

Uticaj ultrazvuka na aktivnost β -proteaze izolovane iz deterdženata

Ispitivan je uticaj ultrazvuka na aktivnost β -proteaze koja se nalazi u deterdžentima. Frekvencija korišćenog ultrazvuka od 43 kHz približno odgovara frekvenciji ultrazvuka koji se nalazi u već mašinama sa sistemom ultrazvučnog pranja. Korišćeni su deterdženti: ariel (mountain spring), Bonux (natura energy aloe vera & jasmine) i merix (gorska svežina). Ispitivan je uticaj ultrazvuka na enzim izolovan iz deterdženta, kao i na enzim u sastavu deterdženta (neizolovani enzim). Uzorci izolovanog i neizolovanog enzima izlagani su ultrazvuku u intervalima od 5, 10, 20 i 30 min. Kod izolovanog enzima, najveći uticaj ultrazvuk ima na β -proteazu iz merixa, dok je kod neizolovanog enzima najveći uticaj na β -proteazu iz bonuxa. Najveća aktivnost β -proteaze je kod ariela. Razlog zašto je aktivnost enzima u arielu najveća, iako ultrazvuk nema najveći uticaj na ovaj enzim, je taj što β -proteaza koja se nalazi u arielu ima veću aktivnost u odnosu na β -proteazu koja se nalazi u bonuxu i merixu. Pod dejstvom ultrazvuka aktivnost se povećava kod svih enzima. Ovim istraživanjem je pokazano da će se u već mašinama sa sistemom ultrazvučnog pranja postići najbolji efekat uklanjanja mrlja proteinskog porekla prilikom korišćenja ariela (mountain spring), zatim sledi merix (gorska svežina) i na kraju bonux (natura energy aloe vera & jasmine).

Uvod

Enzimi predstavljaju grupu proteina koji imaju ulogu bioloških katalizatora. Kao i ostali katalizatori, enzimi snižavaju aktivacionu energiju reakcije i na

taj način je ubrzavaju. Enzime od ostalih konvencionalnih hemijskih katalizatora razlikuje njihova stereospecifičnost i hemijska selektivnost. Najveći stepen ubrzanja reakcije je izmeren kod enzima koji katalizuje uklanjanje CO₂ iz ortidina. Brzina katalizovane reakcije je 10¹⁷ puta brža od nekatalizovane. (Vollhardt i Schore 2004)

Enzimi su našli veliku primenu u svakodnevnom životu. Koriste se u prehrambenoj i hemijskoj industriji, industriji papira, medicini, farmaciji, a veliku upotrebu našli su i u proizvodnji deterdženata. Deterdženti koji sadrže enzime (najčešće α -amilazu i β -proteazu) deluju u hladnoj vodi i efikasniji su od onih deterdženata koji ih ne sadrže.

Ultrazvuk je periodični ciklični zvuk sa frekvencijom većom od granice ljudskog sluha. Granica ljudskog sluha je približno 20 kHz. U hemiji se koristi ultrazvuk frekvencije u intervalu od 20–100 kHz.

Uticaj ultrazvuka na molekule nije direktan, već se taj uticaj ostvaruje putem kavitacija. Kavitacija predstavlja pojavu formiranja veoma malih i uglavnom praznih mehura u tečnostima. Implodiranjem one izazivaju ekstremno visoke lokalne temperature i pritisak u rastvoru u kome se dešava reakcija. Na taj način, molekuli dobijaju energiju koja je potrebna da bi počeli reakciju. Temperatura i pritisak koji nastaju putem kavitacije nastaju veoma brzo, ali isto tako i nestaju, tj. temperatura i pritisak se vraćaju na vrednosti koje su imali pre implozije. Ultrazvuk može da razbija čvrste i premešta neaktivne slojeve inertnog materijala, dajući pri tom veći prostor za odigravanje reakcije.

