

Enzimaska oksidacija benzena peroksidazom iz rena (*Armoracia rusticana*)

Ispitivana je enzimaska oksidacija benzena, kao model sistema razgradnje aromatičnih jedinjenja prisutnih u nafti. Enzimaska aktivnost peroksidaze merena je spektrofotometrijski, gde je kao drugi supstrat korišćen vodonik peroksid. Utvrđena je zavisnost promene apsorbance od koncentracije benzena i pretpostavljeno je da dolazi do transfera elektrona sa benzena na vodonik peroksid. Pokazano je da je reakcija moguća u vodenoj sredini, što otvara mogućnost za primenu u ekološki ugroženim oblastima.

Uvod

Benzen je najjednostavniji predstavnik aromatičnih jedinjenja. Na sobnoj temperaturi je providna tečnost, slatkastog mirisa. Lako isparava i zapaljiv je. U prirodu dospeva na više načina: u vazduhu se nalazi u obliku svojih isparenja, prisutan je u zemljištu i vodi, a posebno ga puno ima u blizini fabrika, u nafti, proizvodima koji sadrže nepolarne rastvarače, a u velikoj dozi ga ima u dimu, naročito duvana. Vrlo često je ksenobiotik u prirodi. Slabo se rastvara u vodi. Akutni simptomi trovanja benzenom su bol u stomaku i glavi, mučnina, konvulzije, nesvestica i smrt. Hronični unos benzena može izazvati rak (Barregard *et al.* 2009).

Benzen, policiklični aromatični ugljovodonici (polycyclic aromatic hydrocarbonates – u daljem tekstu PAH) i njihovi metaboliti su interkalirajuće supstance, i otud potiče njihova genotoksičnost. Kada benzen uđe u organizam čini sistemsku štetu i to ponajviše deluje na centralni nervni sistem, kičmenu moždinu, izaziva leukemiju i takođe deluje na promene u krvi i druge (Rana i Verma 2005).

Metabolizam benzena i drugih aromatičnih jedinjenja u organizmu je brz. Benzen se pretvara u benzen oksid, koji postaje trans dihidrodiol, koji je još toksičniji (Kapitulnik *et al.* 1977), a piren se metaboliše u hidroksipiren koji je krajnji proizvod metabolizma. Enzim koji je zadužen za razgradnju aromatičnih jedinjenjima je jetreni citohrom P450. (Snyder i Hedli 1997)

Peroksidaza iz rena katalizuje oksidoredukujuće reakcije. Ona je bisupstratni enzim; prvi supstrat je vodonik-peroksid, dok drugi supstrat može biti veliki broj organskih materija. Molekul peroksidaze se sastoji od 6 subjedinica, od kojih svaki sadrži hem grupu u čijoj se blizini nalazi aktivno mesto.

Peroksidaze prebacuju elektrone sa drugog supstrata na molekul vodonik peroksida posredstvom transporta preko hem grupe. Mehanizam aktivnosti peroksidaze je opisan ping-pong kinetikom, pri čemu se prvo vezuje peroksidni jon koji oksiduje gvožđe u hem grupi, a potom se vezuje drugi supstrat koji biva oksidovan od strane jona gvožđa iz hem grupe (Veitch 2004).

Peroksidaza je zbog ovih svojih osobina vrlo primenljiv i praktičan enzim. U biohemiji je našla korist kao obeleživač antitela i za ELISA testiranje. Upotrebljava se za čišćenje voda od fenola (Wagner i Nicell 2001). Postupak se sastoji u polimerizaciji novonastalih oksidovanih fenoksi radikala do oligomera ili polimera. Ovaj proces započinje peroksidaza, a taj krajnji rezultat je manje toksičan po okolinu ali i hidrofoban pa se lako može izvaditi (Yu *et al.* 1994). Druga istraživanja bioremedijacije sa peroksidazom bave se upotrebom enzima u komercijalne svrhe, između ostalog, razgradnji lepkova i drugih adheziva, delova za računare pa čak i automobila.

Ranije je pronađen mehanizam delovanja dioksigenaze na jedinjenja i njihov metabolizam. Na ovaj način benzen se oksidiše do katehola, koji se

Vigor Arva (1993), Zrenjanin, Begejski red 45, učenik 1. razred Zrenjaninske gimnazije

MENTOR: Miloš Rokić, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Beograd

potom otvara orto reasepciom, dajući cis, cis–mukoni čnu kiselinu. Krajni produkt ove razgradnje, orto rascepciom, je ćilibarna kiselina, i acetil koenzim A. Drugi naćin koristi meta rascepanje katehola, ćiji je krajnji rezultat acetaldehid i pirogroćđana kiselina (Atlas i Bartha 1992). Ovi mehanizmi su zastupljeni u bakterijama, koji potom koriste pirogroćđanu kiselinu i acetil koenzim A, u daljim cikluslima za dobijanje energije.

