ORIGINAL ARTICLE

Efficacy of Horseradish Peroxidase (HRP) Enzyme Process and H_2O_2 in Removal of Linear Alkyl Benzene Sulfonate (LAS) from Aqueous Solution

Fathollah Gholami-Borujeni[1, 2],
Fatemeh Nejatzadeh[3],
Mostafa Jamalan[4]

[1] Abadan School of Medical Sciences, Abadan, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, Health Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Agriculture, Islamic Azad University, Khoy Branch, Khoy, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Biochemistry, Abadan School of Medical Sciences, Abadan, Iran

(Received August 28, 2017 Accepted December 26, 2017)

Abstract

Background and purpose: Enzymatic treatment, due to various benefits, has attracted many researchers since long time ago. Anionic detergents are one of the largest families of detergents that entered into the environment in recent decades. This study investigated the effect of horseradish peroxidase enzyme process on the removal of linear alkaline benzyl sulfonate (LAS) from aqueous solutions.

Materials and methods: In an experimental study on a laboratory scale and in a batch reactor, the enzyme extracted from horseradish root was applied for removal of anionic detergent. Variables such as enzyme concentrations (0.5-2 U/mL), H_2O_2 (0.5-4 mg/l), detergent concentration (100-500 mg/L), and 0-60 min contact time were examined. Effluent concentration of detergent was measured according to the methylene blue method and spectrophotometric in 652 nm wavelength. At the end, kinetics of reactions were also studied.

Results: The enzymatic activity of the extract from horseradish root was 3.15 U/mL, and had the highest activity at neutral pH. Removal efficiency was 98% in optimum condition (enzyme concentration 1.5 U/mL, H_2O_2 2 mg/L, pH 7.5, and 250 mg/l detergent). Gradual addition of reactants (enzyme and H_2O_2) increased the removal efficiency to 99.5%. The order of reaction of the enzymatic reaction followed the first-order reaction. The correlation coefficient (R^2) was higher than 0.99 and mean constant reaction speed was 0.721 mol $L^{-1}min^{-1}$ ($P\geq0.05$).

Conclusion: Enzymatic treatment by horseradish peroxidase can be used as an environmental friendly method in removal of pollutants such as surfactants.

Keywords: enzyme, horseradish peroxidase, anionic detergent, linear alkyl benzyl sulfate

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (157): 217 - 229 (Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۷ بهمن سال ۱۳۹۶ (۲۲۹ - ۲۱۷)

بررسی کارایی فرایند آنزیمی هورس رادیش پراکسیداز (HRP) و آب اکسیژنه در حذف آلکیل بنزیل سولفونات خطی (LAS) از محیط های آبی

فتح اله غلامی بروجنی[۱و۲]
فاطمه نجات زاده[۳]
مصطفی جمالان[۴]

چکیده

سابقه و هدف: تصفیه آنزیمی از دیر باز به دلیل مزایای زیاد مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. درترجنت‌های آنیونی یکی از بزرگ‌ترین خانواده شوینده‌ها می‌باشند که در دهه‌های اخیر وارد محیط زیست شده است. در این پژوهش به بررسی کارایی فرایند آنزیمی هورس رادیش پراکسیداز (HRP) در حذف آلکیل بنزیل سولفونات خطی (LAS) از محیط‌های آبی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه تجربی در مقیاس آزمایشگاهی و در یک راکتور ناپیوسته، آنزیم استخراج شده از ریشه هورس رادیش در فرایند حذف آنزیمی درترجنت آنیونی مورد بررسی قرار گرفت. جهت مطالعه کارایی فرایند متغیرهای غلظت آنزیمی (U/mL ۲-۰/۵)، آب اکسیژنه (mg/L ۴-۰/۵)، غلظت درترجنت (mg/L ۵۰۰-۱۰۰) و زمان ۶۰-۰ دقیقه بوده است و غلظت درترجنت خروجی فرایند با روش متیلن بلو و اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۵۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و در نهایت سینتیک واکنش مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: فعالیت آنزیمی عصاره استخراج شده از ریشه هورس رادیش U/mL ۱۵/۳بوده است و در pH خنثی بالاترین فعالیت را از خود نشان داد. در شرایط بهینه به دست آمده (غلظت آنزیم U/mL ۱/۵، آب اکسیژنه mg/L ۲، pH=۷/۵ و غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر درترجنت آنیونی) راندمان حذف درترجنت آنیونی ۹۸ درصد بوده است. اضافه نمودن تدریجی واکنشگرها (آنزیم و آب اکسیژنه) منجر به افزایش راندمان (۹۹/۵ درصد) شده است. مرتبه واکنش آنزیمی از واکنش درجه یک تبعیت بیش‌تری داشت. ضریب همبستگی (R^2) بالای ۰/۹۹ و میانگین ثابت سرعت واکنش برابر ۰/۷۲۱ بر لیتر در دقیقه بوده است ($p\text{-value}\geq 0.05$).

استنتاج: فرایند تصفیه آنزیمی با استفاده از هورس رادیش پراکسیداز می‌تواند به عنوان یک روش دوستدار محیط زیست در حذف آلاینده‌هایی مانند درترجنت‌ها از محیط‌های آبی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آنزیم، هورس رادیش پراکسیداز، درترجنت آنیونی، آلکیل بنزیل سولفونات خطی

مقدمه

سورفاکتانت‌ها یکی از مواد مقاوم به تجزیه بیولوژیکی موجود در فاضلاب‌های شهری و صنایع مختلف مانند صنایع غذایی، پلیمرسازی، کاغذی، بازیافت روغن، داروسازی، چرم سازی، نساجی و رنگرزی و ... هستند که در چند دهه اخیر به دلیل رشد سریع فناوری‌های صنعتی و استفاده بیش از حد از

مولف مسئول: فتح اله غلامی بروجنی- ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده بهداشت Email: gholami_b_f@yahoo.com
۱. دانشکده علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران
۲. استادیار، گروه بهداشت محیط، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوی، خوی، ایران
۴. استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۶/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۹/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۱۰/۵

