

حذف آنزیمی آلاینده‌های فنلی از پسابهای صنعتی

ایران عالم‌زاده^۱ فرناز میرزایی^۲

(دریافت ۸۶۸/۱ پذیرش ۸۷/۸۷)

چکیده

در این تحقیق از آنزیم پراکسیداز ترب کوهی برای حذف فنل استفاده شده است. ابتدا امکان‌پذیری فرایند در مقیاس آزمایشگاهی و با محلولهای سنتزی ۱ تا ۱۰ میلی مولار فنل مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بیانگر این بود که این آنزیم به طور مؤثری قادر به حذف ترکیبات فنلی از پسابها می‌باشد و توانایی آن، در محدوده وسیعی از pH، دما و غلظت آروماتیک حفظ می‌شود. در این تحقیق، میزان حذف ترکیبات فنلی در راکتور ناپیوسته و در شرایط بهینه برای راندمان حذف ۹۵ درصد و ۱۰۰ درصد، توسط آنزیم بر روی پساب سنتزی و صنعتی و در محدوده غلظتهای کم و زیاد فنل (۱ و ۱۰ میلی مولار) مورد بررسی قرار گرفت. پساب صنعتی مورد استفاده، پساب کارخانه روغن زیتون با غلظت فنل ۱۲۲۱ میلی گرم در لیتر (۱۳ میلی مولار) و pH برابر ۳/۵ بود که در انتهای واکنش، این ترکیبات فنلی به پلیمرهای نامحلول تبدیل شده و رسوب کردند. در هر یک از سیستم‌های پساب - آنزیم مقادیر هیدروژن پراکسید، آنزیم، پلی اتیلن گلیکول، pH و بافر، بهینه‌سازی شد. همچنین زمان واکنش لازم برای دستیابی به حذف ۹۵ درصد فنل به دست آمد. طبق این نتایج اکسیژن مورد نیاز شیمیایی و بیوشیمیایی به ترتیب به میزان ۵۸ و ۷۸ درصد کاهش یافت. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که افزایش غلظت آب اکسیژنه بیشتر از مقدار بهینه آن سبب غیر فعال شدن آنزیم شده و متعاقباً کارایی حذف آنزیم را کاهش می‌دهد. از طرف دیگر، افزایش آنزیم، پلی اتیلن گلیکول و زمان واکنش، به بیشتر از مقادیر بهینه آنها، راندمان حذف را به مقدار بسیار جزئی افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، حذف ترکیبات فنلی، پساب صنعتی، روغن زیتون، اکسیژن مورد نیاز شیمیایی.

Phenol Removal from Industrial Wastewater by HRP Enzyme

Iran Alemzadeh¹

Farnaz Mirzaei²

(Received Oct. 22, 2007 Accepted Oct. 28, 2008)

Abstract

In this research, horseradish peroxidase for phenol removal was utilized. First, the process was studied at the laboratory scale using a synthetic phenol solution (1-10) mM. Results showed that horseradish peroxidase (HRP) could effectively remove phenolic compounds from wastewater and that the catalytic capability of the enzyme was maintained for a wide range of pH, temperature, and aromatic concentration levels. The performance conditions were optimized for at least 95% and 100% removal of phenolic compounds for both actual and synthetic wastewaters under high and low phenol concentrations (1 and 10 mM). The phenolic wastewater used was an olive mill effluent with a phenol concentration of 1221 mg/L (13 mM) and a pH value of 3.5. At the end of the reaction, the phenolic compounds changed to insoluble polymers and precipitated. Each enzyme/wastewater system was optimized for the following chemical dosages: hydrogen peroxide, enzyme, polyethylene glycol (PEG), and buffer. Furthermore, the reaction time to achieve at least 95% phenol removal was determined. According to the results, COD and BOD reduced to 58% and 78%, respectively. Experimental results showed an increase in H₂O₂ concentration beyond the optimum dose resulting from enzyme inactivation, thus reducing the phenol removal efficiency. On the other hand, increasing the enzyme, PEG, and/or reaction time beyond the optimum values resulted in only a marginal increase in removal efficiency.

Keywords: Peroxidase, Removal of Phenolic Compounds, Industrial Waste, Olive Mill, COD.

1- Prof., Chemical and Petroleum Engineering Dept., Sharif University of Technology, Tehran, (Corresponding Author) (+98 21) 66165486 alemzade@sharif.edu

2- Graduate Student, Chemical and Petroleum Engineering Dept., Sharif University of Technology, Tehran

۱- استاد، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، (نویسنده مسئول) ۶۶۱۶۵۴۸۶ (۰۲۱) alemzade@sharif.edu

۲- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

۲ و ۳ است. طی این واکنش‌ها رادیکال‌های آزاد در چرخه، تشکیل شده و آنزیم به توده محلول نفوذ می‌کند. این رادیکال‌ها در محلول، محصولات پلی آروماتیک را تشکیل می‌دهند. این پلیمرها در آب نامحلول هستند و می‌توان با استفاده از عملیات جداسازی جامد-مایع آنها را از محلول جدا کرد [۱].

