بررسی حذف فنل توسط پراکسیداز ترب کوهی تثبیت شده

ایران عالم زاده [۱] سیامک نجاتی [۲] سپیده معتمد [۳]

(دریافت ۸۷/۱/۲۸ پذیرش ۸۸/۱۰/۱۰)

چکیده

در این تحقیق کاربرد پراکسیداز ترب کوهی (HRP) تثبیت شده در کپسول‌های آلژینات به‌منظور حذف فنل و نیز شرایط بهینه برای تثبیت HRP در آلژینات تعیین شد. شرایط بهینه برای ژله‌ای شدن به‌ترتیب ۰/۷۵ و ٤/٥ درصد حجمی وزنی برای آلژینات سدیم و کلسیم کلرید شش آبه به‌دست آمد. بر اثر تثبیت آنزیم، منحنی فعالیت آنزیمی بر اساس pH به‌گونه‌ای تغییر کرد که مقادیر فعالیت نسبی در pHهای اسیدی و بازی بیشتر شد. همچنین نتایج نشان داد که درصد فعالیت باقیمانده آنزیم محبوس شده مستقل از غلظت آنزیم مورد استفاده است. علاوه بر این، نتایج نشان داد که غلظت آنزیم برای حذف فنل در غلظت فنلی مشخصی دارای مقدار بهینه است که با فراتر رفتن از این مقدار تغییر چندانی در بازده حذف مشاهده نشود. بررسی پیشرفت واکنش با زمان برای آنزیم محبوس شده و آنزیم آزاد نشان داد که در غلظتهای برابر، حذف فنلی برای آنزیم محبوس شده اندکی کمتر است. با این حال، نتایج نشان داد که کپسول‌ها تا چهار دوره بدون تغییر قابل ملاحظه در فعالیت باقیمانده آنها قابل استفاده هستند. نسبت بهینه پراکسید هیدروژن به فنل برای غلظت فنل ۲ تا ۱۰ میلی مولار، ۰/۹٤ تا ۱/۱٥ به‌دست آمد و نشان داده شد که این نسبت وابسته به غلظت فنل است.

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

Phenol Removal by Immobilized Horseradish Peroxidase

Iran Alemzadeh [1] Siyamak Nejati [2] Sepideh Motamed [3]

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

Abstract

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

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

۱- استاد، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران
(نویسنده مسئول) ٦٦١٦٥٤٨٦ (۰۲۱) alemzadeh@sharif.ir
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

1. Prof., Chemical and Petroleum Engineering Dept., Sharif University of Technology, Tehran (Corresponding Author) (+98 21) 66165486 alemzadeh@sharif.ir
2. Grad. Student of Biotechnology, Chemical and Petroleum Eng. Dept., Sharif University of Technology, Tehran
3. Grad. Student of Food Industrial Eng., Chemical and Petroleum Eng. Dept.,Sharif University of Technology, Tehran

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

آنزیم‌ها با وجود اینکه دارای معایبی هستند، همواره به‌عنوان کاتالیست واکنش‌های بیولوژیکی در صنایع مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱]. تثبیت آنزیم‌ها می‌تواند پایداری آنزیم‌ها را افزایش دهد و شرایط واکنش یکنواخت را برای فرایندهای آنزیمی بهبود بخشد [۲]. حذف آنزیمی ترکیبات فنلی از پسابها توسط محققان بسیاری بررسی شده است [۲ و ۳]. از این میان آنزیم‌های پراکسیداز به‌عنوان گزینه‌ای مؤثر در واکنش با ترکیبات فنلی شناخته شده‌اند. این آنزیم‌ها مواد غیر محلولی تشکیل می‌دهند که به آسانی توسط روشهایی از جمله ته‌نشینی و لخته‌سازی قابل جداسازی هستند [۴، ۵ و ۶]. با این حال در این فرایندها غیر فعال شدن آنزیمی به‌عنوان نقطه ضعف عمده به‌چشم می‌خورد [۲]. به این دلیل تلاشها برای تثبیت آنزیم‌های پراکسیداز که به‌طور مؤثری در حذف فنلی اثر می‌گذارند معطوف گردید. در این میان رایج‌ترین آنزیم مورد تحقیق، آنزیم پراکسیداز ترب کوهی بوده که مشتق از ریشه گیاه ترب کوهی است [۷].

استفاده از آنزیم‌هایی که بتوانند جایگزین مناسبی برای پراکسیداز ترب کوهی باشند با هدف هزینه‌های کمتر تهیه بیوکاتالیست نیز همواره مورد توجه محققان بوده است [۸]. از نمونه این آنزیم‌ها می‌توان به پراکسیداز موجود در دانه سویا اشاره کرد که با بازده قابل قبول و قابل قیاس با پراکسیداز ترب کوهی قادر به تصفیه فنل از محیط آبی است [۹]. استفاده از آنزیم‌های تثبیت شده به‌منظور تصفیه پسابها در حجم زیاد گزینه مناسب‌تری به‌نظر می‌رسد [۷]. لذا مواد مختلفی با روشهای گوناگون به‌عنوان پایه‌های مناسب برای تثبیت آنزیمی مورد توجه واقع شده‌اند که از این میان می‌توان به دانه‌های شیشه‌ای، پلیمرها، رزین‌های تعویض یونی و کلی‌های لایه‌ای آلومینیوم اشاره نمود [۱۰، ۱۱و ۱۲].

