

»Mladi za napredek Maribora«

30. srečanje

VPLIV DETERGENTOV NA MEMBRANO CELIC GOMOLJA

RDEČE PESE (*Beta vulgaris*)

Raziskovalno področje BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

05q | K O Š Ò P V Q Z Ő Ő Ü ¥ U X P S

T ^ } q | K P Ő Š Ò P Z Š U P R O S

¥ [| K Ü X Z Ő Q P Z R O Á T Ő Ő Ő Ü

Februar, 2013

»Mladi za napredek Maribora 2013«

30. srečanje

VPLIV DETERGENTOV NA MEMBRANO CELIC GOMOLJA

RDEČE PESE (*Beta vulgaris*)

Raziskovalno področje BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Februar, 2013

KAZALO VSEBINE

Zahvala	7
1 UVOD	8
1.1 Objekt proučevanja	8
1.1.1 Betaciani	9
1.2 Celična membrana.....	11
1.2.1 Fosfolipidi in sfingolipidi.....	12
1.2.2 Glikolipidi	13
1.2.3 Holesterol	13
1.2.4 Membranski proteini	15
1.2.5 Glikoproteini	16
1.2.6 Fluidnost celične membrane.....	16
1.3 Detergenti in mila.....	17
1.3.1. Površinsko aktivne snovi (surfaktanti).....	17
1.3.2 Nastanek mila.....	19
1.4 Vpliv detergentov na celične membrane.....	20
1.4.1 Vpliv detergentov na tonoplast celic gomolja rdeče pese (<i>Beta vulgaris</i>).....	21
1.5 Namen raziskave	22
1.6 Cilji raziskave.....	22
1.7 Delovne Hipoteze	22
2 METODE	23
2.1 Material in pripomočki.....	23
2.2 Postopek izvedbe eksperimenta	25
3 REZULTATI.....	27
3.1 Obdelava rezultatov.....	27
3.2 Rezultati	27
3.2.1 Meritve z vodo	27
3.2.2 Meritve z metanolom	28
3.2.3 Meritve z ekološkim detergentom 1	29
3.2.4 Meritve z ekološkim detergentom 2.....	31
3.2.5 Meritve z navadnim detergentom 1.....	33

3.2.6 Meritve z navadnim detergentom 2.....	35
3.2.7 Primerjalni grafični prikaz rezultatov z vodo, metanolom in detergenti.....	37
3.2.8 Rezultati meritev pH vrednosti	37
3.2.9 Grafični prikaz rezultatov meritev pH vrednosti.....	38
4 DISKUSIJA.....	38
Pregled hipotez.....	40
Sklepi.....	41
5 LITERATURA.....	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Frakcija izoliranih vakuol z barvilom celic korenine rdeče pese (Beta vulgaris)..	8
Slika 2: Zgradba glavnih barvil celic rdeče pese (Beta vulgaris).....	10
Slika 3: Modelni prikaz zgradbe celične membrane.....	11
Slika 4: Zgradba molekule fosfatidilholina.....	12
Slika 5: Kemijska zgradba molekule holesterola	13
Slika 6: Fosfolipidni dvosloj.....	14
Slika 7: Liposom – vzdolžni prerez.....	14
Slika 8: Vrste beljakovin v celični membrani.....	15
Slika 9: Gibanje fosfolipidov v celični membrani.....	16
Slika 10: Prikaz monomera detergenta.....	17
Slika 11: Vodotopni micelij.....	18
Slika 12: Saponifikacija - nastanek mila.....	19
Slika 13: Lipidni raft.....	21
Slika 14: Uporabljen Vernierjev vmesnik in kolorimeter.....	24
Slika 15: Postopek dodajanja vzorcev obarvane raztopine detergenta v kivete.....	26

KAZALO TABEL

Tabela 1: Sestavine v uporabljenih ekoloških detergentih.....	23
Tabela 2: Sestavine v uporabljenih navadnih detergentih.....	24
Tabela 3: Priprava vzorcev raztopin.....	25
Tabela 4: Rezultati meritev z vodo.....	27
Tabela 5: Rezultati meritev z metanolom.....	28
Tabela 6: Rezultati meritev s prvim ekološkim detergentom pri koncentraciji 1:1.....	29
Tabela 7: Rezultati meritev s prvim ekološkim detergentom pri koncentraciji 1:100.....	30
Tabela 8: Rezultati meritev z drugim ekološkim detergentom pri koncentraciji 1:1.....	31
Tabela 9: Rezultati meritev z drugim ekološkim detergentom pri koncentraciji 1:100.....	32
Tabela 10: Rezultati meritev s prvim navadnim detergentom pri koncentraciji 1:1.....	33
Tabela 11: Rezultati meritev s prvim navadnim detergentom pri koncentraciji 1:100.....	34
Tabela 12: Rezultati meritev z drugim navadnim detergentom pri koncentraciji 1:1.....	35
Tabela 13: Rezultati meritev z drugim navadnim detergentom pri koncentraciji 1:1.....	36
Tabela 14: pH vrednosti uporabljenih raztopin detergenta.....	37

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Primerjava rezultatov z vodo,metanolom in detergenti.....	37
Graf 2: pH vrednosti.....	38

POVZETEK

V raziskovalni nalogi sem primerjala učinek ekoloških in navadnih detergentov na celične membrane. Celične membrane so zgrajene iz fosfolipidnega dvosloja in beljakovin. Detergenti so snovi, ki raztapljajo lipide, celična membrana se zato v stiku z njimi poškoduje. Predvidevala sem, da različne vrste detergentov različno učinkujejo na biološke membrane, kar se odraža v tem kako močno so le-te poškodovane. Predmet na katerem sem opazovala učinek, so bile celice gomolja rdeče pese (*Beta vulgaris*), ki v vakuolah vsebujejo barvilo. Uporabila sem raztopine ekoloških in navadnih detergentov za različne namene pri različnih koncentracijah. Vpliv detergentov sem opazovala na podlagi tega, koliko pigmenta je izteklo v okolico. Intenziteto obarvanja sem izmerila s kolorimetrom. Rezultati so pokazali, da imajo ekološki detergenti bolj blagi vpliv na celične membrane kot navadni, zato mislim, da so primernejši za vsakdanjo rabo. Hkrati so tudi prijaznejši do okolja. Odprto ostaja vprašanje njihove čistilne zmogljivosti.

Zahvala

Zahvaljujem se obema mentorjema. Mentorici za pomoč pri izbiri teme raziskovalne naloge, pomoč in pregled zapisanega ter za odgovore na vsa vprašanja, ki so se mi porodila ob pisanju. Hvala tudi za vodenje in nasvete ter posredovane strokovne članke, ki so mi pri nalogi še kako prav prišli. Mentorju bi se zahvalila za pomoč pri delu v laboratoriju. Hvala za opombe in nasvete pri raziskovanju ter za vso pomoč pri uporabi merilnih aparatov.

Hvala tudi staršem za potrpežljivo čakanje, ko sem opravljala poskuse, ter hvala za razumevanje in podporo v času izdelave naloge.

Hvala za razumevanje tudi vsem ostalim, za katere v času pisanja naloge nisem imela dovolj časa, da bi se vam posvetila.

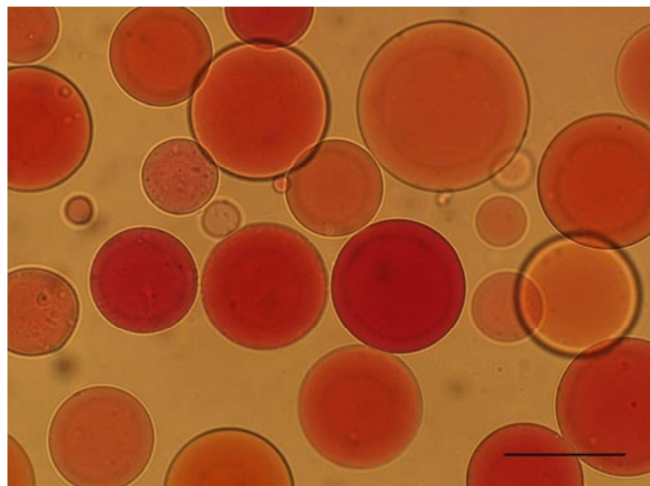
1 UVOD

Detergenti so splošno poznani kot snovi, ki odstranjujejo madeže iz najrazličnejših površin. Med detergenti, ki se pojavljajo na tržišču, je pogosto težko izbrati takšnega, ki bo zadostil našim zahtevam. Izbiramo lahko med različnimi vrstami detergentov z različno sestavo in za različne namene uporabe. Na tržišču so vedno bolj prisotni tudi ekološki detergenti. Z raziskovanjem želim odgovoriti na naslednja vprašanja:

- Kakšne so prednosti ekoloških detergentov pred običajnimi?
- Kakšen je vpliv detergentov na žive celice?
- Ali detergenti očistijo samo površino celic, ali vplivajo tudi globlje?
- Ali različni detergenti različno vplivajo na celice?

1.1 Objekt proučevanja

Objekt proučevanja v raziskovalni nalogi so celice rdeče pese (*Beta vulgaris*). Celice vsebujejo vakuolo, obdano s tonoplastom. V njej se nahaja voda in vodotopno rdeče-vijolično barvilo iz skupine barvil betaciani.

