

## Inkapsulacija peroksidaze cvekle (*Beta vulgaris* L.) kao model zaštite enzima od inhibitornog uticaja teških metala

---

*Grupa enzima (EC 1.11.1.X) koja uključuje peroksidazu (EC 1.11.1.7) detoksikuje žive organizme katališući razlaganje vodonik-peroksida. Peroksidaza katalizuje istu reakciju u industrijskim uslovima, pri prečišćavanju otpadnih voda. U ova-koj sredini joni teških metala, snažni inhibitori enzimske aktivnosti, značajno smanjuju prinos procesa. U ovom radu ispitana je mogućnost primene imobilizacije radi zaštite enzima od inhibitornog uticaja teških metala. Imobilizacija je skup tehnika kojima se ograničava kretanje enzima uz očuvanje njegove akti-vnosti. Peroksidaza korena cvekle izolovana je homogenizacijom i amonijum-sulfatnim taloženjem. Aktivnost enzima merena je standardnim ABTS esejom i u dijalizatu iznosi (10.9±0.6) U/mL. Uticaj teških metala na aktivnost enzima ispi-tan je nakon dvanaestčasovne inkubacije enzima sa solima srebra(I), olova(II) i gvožđa(III). Najbolji inhibitorni efekat pokazalo je srebro(I), dok su olovo(II) i gvožđe(III) slične inhibitorne moći. IC<sub>50</sub> vrednosti za navedene metale iznose (16.8±0.7), (20.5±0.9) i (20.5±0.9) mmol/L, redom. Imobilizacija je izvedena inkapsulacijom enzima kalcijum-alginatom. IC<sub>50</sub> vrednosti za inkapsuliran enzim iznose (20.8±0.9), (27±1) i (32±2) mmol/L za inhibiciju srebrom(I), olovom(II) i gvožđem(III), redom. Za sve sisteme je zajedničko da je IC<sub>50</sub> vrednost povećana. Alginatna kapsula pruža zaštitu od teških metala, te se preporučuje dalje ispitivanje u cilju optimizacije osobina kapsule za uslove industrijske primene.*

---

### Uvod

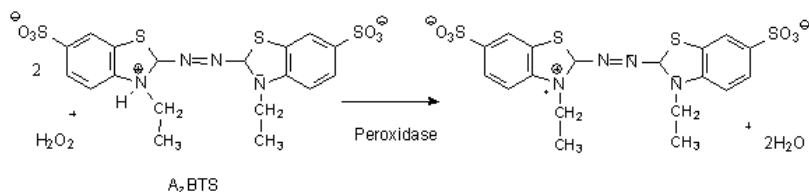
Delimično redukovani oblici kiseonika osnovni su toksični metabolički produkti živih organizama. Ovakve supstance, među kojima je vodonik-peroksid, veoma su reaktivne i brzo stupaju u reakcije slobodno-radikalskog mehanizma. Tada dolazi do oštećenja biomolekula, što može uzrokovati pre vremenu smrt ćelije, promene u međućelijskoj tečnosti i nastanak različitih bolesti. Ove pojave su bitni faktori koji utiču na sta-renje i smrt organizma (Harman 1991). Najčešći molekuli sa delimično redukovanim atomom kiseonika u živim sistemima su superoksidni (O<sup>2-</sup>) i

---

Igor Asanović (1992),  
Ruma, Franje Kluza  
21, učenik 4. razreda  
Srednje medicinske  
škole „Draginja  
Nikšić” u Sremskoj  
Mitrovici

peroksidni ( $O_2^{2-}$ ) jon, hidroksil-radikal ( $\cdot OH$ ) i vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) (Tzika *et al.* 2001).

Poznato je šesnaest enzima zaduženih za redukciju vodonik-peroksida koji čine grupu peroksidaza (EC 1.11.1.X). Najčešći predstavnici peroksidaza su katalaza – CAT (EC 1.11.1.6), peroksidaza – POD (EC 1.11.1.7) i glutation-peroksidaza – GSH-Px (EC 1.11.1.9). POD je katjon-zavisan protein, čiji se mehanizam dejstva zasniva na cikličnoj redukciji gvožđe(III)-jona pogodnim supstratom i oksidaciji nastalog gvožđe(II)-jona vodonik-peroksidom (Kadnikova i Kostić 2002). Reakcija vodonik-peroksida katalizovana peroksidazom sa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselinom) – ABTS kao oksidujućim supstratom prikazana je jednačinom:



Peroksidaza (POD) je najviše zastupljena u renu (*Armoracia rusticana* L.). Kako primena ovog enzima raste, ispituje se njegov sadržaj u drugim biljnim vrstama slične morfologije korena (ren, rotkva, repa, peršun). Između ostalog, u korenu cvekle (*Beta vulgaris* L.) je detektovan značajan sadržaj ovog enzima (Rudrappa *et al.* 2005).

