiirus, mis avaldub kineetiliste konstantide muutuses.

## 6. Kokkuvõte

On teada, et ultraheli võib mõjutada hüdrofoobseid soluut-solvent interaktsioone vesi-orgaanilistes solventides, mis väljendub reaktsiooni kiiruse muutumises. Teatavasti on sellised nõrgad vastastikmõjud lahuses üheks väga oluliseks ensüümreaktsioone mõjutavaks faktoriks. Sellest huvi, kas ultrahelil võiks nende interaktsioonide mõjutamise kaudu olla toime ka ensümaatilistele protsessidele.

Ultraheli mõjub kavitatsiooniefekti tõttu ensüümidele destruktiivselt. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida, kas ultraheliväljas on võimalik läbi viia ensümaatilisi reaktsioone ilma ensüümile kahju tegemata.

Selleks teostati mudelreaktsiooniks valitud  $\alpha$ -kümütrüpsiini katalüüsitud 4-nitrofenüülatsetaadi hüdrolyüsireaktsiooni eeluuringud, millest leiti edasiste ultrahelikatsete jaoks sobivad tingimused. Seadistati ja parametrizeeriti ultrahelisüsteem ensüümikineetika mõõtmisteks. Hinnati KI dosimeetria abil ultraheli suhtelist võimsust reaktsioonirakus ning määrati valitud tingimustel võimalikku 4-nitrofenüülatsetaadi sonodegradatsiooni.

Ultraheli all viidi erinevatel võimsustel pika aja jooksul läbi arvukalt eelkatseid, milles ei täheldatud sonikatsiooni degradeerivat mõju ensüümile valitud tingimustes.

Teostati rida eksperimente, kus jälgiti samas katses ensüümreaktsiooni kineetikat vaheldumisi ultrahelita, ultraheli all ning uuesti ultrahelita. Ultraheliga ning ultrahelita tehtud katsete omavahelisest võrdlemisest selgus, et heli kiirendas reaktsiooni. Tähelepanuväärne on, et ultraheli välja lülitades taastus reaktsiooni esialgne kiirus, millest saab järeldada, et ultrahelil ei olnud ensüümile kahjulikku mõju. Veelgi intrigeerivamad tulemused ilmnesid katsetest, milles varieeriti 4-nitrofenüülatsetaadi kontsentratsiooni ensüümi konstantsel kontsentratsioonil. Leiti, et ultraheli all oli ensüümi sidumiskonstant väiksem, kui ilma ultrahelita reaktsioonides, millest võib järeldada, et ultraheli soodustab ensüüm-substraat seondumist, mis põhjustab kiiruse kasvu. Selle põhjuseks võib tõenäoliselt pidada ultraheli toimet substraadi ja/või ensüümi solvatatsioonile.

Selles töös näidati, et ensüümreaktsioone on võimalik uurida ultraheliväljas. Saadi väga huvitavaid ning varem kirjeldamata efekte, mida on kindlasti põhjust edasi uurida.

## 7. Kasutatud kirjandus

- [1] Tuulmets, A.; Salmar S.; Järv J.; Sonochemistry in Water Organic Solutions. New York: Nova Science Publishers; 2010.
- [2] Suslick, K.S.; Sonochemistry. *Science*. 1990; 247(1439–1445).
- [3] Tuulmets, A.; Piiskop, S.; Järv, J.; Salmar, S.; Sonication effects on non-radical reactions. A sonochemistry beyond the cavitation? *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014; 21(997–1001).
- [4] Piiskop, S.; Salmar, S.; Tuulmets, A.; Kuznetsov, A.; Järv, J.; Kinetic sonication effects in aqueous acetonitrile solutions. Reaction rate levelling by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* 2013; 20(1414-1418).
- [5] Rokhina, V.E.; Lens, P.; Virkutyte, J.; Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in Biotechnology*. 2009 Märts; 27(5).
- [6] Chisti, Y.; Moo-Yong, M.; Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microb. Technol.* 1986 Aprill; 8(194–204).
- [7] Yachmenev, V.G. *et al.*; Intensification of the bio-processing of cotton textiles by combined enzyme/ultrasound treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2002; 77(559–567).
- [8] Kelkar, M.A. *et al.*; Intensification of esterification of acids for synthesis of biodiesel using acoustic and hydrodynamic cavitation. *Ultrason. Sonochem.* 2008; 15(188–194).
- [9] Xie, B. *et al.*; Improvement of the activity of anaerobic sludge by low-intensity ultrasound. *J. Environ. Manage.* 2009; 90(260–264).
- [10] Gedanken A.L.S.; A. Are sonochemically prepared  $\alpha$ -amylase protein microspheres biologically active? *Ultrason. Sonochem.* 2007; 14(1–5).
- [11] Entezari, M.H.; Petrier, C.; A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-biodegradation of phenol. *Appl. Catal B: Environ.* 2004; 53(257–263).
- [12] Kumar, A.; Venkatesu, P.; Overview of the Stability of  $\alpha$ -Chymotrypsin in Different Solvent Media. *Chemical Reviews*. 2012; 112(4283–4307).
- [13] Entezari, M.H. *et al.*; A combination of ultrasound and a biocatalyst: removal of 2-