Archive of SID
www.SID.ir

سورفکتانت‌های مصنوعی در مصارف خانگی و صنعتی وارد محیط زیست شده و منجر به آلودگی اکوسیستم‌های مختلف شده است(۱،۳). صنایع نساجی به تنهایی بیش از ۱۰ درصد از سورفکتانت‌های تولیدی را در جهان مصرف می‌کنند و پساب تولیدی این صنایع دارای غلظت بالایی از سورفکتانت‌ها می‌باشد. سورفکتانت‌ها به چهار دسته کاتیونی، آنیونی، غیریونی و آمفوتریک تقسیم بندی می‌گردند(۳،۵). مطالعات و گزارشات مختلف نشان می‌دهد سورفکتانت‌های آنیونی از پرکاربردترین گروه پاک‌کننده‌ها می‌باشند و در بین این ترکیبات آلکیل، بنزن سولفونات خطی (LAS) حدود ۲۷ درصد از کل دترجنت‌ها (۲/۵ میلیون تن در سال) را تشکیل می‌دهند. مطالعات مختلف غلظت LAS را در فاضلاب شهری بین ۳ الی ۲۱ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند، در واقع حدود ۸۵ درصد از LAS در دترجنت‌های خانگی استفاده می‌شود که کاربردهای آن شامل پودرهای لباسشویی، مایع ظرفشویی و دیگر پاک کننده‌های خانگی می‌باشد. از دیگر کاربردهای آن دترجنت‌های صنعتی، سازمان‌ها و تجاری می‌باشد، اگرچه LAS هم‌چنین می‌تواند به عنوان عامل امولوسیون کننده در کاربردهای صنعتی (مثل آفت کش‌های کشاورزی، جوهر پرینت، رنگ‌های نقاشی و صنایع غذایی و آرایشی) نیز استفاده شود(۱،۳). سورفکتانت‌ها دارای اثرات سوء بر انسان، آبزیان و گیاهان دارند. تخلیه این آلاینده‌ها به منابع آبی منجر به ایجاد لایه سطحی و کف شده که انتقال اکسیژن را به این محیط‌ها محدود می‌سازد. هم‌چنین در فرایندهای مختلف تصفیه فاضلاب ایجاد اختلال می‌نمایند و اثرات کوتاه مدت و بلندمدتی بر روی اکوسیستم‌های آبی دارند. به همین خاطر نهادهای قانونگذار استانداردهای سختگیرانه‌ای برای سورفکتانت‌های آنیونی قرار داده‌اند مثلاً حداکثر غلظت ۰/۵ mg/L برای آب شرب و ۱ mg/L برای سایر مصارف در نظر گرفته شده است(۴). روش‌های مختلفی برای حذف سورفکتانت‌ها از محیط‌های آبی مورد مطالعه قرار گرفته است که از جمله این روش‌ها می‌توان به روش‌های اکسیداسیون شیمیایی و الکتروشیمیایی(۶)، فیلتراسیون، ترسیب شیمیایی، تجزیه فتوکاتالیستی، جذب سطحی، روش‌های مختلف بیولوژیکی و ... اشاره کرد(۱،۳،۷،۹).

فرایندهای تصفیه آنزیمی به دلیل مزایایی مانند کارایی بالای آنزیم‌ها در حذف ترکیبات مقاوم به تجزیه بیولوژیکی - بهره برداری در غلظت پایین و بالای آلاینده - بهره برداری در رنج بالای pH و دما - بهره برداری در شرایط شوک‌های غلظت و دبی - کاهش حجم لجن تولیدی - سهولت کنترل فرایند - سرعت بالای واکنش نسبت به سایر روش‌های متداول تصفیه ترکیبات سمی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. 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(۱۵،۱۰،۲). بیش‌ترین مطالعاتی که روی این آنزیم‌ها صورت گرفته است، مربوط به آنزیم استخراجی از ریشه‌های Horseradish است(۱۵،۱۳،۱۱). 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 به پراکسیدازی مثل H_2O_2 دارند که فعال سازی شوند. آب اکسیژنه ابتدا آنزیم را اکسید کرده که در گردش اکسیداسیون سوبسترا کمک می‌کند. مکانیزم فعالیت آنزیم پراکسیداز به شکل زیر می‌باشد:

$$E + H_2O_2 \rightarrow Ei + H_2O \quad (1)$$
$$Ei + AH_2 \rightarrow Eii + AH^* \quad (2)$$
$$Eii + AH_2 \rightarrow E + AH^* + H_2O \quad (3)$$

در این فرمول‌ها: E: آنزیم، Ei: ترکیب میانی ۱، Eii: ترکیب میانی۲، AH2: ترکیب حلقوی، AH*: رادیکال

Archive of SID
www.SID.ir

آزاد می‌باشند. 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 سایت 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 فرم طبیعی خود برمی‌گردد و چرخه فعالیت آنزیم دوباره تکرار می‌گردد(۱۶، ۱۵، ۱۳، ۱۲). مطالعات زیادی در خصوص کاربرد روش تصفیه آنزیمی با استفاده از آنزیم هورس رادیش پراکسیداز در حذف ترکیباتی مانند رنگ، روغن، ترکیبات فنلی و ... انجام شده است که از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعات عالم زاده و همکاران در حذف فنل، محوی و همکاران در حذف رنگ و روغن(۱۳، ۱۲)، Liu و همکاران در حذف رنگ با استفاده از آنزیم اصلاح شده(۱۷)، مطالعات اشرفی و همکاران در کاربرد آنزیم لکازدر حذف ترکیبات رنگی(۱۹، ۱۸)، کاربرد لکاز در حذف ۲ و ۴ دی نیترو فنل توسط دهقانی فرد و همکاران اشاره کرد(۲۰). بررسی منابع نشان می‌دهد کاربرد تصفیه آنزیمی در حذف سورفکتانت‌ها از محیط‌های آبی بسیار محدود بوده است. چرخه واکنش آنزیمی هورس رادیش پراکسیداز (معادله ۳-۱) نشان می‌دهد این آنزیم در حضور آب اکسیژنه می‌تواند ترکیبات حلقوی را اکسید و پلیمریزه کند(۱۶). آلکیل بنزن سولفونات خطی نیز دارای یک حلقه آروماتیک سولفوناته می‌باشد (۲۱) که امکان استفاده از هورس رادیش پراکسیداز در پلیمریزاسیون این ترکیب وجود دارد. هم‌چنین با توجه به به این که مطالعات انجام شده عمدتاً بر روی آنزیم خالص خریداری شده از مراکز صنعتی می‌باشد، در مرحله توجیه اقتصادی با نواقصی مواجه شده‌اند(۱۳). استخراج آنزیم از منابع مختلف (قارچ‌ها و گیاهان) برای تصفیه فاضلاب‌های آلوده مورد بررسی قرار گرفته است اما گیاهان پایه پراکسیداز مثل Horseradish برای حذف ترکیبات آلاینده، زیاد مورد توجه محققان قرار نگرفته است(۲۲). در این تحقیق به بررسی کارایی سیستم بیوکاتالیستی HRP(Horseradish Peroxidase) استخراج شده از تربچه کوهی (هورس رادیش) و H_2O_2 در اکسیداسیون دترجنت آنیونی (LAS) الکیل بنزن سولفونات خطی از محلول‌های آبی پرداخته شده است.