Osim što imaju značajnu ulogu u zaštiti i razvojnim procesima organizama, peroksidaze su našle primenu u različitim granama privrede. Najznačajnija industrijska upotreba POD je prečišćavanje otpadnih voda od peroksida, fenola, indola, amina, alkohola, formaldehida itd. (Tzika *et al.* 2008). Pored toga, koristi se u analitičke svrhe, u kliničkoj dijagnostici i prehrambenoj industriji: radi otkanjanja peroksida iz hrane i njenog konzervisanja (Rudrappa *et al.* 2005).

Primenu peroksidaze u industriji značajno ometaju inhibitori enzimske aktivnosti. Jedni od najčešće prisutnih inhibitora u otpadnim vodama jesu teški metali (Güngör 2008). Oni u malim koncentracijama inhibiraju enzim, što rezultuje smanjenjem brzine reakcije i prinosa procesa. (MacFarlane 2001).

Imobilizacija je skup tehnika kojima se, ma kojim mehanizmom, postiže ograničenje kretanja enzima, pri čemu enzimska aktivnost ostaje očuvana. Jedna od metoda imobilizacije je inkapsulacija enzima. Odgovarajućim podešavanjem uslova oko molekula enzima se formira selektivno propustljiva polimerna kapsula. Kretanje enzima se ograničava i rukovanje njime olakšava. Imobilizovan enzim se jednostavno odstranjuje iz sistema i ponovo upotrebljava (Nahakpam *et al.* 2008).

Kroz gel kapsule, zajedno sa molekulima supstrata lako difunduju joni teških metala, čestice sličnih ili manjih dimenzija (Kadnikova i Kostić 2002). Međutim, s obzirom na suprotno naelektrisanje gela i jona metala može se pretpostaviti da bi se jedan deo tih jona zadržao na gelu. Jednovalentni katjoni bi relativno lako difundovali do enzima i inhibirali njegovu aktivnost. Dvo- i trovalentni joni bi se snažnije i većim brojem veza vezivali za negativno naelektrisanu alginatnu mrežu, kao što to čine joni kalcijuma(II). Tako bi inhibitorni uticaj ovih jona na enzimsku aktivnost mogao biti smanjen.

U skladu sa tim, ima smisla pretpostaviti da bi, u slučaju peroksidaze, imobilizacija mogla da olakša njenu upotrebu za prečišćavanje otpadnih voda sa rastvorenim solima teških metala.

U ovom radu je ispitan uticaj prirode (veliĉine i naelektrisanja) i koncentracije jona teških metala na aktivnost neimobilizovane i kalcijum-alginatom imobilizovane peroksidaze cvekle. Na osnovu rezultata, moglo bi se utvrditi može li se, i eventualno u kojim slučajevima, imobilizacija koristiti za zaštitu enzima od inhibitornog uticaja teških metala u cilju olakšavanja njegove primene pri prečišćavanju otpadnih voda.

## Materijal i metode

Peroksidaza je ekstrahovana iz korena crvene cvekle. Droga je homogenizovana u prisustvu fosfatnog pufera i polivinilpirolidona, a enzim izolovan taloženjem amonijum-sulfatom zasićenja 80%, centrifugiranjem i dijalizom naspram česemske vode. Enzim je inkubiran mešanjem odgovarajućih zapremina acetatnog pufera, rastvora nitrata teških metala i sto puta razblaženog rastvora enzima. Rastvor za esej pripremljen mešanjem inkubiranog enzima sa rasvorima ABTS i vodonik-peroksida. Merena je apsorbancija rastvora svakih deset sekundi tokom dva minuta i izračunate enzimске aktivnosti izražene u internacionalnim jedinicama. Jedna jedinica definisana je kao koliĉina enzima koja transformiše 1  $\mu$ mol supstrata po minuti na 25°C pri gore navedenim uslovima. Slepa proba je pripremljena istim postupkom, samo što je umesto rastvora enzima dodavan pufer. Na osnovu dobijenih podataka izračunata je IC<sub>50</sub> vrednost za svaki teški metal pojedinaĉno. POD je imobilizovana ukapavanjem smeše ekstrakta enzima i natrijum-alginata u rastvor kalcijum-hlorida. Eseji imobilizovanog enzima su identični esejima neimobilizovanog, osim što je umesto razblaženog rastvora enzima korišćena odgovarajuća masa imobilizata. Masena koncentracija proteina u svim uzorcima određena je Bredfordovom metodom sa Coomassie Brilliant Blue G-250 kao bojom i albuminom govedeg seruma kao standardom. Sve brojĉane vrednosti i potrebne formule date su u daljem tekstu u okviru ovog odeljka.

