وزارت علوم تحقیقات و فناوری
موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش

available online @ www.jcst.icrc.ac.ir
نشریه علمی- پژوهشی علوم و فناوری رنگ / ۷ (۱۳۹۲)، ۱۴۲- ۱۳۳

نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ
Journal of Color Science and Technology
www.jcst.icrc.ac.ir

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

فتح ا... غلامی بروجنی[۱]، فاطمه نجات‌زاده باراندوزی[۲]، امیرحسین محوی[۳*]

۱ـ استادیار، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، آذربایجان غربی، ایران، صندوق پستی:۵۷۵۶۱۱۶۱۱۱
۲ـ استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی خوی، آذربایجان غربی، ایران، صندوق پستی: ۵۷۱۵۹۳۴۶۳۴
۳ـ استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵
تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۱ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۲/۶/۲۰

چکیده

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

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

Detoxification of Dye from Industrial Wastewater by Immobilized Horseradish Peroxidase

F. Gholami-Borujeni[1], F. Nejatzadeh-Barandozi[2], A. H. Mahvi[*3]

[1] Department of Environmental Health, School of Health, Urmia University of Medical Sciences, P.O.Box: 5756116111, Urmia, Iran
[2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Khoy Branch, Islamic Azad University, P.O.Box:5715934634, Khoy, Iran
[3] School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, P.O.Box:14155-6446, Tehran, Iran
Received: 31-07-2012 Accepted: 19-02-2013 Available online: 10-06-2013

Abstract

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

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

***Corresponding author:** mahviami@tums.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱ـ مقدمه

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

فرآیندهای اکسیداسیون پیشرفته یکی از موثرترین فرآیندها در تجزیه ترکیبات مقاوم می‌باشند. از آنجا که معدنی‌شدن کامل ترکیبات مقاوم توسط این روش نیاز به زمان واکنش طولانی و غلظت بالای ماده اکسیدکننده دارد. این روش حذف نیز دارای محدودیت می‌باشد. تصفیه آنزیمی از دیرباز به دلیل مزایایی که نسبت به سایر روش‌های متداول تصفیه ترکیبات سمی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است [۳، ۴]. از مهم‌ترین آنزیم‌هایی که مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است پراکسیدازها می‌باشند. پراکسیدازها آنزیم‌های اکسید و احیایی می‌باشند که از برخی از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان تولید می‌شود [۵]، پراکسیداز آنزیمی است که به طور گسترده در طبیعت وجود دارد در واقع در تمامی ارگانیسم‌های سلولی گیاهان، مخمرها، جلبک‌ها، باکتری‌ها و جانوران وجود دارد. از جمله بیشترین مطالعاتی که روی این آنزیم‌ها صورت گرفته است مربوط به آنزیم استخراجی از ریشه‌های تربچه اسبی[1] بوده است. مهم‌ترین استفاده از این آنزیم‌ها در ساخت کیت‌های ایمنوهیستوشیمی و آنزیمی است. آنزیم پراکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌های خانواده اکسیدوردوکتازها بوده و با EC:1.11.1.7 مشخص می‌شوند، این آنزیم‌ها از هموپروتئین‌های گلیکو پروتئینی است که گروه پروستتیک آن حاوی پروتوپورفین Fe است. پراکسیدازها متعاقب فعال شدن با پراکسید هیدروژن می‌توانند بسیاری از مواد آروماتیک را اکسید کنند. این آنزیم‌ها واکنش‌های زیادی را کاتالیز می‌کنند ولی همه آنها نیاز دارند به پراکسیدازی مثل H_2O_2 دارند که فعال‌سازی شوند. H_2O_2 ابتدا آنزیم را اکسید کرده که در گردش اکسیداسیون سوبسترا کمک می‌کند [۹-۵]. سازوکار فعالیت آنزیم پراکسیداز در رابطه‌های۱ تا ۳ آمده است [۶]:

$$E + H_2O_2 \rightarrow Ei + H_2O \quad (۱)$$

$$Ei + AH_2 \rightarrow Eii + AH^* \quad (۲)$$

$$Eii + AH_2 \rightarrow E + AH^* + H_2O \quad (۳)$$

در این رابطه‌ها:

E: آنزیم، Ei: ترکیب میانی ۱،Eii: ترکیب میانی ۲، AH_2: ترکیب حلقوی و AH^0: رادیکال آزاد می‌باشد.

