



بررسی رنگ‌زدایی رنگینه سیاه راکتیو ۵ به روش آنزیمی

محمد منصوری مجومرد^۱، حمیدرضا کریمی‌نیا^{۲*}

۱- کارشناس ارشد، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران، صندوق پستی: ۹۴۶۵-۱۱۱۵۵

۲- استادیار، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران، صندوق پستی: ۹۴۶۵-۱۱۱۵۵

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۱۸ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۰/۳/۲۰

چکیده

در این تحقیق، روش رنگ‌زدایی آنزیمی به طور تجربی مورد بررسی قرار گرفته است. رنگ‌زدایی رنگینه سیاه راکتیو ۵ در یک راکتور همزده با استفاده از پراکسیداز قارچی کپرینوس سینریوس مطالعه شده است. برای این منظور عواملی همچون غلظت آب اکسیژنه، pH محلول رنگی، غلظت محلول رنگی و فعالیت آنزیمی برای رنگ‌زدایی رنگینه سیاه راکتیو ۵ مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در نهایت بازده رنگ‌زدایی در شرایط راکتور زیستی ۶۷ درصد مشاهده شد. در این حالت، رنگینه سیاه راکتیو به محیط واکنش به طور پیوسته وارد می‌شد و افزودن آب اکسیژنه و آنزیم پراکسیداز به طور ناپیوسته بود. ضمناً pH محیط واکنش برابر با ۸ و غلظت رنگ و غلظت آب اکسیژنه به ترتیب ۴۰ ppm و ۹۶.۱ mM بود.

واژه‌های کلیدی: رنگ‌زدایی، رنگ‌زدایی آنزیمی، پراکسیداز، سیاه راکتیو ۵، کپرینوس سینریوس.

Investigation of Decolorization of Reactive Black 5 by Enzymatic Method

M. Mansouri, H. R. Kariminia

Department of Chemical & Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, P.O. Box: 11155-9465, Tehran, Iran

Abstract

This research reports on the examination of enzymatic decolorization. Decolorization of Reactive Black 5 using fungal peroxidase obtained from *Coprinus Cinereus* was studied in a stirred tank reactor. Effect of several parameters including hydrogen peroxide concentration, pH, dye concentration and enzyme activity on the decolorization of Reactive Black 5 was investigated. Dye decolorization efficiency of 67% was achieved under continuous feeding of dye solution and stepwise addition of hydrogen peroxide and peroxidase enzyme. Under this condition, pH value, dye and hydrogen peroxide concentrations were 8.0, 40 ppm and 96.1 mM, respectively. *J. Color Sci. Tech.* 5(2011), 11-20 © Institute for Color Science and Technology.

Keywords: Dye decolorization, Enzymatic decolorization, Peroxidase, Reactive black 5, *Coprinus cinereus*.

۱- مقدمه

برای اولین بار لیگنین پراکسیداز را از یک گونه قارچ استخراج کردند، بیشتر تحقیقات انجام شده بر روی تجزیه زیستی رنگینه‌های نساجی در زمینه استفاده از قارچ‌های وایت-رت (WRF) می‌باشد که آنزیم‌های تجزیه کننده لیگنین^۵ مثل لاکاز^۶، منگنز پراکسیداز^۷، لیگنین پراکسیداز^۸ و غیره تولید می‌کنند [۲۰].

در میان کاربردهای روش‌های زیستی، استفاده از آنزیم‌ها روز به روز از مقبولیت بیشتری برخوردار می‌شود. علت این مقبولیت از لحاظ خاصیت کاتالیستی این مواد این است که آنها در مقایسه با کاتالیست‌های شیمیایی از کارایی خوبی برخوردار می‌باشند و حتی در مواقعی بهتر نیز عمل می‌کنند. این کاتالیست‌های زیستی، نه تنها واکنش‌های مورد نظر را در فرآیند کاتالیز می‌کنند، بلکه بسترهای خاص را نیز برای واکنش‌ها انتخاب می‌کنند که این موارد خود به خود باعث افزایش بهره‌وری فرآیند می‌شود. به علاوه این مواد اغلب در شرایط متوسط عملیاتی از جمله دما، فشار و pH به نرخ‌های مطلوب واکنش می‌رسند که کاتالیست‌های شیمیایی در صورت فراهم بودن شرایط متعدد عملیاتی به آن می‌رسند که این مسأله باعث کاهش هزینه‌های جاری عملیاتی می‌شود [۲۱]. دلایلی مانند امکان تبدیل راحت به مقیاس صنعتی، کنترل ساده فرآیند، حذف سریع تر آلاینده‌ها، امکان انجام واکنش در غلظت‌های کم و زیاد آلاینده و عدم تولید لجن نیز مورد توجه زیادی قرار گرفته است. آنزیم‌ها می‌توانند رنگینه‌های خاصی را که در مقابل انواع روش‌های تصفیه ای مقاوم هستند، با تبدیل آنها به مواد بی‌ضرر حذف کنند [۲۲، ۲۳]. با این وجود در برابر مزیت‌های واضح استفاده از آنزیم‌ها، تعدادی از مشکلات عملی نیز وجود دارد. از این معایب عمده می‌توان هزینه بالای جداسازی و خالص‌سازی، ناپایداری ساختار آنزیم در هنگام جداسازی (به خصوص در مورد آنزیم درون سلولی) و حساسیت آن در شرایط غیر بهینه را نام برد.

شکل ۱ فعالیت کاتالیستی یک گونه نامشخص آنزیم پراکسیداز را نشان می‌دهد. در این فرآیند، آنزیم را کد^۹ ابتدا توسط آب اکسیژنه اکسید می‌شود و به حالت فعال تبدیل می‌شود که به آن ترکیب I^{۱۰} گفته می‌شود. پس از این عمل ترکیب فعال شده، یک ملکول از پیش ماده^{۱۱} (به عنوان مثال ملکول فنل) را با گرفتن یک الکترون از آن و تبدیل پیش ماده به فرم رادیکال آزاد، اکسید نموده و خود به ترکیب II^{۱۲} تبدیل می‌شود، که یک شکل دیگر از حالت فعال پراکسیداز

