

# بررسی حذف فنل توسط پراکسیداز ترب کوهی تثبیت شده

سپیده معتمد<sup>۳</sup>

سیامک نجاتی<sup>۲</sup>

ایران عالم زاده<sup>۱</sup>

(دریافت ۸۷/۱/۲۸ پذیرش ۸۸/۱۰/۱۰)

## چکیده

در این تحقیق کاربرد پراکسیداز ترب کوهی (HRP) تثبیت شده در کپسول‌های آلژینات به منظور حذف فنل و نیز شرایط بهینه برای تثبیت HRP در آلژینات تعیین شد. شرایط بهینه برای ژله‌ای شدن به ترتیب ۰/۷۵ و ۴/۵ درصد حجمی وزنی برای آلژینات سدیم و کلسیم کلرید شش آبه به دست آمد. بر اثر تثبیت آنزیم، منحنی فعالیت آنزیمی بر اساس pH به گونه‌ای تغییر کرد که مقادیر فعالیت نسبی در pHهای اسیدی و بازی بیشتر شد. همچنین نتایج نشان داد که درصد فعالیت باقیمانده آنزیم محبوس شده مستقل از غلظت آنزیم مورد استفاده است. علاوه بر این، نتایج نشان داد که غلظت آنزیم برای حذف فنل در غلظت فنلی مشخصی دارای مقدار بهینه است که با فراتر رفتن از این مقدار تغییر چندانی در بازده حذف مشاهده نشود. بررسی پیشرفت واکنش با زمان برای آنزیم محبوس شده و آنزیم آزاد نشان داد که در غلظتهای برابر، حذف فنلی برای آنزیم محبوس شده اندکی کمتر است. با این حال، نتایج نشان داد که کپسول‌ها تا چهار دوره بدون تغییر قابل ملاحظه در فعالیت باقیمانده آنها قابل استفاده هستند. نسبت بهینه پراکسید هیدروژن به فنل برای غلظت فنل ۲ تا ۱۰ میلی مولار، ۰/۹۴ تا ۱/۱۵ به دست آمد و نشان داده شد که این نسبت وابسته به غلظت فنل است.

**واژه‌های کلیدی:** پراکسیداز ترب کوهی، آلژینات، ژله‌ای شدن، محبوس شدن، فنل

## Phenol Removal by Immobilized Horseradish Peroxidase

*Iran Alemzadeh*<sup>1</sup>

*Siyamak Nejati*<sup>2</sup>

*Sepideh Motamed*<sup>3</sup>

(Received Apr. 17, 2008 Accepted Dec. 31, 2009)

### Abstract

Horseradish peroxidase was successfully encapsulated in calcium alginate for phenol removal. The optimum gelation condition was found to be 0.75%w/v of sodium alginate solution and 4.5% w/v of calcium chloride hexahydrate. Upon immobilization, the pH profile of enzyme activity changed as it showed a higher relative value in basic and acidic solutions. It was also observed that enzyme activity retention of encapsulated HRP was independent of enzyme concentration. Besides, for each phenol concentration, there would be an enzyme concentration beyond which it had no significant effect on phenol removal. Investigation of phenol removal with time for both encapsulated and free enzymes showed that the encapsulated enzyme had a lower efficiency compared to the same concentration of the free enzyme; however, the capsules were reusable up to four cycles without any changes in their retention activity. The optimum ratio of hydrogen peroxide/phenol was found to depend on phenol concentration and that it varied from 0.94 to 1.15 for phenol concentrations between 2-10 mM.

**Keywords:** Horseradish Peroxidase, Alginate, Gelation, Encapsulation, Phenol

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

2. Grad. Student of Biotechnology, Chemical and Petroleum Eng. Dept., Sharif University of Technology, Tehran

3. Grad. Student of Food Industrial Eng., Chemical and Petroleum Eng. Dept., Sharif University of Technology, Tehran

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

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

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

هدف از تثبیت آنزیم در این تحقیق استفاده از حاملی جدید بود که با کمک آن حذف فنل از پساب سنتزی مورد بررسی قرار گرفت. روش محبوس کردن آنزیم در داخل کپسول با غشاء نیمه تراوی آلزینات<sup>۱</sup> مورد استفاده قرار گرفت و سپس حذف فنل در غلظتهای مختلف آنزیم، پراکسید هیدروژن و فنل بررسی شد.

## ۲- مواد روشها

### ۲-۱- مواد

پراکسیداز ترب کوهی<sup>۲</sup> (پودر لیوفلیزه ۲۰۰ واحد بر میلی گرم)، فنل ۹۹ درصد، پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد وزنی حجمی، ۴-آمینوآنتی پیرین و پتاسیم فرو سیانید که در آزمایش های سنجش مورد استفاده بودند از شرکت مرک<sup>۳</sup> تهیه شدند. آلزینات سدیم غنی از گلورونیک اسید و مشتق شده از گونه لامیرانیا<sup>۴</sup> هایپربورین<sup>۵</sup> و کلسیم کلرید شش آبه هر دو از شرکت ب.د.اچ<sup>۶</sup> انگلیس تهیه شد. آنزیم کاتالاز اسپریلوس نایجر با فعالیت ۲۹۹۳ واحد بر میلی گرم از شرکت سرنا<sup>۷</sup> تهیه گردید. سایر مواد مورد استفاده از درجه آزمایشگاهی بودند.