Ultrazvuk je našao veliku primenu u medicini, kao i u različitim granama industrije. Direktna industrijska primena ultrazvuka je u proizvodnji već mašina. To su već mašine sa sistemom ultrazvučnog pranja i one su efikasnije u pranju od već mašina koje nemaju generator ultrazvuka. Frekvencija ul-

Gordana Krstić (1988), Vranje, Kosovska 107/2, učenica 4. razreda Gimnazije "Bora Stanković" u Vranju

MENTOR: dr Nenad Milosavić, Beograd, IHTM – Centar za hemiju

trazvuka koji se nalazi u mašinama za pranje veša je 40 kHz.

Cilj istraživanja je ispitivanje uticaja ultrazvuka na aktivnost β -proteaze iz različitih tipova deterdženata. Ovo istraživanje se bazira na činjenici da se danas sve više upotrebljavaju deterdženti za pranje veša sa visokim sadržajem enzima (naročito proteaze) u mašinama nove generacije koje imaju generator ultrazvuka.

Materijal i metode

Deterdženti korišćeni za izolovanje enzima su: ariel *mountain spring*, bonux *Natura Energy aloe vera&jasmine* i merix gorska svežina. Određivan je uticaj ultrazvuka na enzim izolovan iz deterdženta i enzim u sastavu deterdženta (enzim sa svim ostalim komponentama koje se nalaze u deterdžentu).

U toku eksperimenta korišćeni su rastvori NaCl, CaCl₂, NaN₃, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, HCl, n-butanol, Trys, kazein, CH₃COONa, CH₃COOH i TCA.

Sve korišćene hemikalije su bile *pro analysis* kvaliteta.

Prvo je enzim ekstrahovan iz deterdženta, zatim je uzorak enzima izlagan uticaju ultrazvuka. Izlaganje uzoraka ultrazvuku rađeno je uranjanjem epruveta sa uzorkom u ultrazvučno kupatilo frekvencije 43 kHz u toku 5, 10, 20 i 30 min. Po završetku izlaganja ultrazvuku uzorak je pripremljen za merenje enzimske aktivnosti. Merena je i aktivnost enzima koji nije izlagan uticaju ultrazvuka, kao i aktivnost enzima u samom deterdžentu, tj. bez prethodnog izolovanja. Najduže vreme izlaganja ultrazvuku je 30 minuta iz razloga što proces pranja u mašinama sa generatorom ultrazvuka traje upravo 30 minuta.

Ekstrakcija enzima iz deterdženta

Za pripremanje uzorka β -proteaze iz deterdženta korišćena su dva rastvora:

Prvi rastvor: NaCl (1% w/v) i CaCl₂ (5 mM) i

Drugi rastvor: Fosfatni pufer (pH 7.0), CaCl₂ (5 mM) i Na-azid (0.02%).

Prvi rastvor se koristi za ekstrakciju enzima iz deterdženta, a drugi rastvor je korišćen za razblaživanje uzorka enzima.

Proces ekstrakcije i razblaživanja uzorka sastoji se iz tri koraka:

1. 10 g uzorka deterdženta rastvoreno je u 100 mL prvog rastvora i 100 mL n-butanola. Posuda

sa smešom je zatvorena i snažno mućkana 15 minuta na sobnoj temperaturi.

2. Alikvot (približno 10 mL) je centrifugiran na 3000 rpm (1.00 g) 10 minuta. Posle centrifugiranja u kivetu se dobija dvofazni rastvor. Alikvot za dalje ispitivanje se uzima iz donje faze.

3. Alikvot od 1 mL razblažen je do 10 mL (1 : 9) u drugom rastvoru.

Priprema uzorka enzima u deterdžentu

Uzorak enzima u deterdžentu, tj. uzorak neizolovanog enzima, je pripremljen tako što se 10 g deterdženta rastvori u 200 mL destilovane vode i zatim se alikvot od 1 mL razblaži do 10 mL (1 : 9) u drugom rastvoru.