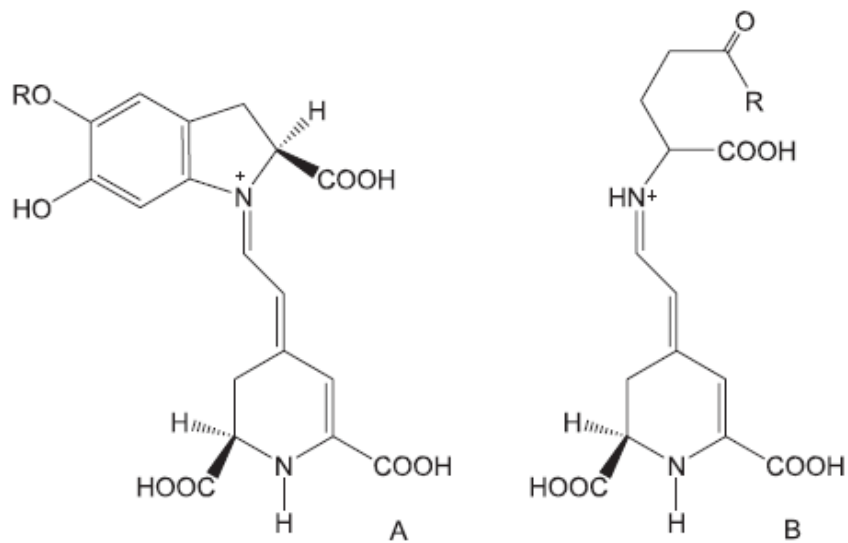


Slika 1: Frakcija izoliranih vakuol z barvilom celic korenine rdeče pese (*Beta vulgaris*)
(Ozolina, N. V. et al., 2012)

1.1.1 Betaciani

Rastlinska barvila glede na njihove lastnosti in zgradbo delimo v štiri večje skupine: antocianini, betalaini, kartenoidi in klorofili. Kopičijo se predvsem v vakuoli in plastidih, pri čemer je za vsako barvilo značilen eden izmed teh organelov. Pri večini rastlinskih vrst so rdeča barvila antocianini, samo rdeča pesa in nekaj drugih vrst (nekatero glive in kaktusi), pa namesto tega proizvajajo betacianine (Vilhar, 2005). V vakuolah celic gomolja rdeče pese (*Beta vulgaris*) je vodotopno rdeče barvilo betacianin, ki rastlini daje značilno barvo. Barvilo se nahaja v vakuolah zdravih celic, ob poškodovanju membrane se razlije v okolje.

Betalaini so aromatski derivati indola (Suganyadevi et al., 2010). Sestavljajo jih rdeče-vijolični betacianini in rumeni betaksantini. Kombinacija teh dveh barvil da še druge barve, kot rdeča in oranžna. Betacianine uporabljajo v prehranski industriji zaradi njihove obarvanosti in stabilnosti (Akita et al., 2001). Najpogostejši betalain je betanin, ki ima v človeškem telesu pozitiven učinek. Dokazano je bilo, da lipoproteini, ki so obogateni z betalaini v telesu povečajo odpornost proti oksidaciji, ki sicer lahko povzroči mnoge bolezni. Betalain ima vlogo tudi pri preprečevanju pljučnega in kožnega raka. Naravna barvila zmanjšujejo rast celic pri tumorjih (Suganyadevi et al., 2010). Poleg tega, da so betalaini varni in naravni, so njihove prednosti tudi topnost v vodi, primerna barva in stabilnost. Odtенок je odvisen od razmerja med betacianini in betaksantini, pri čemer so betacianini stabilnejši in zato primernejši za predelavo. Rastlina, ki se množično uporablja za njihovo pridobivanje, je rdeča pesa (*Beta vulgaris*). Prednosti proizvodnje so neodvisnost od letnih časov in enostavno pridobivanje (Akita et al., 2000). Za pridobivanje barvila iz celice, mora biti membrana celice poškodovana. To lahko povzroči ekstremno visoka ali nizka temperatura, detergenti in različna topila. Visoka temperatura deluje na celice tako, da jim dovaja energijo. Zaradi dodane energije se celice začnejo hitreje gibati in tresti, kar povzroči razdor membran, ki zaradi visoke temperature postanejo tudi bolj tekoče in zato še bolj krhke. Tudi beljakovine, ki sestavljajo velik del celične membrane, se zaradi tresenja in temperature spremenijo svojo strukturo in se razgradijo. S tem v membrani nastanejo luknje, skozi katere lahko izteče pigment. Do razdora vezi med fosfolipidi in razgradnje beljakovin pride tudi zaradi vpliva organskih topil.



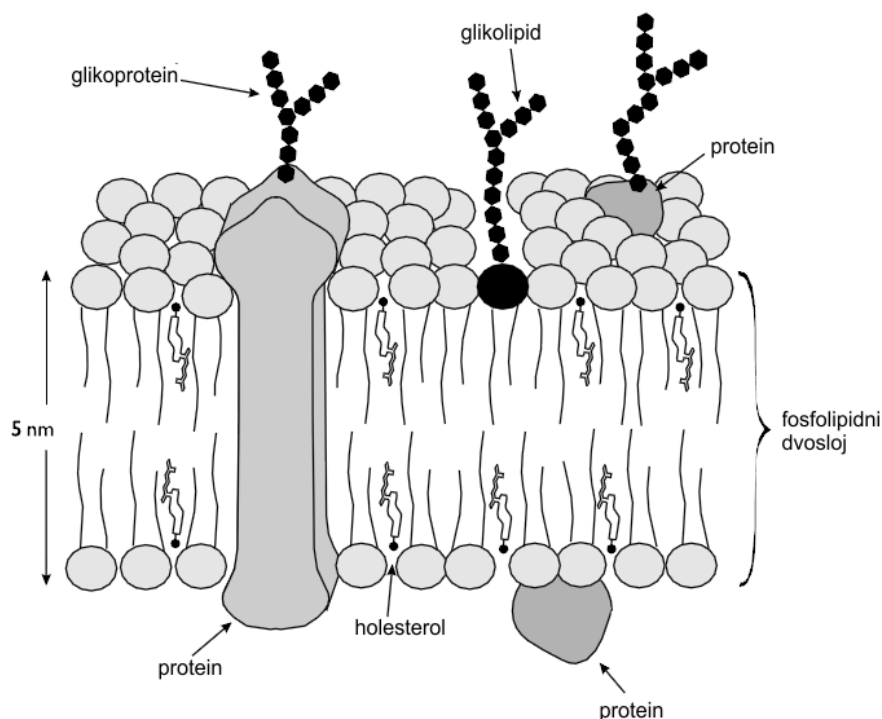
R = H (betanidin) R = NH₂ (vulgaksantin I)
 R = glukozil (betanin) R = OH (vulgaksantin II)
 Abs = 540 nm (vijolično) Abs = 480 nm (rumeno)

Slika 2: Zgradba glavnih barvil celic rdeče pese (*Beta vulgaris*); A: betacianini in B: betaksantini. (Bonacin, J. A. et al., 2009)

Akita et al. (2001) so z raziskavami proučevali razmere v okolju, ki vplivajo na povečanje produkcije betacianina pri rdeči pesi (*Beta vulgaris*). Ugotovili so, da mora hranilo vsebovati minimalno količino dušika, razmerje med amonijakom in nitrati mora biti prilagojeno, pri čemer močno prevladujejo nitrati, potreben je tudi dodatek železa. Ob prisotnosti cinka se proizvodnja betacianina poveča samo ko je prisotno tudi železo. Vpliv železa na rast celic pa je enak z ali brez cinka. Pomemben je tudi vpliv drugih mikroelementov. Vsebnost barvila se zmanjša ob odstranitvi bora, joda, mangana ali molibdena. Ti elementi so ključni za povečanje vsebnosti barvila, medtem, ko baker in kobalt na to ne vplivata, zato sta nepotrebna. S temi pogoji je bila v raziskavi dosežena najvišja vsebnost betacianina doslej, to je 40 mg/L (Akita et al., 2001).

1.2 Celična membrana

Celična membrana je struktura, ki omejuje celice in določene predele v celici (celične organele) od njihovega zunanjskega okolja (Brown, B.S., 1996). Uravnava prehajanje snovi in je selektivno prepustna, kar omogoča, da nekatere snovi prehajajo skozi lažje kot druge (Brown, 1996; Alberts et al., 2002, Reece et al. 2010, Toman et al., 2012). Regulira tudi pretok informacij med celicami s prepoznavanjem signalnih molekul drugih celic, oziroma s pošiljanjem kemičnih ali električnih signalov drugim celicam (Brown, 1996; Kreft et al., 2011). Beljakovinske molekule v membrani delujejo kot kanali za sprejem in izločanje snovi ali kot senzorji za zaznavanje sprememb v okolju in prilagajanje nanje (Toman et al., 2012). Biološke membrane v celicah opravljajo različne naloge, a jim je skupna osnovna zgradba (Alberts, 2012). Zgrajene so iz treh osnovnih komponent: lipidov, beljakovin in ogljikovih hidratov (Brown, 1996). Lipidne molekule tvorijo dvosloj, v katerem se nahajajo posamezne beljakovine. Lipidne in beljakovinske molekule so povezane večinoma z nekovalentnimi kemijskimi vezmi (Brown, 1996, Reece et al., 2010, Kreft et al., 2011, Alberts et al., 2012, Toman et al., 2012). Ogljikovi hidrati so s kovalentnimi vezmi vezani na beljakovinske ali lipidne molekule. Nahajajo se samo na eni strani membrane, npr. pri plazmalemi na zunanji strani membrane (Brown, 1996).

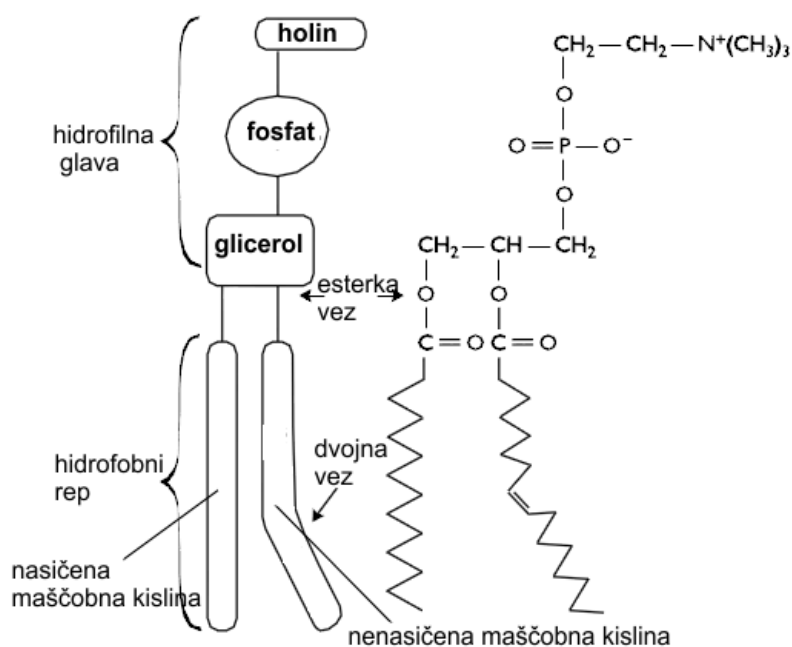


Slika 3: Modelni prikaz zgradbe celične membrane (Brown, 1996)

Celična membrana je tekoča, dinamična struktura. Beljakovine se v fosfolipidnem dvosloju gibljejo (Brown, 1996, Reece et al., 2010, Alberts et al., 2012). V bioloških membranah so prisotne tri glavne vrste lipidov: fosfolipidi, glikolipidi in holesterol (Kornhauser, 1986; Brown, 1996; Kreft et al., 2011).