**Ekstrakcija peroksidaze.** Peroksidaza je ekstrahovana iz korena crvene cvekle (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, convar *vulgaris*, var. *vulgaris*). Biljke starosti četiri meseca gajene bez tretiranja pesticidnim agensima, izvađene su i nakon odstranjivanja nadzemnog dela čuvane su pet dana na temperaturi 4°C. Neoljušten, opran i grubo isečen koren cvekle mase 180 g potopljen je u 800 mL fosfatnog pufera (pH 7) koncentracije 50 mmol/L u kom je rastvoren polivinilpirolidon – PVP (maseni udeo 2%). Koren cvekle je homogenizovan u blenderu maksimalnom brzinom šest puta po 15 s uzastopno. Dobijeni homogenat proceden je kroz dvosloj gaze i nakon sat vremena inkubacije na 4°C centrifugiran tokom 90 minuta (centrifugalno ubrzanje 1600 g, HARRIER 15/80). Talog je odstranjen i deo supernatanta uzorkovan radi ispitivanja sirovog ekstrakta. U tečnu fazu ravnomerno je, tokom trideset minuta, dodavan fino usitnjen amonijum-sulfat do 40% zasićenja uz stalno mešanje i nakon jednog sata rastvor centrifugiran tokom 40 minuta (1600 g). Talog je odbačen i supernatant inkubiran sat vremena na 4°C. Nova količina amonijum-sulfata dodata je do 80% zasićenja i smeša mešana jedan sat na magnetnoj mešalici. Talog dobijen centrifugiranjem tokom 40 minuta (1900 g) rastvoren je u minimalnoj zapremini acetatnog pufera (pH 5) koncentracije 50 mmol/L i dijalizovan preko noći na 4°C (Vujčić 2002).

**Eseji neimobilizovanog enzima.** Rastvori enzima za inkubaciju zapremine 2.000 mL (preciznost reda mikrolitra, automatska pipeta EPPENDORF) pripremljeni su mešanjem odgovarajućih zapremina acetatnog pufera (pH 5, koncentracija 0.050 mol/L), rastvora nitrata teških metala (koncentracija 0.400 mol/L) i 0.250 mL 100 puta razblaženog rastvora enzima. Inkubacija je trajala dvanaest časova na temperaturi 4°C. Radi određivanja aktivnosti peroksidaze dodato je 0.100 mL rastvora ABTS (koncentracija 10.0 mmol/L) i 0.100 mL rastvora vodonik-peroksida (koncentracija 0.033 mol/L) u 0.800 mL inkubiranog rastvora. Merena je apsorbanca rastvora na 419 nm (spektrofotometar, ISKRA), svakih deset sekundi tokom dva minuta. Izračunate su enzimske aktivnosti izražene u internacionalnim jedinicama (formula data dalje u tekstu). Boja potiče od nastalog zelenog oksidovanog oblika ABTS. Jedna jedinica (U) definisana je kao količina enzima koja transformiše 1  $\mu$ mol supstrata po minuti na 25°C pri gore navedenim uslovima (Vujčić 2002). Slepa proba je pripremnjena istim postupkom, samo što je umesto rastvora enzima dodavan pufer.

Ispitana je aktivnost POD cvekle u prisustvu sledećih jona teških metala: Ag<sup>+</sup>, Pb<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup>. Teški metali u rastvorima za enzimski esej su se nalazili u sedam koncentracija: 0, 3, 6, 8, 13, 20 i 30 mmol/L. Izračunata je IC<sub>50</sub> vrednost, koja predstavlja koncentraciju teškog metala koja smanjuje aktivnost enzima na jednu polovinu maksimalne. Za izračuna-

vanje je korišćen zakon opadajuće eksponencijalne zavisnosti aktivnosti enzima od koncentracije inhibitora:

$$c_{1/2} = c_0 \cdot \exp(-k \cdot IC_{50}),$$

gde je  $c_{1/2}$  polovina maksimalne koncentracije enzimske aktivnosti,  $c_0$  maksimalna koncentracija enzimske aktivnosti (bez prisustva teških metala), a  $k$  konstanta karakteristična za dati reakcioni sistem određena pomoću krive zavisnosti (Güngör 2008).

Sva ispitivanja rađena su spektrofotometrijski (CECIL CE2021) u klimatizovanoj prostoriji na 25°C nakon jednočasovnog stajanja svih rastvora na navedenoj temperaturi.

