# بررسی نقش آنزیم پراکسیداز گیاه Garden radish (*Raphanus sativus* L.) در حذف آلاینده‌های آروماتیک

سید علی ضیایی[1*]، سید سعید اشراقی[2]، میترا تقی‌زاده [3]، فرزانه وهاب‌زاده[4]

۱- استادیار پژوهش، گروه پژوهشی فارماکولوژی و طب کاربردی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
۲- فوق لیسانس بیوتکنولوژی دانشگاه امیرکبیر
۳- کارشناس گیاهشناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
٤- دانشیار دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه امیرکبیر
*آدرس مکاتبه: خیابان انقلاب، خیابان قدس، بزرگمهر غربی، پلاک ۹۷، صندوق پستی: ۱٤٤٦-۱۳۱٤٥
پست الکترونیک: ziai@imp.irost.net

## چکیده

**آنزیم پراکسیداز در اکسیداسیون ترکیبات آروماتیک استفاده می‌شود در این مطالعه از گیاه garden radish (*Raphanus sativus* L.) به عنوان منبع آنزیم پراکسیداز برای اکسیداسیون مواد شیمیایی خطرناکی چون : فنل، آنیلین، بنزیدین، بوتاکلر، آلاکلر، رنگ قرمز اسیدی ۸۸ و رنگ آبی اسیدی ۶۲ استفاده کردیم. آنزیم خام این گیاه توانست در مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه این مواد شیمیایی را به مقدار قابل توجهی حذف نماید. تغییرات pH توانست کارآیی این آنزیم را تغییر دهد. برای مثال کاهش pH از ۷ به ۴ میزان برداشت فنل را از ۰/۵ درصد به ۱۰۰درصد افزایش داد. در نتیجه گیاه garden radish برای حذف آلاینده‌های آروماتیک جانشین خوبی می‌باشد.**

**گل‌واژگان: آنزیم پراکسیداز، garden radish، Horseradish، ترکیبات آروماتیک**

## مقدمه

پراکسیداز آنزیمی با حضور گسترده در طبیعت است و در واقع در تمامی ارگانیسم‌های سلولی گیاهان، مخمرها، جلبک‌ها، باکتری‌ها و جانوران وجود دارد. از جمله بیشترین مطالعاتی که روی این آنزیم‌ها صورت گرفته است مربوط به آنزیم استخراجی از ریشه‌های *Armoracia rusticana* L. (Horseradish) است. مهم‌ترین استفاده این آنزیم در ساخت کیت‌های ایمونوهسیتوشیمی و آنزیمی است. البته از آنجایی که این آنزیم از ظرفیت بالایی برای اکسیداسیون ترکیبات فنلی برخوردار است از آن در فرآیندهای مختلف صنعتی از جمله در صنعت غذا (پخت نان)، صنایع نساجی و صنایع شیمیایی استفاده می‌شود [۱].

پراکسیدازها متعاقب فعال شدن با پراکسید هیدروژن می‌تواند بسیاری از مواد آروماتیک را اکسیده نماید که این مواد شامل دی‌فنل‌ها، فنل‌ها، آنیلین‌ها، بنزیدین‌ها و دیگر ترکیبات هتروآروماتیک می‌باشد. این آلوده‌کننده‌های آروماتیک در پساب بسیاری از صنایع حضور دارند. پالایشگاه‌های نفت، کارخانه‌های تولید مواد شیمیایی، کارخانه‌های تولید پلاستیک و رزین، صنایع نساجی و آهن و فولاد جز این موارد هستند [٤-٢].

بسیاری از این آلوده‌کننده‌ها ماهیتی سمی داشته و برای انسان دارای خطر سرطان‌زایی هستند. پراکسیدازها با پلیمریزه کردن ترکیبات آروماتیکی و نهایتاً ترسیب و جداسازی آنها باعث سم‌زدایی محیط از این مواد می‌شوند [٤-٢]. همچنین با توجه به مساله بحران آب و استفاده مجدد از پساب‌های تصفیه شده باید به عدم آلودگی شیمیایی این آب‌ها نیز توجه داشت که یکی از راهکارهای مناسب جهت رفع آلودگی سمی استفاده از آنزیم پراکسیداز می‌باشد.

در این پروژه به تاثیر آنزیم بر روی مواد شیمیایی موجود در پساب‌های صنعتی و مقایسه بین دوآنزیم horseradish و garden radish در این زمینه پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

### مواد

گیاه garden radish با نام علمی *Raphanous sativus* L. از بازار داخلی( تهران) خریداری شده است. هیدروژن پراکسید (۳۰ درصد)، گایاکول (Guaiacol) فسفات پتاسیم، نمک کلرید سدیم، فنل، آنیلین، و بنزیدین از شرکت مرک تهیه شده است، آلاکلر(alachlore)، بوتاکلر( butachlore) از سازمان حفظ نباتات تهیه شده است و رنگ آبی اسیدی٦٢ (Acid blue 62) و قرمز اسیدی ۸۸ (Acid red 88) از صنایع نساجی تهیه شده است.

