

Journal of Water and Wastewater, Vol. 31, No.4, pp: 16-26

# Application of Immobilized Tyrosinase for Phenol Degradation in Batch and Continuous Operation Modes

N. Soltani-Firooz<sup>1</sup>, R. Panahi<sup>2</sup>, B. Mokhtarani<sup>3</sup>, F. Yazdani<sup>4</sup>

1. MSc in Chemical Engineering, Faculty of Petroleum Engineering, Chemistry and Chemical Engineering Research Center of Iran (CCERCI), Tehran, Iran
2. Assist. Prof., Faculty of Petroleum Engineering, Chemistry and Chemical Engineering Research Center of Iran (CCERCI), Tehran, Iran  
(Corresponding Author) Panahi@ccerci.ac.ir
3. Prof., Faculty of Petroleum Engineering, Chemistry and Chemical Engineering Research Center of Iran (CCERCI), Tehran, Iran
4. Assist. Prof., Faculty of Petroleum Engineering, Chemistry and Chemical Engineering Research Center of Iran (CCERCI), Tehran, Iran

(Received Sep. 8, 2019 Accepted Dec. 15, 2019)

#### To cite this article:

Soltani-Firooz, N., Panahi, M., Mokhtarani, B., Yazdani, F. 2020. "Application of immobilized tyrosinase for phenol degradation in batch and continuous operation modes" Journal of Water and Wastewater, 31(4), 16-26.  
Doi: 10.22093/wwj.2019.200946.2922 (In Persian)

## Abstract

Conventional technologies for degradation of phenolic compounds encounter several challenges such as large energy consumption and sludge production. Enzymes, natural catalysts displaying a superb selectivity, can be used for phenol removal. In the present work, tyrosinase immobilized on cellulosic support was used for degradation of phenol in batch and continuous operation modes in different conditions. In this regard, the effect of concentration, flow rate and pH on degradation yield were investigated. The results proved that higher oxidation rates were clearly achieved in continuous operation compared with batch experiments. The pH of 6 and 7 were suitable for phenol removal. In continuous mode, the complete phenol degradation was observed where the initial phenol concentration of 25 ppm was applied at residence times between 3.1 and 6.4 min. However, the greatest overall degradation yield of 71% was obtained with the initial concentration of 25 ppm by utilizing the flow rate of 18 ml/h. The degradation yield of 54% was found in recycling modes at initial phenol concentration of 25 ppm and a flow rate of 30 ml/h. Based on the results, degradation of phenol using tyrosinase can be considered as a valuable and green method.

**Keywords:** Tyrosinase, Bioreactor, Biocatalyst, Phenol Degradation, Continuous Process.



مجله آب و فاضلاب، دوره ۳۱، شماره ۴، صفحه: ۲۶-۱۶

## به کارگیری آنزیم تایروزیناز تثبیت شده برای تخریب فنل در فرایند ناپیوسته و پیوسته

ناهید سلطانی فیروز<sup>۱</sup>، رضا پناهی<sup>۲</sup>، بابک مختارانی<sup>۳</sup>، فرشاد یزدانی<sup>۴</sup>

۱- کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، پژوهشکده مهندسی نفت، پژوهشگاه شیمی

و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران

۲- استادیار، پژوهشکده مهندسی نفت، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران

panahi@ccerci.ac.ir (نویسنده مسئول)

۳- استادیار، پژوهشکده مهندسی نفت، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران

۴- استادیار، پژوهشکده مهندسی نفت، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران

پذیرش ۹۸/۹/۲۴

(دریافت ۹۸/۷/۱۷)

برای ارجاع به این مقاله به صورت زیر اقدام فرمایید:

سلطانی فیروز، ن.، پناهی، ر.، مختارانی، ب.، یزدانی، ف.، ۱۳۹۹، "به کارگیری آنزیم تایروزیناز تثبیت شده برای حذف فنل در فرایند ناپیوسته و پیوسته"

مجله آب و فاضلاب، ۳۱(۴)، ۲۶-۱۶. Doi: 10.22093/wwj.2019.200946.2922

### چکیده

فناوری‌های مرسوم در زمینه حذف ترکیبات فنلی دارای چالش‌هایی نظیر مصرف انرژی زیاد و لجن تولیدی هستند. آنزیم‌ها به‌عنوان کاتالیست‌های طبیعی با انتخابگری بسیار زیاد می‌توانند برای حذف فنل استفاده شوند. در این پژوهش تایروزیناز بر روی بستر سلولزی تثبیت شد و برای حذف فنل در فرایند ناپیوسته و پیوسته تحت شرایط مختلف استفاده شد. تأثیر غلظت فنل، دبی و اسیدیتیه محیط بر بازده فرایند بررسی شد. نتایج نشان داد در مقایسه با فرایند ناپیوسته، نرخ حذف فنل در فرایند پیوسته، بیشتر است. برای حذف فنل، pHهای ۶ و ۷ مناسب بودند. در فرایند پیوسته بیشترین میزان بازده کلی حذف فنل معادل ۷۱ درصد با محلول فنلی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر و دبی ۱۸ میلی‌لیتر در ساعت حاصل شد. در فرایند با جریان بازگشتی بازده حذف ۵۴ درصد با غلظت اولیه ۲۵ میلی‌گرم در لیتر و دبی ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت بود. نتایج نشان داد حذف فنل با استفاده از آنزیم تایروزیناز می‌تواند به‌عنوان یک روش سبز مدنظر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تایروزیناز، بیوراکتور، بیوکاتالیست، تخریب فنل، فرایند پیوسته

### ۱- مقدمه

اینکه اکسیداسیون میکربی و شیمیایی از فرایندهای مرسوم برای تخریب فنل شناخته می‌شوند. این فناوری‌ها با چالش‌هایی مانند نیاز به زمین، مصرف انرژی و لجن تولیدی مواجه هستند. به‌منظور رفع این چالش‌ها می‌توان از فرایندهای کاتالیستی برای حذف فنل استفاده کرد. آنزیم‌ها به‌عنوان کاتالیست‌های طبیعی با انتخابگری بسیار زیاد می‌توانند برای این منظور استفاده شوند (Korbahti and Tanyolac, 2003, Svobodova and Novotny, 2018, Pirsahab et al., 2018, Alvarino et al., 2018, Eslami et al., 2016, Leenders et al., 2015)