در سال ۱۸۵۶ میلادی ویلیام هنری پرکین^۱ به طور اتفاقی اولین رنگینه مصنوعی تجاری را کشف کرد [۱]. در اواخر قرن نوزدهم، ۱۰۰۰۰ رنگینه مصنوعی ساخته شده بود. رنگینه‌های مصنوعی به میزان گسترده‌ای در رنگرزی الیاف نساجی، چاپ کاغذ، عکس رنگی، صنایع داروسازی، غذایی و آرایشی و صنایع دیگر استفاده می‌شود [۲]. میزان کل تولید رنگینه در سال ۱۹۹۰ در سراسر دنیا به ۸۰۰ هزار تن در سال رسید [۳]. امروزه در جهان بیش از ۱۰۰۰۰ نوع رنگینه و رنگدانه مختلف در صنایع نساجی و چاپ، از مجموع بیش از ۱۰۰۰۰۰ نوع به کار می‌رود [۴]. در حدود سال ۲۰۰۰، کشورهای هند، چین، کره جنوبی و اروپای شرقی سالانه در حدود ۶۰۰ هزار تن رنگینه مصرف می‌کردند [۵]. توجه به این نکته حائز اهمیت است که حداقل ۱۰ درصد از رنگینه استفاده شده در صنایع مختلف از طریق ضایعات و فاضلاب وارد محیط زیست می‌گردد [۶]، که این مقدار حداکثر تا ۱۵ درصد گزارش شده است [۷]. به طور معمول رنگینه‌ها در غلظت‌های بالاتر از ۱ mg/l قابل تشخیص هستند. غلظت متوسط رنگینه در فاضلاب خروجی از صنایع نساجی حدود ۳۰۰ mg/l گزارش شده است [۸]. علاوه بر آثار بد ظاهری وجود رنگینه‌ها حتی در مقادیر بسیار اندک و افزایش خواست اکسیژن شیمیایی^۲ (COD)، بسیاری از رنگینه‌های سنتزی سمی، عامل جهش ژنتیکی و سرطان‌زا هستند [۹]. محققین تاکنون تلاش‌های بسیاری برای یافتن یک راه حل مناسب و اقتصادی جهت تصفیه رنگینه‌ها در فاضلاب نساجی انجام داده‌اند. اما این تلاش‌ها همچنان به منظور دستیابی به گزینه‌های سازگار با محیط زیست و اقتصادی ادامه دارد [۱۱]. روش‌های مختلفی برای تصفیه فاضلاب نساجی و حذف رنگ وجود دارد. این روش‌ها را می‌توان به سه دسته کلی روش‌های فیزیکی، روش‌های شیمیایی و روش‌های زیستی تقسیم نمود [۱۰]. فعالیت‌های تحقیقاتی زیادی با سیستم‌های تصفیه فیزیکی - شیمیایی حذف رنگ از فاضلاب‌های صنعتی انجام گرفته است [۱۵-۱۲]. از معایب عمده روش‌های فیزیکی - شیمیایی می‌توان به کارایی پایین، تطبیق‌پذیری محدود، تداخل با سایر ترکیبات فاضلاب و اداره کردن لجن تولید شده و عامل مهم هزینه زیاد اشاره کرد [۱۶]. فرآیندهای رنگ‌زدایی زیستی با تجزیه کامل ترکیبات رنگی به دی اکسید کربن، آمونیاک و آب به جای ایجاد محصولات فرعی سمی، یک روش پاکسازی کامل و مؤثر اقتصادی ارائه می‌کنند و بستر گسترده‌ای برای تحقیقات جدید در تصفیه رنگ‌ها می‌باشند [۱۷، ۱۸]. استفاده از قارچ‌ها به منظور تصفیه فاضلاب‌های رنگی به صورت زیستی به طور فزاینده‌ای در دهه اخیر مورد توجه و بررسی قرار گرفته است [۱۹]. از زمانی که تبیین و کرک^۳

4- White- Rot Fungi
5- Lignolytic
6- Laccase
7- Manganese Peroxidase
8- Lignin Peroxidase
9- Resting enzyme
10- Copmpound I
11- Substrate
12- Compound II

1- William Henry Perkin
2- Chemical Oxygen Demand
3- Tien & Kirk

می‌باشد. ترکیب II نیز همچنین می‌تواند یک ملکول دیگر از پیش ماده را اکسید نموده و به حالت آنزیم راکد برگردد. در صورت وجود آب اکسیژنه اضافی در سیستم، ترکیب II به ترکیب III اکسید می‌شود، که این فرم از آنزیم به کندی به یکی از دو حالت ترکیب یک و یا آنزیم راکد تبدیل می‌شود. ترکیبات آروماتیکی مانند فنل‌ها، آنیلین‌ها، هیدروکینون‌ها و هیدروکینوید آمین‌ها، به ویژه مشتقات بنزیدین به عنوان پیش ماده‌های پراکسیدازها شناخته شده‌اند [۲۴]. در صورت عدم وجود پیش ماده‌ای آروماتیک ترکیب یک توسط آب اکسیژنه به ترکیب I-H₂O₂ تبدیل می‌شود، و در انتها نیز این ترکیب به شکل غیر فعال آنزیم تبدیل می‌گردد.

به منظور ضدعفونی شدن، محیط کشت اتوکلاو شد و به ظروفی مخصوص که در آن ضدعفونی شده بودند، انتقال داده شد و پس از سرد کردن و انعقاد مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت اصلی مایع حاوی گلوکز به عنوان منبع کربن با غلظت ۳۰ g/l، پپتون به عنوان منبع نیتروژن با غلظت ۱۰ g/l و عصاره مخمر^۵ با غلظت ۵ g/l، در ارلن تهیه شد. شرایط و عوامل مؤثر در تولید آنزیم پراکسیداز با استفاده از قارچ کپرنیوس سینریوس پیش از این بهینه سازی شده است [۲۵]. این محیط در ارلن‌هایی به حجم ۲۵۰ میلی لیتر به میزان حدود ۷۵ تا ۸۰ میلی لیتر و در ارلن‌هایی با حجم ۵۰۰ میلی لیتری به میزان ۱۰۰ میلی لیتر تهیه گردید. کشت در شرایط دور تکانه^۶ rpm ۱۶۰، دما ۳۲ °C و pH برابر با ۴ صورت گرفت.

یک واحد از فعالیت پراکسیداز بر اساس میزان مصرف ۱ μmol از H₂O₂ توسط آنزیم تحت شرایط اندازه‌گیری تعریف می‌شود. نمونه شاهد^۷ در این آزمایش همان محلول اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بود که در بالا تعریف گردید، با این تفاوت که در آن به جای اضافه کردن H₂O₂، ۰٫۱ ml از محلول آنزیم و ۰٫۱ ml از بافر تهیه شده اضافه می‌شد به طوری که مجدداً همان حجم ۳٫۱ میلی لیتری ایجاد شود. پس از خواندن میزان جذب هر دو محلول شاهد و نمونه آزمایش، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد [۲۵].