### ۲-۲- روش محبوس کردن در کپسول

به منظور تثبیت آنزیمی در ابتدا آلزینات سدیم در آب حل شد. حل شدن در یک بشر ۱۰۰ میلی لیتری مجهز به همزن مغناطیسی صورت گرفت و ۳ تا ۵ ساعت به طول انجامید. به منظور خارج کردن حبابهای هوا، از یک همزن شیشه ای برای هم زدن محلول استفاده گردید. پس از حل کردن آلزینات سدیم، محلول به منظور همگن شدن تا مدت ۱ ساعت در دمای اتاق هم زده شد و ژل حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای استفاده مجدد ذخیره گردید. کپسول های آلزینات کلسیم با روش یک مرحله ای ساده ای که توسط نیگما و همکاران<sup>۸</sup> شرح داده شده است تهیه شد [۱۷]. مقدار مشخصی از آنزیم در ۱۰ میلی لیتر از کلرید کلسیم حل شد و سپس این محلول از فاصله ۱۰ سانتی متر که به جهت اطمینان از کروی بودن ذرات در نظر گرفته شده بود به صورت قطره ای توسط لوله رابط با قطر ۱/۲ میلی لیتر از جنس سیلیکون، متصل به پمپ پرستالیتیک<sup>۸</sup> به ۱۰۰ میلی لیتر محلول آلزینات اضافه شد. برای جلوگیری از چسبیدن قطرات به هم و کمینه کردن مقاومت های انتقال جرم، محلول آلزینات سدیم توسط همزن مغناطیسی ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در داخل بشر، هم زده

آنزیم ها با وجود اینکه دارای معایبی هستند، همواره به عنوان کاتالیست واکنش های بیولوژیکی در صنایع مورد استفاده قرار می گیرند [۱]. تثبیت آنزیم ها می تواند پایداری آنزیم ها را افزایش دهد و شرایط واکنش یکنواخت را برای فرایندهای آنزیمی بهبود بخشد [۲]. حذف آنزیمی ترکیبات فنلی از پسابها توسط محققان بسیاری بررسی شده است [۲ و ۳]. از این میان آنزیم های پراکسیداز به عنوان گزینه ای مؤثر در واکنش با ترکیبات فنلی شناخته شده اند. این آنزیم ها مواد غیر محلولی تشکیل می دهند که به آسانی توسط روشهایی از جمله ته نشینی و لخته سازی قابل جداسازی هستند [۴، ۵ و ۶]. با این حال در این فرایندها غیر فعال شدن آنزیمی به عنوان نقطه ضعف عمده به چشم می خورد [۲]. به این دلیل تلاشها برای تثبیت آنزیم های پراکسیداز که به طور مؤثری در حذف فنلی اثر می گذارند معطوف گردید. در این میان رایج ترین آنزیم مورد تحقیق، آنزیم پراکسیداز ترب کوهی بوده که مشتق از ریشه گیاه ترب کوهی است [۷].

استفاده از آنزیم هایی که بتوانند جایگزین مناسبی برای پراکسیداز ترب کوهی باشند با هدف هزینه های کمتر تهیه بیوکاتالیست نیز همواره مورد توجه محققان بوده است [۸]. از نمونه این آنزیم ها می توان به پراکسیداز موجود در دانه سویا اشاره کرد که با بازده قابل قبول و قابل قیاس با پراکسیداز ترب کوهی قادر به تصفیه فنل از محیط آبی است [۹]. استفاده از آنزیم های تثبیت شده به منظور تصفیه پسابها در حجم زیاد گزینه مناسب تری به نظر می رسد [۷]. لذا مواد مختلفی با روشهای گوناگون به عنوان پایه های مناسب برای تثبیت آنزیمی مورد توجه واقع شده اند که از این میان می توان به دانه های شیشه ای، پلیمرها، رزین های تعویض یونی و کلی های لایه ای آلومینیوم اشاره نمود [۱۰، ۱۱ و ۱۲].

اگر چه تثبیت به طور مؤثری فعالیت آنزیمی را بالا می برد، با این حال غیر فعال شدن آنزیمی به عنوان نقطه ضعف عملیات تصفیه آنزیمی پسابهای فنلی بر جاست. برخی محققان کم بودن بازده حذف فنلی را مربوط به اندرکنش های میان رادیکال های تشکیل شده و آنزیم می دانند [۱۳]. علاوه بر غیر فعال شدن آنزیمی، مقادیر اضافی پراکسید هیدروژن نیز بر عملکرد آنزیمی اثرات بازدارنده دارند [۱۴].

به منظور رفع مشکلات بالا برخی محققان اضافه نمودن موادی مانند پلی اتیلن گلیکول را که با ایجاد لایه ای محافظ، آنزیم را احاطه می کند، به عنوان راهکاری مناسب معرفی نموده اند [۱۵]. اگر چه براساس تحقیقات اخیر مقدار قابل توجهی از پلی اتیلن گلیکولی که به این منظور به محلول اضافه می شود پس از جداسازی رادیکال ها خود به عنوان آلاینده در محلول باقی می ماند [۱۶].