آنزیم با استفاده از H_2O_2 اکسید شده و به فرم ترکیب میانی فعال ۱ (Ei) تبدیل می‌شود این ترکیب نیز یک مولکول از ترکیب حلقوی را روی مکان فعال خود دریافت می‌کند و پس از واکنش، ترکیب حلقوی اکسید شده و یک رادیکال آزاد تولید می‌شود و وارد محیط واکنش شده و سپس ترکیب میانی ۲ تولید شده یک مولکول دیگر از ترکیب حلقوی را اکسید کرده و رادیکال آزاد دیگری را آزاد می‌کند و به شکل طبیعی خود برمی‌گرددو چرخه فعالیت آنزیم دوباره تکرار می‌گردد. در سال ۲۰۰۵، لای[2] به بررسی کاربرد HRP تثبیت شده در حذف پنتاکلروفنل از محیط های آبی پرداختند. در این مطالعه کاربرد آنزیم هورس رادیش پر اکسیداز تثبیت شده روی بسترهای شیشه‌ای آمینوپروپیل[3] متخلخل (APG) پرداخته شده است. طول عمر کاتالیستی یک آنزیم معمولا به صورت خاموشی آنزیم بیان می‌گردد [۱۰-۵]. خاموشی آنزیم مدت زمانی که طول می‌کشد تا آنزیم فعالیت کاتالیزوری خود را انجام دهد قبل از اینکه غیرفعال شود و به عبارت دیگر تعداد مولکول‌های تبدیل‌شده به وسیله یک مولکول آنزیم قبل از اینکه از بین برود [۸، ۷]. در مطالعه فوق نشان داده شده است که فعالیت آنزیم تثبیت شده پس از استفاده به طور محسوسی کاهش یافته است و یا آنزیم به سمت خاموشی رفته است.

با توجه به اینکه فرآیندهای تصفیه آنزیمی به صورت آنزیم آزاد قابلیت استفاده مجدد را از آنزیم سلب می‌کند، محققین به دنبال روش‌های تثبیت آنزیم بر روی بستر های مختلف می‌باشند. به منظور کاهش هزینه‌های تصفیه آنزیمی و کاربرد آنزیم تثبیت شده بر روی آلژینات کلسیم در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین در این تحقیق به بررسی کارایی سیستم کاتالیزور زیستی HRP استخراج شده از تربچه و H_2O_2 در پلیمریزاسیون رنگ‌های اسید آبی ۲۵ (AB-25) و اسید اورانژ ۷ (AO-7) از محلول‌های آبی پرداخته شد و همچنین سمیت محصولات حاصله با استفاده از روش‌های زیست آزمونی مورد بررسی قرار گرفت.

۲ـ بخش تجربی

۲ـ۱ـ مواد

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

1- Horseradish

2- Yi-chen Lai
3- Aminopropyl

Archive of SID
www.SID.ir

۲ـ۲ـ روش کار

۲ـ۲ـ۱ـ تثبیت آنزیم در پایه آلژینات

به منظور تثبیت آنـزیم HRP ابتـدا آلژینـات سـدیم در غلظـت (۵-۱) درصد وزنی به آرامی در آب مقطر حـل شـد تـا ژل مناسـب تـشکیل گردد. این عملیات در یک بشر ۲۵۰ میلی‌لیتری به وسیله یـک هـم‌زن مغناطیسی به مدت ۵ ساعت در دمای محیط انجام شـده اسـت. بعـد ساختن ژل آلژینات سدیم به منظور جداسازی حباب‌های ایجاد شده از یک میله شیشه‌ای استفاده شد و تمامی حباب‌هـا از محلـول ژلاتینـی رهاسازی شدند. ژل آماده شده در دمای اتاق به منظور همگن‌شدن بـا هم‌زن مغناطیسی به مدت ۵ ساعت به هم‌زده شد. سپس در دمـای ۴ درجه تا زمان استفاده نگهداری شد. برای تهیه کپـسول‌هـای آلژینـات کلسیم ابتدا مقـدار مشخـصی از آنـزیم HRP بـه همـراه غلظـت‌هـای مختلف کلرید کلسیم (۱،۲، ۳، ۴ و ۵ درصد وزنی) تهیه شده و مقدار مشخصی آنزیم خالص خریداری شده به آن اضافه شـد و سـپس ایـن محلول از فاصله ۱۰ سانتی‌متری بالای ژل آلژینات سـدیم تهیـه شـده فوق به صورت قطره به قطره با استفاده از یک سرنگ سیلیکونی اضافه شد و هم‌زمان با اسـتفاده از هـم‌زن مغناطیـسی (۲۰۰ دور در دقیقـه) به هم زده شد. بعد از ۲۰ دقیقه کپسول‌های ایجاد شده به وسـیله آب مقطر شستشو داده شده و از محلول جداسازی شدند. این کپـسول‌هـا برای استفاده در فرآیند حذف رنگ در محلول بافر فـسفات (pH=۷,۴) در دمای ۴ درجه نگهداری شدند [۱۳-۷]. متوسط قطر بیدهای شکیل شده در این روش ۴-۳ میلی‌متر بوده است.

۲ـ۲ـ۲ـ تعیین بازده آنزیم تثبیت شده

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

$$y=[(A-B)/A]*100 \qquad (۴)$$

که در این رابطه:

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

۲ـ۲ـ۳ـ بازده تثبیت آنزیم

به منظور بررسی راندمان تثبیت آنـزیم روی بـستر لازم اسـت غلظـت آنزیم را در محلول کلرید کلسیم و همچنـین بـستر تعیـین نمـود. بـه منظور بررسی غلظت آنزیم در کپسول‌های تشکیل شده، کپسول‌ها دو نیم شده و در محلول بافر فسفات (pH=۷,۴) قرار داده شـده بعـد از ۲ ساعت غلظـت آنزیمـی بـا اسـتفاده از روش سـنجش آنزیمـی تعیـین شد[۲]. بازده تثبیت آنزیم از تفاوت بین غلظت ابتدایی و انتهایی آنزیم گزارش شد.