[U/ml]=

$$\frac{(A_s - A_b)}{(V_e \times k \times \epsilon)} \times D_m \times V$$

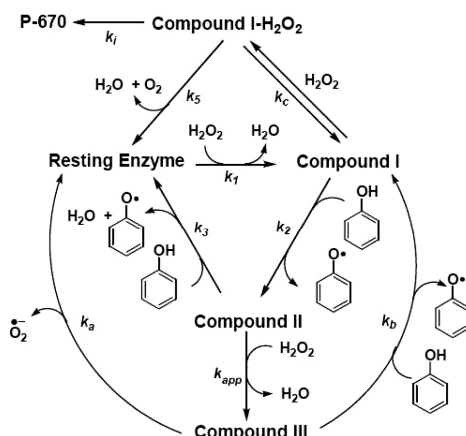
[U/ml] =

$$\frac{(A_s - A_b)}{(0.1 \times 12.88 \times 0.5)} \times D_m \times 3.2 \quad (1)$$

که در این رابطه D_m فاکتور رقیق سازی، V_e حجم نمونه آنزیم استفاده شده در تهیه محلول که برابر با ۰٫۱ ml، V حجم نهائی محلول واکنش (به همراه آنزیم)، ϵ ضریب جذب، k نسبت ضریب استوکیومتری محصول مورد نظر به پیش ماده می‌باشد.

پس از تولید آنزیم پراکسیداز، از آن به منظور رنگ‌زدایی در راکتور پیوسته استفاده شد. در این آزمایش‌ها با استفاده از بهینه کردن مواردی همچون غلظت آب اکسیژنه، pH محلول رنگی، میزان فعالیت آنزیمی و غلظت رنگینه استفاده شده، رنگ‌زدایی صورت گرفت.

برای بهینه سازی غلظت آب اکسیژنه، این غلظت از میان ۹۶۱ mM و ۴۸۰٫۵، ۱۰۰، ۹۶٫۱، ۴۸٫۰۵، ۲۴٫۰۲۵، ۱۲٫۰۱۲۵ انتخاب شد. در این حالت زمان ماند هیدرولیکی درون راکتور پیوسته



شکل ۱: نمایش فعالیت کاتالپستی یک گونه نامشخص پراکسیداز [۲۴].

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد

در این تحقیق برای تولید آنزیم پراکسیداز از قارچ کپرنیوس سینریوس NBRC 30628^۲ استفاده شد. این گونه توسط محقق به نام ساگارا^۳ در دانشگاه کیوتوی ژاپن از ساقه‌های برنج آلوده شده به اوره جداسازی شده است.

۲-۲- روش کار

به منظور تکثیر و رشد میکروارگانیسم کپرنیوس سینریوس از محیط کشت PDA^۴ که یک محیط قندی مغذی برای قارچ‌ها می‌باشد با غلظت ۳۹ g/l استفاده شد. محیط پیش کشت جهت نگهداری و تکثیر میکروارگانیسم نیز همانند محیط کشت مورد استفاده، PDA بود.

5- Yeast extract
6- Shaker
7- Blank
8- Extinction coefficient

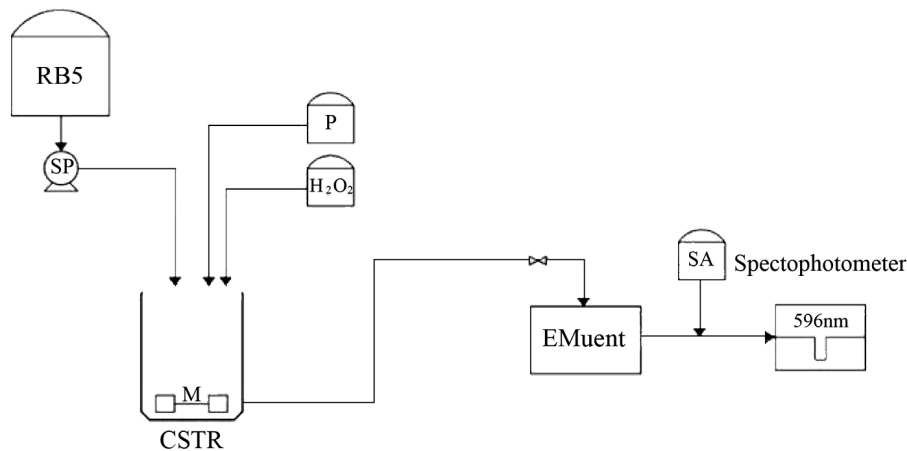
1- Compound III
2- National Biological Resources Center (Japan)
3- Sagara
4- Potato Dextrose Agar

پس از بهینه کردن شرایط فوق با وارد کردن ناپیوسته آنزیم در هر ۱۵ دقیقه به میزان ۴۰ واحد میزان رنگزدایی به صورت پیوسته درآمد.

سیستم رنگزدایی در حالت استفاده از آنزیم آزاد، متشکل از یک پمپ سرنگی به منظور انتقال محلول رنگی به داخل راکتور، منبع تغذیه آب اکسیژنه و راکتور بود. راکتور مورد نظر یک بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری بود که در کف آن یک لوله خروجی تعبیه شده بود. حجم مفید راکتور ۵۰ ml بود. علت انتخاب این حجم کوچک برای راکتور این بود که حتی المقدور آنزیم کمتری صرف هر آزمایش شود. راکتور مورد نظر بر روی همزن مغناطیسی قرار داشت و برای ایجاد اختلاط از آهن‌ربا استفاده شد. نمودار شمایی این سیستم در شکل ۲ ارائه شده است.

برای نمونه‌گیری در فواصل مختلف به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول درون راکتور توسط میکروپیپت برداشته شد و برای اینکه حجم برداشته شده به حجم مورد نظر برای مطالعه رنگ سنجی برسد، به مقدار ۳۰ برابر رقیق شد تا در نهایت حجمی معادل ۳ میلی‌لیتر را تشکیل دهد. در ضمن به علت اینکه نمونه برداشته شده از راکتور همچنان دارای آنزیم محلول بود، برای متوقف کردن واکنش آنزیمی ۳۴ میکرولیتر از سدیم آزید ۳،۱ M به آن افزوده شد.

میزان رنگزدایی بر اساس تفاوت میزان جذب نوری محلول رنگینه اولیه و میزان جذب پس از انجام واکنش در دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج بیشینه رنگینه مورد نظر سنجیده شد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون هر رنگینه این مقادیر جذب، به غلظت رنگینه ارتباط داده شد و سپس به صورت درصد رنگزدایی بیان می‌شود.



شکل ۲: سیستم فرآیند رنگزدایی پیوسته با آنزیم محلول، RB5 (رنگینه سیاه راکتیو ۵)، P (آنزیم پراکسیداز)، SP (پمپ سرنگی)، M (آهن‌ربا)، Effluent (جریان خروجی)، SA (سدیم آزید)، CSTR (راکتور پیوسته همزده).

برابر با ۶۰ دقیقه، pH برابر با ۷ که توسط بافر فسفات ایجاد شد، غلظت رنگینه RB5 برابر با ۴۰ ppm و فعالیت آنزیم موجود در راکتور برابر با ۲۵۰ واحد بود.