در حضور پراکسید اضافه، واکنش ۴ حائز اهمیت می‌شود، زیرا ترکیب III یا E_{iii} حالت غیر فعال و برگشت‌ناپذیر آنزیم است. این موضوع نشان می‌دهد که پراکسید هیدروژن اضافی، موجب بازدارندگی پراکسیداز می‌شود. از طرف دیگر، کمبود پراکسید در طول واکنش سبب محدود شدن سرعت واکنش می‌شود. افزودن پراکسید به صورت نیمه پیوسته و حفظ نسبت بهینه پراکسید به غلظت پراکسیداز سبب جلوگیری از بازدارندگی آنزیم می‌شود [۱۰ و ۱۱].

در مرحله پلیمریزاسیون نیز به طور قابل توجهی فرایند غیرفعال شدن آنزیمی رخ می‌دهد. رادیکال‌های آزادی که در چرخه کاتالیتیکی به سایت فعال آنزیم جذب می‌شوند، باعث جلوگیری از دسترسی سوبستراها می‌گردند [۱۱ و ۱۲]. بنا به کارگیری افزودنی‌هایی مانند پلی‌اتیلن گلیکول^۳ یا چیتوزان^۴، آنزیم، ابتدا غیرفعال شده و سپس به گونه‌ای محسوس کاهش می‌پذیرد. پلی‌اتیلن گلیکول با پلیمر ترکیب شده و به وسیله رسوب‌گیری از محلول جدا می‌شود. طول عمر آنزیم در این شرایط به خوبی افزایش می‌یابد [۵، ۱۱، ۱۳ و ۱۴].

۲- مواد و روشها

پراکسیداز ترب کوهی (EC 1.11.1.7)، ۱۰۵/۷۵ واحد در هر میلی‌گرم جامد)، کاتالاز (EC 1.1.1.6)، ۱۲۴۰۰ میلی‌گرم پروتئین/واحد، و پلی‌اتیلن گلیکول با وزن مولکولی متوسط ۳۳۵۰ از شرکت سیگما تهیه شد. در سال ۱۹۹۳، با استفاده از روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم و^۵ فعالیت ویژه پراکسیداز، ۱۲۰ میلی‌گرم جامد/واحد به دست آمد. یک واحد فعالیت عبارت است از تعداد میکرومول‌های فنلی که در هر دقیقه در pH برابر ۷/۴ و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تبدیل می‌شود. فعالیت اسمی کاتالاز ۹۳۰۰ میلی‌گرم جامد/واحد و ۱۲۴۰۰ میلی‌گرم پروتئین/واحد بود.

پراکسید هیدروژن (۳۰ درصد) از شرکت مرک^۶ تهیه شد. درجه خلوص فنل مورد استفاده در این تحقیق ۹۹ درصد بود و از شرکت

ترکیبات آروماتیک در پساب صنایع مختلف مانند پتروشیمی و پالایشگاه نفت، تبدیل زغال‌سنگ، پلاستیک، رزین، کارخانه‌های آهن و فولاد و همچنین صنایع کاغذسازی وجود دارند [۱ و ۲]. ترکیبات فنلی در صنعت پالایش نفت از تجزیه نفت خام و کراکینگ حرارتی یا کاتالیستی ناشی می‌شوند [۳]. علاوه بر ترکیبات فنلی، این پسابها معمولاً شامل آلودگی‌های آلی و غیرآلی دیگری مانند هیدروکربن‌های پلی آروماتیک، بنزن و مشتقات آن، سیانیدها و سولفیدها هستند [۳]. به طور کلی، تصفیه بیولوژیکی قادر است بیشتر این آلودگی‌ها را تصفیه کند. به هر حال، تجزیه بیولوژیکی معمولاً به زمان بیشتری نیاز دارد و معمولاً تحت تأثیر تغییرات دما و پدیده‌های پرئودیک آلودگی‌های سمی قرار می‌گیرد [۴]. تصفیه فنل‌ها به وسیله اکسیداسیون آنزیم-کاتالیستی یک پیشنهاد عملی و مناسب به جای فرایندهای تصفیه بیولوژیکی سنتی است [۵]. تعدادی از آنزیم‌ها که به دسته اکسیدوردکتازها مربوط می‌شوند، توانایی حذف ترکیبات فنلی را از پسابهای صنعتی دارا هستند [۶]. فرایند آنزیمی که در آن از آنزیم پراکسیداز ترب کوهی^۱ استفاده می‌شود، برای تصفیه مواد سمی پسابهای صنعتی کاربرد دارد [۷]. مزایای این روش عبارت‌اند از: ۱- گسترده‌گی انتخاب سوبسترا؛ ۲- کارایی در محدوده وسیعی از شرایط عملیاتی شامل pH، دما و غلظت سوبسترا؛ ۳- توانایی حذف سایر ترکیبات آلی با روش رسوب‌گیری هم‌زمان [۶، ۸ و ۹].

