



کاهش سمیت رنگ از پساب‌های صنعتی با استفاده از آنزیم هورس رادیش پراکسیداز تثبیت شده

فتح ا... غلامی بروجنی^۱، فاطمه نجاتزاده باراندوزی^۲، امیرحسین محوی^{۳*}

۱- استادیار، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، آذربایجان غربی، ایران، صندوق پستی: ۵۷۵۶۱۱۶۱۱۱

۲- استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی خوی، آذربایجان غربی، ایران، صندوق پستی: ۵۷۱۵۹۳۴۶۳۴

۳- استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۴۶

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۱ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۲/۶/۲۰

چکیده

در این مطالعه به بررسی کارایی آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (HRP) تثبیت شده بر روی آلژینات کلسیم به منظور حذف رنگ اسید آبی ۲۵ و اسید نارنجی ۷ از فاضلاب پرداخته شده است. مطالعه در مقیاس آزمایشگاهی جهت تعیین شرایط بهینه برای تثبیت HRP بر روی کپسول‌های آلژینات کلسیم و سپس بررسی کارایی آنزیم تثبیت شده در حذف رنگ اسید آبی ۲۵ و اسید نارنجی ۷ و همچنین میزان سمیت محصولات تولیدی پساب تصفیه شده با استفاده از روش‌های زیست‌آزمونی انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد آنزیم تثبیت شده بر روی آلژینات کلسیم در شرایط بهینه دارای بازده ۸۰٪ در حذف رنگ از پساب آلوده رنگی بوده است. نتایج نشان داد که کپسول‌ها تا ده دوره بدون تغییر قابل ملاحظه در فعالیت باقیمانده آنها قابل استفاده هستند. نتایج آزمون سمیت با استفاده از دافنیا مگنا نشان داد این روش تصفیه منجر به کاهش شدیدی در سمیت پساب تولیدی شده است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، هورس رادیش پراکسیداز، رنگ، فاضلاب، آلژینات کلسیم.

Detoxification of Dye from Industrial Wastewater by Immobilized Horseradish Peroxidase

F. Gholami-Borujeni¹, F. Nejat-zadeh-Barandozi², A. H. Mahvi^{3*}

¹ Department of Environmental Health, School of Health, Urmia University of Medical Sciences, P.O.Box: 5756116111, Urmia, Iran

² Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Khoy Branch, Islamic Azad University, P.O.Box:5715934634, Khoy, Iran

³ School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, P.O.Box:14155-6446, Tehran, Iran

Received: 31-07-2012

Accepted: 19-02-2013

Available online: 10-06-2013

Abstract

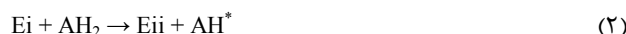
In this study, application of immobilized Horseradish Peroxidase (HRP) on calcium alginate to removal of acid blue 25 and acid orange 7 from waste water was studied. Experimental study of optimum condition for immobilization of HRP on calcium alginate and then, removal efficiency of acid blue 25 and acid orange 7 by immobilized HRP and also toxicity of by-products with bioassay were studied. Results show that immobilized HRP at optimum condition have 80% color removal efficiency from polluted wastewater. Results show alginate beads after 10 replicate usages without change in activity were reusable. Bioassay of by-products by *D. Magna* show that this method of treatment lead to decrease significantly in toxicity of dye from treated wastewater. *J. Color Sci. Tech.* 7(2013), 133-142©. Institute for Color Science and Technology.

Keywords: Enzyme, Horseradish peroxidase, Dye, Wastewater, Calcium alginate.

۱- مقدمه

تصفیه موثر انواع فاضلابها به ویژه نوع صنعتی آن به منظور حفظ محیط زیست از اهمیت زیادی برخوردار است [۱]. تولید مواد رنگی در دنیا، نزدیک به ۸۰۰۰۰۰ تن در سال تخمین زده می‌شود که بیش از ۱۰۰۰۰ نوع رنگ در آن به کار رفته است، برآورد می‌شود که ۱۰ درصد این مقدار، از طریق فاضلاب وارد محیط زیست می‌شود [۲]. فاضلاب حاصل از این صنعت به دلیل وجود مقادیر زیادی از انواع مختلف رنگها و مواد شیمیایی، یک چالش زیست‌محیطی بزرگ در سراسر دنیا محسوب می‌شود. آلودگی اصلی فاضلاب این صنایع مربوط به رنگها و فرآیندهای نهایی آنهاست، که اغلب ترکیبات شیمیایی با ساختمان پیچیده می‌باشند که دفع آنها مشکلات زیادی به همراه دارد [۳-۶].

فرآیندهای اکسیداسیون پیشرفته یکی از موثرترین فرآیندها در تجزیه ترکیبات مقاوم می‌باشند. از آنجا که معدنی شدن کامل ترکیبات مقاوم توسط این روش نیاز به زمان واکنش طولانی و غلظت بالای ماده اکسیدکننده دارد. این روش حذف نیز دارای محدودیت می‌باشد. تصفیه آنزیمی از دیرباز به دلیل مزایایی که نسبت به سایر روش‌های متداول تصفیه ترکیبات سمی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است [۳، ۴]. از مهم‌ترین آنزیم‌هایی که مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است پراکسیدازها می‌باشند. پراکسیدازها آنزیم‌های اکسید و احیایی می‌باشند که از برخی از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان تولید می‌شود [۵]. پراکسیداز آنزیمی است که به طور گسترده در طبیعت وجود دارد 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 تربچه آسی^۱ بوده است. مهم‌ترین استفاده از این آنزیم‌ها در ساخت کیت‌های ایمونوهیستوشیمی و آنزیمی است. آنزیم پراکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌های خانواده اکسیدوردوکتازها بوده و با EC:1.11.1.7 مشخص می‌شوند، این آنزیم‌ها از هموپروتئین‌های گلیکو پروتئینی است که گروه پروستتیک آن حاوی پروتوپورفین Fe است. پراکسیدازها متعاقب فعال شدن با پراکسید هیدروژن می‌توانند بسیاری از مواد آروماتیک را اکسید کنند. این آنزیم‌ها واکنش‌های زیادی را کاتالیز می‌کنند ولی همه آنها نیاز دارند به پراکسیدازی مثل H₂O₂ دارند که فعال‌سازی شوند. H₂O₂ ابتدا آنزیم را اکسید کرده که در گردش اکسیداسیون سوپسترا کمک می‌کند [۵-۹]. سازوکار فعالیت آنزیم پراکسیداز در رابطه‌های ۱ تا ۳ آمده است [۶]:



در این رابطه‌ها:

E: آنزیم، Ei: ترکیب میانی ۱، Eii: ترکیب میانی ۲، AH₂: ترکیب حلقوی و AH⁰: رادیکال آزاد می‌باشد.