1 Alginate  
2 Horseradish Peroxidase  
3 Merck  
4 Lamirania Hyperborean  
5 BDH  
6 Serna  
7 Nigma et al.  
8 Peristaltic

شد. پس از مصرف کامل محلول کلرید کلسیم، قطرات به مدت ۲۰ دقیقه برای تکمیل فرایند نفوذ و کامل شدن غشاء ژله‌ای در محلول قرار داده شدند. در نهایت توسط رقیق کردن محلول داخل بشر تا ۵ مرتبه، کپسول‌ها از محلول فیلتر شدند. کپسول‌های به‌دست آمده برای بررسی حذف فنل مورد استفاده قرار گرفتند.

#### ۲-۳- تعیین مقدار پروتئین

پروتئین موجود در محلول شستشو و نیز مقدار پروتئین موجود در داخل کپسول‌ها همگی توسط روش لوری<sup>۱</sup> بهبود یافته توسط پترسون<sup>۲</sup>، اندازه‌گیری شد [۱۸].

#### ۲-۴- بازده محبوس شدن آنزیمی

برای محاسبه بازده مورد نظر مقادیر پروتئین موجود در محلول اولیه و محبوس شده، از منحنی کالیبراسیون غلظت پروتئین محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین محبوس شده، کپسول‌ها پس از خارج شدن از محلول دو نیم شده و در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH معادل ۷/۴ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و به‌طور غیر پیوسته هم زده شدند. پس از جدا کردن باقیمانده کپسول، مقدار پروتئین موجود محاسبه گردید.

#### ۲-۵- ریزش آنزیمی

اندازه‌گیری‌های ریزش آنزیم توسط قرار دادن کپسول‌ها در داخل لوله‌های آزمایش محتوی بافر تریس با pH معادل ۸ به مدت ۲۲ ساعت صورت گرفت. تفاوت پروتئین موجود در داخل کپسول در ابتدا و انتهای بازه زمانی آزمایش که توسط روش دو نیم کردن کپسول‌ها انجام شد، بیانگر درصد پروتئین محبوس شده در داخل کپسول‌ها بود.

#### ۲-۶- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آزاد و محبوس شده

فعالیت آنزیم توسط روش رنگ سنجی با استفاده از معرف ۴-آمینو آنتی پیرین، فنل و پراکسید هیدروژن به‌عنوان سوبسترا صورت گرفت. این روش در دمای ۲۵ درجه سلسیوس توسط اضافه نمودن بافر فسفات با pH برابر ۷/۴ که شامل: ۰/۰۱ مولار فنل، ۰/۰۰۲۴ مولار آمینو آنتی پیرین و ۰/۰۰۰۲ مولار از پراکسید هیدروژن بود، انجام گردید. نرخ مصرف پراکسید هیدروژن با اندازه‌گیری تغییرات جذب محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر محاسبه شد [۱۹].

#### ۲-۷- محاسبه غلظت فنل

غلظت فنل توسط روش کالریمتری تعیین گردید. در این روش غلظت فنل موجود در نمونه به‌واسطه واکنش با آمینوآنتی پیرین

۲/۰۸ میلی‌مولار در حضور فروسیانید پتاسیم ۸/۳۴ میلی‌مولار تعیین شد. مقدار توسعه رنگ با این شرط که غلظت فنل از ۱۲ میلی‌مولار تجاوز نکرده باشد متناسب با غلظت فنل موجود در نمونه بود. پس از توسعه رنگ بعد از ۹ تا ۱۰ دقیقه مقادیر جذب در ۵۱۰ نانومتر توسط منحنی کالیبراسیون به غلظت فنل تبدیل شدند.

#### ۲-۸- بررسی حذف فنل

به‌منظور بررسی زمان مورد نیاز برای تبدیل فنلی و نیز بازده حذف فنلی، آزمایش‌ها با آنزیم آزاد و محبوس شده در داخل بشر ۱ لیتری مجهز به همزن در دمای ۲۵ درجه سلسیوس طراحی شد. بافر، پراکسید هیدروژن و آنزیم برای انجام واکنش به بشر اضافه شد و غلظت‌های فنل، آنزیم و پراکسید هیدروژن برای بررسی فاکتورهای آزمایشی تغییر داده شدند. هر ۲۰ دقیقه یک نمونه از محتویات واکنش توسط فیلتر سرنگی جدا شد و بلافاصله ۱ میلی‌لیتر از محلول کاتالاز به آن اضافه گردید و برای تعیین غلظت فنل مورد آزمایش رنگ سنجی قرار گرفت.