اکسیداسیون تک الکترونی سوبسترای آروماتیک (AH_2) به وسیله پراکسیداز با مکانیسم چنس جورج^۲ طبق واکنش‌های زیر صورت می‌گیرد [۱].



آنزیم در حالت طبیعی (E) به وسیله پراکسید هیدروژن به آنزیم واسطه فعال E_i اکسید می‌شود. ترکیب I، ترکیب آروماتیک را به سایت فعال خود می‌پذیرد و اکسیداسیون صورت می‌گیرد. به این ترتیب رادیکال آزاد (AH) تولید شده و به داخل محلول می‌رود. در این هنگام آنزیم به حالت E_{ii} تبدیل می‌شود. ترکیب II، مولکول آروماتیک دوم را اکسید می‌کند، رادیکال آزاد دیگری را رها کرده و به حالت طبیعی اولیه (E) بر می‌گردد، در نتیجه چرخه کامل می‌شود. واکنش کلی پراکسیداز شامل روابط ۱،

³ Polyethylene Glycol (PEG)

⁴ Chitosan

⁵ Wu

⁶ Merck

¹ Horseradish Peroxides

² Chance George

آلدريج^۱ تهیه شد. فری سیانید پتاسیم و ۴-آمینوآنتی پیرین از شرکت آلدريج تهیه گردید. محلولهای فری سیانید پتاسیم و ۴-آمینوآنتی پیرین برای مصرف، به صورت روزانه تهیه می‌شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌گردید.

از آنجایی که درصد بالایی از آلودگی پساب روغن زیتون^۲ را می‌توان توسط روش منعقدسازی کاهش داد، از آلوم^۳ با غلظت ۵ میلی مولار به عنوان منعقد کننده استفاده شد.

محلولهای فنل تهیه شده، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. نمونه پساب مورد استفاده در این آزمایش از کارخانه روغن زیتون سفیدرود تهیه شد. پسابها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. غلظت فنل موجود در این پساب، ۱۳ میلی مولار بود. غلظت فنل نیز با استفاده از روش کالریمتری، اندازه‌گیری شد.

فیلتراسیون یکی از روشهای کاهش مواد جامد معلق می‌باشد. به‌کارگیری این روش برای پسابهایی که حاوی مواد معلق زیاد هستند، تا حد زیادی آلودگی‌ها را کاهش می‌دهد. در این آزمایش نیز به عنوان اولین تصفیه، از فیلتراسیون استفاده شد. البته حذف ذرات معلق به وسیله میکروفیلتر، میزان خطاهای ایجاد شده در آنالیزهای اسپکتروفتومتری را نیز به حداقل می‌رساند. پساب سنتزی به علت عاری بودن از مواد معلق نیازی به فیلتراسیون اولیه ندارد. بعد از مرحله منعقدسازی، پساب کارخانه روغن زیتون با دور rpm ۳۰۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس محصول سانتریفوژ را فیلتر کرده و پساب فیلتر شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

واکنش‌های پراکسیداز در راکتورهای ناپیوسته انجام شد. راکتورهای ناپیوسته شامل ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر و حجم کل محلول واکنش ۳۰ میلی‌لیتر بود. حجم پساب مورد استفاده در تمام آزمایش‌ها ۲۵ میلی‌لیتر از حجم کل محلول واکنش و ۵ میلی‌لیتر باقی‌مانده شامل پراکسید هیدروژن، آنزیم، پلی اتیلن گلیکول، بافر فسفات و آب مقطر بود. برای تولید پساب با غلظت زیاد فنل (۱۰ میلی مولار) از محلول فنل ۰/۵ مولار استفاده شد؛ به این صورت که مقداری از محلول فنل به پساب زیتون تزریق می‌شد.