برای سنجش اثر pH محلول رنگی بر روی رنگزدایی، بافر سیترات- فسفات برای pH = ۵، بافر فسفات برای pH های ۶، ۷ و ۸ و بافر بوراکس- اسید بوریک برای pH = ۹ استفاده شد. به عنوان نمونه وقتی اثر pH برابر ۷ بررسی شد، رنگینه ۲۰۰ ppm توسط بافر فسفات با pH برابر ۷ تهیه شد و ۱۰ ml از این رنگینه توسط این بافر درون راکتور به حجم رسید. در تمام این آزمایش‌ها غلظت آب اکسیژنه برابر با ۹۶،۱ mM بود که در هر ۵ دقیقه ۰،۲ ml افزوده می‌شد، HRT برابر با ۶۰ دقیقه، فعالیت آنزیم درون راکتور برابر با ۲۵۰ واحد و غلظت رنگینه ورودی به راکتور و رنگینه درون راکتور برابر با ۴۰ ppm بود.

محلول رنگی شامل رنگینه سیاه راکتیو ۵ (Reactive Black 5) و بافر با pH های مختلف برای رسیدن به غلظت‌های مطلوب بود. فرمول مولکولی رنگینه سیاه راکتیو ۵، $C_{26}H_{21}N_5O_{19}S_6Na_4$ با وزن مولکولی ۹۹۱،۸ g/mol و حلالیت ۸۲ g/l در دمای ۲۰ °C در آب می‌باشد [۲۶]. غلظت رنگینه‌های استفاده شده ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ ppm بوده است. در آزمایش‌های تعیین غلظت بهینه رنگینه، غلظت آب اکسیژنه برابر با ۹۶،۱ mM بود که در هر ۵ دقیقه ۰،۲ ml افزوده شد، HRT برابر با ۶۰ دقیقه، فعالیت آنزیم درون راکتور برابر با ۲۵۰ واحد و pH درون محیط برابر با ۸ بود.

به منظور سنجش میزان فعالیت بهینه آنزیمی، میزان فعالیت درون راکتور در لحظه شروع واکنش برابر با ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ واحد در کل حجم راکتور که برابر با ۵۰ ml بود بررسی شد.

برای ۴۸,۰۵ mM در زمان ۱۵ دقیقه و حذف ۵۵٪، برای ۲۴,۰۲۵ mM در زمان ۲۵ دقیقه و حذف ۵۳٪، برای ۱۲,۰۱۲۵ mM در زمان ۵۰ دقیقه و حذف ۵۰٪ می‌باشد.

با اینکه غلظت‌های بالای آب اکسیژنه اثر منفی بر رنگ‌زدایی می‌گذارد، کم بودن این ماده نیز سبب انجام نشدن واکنش‌های کاتالیستی رنگ‌زدایی می‌شود. در صورت کم بودن آب اکسیژنه رادیکال آزاد رنگ و ترکیب I، آنزیم (شکل ۱) تشکیل نمی‌شود. افزایش غلظت H_2O_2 در محیط واکنش سبب از بین رفتن فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌شود. با توجه به چرخه کاتالیستی آنزیم پراکسیداز این رفتار قابل پیش‌بینی بود زیرا اگر آب اکسیژنه اضافی در محلول وجود داشته باشد با ترکیب II واکنش می‌دهد و ترکیب III را تشکیل می‌دهد که این شکل از آنزیم به کندی به یکی از دو حالت ترکیب I و یا آنزیم راکد تبدیل می‌شود و موجب از بین رفتن تدریجی آنزیم می‌شود.

۲-۳- بررسی اثر pH محلول رنگی

علت تأثیر pH بر روی درصد رنگ‌زدایی توسط آنزیم پراکسیداز را باید در چرخه کاتالیستی این آنزیم (شکل ۱) سنجید. پایداری ترکیب‌های I و II در مورد این آنزیم وابسته به pH و غلظت بافر می‌باشد. مقدار ثابت سرعت تشکیل ترکیب I (K_1) در pH های خنثی و قلیایی مشابه با پراکسیدازهای دیگر ($10^6 \times 10^{-6} - 6$) می‌باشد اما در pH های اسیدی این ثابت کاهش می‌یابد. مقدار ثابت‌های K_2 و K_3 نیز وابسته به pH هستند.

$100 \times$ (غلظت اولیه رنگینه / غلظت در زمان مورد نظر پس از واکنش - غلظت اولیه رنگینه) = درصد رنگ‌زدایی (۲)

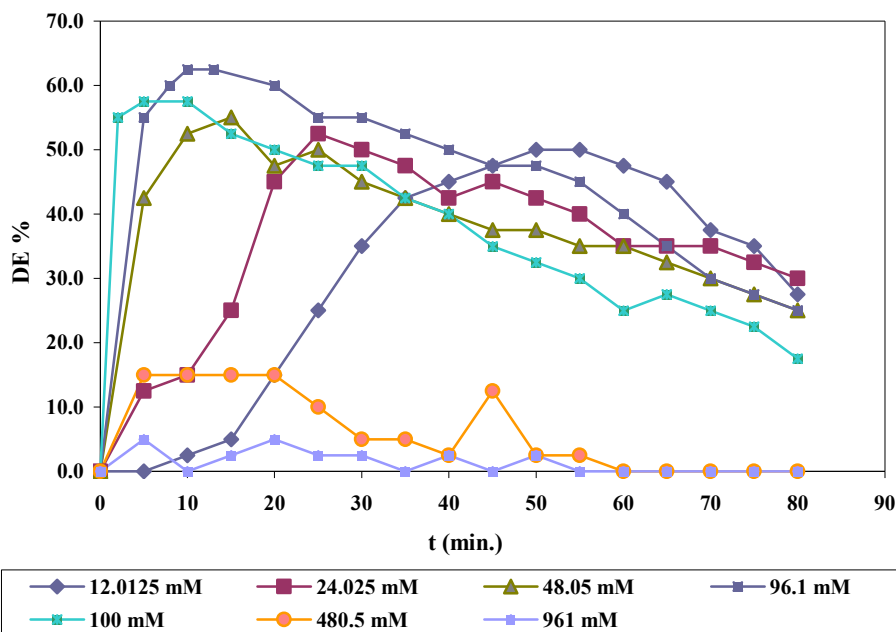
غلظت رنگینه در رابطه فوق بر حسب mg/l یا ppm قرار داده شد. طول موج بیشینه برای رنگینه‌های سیاه راکتیو ۵ برابر با ۵۹۶ nm می‌باشد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی غلظت آب اکسیژنه

منحنی تغییرات درصد رنگ‌زدایی (DE%) بر حسب زمان در شکل ۳ برای غلظت‌های متفاوت آب اکسیژنه قابل مشاهده می‌باشد. در این شکل مشخص است که غلظت آب اکسیژنه به مقدار ۹۶,۱ mM مقداری است که بیشینه حذف رنگینه با مقدار ۶۲٪ در آن صورت می‌گیرد. لازم به ذکر است که افزایش آب اکسیژنه در این آزمایش‌ها به میزان ۰,۲ ml در هر ۵ دقیقه بوده است.