- chlorophenol from aqueous solution. *Ultrason. Sonochem.* 2006; 13(37–41).
- [14] Jian, S. *et al.*; Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste. *J. Clean. Prod.* 2008; 16(591–597).
- [15] Kuznetsova, L.A. *et al.*; Stability of 2-D colloidal particle aggregates held against flow stress in an ultrasound trap. *Langmuir.* 2007; 23(3009–3016).
- [16] Hawkes, J.J. *et al.*; Ultrasonic deposition of cells on a surface. *Biosens. Bioelectron.* 2004; 19(1021–1028).
- [17] El Kaoutit, M. *et al.*; The sonogel–carbon materials as basis for development of enzyme biosensors for phenols and polyphenols monitoring: a detailed comparative study of three immobilizationmatrixes. *Biosens. Bioelectron.* 2007; 22(2958–2966).
- [18] El Kaoutit, M. *et al.*; Dual laccase–tyrosinase based sonogel-carbon biosensor for monitoring polyphenols in beers. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55(8011–8018).
- [19] Zejli, H. *et al.*; Phenol biosensor based on sonogel–carbon transducer with tyrosinase alumina sol–gel immobilization. *Anal. Chim. Acta.* 2008; 612(198–203).
- [20] Chang, R.; "Enzyme Kinetics". In *Physical Chemistry for the Biosciences.*: University Science Books; 2005.
- [21] Hartley, B.S.; Kilby, B.A.; The reaction of p-nitrophenyl esters with chymotrypsin and insulin. *Biochem. J.* 1954; 56.
- [22] Gutfreund, H.; Sturtevant, J.M.; The mechanism of the reaction of chymotrypsin with p-nitrophenyl acetate. *Biochem J.* 1956 Aug; 63(4)(656–661).
- [23] Kezdy, F.J.; Bender, M.L.; The Kinetics of the  $\alpha$ -Chymotrypsin-Catalyzed Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetate. ACS Publications. 1962; 6(1097–1106).
- [24] Piiskop, S.; Raidaru, G.-J.; Salmar, S.; Ultrasonic on-line spectrophotometric system for reaction kinetics measurements. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences.* 2012; 61(52-57).
- [25] Salmar, S.; Cravotto, G.; Tuulmets, A.; Hagu, H.; Effect of ultrasound on the base catalyzed hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate in aqueous ethanol. *J. Phys. Chem. B.* 2006; 110(5817).
- [26] Mason, T.J.; Lorimer, J.P.; *Sonochemistry: Theory, Applications and Uses of Ultrasound in Chemistry.* Horwood E, editor. Chichester, England; 1988.
- [27] Rokhina, E.V.; Lens, P.; Virkutyte, J.; Low-frequency ultrasound in biotechnology:

state of the art. Trends in Biotechnology. 2009; 27(5).

- [29] Shangguan, S.; Wang, F.; Liao, Y. *et al.*; Design, Synthesis and Evaluation of 3-(2-Aminoheterocycle)-4-benzyloxyphenylbenzamide Derivatives as BACE-1 Inhibitors. Molecules. 2013; 18(3583).

## 8. Summary

### **Effect of ultrasound on the hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate with $\alpha$ -chymotrypsin**

Riho Vahtras

Ultrasound is widely used for practical purposes in many different fields. It can be used for cleaning surfaces, homogenising immiscible liquids, to improve the mass transfer of enzymes into substrate matrix or to aid in treatment of wastewater, just to name a few possible fields of use. The ability of very low power ultrasound to alter the solvation of different hydrophobic organic molecules in water-organic cosolvent media even below cavitation level has been observed by our group. This means that ultrasound can affect weak solute-solvent interactions, which are of significant importance in biocatalysis. For this reason it was asked whether ultrasound could also have an effect on enzymatic reactions.