اگر چه تثبیت به‌طور مؤثری فعالیت آنزیمی را بالا می‌برد، با این حال غیر فعال شدن آنزیمی به‌عنوان نقطه ضعف عملیات تصفیه آنزیمی پسابهای فنلی بر جاست. برخی محققان کم بودن بازده حذف فنلی را مربوط به اندر کنش‌های میان رادیکال‌های تشکیل شده و آنزیم می‌دانند [۱۳]. علاوه بر غیر فعال شدن آنزیمی، مقادیر اضافی پراکسید هیدروژن نیز بر عملکرد آنزیمی اثرات بازدارنده دارند [۱۴].

به‌منظور رفع مشکلات بالا برخی محققان اضافه نمودن موادی مانند پلی‌اتیلن گلیکول را که با ایجاد لایه‌ای محافظ، آنزیم را احاطه می‌کند، به‌عنوان راهکاری مناسب معرفی نموده‌اند [۱۵]. اگرچه براساس تحقیقات اخیر مقدار قابل توجهی از پلی‌اتیلن گلیکولی که به این منظور به محلول اضافه می‌شود پس از جداسازی رادیکال‌ها خود به‌عنوان آلاینده در محلول باقی می‌ماند [۱۶].

هدف از تثبیت آنزیم در این تحقیق استفاده از حاملی جدید بود که با کمک آن حذف فنل از پساب سنتزی مورد بررسی قرار گرفت. روش محبوس کردن آنزیم در داخل کپسول با غشاء نیمه تراوای آلژینات[1] مورد استفاده قرار گرفت و سپس حذف فنل در غلظتهای مختلف آنزیم، پراکسید هیدروژن و فنل بررسی شد.

۲- مواد روشها

۲-۱- مواد

پراکسیداز ترب کوهی[2] (پودر لیوفلیزه ۲۰۰ واحد بر میلی‌گرم)، فنل ۹۹ درصد، پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد وزنی حجمی، ۴-آمینوآنتی پیرین و پتاسیم فرو سیانید که در آزمایش‌های سنجش مورد استفاده بودند از شرکت مرک[3] تهیه شدند. آلژینات سدیم غنی از گلورونیک اسید و مشتق شده از گونه *لامیرانیا هایپربورین*[4] و کلسیم کلرید شش آبه هر دو از شرکت ب.د.اچ[5] انگلیس تهیه شد. آنزیم کاتالاز آسپرژیلوس نایجر با فعالیت ۲۹۹۳ واحد بر میلی‌گرم از شرکت سرنا[6] تهیه گردید. سایر مواد مورد استفاده از درجه آزمایشگاهی بودند.

۲-۲- روش محبوس کردن در کپسول

به‌منظور تثبیت آنزیمی در ابتدا آلژینات سدیم در آب حل شد. حل شدن در یک بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری مجهز به همزن مغناطیسی صورت گرفت و ۳ تا ۵ ساعت به‌طول انجامید. به منظور خارج کردن حبابهای هوا، از یک همزن شیشه‌ای برای هم زدن محلول استفاده گردید. پس از حل کردن آلژینات سدیم، محلول به منظور همگن شدن تا مدت ۱ ساعت در دمای اتاق هم زده شد و ژل حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای استفاده مجدد ذخیره گردید. کپسول‌های آلژینات کلسیم با روش یک مرحله‌ای ساده‌ای که توسط نیگما و همکاران[7] شرح داده شده است تهیه شد [۱۷]. مقدار مشخصی از آنزیم در ۱۰میلی‌لیتر از کلرید کلسیم حل شد و سپس این محلول از فاصله ۱۰ سانتی‌متر که به جهت اطمینان از کروی بودن ذرات در نظر گرفته شده بود به صورت قطره‌ای توسط لوله رابط با قطر ۱/۲ میلی‌لیتر از جنس سیلیکون، متصل به پمپ پریستالتیک[8] به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آلژینات اضافه شد. برای جلوگیری از چسبیدن قطرات به هم و کمینه کردن مقاومت‌های انتقال جرم، محلول آلژینات سدیم توسط همزن مغناطیسی ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در داخل بشر، هم زده

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

Archive of SID
www.SID.ir

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

۲-۳- تعیین مقدار پروتئین

پروتئین موجود در محلول شستشو و نیز مقدار پروتئین موجود در داخل کپسول‌ها همگی توسط روش لوری[1] بهبود یافته توسط پترسون[2]، اندازه‌گیری شد [۱۸].