تأثیر پارامترهای غلظت اولیه فنل از ۲ تا ۱۰ میلی‌مولار نسبت هیدروژن پراکسید به فنل از ۰/۴ تا ۱/۷ و مقدار آنزیم از ۰/۱۵ تا ۱/۶ واحد بر گرم آلژینات در بررسی میزان حذف (درصد تبدیل) فنل مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۹- بررسی اثر غلظت کلرید کلسیم و آلژینات بر محبوس شدن غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۲ درصد وزنی حجمی از آلژینات سدیم و غلظت‌های مختلف ۱/۳، ۲/۲۵، ۴/۵ و ۵/۵ درصد وزنی حجمی کلرید کلسیم برای یافتن مقادیر بهینه در ساخت ژل و محبوس کردن آنزیم بررسی شدند. بهینه‌سازی بر اساس سه فاکتور محبوس شدن، ریزش و درصد فعالیت باقیمانده آنزیمی صورت گرفت.

#### ۲-۱۰- بررسی اثر pH

بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیمی برای آنزیم آزاد و محبوس شده انجام شد. به این‌منظور محلول و کپسول‌های آنزیمی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در ۵ میلی‌لیتر بافر با pH در محدوده ۵/۵ تا ۹/۰ به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و سپس فعالیت آنزیم در ۵۱۰ نانومتر به‌دست آمد.

#### ۲-۱۱- بررسی زمان بهینه واکنش

به‌منظور یافتن زمان بهینه برای واکنش آنزیم با فنل، آزمایش‌هایی تنظیم و اجرا شد. به تعدادی بشر که هر یک محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر فنل ۲ میلی‌مولار بودند، ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن و ۰/۸ واحد بر میلی‌لیتر از نمونه آنزیم تثبیت شده اضافه

<sup>1</sup> Lowry  
<sup>2</sup> Peterson

شد و پیشرفت واکنش به مدت ۴ ساعت در دمای ثابت ۲۵ درجه سلسیوس و pH برابر ۸ مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی پیشرفت واکنش هر ۲۰ دقیقه یک نمونه ۱ میلی لیتری از محلول پس از صاف کردن و اضافه نمودن کاتالاز، رنگ سنجی می شد. زمان قابل قبول برای حذف فنل زمانی است که پس از گذشت آن تغییرات چندانی در بازده حذف مشاهده نگردد. پس از تعیین زمان بهینه، آزمایش های لازم برای بررسی سایر پارامترها در آن زمان تعیین گردید.

مقدار آنزیمی که در کپسول ها حبس می شود به گونه ای است که فعالیت ۰/۸ واحد بر میلی لیتر را نتیجه می دهد. این مقدار آنزیم در شرایط غلظت فنل ۲ میلی مولار، پراکسید هیدروژن ۲۰ میکرو لیتر، دما ۲۵ درجه سلسیوس و pH برابر ۷/۴ بر ۱۰۰ میلی لیتر پساب اثر داده شد.

### ۱۲-۲- بررسی اثر غلظت آنزیمی

از آنجا که بیوکاتالیست دارای عمر مشخصی است و همچنین تبدیل وابسته به زمان واکنش است، به طور طبیعی حذف فنل به مقدار کاتالیست مورد استفاده، بستگی پیدا می کند. برای مطالعه بررسی غلظت آنزیمی بر حذف فنل، پنج غلظت مختلف از آنزیم برای مقایسه بازده حذف فنلی مورد بررسی قرار گرفتند. در این سری آزمایش ها، غلظت فنل و پراکسید هیدروژن و نیز شرایط واکنش یکسان بود یعنی غلظت فنل ۲ میلی مولار و pH برابر ۸.

### ۱۳-۲- بررسی اثر غلظت پراکسید هیدروژن

حذف فنل در واکنش آنزیمی را می توان با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن به مقدار مشخصی افزایش داد. از این رو برخی از محققان نسبت های بهینه برای رسیدن به حداکثر حذف فنلی در غلظت های مشخص آنزیمی را معرفی کرده اند [۱۴ و ۲۰]. البته وابستگی این نسبت به غلظت اولیه فنل نیز مشخص شده است [۲۱].

به منظور تحقیق در مقدار بهینه نسبت مولار پراکسید هیدروژن به فنل چندین آزمایش در غلظت های مختلف فنلی یعنی ۲، ۵ و ۸ میلی مولار با تغییر مقدار پراکسید هیدروژن از ۲۰ تا ۹۵۰ میکرو لیتر در حضور مقدار مشخص از آنزیم یعنی ۰/۸ واحد بر میلی لیتر ترتیب داده شد. بیشینه تبدیل فنلی در هر مورد در مقابل نسبت بهینه رسم گردید.

### ۱۴-۲- بررسی استفاده مجدد از کپسول های آنزیمی

آنزیم تثبیت شده را می توان به راحتی جدا کرده و برای بررسی فعالیت باقیمانده مجدداً مورد بررسی قرار داد. برای نشان دادن این خاصیت، کپسول ها پس از گذشت زمان بهینه واکنش از محلول خارج شده و به طور کامل شسته شدند و برای استفاده مجدد در محلول فنلی قرار داده شدند. در این مورد غلظت محلول فنلی دو میلی مولار و نسبت بهینه برای پراکسید هیدروژن به فنل ۰/۹۵ در نظر گرفته شد. تعداد چرخه مناسب برای استفاده مجدد از این کپسول ها با توجه به کاهش چشمگیر بازده حذف فنلی تعیین گردید.