فنل و مشتقات آن علی‌رغم سمیت و سرطان‌زایی برای تولید محصولات مختلفی نظیر رزین، نایلون، چسب، مواد منفجره و رنگ استفاده می‌شود. همچنین پساب‌های فنلی در صنایع نفت تولید می‌شوند (Berenguer et al., 2016). حد مجاز ترکیبات فنل در آب آشامیدنی کمتر از نیم میلی‌گرم در لیتر است (Sohrabi and Akhlaghian, 2016). جذب توسط کربن فعال و استخراج توسط حلال، از روش‌های بازیافت فنل هستند. ضمن



در طول موج ۴۷۵ نانومتر در فواصل زمانی ۳۰ ثانیه با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر PerkinElmer ثبت شد. یک واحد آنزیمی، مقداری از آنزیم است که توانایی تبدیل ال-تایروزین به محلول رنگی و افزایش میزان جذب به مقدار ۰/۰۰۱ بر دقیقه را دارد (Dinçer, et al., 2012).

فعالیت آنزیم استخراج شده در حدود ۶۰۰۰ واحد بر میلی لیتر بود. سپس تثبیت تایروزیناز بر پایه سلولزی انجام شد. به منظور آماده سازی سطح برای عملیات تثبیت، پایه کاغذی ابتدا توسط محلول ۰/۵ نرمال از اسید هیدروکلریک و سپس توسط مقدار کافی از آب مقطر شست و شو داده شد. پس از آن، پایه درون اتیلن دی آمین ۹۹ درصد به مدت ۴۵ دقیقه غوطه ور شد تا در این مرحله گروه های آمینی مورد نظر روی بستر ایجاد شود. در مرحله بعدی، پایه به مدت ۳ ساعت درون محلول گلو تارالدهید ۲ درصد حجمی-حجمی به عنوان عامل اتصال عرضی در شرایط محیط قرار داده شد. به منظور اتصال آنزیم به سطح و انجام عملیات تثبیت، پایه درون محلول آنزیمی به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس غوطه ور شد. پس از اتمام فرایند، آنزیم تثبیت شده با مقدار کافی از بافر فسفات شستشو داده شد تا آنزیم های آزاد موجود روی سطح برداشته شوند (Soltani-Firooz et al., 2017).

## ۲-۳- حذف فنل

حذف آنزیمی فنل در فرایند ناپیوسته و پیوسته بررسی شد. برای انجام آزمایش ها، محلول فنل به صورت تازه با غلظت و اسیدیته مشخص در بافرهای سیترات و فسفات تهیه شد. تمام آزمایش ها در دمای محیط بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس انجام شدند. میزان حذف فنل از معادله ۱ محاسبه شد

$$\text{حذف درصد} = \frac{C_f - C_i}{C_f} \times 100 \quad (1)$$

که در آن

$C_i$  و  $C_f$  به ترتیب غلظت فنل در خوراک بر حسب میلی گرم در لیتر و غلظت فنل در پساب تیمار شده بر حسب میلی گرم در لیتر هستند (Xu and Yang, 2013). در فرایند پیوسته و ناپیوسته، بازده کلی حذف به عنوان درصدی از فنل که در داخل راکتور حذف شده است، در نظر گرفته شد.

فرایندهای آنزیمی در مقایسه با فرایندهای مرسوم بسیار سازگارتر با طبیعت، اقتصادی تر و پایدارتر هستند (Sheldon and Van Pelt, 2013) به منظور غلبه بر پایداری عملیاتی کم و چالش های استفاده مجدد، آنزیم ها باید برای روی پایه جامد تثبیت شوند. آنزیم تثبیت شده می تواند در فرایندهای پیوسته استفاده شود (Zhou and Hartmann 2013, Tavares et al., 2018, Prokopijevic et al., 2014, Sekuljica et al., 2016)

تایروزیناز<sup>۱</sup>، آنزیمی دارای اتم مس است که به صورت وسیعی در طبیعت یافت می شود و معمولاً از قارچ های خوراکی استخراج می شود. این آنزیم قادر به اکسیداسیون فنل حتی در غلظت های بسیار کم و در حضور اکسیژن اتمسفری به عنوان گیرنده الکترون است (Abdollahi et al., 2018, Soltani-Firooz et al., 2017). در این پژوهش تایروزیناز بر روی پایه سلولزی تثبیت شد و برای اکسیداسیون فنل در فرایند ناپیوسته استفاده شد. در این آزمایش ها، اثر نسبت فنل به آنزیم، غلظت فنل، و اسیدیته محیط بر روی اکسیداسیون فنل بررسی شد. سپس آنزیم تثبیت شده برای حذف فنل در فرایند پیوسته به کار گرفته شد. اثر غلظت های مختلف فنل، دبی جریان، و اسیدیته محیط بر اکسیداسیون فنل در فرایند پیوسته ارزیابی شد.

## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- مواد

فیلتر واتمن کاغذی درجه ۴۲، بدون خاکستر به عنوان پایه سلولزی برای تثبیت آنزیم استفاده شد (Soltani-Firooz et al., 2017). مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش ها از شرکت مرک<sup>۲</sup> تهیه شدند. قارچ خوراکی *Agaricus bisporus* تازه از شرکت های معتبر موجود در بازار تهیه شد.

### ۲-۲- فرایند استخراج و تثبیت آنزیم

استخراج آنزیم تایروزیناز با استفاده از پژوهش های قبلی انجام شد (Zynek et al., 2010). فعالیت تایروزیناز با استفاده از محلول فنلی ال-تایروزین ۱ میلی مولار در بافر فسفات با pH برابر ۷ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس اندازه گیری شد. تغییرات جذب محلول

<sup>1</sup> Tyrosinase  
<sup>2</sup> Merck



### ۲-۳-۱- فرایند ناپیوسته

در این بخش با استفاده از محلول فنل ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و pH برابر ۷، نسبت‌های مختلف حجم فنل به سطح آنزیمی در ظرف‌های مناسب تهیه شد. سپس نمونه‌ها در ۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳ ساعت در دمای محیط گرماگذاری شدند تا اثر نسبت حجم فنل به سطح آنزیم بررسی شود.