۲ـ۲ـ۴ـ بررسی ریزش آنزیمی

به منظور بررسی ریزش آنزیمـی، کپـسول‌هـا در محلـول بـافر تـریس (pH=۸) به مدت ۱۸ ساعت نگهـداری شـدند و سـپس کپـسول‌هـا را جداسازی نموده و در محلـول بـافر فـسفات نگهـداری شـدند. غلظـت باقی‌مانده آنزیم در کپسول‌ها اندازه‌گیری شـده و تفـاوت بـین غلظـت اولیه و نهایی به عنوان درصد ریزش آنزیمی گزارش شده است[۶].

۲ـ۲ـ۵ـ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آزاد و محبوس شده

فعالیت آنزیم توسط روش رنگ‌سنجی با اسـتفاده از معـرف ۴- آمینـو آنتی پیرن، فنل و پراکسید هیدروژن به عنوان سوبسترا انجام شد. این روش در دمای ۲۵ درجه سلسیوس توسط اضافه‌کردن بافر فـسفات بـا pH برابر ۷,۴ که شامل: ۰,۰۱ مولار فنل، ۰,۰۰۲۴ مولار ۴-آمینو آنتی پیرن و ۰,۰۰۰۲ مولار پراکسید هیدروژن بود انجام شد و واحد آنزیمی برحسب یونیت آنـزیم بـر گـرم آلژینـات (U/g) محاسـبه شـده اسـت [۱۵-۸].

۲ـ۲ـ۶ـ محاسـبه (رنـگ) ADMI بـا اسـتفاده از دسـتگاه اسپکتروفوتومتر

روش ADMI روشی اسـت کـه توسـط انـستیتو تولیدکننـدگان رنـگ آمریکا پایه‌گذاری شد. توسط ایـن روش، مـی‌تـوان رنـگ نمونـه‌هـا را مستقل از ته‌رنگ آنها اندازه‌گیـری کـرد. اسـاس روش ADMI کـاربرد فرمول‌های آدامز نیکرسون است که روش اصلاح شده سیـستم مـنظم رنگ CIE جهت تعیین اختلاف رنگ یکنواخت می‌باشد. این معـادلات برای محاسبه یک عدد منفرد جهت مقادیر مختلف رنگ می‌باشـد. بـه عنوان مثال، اگر دو نوع رنگ A و B داشته باشیم که نـسبت بـه یـک شاهد (استاندارد)، سنجیده شوند، در صورتی که اختلاف رنگ هر دو از بیرنگی مشابه باشند، مقدار واحد رنـگ ADMI بـرای هـر دو یکـسان است. به عبارت دیگر این روش بر اسـاس تعیـین اخـتلاف رنـگ بـین نمونه ها و استاندارد می‌باشد. این روش می‌تواند جهت تعیین رنگ آبها و فاضـلاب‌هـای رنگـی کـه خـصوصیات رنـگ آنهـا بخـصوص از استانداردهای پلاتینیم- کبالت متفاوت باشد و همچنین آب و فاضلاب مشابه ته‌رنگ استاندارد ها به کار رود [۷، ۶]. که در این پژوهش از این روش به منظور بررسی بازده حذف رنگ استفاده شده است.

۲ـ۲ـ۷ـ مطالعه اثر غلظت آلژینات روی تثبیت آنزیم

غلظت‌های مختلف آلژینات (۴ ٪ m/v-۱) در فرآینـد تثبیـت آنزیمـی مـورد اسـتفاده قـرار گرفتـه اسـت. طـول عمـر رنگبـری آنـزیم HRP تثبیت‌شده روی آلژینات با آزمایشات پـی در پـی بـه منظـور بررسـی امکان استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده مورد بررسی قرار گرفـت. در

Archive of SID

www.SID.ir

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

۲ـ۲ـ۸ـ مطالعه سمیت محصولات تولیدی با استفاده از دافنیا مگنا

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

۳ـ نتایج و بحث

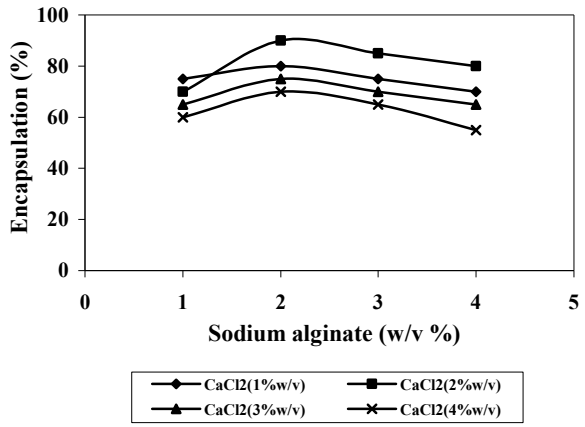
۳ـ۱ـ مطالعه ویژگی‌های آنزیم تثبیت شده

۳ـ۱ـ۱ـ بررسی اثر غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی بازده تشکیل کپسول