## ۳- نتایج و بحث

### ۱-۳- بررسی اثر کلرید کلسیم و آلژینات بر محبوس شدن

نتایج به دست آمده از تعیین مقادیر محبوس شدن، ریزش و درصد فعالیت باقیمانده آنزیمی در درصد های مختلف آلژینات سدیم و کلرید کلسیم در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان می دهد استفاده از کلرید کلسیم با غلظت های بیشتر، بدون توجه به غلظت آلژینات، موجب کاهش ریزش آنزیمی می گردد. با توجه به جدول ۱ با افزایش غلظت آلژینات از ۰/۵ تا ۲ درصد، درصد ریزش کاهش می یابد. به عنوان مثال برای غلظت ۰/۷۵ درصد آلژینات و غلظت ۱/۳ درصد کلسیم کلرید، درصد ریزش ۵۰ بود ولی برای غلظت ۲ درصد آلژینات و همان مقدار کلسیم کلرید، درصد ریزش ۳۰ درصد بود. همچنین فعالیت باقیمانده با تغییر غلظت کلرید کلسیم تغییر چندانی نمی کند.

جدول ۱- بررسی بازده محبوس شدن، درصد ریزش و فعالیت باقیمانده آنزیمی کپسول ها تحت شرایط مختلف تولید کپسول

کلرید کلسیم (w/v%)	آزمایش اول (سدیم آلژینات ۰/۵ w/v)		آزمایش دوم (سدیم آلژینات ۰/۷۵ w/v)		آزمایش سوم (سدیم آلژینات ۰/۱ w/v)		آزمایش چهارم (سدیم آلژینات ۰/۲ w/v)	
	فعالیت باقیمانده (%)	ریزش (%)	فعالیت باقیمانده (%)	ریزش (%)	فعالیت باقیمانده (%)	ریزش (%)	فعالیت باقیمانده (%)	ریزش (%)
۱/۳	۹۴±۴	۴۵±۵	۶۸±۳	۵۰±۴	۱۸±۲	۷۰±۲	۳۹±۴	۳۰±۲
۲/۲۵	۸۷±۷	۲۵±۲	۹۱±۳	۲۹±۳	۱۲±۵	۷۱±۵	۳۳±۵	۲۵±۵
۴/۵	۸۷±۵	۲۱±۲	۸۵±۵	۲۰±۵	۸±۲	۸۵±۴	۸±۳	۶±۲
۵/۵	۹۴±۴	۱۸±۲	۸۹±۲	۱۴±۳	۵±۲	۹۵±۲	۴±۲	۴±۲

است. علت این تفاوت این است که محیط داخلی کپسول تقریباً کاتیونی است و غشایی نیمه تراوا و آنیونی دارد.

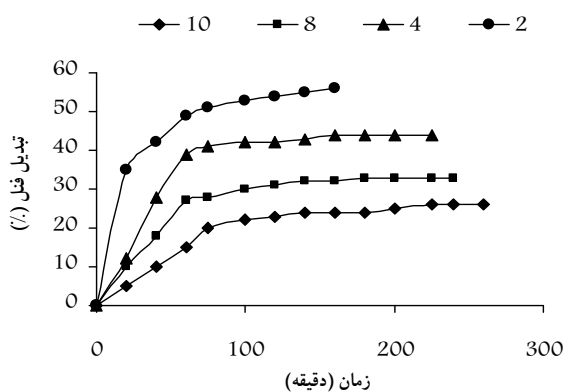
### ۳-۴- زمان بهینه واکنش

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که ۱۰۰ دقیقه زمان برای حذف قابل قبول فنل لازم است. پس از طی این زمان تغییرات چندانی در بازده حذف مشاهده نشد. آزمایش‌های لازم برای بررسی سایر پارامترهای مؤثر ۱۰۰ دقیقه به طول انجامید. پروفیل واکنش حذف پی-کلروفنل با پراکسیداز تثبیت شده بر روی حامل آمینوپروپیل گلاس (APG)<sup>۱</sup> نیز زمان واکنش بهینه ۱۰۰ دقیقه را به دست آورد ولی مقدار حذف تقریباً ۲۰ درصد بود [۲۲].

بررسی پیشرفت واکنش با سایر غلظت‌ها نشان داد که واکنش‌ها در تمامی غلظت‌ها از روند یکسانی تبعیت می‌کنند (شکل ۲). تبدیل فنل بر حسب زمان برای هر دو آنزیم آزاد و تثبیت شده، بررسی شد. مقایسه بین این دو نشان داد که این مقادیر بسیار به یکدیگر نزدیک هستند (شکل ۳). این امر نشانگر آن است که برای هر غلظت فنل، آنزیم دارای غلظت بهینه‌ای است.