برای بررسی اثر غلظت فنل بر حذف فنل، غلظت‌های متفاوت از فنل تهیه شد. سپس مقدار مشخصی از آنزیم در محلول فنلی ریخته شد و سوسپانسیون در ۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳ ساعت گرماگذاری شد. برای بررسی اثر pH بر روی حذف فنل، مقدار مشخصی از آنزیم در محلول فنل ۱۰۰ میلی گرم در لیتر با pHهای مختلف قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در ۲۰۰ دور بر دقیقه و دمای محیط گرماگذاری شدند.

در آزمایش‌های ناپیوسته، میزان غلظت فنل در پایان آزمایش‌ها اندازه‌گیری شد و حذف فنل محاسبه شد (Soltani, Firooz et al., 2017).

### ۲-۳-۲- فرایند پیوسته

برای انجام اکسیداسیون در فرایند پیوسته، آنزیم تثبیت شده درون ستون شیشه‌ای به قطر ۵/۵ و طول ۵۷ میلی متر قرار داده شد. از پمپ سرنگی یا پمپ پرستالتیک برای انتقال فنل به درون بیوراکتور با دبی مشخص استفاده شد.

در آزمایش‌های پیوسته بدون جریان بازگشتی، محلول فنل با غلظت‌های مشخص در pH برابر ۷ با دبی‌های مختلف از داخل راکتور عبور داده شد. برای بررسی اثر pH در میزان حذف، محلول فنلی ۲۵ میلی گرم در لیتر در pHهای مشخص با دبی ۱۸ میلی لیتر در ساعت از داخل راکتور گذرانده شد. در تمام آزمایش‌های با جریان بازگشتی، از جریان خروجی نمونه‌گیری شد و غلظت فنل اندازه‌گیری شد.

در آزمایش‌های فرایند پیوسته با جریان بازگشتی، ۳۰ میلی لیتر محلول فنل با pH برابر ۷، با غلظت‌های مختلف از راکتور با دبی ۳۰ میلی لیتر در ساعت عبور کرد و خروجی راکتور به مخزن خوراک بازگشت داده شد. این آزمایش‌ها به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. در تمام آزمایش‌ها با جریان بازگشتی، غلظت فنل در مخزن خوراک در زمان‌های مشخص اندازه‌گیری شد.

### ۲-۴- تعیین غلظت فنل

تعیین غلظت فنل بر اساس روش رنگ‌سنجی انجام شد. برای این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر پتاسیم فریک سیانید (۴/۸۳ میلی مولار)، ۱۰۰ میکرولیتر آمینواتی پایرین<sup>۱</sup> (۲۰/۸ میلی مولار)، و ۷۰۰ میکرولیتر بی‌کربنات بافر (۲۵/۰ میلی مولار) مخلوط شد. پس از چند دقیقه، جذب نمونه در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت فنل با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد (Gomez et al., 2006, Zhang et al., 2010).

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- حذف فنل در فرایند ناپیوسته