Merenje aktivnosti β -proteaze

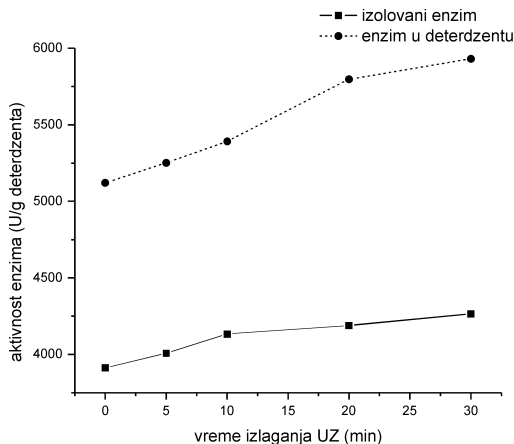
Aktivnost je određena na 0.6% kazeinu kao supstratu koji je rastvoren u 50 mM Tris-HCl puferu (pH 7.6). 1 mL rastvora enzima dodat je u 5 mL rastvora supstrata i inkubiran 10 minuta na temperaturi od 30°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 mL rastvora trihlorsirćetne kiseline (0.11 M TCA u acetatnom puferu) i inkubiranjem od 20 minuta na istoj temperaturi. Reakciona smeša je proceđena kroz filter papir (Whatman 6). Zatim je u filtratu određena koncentracija tirozina merenjem apsorbance na 280 nm. Na osnovu koncentracije tirozina izračunata je aktivnost β -proteaze. Jedinica enzimske aktivnosti definisana je kao količina enzima koji oslobodi 1 μ g tirozina po minuti.

Ekstrahovanoj β -proteazi određena je aktivnost pre i posle izlaganja ultrazvuku. Poređenjem dobijenih vrednosti određen je uticaj ultrazvuka na aktivnost enzima.

Aktivnost β -proteaze u uzorku neizolovanog enzima je određena na isti način kao što je određivana i u uzorku ekstrahovane β -proteaze (Morihara 1963).

Rezultati i diskusija

Aktivnost izolovane, kao i neizolovane β -proteaze iz ariela je najniža za uzorke enzima koji nisu izlagani dejstvu ultrazvuka. Za svaki sledeći uzorak



Slika 1.
Promena aktivnosti izolovane i neizolovane β -proteaze (ariel)

Figure 1.
Change of activity of isolated (square, full line) and unisolated (circle, dotted line) β -proteases (*Ariel*)

relativna aktivnost enzima se povećava, što se može videti na slici 1.

Sa slike 1 može se uočiti da postoji velika razlika u aktivnosti enzima za uzorak izolovane β -proteaze i β -proteaze u sastavu deterdženta.

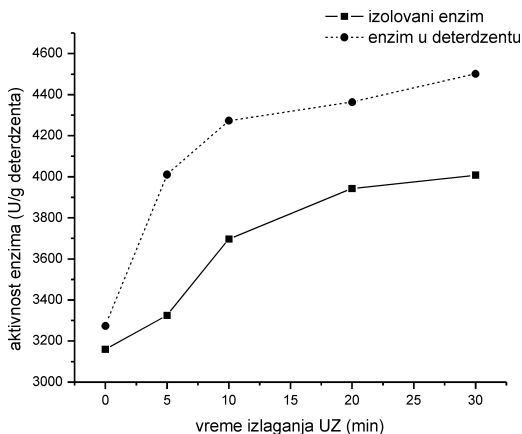
Za uzorke izolovanog i neizolovanog enzima na koje nije delovano ultrazvukom razlika aktivnosti je 1200 U/g deterdženta a za uzorke koji su bili pod uticajem ultrazvuka 30 min ta razlika je 1670 U/g deterdženta.

Razlika aktivnosti za uzorak izolovanog enzima koji nije bio pod dejstvom ultrazvuka i uzorka koji je bio 30 min pod dejstvom ultrazvuka je 350 U/g deterdženta, dok je ta razlika za neizolovani enzim 810 U/g deterdženta.

Promena aktivnosti za izolovani i neizolovani enzim iz bonuxa je slična promeni koja se dešava kod ariela. Naime, najmanju aktivnost imaju uzorci koji nisu izlagani ultrazvuku, a najveću uzorci koji su izlagani ultrazvuku 30 min.