### ۳-۵- بررسی اثر غلظت آنزیمی

شکل ۴ نشان می‌دهد که مقدار آنزیم بر غلظت اولیه فنل تأثیر دارد. برای محلول فنل ۲ میلی مولار، با افزایش غلظت آنزیمی از ۰/۱۵ به ۰/۸ واحد بر گرم، حذف فنل افزایش یافت و با فراتر رفتن از این مقدار دیگر تغییرات قابل ملاحظه‌ای در حذف فنل مشاهده نشد. در نتیجه غلظت فنل باقیمانده که تفاوت بین غلظت فنل اولیه و نهایی است، کاهش یافت. این امر نشانگر آن است که برای هر غلظت فنل، آنزیم دارای غلظت بهینه‌ای است به طوری که افزایش



شکل ۲- بررسی پیشرفت واکنش آنزیمی در حضور ۷/۵ واحد بر میلی لیتر از آنزیم محبوس شده برای چهار غلظت ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میلی مولار فنل

از سوی دیگر، تغییر غلظت آلزینات سدیم موجب تغییرات قابل ملاحظه‌ای در فعالیت باقیمانده آنزیمی و نیز درصد محبوس شدن آنزیم می‌شود. هر چه غلظت آلزینات بیشتر انتخاب شود، فعالیت باقیمانده آنزیمی کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد که اثر بالا مربوط به ممانعت‌های نفوذی ناشی از غشاء ژله‌ای است و شدیداً تحت تأثیر خواص ژل است. بنابراین ژله‌ای شدن و متغیرهای کنترل‌کننده آن، تأثیر بسیاری بر خواص بیوکاتالیست دارند و در این مورد، بهینه خواص بیوکاتالیستی در غلظت‌های به ترتیب ۵/۵ و ۱ درصد وزنی حجمی از کلرید کلسیم و آلزینات سدیم به دست آمد.

### ۳-۲- بررسی اثر غلظت آنزیمی بر درصد فعالیت باقیمانده

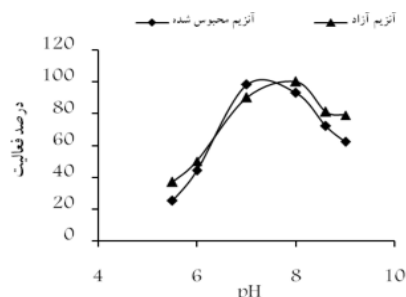
مقادیر مختلف از غلظت‌های آنزیمی به منظور بررسی اثر غلظت آنزیم بر درصد فعالیت باقیمانده در نظر گرفته شد که نتایج مربوط به آن در جدول ۲ قابل مشاهده است. نتایج حاکی از آن است که غلظت آنزیم تأثیری بر درصد فعالیت باقیمانده آنزیمی ندارد.

جدول ۲- تاثیر غلظت آنزیم بر درصد فعالیت باقیمانده

درصد فعالیت باقیمانده آنزیم درون کپسول	آنزیم فعال (mg)	آنزیم محبوس شده (mg)	غلظت آنزیم (mg)
۹/۳	۰/۰۷۶	۰/۸	۱
۱۱/۲	۰/۲۶۲	۲/۷۹	۳
۹/۵	۰/۵۰۵	۴/۸۵	۵
۸/۷	۰/۷۱۹	۷/۳۲	۷/۵

### ۳-۳- بررسی اثر pH

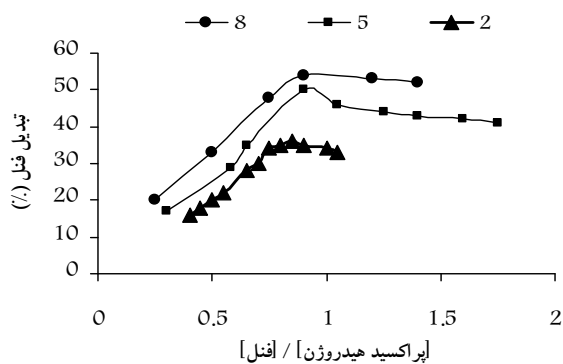
شکل ۱ تأثیر مقادیر مختلف pH بر فعالیت آنزیمی برای هر دو آنزیم آزاد و تثبیت شده را نشان می‌دهد. pH بهینه برای آنزیم آزاد تقریباً ۷/۰ ولی برای آنزیم تثبیت شده در حدود ۸/۰ است. تفاوت بین pH بهینه برای آنزیم آزاد و تثبیت شده در حدود یک واحد



شکل ۱- اثر pH بر فعالیت آنزیم تثبیت شده و آنزیم آزاد

<sup>1</sup> Amino Propyle Glas (APG)

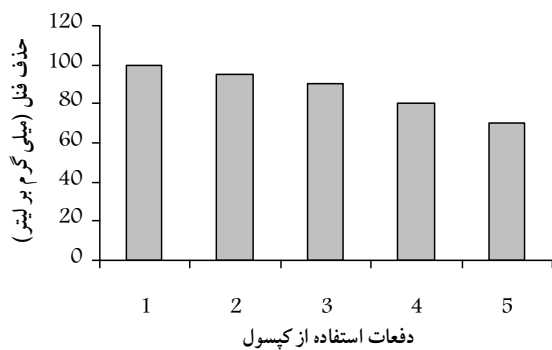
قادر است آنزیم را غیر فعال می‌کند. با توجه به شکل ۵، این نسبت‌ها در بازه غلظتی فنل مورد استفاده بین ۰/۹۴ تا ۱/۱۵ متغیر است که این انحراف از مقدار واحد می‌تواند ناشی از تشکیل پلیمرها و یا محدودیتهای نفوذ به داخل ژل باشد [۲۳].