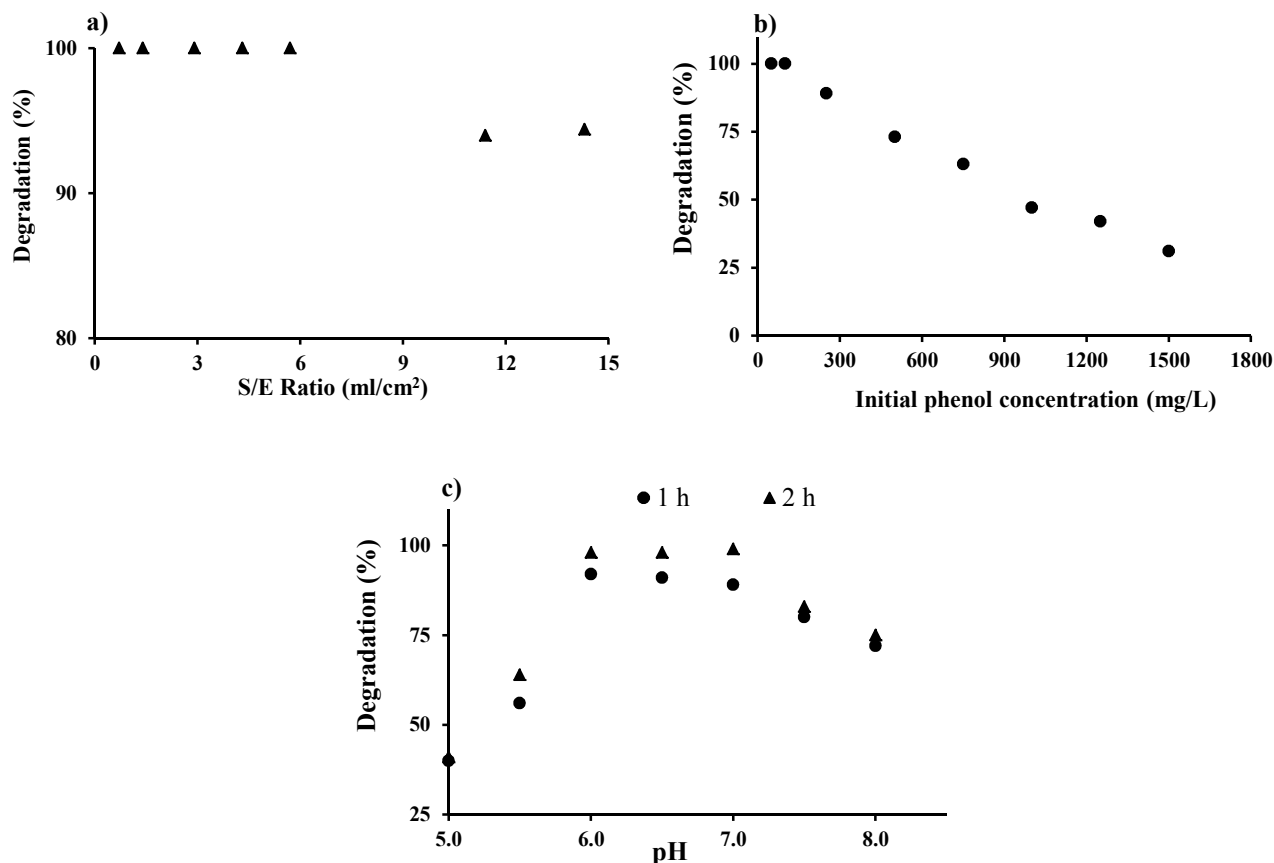
##### ۳-۱-۱- اثر نسبت سوبسترا به آنزیم

برای بررسی توانایی تایروزیناز تثبیت شده بر حذف فنل، مخلوط محلول فنلی و آنزیم تثبیت شده با نسبت‌های متفاوت گرماگذاری شد و میزان حذف فنل محاسبه شد. همانطور که در شکل ۱-ا نشان داده شده، در نسبت محلول فنل به آنزیم تثبیت شده کمتر از ۵/۷ میلی لیتر بر سانتی متر مربع، حذف کامل فنل پس از ۳ ساعت مشاهده شد. در نسبت‌های بیشتر، مقدار حذف فنل کمتر از ۹۵ درصد بود. در نسبت‌های بیشتر فنل به آنزیم، برهم‌کنش‌های مؤثر مابین مولکول فنل و سایت‌های فعال آنزیم کاهش می‌یابد، به همین دلیل حذف فنل نیز کمتر می‌شود. لازم به ذکر است محصول واکنش حذف فنل بر بستر کاغذی جذب شد. در خصوص جذب محصول واکنش بر روی ذرات کیتوزان<sup>۲</sup> نیز گزارش‌های مشابهی وجود دارد (Yamada et al., 2005, Wada et al., 1995).

در نسبت‌های بیشتر فنل به آنزیم، وجود مقدار بیشتر فنل سبب سنتز مقدار بیشتر محصول واکنش می‌شود. این محصول سطح بستر را می‌پوشاند و باعث اختلال در انتقال جرم مولکول فنل به جایگاه فعال آنزیم و تغییر ساختار آنزیم می‌شود. در نتیجه میزان تخریب فنل کاهش می‌یابد. به هر حال جذب محصول واکنش در فرایند تیمار پساب، از ویژگی‌های مناسب بستر سلولزی است. نسبت فنل به آنزیم ۵/۷ میلی لیتر بر سانتی متر مربع برای مطالعات بعدی سامانه ناپیوسته استفاده شد.

<sup>1</sup> Aminoantipyrine  
<sup>2</sup> Chitosan





**Fig. 1.** Phenol degradation in batch operation mode. The effect of a) ratios of phenolic solution volume to enzyme-bearing surface, b) initial phenol concentration and c) different pH on the efficiency of phenol removal  
 شکل ۱- تخریب فنل در فرایند ناپیوسته. اثر (a) نسبت حجم محلول فنل به سطح آنزیم دار، (b) غلظت اولیه فنل و (c) pH های متفاوت بر بازده حذف فنل

دسترس نبودن آنزیم و غیرفعال شدن آن می شود. همچنین محصول واکنش می تواند سبب بازدارندگی آنزیم شود (Canovas et al., 1987) به همین دلیل با افزایش غلظت فنل میزان حذف آن کاهش می یابد.

### ۳-۱-۳- اثر اسیدیته بر روی حذف فنل

اثر pH بر حذف فنل با بهره گیری از محلول فنلی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر در اسیدیته های مختلف بررسی شد. همانطور که در شکل ۱- c نشان داده شده است، حذف کامل فنل برای pH در محدوده ۶ تا ۷ پس از ۲ ساعت گرماگذاری حاصل شد. نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران در خصوص pH مناسب برای فعالیت تایروزیناز تثبیت شده، گزارش شده است (Donato et al., 2014, Khan et al., 2005, Seetharam and Saville, 2003, Abdollahi et al., 2017)

### ۳-۱-۲- تأثیر غلظت فنل

کارایی فرایند حذف فنل به غلظت اولیه فنل وابسته است. برای بررسی اثر آن، محلول فنلی با غلظت های بین ۵۰ تا ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد (Nicell et al., 1995). حذف کامل فنل برای محلول هایی با غلظت اولیه کمتر از ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پس از ۳ ساعت گرماگذاری حاصل شد (شکل ۱- b). برای غلظت های بیشتر، حذف فنل کاهش یافت. سایر پژوهشگران نیز نتایج مشابهی در تیمار پساب فنلی با استفاده از آنزیم هرزردیش پراکسیداز<sup>۱</sup> ملاحظه کرده اند (Cheng et al., 2006, Dalal and Gupta, 2007). غلظت زیاد فنل سبب تشکیل بیشتر مشتقات کوئینون<sup>۲</sup> می شود که بخشی از این ترکیبات بر روی بستر رسوب می نمایند و با آنزیم برهم کنش می دهند. این موضوع سبب در

<sup>1</sup> Horseradish peroxidase

<sup>2</sup> Quinone



و دبی‌های ۱۲ و ۱۸ میلی‌لیتر در ساعت به مدت ۲۵ دقیقه امکان‌پذیر است. همچنین در دبی ۲۵ میلی‌لیتر در ساعت به مدت ۱۵ دقیقه حذف کامل فنل انجام شد. به کارگیری این دبی‌ها در سامانه پیوسته، معادل به وجود آمدن جریان آرام در داخل راکتور می‌شود که این شرایط انتقال جرم تحت تأثیر نفوذ خواهد بود. زمان اقامت ایجاد شده در این دبی‌ها برای نفوذ مولکول‌های فنل از داخل محلول به مکان فعال آنزیم کافی است. در جریان‌های بیش از ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت، حذف فنل به دلیل زمان اقامت کم، ناقص بود. همچنین با گذشت حجم بیشتر از فنل و یا غلظت زیاد فنل، میزان تخریب کاهش می‌یابد، زیرا در این شرایط محصول واکنش به مقدار بیشتری تولید می‌شود و بر روی سطح فعال آنزیم قرار می‌گیرد و سبب غیر فعال شدن آنزیم و انسداد راه دسترسی به جایگاه فعال آنزیم می‌شود. خلاصه نتایج حاصل از حذف فنل در سامانه پیوسته در جدول ۱ نشان داده شده است. محاسبات تا