### تهیه آنزیم خام (crude enzyme)

ابتدا ریشه‌های گیاه garden radish به قطعات کوچکی تقسیم می‌گردد و سپس این قطعات کوچک را به یک مخلوط‌کن منتقل نموده وعمل اختلاط را تا به‌دست آمدن ترکیبی هموژن حدود ٥ دقیقه ادامه می‌دهیم.

### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم

واکنش با افزودن ٥٠ میکرولیتر هیدروژن پراکسید به محلول حاوی ٥٠ میکرولیتر از آنزیم خام و ۳ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات(۰/۱ مولار، pH برابر با ۷) و ٥٠ میکرولیتر گایاکول (۲۰ میلی مولار) شروع می‌شود. با شروع واکنش تغییر رنگ آغاز می‌شود که تغییرات جذب در فواصل ۳۰ ثانیه در طول موج ٤٣٦ نانومتر یادداشت می‌گردد.

### تعریف فعالیت آنزیم

هر واحد فعالیت، مقدار آنزیمی است که ۱ میکرومول گایاکول را در هر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۷ اکسید کند.

**محاسبه فعالیت ویژه آنزیم**

فعالیت آنزیم را برحسب ( Unit/lit) بر میزان پروتئین کل بر حسب (mg/lit) تقسیم می‌کنیم تا فعالیت ویژه آنزیم به‌دست آید. غلظت پروتئین کل طبق روش برادفورد محاسبه می‌شود.

**تهیه مدل آلودگی**

محلول ppm ۱۰۰ از مواد شیمیایی زیر با حل‌کردن mg ۱۰۰ از آن مواد در ۱ لیتر آب تقطیر شده به‌دست می آید. این مواد شیمیایی عبارتند از: آنیلین، بتاکلر، بنزیدین، آلا کلر، فنل، رنگ آبی اسیدی۶۲ و رنگ قرمز اسیدی ۸۸.

**روش تصفیه آنزیمی**

به۱۰۰میلی لیتر از محلول مواد سمی ۱۰ گرم آنزیم خام و ۱۰ گرم پراکسید هیدروژن افزوده می‌شود و به مدت ۲۴ ساعت بر روی همزن(۸۰ دور در دقیقه) قرار داده می‌گردد.

از سیستم HPLC و اسپکتروفتومتر برای تعیین مقدار مواد شیمیایی استفاده می‌شود.

سیستم HPLC کمپانی واترز(waters) شامل پمپ ۶۰۰E، دتکتور UV ۴۸۶ و ستونC18 ۱۵۰×۴/۶ میلی‌متر همراه با برنامه ماکسیما برای تحلیل داده‌ها و پرینتر NEC می‌باشد. فلوی جریان برای تمام مواد شیمیایی ۱ میلی‌لیتر در دقیقه می‌باشد. سیستم اسپکترو فتومتر مدل Ceciel از نوع visible می‌باشد. فنل, بنزیدین و آنیلین بوسیله HPLC اندازه‌گیری می‌شود فاز متحرک شامل ۲۰ درصد آب و ۸۰ درصد متانول است. آلاکلر و بوتا کلرنیز به‌وسیله HPLC اندازه‌گیری می‌شود و فاز متحرک آنها شامل ۳۰ درصد استونیتریل و ۷۰ درصد آب دیونیزه شده می‌باشد. زمان ماند برای این مواد مختلف می‌باشد و سطح زیر منحنی این کروماتوگرام‌ها برای محاسبه درصد پساب تصفیه شده به‌کار می‌رود.

منحنی استاندارد برای مواد شیمیایی بوسیله ٤ غلظت متفاوت مواد شیمیایی رسم می‌شود. این غلظت‌ها شامل ۲۵و ۵۰ و ۷۵ وppm ۱۰۰ می‌باشد.

## نتایج

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم**

فعالیت آنزیم و فعالیت ویژه آنزیم درجدول شماره ۱ آورده شده است.

**میزان حذف مواد آروماتیک**

درصد حذف مواد آروماتیک از محلول آنها به وسیله آنزیم خام در جدول شماره ۲ آورده شده است.

**تاثیر تغییر pH**

تاثیر تغییر pH بر دو ماده بررسی شد که در جدول شماره ۳ نمایش داده شده است.

## بحث

پراکسیداز حضور گسترده‌ای در گیاهان عالی مانند انجیر، تنباکو، سیب‌زمینی، شلغم، horseradish و میکروارگانیسم‌ها مانند مخمر دارد [۱].