شکل ۵- بررسی اثر غلظت پراکسید هیدروژن بر بیشینه تبدیل فنل به دست آمده در سه غلظت متغیر (فنل)

### ۷-۳- استفاده مجدد

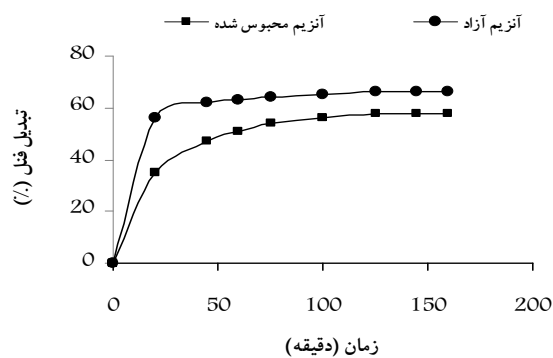
پس از گذشت ۱۰۰ دقیقه از آغاز واکنش، کپسول‌ها از محلول خارج شده و به‌طور کامل شسته شدند و برای استفاده مجدد در محلول فنلی انداخته شدند. پس از ۵ دور استفاده از کپسول‌ها، بازده حذف فنلی کاهش یافت (شکل ۶). این اثر می‌تواند مربوط به تجمع رادیکال‌ها در داخل کپسول و یا مسدود شدن حفرات غشاء احاطه کننده آنزیم باشد که سایت فعال آنزیم یا حتی ملکول‌های آنزیمی را به دام انداخته و باعث غیر فعال شدن آنزیمی می‌شود. در بررسی دیگری نشان داده شده است که آنزیم تثبیت شده بر روی حامل، ۵۰ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۵ دور استفاده از دست می‌دهد [۲۲].



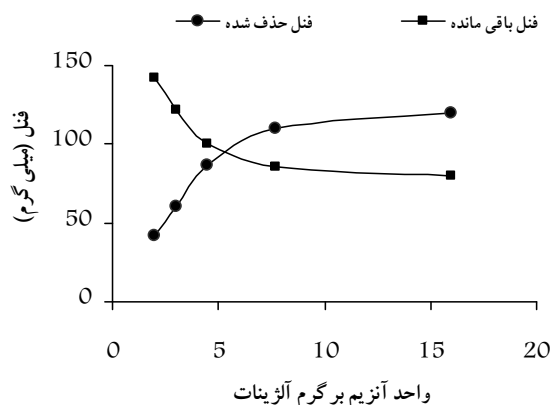
شکل ۶- استفاده پذیری مجدد کپسول‌ها، غلظت فنل ۲ میلی‌مولار مقدار آنزیمی ۷/۵ واحد بر میلی لیتر

### ۴- نتیجه‌گیری

تولید و کاربرد پراکسیداز ترب کوهی تثبیت شده در کپسول کلسیم آلزینات به‌منظور حذف فنل از محلول آبی مورد بررسی قرار



شکل ۳- مقایسه پیشرفت واکنش با زمان برای آنزیم تثبیت شده در غلظت فنل معادل با ۲ میلی‌مولار برای آنزیم محبوس شده و آنزیم آزاد



شکل ۴- بررسی غلظت آنزیم محبوس شده بر حذف فنل حذف شده و فنل باقیمانده

بیشتر غلظت آنزیم تأثیر قابل توجهی بر حذف فنل ندارد. مقدار بهینه غلظت آنزیم در شرایط انجام آزمایش ۰/۸ واحد بر گرم تعیین شد.

### ۶-۳- بررسی اثر غلظت پراکسید هیدروژن

حذف فنل در واکنش آنزیمی را می‌توان با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن به مقدار مشخصی افزایش داد. در شکل ۵ بیشینه تبدیل فنلی در غلظتهای مختلف در مقابل نسبت بهینه رسم شده است. رفتار منحنی حذف فنل با نسبت پراکسید هیدروژن به فنل در تمامی موارد مشابه بود. در ابتدا مقدار حذف فنل با افزایش پراکسید هیدروژن به سرعت افزایش یافت و پس از رسیدن به مقدار مشخصی که بیشینه بازده حذف در آن نسبت صورت می‌گیرد، روندی نزولی پیش گرفت. دلیل این مطلب می‌تواند وجود مقدار اضافی پراکسید هیدروژن باشد که موجب تشکیل سریع واسطه‌های واکنش می‌گردد که خود به‌عنوان مهار کننده آنزیمی رفتار می‌کنند. لازم به ذکر است که مقدار اضافی پراکسید هیدروژن به تنهایی نیز