مواد و روش ها

استخراج عصاره HRP

به منظور استخراج منبع آنزیمی، ۵۰۰ گرم از تربچه هورس رادیش که از میدان تره بار خریداری شده بود، پس از تمیز کردن با استفاده از خرد کن و اضافه کردن بافر استات و سانتریفوژ کردن در rpm ۱۰۰۰۰به مدت ۶ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری شد. به منظور جداسازی آنزیم HRP به صورت ناخالص مواد ته نشین شده با استفاده از بافر استات (pH=4.5) M ۰/۱در ۴ درجه سانتی گراد سه بار به مدت ۳ ساعت انجام شد. عصاره استخراج شده به منظور تخلیص بیش‌تر با استفاده از فیلتر KD ۱۲ و بافر استات(pH =۴/۵)و در ۴ درجه سانتی‌گراد صاف سازی شدو تا قبل از استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد(۲۴، ۲۳، ۱۳).

سنجش فعالیت آنزیمی(Enzyme activity assay)

به منظور سنجش فعالیت آنزیمی از روش ۴-آمینو آنتی پیرن و رنگ سنجی استفاده شد. در این روش از ۴-آمینو آنتی پیرن به عنوان کروموژن و از فنل و آب اکسیژنه به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود. سنجش آنزیمی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با اضافه کردن بافر فسفات (pH=7.4) به محلولی دارای ۱×۱۰^{۲} مول فنل و $۲/۴\times۱۰^{۳}$ مول ۴-آمینو آنتی پیرن و ۲×۴^{-۱۰} مول آب

Archive of SID
www.SID.ir

اکسیژنه انجام شد. میزان جذب نور مواد رنگی تولید شده در ۵۱۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر-UV Visibleساخت UNICO امریکا اندازه‌گیری شد و میزان فعالیت آنزیم موجود در عصاره استخراجی بر حسب units/ml محاسبه شده است(۲۲، ۱۶، ۱۵). بر این اساس هر واحد فعالیت آنزیم هورس رادیش پراکسیداز، مقدار آنزیمی است که یک میکرومول فنل را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۷/۴ اکسید می‌کند. نتایج فعالیت آنزیمی در pH های مختلف در یک دوره زمانی ۱۲۰-۰ دقیقه در نمودار شماره ۱ آورده شده است. محاسبه فعالیت ویژه آنزیمی فعالیت آنزیم را بر حسب Unit/ml بر میزان پروتئین کل بر حسب mg/ml تقسیم می‌کنیم تا فعالیت ویژه آنزیمی به دست آید. غلظت کل پروتئین طبق روش برادفورد محاسبه شد(۲۴، ۱۹).

دامنه متغیرهای مورد مطالعه

دترجنت آنیونی در دامنه غلظت ۵۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، عصاره آنزیمی در دامنه فعالیت ۰/۵ الی ۲ یونیت بر میلی‌لیتر، آب اکسیژنه در دامنه غلظت ۰/۵ الی ۴ میلی‌گرم در لیتر و آزمایشات در سه سطح pH اسیدی، خنثی و قلیایی در زمان‌های تماس ۰ الی ۶۰ دقیقه انجام شد. اندازه‌گیری دترجنت آنیونی(LAS) توسط روش ماده فعال متیلن بلو (MBAS) طبق روش ۵۵۴۰ C.در کتاب استاندارد متد صورت گرفت [۱, ۲۱, ۲۵, ۲۶]. منحنی استاندارد در نمودار شماره ۲ آورده شده است. تمامی موارد مصرفی دارای گرید آزمایشگاهی بوده و از نمایندگی شرکت‌های مرک و سیگما آلدریچ در ایران خریداری و مورد استفاده قرار گرفتند.

تمامی آزمایشات در دمای محیط و به روش ناپیوسته در ارلن آزمایشگاهی انجام شد و به منظور یکنواخت سازی محیط آزمایش از همزن آزمایشگاهی استفاده شد. تمامی آزمایشات با دو بار تکرار و محاسبه میانگین داده‌ها به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شده است.

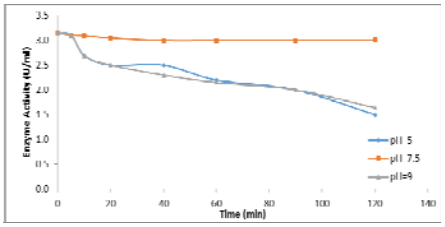
برای تعیین سینتیک واکنش‌ها در شرایط بهینه برای واکنش درجه صفر نمودار غلظت (C) در برابر زمان واکنش، واکنش درجه یک (ln C) در برابر زمان و واکنش و درجه دو (1/C) در برابر زمان واکنش با استفاده از اکسل ترسیم گردید و ضریب رگرسیون (R^2) و K_0 برای هر کدام از معادلات محاسبه شد.

جهت تعیین ارتباط بین پارامترهای مختلف از آنالیز رگرسیون خطی و تعیین ضریب همبستگی استفاده شد. تمامی آنالیزها با استفاده از نرم افزار SPSS و ترسیم نمودارها با Microsoft Excel انجام شد.