**Određivanje masene koncentracije proteina.** Određena je masena koncentracija proteina u ekstraktu Bredfordovom metodom. Kao boja u reagensu korišćen je Coomassie Brilliant Blue – CBB G-250. Standardnu seriju čine rastvori albumina goveđeg seruma – BSA (boven serum albumine). Apsorbanca rastvora je merena na 595 nm nakon dodavanja 0.100 cm<sup>3</sup> rastvora analize/standarda u 5.00 mL reagensa.

**Imobilizacija peroksidaze.** Pripremljen je 1.000 mL rastvora za imobilizaciju mešanjem 0.500 mL sto puta razblaženog ekstrakta enzima i iste zapremine rastvora natrijum-alginata masenog udela 4%. Potom je ovaj rastvor insulinskim špricom ukapavan u 15 mL rastvora kalcijum-hlorida koncentracije 1 mol/L brzinom 0.2 kapi po sekundi uz mešanje mehaničkom mešalicom. Time su dobijene polimerne kapsule sa imobilizovanim enzimom. Smeša je ostavljena dvanaest časova na temperaturi 4°C. Potom je rastvor odliven i kapsule dva puta isprane acetatnim puferom (pH 5) koncentracije 50 mmol/L i ostavljene u minimalnoj zapremini istog pufera na temperaturi 4°C. Rastvor kalcijum-hlorida i ispirci puferom sačuvani su radi određivanja masene koncentracije proteina i prinosa imobilizacije. Ceo postupak imobilizacije izveden je šest puta u odvojenim sudovima, a imobilizati sjedinjeni. Tako dobijene kapsule čuvane su na 4°C i korišćene za eseje imobilizovanog enzima.

**Eseji imobilizovanog enzima.** Eseji imobilizovanog enzima su identični esejima neimobilizovanog, osim što je umesto 0.100 mL razblaženog rastvora enzima korišćena odgovarajuća masa imobilizata (0.091 g).

## Rezultati i diskusija

### Ekstrakcija peroksidaze

Nakon blendiranja u fosfatnom puferu i filtriranja kroz gazu dobijen je homogenat. Rastvor je veoma viskozan, svetlo ljubičast i sadrži znatnu masu vlaknastih balastnih supstanci. Centrifugiranjem su ove supstance otklonjene a antocijanski pigmenti zadržani, tako da je rastvor postao

tamniji, bistriji i manje viskozan. Primarnim taloženjem amonijum-sulfatom otklonjeni su nepoželjni proteini i njihovi derivati. Sekundarnim taloženjem u talog je prešla proteinska frakcija koja sadrži peroksidazu, izvesnu količinu sličnih enzima i većinu antocijana. Supernatant je odliven i talog rastvoren u minimalnoj zapremini acetatnog pufera. Potom je ostavljen da dijalizuje preko noći naspram česmenske vode. Veći molekuli antocijana su ostali koncentrovani u dijalizatu, tako da je on tamno mrk i gotovo neprovidan. Konačna zapremina dijalizovanog ekstrakta iznosila je 18 mL.

## Eseji neimobilizovanog enzima

Standardnim ABTS enzimskim esejom određena je aktivnost POD sirovog ekstrakta, POD dijalizata i POD inkubirane sa teškim metalima. U svim esejima korišćeni su sto puta razblaženi ekstrakti.

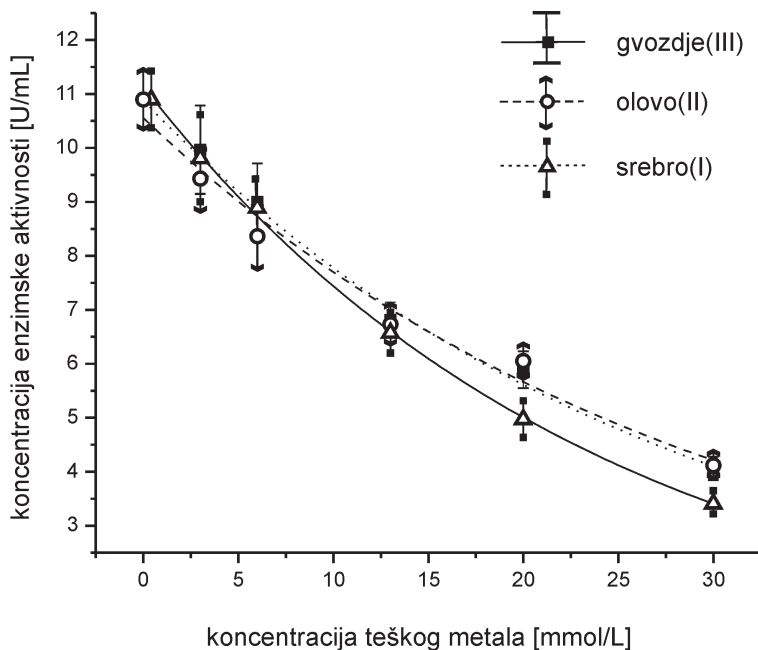
Aktivnost enzima u sirovom ekstraktu data je u tabeli 1. U istoj tabeli uočava se da masena koncentracija proteina ima visoku vrednost, a uticaj teških metala u ovom stadijumu nije ispitan.