1.2.1 Fosfolipidi in sfingolipidi

Fosfolipidi so zgrajeni iz glicerola, ki je vezan z dvema molekulama maščobnih kislin, fosfatno molekulo in holinom (Brown, 1996, Reece et al., 2010, Alberts et al., 2012). Molekule maščobnih kislin vsebujejo najpogosteje od 14 do 24 ogljikovih atomov. Ena je pogosto nenasičena in vsebuje 1 do 4 cis dvojne vezi. Fosfolipidi, ki vsebujejo glicerol, se imenujejo glicerofosfolipidi. Na fosfatno skupino so lahko vezani holin, serin ali etanolamin. Druga vrsta fosfolipidov so sfingolipidi, ki vsebujejo sfingozin namesto glicerola. (Brown, 1996)



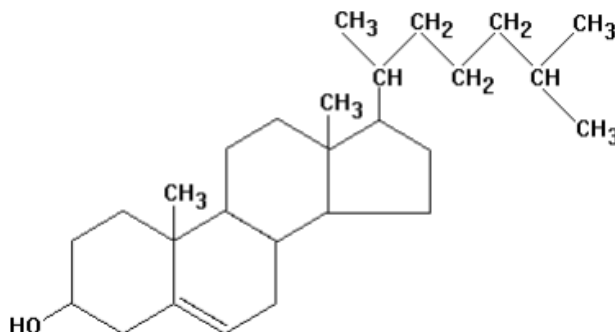
Slika 4: Zgradba molekule fosfatidilholina (Brown, 1996)

1.2.2 Glikolipidi

Glikolipidi vsebujejo podobno kot fosfolipidi glicerol ali sfingozin, vezan na molekule maščobnih kislin, a imajo namesto fosfatne skupine vezan ogljikov hidrat (glukozo ali galaktozo). Glikolipidi v živalskih celičnih membranah pogosto vsebujejo sfingozin, tisti, v celičnih membranah bakterijskih in rastlinskih celic pa glicerol. Glikolipidi se vedno nahajajo na zunanji strani celične membrane (Brown, 1996).

1.2.3 Holesterol

Tretja vrsta membranskega lipida je holesterol, ki se gradbeno zelo razlikuje od fosfolipidov in glikolipidov. Molekula je zgrajena iz štirih obročev ogljikovih atomov, kratke stranske verige ogljikovodikov in hidroksilne skupine.

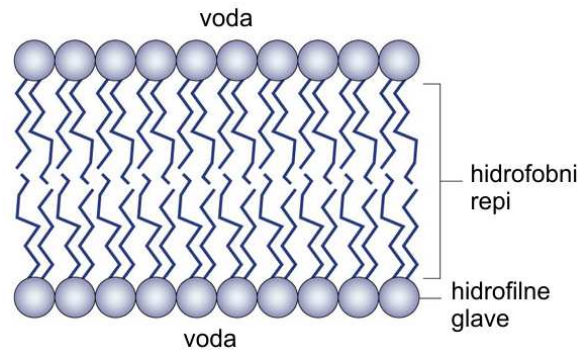


Slika 5: Kemijska zgradba molekule holesterola

(Vir: http://www.raw-milk-facts.com/cholesterol_primer_T3.html)

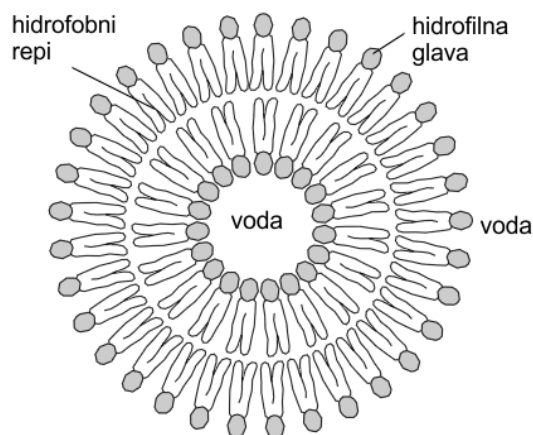
Holesterol se nahaja v membranah živalskih celic in membranah bakterij mikroplazem (Kreft et al., 2011).

Osnovna lastnost membranskih lipidov je amfipatičnost, kar pomeni da imajo hidrofilno (polarno) in hidrofobno (nepolarno) regijo. Fosfolipidi in glikolipidi imajo hidrofilne glave in hidrofobne repe. Obdane z vodo spontano tvorijo dvosloj, v katerem so v notranjosti hidrofobni repi, zunaj pa hidrofilne glave (slika 4).



Slika 6: Fosfolipidni dvosloj (Vir: internetni vir)

Hidrofilni repi se orientirajo stran od vode. Fosfolipidni dvosloji se tako na koncih povežejo in tvorijo liposome. Tudi liposomi so amfipatični, glede na hidrofobne obroč in stransko verigo ogljikovodikov ter hidrofilno hidroksilno skupino (Alberts et al, 2002).

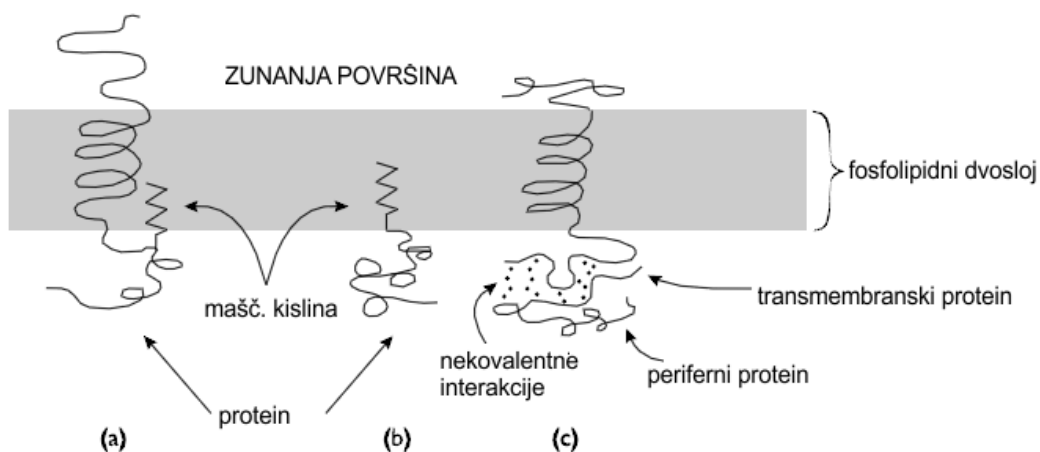


Slika 7: Liposom – vzdolžni prerez (Brown, 1996)

1.2.4 Membranski proteini

Proteini v membranah imajo številne pomembne funkcije. Njihova količina in vrsta sta različni. Bolj aktivno kot membrana sodeluje v presnovi, več proteinov vsebuje. Proteini so na različne načine povezani s fosfolipidnim dvoslojem. **Integralni proteini** so s kovalentnimi vezmi vezani na maščobne kisline ali fosfolipide znotraj membrane. So močno zasidrani v membrano, od nje se odcepijo le v primeru, ko se poruši lipidni dvosloj (delovanje detergentov ali organskih topil). **Transmembranski proteini** prehajajo skozi celotni lipidni dvosloj in imajo hidrofobni del (α -helix), ki se nahaja znotraj fosfolipidnega dvosloja in je povezan s hidrofobnimi repi fosfolipidov. Hidrofilna dela teh proteinov segata v okolico na obeh straneh membrane. Nekateri transmembranski proteini so lahko kovalentno povezani z verigami maščobnih kislin v dvosloju.

Periferni proteini so šibko vezani na površino fosfolipidnega dvosloja z nekovalentnimi interakcijami z drugimi proteini. Z membrane se odcepijo pri spremembi pH ali koncentracije okolja, pri čemer ostane membrana nespremenjena.



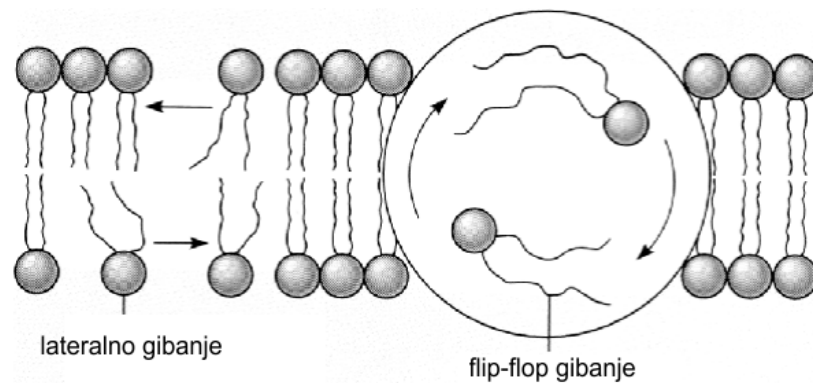
Slika 8: Vrste beljakovin v celični membrani; a) transmembranski protein, pritrjen na fosfolipidni dvosloj z maščobnokislinsko verigo; b) integralni protein, pritrjen z maščobnokislinsko verigo; c) periferni protein, pritrjen na transmembranski protein. (Brown, 1996)

1.2.5 Glikoproteini

Veliko membranskih proteinov ima na delu, ki izhaja iz celične membrane na površino kovalentno vezane sladkorje. Ti so lahko vezani na $-\text{CONH}_2$ stransko skupino aminokislina aspargin, ali na $-\text{OH}$ stransko skupino aminokislina serin ali treonin (Brown, 1996).

1.2.6 Fluidnost celične membrane

Celična membrana je dinamična struktura, membranski proteini in fosfolipidi v njej se gibljejo. Fosfolipidi se zelo hitro premikajo v lateralni smeri z difuzijo. Posamezne molekule fosfolipidov tudi rotirajo okrog svoje osi. Fleksibilni fosfolipidni repi se gibljejo še z valovanjem. Proteini se gibljejo različno hitro. So večji in se večinoma gibljejo počasneje kot fosfolipidi. Fosfolipidi redko prehajajo iz enega sloja membrane v drugega (transverzalna difuzija ali flip-flop), ker mora polarna fosfolipidna glava preiti skozi hidrofobni (nepolarni) del dvosloja. Pogosto se dogaja transverzalna difuzija določenih fosfolipidov le v membranah endoplazmatskega retikla, s pomočjo lipidov, imenovanih fosfolipidni translokatorji. Pri proteinih takšno transverzalno gibanje v fosfolipidnem dvosloju ni poznano (Brown, 1996; Reece et al., 2010).