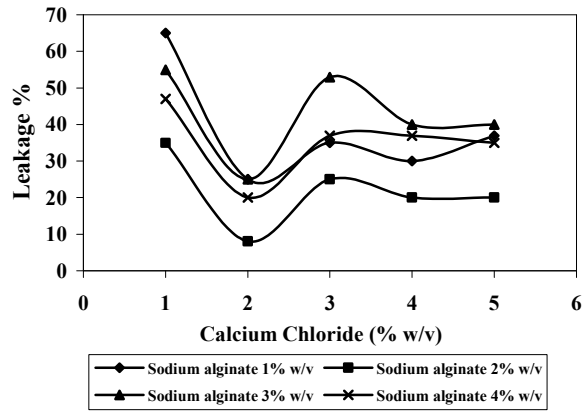
در شکل ۱ نتایج بررسی اثر غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی بازده تشکیل کپسول آورده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد در غلظت ۲٪ وزنی- حجمی کلرید کلسیم و آلژینات سدیم بیشترین بازده تشکیل کپسول دیده شده است و در غلظت‌های بیشتر و کمتر از آن بازده تشکیل کپسول به طور محسوسی کاهش یافته است.

۳ـ۱ـ۲ـ مطالعه اثر غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی ریزش آنزیمی

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



شکل۱: بررسی اثر غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم روی بازده تشکیل کپسول.



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

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

۳ـ۱ـ۳ـ مقایسه اثر pH بر فعالیت آنزیمی آنزیم تثبیت شده روی آلژینات و آزاد

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

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

Archive of SID

www.SID.ir

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

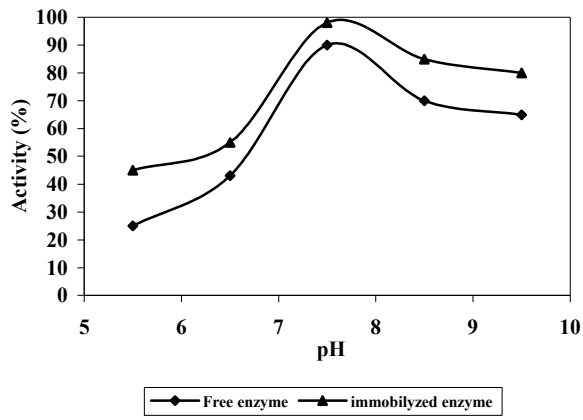
۳ـ۱ـ۴ـ مطالعه پایداری دمایی آنزیم تثبیت شده و آزاد

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

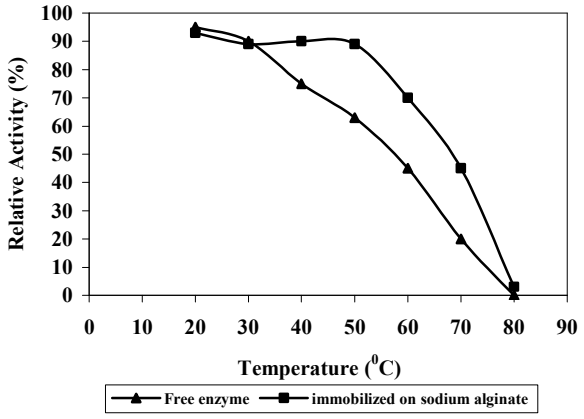
۳ـ۲ـ مطالعه حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت شده

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

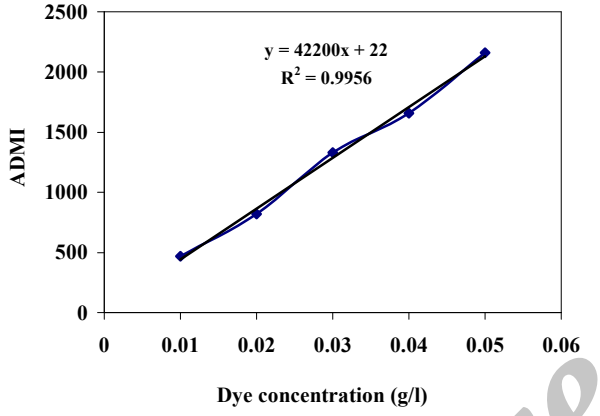
در رابطه‌های به دست آمده از شکل‌های فوق Y مقدار رنگ برحسب ADMI می‌باشد و X مقدار غلظت رنگ بر حسب گرم بر لیتر می‌باشد. با جایگذاری در فرمول می‌توان رابطه بین غلظت رنگ بر حسب میلی‌گرم بر لیتر و ADMI را به دست آورد.