آنزیم با استفاده از H₂O₂ اکسید شده و به فرم ترکیب میانی فعال ۱ (Ei) تبدیل می‌شود این ترکیب نیز یک مولکول از ترکیب حلقوی را روی مکان فعال خود دریافت می‌کند و پس از واکنش، ترکیب حلقوی اکسید شده و یک رادیکال آزاد تولید می‌شود و وارد محیط واکنش شده و سپس ترکیب میانی ۲ تولید شده یک مولکول دیگر از ترکیب حلقوی را اکسید کرده و رادیکال آزاد دیگری را آزاد می‌کند و به شکل طبیعی خود برمی‌گردد و چرخه فعالیت آنزیم دوباره تکرار می‌گردد. در سال ۲۰۰۵، لای^۲ به بررسی کاربرد HRP تثبیت شده در حذف پنتاکلروفنل از محیط‌های آبی پرداختند. در این مطالعه کاربرد آنزیم هورس رادیش پر اکسیداز تثبیت شده روی بستری شیشه‌ای آمینوپروپیل^۳ متخلخل (APG) پرداخته شده است. طول عمر کاتالستی یک آنزیم معمولاً به صورت خاموشی آنزیم بیان می‌گردد [۱۰-۵]. خاموشی آنزیم مدت زمانی که طول می‌کشد تا آنزیم فعالیت کاتالیزوری خود را انجام دهد قبل از اینکه غیرفعال شود و به عبارت دیگر تعداد مولکول‌های تبدیل‌شده به وسیله یک مولکول آنزیم قبل از اینکه از بین برود [۸، ۷]. در مطالعه فوق نشان داده شده است که فعالیت آنزیم تثبیت شده پس از استفاده به طور محسوسی کاهش یافته است و با آنزیم به سمت خاموشی رفته است.

با توجه به اینکه فرآیندهای تصفیه آنزیمی به صورت آنزیم آزاد قابلیت استفاده مجدد را از آنزیم سلب می‌کند، محققین به دنبال روش‌های تثبیت آنزیم بر روی بسترهای مختلف می‌باشند. به منظور کاهش هزینه‌های تصفیه آنزیمی و کاربرد آنزیم تثبیت شده بر روی آلزینات کلسیم در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین در این تحقیق به بررسی کارایی سیستم کاتالیزور زیستی HRP استخراج شده از تربچه و H₂O₂ در پلیمریزاسیون رنگ‌های اسید آبی ۲۵ (AB-25) و اسید اورانژ ۷ (AO-7) از محلول‌های آبی پرداخته شد و همچنین سمیت محصولات حاصله با استفاده از روش‌های زیست‌آزمونی مورد بررسی قرار گرفت.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد

به منظور انجام این تحقیق آنزیم خالص HRP از شرکت سیگما، آلزینات سدیم و سایر مواد شیمیایی مصرفی از نوع آزمایشگاهی از شرکت مرک و رنگ مصرفی از نمایندگی شرکت الوان ثابت تهیه شد.

2- Yi-chen Lai
3- Aminopropyl

1- Horseradish

۲-۲- روش کار

۲-۲-۱- تثبیت آنزیم در پایه آلژینات

به منظور تثبیت آنزیم HRP ابتدا آلژینات سدیم در غلظت (۵-۱) درصد وزنی به آرامی در آب مقطر حل شد تا ژل مناسب تشکیل گردد. این عملیات در یک بشر ۲۵۰ میلی لیتری به وسیله یک همزن مغناطیسی به مدت ۵ ساعت در دمای محیط انجام شده است. بعد ساختن ژل آلژینات سدیم به منظور جداسازی حباب‌های ایجاد شده از یک میله شیشه‌ای استفاده شد و تمامی حباب‌ها از محلول ژلاتینی رهاسازی شدند. ژل آماده شده در دمای اتاق به منظور همگن شدن با همزن مغناطیسی به مدت ۵ ساعت به هم زده شد. سپس در دمای ۴ درجه تا زمان استفاده نگهداری شد. برای تهیه کپسول‌های آلژینات کلسیم ابتدا مقدار مشخصی از آنزیم HRP به همراه غلظت‌های مختلف کلرید کلسیم (۰.۲، ۰.۳، ۰.۴ و ۰.۵ درصد وزنی) تهیه شده و مقدار مشخصی آنزیم خالص خریداری شده به آن اضافه شد و سپس این محلول از فاصله ۱۰ سانتی متری بالای ژل آلژینات سدیم تهیه شده فوق به صورت قطره به قطره با استفاده از یک سرنگ سیلیکونی اضافه شد و هم‌زمان با استفاده از هم‌زن مغناطیسی (۲۰۰ دور در دقیقه) به هم زده شد. بعد از ۲۰ دقیقه کپسول‌های ایجاد شده به وسیله آب مقطر شستشو داده شده و از محلول جداسازی شدند. این کپسول‌ها برای استفاده در فرآیند حذف رنگ در محلول بافر فسفات (pH=۷.۴) در دمای ۴ درجه نگهداری شدند [۷-۱۳]. متوسط قطر بیدهای تشکیل شده در این روش ۳-۴ میلی متر بوده است.

۲-۲-۲- تعیین بازده آنزیم تثبیت شده

بازده آنزیم تثبیت شده (Y) با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شده است [۶]:

$$y = [(A-B)/A] * 100 \quad (4)$$

که در این رابطه:

A: مقدار کل آنزیم بر حسب میلی گرم اضافه شده به محلول تثبیت شده، B: مقدار آنزیم باقی مانده در محلول $CaCl_2$ و محلول شستشوی ژل در فرآیند تثبیت آنزیم می‌باشد.

۲-۲-۳- بازده تثبیت آنزیم

به منظور بررسی راندمان تثبیت آنزیم روی بستر لازم است غلظت آنزیم را در محلول کلرید کلسیم و همچنین بستر تعیین نمود. به منظور بررسی غلظت آنزیم در کپسول‌های تشکیل شده، کپسول‌ها دو نیم شده و در محلول بافر فسفات (pH=۷.۴) قرار داده شده بعد از ۲ ساعت غلظت آنزیمی با استفاده از روش سنجش آنزیمی تعیین شد [۲]. بازده تثبیت آنزیم از تفاوت بین غلظت ابتدایی و انتهای آنزیم

گزارش شد.

۲-۲-۴- بررسی ریزش آنزیمی

به منظور بررسی ریزش آنزیمی، کپسول‌ها در محلول بافر تریس (pH=۸) به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شدند و سپس کپسول‌ها را جداسازی نموده و در محلول بافر فسفات نگهداری شدند. غلظت باقی مانده آنزیم در کپسول‌ها اندازه‌گیری شده و تفاوت بین غلظت اولیه و نهایی به عنوان درصد ریزش آنزیمی گزارش شده است [۶].