برای pH نزدیک ۵، کمترین میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد زیرا نقطه ایزوالکتریک این آنزیم در حدود ۵ است (Rijiravanich et al., 2006)

### ۳-۲- حذف در فرایند پیوسته بدون جریان بازگشتی

#### ۳-۲-۱- تأثیر غلظت فنل و دبی خوراک

برای بررسی اثر غلظت، محلول فنل با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر با دبی ۱۲، ۱۸، ۲۵ و ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت از داخل بیوراکتور عبور داده شد (شکل ۲). دبی‌ها متناسب با تجهیزات موجود طوری انتخاب شدند که فرایند، سرعت زیادی داشته باشد. سپس خروجی راکتور به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شد و میزان فنل آن تعیین شد. در ادامه، جریان خروجی در بازه‌های زمانی ۵ دقیقه جمع‌آوری شد و میزان فنل آن اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد حذف کامل فنل در خوراک با غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر

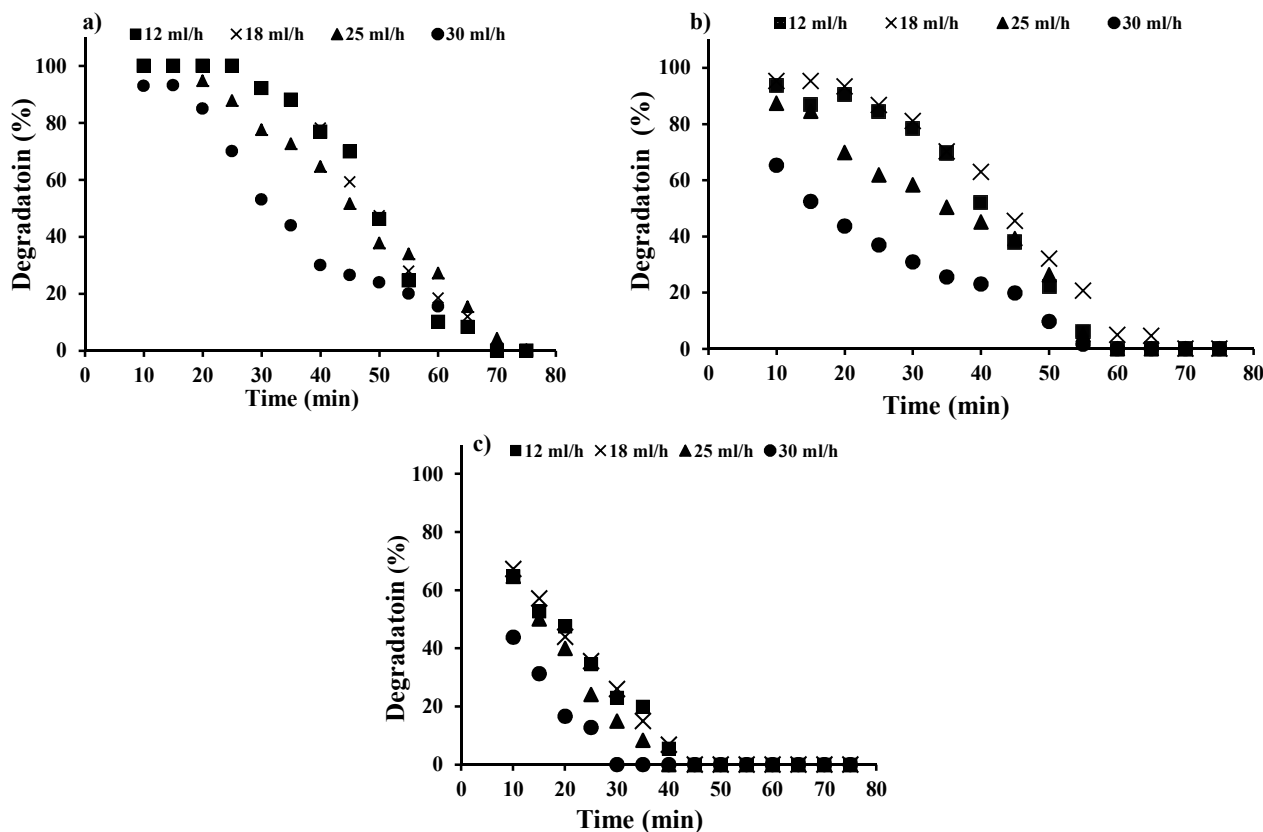


Fig. 2. The performance of the bioreactor in single-pass continuous operation mode at various flow rates. The inlet phenol concentrations of a) 25, b) 50 and c) 100 mg/L

شکل ۲- کارایی سامانه بدون جریان بازگشتی در دبی‌های مختلف، غلظت فنل خوراک (a)، ۲۵، (b)، ۵۰ و (c) ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر



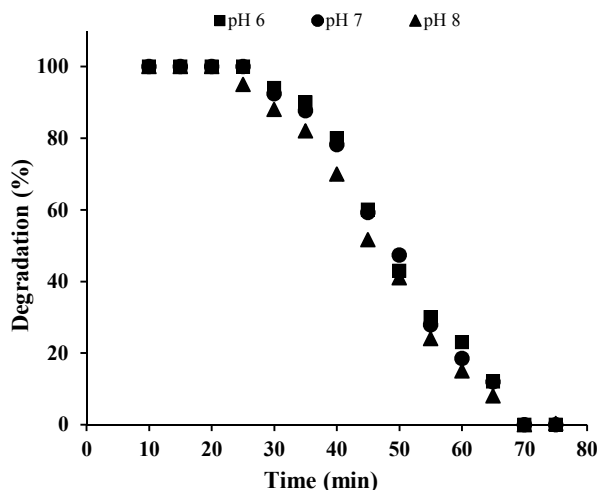


Fig. 3. The effects of pH on the phenol degradation in the single-pass continuous process

شکل ۳- اثر pH بر تخریب فنل در فرایند پیوسته بدون جریان بازگشتی

میلی گرم فنل، بیشترین نرخ اکسیداسیون فنل برابر ۰/۳۵۶ میلی گرم در ساعت معادل با بازده تخریب ۸۹ درصد بود، که این نرخ با به کارگیری ۱۰۰ میلی گرم در لیتر فنل در pH برابر ۷ حاصل شد. برای اکسیداسیون همان مقدار متناظر فنل در فرایند پیوسته، نرخ تخریب به وضوح، بیشتر و در بهترین حالت، ۴/۲ برابر بود.