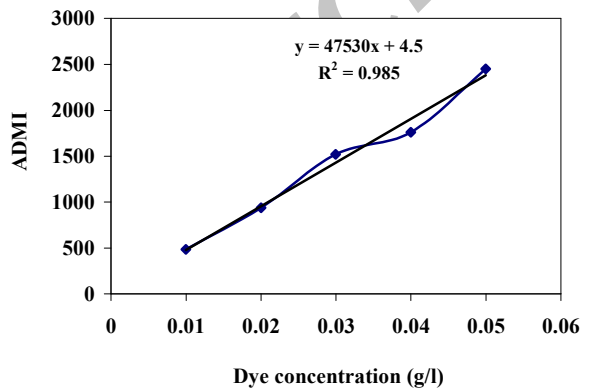
شکل ۳: مقایسه اثر pH بر فعالیت آنزیمی آنزیم تثبیت‌شده روی آلژینات و آزاد.



شکل ۴: مطالعه پایداری دمایی آنزیم تثبیت‌شده و آزاد.



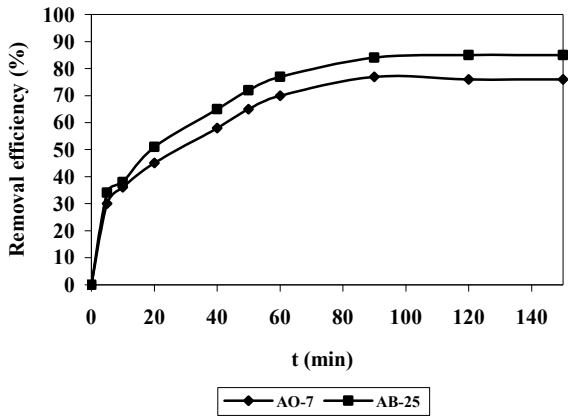
شکل۵: بررسی ارتباط بین غلظت رنگ اسید نارنجی ۷ برحسب ADMI و گرم بر لیتر.



شکل۶: بررسی ارتباط بین غلظت رنگ اسید آبی ۲۵ بر حسب ADMI و گرم بر لیتر.

Archive of SID

www.SID.ir



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

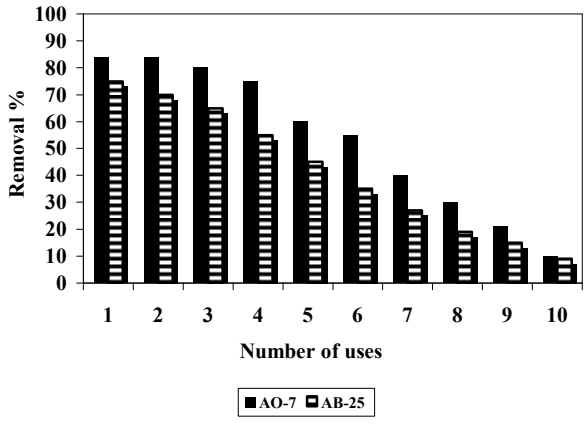
مطالعه حذف رنگ

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

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

۳ـ۳ـ مطالعه استفاده مجدد آنزیم تثبیت‌شده

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



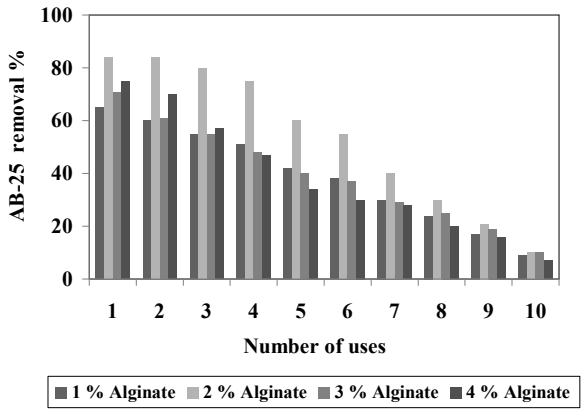
شکل ۸: مطالعه استفاده مجدد آنزیم تثبیت‌شده در حذف رنگ‌های اسید آبی ۲۵ و اسید نارنجی ۷.

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

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

۳ـ۴ـ مطالعه استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده در غلظت‌های مختلف آلژینات در حذف رنگ اسید آبی ۲۵ و اسید نارنجی ۷

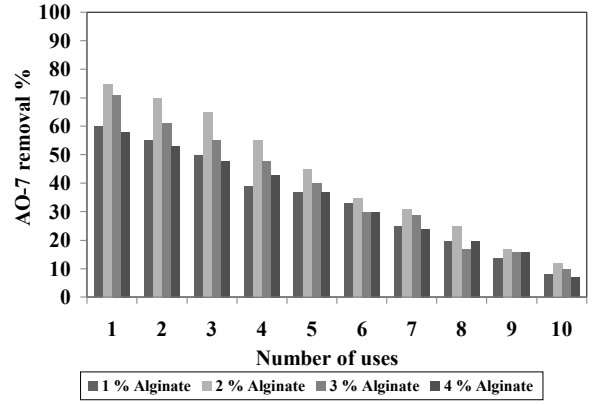
آنزیم تثبیت شده را می‌توان به راحتی جداسازی و برای بررسی فعالیت باقی‌مانده مجددا مورد بررسی قرار داد. برای نشان دادن این خاصیت، کپسول‌ها پس از گذشت زمان بهینه واکنش از محلول خارج شده و به طور کامل شسته شدند و برای استفاده مجدد در محلول حاوی رنگ قرار داد. تعداد چرخه مناسب برای استفاده مجدد از این کپسول‌ها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



شکل ۹: مطالعه استفاده مجدد آنزیم تثبیت‌شده در غلظت های مختلف آلژینات در حذف رنگ اسید آبی ۲۵.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱۰: مطالعه استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده در غلظت‌های مختلف آلژینات در حذف رنگ اسید نارنجی ۷.