۲-۲-۵- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آزاد و محبوس شده

فعالیت آنزیم توسط روش رنگ‌سنجی با استفاده از معرف ۴-آمینو آنتی پیرین، فنل و پراکسید هیدروژن به عنوان سوبسترا انجام شد. این روش در دمای ۲۵ درجه سلسیوس توسط اضافه کردن بافر فسفات با pH برابر ۷.۴ که شامل: ۰.۰۱ مولار فنل، ۰.۰۲۴ مولار ۴-آمینو آنتی پیرین و ۰.۰۰۲ مولار پراکسید هیدروژن بود انجام شد و واحد آنزیمی برحسب یونیت آنزیم بر گرم آلژینات (U/g) محاسبه شده است [۱۵-۸].

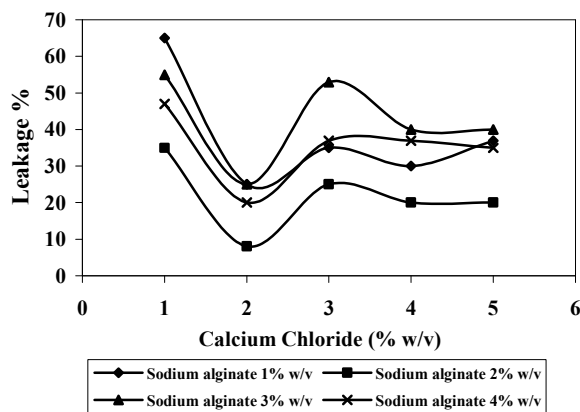
۲-۲-۶- محاسبه (رنگ) ADMI با استفاده از دستگاه

اسپکتروفتومتر

روش ADMI روشی است که توسط انستیتو تولیدکنندگان رنگ آمریکا پایه‌گذاری شد. توسط این روش، می‌توان رنگ نمونه‌ها را مستقل از تهرنگ آنها اندازه‌گیری کرد. اساس روش ADMI کاربرد فرمول‌های آدامز نیکرسون است که روش اصلاح شده سیستم منظم رنگ CIE جهت تعیین اختلاف رنگ یکنواخت می‌باشد. این معادلات برای محاسبه یک عدد منفرد جهت مقادیر مختلف رنگ می‌باشد. به عنوان مثال، اگر دو نوع رنگ A و B داشته باشیم که نسبت به یک شاهد (استاندارد)، سنجیده شوند، در صورتی که اختلاف رنگ هر دو از بیرنگی مشابه باشند، مقدار واحد رنگ ADMI برای هر دو یکسان است. به عبارت دیگر این روش بر اساس تعیین اختلاف رنگ بین نمونه‌ها و استاندارد می‌باشد. این روش می‌تواند جهت تعیین رنگ آنها و فاضلاب‌های رنگی که خصوصیات رنگ آنها بخصوص از استانداردهای پلاتینیم- کبالت متفاوت باشد و همچنین آب و فاضلاب مشابه تهرنگ استاندارد‌ها به کار رود [۶، ۷]. که در این پژوهش از این روش به منظور بررسی بازده حذف رنگ استفاده شده است.

۲-۲-۷- مطالعه اثر غلظت آلژینات روی تثبیت آنزیم

غلظت‌های مختلف آلژینات (۱-۴ % m/v) در فرآیند تثبیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفته است. طول عمر رنگبری آنزیم HRP تثبیت شده روی آلژینات با آزمایشات پی در پی به منظور بررسی امکان استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده مورد بررسی قرار گرفت. در



شکل ۲: مطالعه اثر غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی ریزش آنزیمی.

همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است در غلظت ۲٪ وزنی - حجمی آلژینات سدیم و کلرید کلسیم کمترین ریزش آنزیمی ایجاد شده است و این غلظت‌ها به عنوان غلظت بهینه در تثبیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفتند. عالم‌زاده و همکارانش شرایط بهینه خواص زیست‌کاتالیزوری در غلظت‌های به ترتیب ۵٫۵ و ۱ درصد وزنی حجمی از کلرید کلسیم و آلژینات را گزارش نمودند [۷]. لای و همکارانش شرایط بهینه برای تثبیت آنزیم روی APG که بوسیله گلوترالدهید فعال شده است و منجر به افزایش فعالیت ویژه آنزیم تا ۵۰ U/g شده است را در دامنه pH برابر ۹٫۵-۷٫۵ و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند [۸].

۳-۱-۳- مقایسه اثر pH بر فعالیت آنزیمی آنزیم تثبیت شده روی آلژینات و آزاد

آنزیم‌ها بهترین تبدیل سوستر را در pHهای خاص انجام می‌دهند. مطالعات نشان می‌دهد HRP بهترین فعالیت را در دامنه pH بین ۸-۵ دارد البته این pH به شدت متأثر از دهنده هیدروژن مورد استفاده دارد. ثابت‌های واکنش K_1 و K_2 برای تشکیل ترکیب میانی ۱ و ۲ وابسته به pH می‌باشد K_1 در pH خنثی و قلیایی ثبت باقی‌مانده ولی در دامنه pH اسیدی کاهش می‌یابد.

در این مطالعه به بررسی و مقایسه اثر pH بر روی فعالیت آنزیمی به صورت آزاد و تثبیت شده پرداخته شده است. در ۵ سطح pH به بررسی فعالیت نسبی آنزیم به دو صورت پرداخته شده است. نتایج این مطالعه در شکل ۳ آورده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد درصد فعالیت نسبی آنزیم تثبیت شده در pH بهینه ۷٫۵ نسبت به آنزیم به صورت آزاد بیشتر است. همچنین آنزیم تثبیت شده در دامنه pH ۹٫۵-۵٫۵ نسبت به آنزیم آزاد فعالیت بیشتری از خود نشان داده است بنابراین می‌توان گفت آنزیم تثبیت شده دارای مقاومت بیشتری

این مطالعه فرآیند حذف رنگ در ده بار متوالی با استفاده از آنزیم تثبیت‌شده بررسی شده است.