Slika 9: Gibanje fosfolipidov v celični membrani

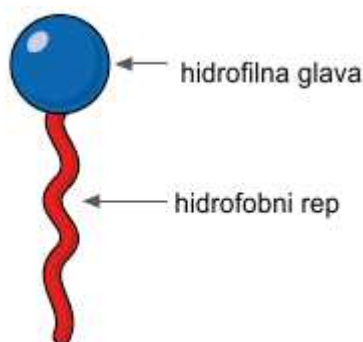
(Internetni vir: <http://course1.winona.edu/sberg/ILLUST/flipflop.GIF>)

Na fluidnost celične membrane vplivajo temperatura, maščobno kislinska zgradba (Alberts et al., 2012) in vsebnost holesterola (Brown, 1996). Pri nizkih temperaturah so repki fosfolipidnih molekul bolj tesno skupaj in tvorijo urejeno strukturo, ki je manj tekoča. Fluidnost se povečuje s povečanjem temperature, ko fosfolipidne molekule hitreje vibrirajo in tvorijo neurejeno strukturo. Fluidnost je odvisna tudi od zgradbe maščobnih kislin, ki tvorijo fosfolipidne repe. Večja je fluidnost, če so verige maščobnih kislin krajše in vsebujejo dvojne vezi. Vsebnost holesterola v membrani zmanjšuje njeno fluidnost (Brown, 1996; Reece et al., 2010).

1.3 Detergenti in mila

1.3.1. Površinsko aktivne snovi (surfaktanti)

Mila in detergenti vsebujejo surfaktant (površinsko aktivna snov), kot svojo aktivno sestavino. Površinsko aktivne snovi prvenstveno vplivajo na lastnosti površin, predvsem površin tekočin. Zanje je značilno, da se močno adsorbirajo na vmesnih površinah in znižujejo površinsko napetost. Po navadi je to ali med trdnim in tekočim, pri tem nastane suspenzija, nadalje med dvema tekočinama, kar tvori emulzijo, ter med tekočino in zrakom, zaradi česar nastane pena. Surfaktanti so molekule, ki so sestavljene iz polarnih in nepolarnih delov. V večini primerov so na dolge, nepolarne hidrofobne skupine ali »repe«, pritrjene polarne skupine ali »glave« (Vir: EMD Biosciences).

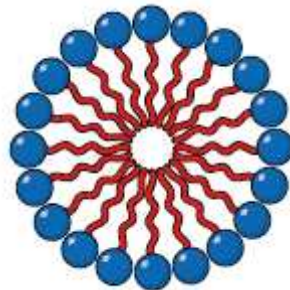


Slika 10: Prikaz monomera detergenta (Internetni vir:

http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/detergents/ANATRACE_DetergentsUse.pdf)

Glede na zgradbo polarne glave, jih razdelimo med ionske (anionske, kationske, amfoterične) in neionske. Njihova zgradba omogoča zmanjšanje površinske napetosti tekočine, lažjo disperzijo, omočenje ali mešanje različnih tekočin. Topni so v polarnih in nepolarnih topilih, a je njihova topnost omejena.

Kadar koncentracija surfaktanta pri določenih pogojih preseže neko določeno vrednost, se začnejo tvoriti organizirane, sferične strukture, imenovane miceliji. Ta koncentracija se imenuje kritična micelna koncentracija (CMC) - koncentracija surfaktanta, pri kateri se spontano tvorijo miceliji (Vir: Antrance).



Slika 11: Vodotopni micelij

(Internetni vir:

http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/detergents/ANATRACE_DetergentsUse.pdf)

Najpogosteje uporabljene površinsko aktivne snovi so:

- Natrijev dodecil sulfat (SDS)
- Natrijev teradecil sulfat (STS)
- Cetil-trimetil-amonijev bromid (CTAB)
- Žolčne kisline: holna kislina, deoksi holna kislina

Anionsko površinsko aktivne snovi (SDS)

V vodi disociirajo na amfifilni anion in kation, ki je običajno predstavnik alkalijskih kovin (Na^+ in K^+). Uporabljajo se kot mila, čistilna sredstva in detergenti, topila za trdne snovi in emulzifikatorji.

Kationsko površinsko aktivne snovi (CTAB)

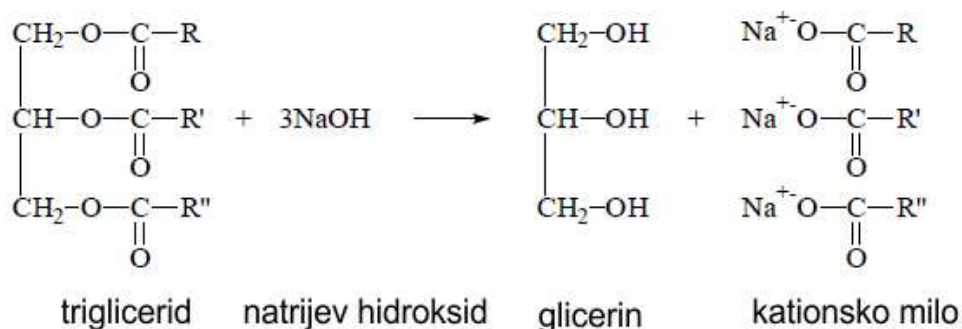
V vodi disociirajo na amfilni kation in anion, ki je najpogosteje halogen. Osnova teh molekul je kationski naboj na kvartarnem N atomu. Najpogostejše so kvartarne amonijeve spojine z eno ali več verigami alkilnega tipa. So dobri inhibitorji korozijskih procesov.

Neionizirano površinsko aktivne snovi

Ne ionizirajo v vodnih raztopinah, zaradi neionizirajoče hidrofilne skupine, ki je običajno alkohol, fenol, eter, ester ali amid. Večji del takšnega surfaktanta deluje hidrofilno, zaradi prisotne polietilen glikolne verige, dobljene z polikondenzacijo etilen oksida. Uporabljajo se kot stabilizatorji, dispergant, detergenti in emulzifikatorji.

1.3.2 Nastanek mila

Milo nastane pri reakciji saponifikacije:



Slika 12: Saponifikacija - nastanek mila

(<http://nzic.org.nz/ChemProcesses/detergents/11A.pdf>)

Najpogosteje uporabljene maščobe in olja so loj (goveji ali ovčji), kokosovo olje in palmovo olje (Kornhauser, 1986). Čisto milo je trdno in zlahka oksidira, zato jim dodajajo številne aditive, npr. glicerin.

Detergenti se od mila razlikujejo v tem, da imajo polarno glavo, ki jo tvori sulfat, žveplena kislina ali polieter.

Sulfat: $R - O - SO_3^- Na^+$

Žveplena kislina: $R - Ar - SO_3^- Na^+$

Polieter: $R - (O - CH_2CH_2)_n - OH$

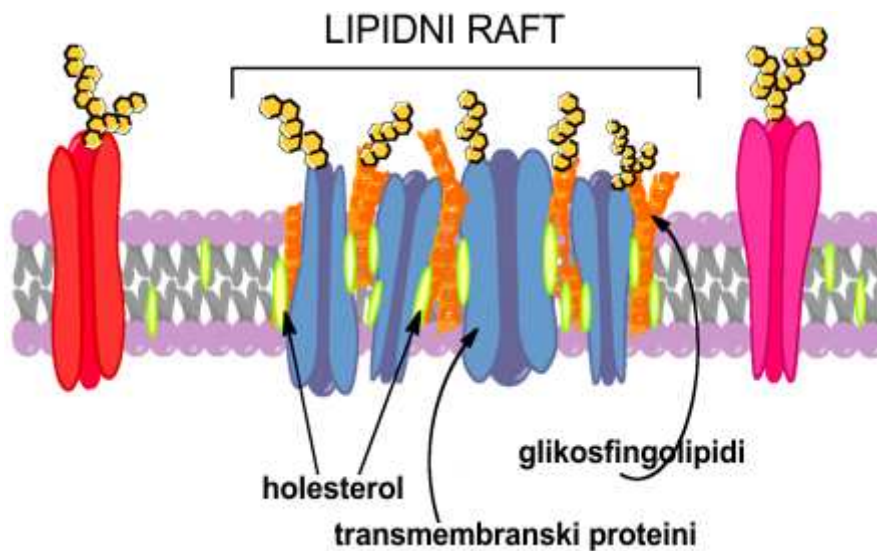
Zaradi drugačne polarne glave detergenti ne tvorijo v trdi vodi netopnih oborin, zato je učinkovitost čiščenja večja. Nekatera čistilna sredstva vsebujejo le 10-25% detergenta, ostalo so belila, barvila in drugi dodatki (Eaton, 1989). Od fosfolipidov se detergenti razlikujejo tudi v tem, da imajo le en hidrofobni rep. Zaradi takšne oblike se v vodi ne oblikujejo v dvosloj, kot fosfolipidi. Ob stiku detergenta z membrano se hidrofobni deli detergenta povežejo s hidrofobnimi deli fosfolipidov, tako celična membrana razpade (Alberts, 2004).

1.4 Vpliv detergentov na celične membrane

Detergenti so snovi, ki raztapljajo lipide v vodi. Zaradi polarne in nepolarne glave, se lahko en del veže na lipid, drugi pa se veže z vodo in tako loči med seboj povezane lipide.

Raztapljanje membran pod vplivom detergenta poteka v več fazah. Pri nižjih koncentracijah se detergenti združijo z membrano z vrivanjem v dvosloj. Pri povišanju koncentracije, ko je dvosloj že prepojen z detergentom, membrana razpade in z molekulami detergenta tvori različne micelije. Na koncu se tvorijo tri vrste micelijev: prve sestavljajo molekule lipidov in detergenta, v drugih so molekule beljakovin, ki so obdane z molekulami detergenta (vsaka beljakovinska molekula v svojem miceliju), tretje pa sestavljajo preostale molekule detergenta (vir: Bhairi, S. in Mohan, C.).