### ۳-۲-۴- فرایند با جریان بازگشتی

در این سامانه، پساب تیمار شده از خروجی بیوراکتور به داخل مخزن خوراک هدایت شد (شکل ۴). در این آزمایش ها، ۳۰

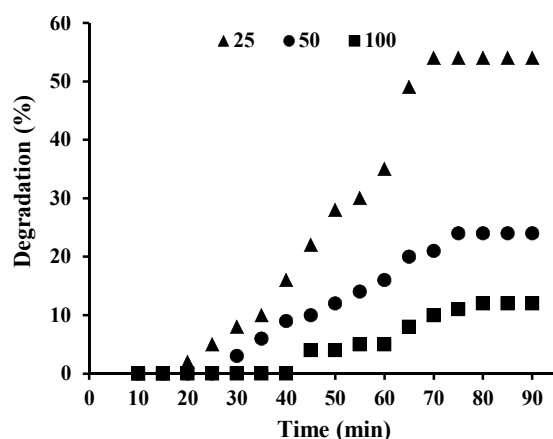


Fig. 4. The effect of phenol concentrations (25, 50 and 100 mg/L) in the performance of total-recycle process

شکل ۴- اثر غلظت فنل (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) در بازدهی

فرایند با جریان بازگشتی

### جدول ۱- تخریب فنل در فرایند پیوسته بدون جریان بازگشتی

Table 1. The phenol degradation in the single-pass continuous operation mode

Run No.	Initial phenol Concentration (ppm)	Flow rate (ml/h)	Total passed phenol (mg)	Degraded phenol (mg)	Overall degradation on yield (%)
1	25	12	0.325	0.229	70.5
2	25	18	0.488	0.346	71.0
3	25	25	0.729	0.452	62.0
4	25	30	0.813	0.410	50.4
5	50	12	0.550	0.358	65.0
6	50	18	0.975	0.591	60.6
7	50	25	1.146	0.641	56.0
8	50	30	1.375	0.468	34.0
9	100	12	0.800	0.313	39.1
10	100	18	1.200	0.479	39.9
11	100	25	1.458	0.557	38.2
12	100	30	1.250	0.371	29.7

زمانی انجام شد که سامانه، دیگر قادر به حذف فنل نبود. نتایج نشان داد در دبی های ۱۲ و ۱۸ میلی لیتر در ساعت بیشترین میزان حذف کلی حاصل شد. از طرف دیگر، بازده تخریب با افزایش غلظت فنل کاهش یافت. نتایج مشابهی در سامانه ناپیوسته حاصل شد. بیشینه میزان تخریب کلی ۷۱ درصد با غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر و دبی ۱۸ میلی لیتر در ساعت حاصل شد. همچنین با به کارگیری محلول فنل ۵۰ میلی گرم در لیتر و دبی ۲۵ میلی لیتر در ساعت بیشترین میزان حذف فنل برابر ۰/۶۴۱ میلی گرم، حاصل شد.

### ۳-۲-۳- اثر اسیدیته

اثر اسیدیته در حذف فنل با به کارگیری محلول فنلی ۲۵ میلی گرم در لیتر در pH های ۶، ۷ و ۸ با دبی حجمی ۱۸ میلی لیتر در ساعت بررسی شد. محلول خروجی از راکتور در زمان های مشخصی جمع آوری و آنالیز شد. میزان کل فنل عبور کرده از راکتور به بازده کلی تخریب آن محاسبه شد. در تمام این آزمایش ها، راکتور بعد از کارکرد به مدت ۷۰ دقیقه غیرفعال شد. این زمان، معادل عبور ۰/۴۸۸ میلی گرم فنل از سامانه بود (شکل ۳). در pH های ۶ و ۷ بازده کلی حذف ۷۱ درصد بود در حالی که در pH برابر ۸ بازده ۶۷ درصد بود. اثر اسیدیته در این آزمایش ها در تطابق با یافته های حاصل از فرایند ناپیوسته بود.

### ۳-۲-۳- مقایسه نتایج فرایند ناپیوسته و پیوسته

در آزمایش های ناپیوسته برای تخریب ۰/۳۵۰ تا ۰/۴۰۰



دما انجام شده است. در این آزمایش حذف کامل فنل بعد از ۲ ساعت در فرایند ناپیوسته و همچنین حذف ۸۰ درصد در فرایند پیوسته حاصل شده است (Santos et al., 2016). در آزمایش دیگر، آنزیم لاکاز<sup>۱</sup> برای روی کربن فعال تثبیت شد. در این آزمایش‌ها حذف کامل ترکیبات فنلی در راکتور لوله‌ای در دمای ۲۸ درجه سلسیوس ملاحظه شد (Nguyen et al., 2016).

در پژوهش دیگری ترکیب فرایند احیای فلزی و اکسیداسیون آنزیمی برای حذف ترکیبات فنلی هالوژنه در دمای ۳۶ درجه سلسیوس بررسی و بازده بیش از ۹۵/۴ درصد اکسیداسیون آنزیمی گزارش شده است (Dai et al., 2015).

توسک و همکاران حذف ناقص محلول فنلی ۸۹ درصد، توسط آنزیم لاکاز در در راکتور با سطح مقطع مستطیلی را گزارش کرده‌اند (Tušek et al., 2013).