۲-۲-۸- مطالعه سمیت محصولات تولیدی با استفاده از دافنیا مگنا

به منظور بررسی سمیت محصولات تولیدی فرآیند از روش ارائه شده ارزیابی سمیت با استفاده از دافنیا مگنا استفاده شده است [۶]. به منظور بررسی تداخل سمیت واکنش‌گرها ابتدا به بررسی سمیت آنزیم و پر اکسید هیدروژن و همچنین سمیت هر دو واکنش‌گر به طور هم‌زمان پرداخته شده است و سپس سمیت رنگ‌ها قبل و بعد از فرآیند مورد بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

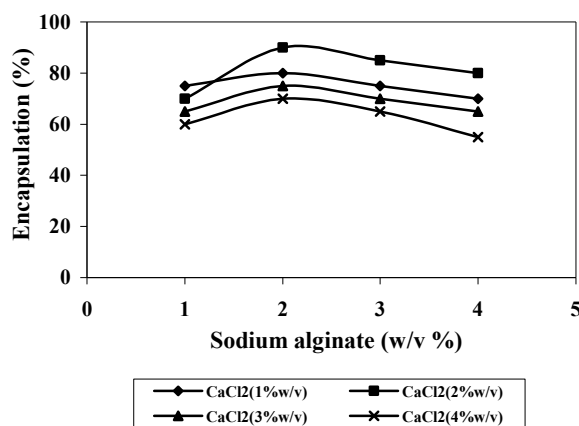
۳-۱-۳- مطالعه ویژگی‌های آنزیم تثبیت شده

۳-۱-۳-۱- بررسی اثر غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی بازده تشکیل کپسول

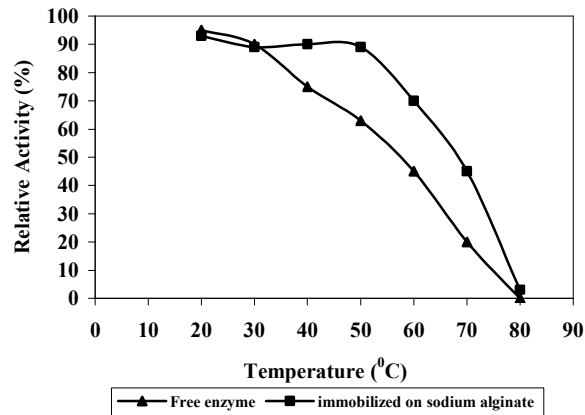
در شکل ۱ نتایج بررسی اثر غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی بازده تشکیل کپسول آورده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد در غلظت ۲٪ وزنی- حجمی کلرید کلسیم و آلژینات سدیم بیشترین بازده تشکیل کپسول دیده شده است و در غلظت‌های بیشتر و کمتر از آن بازده تشکیل کپسول به طور محسوسی کاهش یافته است.

۳-۱-۳-۲- مطالعه اثر غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی ریزش آنزیمی

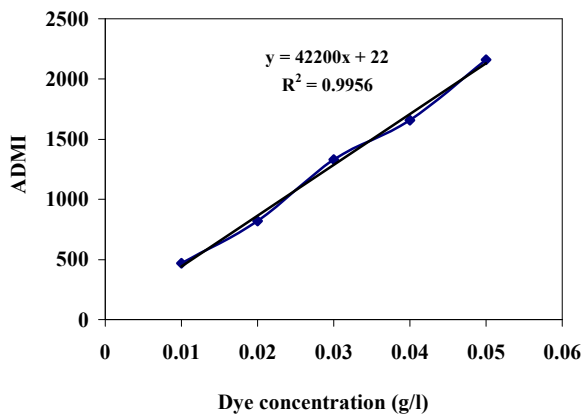
اندازه‌گیری ریزش آنزیمی توسط قراردادن کپسول‌ها در داخل لوله‌های آزمایش محتوی بافر تریس با pH معادل ۸ به مدت ۲۲ ساعت صورت گرفت. نتایج این مطالعه در شکل ۲ آورده شده است.



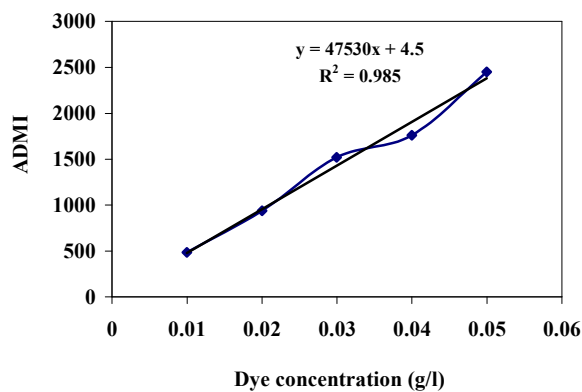
شکل ۱: بررسی اثر غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی بازده تشکیل کپسول.



شکل ۴: مطالعه پایداری دمایی آنزیم تثبیت شده و آزاد.



شکل ۵: بررسی ارتباط بین غلظت رنگ اسید نارنجی ۷ بر حسب ADMI و گرم بر لیتر.



شکل ۶: بررسی ارتباط بین غلظت رنگ اسید آبی ۲۵ بر حسب ADMI و گرم بر لیتر.

نسبت به آنزیم بصورت آزاد به تغییرات pH محیط دارد. بنابراین در ادامه مطالعه این pH به عنوان مبنا مورد استفاده قرار گرفت.

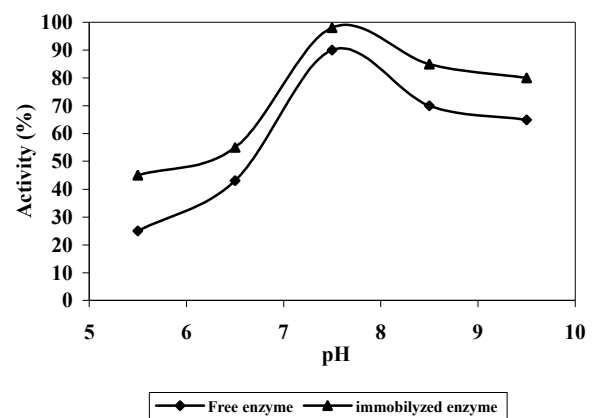
۳-۱-۴- مطالعه پایداری دمایی آنزیم تثبیت شده و آزاد

به منظور بررسی و مقایسه پایداری دمایی آنزیم به صورت آزاد و تثبیت شده، فعالیت نسبی آنزیم در ۷ سطح دمایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در شکل ۴ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد پایداری دمایی آنزیم تثبیت شده بیشتر از آنزیم آزاد بوده است بطوری که در دماهای بالاتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم آزاد بطور محسوسی کاهش یافته است ولی در آنزیم تثبیت شده فعالیت آنزیم در دماهای بالای ۵۰ درجه سانتی‌گراد کاهش فعالیت آنزیمی دیده شده است. بنابراین می‌توان این‌طور تفسیر نمود که آنزیم تثبیت شده مقاومت دمایی بالاتری نسبت به آنزیم به صورت آزاد دارد.