Nekateri deli celičnih membran so dokazano odporni na raztapljanje z detergenti. Imenujejo se membrane, odporne na detergente ali »detergent – resistant membranes« (krajshe »DRMs«). DMRs v membrani, se razlikujejo od njenih ostalih delov po kemijski zgradbi in številnih pomembnih funkcijah pri endocitozi, apoptozi, celični adheziji, celičnem signaliziranju, idr. Vsebujejo specializirane mikrodomene, kjer so lipidi tesneje povezani. Njihova značilnost so tudi posebne interakcije lipidov s proteini. Takšni predeli so tudi tako imenovani »lipidni rafti«, ki vsebujejo holesterol, sfingolipide in različne vrste proteinov (Schuck et al., 2003; Hrovat, A., 2009). Takšne membranske mikrodomene so dokazano netopne v neionskih detergentih (npr. Triton 100) pri nizkih temperaturah.



Slika 13: Lipidni raft (Internetni vir: http://en.wikibooks.org/wiki/File:Lipid_Raft*.png)

1.4.1 Vpliv detergentov na tonoplast celic gomolja rdeče pese (*Beta vulgaris*)

Tonoplast celic rdeče pese vsebuje mikrodomene (lipidne rafte), ki so odporne na detergente. Te so dokazane, če so netopne v neionskih detergentih pri nizki temperaturi. Ti skupki odpornih lipidov (lipidni rafti) so sestavljeni iz sfingolipidov, prostih (nezaestrenih) sterolov in nasičenih maščobnih kislin, fosfolipidov pa je tukaj zelo malo. Tudi za te odporne dele membrane je značilna večja gostota in visoka raven urejenosti lipidov. Od preostalih delov membran se razlikujejo v kemijski zgradbi. Opravljajo številne življenjsko pomembne funkcije v celici. DMRs tonoplasta rdeče pese ima podobne lastnosti kot druge biološke membrane, predvsem v zgradbi. Ena izmed posebnosti DMRs tonoplasta je, da steroli niso zaestreni oz. ne vsebujejo vezane nobene druge skupine. Prav tako v rdeči pesi ni večjega presežka določenih lipidov, kot je bilo to ugotovljeno pri drugih rastlinskih vrstah. Odporni deli tonoplasta so gostejši od ostalih delov tonoplasta in tudi od odpornih delov celične membrane. Te mikrodomene tonoplasta, sestavljene iz lipidov in beljakovin, so posebna vrsta odpornih membran, ki jih vsebuje samo tonoplast.

Teh zaključkov ne moremo posplošiti na vse rastlinske vrste, saj se različni tipi membran med seboj razlikujejo (Ozolina et al., 2012).

1.5 Namen raziskave

Celične membrane so zgrajene iz različnih lipidov, med katerimi prevladujejo fosfolipidi. Detergenti se vežejo na lipide in jih raztapljajo v vodi, pri čemer poškodujejo celično membrano. Pri poškodovanju celične membrane in tonoplasta celic *Beta vulgaris*, barvilo izteče iz celice in obarva okolje. Intenzivnost obarvanja je odvisna od stopnje poškodovanosti celične membrane. Na ta način bom preizkušala vpliv različnih detergentov in skušala poiskati razlike v vplivu med ekološkimi in navadnimi detergenti. Celice gomolja rdeče pese bom izpostavljala naslednjim okoliščinam:

- različne vrste detergentov,
- različne koncentracije detergentov.

Z rezultati želim ljudem pomagati pri izbiri detergenta, ki je zdravju prijaznejši in v naravi, ob morebitnem iztekanju, ne povzroča ekološke škode.

1.6 Cilji raziskave

Z raziskovalno nalogo želim:

- Poglobiti svoje znanje o detergentih;
- Poglobiti znanje o celičnih strukturah in naravnih barvilih;
- Izvedeti kako detergenti vplivajo na celične membrane;
- S poskusi ugotoviti razlike med detergenti in na podlagi tega utemeljiti najboljšo izbiro detergenta.

1.7 Delovne Hipoteze

Predvidevam, da bom z izbrano metodo dela ugotovila:

- Da detergenti različno močno poškodujejo celične membrane;
- Da so poškodbe membran manjše ob uporabi ekoloških detergentov;
- Da v istem časovnem obdobju različno intenziteto obarvanja povzroči višja koncentracija detergenta v raztopini.

2 METODE

2.1 Material in pripomočki

Kemikalije

- Metanol
- Voda
- Destilirana voda
- Različni detergenti
 - Ekološka detergenta: Sonett in Almacabio

Tabela 1: Sestavine v uporabljenih ekoloških detergentih

Ekološki detergent 1: Sonett	Ekološki detergent 2: Almacabio
Sestavine:	Sestavine:
15-30% milo iz repičnega olja	Pod 5% neionske površinsko aktivne snovi
5-15% neionski tenzidi (sladkorni tenzidi)	5-15% anionske površinsko aktivne snovi iz rastlinskih izvlečkov
5-15% citrati	Dišava
5-15% rastlinski alkohol (etanol)	Konzervans
1-5% Anionski tenzidi (alkoholni sulfat kokosove maščobe, sulfatizirano ricinusovo olje)	Bitrex
Manj kot 1% eterično olje limonske trave	
Rododendron	
Zelena meta	
Sledovi sivke (vsebuje citral, limono, geraniol)	

Balzamični dodatki	
--------------------	--

- Navadna detergenta: Blink in Pril

Tabela 2: Sestavine v uporabljenih navadnih detergentih

Navadni detergent 1: Blink Sestavine:	Navadni detergent 2: Pril Sestavine:
5-15% anionske površinsko aktivne snovi	5-15% anionske površinsko aktivne snovi
Neionske površinsko aktivne snovi	Amfoterne površinsko aktivne snovi
Milo	2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol
Fosfanati	Metil kloroizotiazolinon
Encimi	Parfumi
Metilizotiazolinon	
Benzizotiazolinon	

Naprave

- Vernierjev kolorimeter
- Vernierjev pH senzor
- Tehnica



Slika 14: Uporabljen Vernierjev vmesnik in kolorimeter

Laboratorijski pribor

- Čaše
- Pipete
- Merilni valj
- Aluminijska folija
- Kivete
- Nož

Ostalo

- Rdeča pesa
- Štoparica

2.2 Postopek izvedbe eksperimenta

Eksperimente sem izvajala v šolskem laboratoriju.

Gomolj rdeče pese (*Beta vulgaris*) sem narezala na enake koščke, težke približno 2 grama, z odstopanjem za največ 0,1 gram. Koščke, ki so odstopali od načrtovane teže, sem izločila. Za primerjavo in kontrolo sem najprej testirala 20 vzorcev z vodo in 20 vzorcev z metanolom, saj voda blago vpliva na membrane celic, metanol pa jih poškoduje. Učinke različnih detergentov na celične membrane celic rdeče pese sem merila pri 20 vzorcih (po 10 mL raztopine) vsakega in dveh različnih koncentracijah (1:1 in 1:100).

Tabela 3: Priprava vzorcev raztopin

Raztopina (10 mL)	Koncentracija raztopine (%)
Voda	100
Metanol	100
Ekološki detergent	50 1
Ekološki detergent 2	50 1
Navadni detergent 1	50

	1
Navadni detergent 2	50
	1

Raztopine detergentov sem pripravila z destilirano vodo v čašah. Vsem raztopinam sem izmerila pH vrednost s pomočjo senzorja za določanje pH vrednosti in Vernierjevega vmesnika. Koščke pese sem pustila v raztopini 15 minut. Po tem času sem izmerila intenzivnost obarvanja raztopine (absorbanco) s kolorimetrom pri valovni dolžini 470 nm. Bolj kot so celične membrane poškodovane zaradi učinka detergenta, intenzivnejša je obarvanost, ker barvilo izteka iz vakuole. Intenzivnejše obarvana raztopina prepušča manj svetlobe in ima višjo vrednost absorbance.



Slika 15: Postopek dodajanja vzorcev obarvane raztopine detergenta v kivete

3 REZULTATI

Skupno vsem meritvam:

- Volumen raztopine: 10mL
- Čas: 15 minut
- Teža: 2g \pm 0,1g

3.1 Obdelava rezultatov

Pri obdelavi rezultatov sem upoštevala začetno absorbanco raztopine, brez dodanega vzorca rdeče pese. To sem odštela od izmerjene absorbance vzorca, v katerem je bila rdeča pesa. Zaradi majhnega odstopanja teže, ki ni bila vedno točno 2 grama, sem izračunala absorbanco na težo (g^{-1}). Tako so rezultati bolj primerljivi med seboj. Nato sem izračunala mediano, s katero sem izločila rezultate, ki ekstremno izstopajo v primerjavi z drugimi. Na koncu sem dobljene vrednosti prikazala primerjalno z grafikonom.

3.2 Rezultati

Naslednji tabeli vsebujeta podatke meritev z vodo in metanolom, skupaj z izračunano absorbanco/težo in mediano.

Začetna absorbanca vode: 0,00

Začetna absorbanca metanola: 0,00

3.2.1 Meritve z vodo

Tabela 4: Rezultati meritev z vodo

#	Teža [g]	Absorbanca	Absorbanca/težo [g^{-1}]
1	2,08	0,240	0,115
2	2,08	0,287	0,138
3	2,04	0,360	0,176
4	2,08	0,256	0,123
5	2,01	0,385	0,192

6	2,01	0,305	0,152
7	2,09	0,277	0,133
8	2,02	0,299	0,148
9	2,07	0,275	0,133
10	2,09	0,305	0,146
11	2,09	0,428	0,205
12	2,07	0,409	0,198
13	2,05	0,303	0,148
14	2,05	0,443	0,216
15	2,10	0,383	0,182
16	1,95	0,396	0,203
17	1,91	0,650	0,340
18	2,04	0,455	0,223
19	2,09	0,472	0,226
20	1,91	0,446	0,234
MEDIAN			0,179

3.2.2 Meritve z metanolom

Tabela 5: Rezultati meritev z metanolom

#	Teža [g]	Absorbanca	Absorbanca/teža [g ⁻¹]
1	2,05	0,767	0,374
2	2,05	1,099	0,536
3	2,03	0,926	0,456
4	2,04	0,783	0,384
5	2,05	1,172	0,572
6	2,06	0,926	0,450
7	2,03	1,024	0,504
8	2,03	1,037	0,511
9	2,01	0,738	0,367

10	2,03	0,796	0,392
11	2,07	1,298	0,627
12	1,98	1,155	0,583
13	1,95	1,194	0,612
14	2,00	1,269	0,635
15	2,09	1,389	0,665
16	2,06	1,118	0,543
17	2,02	1,260	0,624
18	1,97	1,193	0,606
19	2,00	1,218	0,609
20	2,04	1,215	0,596
MEDIAN			0,557

Te vrednosti so služile kot primerjalne vrednosti za meritve z detergenti. Sledijo rezultati za ekološke detergente.