عمومی برای جریان پسابها می‌باشند، به نسبت بیشتر است. اگرچه بازده حذف فنلی بر اثر محبوس شدن به دلیل در دسترس نبودن آنزیم کاهش می‌یابد لکن بررسی استفاده مجدد و نیز پیشرفت واکنش، امکان رسیدن به بازده بالاتر و نیز کنترل بهتر واکنش را فراهم می‌نماید. آزمایش‌ها نشان داد که این بیوکاتالیست‌ها در چهار دوره متوالی بدون کاهش قابل توجهی در عملکرد خود می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده پراکسیداز ترب کوهی محبوس شده در کپسول آلژینات می‌تواند در حذف موثر فنلی به کار گرفته شود. کارایی حذف فنلی متأثر از غلظت فنل، مقدار پراکسید هیدروژن، مقدار آنزیم به کار رفته و نیز pH محیط آبی است. فعالیت باقیمانده، محبوس شدن و ریزش آنزیمی به شرایط آماده‌سازی ژل و کپسول وابسته است و یافتن مقادیر بهینه برای کمیتهای مذکور بستگی به نوع آلژینات مورد استفاده دارد. فعالیت آنزیم محبوس شده در محیط‌های بازی و اسیدی که شرایط

## ۵- مراجع

- 1- Aitken, M.D. (1993b). "Wastewater treatment applications of enzymes: Opportunity and obstacles." *J. of Chemical Eng.*, 52 (2), 49-58.
- 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- Kilbanov, A.M., Alberti, B.N., Morris, E.D., and Felshin, L.M. (1980). "Enzymatic removal of toxic phenols and aniline from wastewater." *J. Appl. Biochem.*, 2 (5), 414-421.
- 4- Wright, H., and Nicell, J. A. (1999). "Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols." *Biores. Technol.*, 70, 69-79.
- 5- Kilbanov, A.M., Tu, T.M., and Scott, K. P. (1983). "Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal conversion wastewater." *J. of Science*, 221, 259-261.
- 6- Cooper, V.A., and Nicell, J.A. (1996). "Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase." *Water Res.*, 30 (4), 954-964.
- 7- Tatsumi, K., Wada, S., and Ichikawa, H. (1996). "Removal of chlorophenol with immobilized horseradish peroxidase." *Biotechnol. Bioeng.*, 51 (1), 126-130.
- 8- Azevedo, A.M., Vojinovic, V., Cabral, J.M.S., Gibson, T.D., and Fonseca, L.P. (2004). "Operational stability of immobilized horseradish peroxidase in mini-packed bed bioreactors." *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, 28 (3), 121-128
- 9- Wilberg, K., Assenhaimer, C., and Rubio, J. (2002). "Removal of aqueous phenol catalyzed by a low purity soybean peroxidase." *J. Chem. Technol. and Biotechnol.*, 77 (7), 851-857.
- 10- Fernandes, K.F., Lima, C.S., Pinho, H. and Collins, C.H. (2003). "Immobilization of horseradish peroxidase on to polyaniline polymers." *Process Biochem.*, 38 (9), 1379-1384.
- 11- Cheng, J., Yu, S.M., and Zuo, P. (2006). "Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater." *Water Res.*, 40 (2), 283-290.
- 12- Caromori, S.S., and Fernandes, K.F. (2004). "Covalent immobilization of horseradish peroxidase onto poly (ethylene terephthalate)- poly (aniline) composite." *Process Biochem*, 39 (7), 883-888.
- 13- 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.
- 14- Caza, N., Bewtra, J.K., Biswas, N., and Taylor, K.E. (1999). "Removal of phenolic compound from synthetic wastewater using soybean peroxidase." *Water Res.*, 33 (13), 3012-3018.
- 15- Nakamoto, S., and Machida, N. (1992). "Phenol removal from aqueous solution by peroxidase-catalyzed reaction using additives." *Water Res.*, 26 (1), 49-54.
- 16- Kinsely, C., and Nicell, J.A. (2000). "Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene Glycol." *Biores. Tech.*, 73 (2), 139-146.

- 17- Nigma, S.C., Tsao, I. F., Sakoda, A., and Wang, H.Y. (1988). "Techniques for preparing hydrogel membrane capsule." *Biotechnol. Tech.*, 2 (4), 271-276.
- 18- Peterson, G. L. (1977). "Simplification of the protein assay method of lowry et al. that is more generally applicable." *Anal Biochem*, 83 (2), 346-356.
- 19- Nicell, J. A., and Wright, H. (1997). "A model peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide." *Enzyme Microb. Technol.*, 21 (4), 302-309.
- 20- Wu, Y., Taylor, K.E., Biswas, N., and Bewtra, J.K. (1997). "Comparison of additive in the removal of phenolic compound by peroxidase-catalyzed polymerization." *Water Res.*, 31 (11), 2699-2704.
- 21- Wu, Y., Taylor, K.E., Biswas, N., and Bewtra, J.K. (1999). "Kinetic model for removal of phenol by horseradish peroxidase with PEG." *J. Environ. Eng.*, 125 (5), 451-458.
- 22- 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.
- 23- Nicell, J.A., Bewtra, J. K., Biswas, N., and Pierre, C.S. (1993). "Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compound from wastewater." *Canadian J. of Civil Eng.*, 20 (5), 725-730.