۳-۲- مطالعه حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت شده

بررسی ارتباط بین میزان غلظت رنگ بر حسب میلی‌گرم بر لیتر و ADMI با توجه به اینکه غلظت ثانویه اندازه‌گیری شده رنگ در این مطالعه بر اساس اندازه‌گیری اسپکتروفوتومتری و بر اساس روش ADMI می‌باشد، در این مطالعه به بررسی ارتباط بین میزان غلظت رنگ بر حسب میلی‌گرم بر لیتر و ADMI آنها پرداخته شده است. نتایج این مطالعه در شکل ۵ آورده شده است.

در رابطه‌های به دست آمده از شکل‌های فوق Y مقدار رنگ بر حسب ADMI می‌باشد و X مقدار غلظت رنگ بر حسب گرم بر لیتر می‌باشد. با جایگذاری در فرمول می‌توان رابطه بین غلظت رنگ بر حسب میلی‌گرم بر لیتر و ADMI را به دست آورد.



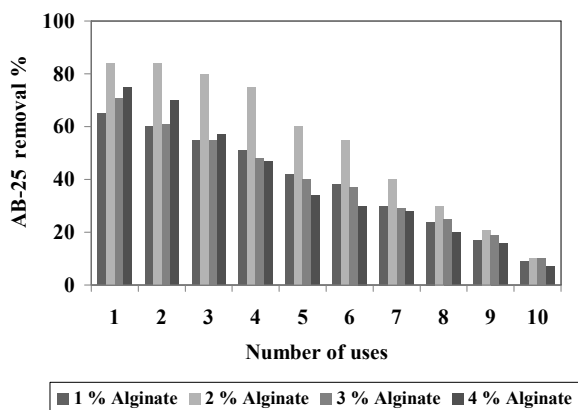
شکل ۳: مقایسه اثر pH بر فعالیت آنزیمی آنزیم تثبیت شده روی آلزینات و آزاد.

در این قسمت ۱۰ مرحله استفاده از آنزیم تثبیت شده و جداسازی شده از محلول مورد استفاده قرار گرفت و نتایج این آزمایشات در شکل ۸ آورده شده است.

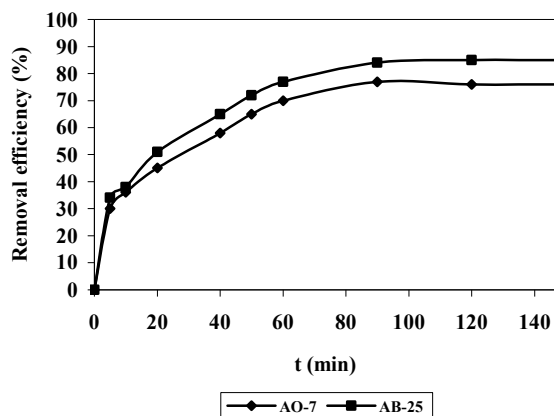
این نتایج نشان می‌دهد پس از ۱۰ مرحله استفاده از آنزیم تثبیت شده فعالیت آنزیمی به طور محسوسی کاهش یافته است به طوری که میزان حذف رنگ‌های اسید آبی ۲۵ و اسید نارنجی ۷ از ۸۵-۷۵٪ به ۱۰٪ کاهش یافته است.

۳-۴- مطالعه استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده در غلظت‌های مختلف آلژینات در حذف رنگ اسید آبی ۲۵ و اسید نارنجی ۷

آنزیم تثبیت شده را می‌توان به راحتی جداسازی و برای بررسی فعالیت باقی‌مانده مجدداً مورد بررسی قرار داد. برای نشان دادن این خاصیت، کپسول‌ها پس از گذشت زمان بهینه واکنش از محلول خارج شده و به طور کامل شسته شدند و برای استفاده مجدد در محلول حاوی رنگ قرار داد. تعداد چرخه مناسب برای استفاده مجدد از این کپسول‌ها با توجه به کاهش چشمگیر بازده حذف رنگ تعیین گردید. به منظور بررسی استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده در این قسمت به بررسی اثر غلظت‌های مختلف آلژینات (چهار سطح غلظت) در میزان دفعات استفاده مجدد آنزیم در حذف رنگ مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه در شکل ۹ و ۱۰ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد فعالیت آنزیمی کپسول‌های جداسازی شده در هر مرحله از فرایند به تدریج کاهش می‌یابد و پس از ده مرحله استفاده همچنان حذف رنگ انجام می‌شود ولی میزان حذف رنگ به طور چشمگیری کاهش یافته است به طوری که راندمان حذف رنگ از ۸۵٪ به کمتر از ۲۰٪ رسیده است. و همچنین غلظت‌های مختلف آلژینات نیز تاثیری در کاهش فعالیت آنزیمی نداشته است.



شکل ۹: مطالعه استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده در غلظت‌های مختلف آلژینات در حذف رنگ اسید آبی ۲۵.



شکل ۷: مطالعه حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت شده.

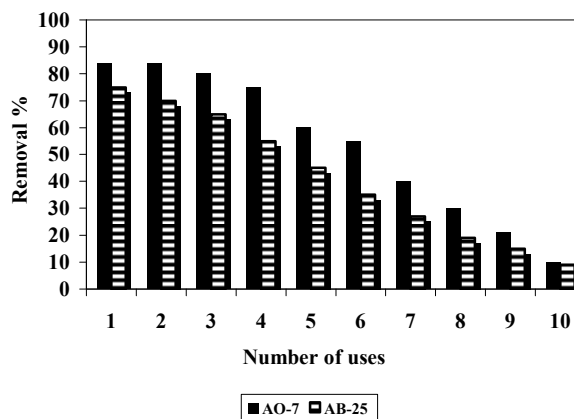
مطالعه حذف رنگ

در این قسمت دو رنگ اسید نارنجی ۷ و اسید آبی ۲۵ به عنوان سوپسترا در حذف با استفاده از آنزیم تثبیت شده مورد استفاده قرار گرفت. نتایج این مطالعه در شکل ۷ آورده شده است.

این نتایج نشان می‌دهد در مدت زمان ۶۰ دقیقه آنزیم تثبیت شده منجر به حذف ۷۰٪ اسید نارنجی ۷ و ۸۰٪ حذف در اسید آبی ۲۵ شده است و با افزایش زمان تماس میزان افزایش حذف رنگ جزئی بوده است.

۳-۳- مطالعه استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده

به منظور بررسی استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده تعداد دفعاتی که آنزیم تثبیت شده از محلول جدا شدند و همچنان کارایی حذف رنگ را داشتند مورد بررسی قرار گرفت.