راکتورها با مقادیر مشخص آنزیم، پلی اتیلن گلیکول، بافر، آب مقطر و ۲۵ میلی‌لیتر پساب آماده شدند به طوری که حجم نهایی ۳۰ میلی‌لیتر بود. محلول واکنش در راکتورهای ناپیوسته (ارلن‌ها) با همزن مغناطیسی به طور مداوم هم‌زده می‌شد. روش اندازه‌گیری فنل، روشی فتومتری بر اساس ۴-آمینوآنتی پیرین و فریسیانید

بود. واکنش‌ها با افزودن مقدار مشخص پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به راکتورها شروع شدند. برای اینکه از کامل شدن واکنش اطمینان حاصل شود، راکتورها به مدت ۵ ساعت به صورت مداوم هم‌زده شدند. در انتهای دوره واکنش، مقدار ۲۰۰۰ میکرولیتر از محلول واکنش با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کاتالاز با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مخلوط شد تا مقدار پراکسید هیدروژن باقی‌مانده مصرف شود. برای افزایش انعقاد، از ۲۰۰ میکرولیتر محلول سولفات پتاسیم آلومینیم (آلوم) به غلظت ۴۰ گرم بر لیتر استفاده شد. همه نمونه‌ها تقریباً به مدت ۱ دقیقه با دست هم‌زده شدند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه و با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ گشتند. پس از اندازه‌گیری مقدار فنل باقی‌مانده در محلول، میزان درصد آن به عنوان راندمان واکنش در نظر گرفته شد. بخشهایی که در ادامه آمده، چگونگی بهینه‌سازی پنج پارامتر مورد نظر در فرایند تصفیه آنزیمی پسابهای سنتزی و صنعتی است.

غلظت پراکسید هیدروژن، اولین پارامتری است که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. غلظت H_2O_2 برای سیستم‌های تصفیه برای غلظتهای بالا و پایین فنل (۱۰ و ۱ میلی‌مولار) بهینه‌سازی شد. مقدار پراکسید هیدروژن اضافه شده با نسبت میلی مولار H_2O_2 به میلی مولار فنل در راکتور بیان می‌شود. در طول روش بهینه‌سازی، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به صورت محدود تا رسیدن به میزان بهینه کسر مولار پراکسید هیدروژن به میلی‌مولار فنل اضافه شد و سپس میزان بهینه میلی مولار پراکسید هیدروژن به میلی مولار فنل برای سیستم‌های مختلف به دست آمد. غلظت آنزیم و پلی اتیلن گلیکول به صورت مازاد بر میزان استوکیومتری، و غلظت بافر فسفات نیز در راکتورها ۰/۵ مولار بود.

دومین پارامتری که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت، مقدار فعالیت بهینه پراکسیداز بود. در این مجموعه از آزمایش‌ها از غلظت بهینه شده پراکسید هیدروژن برای سیستم‌های تصفیه پساب استفاده شد، در حالی که PEG به مقدار مازاد بر استوکیومتری واکنش و بافر فسفات با غلظت ۰/۵ مولار در محلول بودند. پراکسیداز نیز به مقدار محدود و تا رسیدن به میزان حداقل آنزیم مورد نیاز برای حذف ۹۵ درصد فنل اضافه شد.

برای به دست آوردن مقدار غلظت بهینه پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی ۳۳۵۰، از محلول ۴۰ گرم بر لیتر پلی اتیلن گلیکول استفاده شد و سپس این محلول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در طول آزمایش‌ها، از مقدار بهینه نسبت میلی مولار H_2O_2 به میلی مولار فنل، و مقدار بهینه پراکسیداز استفاده شد.

برای بررسی اثر pH و بافر، از محلولهای بافر استات سدیم-اسید استیک، بافر فسفات سدیم، بافر برات و بافر کربنات سدیم استفاده شد. اثر pH در محدوده ۴ تا ۱۰ بر راندمان حذف فنل از

¹ Aldrich

² Olive Mill Wastewater (OMW)

³ Alum

پساب سنتزی بررسی شد. پراکسید هیدروژن و فنل به نسبت ۱ به ۱ و پلی اتیلن گلیکول به مقدار ۴۰ گرم بر لیتر برای غلظت‌های مختلف فنل اضافه شد. راکتور با غلظت‌های شیمیایی بهینه برای پساب صنعتی آماده شد. یک راکتور حاوی بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار بود، در حالی که در دیگری با حجم مساوی آب مقطر ریخته شد. راندمان حذف فنل برای هر دو راکتور بعد از این که واکنش به مدت ۵ ساعت انجام شد، مقایسه شد.

برای بررسی زمان واکنش، همه مواد شیمیایی با مقادیر بهینه در راکتورها ریخته و واکنش به مدت ۵ ساعت انجام شد. نمونه‌ها در فاصله‌های زمانی مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند تا میزان راندمان حذف فنل در آنها برحسب زمان برای هر سیستم پساب مشخص شود.