مشاهده می‌شود که در غلظت‌های بالا مانند ۴۸۰,۵ ml و ۹۶۱ ml آب اکسیژنه نقش بازدارندگی در پیشرفت واکنش دارد و در غلظت‌های کمتر از ۹۶,۱ mM رنگ‌زدایی با نرخ کمی نسبت به حالت ۹۶,۱ mM کاهش می‌یابد و بیشینه رنگ‌زدایی در هر یک از حالات به سمت راست نمودار انتقال می‌یابد یعنی کاهش آب اکسیژنه باعث می‌شود بیشینه رنگ‌زدایی در زمان‌های طولانی‌تری اتفاق بیفتد. این بیشینه رنگ‌زدایی برای ۹۶,۱ mM در زمان ۱۳ دقیقه و حذف ۶۳٪،



شکل ۳: درصد حذف رنگینه برای رنگینه سیاه راکتیو ۵ با غلظت ۴۰ ppm در pH برابر ۰,۷، HRT برابر با ۶۰ دقیقه، دمای محیط، فعالیت آنزیمی ۵ U/ml و غلظت‌های متفاوت آب اکسیژنه.

می‌باشد.

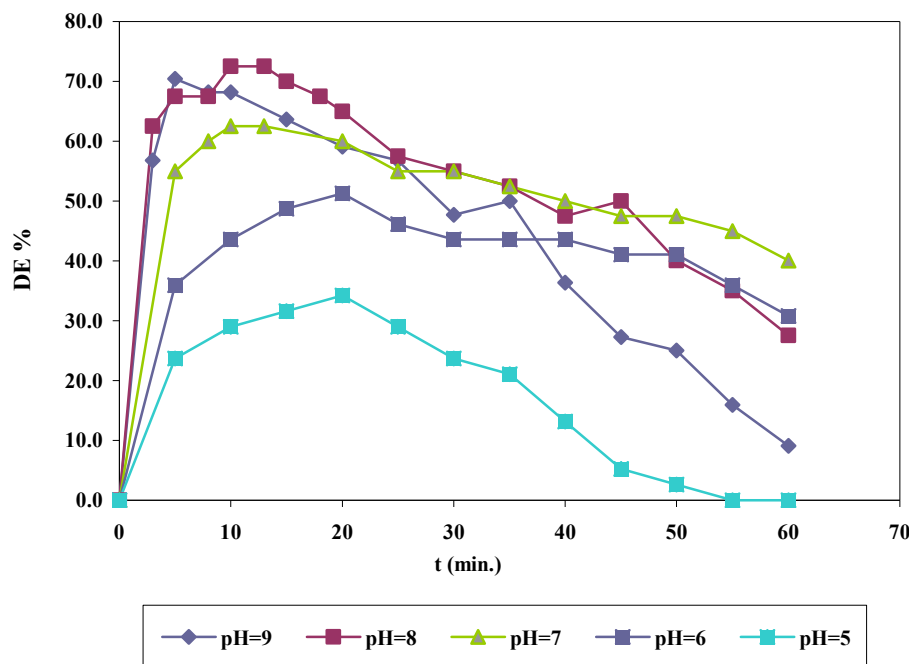
رنگ‌زدایی بیشینه‌ای که در حالت pH های ۵ و ۶ اتفاق می‌افتد به ترتیب برابر با ۳۴٪ در زمان ۲۰ دقیقه و ۵۱٪ در زمان ۲۰ دقیقه می‌باشد. این مقدار برای pH های ۷، ۸ و ۹ به ترتیب برابر با ۶۳٪ در زمان ۱۳ دقیقه، ۷۳٪ در زمان ۱۲ دقیقه و ۷۱٪ در زمان ۵ دقیقه می‌باشد. بنابراین با تکیه بر این موضوع که در pH برابر با ۸ در کمترین زمان ممکن می‌توان به بیشترین رنگ‌زدایی رسید و در صورتیکه pH محیط به سمت اسیدی افزایش پیدا کند درصد رنگ‌زدایی کاهش می‌یابد (به طوری که در pH برابر با ۵ گویا در انتهای کار یعنی پس از ۵۵ دقیقه مقدار باقی مانده آنزیم کاملاً غیرفعال شده است)، pH برابر با ۸ به عنوان pH بهینه می‌باشد.

۳-۳- بررسی اثر غلظت رنگینه بر روی رنگ‌زدایی

با توجه به شکل ۵ مشخص است که هرچه غلظت رنگینه افزایش پیدا می‌کند، به طور مشخص درصد رنگ‌زدایی کاهش پیدا می‌کند. نگاه دقیق‌تری به این نمودار مشخص می‌کند که به طور مثال در دقیقه ۲۵ پس از شروع واکنش، با اینکه حدود ۵۸ درصد از رنگینه ppm ۲۰ و ۴۱ درصد از رنگینه ppm ۸۰ حذف می‌شود، موازنه جرم بر روی رنگینه حذف شده نشان می‌دهد که مقدار رنگینه بیشتری در غلظت رنگینه ppm ۸۰ حذف می‌شود که این موضوع مؤید تحقیقات دیگر می‌باشد [۲۷].

روند تغییرات ثابت سرعت K_2 و K_3 به شکل یک سهمی وارونه است که مقدار بیشینه هر دو ثابت (بیشتر از $10^6 M^{-1}S^{-1} \times 120$ برای K_2 و $48 \times 10^6 M^{-1}S^{-1}$) در pH برابر با ۸ می‌باشد. مقادیر این ثابت‌ها در این pH برای سایر پراکسیدازها نیز در همین محدوده است. در مورد آنزیم CIP در pH بین ۵ تا ۶ مقدار دو ثابت سرعت K_2 و K_3 یکسان می‌باشد درحالی‌که برای سایر پراکسیدازها مقدار K_2 به طور معمول حداقل ۱۰ برابر بیش از K_3 است. این مقدار بالای K_3 احتمالاً به دلیل بیش از حد بودن غیر عادی پتانسیل کاهش ترکیب II برای این آنزیم است [۲۸].