3.2.3 Meritve z ekološkim detergentom 1

Razmerje 1:1, začetna absorbanca: 0,101

Tabela 6: Rezultati meritev s prvim ekološkim detergentom pri koncentraciji 1:1

#	Teža	Absorbanca	Absorbanca- začetna absorbanca	Absorbanca/težo [g ⁻¹]
1	1,990	0,510	0,409	0,206
2	2,040	0,544	0,443	0,217
3	2,080	0,801	0,700	0,337
4	1,920	0,552	0,451	0,235
5	1,980	0,600	0,499	0,252
6	2,090	0,497	0,396	0,189
7	1,930	0,655	0,554	0,287

8	2,100	0,630	0,529	0,252
9	1,970	0,483	0,382	0,194
10	2,010	0,593	0,492	0,245
11	1,980	0,522	0,421	0,213
12	2,080	0,346	0,245	0,118
13	1,900	0,466	0,365	0,192
14	1,900	0,531	0,430	0,226
15	1,970	0,296	0,195	0,099
16	1,930	0,562	0,461	0,239
17	1,970	0,485	0,384	0,195
18	1,950	0,553	0,452	0,232
19	2,030	0,603	0,502	0,247
20	2,010	0,582	0,481	0,239
MEDIAN				0,229

Razmerje 1:100, začetna absorbanca: 0,757

Tabela 7: Rezultati meritev s prvim ekološkim detergentom pri koncentraciji 1:100

#	Teža	Absorbanca	Absorbanca- začetna absorbanca	Absorbanca/težo [g ⁻¹]
1	2,100	1,056	0,299	0,142
2	1,930	1,114	0,357	0,185
3	2,030	1,019	0,262	0,129
4	2,070	1,140	0,383	0,185
5	1,930	1,056	0,299	0,155
6	2,100	1,221	0,464	0,221
7	2,010	1,155	0,398	0,198
8	1,950	0,972	0,215	0,110
9	1,910	0,995	0,238	0,125
10	1,960	1,003	0,246	0,126
11	2,040	0,982	0,225	0,110

12	2,050	1,045	0,288	0,140
13	2,000	1,005	0,248	0,124
14	2,050	1,164	0,407	0,199
15	2,050	1,013	0,256	0,125
16	2,090	1,143	0,386	0,185
17	2,010	1,020	0,263	0,131
18	1,980	1,105	0,348	0,176
19	1,900	1,093	0,336	0,177
20	2,030	0,998	0,241	0,119
MEDIAN				0,141

3.2.4 Meritve z ekološkim detergentom 2

Razmerje 1:1, začetna absorbanca: 0,000

Tabela 8: Rezultati meritev z drugim ekološkim detergentom pri koncentraciji 1:1

#	Teža	Absorbanca	Absorbanca- začetna absorbanca	Absorbanca/težo [g ⁻¹]
1	2,06	0,933	0,933	0,453
2	1,90	0,624	0,624	0,328
3	2,08	1,134	1,134	0,545
4	2,07	0,761	0,761	0,368
5	1,90	0,675	0,675	0,355
6	2,05	0,796	0,796	0,388
7	2,02	0,563	0,563	0,279
8	2,01	0,499	0,499	0,248
9	1,90	0,763	0,763	0,402
10	1,97	0,965	0,965	0,490
11	1,94	0,511	0,511	0,263
12	2,06	0,506	0,506	0,246

13	2,04	0,620	0,620	0,304
14	1,98	0,506	0,506	0,256
15	1,95	0,507	0,507	0,260
16	2,06	0,505	0,505	0,245
17	2,00	0,499	0,499	0,250
18	1,93	0,469	0,469	0,243
19	1,91	0,575	0,575	0,301
20	1,98	0,515	0,515	0,260
MEDIAN				0,290

Razmerje 1:100, začetna absorbanca: 0,000

Tabela 9: Rezultati meritev z drugim ekološkim detergentom pri koncentraciji 1:100

#	Teža	Absorbanca	Absorbanca- začetna absorbanca	Absorbanca/težo [g⁻¹]
1	2,10	0,418	0,418	0,199
2	2,10	0,480	0,480	0,229
3	1,90	0,486	0,486	0,256
4	1,91	0,358	0,358	0,187
5	2,07	0,616	0,616	0,298
6	1,90	0,416	0,416	0,219
7	1,96	0,385	0,385	0,196
8	2,10	0,368	0,368	0,175
9	1,92	0,490	0,490	0,255
10	2,02	0,478	0,478	0,237
11	1,95	0,525	0,525	0,269
12	2,07	0,446	0,446	0,215
13	2,01	0,486	0,486	0,242
14	1,92	0,458	0,458	0,239
15	1,94	0,510	0,510	0,263
16	2,03	0,340	0,340	0,167

17	2,08	0,400	0,400	0,192
18	2,10	0,512	0,512	0,244
19	1,92	0,431	0,431	0,224
20	2,09	0,520	0,520	0,249
MEDIAN				0,233

Uporabila sem tudi dva navadna detergenta pri enakih koncentracijah. Naslednje tabele prikazujejo te rezultate.

3.2.5 Meritve z navadnim detergentom 1

Razmerje 1:1, začetna absorbanca: 0,129

Tabela 10: Rezultati meritev s pravim navadnim detergentom pri koncentraciji 1:1

#	Teža	Absorbanca	Absorbanca- začetna absorbanca	Absorbanca/težo [g ⁻¹]
1	2,03	1,087	0,958	0,472
2	2,00	0,947	0,818	0,409
3	2,00	1,078	0,949	0,475
4	2,07	0,992	0,863	0,417
5	2,08	0,958	0,829	0,399
6	2,08	1,073	0,944	0,454
7	2,04	1,087	0,958	0,470
8	2,06	0,937	0,808	0,392
9	2,02	0,845	0,716	0,354
10	2,04	0,884	0,755	0,370
11	1,99	0,976	0,847	0,426
12	2,10	0,818	0,689	0,328
13	1,99	0,763	0,634	0,319
14	1,98	1,054	0,925	0,467

15	2,02	0,869	0,740	0,366
16	1,90	0,795	0,666	0,351
17	1,95	1,005	0,876	0,449
18	1,98	0,897	0,768	0,388
19	2,10	1,037	0,908	0,432
20	1,91	1,117	0,988	0,517
MEDIAN				0,413

Razmerje 1:100, začetna absorbanca: 0,063

Tabela 11: Rezultati meritev s prvim navadnim detergentom pri koncentraciji 1:100

#	Teža	Absorbanca	Absorbanca- začetna absorbanca	Absorbanca/težo [g ⁻¹]
1	1,95	0,594	0,531	0,272
2	2,05	0,558	0,495	0,241
3	2,05	0,455	0,392	0,191
4	2,10	0,452	0,389	0,185
5	1,90	0,531	0,468	0,246
6	2,10	0,383	0,320	0,152
7	2,07	0,485	0,422	0,204
8	2,10	0,483	0,420	0,200
9	2,06	0,570	0,507	0,246
10	1,96	0,508	0,445	0,227
11	2,03	0,515	0,452	0,223
12	2,00	0,484	0,421	0,211
13	2,05	0,606	0,543	0,265
14	1,96	0,550	0,487	0,248
15	2,01	0,515	0,452	0,225
16	1,91	0,652	0,589	0,308
17	2,02	0,555	0,492	0,244
18	2,10	0,593	0,530	0,252

19	1,94	0,556	0,493	0,254
20	2,07	0,717	0,654	0,316
MEDIAN				0,243

3.2.6 Meritve z navadnim detergentom 2

Razmerje 1:1, začetna absorbanca: 0,193

Tabela 12: Rezultati meritev z drugim navadnim detergentom pri koncentraciji 1:1

#	Teža	Absorbanca	Absorbanca- začetna absorbanca	Absorbanca/težo [g ⁻¹]
1	1,91	1,893	1,700	0,890
2	1,98	1,611	1,418	0,716
3	1,95	1,745	1,552	0,796
4	2,05	1,698	1,505	0,734
5	1,90	1,911	1,718	0,904
6	2,02	1,838	1,645	0,814
7	1,90	1,808	1,615	0,850
8	1,93	1,671	1,478	0,766
9	2,00	1,737	1,544	0,772
10	1,95	1,650	1,457	0,747
11	2,08	1,748	1,555	0,748
12	1,97	1,839	1,646	0,836
13	1,95	1,599	1,406	0,721
14	1,92	1,628	1,435	0,747
15	2,02	1,611	1,418	0,702
16	2,09	1,808	1,615	0,773
17	1,91	1,666	1,473	0,771
18	2,08	1,810	1,617	0,777
19	2,06	1,698	1,505	0,731

20	1,94	1,765	1,572	0,810	
				MEDIAN	0,772

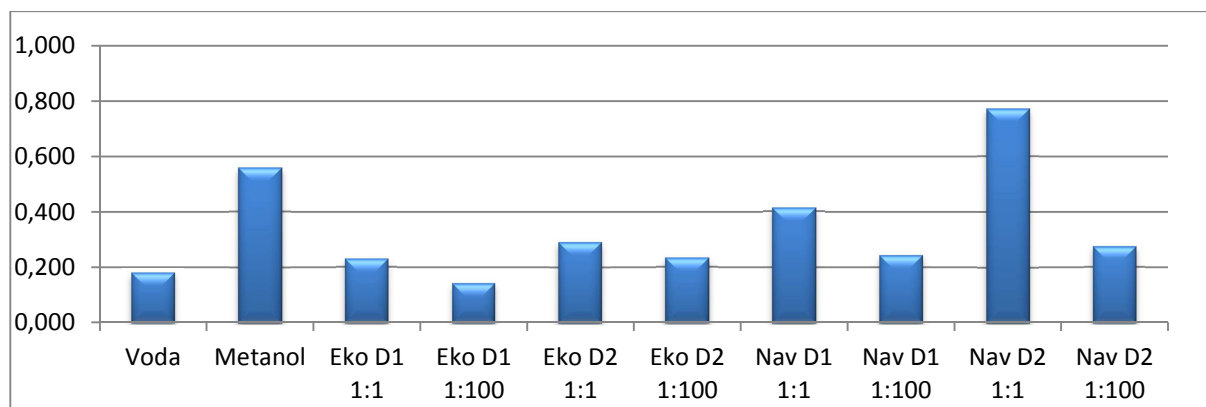
Razmerje 1:100, začetna absorbanca: 0,000