Masa proteina i njihova aktivnost u dijalizatu prikazani su u tabeli 1. Povećanje aktivnosti posledica je dve pojave. Prva je otklanjanje supstanci koje mogu da ometaju aktivnost enzima, a druga smanjenje viskoznosti koje omogućava veću brzinu reakcije. Antocijani koji se nalaze u homogenatu i dijalizatu ne ometaju merenje enzimске aktivnosti i pored koagulacije u golim okom vidljive čestice u ekstraktu. Stostrukim razblaživanjem ekstrakta ove čestice se rastvaraju.

Uticaj teških metala na peroksidazu prikazan je na slici 1.

Uočljivo je da joni srebra(I) najbolje inhibiraju enzim.  $IC_{50}$  vrednost izračunata na osnovu podataka dobijenih iz krive na slici 1. iznosi  $(16.8 \pm 0.7)$  mmol/L. Neposredno po dodatku rastvora srebro-nitrata u rastvor enzima i pufera nije došlo do uočljivih promena. Međutim, u toku inkubacije se kod koncentracija preko 15 mmol/L pojavila mala količina žućkastog taloga koja je otklonjena centrifugiranjem u minifugi (3500 g, EPPENDORF). Pretpostavljen mehanizam inhibicije jeste da se peroksidaza delom denaturiše reakcijom jona srebra(I) sa slobodnim karboksilnim grupama enzima, i da potom dolazi do koagulacije denaturisanog proteina. Bledo žuta boja verovatno potiče od zaostalih fosfata adsorbovanih na enzimsku površinu, koji sa srebrom(I) grade žuto zamućenje.

Olovo(II) i gvožđe(III) pokazali su veliku podudarnost u inhibiranju aktivnosti peroksidaze.  $IC_{50}$  vrednost za gvožđe(III) iznosi  $(19.2 \pm 0.8)$  mmol/L, a za olovo(II)  $(20.5 \pm 0.9)$  mmol/L. Razlika je u nivou greške merenja, tako da se može smatrati da ova dva metala imaju jednaku potenciju inhibicije peroksidaze. Pored toga, pretpostavljeni su različiti mehanizmi inhibicije. Kod gvožđa(III), pri mešanju enzima sa rastvorom metala do-



Slika 1.  
 Uticaj koncentracije gvožđa(III), olova(II) i srebra(I) na aktivnost peroksidaze cvekle

Figure 1.  
 Influence of iron (III), lead (II) and silver (I) concentration on red beet peroxidase activity

lazi do pomeranja boje rastvora iz narandžaste u crvenu. To je verovatno posledica dejstva ligandnog polja atoma azota aminokiselina enzima koji koordinišu višak gvožđa(III). Kao rezultat ovog vezivanja dolazi do promene oblika proteina i smanjenja aktivnosti. Pretpostavlja se da kod olova(II) dolazi do kompeticije sa jonom gvožđa(III) u porfirinskom prstenu hema. Pri dodatku ovog metala nije došlo do vizuelno uočljivih promena u rastvoru, tako da je potrebno dodatno ispitivanje kako bi se izveo pouzdaniji zaključak o mehanizmu inhibicije.

### Imobilizacija peroksidaze

Ukupna masa imobilizata iznosi 2.72 g, a ukupan broj kapsula 240. Kapsule su mrke usled prisustva antocijana, tako da su lako uočljive i mogu se odlivanjem pouzdano odvojiti od rastvora. U tabeli 1 prikazane su mase proteina u kalcijum-hloridnom rastvoru i prvom i drugom ispirku. Merenjima mase proteina i aktivnosti enzima potvrđeno je da najveći deo neinkapsuliranih proteina ostaje adsorbovan na površinu kapsule i ispira se tek zakišeljavanjem puferom. Izračunat prinos imobilizacije iznosi  $(90.0 \pm \pm 0.8)\%$ .