با توجه به اطلاعات فوق می‌توان نتیجه گرفت که چرخه کاتالیزستی آنزیم CIP در pH های بالاتر به خوبی انجام می‌شود. واکنش منجر به تشکیل ترکیب I با ثابت K_1 در pH های خنثی و قلیایی خوب انجام می‌شود و ثابت‌های K_2 و K_3 نیز برای pH های قلیایی بسیار خوب و برای pH های خنثی مناسب است. شکل ۴ نمودار تغییرات درصد رنگ‌زدایی بر حسب زمان را نشان می‌دهد. بافرهایی که برای این منظور به کار رفت pH برابر با ۵ تا ۹ داشتند. در شکل ۴ مشخص است که pH بهینه برای واکنش رنگ‌زدایی برابر با ۸ می‌باشد، البته pH = ۹ نیز به آن نزدیک است ولی دامنه رنگ‌زدایی در بافر با pH = ۸ بیشتر است به این معنا که اگر درصد رنگ‌زدایی ۵۰ را برای سیستم مطلوب فرض کنیم و در این درصد خطی به موازات منحنی زمان رسم شود، فاصله تقاطع این خط موازی در pH = ۸ نسبت به pH = ۹ بیشتر



شکل ۴: درصد حذف رنگینه برای رنگینه سیاه راکتیو ۵ با غلظت ۴۰ ppm در HRT برابر با ۶۰ دقیقه، دمای محیط، فعالیت آنزیمی ۵ U/ml، غلظت آب اکسیژنه برابر با ۹۶.۱ mM و pH های متفاوت.

رنگینه ۲۰ ppm را به سرعت حذف می‌کند و فعالیت آن نسبت به رنگینه ۴۰ ppm به سرعت کاهش می‌یابد. لذا غلظت رنگینه مناسب برابر با ۴۰ ppm انتخاب شد.

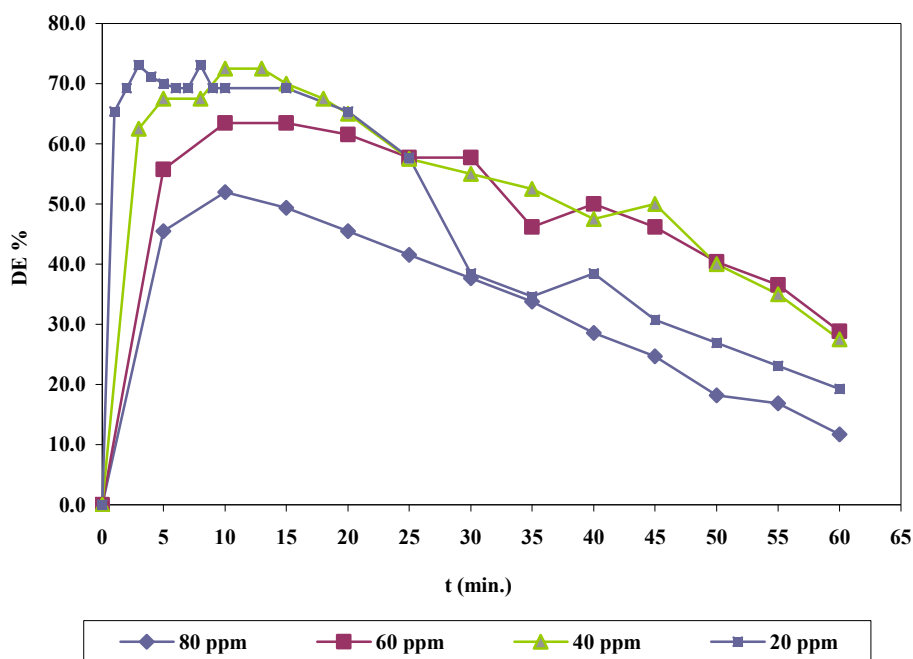
۳-۴- بررسی اثر فعالیت آنزیمی

بر اساس مراجع مختلف با افزایش میزان آنزیم و ثابت نگه داشتن عوامل دیگر از جمله غلظت آب اکسیژنه و غلظت رنگینه، درصد رنگ‌زدایی بهبود می‌یابد [۲۵]. در شکل ۶ نیز مشخص است با زیاد شدن فعالیت آنزیم در شروع واکنش رنگ‌زدایی، درصد رنگ‌زدایی نیز افزایش می‌یابد. نکته دیگر این است که با افزایش فعالیت آنزیم محل بیشینه درصد رنگ‌زدایی به سمت چپ انتقال می‌یابد و در زمان کوتاه‌تری به نقطه بیشینه می‌رسد (شکل ۶).

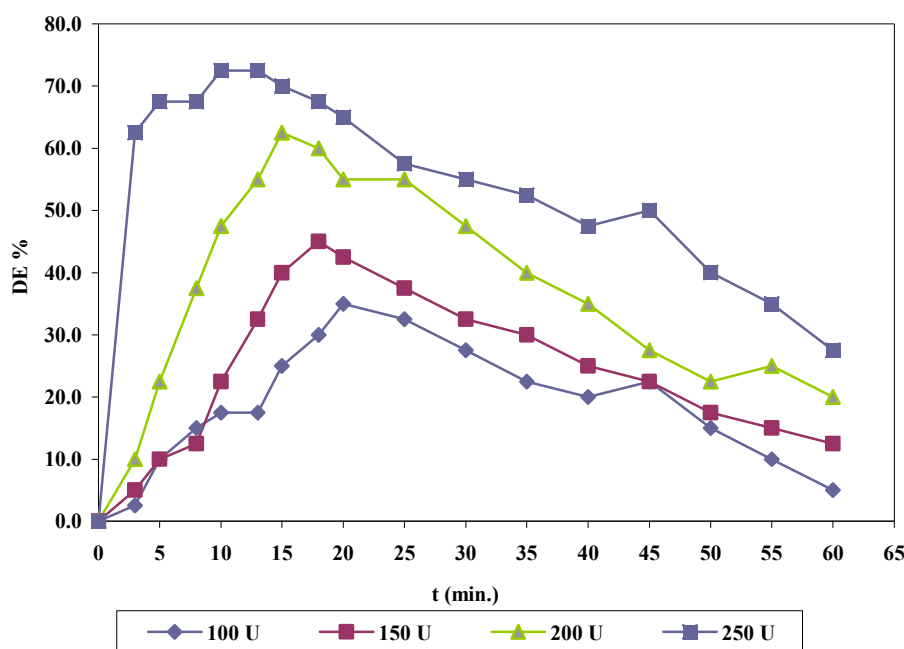
مقادیر بیشینه برای فعالیت‌های آنزیمی ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ واحد در حجم راکتور به ترتیب برابر با ۳۵٪ در ۲۰ دقیقه، ۴۵٪ در ۱۸ دقیقه، ۶۳٪ در ۱۵ دقیقه و ۷۳٪ در ۱۲ دقیقه می‌باشد.