یافته ها

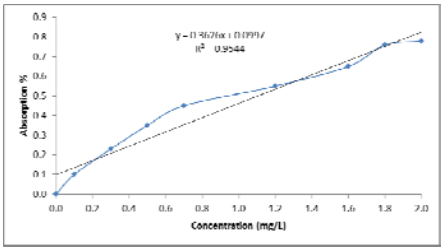
نتایج فعالیت آنزیمی

با توجه به این که آزمایشات در دمای آزمایشگاهی (۲۵ درجه سانتی گراد) انجام شد، فعالیت آنزیمی عصاره استخراج شده در شرایط آزمایشگاهی و pHهای مختلف در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه مورد سنجش قرار گرفت. نتایج فعالیت آنزیمی نشان داد عصاره استخراج شده دارای فعالیت اولیه ۱۵/۳ Unit/ml بوده است. تغییرات فعالیت آنزیمی در شرایط آزمایشگاهی مختلف در نمودار شماره ۱ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد کم‌ترین تغییر در فعالیت آنزیمی در pH خنثی ایجاد شده است، با افزایش و کاهش pH، فعالیت آنزیمی کاهش یافته است. بنابراین در ادامه آزمایشات به منظور حفظ فعالیت آنزیمی در طول انجام واکنش، pH در محدوده خنثی تنظیم شده است.



نمودارشماره ۱: بررسی تغییرات فعالیت آنزیم هورس رادیش پراکسیداز استخراج شده در pH های مختلف در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه

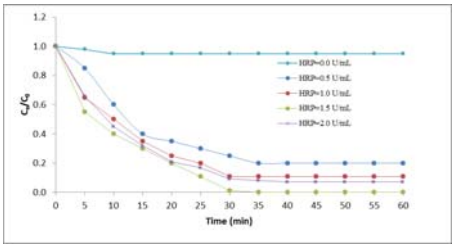
Archive of SID
www.SID.ir



نمودار شماره ۲: منحنی کالیبراسیون درجنت آنیونی مورد استفاده در پژوهش

بررسی اثر غلظت آنزیمی در حذف درجنت

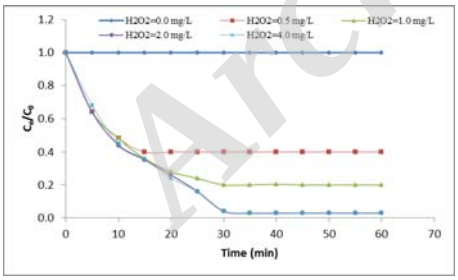
به منظور بررسی اثر دامنه غلظت آنزیم (۰/۵ تا ۲ یونیت بر میلی لیتر) در فرایند حذف درجنت، آزمایشات در مدت زمان ۶۰ دقیقه در مقیاس ناپیوسته با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر درجنت آنیونی در pH برابر ۷/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر آب اکسیژنه در دمای آزمایشگاه انجام شده است و در فواصل مختلف زمانی، اقدام به نمونه برداری و اندازه‌گیری غلظت درجنت با استفاده از روش اسپکتروفتومتری شده است. نتایج آزمایشات در نمودار شماره ۳ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت آنزیم، فرایند حذف درجنت افزایش یافته تا حداکثر راندمان در غلظت ۱/۵ یونیت بر میلی لیتر آنزیم رسیده است و بعد از آن با افزایش غلظت آنزیمی، راندمان حذف کاهش یافته است. زمانی که در محیط واکنش فقط از آب اکسیژنه استفاده شده است و غلظت آنزیمی صفر بوده است، درصد کمی از درجنت (۵ درصد) به دلیل فعالیت اکسیداسیونی آب اکسیژنه ایجاد شده است که در سایر نتایج امکان این اثر تداخلی در نظر گرفته شده است.



نمودار شماره ۳: اثر غلظت آنزیمی در حذف درجنت آنیونی (غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر، pH ۷/۵=آب اکسیژنه ۲ میلی گرم بر لیتر)

بررسی اثر غلظت آب اکسیژنه در حذف درجنت

به منظور بررسی اثر غلظت آب اکسیژنه در حذف درجنت آنیونی، آزمایشات در شرایطی که غلظت درجنت آنیونی ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت آنزیم ۱/۵ U/ml، pH برابر ۷/۵ و غلظت متغیر آب اکسیژنه ۰/۵ الی ۴ میلی گرم در لیتر در دمای آزمایشگاهی بود، انجام شد و در فواصل مختلف زمانی اقدام به نمونه برداری و اندازه‌گیری غلظت درجنت با استفاده از روش اسپکتروفتومتری گردید. نتایج آزمایشات در نمودار شماره ۴ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد زمانی که آب اکسیژنه در محیط واکنش وجود ندارد، آنزیم هورس رادیش پراکسیداز به تنهایی قادر به فعال سازی نمی باشد و هیچ تاثیری بر روی درجنت در محیط واکنش نداشته است. با افزایش غلظت آب اکسیژنه از ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تا ۲ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ دقیقه، راندمان حذف درجنت افزایش یافته و به ۹۸ درصد می‌رسد.



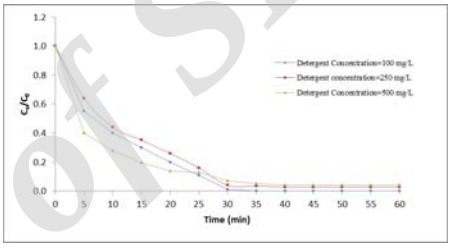
نمودار شماره ٤: اثر غلظت آب اکسیژنه برفرایند اکسیداسیون آنزیمی درجنت آنیونی (غلظت درجنت ۲۵۰mg/L، pH=۷/۵ ، غلظت آنزیم ۱/۵U/mL)

بررسی اثر غلظت درجنت بر راندمان حذف

به منظور بررسی اثر غلظت درجنت بر راندمان فرایند آنزیمی، در شرایطی که پارامترهایی مانند غلظت