### Eseji imobilizovanog enzima

Merenjem aktivnosti imobilizovane peroksidaze utvrđeno je da je najveći deo imobilizovanog enzima ostao aktivan i nakon ovog postupka. Rad korišćenog spektrofotometra nije ometalo prisustvo alginatnih kapsula

Tabela 1. Pregled karakteristika različitih stepena prečišćenosti peroksidaze cvekle i njenog imobilizata

	koncentracija enzimске aktivnosti (U/mL)	enzimska aktivnost (U)	zapremina (mL)	masena koncentracija proteina (g/L)	masa proteina (μg)	aktivnost enzima po jedinici mase proteina (U/mg)	stepen prečišćenosti**
homogenat	0.75(4)	0.23(2)	300	0.48(3)	131(8)	1.6(2)	1
dijalizat	10.9(6)	0.20(1)	18.0	0.81(2)	16(2)	14(1)	9
imobilizat	9.3(6)	0.028(2)	3.000*	0.37(2)	2.2(2)	13.4(8)	8.4
kalcijum-hloridni rastvor	–	–	900	0.129±0.(9)	116(8)	–	–
prvi ispirak	–	–	12.0	0.102(8)	1.22(7)	–	–
drugi ispirak	–	–	15.0	(1.5±0.1) ×10 <sup>-3</sup>	2.2(4)	–	–

\* ukupna zapremina ekstrakta dispergovanog u imobilizatu  
 \*\* odnos aktivnosti enzima po jedinici mase proteina u uzorku i homogenatu

na dnu kivete. Time je omogućeno kontinuirano snimanje. Za eseje je korišćena jedna tridesetina (0.091 g) ukupne mase imobilizata koju čini u proseku osam alginatnih kapsula.

Aktivnost imobilizovanog enzima prikazana je u tabeli 1, a preračunata na jedinicu mase imobilizata iznosi (4.2±0.3) U/g. Kada se prva navedena vrednost uporedi sa neimobilizovanim enzimom i u obzir uzme gubitak proteina usled imobilizacije, rezultat je smanjenje aktivnosti enzima usled inkapsulacije od približno 14.8%. To je blisko očekivanoj vrednosti za inkapsulaciju kalcijum-alginatom (Nahapkam 2008).

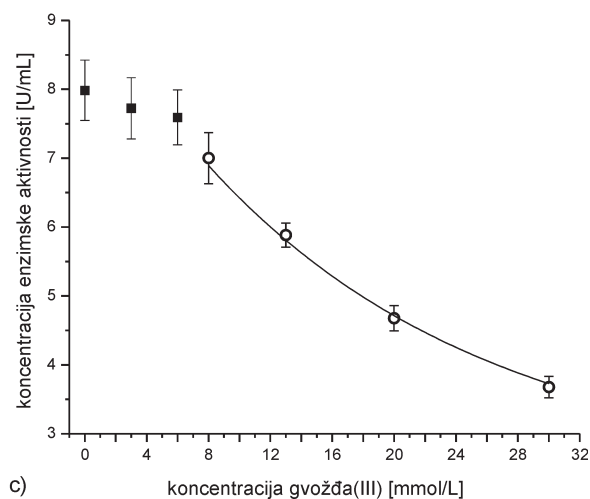
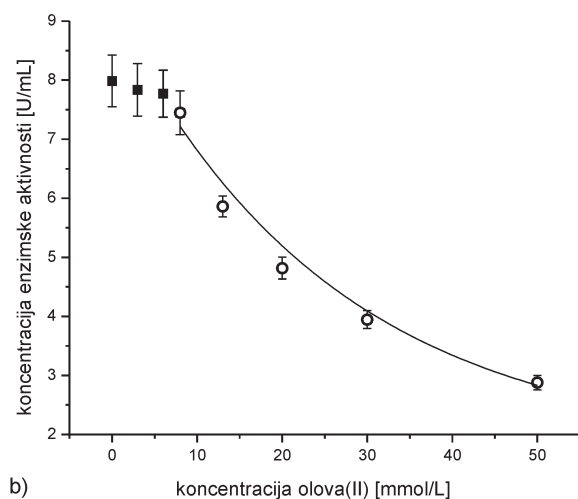
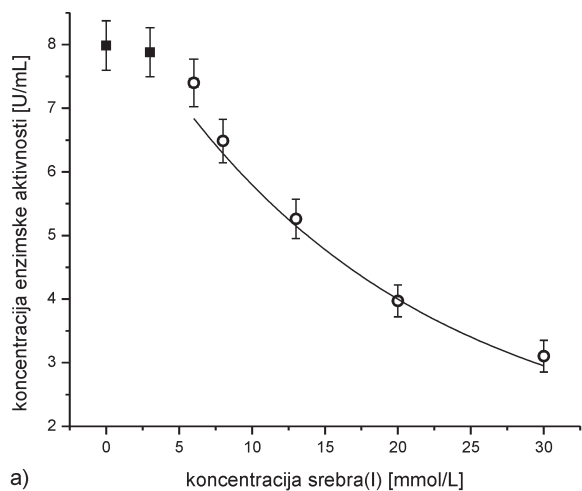
U tabeli 1 prikazane su osnovne karakteristike homogenata (svežeg ekstrakta), amonijum-sulfatnog dijalizata i imobilizata.

