

## Ispitivanje aktivnosti i karakterizacija haloperoksidaze iz gljive *Postia caesia*

---

*U uzorku gljive (Postia caesia) ispitana je aktivnost enzima haloperoksidaze. U okviru karakterizacije vršeno je ispitivanje inhibicije enzima fosfatima i određivanje njegove supstratne specifičnosti prema halogenim supstratima. Inhibicija fosfatima je snažna i pokazuje linearnu koncentracionu zavisnost. Haloperoksidaza je pokazala najveći afinitet za KF kao halogenidni supstrat, što je nov rezultat. Sem toga ispitivana je enzimska aktivnost i sa KCl i KI kao supstratima. Smatra se da je u gljivi pronadjen ranije neprijavljen enzim haloperoksidaza sa afinitetom za različite supstrate.*

---

### Uvod

Enzimi su vrlo važna grupa proteina. Celokupni ćelijski metabolizam moguć je samo uz njihovo dejstvo. Oni su veoma efikasni katalizatori. Specifični su i deluju na određenu materiju (supstrat). Enzimi učestvuju u mnogim biohemijskim reakcijama kao katalizatori koji ostvaruju svoju ulogu smanjujući energiju aktivacije (Đurđić 2000).

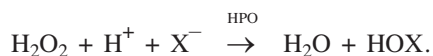
Haloperoksidaze (HPO) su enzimi sastavljeni od dve subjediniice relativne molekulske mase 65 kDa (Plat 1987). Istraživanja su pokazala da je vanadijum neophodan za katalitičko dejstvo bromoperoksidaza i da ga ovi enzimi sadrže kao prostetičnu grupu. U saglasnosti sa strukturalnom sličnošću vanadata i fosfata dokazano je da vanadijumska haloperoksidaza brzo gubi aktivnost u fosfatnom puferu. Takođe, vanadati su poznati kao proteinski inhibitori mnogih različitih fosfataza (Hemrika 1997). Literaturni podaci govore o tome da haloperoksidaza prilikom svog dejstva zahteva odgovarajući halogeni supstrat. Poznato je da ona pri tom može da učestvuje u reakciji sa KBr, KCl i KI pri čemu dobija ime po najelektronegativniječm halogenidu koji oksiduje. Na primer, hloroperoksidaza može da oksiduje hloride, bromide i jodide, dok bromoperoksidaza može da oksiduje bromide i jodide (Hemrika 1999).

---

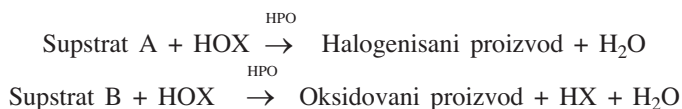
*Milica Đokić (1991),  
Leskovac, Jovana  
Cvijića 37, učenica 2.  
razreda Medicinske  
škole u Leskovcu*

**MENTOR:**  
*Milica Grozdanović,  
Hemijski fakultet,  
Beograd*

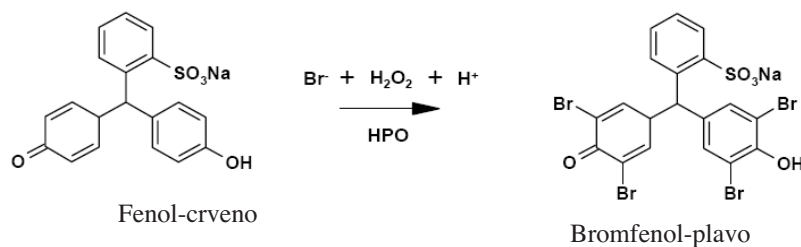
Ovi enzimi katalizuju oksidaciju halogenih jona ( $X^-$ ) do odgovarajuće hipohalogene kiseline (HOX) sa vodonik-peroksidom, što je predstavljeno jednačinom:



Ove kiseline kasnije mogu reagovati sa širokim spektrom nukleofilnih akceptora i formirati razna halogenska jedinjenja (Hemrika 1997). Halogenperoksidaze mogu poboljšati reakciju određenih supstrata sa nastalim hipohalogenim kiselinama (HClO, HBrO, HIO). Zavisno od supstrata, reakcija se dalje može nastaviti halogenizacijom ili oksidacijom:



Haloperoksidaza time utiče na oksidovanje ili halogenovanje nekih organskih supstrata (npr. fenol crvenog, slika 1) (Petronijević 2007).