Archive of SID
www.SID.ir

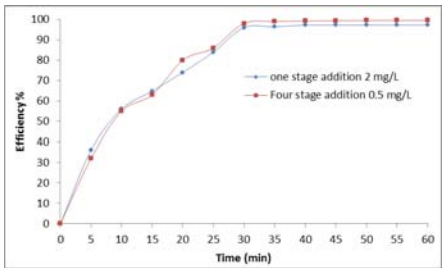
آنزیم ۱/۵ U/mL، آب اکسیژنه ۲ mg/L و pH = ۷/۵ تنظیم شد، فرایند اکسیداسیون آنزیمی در غلظت‌های مختلف دترجنت آنیونی (۱۰۰-۵۰۰mg/L) مورد بررسی قرار گرفت. فرایند در دمای آزمایشگاهی انجام شد و در فواصل مختلف زمانی اقدام به نمونه‌برداری و اندازه گیری غلظت دترجنت با استفاده از روش اسپکتروفتومتری شده است. نتایج این آزمایشات در نمودار شماره ۵ آورده شده است. با افزایش غلظت دترجنت آنیونی و ثابت بودن غلظت آب اکسیژنه به عنوان فعال‌ساز واکنش آنزیمی و غلظت آنزیم، راندمان حذف کاهش یافته است.



نمودار شماره ۵: اثر غلظت دترجنت بر راندمان فرایند آنزیمی (غلظت آنزیم 5/1 U/mL، آب اکسیژنه 2 mg/L و pH = ۷/۵)

تاثیر تناوب افزودن آب اکسیژنه به فرایند

با توجه به اهمیت آب اکسیژنه در فعال‌سازی آنزیم هورس رادیش پر اکسیداز و هم‌چنین امکان مصرف بخشی از آب اکسیژنه در فرایند اکسیداسیون سوبسترا در مدت زمان ۶۰ دقیقه، به بررسی تاثیر تناوب افزودن آب اکسیژنه به فرایند در کارایی حذف دترجنت آنیونی در شرایط بهینه) غلظت آنزیم ۱/۵U/mL، آب اکسیژنه ۲mg/L، pH =۷/۵ و غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر دترجنت آنیونی(پرداخته شده است. در زمان های مختلف ۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه در هر مرحله، ۰/۵ میلی گرم بر لیتر آب اکسیژنه به محیط واکنش اضافه شد، ولی آنزیم در یک مرحله به فرایند اضافه شده است. نتایج در نمودار شماره ۶ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد افزودن یکباره آب اکسیژنه به فرایند در ابتدای واکنش (۱۵-۰ دقیقه) منجر به بالا رفتن راندمان حذف دترجنت شده است ولی پس از آن افزودن مرحله‌ای آب اکسیژنه منجر به افزایش راندمان حذف دترجنت شده است، به طوری‌که راندمان را از ۹۸ درصد به ۹۹/۵ درصد در مدت زمان ۵۰ دقیقه رسانیده است.



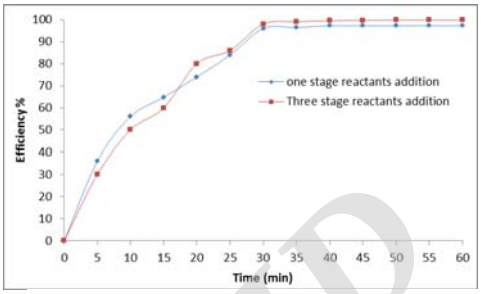
نمودار شماره ٦: اثر تناوب افزودن آب اکسیژنه به فرایند

تاثیر تناوب افزودن آب اکسیژنه و آنزیم هورس رادیش پراکسیداز به فرایند

با توجه به چرخه فعالیت آنزیمی که در مقدمه به آن اشاره شده است، در هر مرحله از فعالیت آنزیم که کمپلکس آنزیم سوبسترا ایجاد می‌شود و در هر گردش دو مولکول ترکیب حلقوی اکسید می‌شود، به نظر می‌رسد افزودن مرحله‌ای آنزیم-آب اکسیژنه به فرایند می‌تواند از غیرفعال شدن آنزیم در اثر رسوبات ناشی از پلیمریزاسیون دترجنت‌ها جلوگیری نماید و منجر به افزایش راندمان فرایند آنزیمی گردد. به همین منظور در غلظت ثابت ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر دترجنت در pH برابر ۷/۵، در سه مرحله اقدام به افزودن آنزیم و آب اکسیژنه به محیط واکنش شده است. با توجه به این که نسبت آنزیم به آب اکسیژنه در شرایط بهینه ۰/۷۵ بوده است (۱/۵ به ۲)، در این سه مرحله (زمان های صفر، ۱۵، ۲۵، ۴۰ دقیقه) همین نسبت رعایت شده است و در مدت ۵ دقیقه بعد از هر مرحله اضافه شدن واکنش گرها، نمونه گیری و اندازه‌گیری غلظت باقیمانده دترجنت انجام شده است. نتایج راندمان حذف دترجنت در نمودار شماره ۷ آورده شده است. نتایج نشان داد افزودن مرحله‌ای واکنشگرها (آنزیم-آب اکسیژنه) در ابتدا به دلیل پایین بودن نسبت غلظت واکنشگرها به سوبسترا (دترجنت) راندمان حذف دترجنت تا مدت زمان ۲۰

Archive of SID
www.SID.ir

دقیقه کاهش پیدا کرد ولی پس از آن تا مدت زمان ۵۵ دقیقه منجر به افزایش راندمان حذف درجنت شده است. به طوری‌که راندمان کلی فرایند از ۹۸ درصد به ۹۹/۸ درصد در پایان ۵۵ دقیقه رسیده است.