در برخی از تحقیقات به اثر سمی بودن رنگینه بر روی فعالیت آنزیمی در غلظت‌های بیش از حد مناسب رنگینه اشاره شده است. در این شکل بیشینه حذف (حداکثر درصد رنگ‌زدایی) در مورد رنگینه ۲۰ ppm در زمان ۳ دقیقه با ۷۳ درصد، رنگینه ۴۰ ppm در زمان ۱۲ دقیقه با حدود ۷۳ درصد، رنگینه ۶۰ ppm در زمان ۱۵ دقیقه با ۶۴ درصد و رنگینه ۸۰ ppm در زمان ۱۰ دقیقه با ۵۲ درصد می‌باشد. این کم شدن درصد رنگ‌زدایی به علت کم بودن فعالیت آنزیمی در مقابل پیش ماده موجود (رنگینه) و یا اثر سمیت رنگینه بر روی فعالیت کاتالستی آنزیم می‌باشد.

با توجه به شکل ۵ متوجه می‌شویم که میزان درصد رنگ‌زدایی بیشینه در حالت رنگینه ۲۰ ppm کمی بیشتر از ۴۰ ppm است اما دامنه حفظ این درصد رنگ‌زدایی بالا برای رنگینه ۴۰ ppm بیشتر است. در خصوص اندازه گیری این دامنه در صورتیکه خطی افقی موازی با محور x (زمان) رسم شود به طوری که نمودارهای درصدهای رنگ‌زدایی ۲۰ و ۴۰ ppm را قطع کند، همواره طول پاره خط ایجاد شده در نمودار غلظت ۴۰ ppm بلندتر از طول پاره خط ایجاد شده در نمودار غلظت ۲۰ ppm می‌باشد. این مسأله به این معنا است که آنزیم



شکل ۵: درصد حذف رنگینه برای رنگینه سیاه راکتیو ۵ با غلظت‌های مختلف در HRT برابر با ۶۰ دقیقه، دمای محیط، فعالیت آنزیمی ۵ U/ml، غلظت آب اکسیژنه برابر با ۹۶،۱ mM و pH برابر ۸.



شکل ۶: درصد حذف رنگینه برای رنگینه سیاه راکتیو ۵ با غلظت ۴۰ ppm، HRT برابر با ۶۰ دقیقه، دمای محیط، غلظت آب اکسیژنه برابر با ۹۶،۱ mM، pH برابر ۸ و فعالیت‌های آنزیمی مختلف.

۳-۵- بررسی اثر رنگ‌زدایی پیوسته

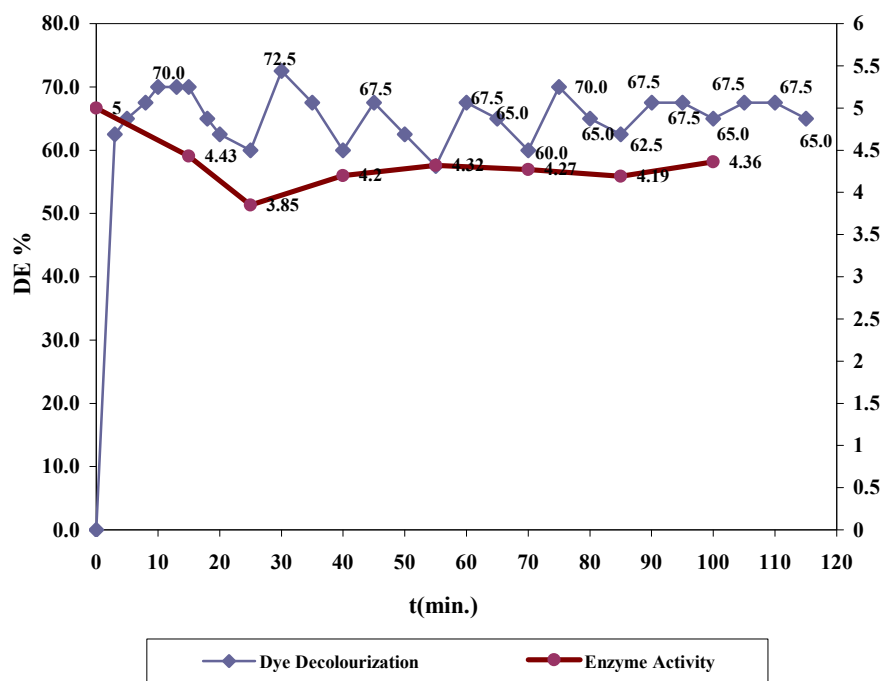
با افزودن آنزیم به صورت ناپیوسته در هر ۱۵ دقیقه، درصد رنگ‌زدایی بررسی گردید که نتایج آن در شکل ۷ آمده است. مشاهده شد که پس از ۷۵ دقیقه، منحنی رنگ‌زدایی تقریباً به صورت پایدار می‌باشد. در این شکل مشخص است که درصد رنگ‌زدایی پس از ۷۵ دقیقه به ۶۷،۵ رسید. اثر دیگری که در این شکل مشهود است میزان فعالیت آنزیمی می‌باشد که در حالت رنگ‌زدایی ثابت در بازه ۴،۱۹ تا ۴،۳۶ U/mL قرار دارد. لازم به ذکر است میزان فعالیت آنزیمی در محور عمودی سمت راست شکل ۷ قابل مشاهده است.

۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشخص شد که غلظت بهینه برای آب اکسیژنه با نرخ افزایش ۲،۴ ml/h برابر با ۹۶،۱ mM بود و غلظت‌های بیشتر از این مقدار باعث غیر فعال شدن آنزیم و ناکارآمد بودن فرآیند می‌شود. همچنین مشخص شد که غلظت اولیه رنگینه باید تا حد مشخصی زیاد شود تا از اثر سمی بودن غلظت‌های بیش از حد رنگینه بر روی فعالیت آنزیمی جلوگیری شود. غلظت بهینه رنگینه برای داشتن بیشترین بازده برابر با ۴۰ ppm بود. تأثیر pH محیط بر روی شرایط کاتالستی آنزیم موجود در واکنش می‌باشد.

در تمام شکل‌های ۳ تا ۶ نکته‌ای که به چشم می‌خورد این است که منحنی بازده رنگ‌زدایی دارای بیشینه می‌باشد. باید به این نکته توجه شود که علت این کاهش بازده برگشت پذیری فرآیند آنزیمی نمی‌باشد زیرا این فرآیند از ساز و کار تجزیه زیستی پیروی می‌کند. علت وجود این بیشینه این است که فرآیند تا پیش از این که به صورت پیوسته درآید (آزمایش مربوط به بخش بعد) به صورت افزایش ناپیوسته آنزیم در ابتدای فرآیند انجام می‌شده است. این افزایش یک مرتبه‌ای آنزیم در ابتدای فرآیند باعث می‌شود تا هنگامی که هریک از عوامل (به طور نمونه سنجش pH بهینه، غلظت رنگ، غلظت آب اکسیژنه و ...) به منظور بهینه‌سازی بررسی می‌شوند، منحنی دارای نقطه بیشینه شود زیرا آنزیم مدتی برای سازگاری و استفاده از رنگ به صورت پیش ماده در محیط نیاز دارد و هنگامی که رنگ‌زدایی شروع می‌شود ابتدا یک منحنی صعودی داریم. در ادامه فرآیند هنگامی که آنزیم مشغول رنگ‌زدایی است، مقداری از آنزیم موجود در محیط واکنش با جریان خروجی دفع می‌شود و مقداری از آن به شکل غیرفعال تبدیل می‌شود و بنابراین منحنی دارای روند نزولی می‌شود.