نتایج این سری از آزمایش‌ها، کمترین زمان لازم برای رسیدن به حذف ۹۵ درصد از ترکیبات فنلی تحت شرایط عملیاتی با راکتور ناپیوسته کاملاً هم‌زده را مشخص کرد. در مراحل مختلف آزمایش‌ها میزان اکسیژن مورد نیاز شیمیایی^۱ و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شد. در ضمن کلیه آزمایش‌ها بر اساس روش‌های استاندارد تعریف شده در مراجع انجام گرفته است [۱ و ۲].

۲-۱- روش اندازه‌گیری غلظت فنل

اندازه‌گیری غلظت فنل به وسیله روش کالریتری انجام شد. در این روش از ۴- آمینوآنتی پیرین (۴-AAP) و فری سیانیدپتاسیم به عنوان سوبسترای تولید کننده رنگ و محلول فنل استفاده شود. تولید رنگ در طول موج ۵۱۰ نانومتر، مستقیماً با غلظت ترکیبات فنلی در محلول تناسب دارد. محلولی که برای اندازه‌گیری آماده می‌شود، شامل ۱۰۰ میکرولیتر فری سیانید، ۱۰۰ میکرولیتر آمینوآنتی پیرین و ۸۰۰ میکرولیتر از نمونه است.

۲-۲- روش اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز

مواد لازم در این روش عبارت است از: ۲۵۰ میکرولیتر از محلول ۴- آمینوآنتی پیرین ۹/۶ میلی مولار، ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنل ۱۰۰ میلی مولار، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پراکسید هیدروژن ۲ میلی مولار، ۵۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات سدیم (pH برابر با ۷/۴) و ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیم. پس از اضافه کردن آنزیم، سرعت واکنش با اندازه‌گیری سرعت افزایش جذب نور در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم عبارت است از تعداد میکرومول‌های فنل که در هر دقیقه در pH برابر ۷/۴ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تبدیل می‌شود.

۲-۳- اندازه‌گیری اکسیژن مورد نیاز شیمیایی

این اندازه‌گیری با استفاده از روش هضم ۲ ساعته با اسید سولفوریک و دی‌کرومات پتاسیم انجام شد.

۲-۴- اندازه‌گیری اکسیژن مورد نیاز بیوشیمیایی^۲

پساب مورد آزمایش بعد از رقت مناسب به مدت ۵ روز در ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی کشت داده شد. کم شدن اکسیژن محلول در ضمن عمل کشت، مبنای اندازه‌گیری اکسیژن مورد نیاز بیوشیمیایی قلمداد گشت.

در بخش تصفیه فیزیکی پس از میکروفیلتراسیون پساب کارخانه روغن زیتون، با استفاده از آلوم ۴۰ گرم در لیتر، انعقادسازی انجام گرفت. سپس پساب کارخانه روغن زیتون با دور ۳۰۰۰ rpm و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شده و محصول عملیات سانتریفوژ مجدداً میکروفیلتر گشت و پساب به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۳- نتایج و بحث

نتایج نهایی بخش تصفیه فیزیکی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- نتایج نهایی تصفیه فیزیکی پساب طبیعی

مرحله	فنل (میلی مولار)	COD (میلی‌گرم بر لیتر)
قبل از تصفیه فیزیکی	۱۳	۶۱۶۳۳
بعد از تصفیه فیزیکی	۹/۰۱۶	۳۳۸۵۱
درصد بازده حذف	۳۰/۶	۴۵

برای سهولت، پساب سنتزی^۳ و پساب کارخانه روغن زیتون، به ترتیب با علایم اختصاری SW و OMW نشان داده شده است.

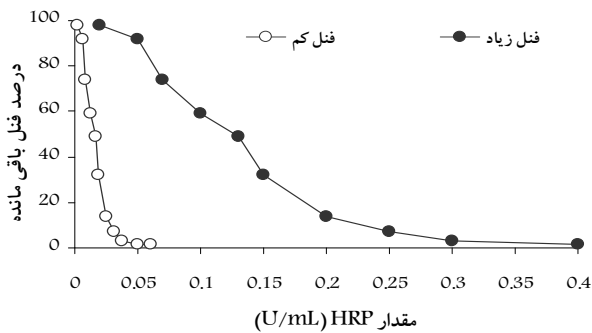
نسبت بهینه، نسبت میلی مولار H₂O₂ به میلی مولار فنل برای دو پساب رقیق و غلیظ (۱، ۱۰ میلی مولار برای SW، OMW) به دست آمد. راندمان حذف فنل به صورت مقدار فنل باقی‌مانده، به عنوان تابعی از نسبت میلی مولار H₂O₂ به میلی مولار فنل، در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

مقدار آنزیم در راکتورها، به صورت اضافه بر مقدار استوکیومتری استفاده شد. میزان آنزیم برای OMW، ۰/۲۴ U/mL و برای SW، ۰/۴۸ U/mL و ۰/۰۸ U/mL در نظر گرفته شد. غلظت پلی اتیلن گلیکول نیز به صورت مازاد بر میزان استوکیومتری و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در راکتورها بود.