Slika 1.  
Pretvaranje fenol-crvenog u bromfenol-plavo uz prisustvo haloperoksidaze kao katalizatora

Figure 1.  
Transformation of phenol-red into bromphenol-blue in the presence of haloperoxidase as a catalyst

Haloperoksidaze su do danas pronađene u nekim vrstama algi (*Corallina officinalis*), lišajeva (*Xanthoria parietina*) i u nekim gljivama (*Curvularia inaequalis*). Ovi enzimi danas imaju sve veću primenu u biotehnologiji, kao biokatalizatori u biosintezi.

**Cilj** ovog rada je izolovanje enzima haloperoksidaze iz gljive *Postia caesia*, ispitivanje inhibicije fosfatnim puferom, kao i određivanje specifičnosti enzima ka određenim supstratima.

## Materijal i metode

Eksperiment je rađen u *in vitro* uslovima. Iz uzorka gljive (*Postia caesia*) ekstrahovan je enzim haloperoksidaza.

**Priprema sirovog ekstrakta.** 25 g gljive je usitnjeno i homogenizovano u 0.1 M acetatnom puferu pH 6.5 u ultrazvučnom kupatilu. Temperatura vode je održavana na  $20 \pm 2^\circ C$ . Ekstrakcija je trajala tri sata. Ekstrakt je zatim centrifugiran 20 min na 2000 rpm, a zatim i 5 min na 13400 rpm. Supernatanti su preko noći držani na  $+4^\circ C$  (Plat 1987).

**Određivanje aktivnosti enzima.** Određivan je optimalni metod za ispitivanje aktivnosti haloperoksidaze. Najbolju reproducibilnost i aktivnost dala je reakciona smeša koja se sastojala od 5  $\mu\text{M}$  fenol-crvenog, 0.1 mM KBr i 30% rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$ , te je upravo ona korišćena pri daljem radu:

- 2 mL 5  $\mu\text{M}$  fenol-crvenog
- 0.2 mL 0.1 mM KBr
- 0.2 mL 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$
- 0.5 mL 0.1 M acetatnog pufera pH 6.5
- 0.5 mL ekstrakta enzima

Sva merenja apsorbanci rađena su na spektrofotometru (Cintra 10, GBC Spectral UV/Vis spectrophotometer, Melbourne) na 590 nm. Korišćenjem dobijenih apsorbanci preračunata je aktivnost enzima uz korišćenje formule:

$$\frac{V \times \Delta A_{\text{minut}}}{\epsilon \times d \times v}$$

gde je:  $V$  celokupna zapremina reakcione smeše u mL,  $\Delta A_{\text{minut}}$  – iznos promene apsorbance u toku minuta (na 590 nm za fenol-crveno),  $d$  – talasna dužina u cm (1.0),  $v$  – zapremina enzima u uzorku u mL,  $\epsilon$  – molarni koeficijent apsorpcije proizvoda (za fenol-crveno na 590 nm je  $0.0148 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Petronijević 2007).

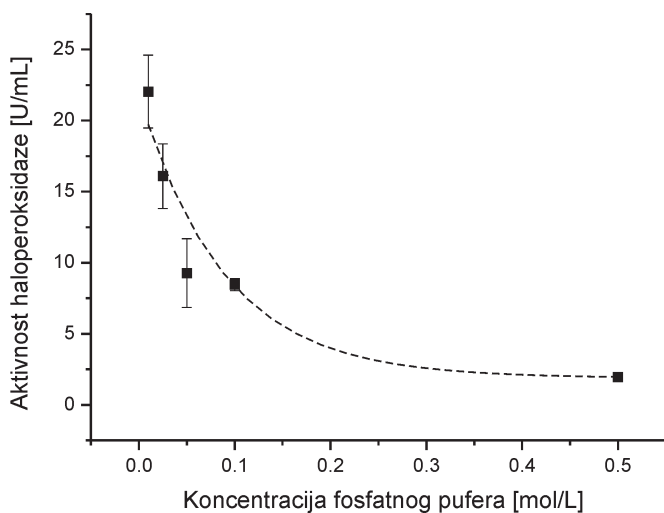
**Inhibicija fosfatima.** Poznato je da fosfati inhibiraju haloperoksidaze (Hemrika 1997), tako da je ispitivan njihov uticaj na enzim. U reakcionu smešu, koja je korišćena za utvrđivanje aktivnosti enzima, dodavana je odgovarajuća zapremina fosfatnog pufera pH 7 umesto acetatnog pufera.