۳ـ۵ـ مطالعه اثر غلظت آنزیم در حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت‌شده

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

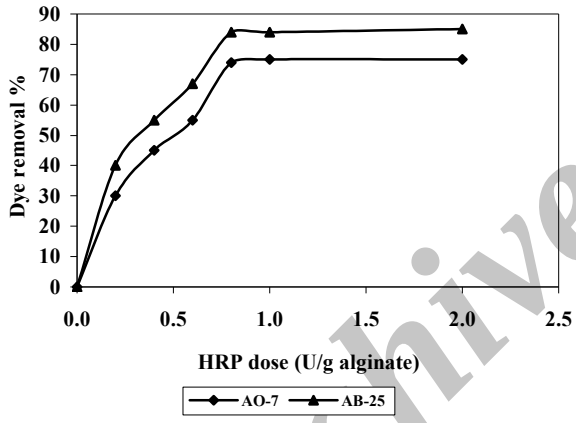
۳ـ۶ـ مطالعه اثر غلظت آب اکسیژنه در حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت‌شده

مطالعات برخی از محققین نشان داد که در نسبت‌های بهینه آنزیم/سوبسترا/آب اکسیژنه روی فعالیت آنزیمی تاثیر زیادی دارد. به همین منظور در این مطالعه به بررسی اثرغلظت آب اکسیژنه در حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت‌شده پرداخته شده است. نتایج این بخش در شکل ۱۲ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد در نسبت مولی آب اکسیژنه به رنگ برابر ۱,۲۵ حداکثر بازده حذف در هر دو رنگ دیده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که از نسبت مولی H_2O_2/dye برابر ۰,۵ تا ۱,۲۵ با افزایش این نسبت بازده حذف رنگ افزایش می‌یابد و از ۳۰٪ به ۷۳٪ برای رنگ اسید نارنجی ۷ و از ۴۰٪ به بیش از ۸۰ ٪ برای اسید آبی ۲۵ رسیده است. ولی پس از آن با افزایش این نسبت بازده حذف هر دو رنگ کاهش یافته است. این نتایج می‌تواند ناشی از اثر بازدارندگی آب اکسیژنه که باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد اضافی در محلول می‌شود و این رادیکال‌های آزاد با سایت‌های فعال آنزیم وارد واکنش می‌شوند و موجب غیرفعال‌شدن آنزیم می‌گردد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد نسبت بهینه H_2O_2/dye برای رسیدن به حد اکثر بازده حذف رنگ برابر ۱,۲۵ می‌باشد.

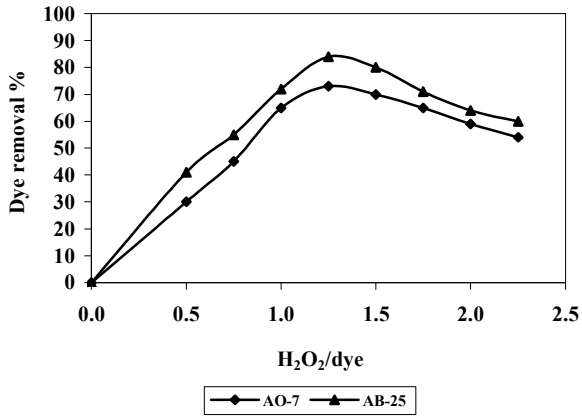
۳ـ۷ـ مطالعه سمیت رنگ با استفاده از دافنیا مگنا قبل و بعد از فرآیند تصفیه

۳ـ۷ـ۱ـ مطالعه سمیت آنزیم هورس رادیش پراکسیداز روی دافنیا مگنا

نتایج مطالعه سمیت آنزیم HRP استخراج شده روی دافنیا مگنا نشان می‌دهد LC_{50} در دوره انکوباسیون ۲۴h ، ۴۸ h و ۹۶h آنزیم HRP روی دافنیا مگنا برابر U/ml ۲۰ می‌باشد (شکل۱۳). از آنجا که غلظت آنزیم مورد استفاده در این مطالعه عموما کمتر از U/ml ۱ بوده است می‌توان نتیجه گرفت HRP نمی‌تواند روی نتایج حاصل از آزمون سمیت رنگ بعد از فرآیند آنزیمی تاثیرگذار باشد.



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



شکل۱۲: مطالعه اثر غلظت آب اکسیژنه در حذف رنگ با استفاده از آنزیم تثبیت‌شده.