Za sada metoda bakterijske ili mikobioloćke degradacije nafte ostaje kao jedna od najuspećnijih metoda u otklanjanju mrlja od „ćište“ nafte (Petrović *et al.* 2004).

Benzen zbog svoje nezasićene prirode moćže reagovati sa peroksidom i pretpostavlja se da ova reakcija moćže biti posredovana peroksidazom. Ovo bi omogućilo koriććenje peroksidaze sa ciljem uklanjanja toksićnih jedinjenja prisutnih na mestima izlivanja benzena ili nafte u vodi ili zemljićtima.

Cilj ovog rad je da se ispita enzimska oksidacija benzena i nafte peroksidazom iz rena i razmatre mogućnosti za primene u prirodnoj sredini.

Testiran je benzen pošto je on najjednostavniji aromatićni ugljovodonik sa zadovoljavajućnom rastvorljivoću u vodi i najćećeće aromatićno jedinjenje koje se pojavljuje u prirodi na kom bi mogao da se pokaće resecp prstena, ćto se moćže objasniti i razgradnjom PAH-ova. Osim ispitivanja degradacije benzena, pokućšano je i sa ispitivanjem degradacije nafte peroksidazom.

Nafta koja je upotrebljna za merenje u vidljivoj spektru je bila providna nafta, „Rusanda-10“ vaćdena na dubini od 2628 do 2638 metara.

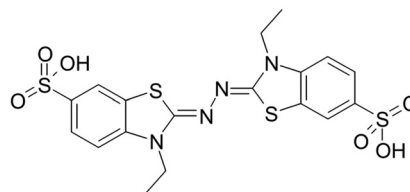
Metode i materijal

Metoda u istraćivanju zasniva se na spektrofotometrijskom merenju aktivnosti peroksidaze. Zapravo, se meri promena apsorbance supstrata ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) koji daje obojen produkt, ćiji je spektar u vidljivoj delu. Pošto bi peroksidaza trebala u smeći

koja sadrići benzen ili naftu, da reaguje sa njima, umesto ABTS-a, pada apsorbancia.

Apsorbancia je merena spektrofotometrijski na GBC UV-VIS Cintra 10. Peroksidaza koristi vodonik peroksid i ABTS kao supstrat da bi dala oksidovani ABTS zelene boje sa apsorpcionim maksimumom na 420 nm (Ćirković Velićković i Prodanović 2005).

Reakciona smeća je sadrićala 50 µL vodonik peroksida 20 mM (pravljjen je svećž), 20 µL ABTS 9.1 mM, 880 µL fosfatnog pufera (pH 6.0, 100 mM) i 20 µL peroksidaze iz rena priblićne aktivnosti 10 IU/mL. Slepuprobu su saćinjivale sve komponente osim enzima, u navedenim kolićinama. Zapremina bez dodatka drugog supstrata iznosila je 1.05 mL.



Slika 2. Struktura ABTS-a

Figure 2. Structure of ABTS

Kao supstrat dodavani su, u zavisnosti od testiranja, nafta i benzen u razlićitim koncentracijama. Kolićine benzena, odnosno nafte, koje su dodavane u reakcionu smeću su sledeće:

benzen: 10, 40, 50 µL

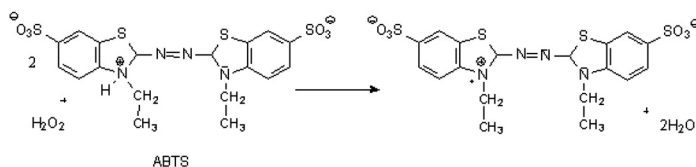
nafta: 10, 15, 40 µL

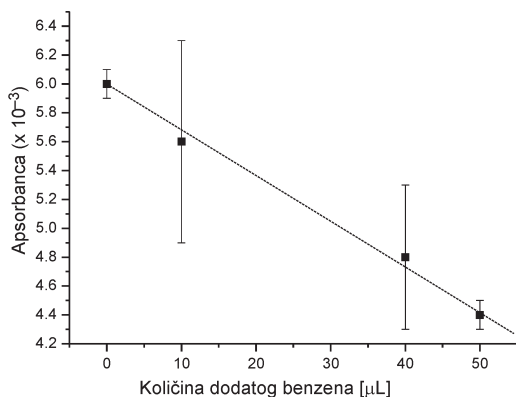
Rezultati i diskusija

Dobijeni rezultati se poklapaju sa pretpostavkom da dolazi do oksidacije benzena, ali u mnogo manjoj meri nego ćto je oćekivano. Enzimski esej vrćen sa naftom i peroksidazom pokazuje neohrabrujuće rezultate.