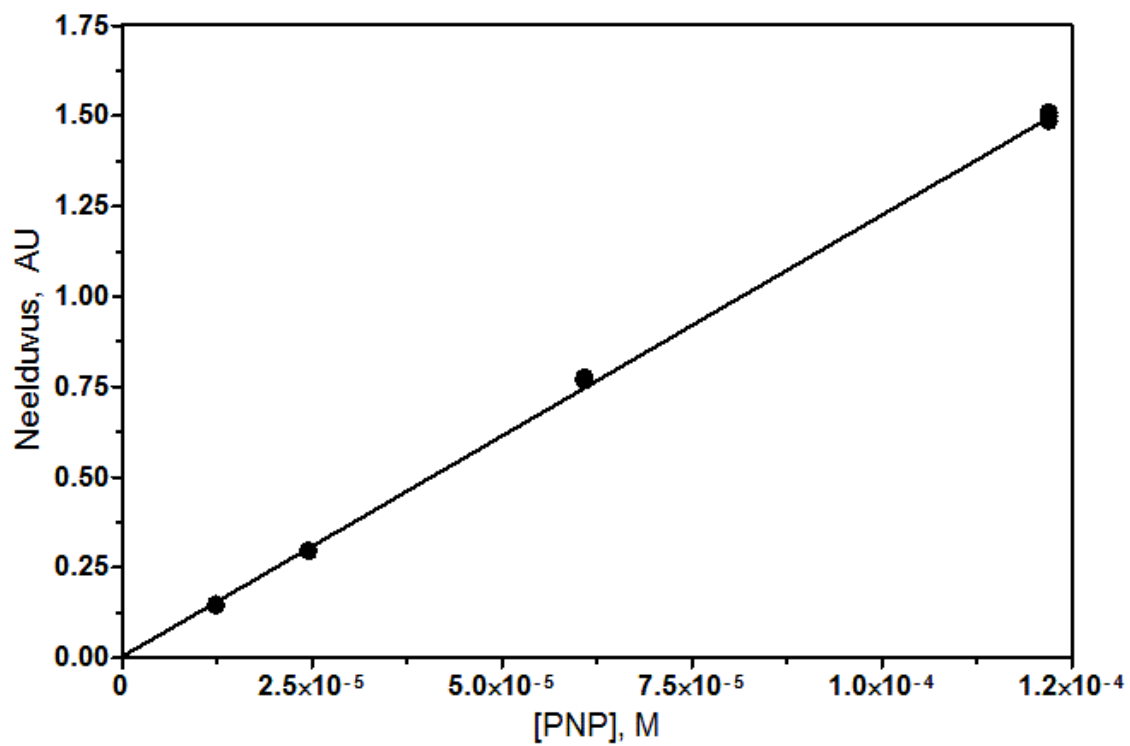
Since ultrasound is often used for its destructive capacity to degrade substances, it was assumed, that sonication would have a negative effect on an enzyme. The aim of this work is to find out whether or not it is possible to use the ultrasonic method developed by our research group to study enzymatic processes without denaturing the enzyme. A model reaction of  $\alpha$ -chymotrypsin catalysed hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate was chosen and kinetic measurements were carried out with and without sonication using an ultrasound system developed by our research group in earlier work. The system was modified and optimised for conducting experiments with the model reaction.

Kinetic constants were obtained for a number of reactions with varying substrate and/or enzyme concentrations. It was observed, that ultrasound accelerated the  $\alpha$ -chymotrypsin catalysed PNPA hydrolysis reaction and the enzyme did not suffer any noticeable damage to its catalytic activity from sonication notwithstanding cavitation. Very intriguingly, ultrasound was shown to reduce the Michaelis constant of the model reaction, which means that sonication improves binding of the enzyme and substrate.