در پژوهش دیگری استفاده از آنزیم هرزردیش پراکسیداز تثبیت شده بر روی سطوح از جنس طلا در راکتور با جریان پیوسته سبب حذف ۳۵ درصد محلول فنلی بعد از ۷۲ ساعت چرخش محلول شده است (Tudorache et al., 2011).

در این پژوهش حذف کامل فنل، در غلظت‌های بیشتر و زمان ماند کمتر حاصل شد. نتایج این پژوهش در دمای محیط و بدون افزودن موادی نظیر اکسیژن، هوا و آب اکسیژنه به سامانه حاصل شده است.

#### ۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، تایروزیناز بر روی سطح سلولزی تثبیت شد و برای حذف فنل در سامانه پیوسته و ناپیوسته استفاده شد. سرعت حذف فنل در فرایند پیوسته ۴/۲ برابر بیشتر از فرایند ناپیوسته بود. همچنین کارایی سامانه پیوسته شدیداً وابسته به غلظت اولیه فنل و دبی بود. بیشترین بازده حذف ۷۱ درصد با استفاده از فنل ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر و دبی ۱۸ میلی‌لیتر بر ساعت حاصل شد. افزایش دبی و غلظت سبب کاهش میزان تخریب می‌شود. حذف فنل با استفاده از جریان بازگشتی با دبی ۳۰ میلی‌لیتر بر ساعت سبب افزایش بازده حذف شد. به هر حال برای دوری از اثرات منفی بازگشت محصولات واکنش به داخل راکتور حذف فنل در فرایند

میلی‌لیتر محلول فنل با pH برابر ۷ در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر با دبی ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت به صورت جداگانه به داخل بیوراکتور فرستاده شد و جریان به مدت ۹۰ دقیقه بازگشت داده شد. غلظت فنل در مخزن خوراک در زمان‌های مشخص اندازه‌گیری شد.

همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، تخریب فنل با گذر زمان افزایش می‌یابد. ضمن اینکه در طول فرایند فنل واکنش نداد و همچنین محصولات واکنش به همراه جریان بازگشتی مجدداً به داخل راکتور منتقل می‌شوند. محصولات واکنش بر روی سطح سلولوزی، جذب یا ته‌نشین می‌شوند و با آنزیم تثبیت شده برهم‌کنش می‌دهند. در نتیجه انباشتگی محصول واکنش بر روی سطح، انتقال جرم در اطراف آنزیم تثبیت شده، محدود می‌شود و فعالیت زیست کاتالیست کاهش می‌یابد. این پدیده با افزایش غلظت اولیه فنل تشدید می‌شود.

به هر حال بیشترین بازده حذف کلی در حدود ۵۴ درصد در این آزمایش‌ها با به کارگیری محلول فنل ۲۵ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد که بیشتر از بازده حاصل شده در فرایند پیوسته بدون جریان برگشتی با دبی مشابه بود (۵۰/۴ درصد). در مقابل، بازده حذف برای محلول فنل با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۲۴ و ۱۲ درصد بود که مقدار کمتری در مقایسه با نتایج سامانه پیوسته بدون جریان بازگشتی بود. مشابه نتایج حاصل در سامانه پیوسته بدون جریان بازگشتی، با افزایش غلظت اولیه فنل میزان بازده حذف کاهش یافت. در این آزمایش‌ها سامانه به مدت ۷۰ تا ۸۰ دقیقه فعال بود که در مقایسه با فرایند پیوسته بدون جریان بازگشتی طول عمر بیشتری را نشان داد.

#### ۳-۳- مقایسه نتایج

پژوهش‌های متعددی در خصوص حذف فنل با استفاده از کاتالیست‌های شیمیایی و آنزیم‌ها در راکتورهای لوله‌ای انجام شده است. در پژوهش‌های انجام شده غالباً از اکسیژن، هوا و یا آب اکسیژنه به‌عنوان ماده اکسیدکننده استفاده شده است. در پژوهشی از نانولوله‌های کربنی اصلاح شده به‌عنوان کاتالیست برای حذف فنل در فرایندهای ناپیوسته و پیوسته استفاده شد. حذف پیوسته محلول فنلی در راکتور لوله‌ای با بررسی پارامترهای فرایندی نظیر غلظت و

<sup>1</sup> Laccase





## ۵- قدردانی

به این وسیله نویسندگان از پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران بابت حمایت از انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌نمایند.

پیوسته بدون جریان بازگشتی بهتر است. البته جداسازی محصولات واکنش نیز می‌تواند راه حل مناسبی برای این موضوع باشد. در مجموع، این سامانه می‌تواند به‌عنوان راه حلی سبز برای حذف فنل استفاده شود.