Tabela 13: Rezultati meritev z drugim navadnim detergentom pri koncentraciji 1:1

#	Teža	Absorbanca	Absorbanca- začetna absorbanca	Absorbanca/težo [g ⁻¹]	
1	1,90	0,590	0,590	0,311	
2	1,94	0,536	0,536	0,276	
3	2,09	0,675	0,675	0,323	
4	1,95	0,445	0,445	0,228	
5	2,04	0,428	0,428	0,210	
6	2,04	0,634	0,634	0,311	
7	2,05	0,459	0,459	0,224	
8	2,10	0,564	0,564	0,269	
9	2,00	0,353	0,353	0,177	
10	2,02	0,608	0,608	0,301	
11	2,03	0,446	0,446	0,220	
12	1,99	0,416	0,416	0,209	
13	2,09	0,577	0,577	0,276	
14	1,91	0,446	0,446	0,234	
15	2,02	0,761	0,761	0,377	
16	1,91	0,614	0,614	0,321	
17	2,06	0,541	0,541	0,263	
18	2,05	0,655	0,655	0,320	
19	2,04	0,378	0,378	0,185	
20	1,95	0,723	0,723	0,371	
				MEDIAN	0,272

3.2.7 Primerjalni grafični prikaz rezultatov z vodo, metanolom in detergenti

Graf 1: Primerjava rezultatov z vodo, metanolom in detergenti



3.2.8 Rezultati meritev pH vrednosti

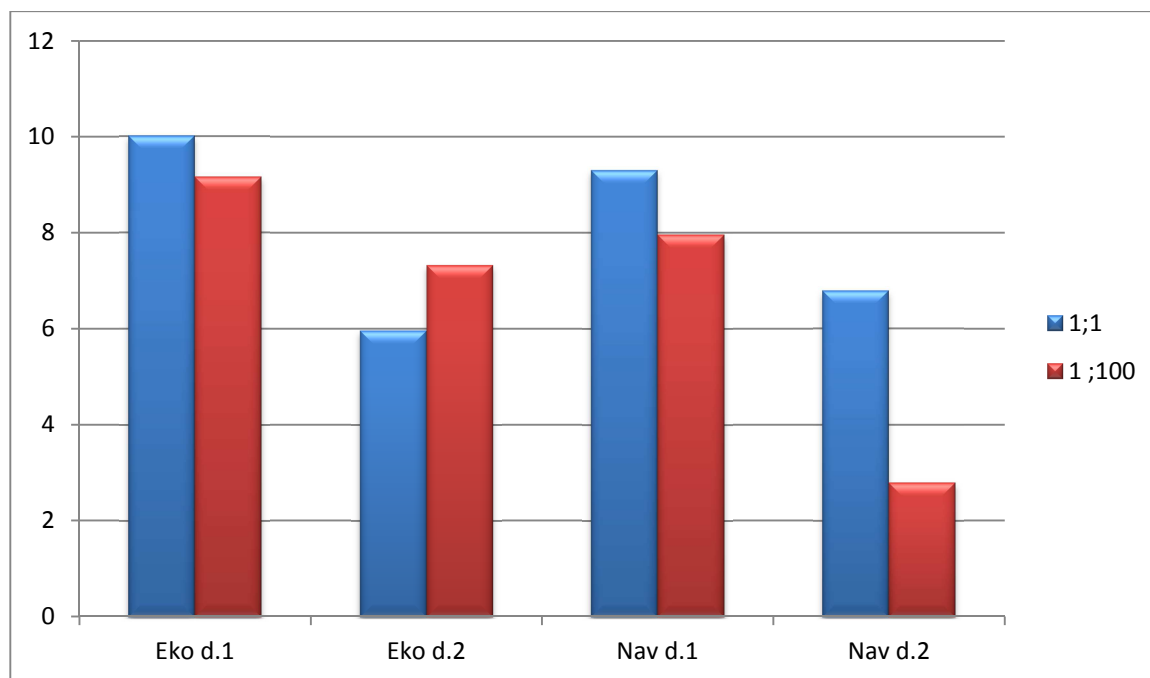
Na izločanje barvila vpliva tudi pH, ki je bil izmerjen pri vseh detergentih in sicer pri koncentracijah, ki so bile uporabljene. Izmerjene vrednosti prikazujeta naslednja tabela in graf.

Tabela 14: pH vrednosti uporabljenih raztopin detergenta

Detergent	Koncentracija	pH vrednost
Ekološki d. 1: Sonett	1:1	10,02
Ekološki d. 1: Sonett	1:100	9,16
Ekološki d. 2: Almacabio	1:1	5,96
Ekološki d. 2: Almacabio	1:100	7,32
Navadni d. 1: Blink	1:1	9,30
Navadni d. 1: Blink	1:100	7,96
Navadni d. 2: Pril	1:1	6,79
Navadni d. 2: Pril	1:100	7,54

3.2.9 Grafični prikaz rezultatov meritev pH vrednosti

Graf 2: pH vrednosti



4 DISKUSIJA

S dobljenimi rezultati sem prišla do mnogih ugotovitev, s pomočjo katerih lahko komentiram svoje začetne hipoteze.

Za primerjavo sem najprej preizkusila vpliv vode in metanola na celice. Izkazalo se je, da ima voda najmanjši vpliv na celične membrane celic rdeče pese med vsemi preizkušenimi snovmi. Metanol veliko močneje poškoduje membrane celic. Absorbanca vode na težo pese redko preseže 0,200, povprečna vrednost na težo je le 0,179. Pri metanolu so vrednosti veliko višje, tudi preko 1,300, zato je tudi absorbanca glede na težo veliko višja kot pri vodi. Razlog za to je v sestavi celične membrane in molekule metanola. Molekula metanola ima polarno hidroksilno skupino in nepolarni alifatski del. Zlahka penetrira v lipidni dvosloj in tam s tvorbo interakcij z lipidi poruši strukturo membrane (Patra et al., 2006). Vodne molekule so polarne in se ne povezujejo z nepolarnimi repi fosfolipidnih molekul v membranskem dvosloju, zato njene zgradbe ne rušijo.

Preizkusila sem vpliv dveh ekoloških in dveh navadnih detergentov. Razlikovali se se v namenu uporabe. Eden od ekoloških in navadnih je bil namenjen pomivanju posode, druga

dva pa pranju perila. Pri vsakem od njih sta bili preizkušeni dve koncentraciji, 1:1 in 1:100. Priporočena koncentracija za doziranje je pri večini detergentov od 1:500 do 1:100.

Pri obeh ekoloških so bile vrednosti absorbance na težo nizke in so redko presegle 0,300, kar je le malo več kot pri vodi. Prvi ekološki detergent je pri nižji koncentraciji membrane poškodoval celo manj kot voda.

Pričakovano agresivnejša neekološka detergenta, sta imela na membrane močnejši vpliv. Pri prvem detergentu so bile vrednosti absorbance, kljub višji začetni absorbanci, dokaj visoke. Vrednosti so se približevale meritvam z metanolom. Pri drugem navadnem detergentu so bile te vrednosti pri višji koncentraciji celo presežene.

Če primerjamo rezultate vplivov posameznih detergentov pri različnih koncentracijah, je jasno razvidno, da višja koncentracija detergenta močneje poškoduje celične membrane. To se je pokazalo tako pri ekoloških kot neekoloških detergentih. Razlike med absorbancami pri različnih koncentracijah se gibljejo od 0,057 pri drugem ekološkem detergentu, do 0,500 pri drugem navadnem detergentu, pri čemer nobeden od detergentov ne odstopa od te ugotovitve. Pokazale so se tudi razlike med ekološkima detergentoma. Prvi ekološki detergent pri obeh koncentracijah manj poškoduje celične membrane kot drugi, vendar razlike niso velike. Tudi v kemijski sestavi sta si podobna, zato ne prihaja do večjih razlik.

Enako pa ne velja za neekološke detergente. Pri nižji koncentraciji so vrednosti podobne, vendar pri višji prihaja do velikih razlik. Drugi detergent veliko močneje poškoduje membrane kot prvi, celo bolj kot metanol. V njuni sestavi so razlike, kar očitno vpliva na njuno delovanje.

Glavna primerjava, ki je ključno vprašanje naloge pa je med vplivi ekoloških in neekoloških detergentov na celične membrane celic rdeče pese. V vseh primerih navadni detergenti bolj poškodujejo membrane kot ekološki. Največje razlike so med prvim ekološkim in drugim navadnim detergentom. Razlike so spet večje pri višji koncentraciji detergenta, kjer segajo do 0,543. Opazne so tudi pri nižji koncentraciji, vendar so razlike manjše, do 0,131.

Detergenti so se razlikovali tudi glede na namen. Primerjala sem en ekološki in en navadni detergent za pomivanje posode, ter dva detergenta, ekološkega in navadnega, za pranje perila. Pričakovano bi bilo, da so detergenti za pomivanje posode bolj blagi, saj je koža dnevno v stiku z njimi, vendar se je izkazalo ravno nasprotno. Tako pri navadnih, kot pri ekoloških detergentih, so tisti za pomivanje posode bolj poškodovali membrane. To sta bila drugi ekološki in drugi navadni detergent.

Razlog za razlike so sestavine detergentov. Glavna razlika med sestavinami ekoloških in navadni detergentov je, da so sestavine ekoloških naravnega izvora, ti detergenti vsebujejo predvsem rastlinske izvlečke (npr. repično olje, kokosova maščoba, limonina trava idr.). Navadni detergenti pa vsebujejo sintetične kemijske snovi. V veliki meri oboji vsebujejo surfaktante oz. tenzide. Ti omočijo material, odstranijo nečistoče s pomočjo elektrostatskega naboja in tvorijo micelije. Lahko so anionski, kationski, neionski ali amfoterni. Razlikujejo se glede na ionski naboj v vodni raztopini. Pri anionskih ima hidrofilni del negativni naboj, pri kationskih pa ima pozitivnega. Neionski v vodi ne tvorijo ionov, amfoterni pa so lahko pozitivni ali negativni, kar je odvisno od pH vrednosti.