نمودار شماره ۷: تناوب افزودن آب اکسیژنه و آنزیم هورس رادیش پراکسیداز به فرایند آنزیمی درجنت آنیونی

جدول شماره ۱: ضرایب سینتیکی واکنش برای غلظت های مختلف درجنت

درجنت (mg/L)	واکنش درجه صفر K_0 (mol $L^{-1}min^{-1}$)	R^2	واکنش درجه یک K_1(mol $L^{-1}min^{-1}$)	R^2	واکنش درجه دو K_2(mol $L^{-1}min^{-1}$)	R^2
۱۰۰	۰/۲۵۸	۰/۸۹۲	۰/۷۵۲	۰/۹۹۷	۰/۰۳۱۵	۰/۷۸۲
۲۵۰	۰/۳۲۶	۰/۹۲	۰/۶۳۸	۰/۹۹۵	۰/۰۳۶	۰/۸۶۲
۵۰۰	۰/۴۵۲	۰/۹۳۵	۰/۷۷۳	۰/۹۹۱	۰/۰۵۲۳	۰/۸۸۳
میانگین	۰/۳۴۵	۰/۹۱۵	۰/۷۲۱	۰/۹۹۴	۰/۰۳۹۹	۰/۸۴۲

بحث

فعالیت آنزیمی

نتایج بررسی فعالیت آنزیمی عصاره استخراج شده از هورس ردایش (Horseradish Root) نشان می‌دهد عصاره استخراج شده دارای فعالیت اولیه ۱۵/۳ Unit/ml بوده و pH بهینه فعالیت آنزیمی ۷/۵ می‌باشد که با تغییر درpH ، فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد. مطالعه قانعیان نشان داد فعالیت آنزیم استخراج شده از Raphanus Sativusبرابر ۳/۱۰۷ یونیت بر میلی لیتر بوده است [۲۷]. فعالیت آنزیمی هورس رادیش پراکسیداز در مطالعات قبلی محقق نشان می‌دهد فعالیت آنزیمی هورس رادیش پراکسیداز استخراج شده از ریشه هورس رادیش، ۲/۳۶ یونیت بر میلی‌لیتر بوده است که با نتایج این مطالعه متفاوت بوده است. دلیل این تفاوت احتمالاً به خاطر محل کاشت گیاه می‌باشد، نتایج مختلف نشان می‌دهد گیاهانی که تحت تاثیر تنش‌های مختلف مانند تنش خشکی قرار می‌گیرند، غلظت متفاوتی از آنزیم‌های مختلف را دارند(۱۴،۱۲). عالم زاده و همکارانش در مطالعه کاربرد آنزیم هورس رادیش پراکسیداز خالص در حذف فنل نیز pH بهینه فعالیت آنزیم را در محدوده ۷/۵ گزارش کردند(۱۶). مطالعات متعددی نشان می‌دهند که آنزیم‌ها بهترین تبدیل سوبسترا را در pH های خاص انجام می‌دهند. بسیاری از آنزیم‌ها در شرایط اسیدی و یا بازی به طور برگشت ناپذیری تغییر ماهیت می‌دهند. نقش pH در فعالیت کاتالیزوری آنزیم در واقع بر روی گروه‌های یونش پذیر در جایگاه فعال آنزیم می‌باشد.

اثر غلظت آنزیمی در حذف درجنت

بررسی اثر غلظت آنزیمی در حذف درجنت نشان داد در دامنه غلظت آنزیم (۰/۵ تا ۲ یونیت بر میلی لیتر)، فرایند حذف درجنت، در مدت زمان ۶۰ دقیقه در مقیاس ناپیوسته با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر درجنت آنیونی در pH برابر ۷/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر

مطالعه سینتیک واکنش‌های آنزیمی

مطالعه سرعت فرآیندهای شیمیایی در شرایط آزمایشگاهی گوناگون که مبنای طراحی راکتورها نیز می‌باشد، از اهمیت بالایی برخوردار است. نتایج آنالیز در جدول شماره ۱ آورده شده است. نتایج بررسی نشان می‌دهد مرتبه واکنش آنزیمی از واکنش درجه یک تبعیت بیش‌تری دارد. ضریب همبستگی (R^2) بالای ۰/۹۹ و میانگین ثابت سرعت واکنش برابر۰/۷۲۱ بر لیتر در دقیقه بوده است ($p\text{-value}\geq 0.05$).

Archive of SID

www.SID.ir

آب اکسیژنه در دمای آزمایشگاه راندمان متفاوتی دارد. در ابتدا با افزایش غلظت آنزیمی، راندمان حذف افزایش می‌یابد تا به ۱/۵ یونیت بر میلی لیتر می‌رسد و پس از آن با افزایش غلظت آنزیمی، راندمان حذف کاهش می‌یابد که این کاهش راندمان می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد. یکی از دلایل می‌تواند غیر فعال شدن آنزیم در طی فرایند در اثر رسوب ترکیبات پلیمریزه شده دترجنت بر روی سایت‌های فعال آنزیم باشد و دلیل دیگر می‌تواند ناشی از کاهش نسبت آب اکسیژنه به آنزیم باشد، به دلیل این که بخشی از آب اکسیژنه در فرایند اکسیداسیون سوبسترا مصرف شده و دیگر در محیط واکنش وجود ندارد که منجر به فعال شدن آنزیم در راکتور شود(۲۸، ۱۸، ۱۶). هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر آب اکسیژنه به تنهایی درصد کمی (کم‌تر از ۵ درصد) از دترجنت را اکسید کرده است و روی فرایند حذف دترجنت بی‌تاثیر بوده است که با مطالعه دهقانی و همکارانش مطابقت دارد(۲۹).

اثر غلظت آب اکسیژنه در حذف دترجنت

اثر غلظت آب اکسیژنه در حذف دترجنت در شرایطی که غلظت دترجنت آنیونی ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر، غلظت آنزیم U/ml ۱/۵، در pH برابر ۷/۵ و غلظت متغیر آب اکسیژنه ۰/۵ الی ۴ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ دقیقه، نشان می‌دهد زمانی که آب اکسیژنه در محیط واکنش وجود ندارد، آنزیم هورس رادیش پراکسیداز به تنهایی قادر به فعال‌سازی نمی‌باشد و هیچ تاثیری بر روی دترجنت در محیط واکنش نداشته است. با افزایش غلظت آب اکسیژنه از ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تا ۲ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ دقیقه، راندمان حذف دترجنت افزایش یافته و به ۹۸ درصد رسیده است. آب اکسیژنه به عنوان فعال‌گر آنزیم HRP نقش اساسی دارد. آب اکسیژنه برای اکسید کردن آنزیم خالص به فرم میانی و اکسیداسیون ترکیب آروماتیک و ایجاد رادیکال های آزاد نقش ایفا می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد این آنزیم در نسبت غلظت پراکسید هیدروژن و آنزیم مناسب بهترین تبدیل سوبسترا را انجام می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر آنزیم، اثر کاتالاز ممکن است غالب شود و واکنش با تجزیه پراکسید هیدروژن متوقف شود. به عبارت دیگر نسبت استوکی متری بالاتر پر اکسید هیدروژن در مقایسه با آنزیم ممکن است باعث غیر فعال شدن آنزیم شود. بنابراین غلظت بهینه آنزیم و پراکسید هیدروژن برای واکنش آنزیمی مورد نیاز می‌باشد. این نتایج با مطالعات محقق در کاربرد آنزیم در حذف رنگ مطابقت دارد(۱۳، ۱۲).