**Supstratna specifičnost enzima.** U eksperimentu je sem navedenih halogenida (KBr, KCl i KI) korišćen i KF kao supstrat za koji dosada nije pokazano da ga haloperoksidaza može oksidovati (Bommarius 2004). Određivana je supstratna specifičnost delovanja enzima. Korišćen je isti metod za određivanje aktivnosti enzima kao kod ispitivanja inhibicije fosfatima. Umesto KBr dodavan je odgovarajući halogeni supstrat (0.1 mM KF, KCl, odnosno KI).

## Rezultati

### Inhibicija fosfatima

Na slici 2 je prikazana inhibicija haloperoksidaze fosfatnim puferom sa povećanjem njegove koncentracije. Uočava se da se sa povećanjem koncentracije fosfatnog pufera skoro linearno smanjuje aktivnost haloperoksidaze.



Slika 2.  
Inhibicija haloperoksidaze fosfatnim puferom

Figure 2.  
Inhibition of haloperoxidase with phosphate buffer

### Supstratna specifičnost enzima

Haloperoksidaza je pokazala najveću aktivnost sa KF kao supstratom od  $38 \pm 11$  U/mL, dok sa KCl i KI kao supstratima  $6 \pm 2$  U/mL i  $30 \pm 5$  U/mL, respektivno.

Tabela 1. Specifičnost haloperoksidaze ka različitim supstratima

Supstrat	Aktivnost enzima [U/mL]			Sr. vrednost
	Izmerene vrednosti			
KF	48.8	29.2	35.4	$38 \pm 11$
KCl	5.4	8.1	3.7	$6 \pm 2$
KI	26.9	29.0	35.5	$30 \pm 5$

### Diskusija

Na slici 2 se vidi da se aktivnost haloperoksidaze proporcionalno smanjuje sa povećanjem koncentracije fosfatnog pufera. To se može tumačiti podacima o prisustvu vanadijuma u aktivnom centru ovog enzima. Istraživanje je najpre rađeno sa KBr kao supstratom, a kasnije su ispitani i drugi kalijum-halogenidi (KI, KCl i KF) u ulozi supstrata. Najveća aktivnost enzima je pokazana sa KF. Ispitivanja aktivnosti enzima rađena sa navedenim supstratima pokazala su da haloperoksidaza može da oksiduje sve halogenide sem fluorida, tako da je u ovom slučaju dobijen nov rezultat. Navedeno govori o tome da kod gljive *Postia caesia* nije u

pitanju samo bromoperoksidaza već haloperoksidaza koja ima afinitet za sve halogenidne supstate, uključujući i fluorid. Kako je istraživanje vršeno sa sirovim ekstraktom postoji mogućnost da je bio prisutan skup više haloperoksidaza od kojih jedna oksiduje fluorid.

## Zaključak

Dobijeni rezultati pokazuju da u ispitivanoj gljivi (*Postia caesia*) postoji enzim haloperoksidaza i ta gljiva predstavlja novi uzorak koji sadrži ovaj enzim. Poznato je da fosfati inhibiraju vanadijumske haloperoksidaze, tako da se uočava pravilna inhibicija fosfatnim puferom što predstavlja očekivani rezultat. Takođe, haloperoksidaza je pokazala najveći afinitet za KF kao supstrat što je nov rezultat zato što dosadašnja istraživanja govore da haloperoksidaza sa ovim supstratom ne pokazuje aktivnost. Iz navedenog se može zaključiti da gljiva ne sadrži haloperoksidazu specifičnu samo za jedan halogenidni supstrat, već haloperoksidazu koja ima afinitet za različite supstrate. Kako je enzim pronađen u biološkoj vrsti koja do sada nije ispitivana, to ostavlja prostor za dalja istraživanja.