## References

- Abdollahi, K., Yazdani, F. & Panahi, R. 2017. Covalent immobilization of tyrosinase onto cyanuric chloride crosslinked amine-functionalized superparamagnetic nanoparticles: synthesis and characterization of the recyclable nanobiocatalyst. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 396-405.
- Abdollahi, K., Yazdani, F., Panahi, R. & Mokhtarani, B. 2018. Biotransformation of phenol in synthetic wastewater using the functionalized magnetic nano-biocatalyst particles carrying tyrosinase. *3 Biotech*, 8 (10), 419.
- Alvarino, T., Suarez, S., Lema, J. & Omil, F. 2018. Understanding the sorption and biotransformation of organic micropollutants in innovative biological wastewater treatment technologies. *Science of the Total Environment*, 615, 297-306.
- Berenguer, R., Sieben, J. M., Quijada, C. & Morallón, E. 2016. Electrocatalytic degradation of phenol on Pt- and Ru-doped Ti/SnO<sub>2</sub>-Sb anodes in an alkaline medium. *Applied Catalysis B: Environmental*, 199, 394-404.
- Canovas, F. G., Tudela, J., Madeid, C. M., Varon, R., Carmona, F. G. & Lozano, J. A. 1987. Kinetic study on the suicide inactivation of tyrosinase induced by catechol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 912, 417-423.
- Cheng, J., Yu, S. M. & Zuo, P. 2006. Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Research*, 40, 283-290.
- Dai, Y., Song, Y., Wang, S. & Yuan, Y. 2015. Treatment of halogenated phenolic compounds by sequential tri-metal reduction and laccase-catalytic oxidation. *Water Research*, 71, 64-73.
- Dalal, S. & Gupta, M. N. 2007. Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering. *Chemosphere*, 67, 741-747.
- Dinçer, A., Becerik, S. & Aydemir, T. 2012. Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 815-820.
- Donato, L., Algieri, C., Rizzi, A. & Giorno, L. 2014. Kinetic study of tyrosinase immobilized on polymeric membrane. *Journal of Membrane Science*, 454, 346-350.
- Eslami, B., Naddafi, K., Rastkari, N., Rashidi, B. H., Djazayeri, A. & Malekafzali, H. 2016. Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and gestational diabetes mellitus in primiparous women. *Environmental Research*, 151, 706-712.
- Gomez, J. L., Bodalo, A., Gomez, E., Bastida, J., Hidalgo, A. M. & Gomez, M. 2006. Immobilization of peroxidases on glass beads: an improved alternative for phenol removal. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1016-1022.
- Khan, A., Akhtar, S. & Husain, Q. 2005. Simultaneous purification and immobilization of mushroom tyrosinase on an immunoaffinity support. *Process Biochemistry*, 40, 2379-2386.
- Korbahti, B. K. & Tanyolac, A. 2003. Continuous electrochemical treatment of phenolic wastewater in a tubular reactor. *Water Research*, 37, 1505-1514.



- Leenders, S. H. A. M., Gramage-Doria, R., De Bruin, B. & Reek, J. N. H. 2015. Transition metal catalysis in confined spaces. *Chemical Society Reviews*, 44 (1), 433-448.
- Nguyen, L. N., Hai, F. I., Dosseto, A., Richardson, C., Price, W. E. & Nghiem, L. D. 2016. Continuous adsorption and biotransformation of micropollutants by granular activated carbon-bound laccase in a packed-bed enzyme reactor. *Bioresource Technology*, 210, 108-116.
- Nicell, J. A., Saadi, K. W. & Buchanan, I. D. 1995. Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive. *Bioresource Technology*, 54, 5-16.
- Pirsaheb, M., Moradi, S., Shahlaei, M. & Farhadian, N. 2018. Application of carbon dots as efficient catalyst for the green oxidation of phenol: kinetic study of the degradation and optimization using response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*, 353, 444-453.
- Prokopijevic, M., Prodanovic, O., Spasojevic, D., Stojanovic, Z., Radotic, K. & Prodanovic, R. 2014. Soybean hull peroxidase immobilization on macroporous glycidyl methacrylates with different surface characteristics. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 799-804.
- Rijiravanich, P., Aoki, K., Chen, J., Surareunchai, W. & Somasundrum, M. 2006. Micro-cylinder biosensors for phenol and catechol based on layer-by-layer immobilization of tyrosinase on latex particles: Theory and experiment. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 589, 249-258.
- Santos, D. F. M., Soares, O. S. G. P., Silva, A. M. T., Figueiredo, J. L. & Pereira, M. F. R. 2016. Catalytic wet oxidation of organic compounds over N-doped carbon nanotubes in batch and continuous operation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 199, 361-371.
- Seetharam, G. B. & Saville, B. A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Water Research*, 37, 436-440.
- Sekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., Jovanović, J. R., Stefanovic, A. B., Djokic, V. R., et al. 2016. Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, 461-472.
- Sheldon, R. A. & van Pelt, S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why what and how. *Chemical Society Reviews*, 42, 6223-6235.
- Sohrabi, S. & Akhlaghian, F., 2016. Modeling and optimization of phenol degradation over copper-doped titanium dioxide photocatalyst using response surface methodology. *Process Safety and Environmental Protection*, 99, 120-128.
- Soltani-Firooz, N., Panahi, R., Mokhtarani, B. & Yazdani, F. 2017. Direct introduction of amine groups into cellulosic paper for covalent immobilization of tyrosinase: support characterization and enzyme properties. *Cellulose*, 24, 1407-1416.
- Svobodová, K. & Novotný, C. 2018. Bioreactors based on immobilized fungi: bioremediation under non-sterile conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 39-46.
- Tavares, T. S., Torres, J. A., Silva, M. C., Nogueira, F. G. E., da Silva, A. C. & Ramalho, T. C. 2018. Soybean peroxidase immobilized on  $\delta$ -FeOOH as new magnetically recyclable biocatalyst for removal of ferulic acid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41, 97-106.
- Tudorache, M., Mahalu, D., Teodorescu, C., Stan, R., Bala, C. & Parvulescu, V. I. 2011. Biocatalytic microreactor incorporating HRP anchored on micro-/nano-lithographic patterns for flow oxidation of phenols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69, 133-139.
- Tušek, A. J., Tišma, M., Bregović, V., Pticar, A., Kurtanjek, Z. & Zelic, B. 2013. Enhancement of phenolic



- compounds oxidation using laccase from *Trametes versicolor* in a microreactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18, 686-696.
- Wada, S., Ichikawa, H. & Tastsumi, K. 1995. Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant. *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 304-309.
- Xu, D. Y. & Yang, Z. 2013. Cross-linked tyrosinase aggregates for elimination of phenolic compounds from wastewater. *Chemosphere*, 92, 391-398.
- Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, T., Kashiwada, A., Matsuda, K. & Hirata, M. 2005. Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads. *Biotechnology Progress*, 21, 823-829.
- Zhang, F., Zheng, B., Zhang, J., Huang, X., Liu, H., Guo, S. et al. 2010. Horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide: physical properties and applications in phenolic compound removal. *The Journal of Physical Chemistry*, 114, 8469-8473.
- Zhou, Z. & Hartmann, M. 2013. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. *Chemical Society Reviews*, 42, 3894-3912.
- Zynek, K., Bryjak, J. & Polakovič, M. 2010. Effect of separation on thermal stability of tyrosinase from *Agaricus bisporus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66, 172-176.