Zavisnost aktivnosti imobilizovane POD cvekle od koncentracije teških metala (srebra(I), olova(II) i gvožđa(III), redom) prikazana je na slici 2.

Kod imobilizovanih enzima uočljiva su dva različita dela grafika. Prvih tri do pet tačaka (crni kvadrati na graficima) grade plato koji linearno pada ka x-osi, i nakon određene granične vrednosti koncentracije počinje eksponencijalni pad (beli kružići na slikama). Ova pojava može se tumačiti zadržavanjem jona teških metala na površini kapsule do određene koncentracije, nakon čega dolazi do intenzivnijeg prodiranja jona u unutrašnjost kapsule i inhibicije enzima.

Nakon preliivanja kapsula rastvorom srebrno-nitrata uočava se bela sluz, i to u rastvorima svih ispitivanih koncentracija većih od 3 mmol/L.





Slika 2.

Zavisnost aktivnosti imobilizovane POD cvekle od koncentracije srebra(I) (a), olova(II) (b) i gvožđa(III) (c). Delovi krive označeni crnim kvadratima (linearan pad) i belim kružićima (eksponencijalan pad) označavaju oblast koncentracija sa zadržavanjem jona na kapsuli, odnosno oblast njihovog prodiranja u kapsulu.

Figure 2.

Dependence of immobilized peroxidase activity of silver(I) concentration (a), lead(II) concentration (b) and iron(III) concentration (c). Parts of the curve marked by black squares (linear fall) and white dots (exponential fall) signify concentration zone with ion retention on the capsule and zone of their penetration into the capsule, respectively.

Pored toga javlja se i svetlo mrko obojenje rastvora kod koncentracija 20 i 30 mmol/L. Pretpostavlja se da sa malobrojnim jonizovanim karboksilnim grupama alginata srebro(I) reaguje stvarajući sluzavu strukturu. Mrko obojenje rastvora pri višim koncentracijama može biti uzrokovano značajnijom promenom strukture alginatne mreže. Tada se stvaraju pore dovoljno velike da propuste molekule antocijana koji napuštaju kapsulu.  $IC_{50}$  vrednost imobilizovanog enzima inhibiranog srebrom(I) iznosi  $(20.8 \pm 0.9)$  mmol/L, što je za 26% veće od  $IC_{50}$  vrednosti neimobilizovanog enzima.

Alginatna kapsula smanjuje sličnost inhibicije olovom(II) i gvoždem(III). Kod gvožđa(III) uočava se gotovo linearna kriva, sa blagim ekspancijalnim padom nakon koncentracije 8 mmol/L. Kod olova(II) uočava se jasnija razlika između ova dva dela. Granična vrednost je takođe 8 mmol/L. Može se zaključiti da se olovo(II) u nižim koncentracijama zadržava na kapsuli bolje od gvožđa(III) i pored toga što je manje naelektrisano. Ovo se može tumačiti poređenjem poluprečnika jona gvožđa(III) (69 nm u niskospinskom stanju) i olova(II) (133 nm) sa prečnikom jona kalcijuma(II) (114 nm) koji se najbolje uklapa među karboksilne grupe u porama polimerne mreže (Nahakpam 2008). Pored toga, deo olova(II) se zadržava na površini usled građenja olovo(II)-hlorida sa zaostalim hloridnim jonima na kapsulama. Tvrdnja da kapsula bolje štiti od olova(II) ogleda se i u  $IC_{50}$  vrednosti: za olovo(II) iznosi  $(31 \pm 2)$  mmol/L (relativno povećanje 43% u odnosu na neinkapsuliran enzim), a za gvožđe(III)  $(27 \pm 1)$  mmol/L (relativno povećanje 39%). Poređenje sa zaštitom od srebra(I) potvrđuje da su oligovalentni joni bolje zadržani od monovalentnih usled stvaranja više veza sa alginskom kiselom.

## Zaključak

Peroksidaza je izolovana iz korena cvekle homogenizacijom i amonijum-sulfatnim taloženjem. Karakteristično za ekstrakt je mrko obojenje koje potiče od zaostalih antocijana i preporučuje se optimizacija postupka ekstrakcije u cilju njihovog otklanjanja.