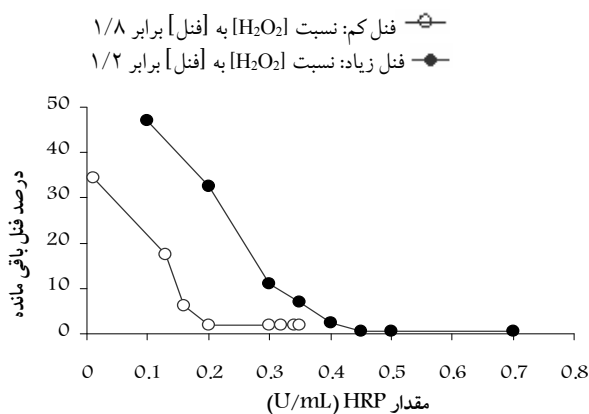
² Biological Oxygen Demand (BOD)

³ Synthesis Wastewater (SW)

¹ Chemical Oxygen Demand (COD)



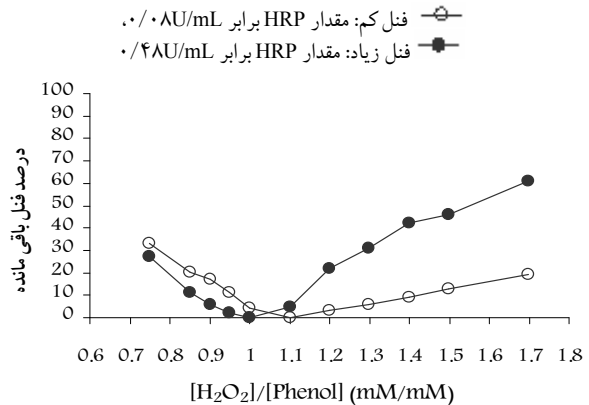
شکل ۳- تغییرات درصد حذف فنل با افزایش میزان HRP در SW
شرایط واکنش: (۱) نسبت $[H_2O_2]$ به [فنل] برابر $0.1/0.1$ mM/mM مقدار PEG برابر 1000 میلی‌گرم بر لیتر، (۳) غلظت بافر فسفات برابر $0.05/0.5$ مولار، (۴) زمان واکنش برابر ۵ ساعت



شکل ۴- تغییرات درصد حذف فنل با افزایش میزان HRP در OMW
شرایط واکنش: (۱) مقدار PEG برابر 1000 میلی‌گرم بر لیتر، (۲) غلظت بافر فسفات برابر $0.05/0.5$ مولار، (۳) زمان واکنش برابر ۵ ساعت

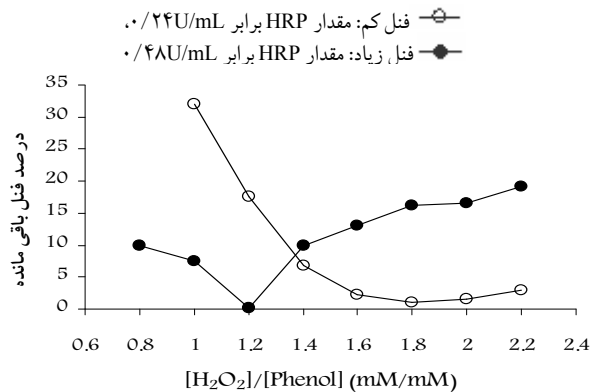
هیدروژن به فنل که در سری آزمایش‌های قبلی به دست آمده بود، انجام شد. میزان کمینه آنزیم پراکسیداز برای پساب سنتزی با غلظتهای فنل ۱ و ۱۰ میلی مولار به ترتیب $0.05/0.4$ میلی لیتر/واحد به دست آمد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که OMW با غلظت فنل پایین، نسبت به SW به میزان چهار برابر آنزیم، پراکسیداز بیشتری نیاز دارد که می‌تواند به دلیل افزایش نسبت پراکسیداز هیدروژن به فنل باشد که موجب مهار آنزیم شده است. لکن نتایج، برای پساب طبیعی در غلظت بالا، مشابه حالت سنتزی است.