Slika 1. Oksidacija ABTS-a posredovana peroksidazom

Figure 1. Enzyme catalyzed reaction of ABTS oxidation





Slika 3. Zavisnost promena apsorbancije na 420 nm od koncentracije benzena

Figure 3. Absorbance change caused by different benzene concentration, measured at 420nm

Dobijen je pad apsorbance sa povećanjem količine benzena. Pad je linearan i nisu izmerena velika odstupanja (slika 3). Promena je utvrđena, ali je efekat slab.

Enzim se nalazi u smeši sa benzenom i ima mogućnost da ga oksidiše, umesto da to čini ABTSu, a pošto se meri oksidovani (zeleni) oblik ABTSa, apsorbance pada. Najverovatniji metabolizam bi bio prethodno opisani meta ili orto rascep uz neke modifikacije (Atalas i Bartha 1992).

Živa ćelija bi mogla da koristi finalne proizvode degradacije u Krebsovom ciklusu. Takođe, pretpostavljeno je da je potrebna dorada i promena postupka, što se ne može utvrditi bez hromatografije i druge spektrofotometrijske metode.

Pretpostavljeno je da kiseonik potreban za oba mehanizma dolazi iz vodonik peroksida ili iz vode.

Ovakva jedinjenja su mnogo manje opasna, jer već svojim rascepljenjem gube na svojoj cikličnosti i time ne mogu lako biti interkalirane u strukturu DNK.

Mehanizam koji je pretpostavljen za oksidaciju fenola (Yu *et al.* 2004) je malo moguć, jer se vrlo verovatno ne formiraju fenoksi radikali. Nije utvrđena vidljiva polimerizacija produkata, niti se smatra da postoji pri ovom obliku degradacije.

Gasna hromatografija ili infracrvena spektroskopija bi utvrdila tačne produkte pri postupku razlaganja benzena.

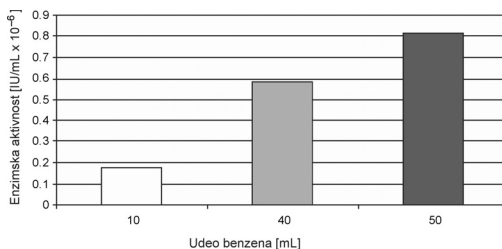
Moguće je reći da bi na isti način reagovala i velika policiklična aromatična jedinjenja, u slabijoj meri. Pretpostavlja se da je do slabljenja delovanja enzima došlo zbog dva faktora:

1. Postoji veliki broj prstenova, svaki od njih je potrebno razložiti na isti način. Takođe, pretpostavlja se da ne mogu svi PAH-ovi da budu korišćeni, jer, aktivno mesto je određene, konačne, veličine. Vrlo veliki PAH-ovi bi teško pristupili tom mestu.

2. Povećanjem broja prstenova, opada polarnost i rastvorljivost u vodi. Time se onemogućuje enzimska degradacija.

Pošto su ova merenja vršena u hidrofilnoj sredini pufera, pretpostavlja se da bi imalo efekta u prirodnoj sredini, posebno primenjeno na zagađenje vode.

Izračunavanjem aktivnosti enzima dobijeni su rezultati prikazani na slici 4.



Slika 4. Enzimska aktivnost, proračuna na IU/mL za benzen i ABTS

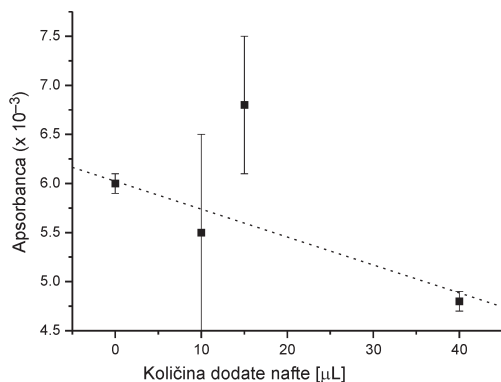
Figure 4. Enzyme activity, calculated for benzene and ABTS

Za izračunavanje enzimске aktivnosti korišćena je formula:

$$\text{Aktivnost [IU]} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{420} \text{ test}}{\text{min}} - \frac{\Delta A_{420} \text{ proba}}{\text{min}} \right)}{\text{milimolar. koef. nestajanja oksid. ABTS na 420 nm}} \times \frac{\text{zapremina eseja u mL}}{\text{zapremina enzima}} \times \text{razređenje}$$

Spektroskopsko merenje smeše sa naftom nije pokazalo dobre rezultate. Nije utvrđena zavisnost količine i apsorbance.