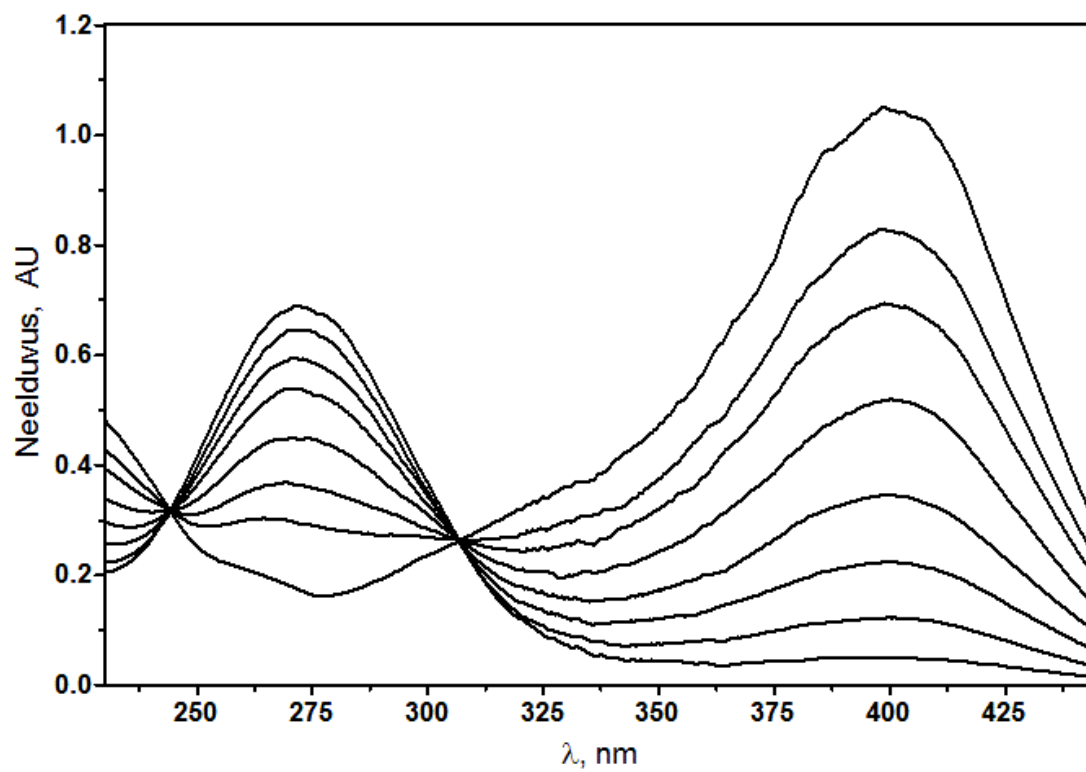
In conclusion it was shown, that the ultrasonic method can be used for research on biocatalysis and that ultrasound affects the kinetics of the chosen model reaction. Intriguing effects not yet described before were observed. The results of this work definitely deserve further research.

## 9. Lisad

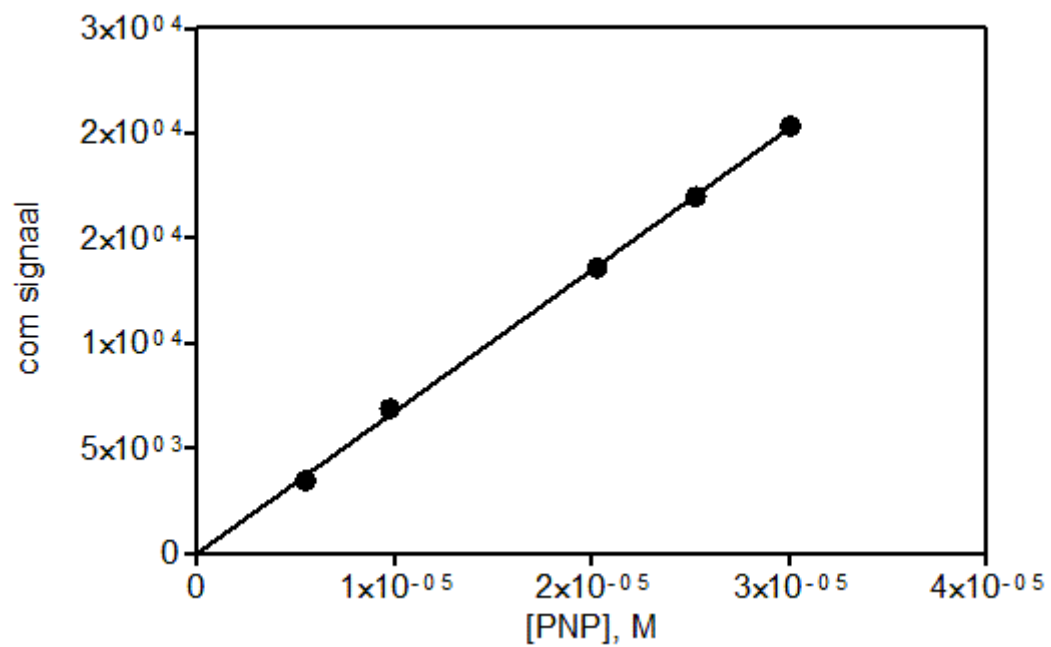
**Lisa 1.** Valitud PNP molaarsete kontsentratsioonide vahemiku Lambert-Beeri seadusele vastavuse kontroll UV-Vis spektrofotomeetril.