مقادیر غلظت بهینه به دست آمده برای پلی اتیلن گلیکول برای پساب صنعتی در روش تصفیه آنزیمی با پراکسیداز بسیار نزدیک به نتایج مربوط به پساب سنتزی می‌باشد (جدول ۲). هنگامی که غلظت PEG در راکتور بیشتر از مقدار بهینه باشد، راندمان حذف فنل تغییر چشمگیری نخواهد کرد.



شکل ۱- تغییرات درصد حذف فنل با افزایش نسبت پراکسید هیدروژن به فنل در SW

شرایط واکنش: (۱) مقدار پلی اتیلن برابر 1000 میلی‌گرم بر لیتر، (۲) غلظت بافر فسفات برابر $0.05/0.5$ مولار، (۳) زمان واکنش برابر ۵ ساعت



شکل ۲- تغییرات درصد حذف فنل با افزایش نسبت پراکسید هیدروژن به فنل در OMW

شرایط واکنش: (۱) $PEG=1000$ mg/L، (۲) غلظت بافر فسفات برابر $0.05/0.5$ مولار، (۳) زمان واکنش برابر ۵ ساعت

غلظت بافر فسفات سدیم در همه راکتورها 0.05 مولار نگه داشته شد.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، پراکسیداز، پساب سنتزی با غلظتهای ۱ و ۱۰ میلی مولار فنل را با نسبت‌های بهینه پراکسید-هیدروژن به فنل $1/1$ و $1/0$ تصفیه می‌کند. کاهش مقدار بهینه پراکسید هیدروژن به فنل از غلظت پایین فنل (۱ میلی مولار) به غلظت بالای آن (۱۰ میلی مولار) با کمتر بودن اثر ماتریکس واکنش مطابقت دارد. مطالعات نشان می‌دهد که افزایش نسبت پراکسید هیدروژن به فنل بیشتر از نسبت بهینه منجر به غیر فعال شدن آنزیم می‌شود، و در نتیجه راندمان حذف فنل کاهش می‌یابد. در شکلهای ۳ و ۴ راندمان حذف فنل برحسب مقدار پراکسیداز نشان داده شده است. مجموعه آزمایش‌ها در مقدار بهینه پراکسید-

جدول ۲- غلظت‌های بهینه پلی اتیلن گلیکول برای دو نوع پساب سنتزی و صنعتی

نمونه	پلی اتیلن گلیکول (لیتر/ میلی گرم)
SW (۱ mM)	۳۰
SW (۱۰ mM)	۲۵۰
OMW (۱ mM)	۵۰
OMW (۱۰ mM)	۳۰۰

جدول ۳- مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با سایر تحقیقات

نام محقق	آنزیم	pH	غلظت اولیه H_2O_2 (میلی مولار)	حذف فنل (درصد)
J.Nicell [۱۵]	پراکسیداز ۲۳nM	۷/۴	۰/۵	۹۳
Arnao [۱۶]	پراکسیداز ۱ μ M	۷/۰	۱۰	۹۰
Baynton [۱۷]	پراکسیداز ۱۰۰nM	۷/۰	۲۵	۹۵
تحقیق SW پساب سنتزی	پراکسیداز ۱۳۷nM	۷/۴	۱/۰	۹۵
تحقیق OMW پساب صنعتی	پراکسیداز ۱۳۷nM	۷/۴	۱/۲	۱۰۰

جدول ۴- زمان کمینه لازم برای رسیدن به راندمان حذف فنل ۹۵ درصد

نمونه	زمان (ساعت)
SW (۱ mM)	۵
SW (۱۰ mM)	۳
OMW (۱ mM)	۱
OMW (۱۰ mM)	۱/۵

هیدروژن باقی مانده می باشد که موجب کاهش فعالیت آنزیم در محیط واکنش می شود.

۴- نتیجه گیری

حذف فنل به روش آنزیمی با استفاده از پراکسیداز ترب کوهی در حضور پراکسید هیدروژن و پلی اتیلن گلیکول بررسی شد. دو نوع پساب سنتزی و صنعتی حاصل از پساب کارخانه روغن زیتون، آماده و حذف فنل و ترکیبات فنلی در این پسابها مطالعه شد. دو غلظت اولیه فنل شامل ۱ و ۱۰ میلی مولار در پساب سنتزی و پساب صنعتی ۱۳ میلی مولار فنل استفاده شد. البته پساب طبیعی نیز برای مقایسه رقیق شد. عواملی که در این بررسی بهینه شد عبارت بودند از:

- نسبت پراکسید هیدروژن به فنل؛
- میزان آنزیم لازم برای حذف حداکثر فنل؛
- میزان بهینه پلی اتیلن گلیکول؛
- زمان لازم برای حذف فنل به میزان حداکثر.

تمامی این مطالعات برای پساب سنتزی و طبیعی بهینه گردید.