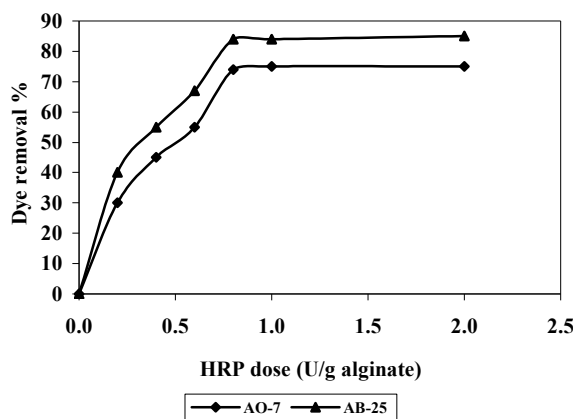
شکل ۸: مطالعه استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده در حذف رنگ‌های اسید آبی ۲۵ و اسید نارنجی ۷.

رادیکال‌های آزاد اضافی در محلول می‌شود و این رادیکال‌های آزاد با سایت‌های فعال آنزیم وارد واکنش می‌شوند و موجب غیرفعال شدن آنزیم می‌گردد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد نسبت بهینه H_2O_2/dye برای رسیدن به حد اکثر بازده حذف رنگ برابر ۱,۲۵ می‌باشد.

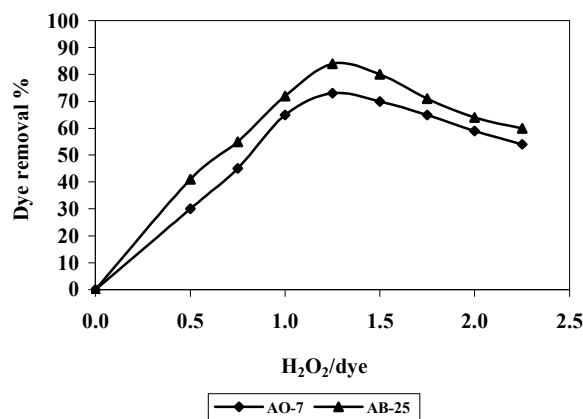
۳-۷- مطالعه سمیت رنگ با استفاده از دافنیا مگنا قبل و بعد از فرآیند تصفیه

۳-۷-۱- مطالعه سمیت آنزیم هورس رادیش پراکسیداز روی دافنیا مگنا

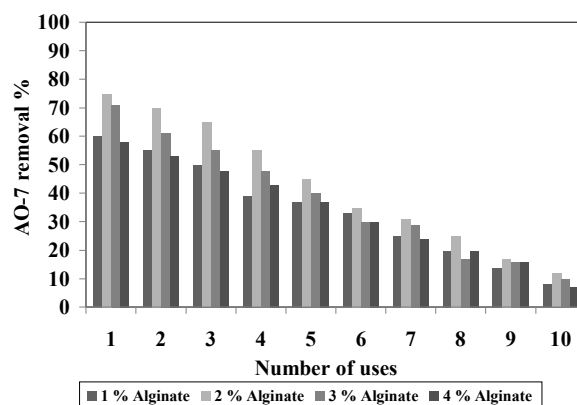
نتایج مطالعه سمیت آنزیم HRP استخراج شده روی دافنیا مگنا نشان می‌دهد LC_{50} در دوره انکوباسیون ۲۴h، ۴۸h و ۹۶h آنزیم HRP روی دافنیا مگنا برابر ۲۰ U/ml می‌باشد (شکل ۱۳). از آنجا که غلظت آنزیم مورد استفاده در این مطالعه عموماً کمتر از ۱ U/ml بوده است می‌توان نتیجه گرفت HRP نمی‌تواند روی نتایج حاصل از آزمون سمیت رنگ بعد از فرآیند آنزیمی تاثیرگذار باشد.



شکل ۱۱: مطالعه اثر غلظت آنزیم در حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت شده.



شکل ۱۲: مطالعه اثر غلظت آب اکسیژنه در حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت شده.



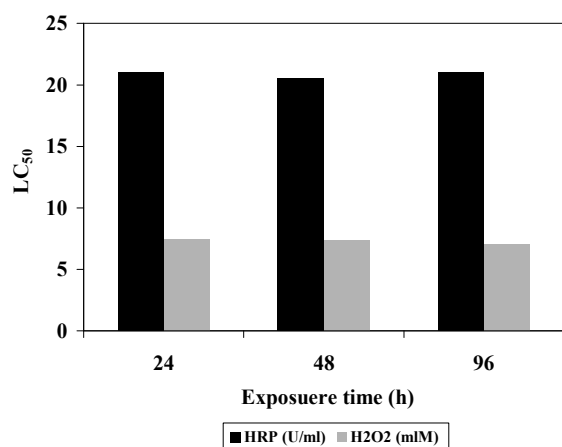
شکل ۱۰: مطالعه استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده در غلظت‌های مختلف آلژینات در حذف رنگ اسید نارنجی ۷.

۳-۵- مطالعه اثر غلظت آنزیم در حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت شده

از آنجا که آنزیم‌ها دارای عمر مشخصی می‌باشند و همچنین واکنش‌های تبدیلی وابسته به زمان واکنش می‌باشند، طبیعتاً حذف رنگ به میزان غلظت آنزیمی بستگی پیدا می‌کند به همین دلیل در این مطالعه به بررسی اثر غلظت آنزیم در حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت شده پرداخته شده است. در این مطالعه غلظت آنزیمی بر حسب (U/g Alginate) در ۷ سطح مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بخش در شکل ۱۱ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد ۱ U/g Alginate از آنزیم و غلظت ۱۰۰۰ ADMI رنگ دارای بیشترین بازده حذف بوده است و با افزایش غلظت آنزیمی بیش از ۱ U/g Alginate، کارایی حذف افزایش پیدا نکرده است.

۳-۶- مطالعه اثر غلظت آب اکسیژنه در حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت شده

مطالعات برخی از محققین نشان داد که در نسبت‌های بهینه آنزیم/اسوبسترا/آب اکسیژنه روی فعالیت آنزیمی تاثیر زیادی دارد. به همین منظور در این مطالعه به بررسی اثر غلظت آب اکسیژنه در حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت شده پرداخته شده است. نتایج این بخش در شکل ۱۲ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد در نسبت مولی آب اکسیژنه به رنگ برابر ۱,۲۵ حداکثر بازده حذف در هر دو رنگ دیده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که از نسبت مولی H_2O_2/dye برابر ۰,۵ تا ۱,۲۵ با افزایش این نسبت بازده حذف رنگ افزایش می‌یابد و از ۳۰٪ به ۷۳٪ برای رنگ اسید نارنجی ۷ و از ۴۰٪ به بیش از ۸۰٪ برای اسید آبی ۲۵ رسیده است. ولی پس از آن با افزایش این نسبت بازده حذف هر دو رنگ کاهش یافته است. این نتایج می‌تواند ناشی از اثر بازدارندگی آب اکسیژنه که باعث ایجاد



شکل ۱۵: سمیت آنزیم هورس رادیش پراکسیداز و پراکسید هیدروژن روی دافنیا مگنا.