Archive of SID

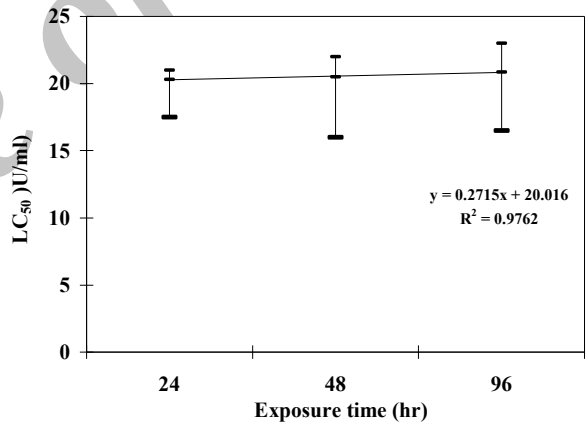
www.SID.ir

۳ـ۷ـ۲ـ مطالعه سمیت پراکسید هیدروژن روی دافنیا مگنا

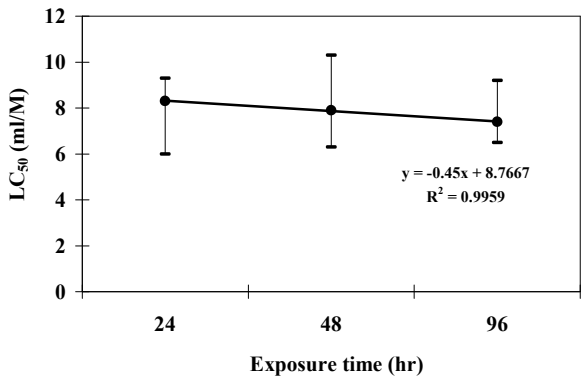
نتایج مطالعه سمیت آنزیم آب اکسیژنه روی دافنیا مگنا نشان میدهد LC_{50} در دوره انکوباسیون ۲۴h ، ۴۸ h و ۹۶h روی دافنیا مگنا برابر ۸ mM می‌باشد (شکل ۱۴). از آنجا که غلظت آب اکسیژنه مورد استفاده در این مطالعه عموما کمتر از ۱mM بوده است می‌توان نتیجه گرفت آب اکسیژنه نمی‌تواند روی نتایج حاصل از آزمون سمیت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

۳ـ۷ـ۳ـ سمیت آنزیم هورس رادیش پراکسیداز و پراکسید هیدروژن روی دافنیا مگنا بطور همزمان

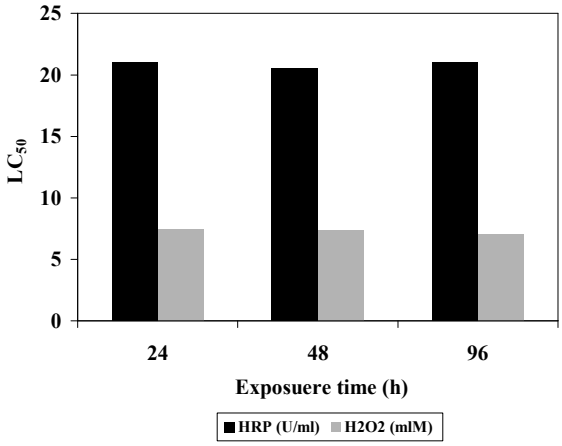
به منظور بررسی امکان ایجاد اثر تشدیدکنندگی و یا بازدارندگی هرکدام از عوامل واکنش روی میزان سمیت تولیدی به بررسی سمیت آنزیم هورس رادیش پراکسیداز و پراکسید هیدروژن روی دافنیا مگنا به طور همزمان پرداخته شده است (شکل ۱۵). بدین منظور از آب اکسیژنه و آنزیم به طور همزمان در بررسی اثر سمیت روی دافنیامگنا استفاده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



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



شکل ۱۴: سمیت پراکسید هیدروژن روی دافنیا مگنا.



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

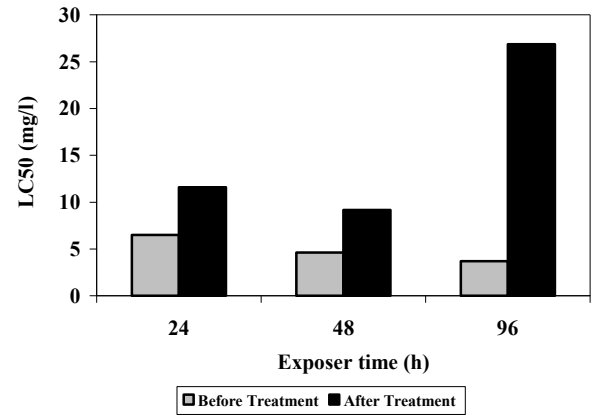
۳ـ۷ـ۴ـ مطالعه سمیت رنگ‌های مورد مطالعه قبل و بعد از واکنش آنزیمی