در جدول ۳، نتایج حاصل از این تحقیق با سایر نتایج محققان مقایسه شده است. مقایسه نتایج آزمایش‌های انجام شده با نمونه‌های مشابه آن بیانگر این موضوع است که میزان حذف فنل با روش انجام شده در این مطالعه برای پساب سنتزی مشابه و نزدیک با درصد حذف آن در سایر مطالعات است. لکن از میزان کمتر پراکسید هیدروژن استفاده شده است. برای پساب صنعتی، کاهش آلاینده حداکثر بوده است. لازم به ذکر است که نتایج مطالعات در جدول ۳ در مورد تصفیه پساب سنتزی و طبیعی می باشد. در صورتی که تاکنون تحقیقاتی بر روی پساب فنلی زیتون انجام نشده است. نتایج حاصل از این جدول حاکی از آن است که در میزان کمتری از پراکسید هیدروژن حذف فنل قابل ملاحظه است، این میزان حذف برای پساب سنتزی ۹۵ و برای پساب صنعتی ۱۰۰ درصد مشاهده شد. زمان کمینه لازم در جدول ۴ نشان داده شده است. در اکثر موارد بیش از ۹۰ درصد حذف فنل در همان یک ساعت ابتدایی شروع واکنش اتفاق می افتد. سرعت این واکنش به طور قابل توجهی بعد از اولین ساعت کاهش می یابد. علت این موضوع مربوط به کاهش میزان فنل و یا پراکسید

- 1- Nicell, J. A. (1994). "Kinetics of horseradish peroxidase-catalyzed polymerization and precipitation of aqueous 4-chlorophenol." *J. of Chemical Technology and Biotechnology*, 60, 203-215.
- 2- Singh, N., and Singh, J. (2002). "An enzymatic method for removal of phenol from industrial effluent." *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 32 (2), 127-133.
- 3- Dyer, J. C., and Mignone, N. A. (1993). *Handbook of industrial residues*, Vol. 1, Environmental Engineering Series, Noyes Publications, Park Ridge, NJ, USA.
- 4- Lanouette, K. H. (1997). "Treatment of phenolic wastes." *Chem. Eng. (Deskbook Issue)*, 17, 99-106.
- 5- Wagner, M., and Nicell, J. A. (2001). "Peroxidase-Catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater." *J. of Water Science and Technology*, 43(2), 253-267.
- 6- Karam Nicell, J. (1997). "Potential applications of enzymes in waste treatment." *J. of Chemical Technology and Biotechnology*, 69, 41- 49.
- 7- Klibanov, A. M., Alberti, B. N., Morris, E. D., and Felshin, L. M. (1980). "Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters." *J. of Applied Biochemistry*, 2, 414-421.
- 8- Cooper, V. A., and Nicell, J. A. (1996). "Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase." *Water Research*, 30 (4), 954-963.
- 9- Wagner, M., and Nicell, J. (2002). "Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide." *J. of Water Research*, 36, 4041-4052.
- 10- Lai, Y. C., and Lin, S. C. (2005). "Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-chlorophenol from aqueous solution." *Process Biochem.*, 40, 1167-1174.
- 11- Wu, J., Bewtra, J. K., Biswas, N., and Taylor, K. E. (1994). "Effect of H₂O₂ addition mode on enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol." *The Canadian J. of Chemical Engineering*, 72, 881-886.
- 12- Ator, M. A., and Ortiz de Montellano, P. R. (1987). "Protein control of prosthetic heme reactivity." *J. of Biol. Chem.*, 262(4), 1542-1551.
- 13- Wilberg, K., Senhaimer, C. A. and Rubio, J. (2002). "Removal of aqueous phenol catalyzed by a low purity soybean peroxidase." *J. of Chem. Technol. Biotechnol.*, 77, 851-857.
- 14- Ganjidoust, M., Tatsumi, K., Wada, S., and Kowase, M. (1996). "Role of peroxidase and chitosan in removing chlorophenols from aqueous solution." *Wat. Sci. Technol.*, 34(10), 151-159.
- 15- Nicell, J. A., Bewtra, J. K., Biswas, N., and St. Pierre, C. C. (1993). "Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compound from aqueous solution." *Canadian J. of Civ. Eng.*, 20, 725-735.
- 16- Arnao, M. B., Acosta, M., del Rio, J. A., Varon, R., and Garcia-Canovas, F. (1990). "A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide." *Biochem. Biophys., Acta* (1041), 43-47.
- 17- Baynton, K. J., Bewtra, J. K., Biswas, N., and Taylor, K. E. (1994). "Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide; a kinetic investigation." *Biochem. Biophys., Acta* (1206), 272-278.