۳-۷-۴- مطالعه سمیت رنگ‌های مورد مطالعه قبل و بعد از واکنش آنزیمی

نتایج مطالعه سمیت حاصل از رنگ اسید نارنجی ۷ قبل از فرآیند تصفیه روی دافنیا مگنا که به منظور بررسی اثر تصفیه آنزیمی روی کاهش سمیت انجام شده است نشان می‌دهد غلظت کشنده (LC_{50}) ۲۴ h، ۴۸ h و ۹۶ h بترتیب برابر ۸، ۹، ۷ و ۷،۵ میلی‌گرم بر لیتر بوده است و بعد از فرآیند تصفیه غلظت کشنده (LC_{50}) ۲۴ h، ۴۸ h و ۹۶ h بترتیب به ۲۱، ۲۳ و ۲۴ میلی‌گرم بر لیتر رسیده است یعنی به طور متوسط فرآیند آنزیمی به طور متوسط موجب کاهش ۶۵٪ در سمیت رنگ اسید نارنجی ۷ شده است (شکل ۱۶).

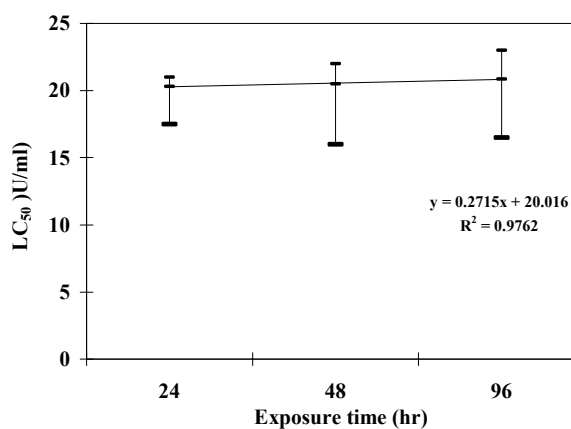
نتایج مطالعه سمیت حاصل از رنگ اسید آبی ۲۵ قبل از فرآیند تصفیه روی دافنیا مگنا که به منظور بررسی اثر تصفیه آنزیمی روی کاهش سمیت انجام شده است نشان می‌دهد غلظت کشنده (LC_{50}) ۲۴ h، ۴۸ h و ۹۶ h بترتیب برابر ۵، ۶، ۵ و ۴،۲ میلی‌گرم بر لیتر بوده است و بعد از فرآیند تصفیه غلظت کشنده (LC_{50}) ۲۴ h، ۴۸ h و ۹۶ h بترتیب به ۱۲، ۱۳ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر رسیده است یعنی به طور متوسط فرآیند آنزیمی به طور متوسط موجب کاهش ۶۰٪ در سمیت رنگ اسید آبی ۲۵ شده است (شکل ۱۷). نتایج متفاوتی در مورد سمیت رنگ‌ها پس از اکسیداسیون گزارش شده است برخی از محققان کاهش سمیت رنگ را پس از اکسیداسیون و برخی افزایش سمیت را گزارش نمودند که ناشی از تنوع در محصولات جانبی رنگ‌ها پس از فرآیندهای مختلف اکسیداسیون می‌باشد [۱۶-۱۷].

۳-۷-۲- مطالعه سمیت پراکسید هیدروژن روی دافنیا مگنا

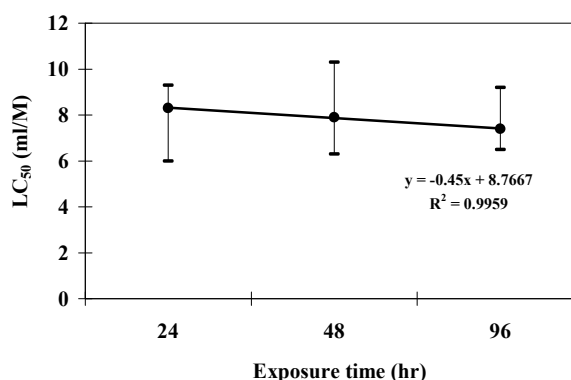
نتایج مطالعه سمیت آنزیم آب اکسیژنه روی دافنیا مگنا نشان می‌دهد در LC_{50} دوره انکوباسیون ۲۴ h، ۴۸ h و ۹۶ h روی دافنیا مگنا برابر ۸ mM می‌باشد (شکل ۱۴). از آنجا که غلظت آب اکسیژنه مورد استفاده در این مطالعه عموماً کمتر از ۱ mM بوده است می‌توان نتیجه گرفت آب اکسیژنه نمی‌تواند روی نتایج حاصل از آزمون سمیت رنگ بعد از فرآیند آنزیمی تأثیرگذار باشد.

۳-۷-۳- سمیت آنزیم هورس رادیش پراکسیداز و پراکسید هیدروژن روی دافنیا مگنا بطور همزمان

به منظور بررسی امکان ایجاد اثر تشدیدکنندگی و یا بازدارندگی هرکدام از عوامل واکنش روی میزان سمیت تولیدی به بررسی سمیت آنزیم هورس رادیش پراکسیداز و پراکسید هیدروژن روی دافنیا مگنا به طور هم‌زمان پرداخته شده است (شکل ۱۵). بدین منظور از آب اکسیژنه و آنزیم به طور هم‌زمان در بررسی اثر سمیت روی دافنیا مگنا استفاده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد این دو عامل اثر تشدیدکنندگی سمیت بر روی دافنیا مگنا نداشته است.



شکل ۱۳: سمیت آنزیم هورس رادیش پراکسیداز روی دافنیا مگنا.

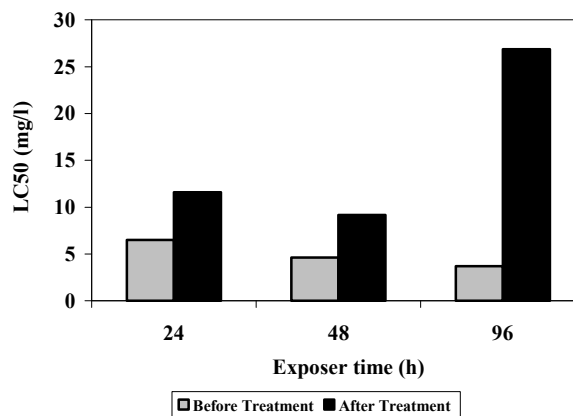


شکل ۱۴: سمیت پراکسید هیدروژن روی دافنیا مگنا.