Vpliv pH vrednosti je različen pri ekoloških in navadnih detergentih. Pri ekoloških ima pri obeh koncentracijah večji vpliv bolj bazični detergent, z višjim pH. Pri navadni detergentih ima obratno, večji vpliv detergent, ki ima začetno nižji pH. Za ugotovitev vpliva pH vrednosti na membrane bi bilo potrebnih več detergentov. Detergenti namenjeni za pomivanje posode imajo nižji pH, kot tisti za perilo. Pri bazičnih detergentih se pri bolj razredčeni raztopini pH znaša, pri kislih pa poviša. Torej se pH z nižjo koncentracijo detergenta začne približevati vrednosti 7, kot je pH vode. Pričakovano je, da bodo detergenti za pomivanje posode imeli bolj nevtralni pH (bližje vrednosti 7), zaradi dnevnega stika s kožo, ki ga pri detergentih za pranje perila ni toliko.

Na rezultate so vplivale tudi začetne absorbance. Te so se pri detergentih razlikovale, saj je težko poiskati detergente, ki so enake barve. V izogib motnji zaradi obarvanosti detergenta, sem izbirala prosojne oziroma zelo rahlo obarvane detergente. Zaradi začetnih absorbanc se lahko pojavijo napake v meritvah. Če bi začetne absorbance bile enake bi bili rezultati natančnejši. Pri nekaterih detergentih, ki so brez dodane vode prosojni, je razlog za višjo absorbanco, ko sem jim dodala vodo, vsebnost različnih ogrodnih substanc. To so snovi, ki mehčajo vodo in odstranjujejo kalcijeve in magnezijeve ione. Če detergent ne vsebuje ogrodnih substanc, se kalcijevi in magnezijevi ioni oborijo s komponentami detergenta. V primeru uporabljenih detergentov so bile te snovi citrati in fosfanati.

Pregled hipotez

Iz analize teh rezultatov lahko preverjam pravilnost svojih hipotez. Izkaže se, da je hipoteza o različni poškodovanosti membran z različnimi detergenti resnična. Hipotezo lahko potrdim,

saj se vrednosti tako med ekološkimi kot med navadnimi detergenti razlikujejo, razlike pa so še večje ob primerjavi ekoloških z navadnimi.

Potrjena je tudi naslednja hipoteza, ki pravi, da so poškodbe membran manjše ob uporabi ekoloških detergentov. Kljub razlikam med ekološkima detergentoma, pri čemer eden vpliva bolj kot drugi, sta obe vrednosti manjši od vpliva navadnih detergentov. Ti poškodujejo membrane bistveno bolj. Vendar tega ne moremo posplošiti na vse detergente, saj vsebujejo različne snovi, ki prav tako na različne načine vplivajo na celične membrane. Pomembne so tudi koncentracije posameznih snovi, ki jih vsebuje posamezni detergent, koncentracije katerih pa so večinoma na deklaraciji zapisane v mejah (npr. 5-15 %). Detergenti se razlikujejo tudi v pH vrednosti, ki lahko vpliva na poškodovanost celičnih membran.

V zadnji hipotezi sem postavila trditev, da večja koncentracija detergenta v uporabljeni raztopini bolj poškoduje membrane kot manjša. Pri vseh štirih detergentih se je tudi ta hipoteza izkazala za resnično. V vseh primerih je bilo iztekanje pigmenta manjše pri koncentraciji 1:100, kot pri 1:1.

Sklepi

S pomočjo te naloge sem dobila odgovore na začetna vprašanja. Ugotovila sem, da različni detergenti različno vplivajo na celice, glavne razlike pa se pojavijo pri primerjavi ekoloških z navadnimi. Pri tem sem ugotovila, da ekološki detergenti na celice vplivajo bolj blago kot neekološki, kjer je poškodovanost membran dosti močnejša. Te ugotovitve zaradi različnih lastnosti in snovi, ki jih vsebujejo različne vrste detergentov ne moremo posplošiti za vse ekološke in navadne detergente. Kljub vsemu so ekološki detergenti boljši, saj vsebujejo nekatere naravne snovi in so prijaznejši okolju.

Natančnejše rezultate pri svoji raziskavi bi lahko dosegla z:

- Vzpostavitev načina za rezanje koškov rdeče pese, ki bi bili enakih velikosti. Kljub podobni teži uporabljenih koščkov so se ti med seboj razlikovali v obliki. Pri iztekanju pigmenta je pomembna ravno površina na katero določena snov deluje, zato bi bil potreben mehanizem za natančnejše rezanje.
- Izbiro detergentov z enako začetno absorbanco. Kljub temu, da je bila začetna absorbanca upoštevana in odšteta, bi bile možne napake manjše pri uporabi detergentov z enako začetno absorbanco, najbolje 0,000.

- Uporabo več detergentov z različno sestavo in namenom. S tem bi lahko določila vpliv še drugih dejavnikov, npr. pH vrednosti.
- Primerjava med detergenti s podobnim namenom uporabe
- Večje število vzorcev detergentov

Kljub možnim napakam, menim, da so meritve dovolj natančne, da lahko na podlagi le-teh odgovorim na glavno vprašanje naloge. Zanimalo me je predvsem kateri detergenti, ekološki ali neekološki, imajo manjši vpliv na žive celice in so s tem primernejši za vsakdanjo rabo. Izkazalo se je, da so v primeru moje raziskave to ekološki detergenti. Ne glede na njihov namen, je vpliv na celične membrane bistveno manjši. Iz tega vidika so primernejši za vsakdanjo rabo, kjer so veliko časa v stiku s kožo, na katero nimajo tako uničujočega učinka kot navadni detergenti.

Vendar je glavni namen detergentov čiščenje, zato ostaja odprto vprašanje o čistilnem učinku ekoloških detergentov. Glede na njihov blagi vpliv bi lahko sklepali, da je tudi njihov čistilni učinek slabši od učinka navadni detergentov. Za odgovor na ta problem bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

5 LITERATURA

AKITA, T., HINA, Y., NISHI, T. (2000). Production of betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta Vulgaris L.*). The Nippon Shinyaku Institute for Botanical Research, Japan.

AKITA, T.; HINA, Y.; NISHI, T. (2001) New medium composition for high betacyanin production by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris L.*).The Nippon Shinyaku Institute for Botanical Research, Japan.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2002) Molecular biology of the cell. Fourth edition. Garland Science, New York.

ALBERTS, B. (2004) Essential cell biology. 2. izdaja. London: Garland Science: Taylor & Francis Group. Str. 740

ANTRANCE: Detergents and their uses in membrane proteine science. On line: www.antrance.com

BHAIRI, S.M.; MOHAN, C. (1997) Detergents. A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. Calbiochem/Novabiochem Corp.

VERNIER software and technology. Biology with Vernier. *Biological membranes*. Beaverton, OR.

BONACIN, J. A.; ENGELMANN, F. M.; SEVERINO, D.; TOMA, H. E.; BAPTISTA, S. M. (2009) Singlet oxygen quantum yields (Φ_d) in water using beetroot extract and an array of LEDs. Journal of the Brazillian Chemical Society. Vol. 20, št. 1. São Paulo.

BROWN, B. S. (1996) Biological membranes. The Biochemical Society, Manchester. ISBN-13: 978-0904498325; On line:

http://www.biochemistry.org/Portals/0/Education/Docs/BASC08_full.pdf

EATON, D. C. (1989) Laboratory investigations in organic chemistry. 1. izdaja. New York: McGraw-Hill, str. 929 ISBN 0-07-01885-6.

EMD Biosciences: Biological detergents. Guide for solubilization of membrane proteins and selecting tools for detergent removal. On line: http://www.emdmillipore.com/life-science-research/detergents/c_6.b.s1OU6YAAAEii7k7mKMQ

FINDLAY, A. (1954) Kemija v službi človeka. 1. izdaja. Ljubljana: DZS, str. 379.

HROVAT, A. (2009) Vloga aktinskih filamentov v delovanju membranski receptorjev, sklopljenih z g-proteini. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta.

http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/detergents/ANATRACE_DetergentsUse.pdf

http://www.biochemistry.org/Portals/0/Education/Docs/BASC08_full.pdf

KORNHAUSER, A. (1986) Organska kemija II: organske kisikove spojine, lipidi, ogljikovi hidrati. 1. izdaja. DZS; Ljubljana, str. 215.

KREFT, M. Erdani et al. (2011) Celična biologija z genetiko. 1. izdaja. Ljubljana: Medicinska fakulteta, inštitut za biologijo celice, 2011. str. 162 str. ISBN 978-961-267-040-5.

OZOLINA, N.V.; NETRESKINA, I. S.; KOLESNIKOVA, E.V.; SALYAEY, R. K.; NURMINSKY, V. N.; RAKEYICH, A. I.; MARTYNOVICH, E. F.; CHERNYSHOV, M. Y. (2012) Tonoplast of *Beta vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains. In: Planta. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

PATRA, R.; SALONEN, E.; TERAMA, E.; VATTULAINEN, I.; FALLER, R.; LEE, B. W.; HOLOPAINEN, J.; KARTTUNEN, M. (2006) Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. Biophysical Journal. Vol. 90, 1121–1135.

REECE, J.B.; URRY, L.A.; CAIN, M.L.; WASSERMAN, S.A.; MINORSKY, P.V.; JACKSON, R.B. (2010) Campbell Biology, 9th Edition. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.

SCHUCK, S.; HONSHO, M.; EKROOS, K.; SHEYCHENKO, A.; SIMONS, K. (2003) Resistance of cell membranes to different detergents. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 100, št.10, str. 5795–5800.

STUŠEK, P. (2003) *Celica: učbenik za strokovne in tehniške gimnazije*. 1. izdaja, 3. natis. Ljubljana: DZS,. 132 str. ISBN 86-341-2554-8.

SUGANYADEVI, P.; SARAVANAKUMAR, M.; ARAVINTHAN, K.M.; ARUNKUMAR, A.; KRISHNA, K. R.; KARTHIKEYANI, S. (2010) Extraction of Betacyanin from red beetroot (*Beta Vulgaris L.*) and to evaluate its antioxidant potential. Journal of Pharmacy research Vol. 3. India.

TOMAN, M. J.; SERNEC, K.; KOPČAVAR, V. (2012) Biologija celice in ekologija z varstvom okolja: učbenik za biologijo v srednjih strokovnih in poklicno-tehniških šolah. 1. izdaja, 1. natis. Ljubljana: DZS, str. 151. ISBN 978-961-02-0228-8.

VILHAR, B. (2005) Biologija rastlinske celice: delovni zvezek. Univerza v Ljubljani, biotehniška fakulteta. Ljubljana.