**Zahvalnost.** Veliku zahvalnost dugujem prof. Živomiru Petronijeviću sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, na korisnim sugestijama prilikom izrade ovog rada, svom mentoru dipl. bioh. Milici Grozdanović, kao i dipl. bioh. Voinu Petroviću sa Hemijskog fakulteta u Beogradu, na sugestijama i praćenju same realizacije rada.

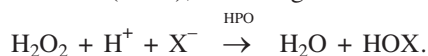
---

## Literatura

- Bommarius A. S., Riebel B.R. 2004. *Biocatalysis*. Wiley
- Đurđić V. 2000. *Medicinska biohemija*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva
- Hemrika W., Renirie R., Dekker H. L., Barnett Ph., Wever R. 1997. From phosphatases to vanadium peroxidases: A similar architecture of the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 2145.
- Hemrika W., Renirie R., Macedo-Ribeiro S., Messerschmidt A. Wever R. 1999. Heterologous Expression of the Vanadium-Containing Chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis* in *Saccharomyces cerevisiae* and Site-directed Mutagenesis of the Active Site Residues His496, Lys353, Arg360 and Arg490. *J. Biol. Chem.*, **274**: 23820
- Petronijević Ž. 2007. Materijali za *Praktikum za vežbe iz enzimologije*. Leskovac: Tehnološki fakultet
- Plat H., Krenn B. E. and Wever R. 1987. The bromoperoxidase from the lichen *Xanthoria parietina* is a novel vanadium enzyme. *Biochem. J.*, **248**: 277.

## Isolation and Characterisation of Haloperoxidase from the Fungus *Postia caecia*

Enzymes are a very important group of proteins. Cell metabolism is possible only in their presence. Haloperoxidases (HPO) are enzymes which catalyze a two electron oxidation of a halide ( $X^-$ ) to the corresponding hypohalous acid (HOX), according to the following reaction:



HOX may further react with a broad range of nucleophilic acceptors to form a diversity of halogenated compounds.

Haloperoxidases have been discovered in some seaweeds (*Corallina officinalis*), lichens (*Xanthoria parietina*) and in some fungi (*Curvularia inaequalis*). These enzymes have a very important role in biotechnology where they are used as biocatalyzers in biosynthesis.

In our research we characterized a novel haloperoxidase from fungi. The experiments were carried out *in vitro*. The enzyme was extracted from the fungus and its activity was measured in an assay with 5  $\mu$ M phenol-red, 0.1 mM KBr and a 30% solution of  $H_2O_2$ .

Absorbances were measured on Cintra 10, GBC Spectral UV/Vis spectrophotometer, Melbourne at 590 nm for phenol-red. Enzyme activity was calculated using the following equation:

$$\frac{V \times \Delta A_{\text{minut}}}{\varepsilon \times d \times v}$$

where  $V$  – total volume of the assay mixture in mL,  $\Delta A_{\text{minut}}$  – rate of change of absorbance per minute (at 590 nm for phenol-red),  $d$  – light path in cm (1.0),  $v$  – volume of enzyme assay mixture in mL,  $\varepsilon$  – molar absorption coefficient (Bromphenol Blue at 590 nm = 0.0148  $\mu$ M/cm<sup>3</sup>).

Furthermore, the use of a phosphate buffer in the activity assay (in different concentrations) showed inhibition of haloperoxidase activity. The enzyme showed more activity with KF as a substrate than with KCl, KI and KBr.

These results show that an, until now undescribed, haloperoxidase exists in *Postia caesia*. Further more, not only is there a bromoperoxidase present in this fungus, but there are also other haloperoxidase which have affinity for different substrates. This is the first reported case of a haloperoxidase that is capable of oxidizing a fluoride ion. In order to investigate the enzyme properties in depth and to devise a potential commercial application, further investigation ought to be performed.