از زمانی که تصفیه آنزیمی طراحی شده است حداقل کردن هزینه‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده است. در آزمایش‌هایی که قبلاً

**جدول شماره ۱- فعالیت آنزیم**

| پارامتر / منبع آنزیم | فعالیت $\left(unit/lit\right)$ | فعالیت ویژه $\left(unit/mgprotein\right)$ |
|---|---|---|
| آنزیم خام | ۷٤۱/۱ | ۳۲۸/٤ |

**جدول شماره ۲- عملکرد آنزیم خام در کاهش آلاینده‌های مورد سنجش در این تحقیق (pH=۷ )**

| نام مواد شیمیایی | درصد حذف |
|---|---|
| فنل | ۰/۵ |
| آنیلین | ۹٤/۵ |
| بنزیدین | ۷٦/۸ |
| آلاکلر | ۲۲/۳ |
| بوتاکلر | ۷۰/٤ |
| رنگ آبی اسیدی ٦۲ | ۲۸/۸ |
| رنگ قرمز اسیدی ۸۸ | ۱۰۰/۰ |

**جدول شماره ۳- تاثیر تغییر pH بر مذف مواد آروماتیک**

| مواد شیمیایی | درصد حذف | pH |
|---|---|---|
| فنل | ۱۰۰/۰ | ٤ |
| بنزیدین | ٤۲/۳ | ۵/۵ |

توصیف شده است پراکسیداز horseradish خالص تهیه شده از کمپانی سیگما با آنزیم خام تهیه شده از ریشهٔ horseradish که از سوپر مارکت محلی خریداری شده مقایسه گردیده است و در تمام حالت‌ها، نتیجه مقایسه اثبات می‌کند که بازدهی فرآیند وابسته به خلوص آنزیم نمی‌باشد [۲].

اغلب فنل‌ها و آمین‌های آروماتیک سمی هستند و بسیاری می‌دانند و حدس می‌زنند که باعث جهش ژن‌های انسانی می‌شود [٤-۲]. این مواد در پساب‌های صنایع مختلف وجود دارند من‌جمله صنایع تبدیلی زغال سنگ، پالایشگاه‌ها، تولید رزین، پلاستیک، مواد شوینده، رنگ‌ها، مواد شیمیایی آلی، صنایع تولید آهن و استیل. برای مثال فنل, کرزول و گزیلن بوسیله کربنیزاسیون زغال سنگ در دمای بالا تولید می‌شوند.

روش‌های متعددی برای جداسازی این آلودگی‌ها از پساب‌ها استفاده می‌شود مانند: کاهش میکروبی، جذب بر روی کربن فعال شده، اکسیداسیون شیمیایی، استخراج حلال و فرآیند جذب غشایی [۲]. متاسفانه این روش‌ها اغلب مفید نیستند. بعضی از آنها، مشکلات جدی دارند مانند: هزینه بالا، بازدهی پایین، درجه خلوص پایین و تشکیل محصولات خطرناک. بنابراین راه حل‌های جدید برای حل مشکل تصفیه پساب‌ها لازم است. یکی از این راه‌ها استفاده از آنزیم horseradish peroxidase برای تصفیه پساب‌های ترکیبات فنلی و آمین‌های آروماتیک است [٦-۱].

در این تحقیق از آنزیم garden radish به‌جای horseradish استفاده شد و موادی انتخاب شدند که هم دارای سمیت بالایی می‌باشند و هم مصارف صنعتی زیادی دارند. ابتدا فنل انتخاب گردید. این ماده در پساب پالایشگاه، پتروشیمی و کارخانه‌های تولید مواد شیمیایی یافت می‌شود. .فنل پروتئینها را از حالت طبیعی خارج کرده و به‌راحتی از سطح پوست جذب می‌شود، سوزش‌آور است و رنگ پوست متعاقب تماس با آن قهوه‌ای می‌شود. فنل سریعاً توسط کلیه‌ها به‌صورت ترکیب با گلوکروناید دفع می‌شود و باعث ایجاد سرطان در انسان می‌گردد [۷]. بنزیدین نیز همانند فنل در پساب کارخانه‌ها یافت

می‌شود و ضمناً این ماده در آزمایش‌های خون‌شناسی به کار می‌رود. این ماده بر روی ژن‌های حیوانات آزمایشگاهی تاثیر گذاشته و باعث ایجاد سرطان مثانه در انسان‌ها می‌شود [۹-۷].