اثر غلظت دترجنت بر راندمان حذف دترجنت

بررسی اثر غلظت دترجنت بر راندمان حذف دترجنت نشان می‌دهد در شرایطی که پارامترهایی مانند غلظت آنزیم U/mL ۱/۵، آب اکسیژنه mg/L ۲و pH= ۷/۵تنظیم شد، فرایند اکسیداسیون آنزیمی در غلظت های مختلف دترجنت آنیونی (mg/L۵۰۰-۱۰۰) ، با افزایش غلظت دترجنت آنیونی و ثابت بودن غلظت آب اکسیژنه به عنوان فعال‌ساز واکنش آنزیمی و غلظت آنزیم راندمان حذف کاهش یافته است. بر اساس نتایج به دست آمده و مطالعات دیگر می‌توان گفت که نسبت‌های آنزیم به آب اکسیژنه و سوبسترا در فرایند پلیمریزاسیون آنزیمی با توجه به مکانیسم‌های فرایند آنزیمی (معادلات ۳-۱) و نسبت‌های مولی آن‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد Liu .و همکارانش نسبت مولی آنزیم به رنگ را ۱ به ۱/۲۵ گزارش کردند و عالم زاده و همکاران این نسبت‌ها را برای فنل ۱ به ۱/۱۵ گزارش کردند(۳۰، ۱۷).

تاثیر تناوب افزودن آب اکسیژنه و آنزیم هورس رادیش پراکسیداز

تاثیر تناوب افزودن آب اکسیژنه و آنزیم هورس رادیش پراکسیداز به فرایند در غلظت ثابت ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر دترجنت در pH برابر ۷/۵، در سه مرحله

Archive of SID
www.SID.ir

افزودن آنزیم و آب اکسیژنه به محیط واکنش با نسبت آنزیم به آب اکسیژنه در شرایط بهینه ۰/۷۵ نتایج نشان داد افزودن مرحله‌ای واکنشگرها (آنزیم-آب اکسیژنه) در ابتدا به دلیل پایین بودن نسبت غلظت واکنشگرها به سوبسترا (دترجنت) راندمان حذف دترجنت تا مدت زمان ۲۰ دقیقه کاهش پیدا کرد ولی پس از آن تا مدت زمان ۵۵ دقیقه منجر به افزایش راندمان حذف دترجنت شده است. به طوری‌که راندمان کلی فرایند از ۹۸ درصد به ۹۹/۸ درصد در پایان ۵۵ دقیقه رسیده است. بررسی متون نشان می‌دهد در بسیاری از مطالعات، تاثیر تناوب افزودن واکنشگرها بررسی نشده است و قانعیان و همکارانش در مطالعه خود به این نتایج دست یافتند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد(۲۷).

مرتبه واکنش آنزیمی

نتایج این نشان می‌دهد مرتبه واکنش آنزیمی از واکنش درجه یک تبعیت بیش‌تری دارد. ضریب همبستگی (R^2) بالای ۰/۹۹ و میانگین ثابت سرعت واکنش برابر ۰/۷۲۱ بر لیتر در دقیقه بوده است (p-value≥0.05). نتایج درجه واکنش با پژوهش Liu و همکارانش در خصوص سرعت واکنش و مرتبه آن هم‌خوانی داشت(۱۷).

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که به طورکلی تصفیه آنزیمی از دیر باز به دلیل مزایای زیر نسبت به سایر روش‌های متداول تصفیه ترکیبات سمی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. از مزایای تصفیه آنزیمی نسبت به سایر روش‌های تصفیه می توان به کارایی بالای آنزیم‌ها در حذف ترکیبات مقاوم به تجزیه بیولوژیکی، بهره برداری در غلظت پایین و بالای آلاینده، بهره برداری در رنج بالای pH و دما، بهره برداری در شرایط شوک‌های غلظت و دبی، کاهش حجم لجن تولیدی، سهولت کنترل فرایند و سرعت بالای واکنش اشاره کرد. با توجه به مزایای گفته شده، مطالعات به طرف تصفیه آنزیمی و استفاده از آنزیم در تصفیه فاضلاب‌های خطرناک و خاک کشیده شده است. در مطالعات کاربرد آنزیم هورس رادیش پر اکسیداز در حذف آلاینده‌های مختلف از جمله فنل، هورمونهای طبیعی و مصنوعی، رنگ و روغن و مطالعه حاضر در حذف دترجنت نتایج قابل قبولی حاصل شده است. پیشنهاد می‌شود اثر متغیرهای دیگری مانند دما، حضور کاتیون‌ها و آنیون‌ها و ... در فرایند آنزیمی نیز مورد مطالعه قرار گیرد. به نظر می‌رسد کاربرد روش تصفیه آنزیمی هورس رادیش پراکسیداز می‌تواند در فاضلاب‌هایی که حاوی ترکیبات مختلف آلاینده باشند نیز مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

کار تحقیقاتی حاضر مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب معاونت آموزشی و تحقیقات و فناوری دانشکده علوم پزشکی آبادان می باشد(IR.ABADANUMS.REC.1395.183). نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند مراتب تشکر و قدردانی خود را از این دانشکده به دلیل حمایت مالی به عمل آورند.

References

1. Adak A, Bandyopadhyay M, Pal A. Removal of anionic surfactant from wastewater by alumina: a case study. Colloids Surfaces A.2005;254(1):165-171.

2. Hill CA, Wallace WE, Keane MJ, Mike PS. The enzymatic removal of a surfactant coating from quartz and kaolin by P388D1 cells. Cell Biol Toxicol.1995;11(2):119-128.