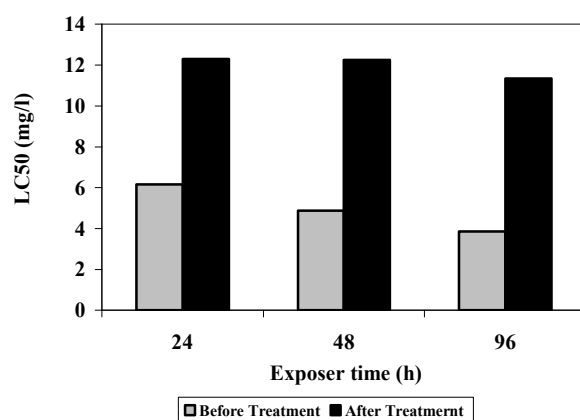
۴- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد آنزیم تثبیت‌شده بر روی آلژینات کلسیم در غلظت ۰.۲٪ وزنی - حجمی آلژینات سدیم و همچنین در غلظت ۱.۵٪ وزنی - حجمی کلرید کلسیم دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بوده است. در این شرایط بازده حذف رنگ از پساب آلوده رنگی بیش از ۸۰٪ بوده است. شرایط بهینه حذف رنگ به ترتیب، pH برابر ۷.۵، غلظت رنگ ADMI ۱۵۰۰، ۱ U/ml آنزیم هورس رادیش، زمان ماند ۶۰ دقیقه، غلظت آب اکسیژنه ۲ میلی مولار در دمای محیط بدست آمد. نتایج نشان داد که کپسول‌ها تا ده دوره با تغییر در فعالیت باقیمانده آنها همچنان قابل استفاده هستند.

نتایج آزمون سمیت با استفاده از دافنیا مگنا نشان داد این روش تصفیه منجر به کاهش شدیدی در سمیت پساب تولیدی شده است. این روش تصفیه مواد سمی با توجه به مزایای زیادتری که نسبت به سایر روش‌های تصفیه متداول (مثل اکسیداسیون، روش‌های بیولوژیکی و شیمیایی و غیره) دارد می‌تواند به عنوان یک گزینه مناسب برای تصفیه مواد دیرگداز و آروماتیک و مخصوصاً مواد رنگی مورد استفاده قرار گیرد. این مطالعه نشان داد آنزیم تثبیت شده روی آلژینات کلسیم می‌تواند به منظور حذف و سمیت‌زدایی رنگ از فاضلاب صنایع مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱۵: مطالعه سمیت رنگ AO-7 قبل و بعد از واکنش آنزیمی.



شکل ۱۶: مطالعه سمیت رنگ AB-25 قبل و بعد از واکنش آنزیمی.

۵- مراجع

- V. Maddhinni, H. Vurimindi, A. Yerramilli, Degradation of azo dye with Horseradish Peroxidase (HRP). *J. Indian Inst. Sci.* 86(2006), 507-514.
- A. H. Mahvi, M. Ghanbarian, K. Naddafi, N. M. Mahmoodi, Investigation of the toxicity reduction in reactive dye solution and real textile wastewater by nanophotocatalysis process. *J. Color Sci. Tech.* 1(2008), 91-96.
- N. M. Mahmoodi, M. Arami, N. Y. Limaee, Photocatalytic degradation of triazinic ring-containing azo dye (Reactive Red 198) by using immobilized TiO₂ photoreactor: Bench scale study. *J. Hazard Mater.* 133(2006), 113-118.
- R. Fernandez-Alba, D. Hernando, A. Agüera, J. Cáceres, S. Malato, Toxicity assays: A way for evaluating AOPs efficiency. *Water Res.* 36(2002), 4255-4262.
- F. Gholami-Borujeni, A. H. Mahvi, S. Nasser, M. A. Faramarzi, R. Nabizadeh, M. Alimohammadi, Enzymatic treatment and detoxification of acid orange 7 from textile wastewater. *Appl Biochem Biotechnol.* 165(2011), 1274-1284.
- F. Gholami-Borujeni, A. H. Mahvi, S. Nasser, M. A. Faramarzi, R. Nabizadeh, M. Alimohammadi, Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution. *Res J. Chem. Environ.* 15(2011), 217-222.
- I. Alemzadeh, S. Nejati, S. Motamed, Phenol removal by immobilized horseradish peroxidase. *Wat. Wastewat.* 2 (2011), 2-9.
- Y. C. Lai, S. C. Lin. Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p chlorophenol from aqueous solution. *Process Biochem.* 40(2005), 1167-1174.
- C. Linqiu, Carrier bound immobilized enzymes. Wiley, Germany, Parmar A, Roos EC, de vroom E: Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics. *Org process Rev. Dev.* 2(2005), 128-133.
- E. Torres, I. Bustos-Jaimes, S. Le Bogne. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B.* 46(2003), 1-15.
- C. A. M. Portugal, J. C. Lima. Crespo, Probing the change of enzymatic activity of horseradish peroxidase induced by membrane permeation using tryptophan fluorescence. *J. Membrane Sci.* 284(2006), 180-192.
- K. Nazari, N. Esmacili, A. Mahmoudi, H. Rahimi, A. A.

- Moosavi-Movahedi, Peroxidative phenol removal from aqueous solution using activated peroxidase biocatalyst. *Enzyme Microb. Technol.* 41(2007), 226-233.
13. R. Tehrani-Bagha, N. M. Mahmoodi, M. Markazi, E. Talae, Removal of a cationic dye from wastewater by low-cost kaolin. *J. Color Sci. Tech.* 3(2009), 145-155.
14. M. Mansouri, H. R. Kariminia, Investigation of decolorization of reactive black 5 by enzymatic method. *J. Color Sci. Tech.* 5 (2012), 11-20.
15. R. Nateghi, A. Assadi, Gh. R. Bonyadinejad, S. Safa, Effectiveness of coagulation process in removing reactive blue 19 dye from textile industry wastewater. *J. Color Sci. Tech.* 5 (2012), 235-242.
16. M. H. Dehghani, S. Nasser, P. Mahdavi, A. H. Mahvi, K. Naddafi, Gh. R. Jahed, Evaluation of Acid 4092 dye solution toxicity after uv/zno mediated nanophotocatalysis process using daphnia magna bioassay. *J. Color Sci. Tech.* 5(2012), 285-292.
17. F. Gholami-Borujeni, M. A. Faramarzi, F. Nejat-zadeh-Barandozi, A. H. Mahvi, Oxidative degradation and detoxification of textile azo dye by horseradish peroxidase enzyme. *F. E. B.* 22(2013), 1-6.