Teški metali inhibiraju enzim, pri čemu  $IC_{50}$  vrednosti iznose  $(16.8 \pm 0.7)$  mmol/L za srebro(I),  $(19.2 \pm 0.8)$  mmol/L za gvožđe(III) i  $(20.5 \pm 0.9)$  mmol/L za olovo(II). Dakle, srebro(I) je bolji inhibitor od olova(II) i gvožđa(III), koji su slične inhibitorске moći. Imobilizacija kalcijum-alginatom inkapsulira enzim sa malim gubitkom aktivnosti.  $IC_{50}$  vrednosti imobilizovanog enzima su veće od onih za neimobilizovan i iznose  $(20.8 \pm 0.9)$ ,  $(27 \pm 1)$  i  $(31 \pm 2)$  mmol/L za srebro (I), gvožđe(III) i olovo(II), redom. Rezultati pokazuju da kapsula dobro zadržava jone teških metala u malim koncentracijama (do 8 mmol/L za  $Pb^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  i 5 mmol/L za  $Ag^+$ ) i da je za oligovalentne katjone slabije propusna nego za monovalentne.

Verovatno je da ovaj efekat zavisi od naelektrisanja, prečnika i hemijskih osobina jona.

Zajedničko za sve sisteme jeste da kapsula pruža zaštitu od teških metala i preporučuje se dalje istraživanje u cilju optimizacije osobina kapsule za primenu u industrijskim uslovima.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se Vladimiru Prokopoviću i Ivanu Mrkiću, studentima Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na pomoći oko izvođenja ekperimentalnog dela istraživanja i organizovanja rezultata merenja. Takođe, zahvaljujem se Aleksandri Dimitrijević, diplomiranom biohemičaru, na pomoći oko nabavke za rad neophodnih supstanci i prezentaciji o inkapsulaciji enzima koja je pomogla u osmišljavanju eksperimenata u okviru projekta.

---

## Literatura

- Güingör S. I. 2008. The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *African Journal of Biotechnology*, **7**: 2248.
- Harman D. 1991. The aging process: Major risk factor for disease and death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**: 5360.
- Kadnikova E. N., Kostić N. M. 2002. Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass. Effects of glass matrix on reactivity. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, **18**: 39.
- MacFarlane G. R., Burchett M. D. 2001. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the Grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin*, **42**(3): 233.
- Nahakpam S., Singh P., Shah K. 2008. Effect of Calcium on Immobilization of Rice (*Oryza sativa* L.) Peroxidase for Bioassays in Sodium Alginate and Agarose Gel. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **13**: 632.
- Rudrappa T., Neelwarne B., Kumar V., Lakshmanan V., Venkataramareddy S. R., Aswathanarayana R. G. 2005. Peroxidase production from hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). *Electronic Journal of Biotechnology*, **8**: 185.
- Tzika E. D., Sotiorudis T. G., Papadimitriou V., Xenakis. A. 2008. Partial purification and characterization of peroxidase from olives. *European food research and technology*, **228**: 487.
- Vujčić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija: Praktikum*. Beograd: Rantek

## Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Peroxidase Encapsulation as Model of Enzyme Protection from Inhibitory Effect of Heavy Metals

A Group of enzymes (EC 1.11.1.X) including peroxidase (EC 1.11.1.7) detoxifies living organisms catalyzing hydrogen-peroxide degradation. Nevertheless, it is being applied in industrial conditions, for example in waste water purification. In this medium are frequent ions of heavy metals, which are strong enzyme activity inhibitors. Immobilization is a technique which limits enzyme movement and facilitates operating with the same, but not destroying its activity. In this project, the possibility of using immobilization in order to protect enzyme from inhibitory effect of heavy metals was the purpose of research. Red beet peroxidase has been isolated by homogenization and ammonium-sulphate purification. Enzyme activity has been measured by standard ABTS enzyme assay, and is  $(10.9 \pm 0.6)$  U/mL in dialysate. Influence of heavy metals has been determined after twelve hours incubation with silver(I), lead(II) and iron(III) salts. Silver(I) shows the best inhibitory effect, while lead(II) and iron(III) have similar peroxidase inhibitory potential.  $IC_{50}$  values, for these three metals respectively, are  $(16.8 \pm 0.7)$  mmol/L,  $(20.5 \pm 0.9)$  mmol/L i  $(20.5 \pm 0.9)$  mmol/L. Immobilization has been performed by calcium-alginate encapsulation. After that, influence of heavy metals on immobilized enzyme has been determined.  $IC_{50}$  values for encapsulated enzyme are  $(20.8 \pm 0.9)$ ,  $(27 \pm 1)$  and  $(32 \pm 2)$  mmol/L for inhibition by silver(I), lead(II) and iron(III) respectively. It is common for all systems that  $IC_{50}$  values increase due to immobilization process and that alginate capsule provides effective protection from inhibitory effect of heavy metals, so further research to optimize capsule characteristics for use in industrial conditions is highly recommended.