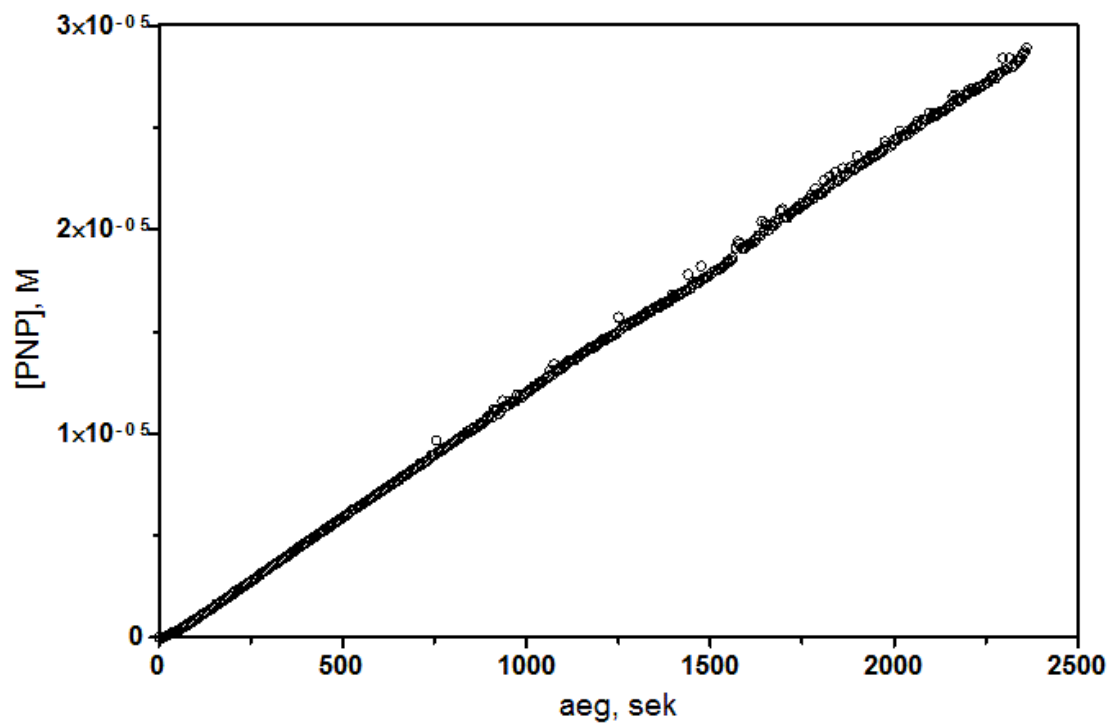
**Lisa 2.** Ensüümatalüütilise PNPA hüdrolüüsi reaktsiooni käigus eri ajahetkedel võetud neelduvusspektrid fosfaatpuhvrts pH=7,5, T=25 °C.



**Lisa 3.** Ultraheliseadme detektori väljundsignaali ja PNP molaarse kontsentratsiooni sõltuvus.



**Lisa 4.** Hüdrolüüsireaktsioonil tekkiva PNP molaarne kontsentratsioon ajast sõltuvus ultraheli nominaalvõimsusel 40%; PNPA algkontsentratsioon  $9,97 \cdot 10^{-5}$  M ja KT suhteline kontsentratsioon  $4,2 \cdot 10^{-6}$  M, pH=7,5, T=25 °C.



**Lisa 5.** GraphPad Prism 5 programmiga leitud kineetilised andmed ning statistika PNPA ensüümkatalüütilise hüdrolüüsireaktsiooni jaoks ultrahelita ja ultraheliga.

<b>Michaelis-Menten</b>	<b>Ultrahelita</b>	<b>Ultraheliga</b>
Best-fit values		
Vmax	1,474e-008	1,707e-008
Km	6,932e-006	4,824e-006
Std. Error		
Vmax	5,598e-010	3,216e-010
Km	1,331e-006	4,976e-007
95% Confidence Intervals		
Vmax	1,348e-008 to 1,601e-008	1,618e-008 to 1,797e-008
Km	3,921e-006 to 9,943e-006	3,443e-006 to 6,206e-006
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	9	4
R square	0,8792	0,9771
Absolute Sum of Squares	9,262e-018	8,085e-019
Sy.x	1,014e-009	4,496e-010
Constraints		
Km	Km > 0,0	Km > 0,0
Number of points		
Analyzed	11	6



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, \_\_\_\_\_ Riho Vahtras \_\_\_\_\_,  
(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Ultraheli toime  $\alpha$ -kümotrüpsiini reaktsioonile 4-nitrofenüülatsetaadiga“

---

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on \_\_\_\_\_ Siim Salmar \_\_\_\_\_,  
(juhendaja nimi)

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 alates **28.05.2017** 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 **28.05.2015**