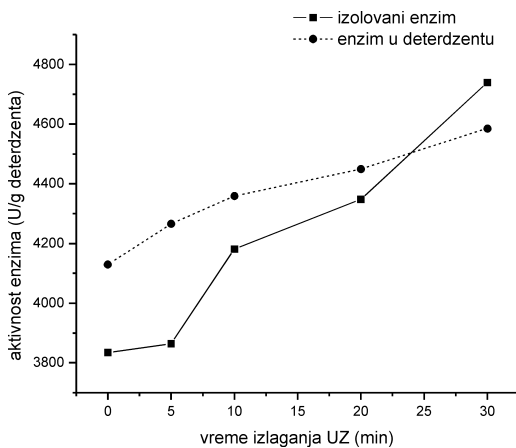
Promena aktivnosti za proteazu koja se nalazi u bonuxu je prikazana na slici 2.

Analizom slike 2 može se primetiti da nema veće razlike u aktivnosti izolovane i neizolovane β -proteaze u uzorcima koji nisu bili pod uticajem ultrazvuka. Razlika u aktivnosti za uzorke izolovanog i neizolovanog enzima koji nisu izlagani ultrazvuku



Slika 2.
Promena aktivnosti izolovane i neizolovane β -proteaze (bonux)

Figure 2.
Change of activity of isolated (square, full line) and unisolated (circle, dotted line) β -proteases (*Bonux*)



Slika 3.
Promena aktivnosti izolovane i neizolovane β -proteaze (merix)

Figure 3.
Change of activity of isolated (square, full line) and unisolated (circle, dotted line) β -proteases (*Merix*)

je 110 U/g deterdženta. Veća razlika u aktivnosti se javlja već pri uticaju ultrazvuka od 5 minuta i ona je 680 U/g deterdženta, što ujedno predstavlja i najveću razliku u aktivnosti izolovane i neizolovane β -proteaze. Razlika u aktivnosti za uzorke izolovanog i

neizolovanog enzima koji su bili pod uticajem ultrazvuka 30 min 490 U/g deterdženta.

Promena aktivnosti kod β -proteaze koja se nalazi u merixu razlikuje se od promena koje su se dešavale kod prethodne dve proteaze. Aktivnost enzima najmanja je za uzorak izolovanog enzima koji nije izlagan ultrazvuku (3830 U/g deterdženta), a najveću aktivnost ima uzorak takođe za uzorak izolovanog enzima (4740 U/g deterdženta).

Povećanje aktivnosti za β -proteazu koja se nalazi u merixu prikazano je na slici 3.

Pre izlaganja ultrazvuku, veća je aktivnost enzima u deterdžentu (neizolovanom) za 290 U/g deterdženta. Već posle 5 min izlaganja enzima ultrazvuku javlja se veća razlika (400 U/g deterdženta), koja se daljim izlaganjem ultrazvuku smanjuje i posle 20 minuta ona je 101.6 U/g deterdženta. Povećanje aktivnosti za uzorak izolovanog enzima koji je pod dejstvom ultrazvuka približno 25 min je veće za razliku od uzorka neizolovanog enzima, tako da u jednom trenutku dolazi do izjednačavanja aktivnosti izolovane i neizolovane β -proteaze. Posle tog izjednačavanja aktivnosti enzima, tj. za uzorke koji su bili pod uticajem ultrazvuka 30 min, veću aktivnost je pokazala izolovana β -proteaza. Razlika u aktivnost za te uzorke je 153.76 U/g deterdženta.

Mogući uzrok zašto dolazi do izjednačavanja aktivnosti izolovanog i neizolovanog enzima je ometanje aktivnosti enzima od strane neke komponente iz deterdženta od koje je ekstrakcijom izolovani enzim odvojen i zbog toga je kod uzorka izolovanog enzima aktivnost veća.

Pre izlaganja ultrazvuku najveću aktivnost za izolovani enzim je pokazala β -proteaza koja je izolovana iz ariela sa 3912.85 U/g deterdženta, sledi aktivnost proteaze izolovane iz merixa (3830 U/g deterdženta), dok je najmanju aktivnost imala proteaza koja se nalazi u bonuxu (3160 U/g deterdženta). Isti redosled aktivnosti β -proteaze pre izlaganja ultrazvuku dobijen je i kod uzoraka kod kojih enzim nije izolovan iz deterdženta.