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

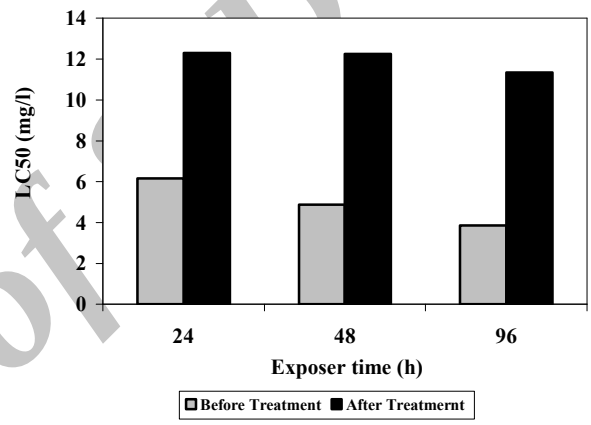
نتایج مطالعه سمیت حاصل از رنگ اسید آبی ۲۵ قبل از فرآیند تصفیه روی دافنیا مگنا که به منظور بررسی اثر تصفیه آنزیمی روی کاهش سمیت انجام شده است نشان می‌دهد غلظت کشنده (LC_{50}) ۲۴ h، ۴۸h و ۹۶ h بترتیب برابر ۶,۵، ۵ و ۴,۲ میلی‌گرم بر لیتر بوده است و بعد از فرآیند تصفیه غلظت کشنده (LC_{50}) ۲۴ h، ۴۸h و ۹۶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

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱۶: مطالعه سمیت رنگ AO-7 قبل و بعد از واکنش آنزیمی.



شکل۱۷: مطالعه سمیت رنگ AB-25 قبل و بعد از واکنش آنزیمی.

۴ـ نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد آنزیم تثبیت‌شده بر روی آلژینات کلسیم در غلظت ۲٪ وزنی ـ حجمی آلژینات سدیم و همچنین در غلظت ۱٫۵٪ وزنی ـ حجمی کلرید کلسیم دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بوده است. در این شرایط بازده حذف رنگ از پساب آلوده رنگی بیش از ۸۰٪ بوده است. شرایط بهینه حذف رنگ به ترتیب، pH برابر ۷٫۵، غلظت رنگ ADMI ۱۵۰۰، ۱ U/ml آنزیم هورس رادیش، زمان ماند ۶۰ دقیقه، غلظت آب اکسیژنه ۲ میلی مولار در دمای محیط بدست آمد. نتایج نشان داد که کپسول‌ها تا ده دوره با تغییر در فعالیت باقیمانده آنها همچنان قابل استفاده هستند.

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

۵ـ مراجع

1. V. Maddhinni, H. Vurimindi, A. Yerramilli, Degradiation of azo dye with Horseradish Proxidase (HRP). *J. Indian Inst. Sci.* 86(2006), 507-514.
2. A. H. Mahvi, M. Ghanbarian, K. Naddafi, N. M. Mahmoodi, Investigation of the toxicity reduction in reactive dye solution and real textile wastewater by nanophotocatalysis process. *J. Color Sci. Tech*. 1(2008), 91-96.
3. N. M. Mahmoodi, M. Arami, N. Y. Limaee, Photocatalytic degradation of triazinic ringcontaining azo dye (Reactive Red 198) by using immobilized TiO_2 photoreactor: Bench scale study. *J. Hazard Mater*. 133(2006), 113-118.
4. R. Fernandez-Alba, D. Hernando, A. Agüera, J. Cáceres, S. Malato, Toxicity assays: A way for evaluating AOPs efficiency. *Water Res*. 36(2002), 4255-4262.
5. F. Gholami-Borujeni, A. H. Mahvi, S. Nasseri, M. A. Faramarzi, R. Nabizadeh, M. Alimohammadi, Enzymatic treatment and detoxification of acid orange 7 from textile wastewater. *Appl Biochem Biotechnol*. 165(2011), 1274-1284
6. F. Gholami-Borujeni, A. H. Mahvi, S. Nasseri, M. A. Faramarzi, R. Nabizadeh, M. Alimohammadi, Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution. *Res J. Chem. Environ*. 15(2011), 217-222.
7. I. Alemzadeh, S. Nejati, S. Motamed, Phenol removal by immobilized horseradish peroxidase. *Wat. Wastewat*. 2 (2011), 2-9.
8. Y. C. Lai, S. C. Lin. Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p chlorophenol from aqueous solution. *Process Biochem*. 40(2005), 1167-1174.
9. C. Linqiu, Carrier bound immobilized enzymes. Wiley, Germany, Parmar A, Roos EC, de vroom E :Penicillin acylase In the industrial production of β- lactam antibiotics. *Org process Rev. Dev*. 2(2005), 128-133.
10. E. Torres, I. Bustos-Jaimes, S. Le Bogne. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B*. 46(2003), 1-15.
11. C. A. M. Portugal, J. C. Lima. Crespo, Probing the change of enzymatic activity of horseradish peroxidase induced by membrane permeation using tryptophan fluorescence. *J. Membrane Sci.* 284(2006), 180-192.
12. K. Nazari, N. Esmaeili, A. Mahmoudi, H. Rahimi, A. A.

Archive of SID

www.SID.ir

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

Archive of SID

www.SID.ir