U trećoj tački (slika 5) postoji najveći neočekivani rezultat, gde apsorbance raste pa čak i više od



Slika 5. Zavisnost promena apsorbancije na 420 nm od koncentracije nafte

Figure 5. Absorbance change caused by different petroleum concentration, measured on 420nm

početnih količina. To ukazuje na grešku, koja je najverovatnije počinjena u radu, ili se pak to stvarno dešava. Moguća su i druga objašnjenja, među kojima je i inhibicija delovanja enzima.

Zaključak

Ovim radom je pokazano da peroksidaza oksiduje i benzen u hidrofilnoj sredini. Efekat, je, iako malog intenziteta, je od praktičnog značaja. Pretpostavlja se da se oksidacija dešava po modifikovanom principu meta i orto rascepa, koji je prikazan kod drugih enzima. Za tačnu analizu raspada supstrata, u ovom slučaju benzena, potrebno je još uraditi infracrvenu spektrofotometriju ili druge metode, sa kojim bi se mogli pronaći međuprodukti.

Pošto se reakcija odvija u hidrofilnoj sredini i u uslovima sličnim onima u prirodi, moguće je primeniti enzim u zagađenim okolinama, a od posebnog je značaja što se što se degradira u manje opasne supstance.

Nije pokazana mogućnost oksidacije nafte peroksidazom.

Zahvalnost. Zahvaljujem se Milici Grozdanović i Olgi Petrović za svu pomoć i svom mentoru, Milošu Rokiću, koji je puno doprineo. Takođe se zahvaljujem kompaniji NIS Naftagas koja mi je omogućila naftu za ovaj rad.

Literatura

Atlas R. M., Bartha R. 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Advances in microbial ecology*, **12**: 287.

Barregard L., Holmberg E., Sallsten G. 2009 . Leukaemia incidence in people living close to an oil refinery. *Environ. Research*, **109**: 985.

Ćirković Veličković T., Prodanović R. 2005. *Enzimologija: Laboratorijski priručnik*. Beograd: Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Kapitulnik J., Levin W., Conney A. H., Yagi H., Jerina D. M. 1977. Benzo[A]Pyrene 7,8-Dihydrodiol is more carcinogenic than Benzo[A]Pyrene in newborn mice. *Nature*, **266**: 378.

Rana S. V., Verma Y. 2005. Biochemical toxicity of benzene. *J. Environ. Biol.*, **26** (2): 157.

Snyder R., Hedli C. C. 1997. An Overview of Benzene Metabolism. *Environmental Health Perspectives*, **104**: 1165.

Veitch N. C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, **65** (3): 249.

Wagner M., Nicell J. A. 2001. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewaters. *J. of Water Science and Technology*, **43** (2): 353

Yu J., Taylor K. *et al.* 1994. Phenol Conversion and Dimeric Intermediates in Horseradish Peroxidase-Catalyzed Phenol Removal from Water. *Environ. Sci. Tech.*, **28**: 2154.

Petrović O., Dalmacija B., Rončević S., Ivančev-Tumbas I., Bečelić M., Simeunović J., Agbaba J., Radnović D., Lazić N., Đukić M. 2004. *Naftno zagađenje područja Ratno ostrvo – mogućnosti bioremedijacije*. Novi Sad: PMF, Departman za hemiju

Vigor Arva

Enzyme Oxidation of Benzene by Horseradish Peroxidase (*Armoracia rusticana*)

In this paper we try to show that horseradish peroxidase could oxidize benzene. Aromatic hydrocarbons and benzene induction causes cancer in multiple tissues, leukemia, etc. High benzene concentration is found in soil near factories, oil refineries etc. (Leukemia incidence in people living close to an oil refinery (Barregard *et al.* 2009)).

This research has importance in environment sciences, because of the benzene contamination in the environment and its very high toxicity.

Peroxidase is a hexamer heme containing protein that uses both hydrogen peroxide and another substrate. That substrate can be many chemicals, be-

cause it has a large non-specific binding site. It works as a ping-pong mechanism, which transfers electrons from one substrate to another.

In our experiment we used an enzyme assay that had a cocktail made of hydrogen peroxide and ABTS which is green when oxidized, and thus can be measured. Measuring was done spectrophotometrically at 420 nm. We added different concentrations of benzene to the reaction, and blind tests were done as well, where instead of enzyme we used the same amount of buffer.

Gradually the absorbance fell with benzene, which is shown in figures. We explained that when there is benzene in the mixture, peroxidase oxidizes it instead of ABTS, and that is measured on the graph. It is possible that benzene is degraded in the same way as it would be if the enzyme was dioxygenase.

We also tried enzyme degradation petroleum, but it is shown that at these conditions horseradish peroxidase does not oxidize it. 