1- Biodegradation



شکل ۷: اثر فعالیت آنزیمی بر روی درصد رنگ‌زدایی بر حسب زمان.

برای رسیدن به یک فرآیند رنگ‌زدایی دوستدار محیط زیست و جلوگیری از تولید محصولات جانبی که روش‌های فیزیکی یا شیمیایی جهت رنگ‌زدایی تولید می‌کنند، باید به چارچوب شرایط بهینه عملیاتی آنزیم مورد نظر رسید که رسیدن به این شرایط خود نیازمند تحقیقات عمده و صرف هزینه زیادی می‌باشد. البته به مرور زمان و با سخت شدن مقررات زیست محیطی، این فرآیندها جایگاه اصلی خود را در میان فناوری‌های دیگر خواهد یافت.

چرخه کاتالیستی آنزیم CIP در pHهای بالاتر به خوبی انجام می‌شود. در این تحقیق بهترین pH برای رنگ‌زدایی توسط آنزیم محلول درون راکتور پیوسته برابر با ۸ بود که این مقدار pH مؤید تحقیقات دیگر می‌باشد [۲۸]. میزان فعالیت آنزیم موجود در محیط واکنش به طور مستقیم با افزایش بازده رنگ‌زدایی نسبت دارد و هرچه این میزان بیشتر باشد، بازده افزایش می‌یابد. ضمناً با افزایش فعالیت آنزیم، زمان رسیدن به بیشینه درصد رنگ‌زدایی کوتاه‌تر می‌شود. به طور کلی تمام این مقادیر در خصوص فرآیند رنگ‌زدایی آنزیمی مشخص می‌کند که

۵- مراجع

1. D. Wesenberg, I. Kyriakides, S. N. Agathos, White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22(2003), 161-187.
2. F. Rafii, W. Freankalin, C. E. Cerniglia, Azo-reductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1990), 2146-2151.
3. H. Zollinger, Color chemistry-syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. Weinheim, Wiley-VCH, New York, 1991.
4. R. Will, Y. Ishikawa, A. Leder, Synthetic dyes, chemical economics handbook: synthetic dyes. SRI Chemical & Health Business Services, Menlo Park (CA), (2000).
5. Y. Ishikawa, T. Esker, A. Leder, Chemical economics handbook: dyes. SRI Chemical and Health Business Services, Menlo Park (CA) (2000).
6. L. Levin, L. Papinutti, F. Forchiassin, Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *J. Bioresour. Technol.* 94(2004), 169-176.
7. A. A. Vaidya, K. V. Datye, Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibers. *Colourage*, 14(1982), 3-10.
8. C. Gon, I. Alves, A. Gomes, R. Bra's, M. I. A. Ferra, M. T. P. Amorim, R. S. Porter, Biological treatment of effluent containing textile dyes. *J. Soc. Dyers Colour.* 6(2000), 393-397.
9. K. T. Chung, S. E. Stevens, C. E. Cerniglia, The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit. Rev. Microbiol.* 18(1992), 175-90.
10. M. Joshi, R. Bansal, R. Purwar, Colour removal from textile effluents. *Indian J. Fibre Text. Res.* 29(2004), 239-59.

11. A. B. Dos Santos, F. J. Cervantes, S. B. Van Lier, Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour. Technol.* 98(2007), 2369-2385.
12. R. Tehrani-Bagha, N. M. Mahmoodi, M. Markazi, E. Talaei, Removal of a Cationic Dye from Wastewater by Low-cost Kaolin. *J. Color Sci. Tech.* 3(2009), 145-155.
13. G. Capar, U. Yetis, L. Yilmaz, Membrane based strategies for the pre-treatment of acid dye bath wastewaters. *J. Hazard. Mater.* 135(2006), 423-430.
14. H. Y. Shu, Degradation of dyehouse effluent containing C. I. Direct Blue 199 by processes of ozonation, UV/H₂O₂ and in sequence of ozonation with UV/H₂O₂. *J. Hazard. Mater.* 133(2006), 92-98.
15. C. G. Silva, W. Wang, J. L. Faria, Photocatalytic and photochemical degradation of mono-, di- and tri-azo dyes in aqueous solution under UV irradiation. *J. Photochem. Photobiol. A.* 181(2006), 314-324.
16. P. Kaushik, A. Malik, Fungal dye decolorization: Recent advances and future potential. *Environ. Int.* 35(2009), 127-141.
17. A. Paszczynski, M. B. Pasti-Grigsby, S. Goszczynski, R. L. Crawford, D. L. Crawford, Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl. Environ. Microbiol. Biotechnol.* 58(1992), 3598-3604.
18. K. Selvan, K. Swaninathan, K. Chae, Decolorization of azo dye and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelopora* sp. *Bioresour. Technol.* 88(2003), 115-119.
19. M. Mohorcic, S. Teodorovic, V. Golob, J. Fiedrich, Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths. *Chemosphere.* 63(2006), 1709-1717.
20. M. Tien, T. K. Kirk, Lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* 161(1988), 238-249.
21. B. Krajewska, Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme. Microb. Technol.* 35(2004), 126-139.
22. A. Kunz, P. Peralta-Zamora, S. G. Moraes, N. Dur'an, Novas tendências no tratamento de efluentes tóxicos. *química nova.* 25 (2002), 78-82.
23. H. R. Kariminiaae-Hamedani, A. Sakurai, M. Sakakibara, Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. *Dyes Pigm.* 72(2007), 157-162.
24. J. Putter, R. Becker, Peroxidases. in *Methods of Enzymatic Analysis.* H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, and M. Grabl, Editors. Weinheim, Verlag Chemie, 3rd ed. (1983). 286-293.
25. V. Yousefi, H. R. Kariminia, Statistical analysis for enzymatic decolorization of acid orange 7 by *Coprinus cinereus* Peroxidase. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64(2009), 245-252.
26. C. Wang, A. Yediler, D. Lienert, Z. Wang, A. Kettrup, Ozonation of an azo dye C. I. Remazol Black 5 and toxicological assessment of its oxidation products. *Chemosphere.* 52(2003), 1225-1232.
27. F. Zhang, J. S. Knapp, K. N. Tapley, Decolorization of cotton bleaching effluent with wood rotting fungus. *Water Resour.* 33 (1999), 919-928.
28. H. Wright, J. A. Nicell, Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenol. *Bioresour. Technol.* 70 (1999), 69-79.