آنیلین و دیگر ترکیبات مرتبط با آن در سنتز رنگ‌های آنیلینی، رابر، پلاستیک‌ها، ضدقارچ‌ها، تولیدات دارویی و افزودنی‌های سوختی کاربرد دارد. آنیلین به آسانی در پوست نفوذ می‌کند و باعث ایجاد مت‌هموگلوبینمی در خون می‌شود [۷]. دو ماده دیگر که مصارف کشاورزی دارند و به‌عنوان علف‌کش استفاده می‌شوند آلاکلر و بوتاکلر هستند که مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. آلاکلر که به مقدار وسیع‌در بین علف‌کش‌های استانیلید استفاده می‌شود دارای سمیت سلولی برای موش صحرایی می‌باشد[۱۰، ۱۱] و بوتاکلر نیز اگر چه دارای سمیت پایینی برای جانوران است ولی دارای پتانسیل ایجاد حساسیت‌های پوستی آلرژیک در انسان می‌باشد [۱۱،۱۰]. دو ماده دیگر مورد آزمایش رنگ قرمز اسیدی ۸۸ و رنگ آبی اسیدی ٦٢ است که در رنگهای نساجی و شوینده ها مصرف دارند، رنگ قرمز اسیدی ۸۸ طبق گزارش منتشر شده در سال ۲۰۰۰ به همراه بنزن، اکسید اتیلن، ۱و۳-بوتادین و... جز مواد سرطان‌زا می‌باشد [۱۲]، رنگ اسیدی آبی ٦٢ نیز تواتر اریتروسیت‌های میکرونوکلئوتید پلی‌کروماتیک را در مغز استخوان موش افزایش می‌دهد [۱۲].

مقایسه بین میزان برداشت ترکیبات آروماتیک مانند فنل، آنیلین و بنزیدین تشابه عملکرد آنزیم *garden radish* را با آنزیم horseradish نشان داد. میزان حذف فنل مطابق با مقالات قبلی در این زمینه بود[۱] میزان حذف بنزیدین کمتر از مطالعات قبلی (٧٦/٨ درصد در مقابل ٩٩/٩٤ درصد) و میزان حذف آنیلین بیشتر از رقم به‌دست آمده حاصل از مطالعات پیشین بود (٩٤/٥ درصد در برابر ٦٢/٥ درصد). در مورد موادی چون آلاکلر، بوتاکلر، رنگ آبی اسیدی ٦٢ و رنگ قرمز اسیدی ۸۸ آزمایشی در این زمینه صورت نگرفته بود ولی نتایج در مجموع رضایت‌بخش بودند (نگاه کنید به جدول شماره ۲) که می‌توان نتیجه گرفت این منبع آنزیمی جانشین مناسبی برای آنزیم horseradish است.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از سازمان حفظ نباتات که سموم فوق‌الذکر را در اختیار پژوهشکده قرار دادند تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

**1.** Kushad MM, Guidera M, Bratsch AD. Distribution of horseradish peroxidase activity in horseradish plants. *HortScience*, 1999; 34: 127-29.

**2.** Alberti BN, Klibanov AM, Peroxidase for removal of hazardous aromatics from industrial wastewaters. In: Exner JH. *Detoxication of hazardous waste*. Ann Arbor Science Publishers. 1982; pp: 349-56.

**3.** Klibanov AM, Morris ED. Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. *Enzyme Microb. Technol.* 1981; 3: 119-22.

**4.** Klibanov AM, Alberti BN, Morris ED and Felshin LM. Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters. *J. Appl. Biochem.* 1980; 2: 414-21.

**5.** Bhunia A, Durani S, Wangikar PP. Horseradish peroxidase catalyzed degeredation of industrially important dyes. *Biotechnol. Bioeng.* 2001; 72:562-7.

**6.** Huang J and Dunford HB. Oxidation of substituted anilines by horseradish peroxidase compound II. *Can. J. Chem.* 1990; 68: 2159-63.

**7.** Haddad LM, Winchestre JF. *Clinical management of poisoning and drug overdose.* W.B. Saunders Company. 2nd ed. 1990.

**8.** Reynolds SH, Patterson RM, Mennear JH, Maronpot RR, Anderson MW. Ras gene activation in rat tumors induced by benzidine congeners and derived dyes. *Cancer Res.* 1990; 15;50:266-72.

**9.** Prival MJ, Bell SJ, Mitchell VD, Peiperl MD, Vaughan VL. Mutagenicity of benzidine and benzidine-congener dyes and selected monoazo dyes in a modified Salmonella assay. *Mutat. Res.* 1984; 136: 33-47.

**10.** Dierickx PJ. Glutathione-dependent cytotoxicity of the chloroacetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor in rat and human hepatoma-derived cultured cells. *Cell Biol. Toxicol.* 1999; 15:325-32.

**11.** Heydens WF, Wilson AG, Kier LD, Lau H, Thake DC and Martens MA. An evaluation of the carcinogenic potential of the herbicide alachlor to man. *Hum. Exp. Toxicol.* 1999; 18:363-91.

**12.** Przybojewska B, Baranski B, Spiechowicz E, Sitarek K. Mutagenic activity of some textile dyes in different test systems. *Toxicol. Lett.* 1988; 40:183-92.