Kod svih ispitivanih uzoraka (i kod izolovanog i kod neizolovanog enzima), najmanju aktivnost β -proteaza ima kada uzorak nije izlagan uticaju ultrazvuka, a najveću kada je pod uticajem ultrazvuka 30 minuta.

Za uzorak enzima u deterdžentu (neizolovan) enzim promena aktivnosti je najveća kod enzima koji se nalazi u bonuxu i ima vrednost 1230 U/g deterdženta, dok je za uzorak izolovanog enzima najveća razlika je takođe kod enzima iz merixa i ova vrednost iznosi 910 U/g deterdženta. Najmanja promena aktivnosti za neizolovani enzim je izmerena kod β -proteaze koja se nalazi u merixu (460 U/g deterdženta), a za uzorak izolovanog enzima je najmanja kod enzima iz ariela (350 U/g deterdženta).

Zaključak

Analizom svih dobijenih rezultata može se zaključiti da ultrazvuk ima pozitivan uticaj na aktivnost enzima, tj. povećava njihovu aktivnost. Najbolji uticaj ultrazvuka na izolovane enzime zapažen je kod β -proteaze iz bonuxa, zatim sledi proteaza iz merixa i na kraju proteaza iz ariela. Kod neizolovanog enzima najbolji uticaj ultrazvuka na enzimsku aktivnost nalazimo u uzorku bonuxa, zatim ariela i na kraju merixa. Bez obzira na promenu aktivnosti pod dejstvom ultrazvuka, najveću aktivnost pokazuje uzorak neizolovane β -proteaze iz ariela.

Na osnovu ovih činjenica može se zaključiti da se korišćenjem ariela (*mountain spring*) u već mašinama sa sistemom ultrazvučnog pranja postižu najverovatnije najbolji rezultati u otklanjanju fleka proteinskog porekla, zatim sledi merix gorska svežina, i na kraju bonux (*natura energy aloe vera & jasmine*). Takođe je dokazano da se prilikom korišćenja ispitivanih deterdženata bolji efekat uklanjanja mrlja postiže u mašinama sa ultrazvukom nego ako koristimo deterdžent u mašinama koje nemaju ultrazvuk.

Literatura

Vollhardt P. C., Schore N. E. 2004. *Organska hemija*. Beograd: Data Status

Morihara K. 1963. Pseudomonas aeruginosa proteinase I. Purification and general properties. *Biochem Biophys Acta*, **73**: 113.

Influence of Ultrasound on the Activity of β -proteases Isolated from Detergents

In this paper the influence of ultrasound on the activities of β -proteases found in detergents was examined. The frequency of the used ultrasound was 43 kHz, which approximately suits to the ultrasound frequency in washing machines with an ultrasound washing system (40 kHz). The detergents which were used are *Ariel* (mountain spring), *Bonux* (Natura Energy aloe vera & jasmine) and *Merix* (mountain fresh). The influence of ultrasound on the enzyme isolated from the detergent was examined, as well as the influence on the enzyme which is a component of the detergent (unisolated enzyme). The samples of isolated and unisolated enzymes were exposed to ultrasound in periods of 5, 10, 20 and 30 minutes. In the case of the isolated enzyme,

ultrasound has the greatest influence on β -proteases from *Merix*, while in the unisolated enzyme the greatest influence is on β -proteases from *Bonux*. However, the greatest activity of β -proteases is in *Ariel*, in the sample of unisolated enzyme. The reason for the greatest activity of β -proteases in *Ariel*, although ultrasound does not have the strongest influence on this enzyme, is that β -proteases which is found in *Ariel* has a stronger activity in comparison with β -proteases found in *Bonux* and *Merix*. Under the influence of ultrasound the activity increases in all enzymes. This research has shown that the best effect of removing stains of protein origin will be achieved by using *Ariel* (mountain spring) in washing machines with an ultrasound washing system, then by *Merix* (mountain fresh), and finally by *Bonux* (Natura Energy aloe vera & jasmine). It was also proven that by using the examined detergents there is a better effect of removing stains in washing machines with ultrasound than by using the detergent in washing machines without ultrasound.