Archive of SID
www.SID.ir

3. Önder E, Koparal AS, Öğütveren ÜB. An alternative method for the removal of surfactants from water: Electrochemical coagulation. Sep Purif Technol. 2007;52(3):527-532.
4. Wang XJ, Song Y, Mai JS. Combined Fenton oxidation and aerobic biological processes for treating a surfactant wastewater containing abundant sulfate. J Hazard Mater. 2008;160(2):344-348.
5. Dhouib A, Hdiji N, Hassaïri I, Sayadi S. Large scale application of membrane bioreactor technology for the treatment and reuse of an anionic surfactant wastewater. Process Biochemistry.2005;40(8):2715-2720.
6. Zazouli MA, Charati JY, Alavinia SM, Esfandyari Y. Efficiency of electrocoagulation process using aluminum electrode in hospital laundry wastewater pretreatment. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016;25(134):251-260.(persian)
7. Aloui F, Kchaou S, Sayadi S. Physicochemical treatments of anionic surfactants wastewater: Effect on aerobic biodegradability. J Hazard Mater.2009;164(1):353-359.
8. Dhouib A, Hamad Nm, Hassaïri I, Sayadi S. Process Biochem. 2003;38(8):12(8):1245-1250.
9. Dianati Tilaki R, Hosseini Motlagh SS. Removal of Chromium (VI) from Aqueous Solution by Activated Carbon Modified with Cationic Surfactant Benzalkonium Chloride. J Mazandaran Univ Med Sci. 2017;27(148):122-135.(persian)
10. Bayramoglu G, Akbulut A, Arica MY. Immobilization of tyrosinase on modified diatom biosilica: Enzymatic removal of phenolic compounds from aqueous solution. J Hazard Mater. 2013;244-245:528-536.
11. Bayramoğlu G, Arıca MY. Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. J Hazard Mater. 2008;156(1):148-155.
12. Gholami-Borujeni F, Faramarzi MA, Nejatzadeh-Barandozi F, Mahvi AH. Oxidative degradation and detoxification of textile azo dye by horseradish peroxidase enzyme. Fresenius Environmental Bulletin. 2013;22(3):739-744.
13. Gholami-Borujeni F, Nejatzadeh-Barandozi F, Mahvi AH. Application of low purity horseradish peroxidase enzyme to removal of oil from oily wastewater. Desalination and Water Treatment. 2016;57(42):19760-1977.
14. Gomez J, Bodalo A, Gomez E, Bastida J, Hidalgo A, Gomez M. Immobilization of peroxidases on glass beads: an improved alternative for phenol removal. Enzyme Microb Tech. 2006;39(5):1016-1022.
15. Kauffmann C, Petersen BR, Bjerrum MJ. Enzymatic removal of phenols from aqueous solutions by Coprinus cinereus peroxidase and hydrogen peroxide. J Biotechnol. 1999;73(1):71-74.
16. Alemzadeh I, Nejati S. Phenols removal by immobilized horseradish

Archive of SID
www.SID.ir

peroxidase. J Hazard Mater. 2009;166(2):1082-1086.

17. Liu JZ, Wang TL, Ji LN. Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase. J Mol Catal B-Enzym. 2006;41(3):81-86.
18. Ashrafi SD, Nasseri S, Alimohammadi M, Mahvi AH, Faramarzi MA. Optimization of the enzymatic elimination of flumequine by laccase-mediated system using response surface methodology. Desalination and Water Treatment. 2016;57(31):14478-14487.
19. Ashrafi SD, Rezaei S, Forootanfar H, Mahvi AH, Faramarzi MA. The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, Paraconiothyrium variabile. Int Biodeter Biodegr. 2013; 85:173-181.
20. Dehghanifard E, Jafari AJ, Kalantary RR, Mahvi AH, Faramarzi MA, Esrafili A. Biodegradation of 2,4-dinitrophenol with laccase immobilized on nano-porous silica beads. Iranian J Environ Health Sci Eng. 2013;10(1):25.(persian)
21. León VM, Gómez-Parra A, González-Mazo E. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates in seawater. Environ Sci Technol. 2004;38(8):2359-2367.
22. Lavery CB, MacInnis MC, MacDonald MJ, Williams JB, Spencer CA, Burke AA. et al. Purification of peroxidase from horseradish (Armoracia rusticana) roots. J Agric Food Chem. 2010;58(15):8471-8476.
23. Ulson de Souza SM1, Forgiarini E, Ulson de Souza AA. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). J Hazard Mater. 2007;147(3):1073-1078.
24. Nicell JA, Bewtra JK, Biswas N, Pierre CC St, Taylor KE. Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from aqueous solution. Can J Civil Eng.1993;20(5):725-735.
25. Ameriacan Public Health Association, Water Environment Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater.USA: American Public Health Association (APHA): Washington DC, 2005.
26. Li D, Wang C, Tripkovic D, Sun S, Markovic NM, Stamenkovic VR. Surfactant removal for colloidal nanoparticles from solution synthesis: the effect on catalytic performance. Acs Catal. 2012;2(7):1358-1362.
27. Ghaneian MT, Ghanizadeh G. Application of Enzymatic Polymerization Process for the Removal of Phenol from Synthetic Wastewater. Iran J Health & Environ. 2009; 2(1): 46-55.(persian)
28. Forootanfar H, Moezzi A, Aghaie-Khozani M, Mahmoudjanlou Y, Ameri A, Niknejad F. et al. Synthetic dye سdecolorization by three sources of fungal laccase. Iranian J Environ Health sci Engin. 2012;9(1):27. (persian)

Archive of SID

www.SID.ir

29. Dehghani M, Nasseri S, Ghaderpoori M, Mahvi A, Nabizadeh Nodehi R. Investigating the efficiency of UV/H2O2 process for removal of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in aqueous solutions. Iranian J Health Environ. 2011; 3(4):411-418.(persian)

30. Alemzadeh I, Nejati S. Removal of phenols with encapsulated horseradish peroxidase in calcium alginate. Iran J Chem Chem Eng (IJCCE). 2009; 28(2):43-49.(persian)

Archive of SID

www.SID.ir