۲-۴- بازده محبوس شدن آنزیمی

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

۲-۵- ریزش آنزیمی

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

۲-۶- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آزاد و محبوس شده

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

۲-۷- محاسبه غلظت فنل

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

۲-۸- بررسی حذف فنل

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

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

۲-۹- بررسی اثر غلظت کلرید کلسیم و آلژینات بر محبوس شدن

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

۲-۱۰- بررسی اثر pH

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

۲-۱۱- بررسی زمان بهینه واکنش

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

[1] Lowry
[2] Peterson

Archive of SID
www.SID.ir

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

مقدار آنزیمی که در کپسول‌ها حبس می‌شود به گونه‌ای است که فعالیت ۰/۸ واحد بر میلی لیتر را نتیجه می‌دهد. این مقدار آنزیم در شرایط غلظت فنل ۲ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۲۰ میکرو لیتر، دما ۲۵ درجه سلسیوس و pH برابر ۷/۴ بر ۱۰۰میلی‌لیتر پساب اثر داده شد.

۲-۱۲- بررسی اثر غلظت آنزیمی

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

۲-۱۳- بررسی اثر غلظت پراکسید هیدروژن

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

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

۲-۱۴- بررسی استفاده مجدد از کپسول‌های آنزیمی

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

۳- نتایج و بحث

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

نتایج به‌دست آمده از تعیین مقادیر محبوس شدن، ریزش و درصد فعالیت باقیمانده آنزیمی در درصدهای مختلف آلژینات سدیم و کلرید کلسیم در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد استفاده از کلرید کلسیم با غلظتهای بیشتر، بدون توجه به غلظت آلژینات، موجب کاهش ریزش آنزیمی می‌گردد. با توجه به جدول ۱ با افزایش غلظت آلژینات از ۰/۵ تا ۲درصد، درصد ریزش کاهش می‌یابد. به‌عنوان مثال برای غلظت ۰/۷۵درصد آلژینات و غلظت ۱/۳درصد کلسیم کلرید، درصد ریزش ۵۰ بود ولی برای غلظت ۲درصد آلژینات و همان مقدار کلسیم کلرید، درصد ریزش ۳۰ درصد بود. همچنین فعالیت باقیمانده با تغییر غلظت کلرید کلسیم تغییر چندانی نمی‌کند.

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

کلرید کلسیم (w/v%)	آزمایش اول (سدیم آلژینات ۰/۵٪ w/v)			آزمایش دوم (سدیم آلژینات ۰/۷۵٪ w/v)			آزمایش سوم (سدیم آلژینات ۱٪ w/v)			آزمایش چهارم (سدیم آلژینات ۲٪ w/v)		
	محبوس شدن (٪)	ریزش (٪)	فعالیت باقیمانده (٪)	محبوس شدن (٪)	ریزش (٪)	فعالیت باقیمانده (٪)	محبوس شدن (٪)	ریزش (٪)	فعالیت باقیمانده (٪)	محبوس شدن (٪)	ریزش (٪)	فعالیت باقیمانده (٪)
۱/۳	۹۴±۴	۴۵±۵	۲۰±۵	۶۸±۳	۵۰±۴	۱۸±۲	۷۰±۲	۳۹±۴	۱۳±۳	۷۵±۴	۳۰±۲	۸±۳
۲/۲۵	۸۷±۷	۲۵±۲	۱۱±۵	۹۱±۳	۲۹±۳	۱۲±۵	۷۱±۵	۳۳±۵	۹±۳	۸۱±۳	۲۵±۵	۵±۲
۴/۵	۸۷±۵	۲۱±۲	۸/۵±۲	۸۵±۵	۲۰±۵	۸±۲	۸۵±۴	۸±۳	۵±۲	۹۰±۵	۶±۲	۶±۱
۵/۵	۹۴±۴	۱۸±۲	۸±۲	۸۹±۲	۱۴±۳	۵±۲	۹۵±۲	۴±۲	۳±۱	۹۶±۲	۴±۲	۱

Archive of SID
www.SID.ir

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

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

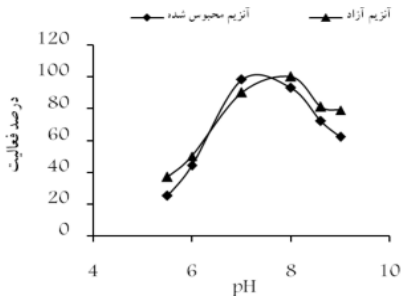
مقادیر مختلف از غلظتهای آنزیمی به‌منظور بررسی اثر غلظت آنزیم بر درصد فعالیت باقیمانده در نظر گرفته شد که نتایج مربوط به آن در جدول ۲ قابل مشاهده است. نتایج حاکی از آن است که غلظت آنزیم تأثیری بر درصد فعالیت باقیمانده آنزیمی ندارد.

جدول ۲- تاثیر غلظت آنزیم بر درصد فعالیت باقیمانده

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

۳-۳- بررسی اثر pH

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



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

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

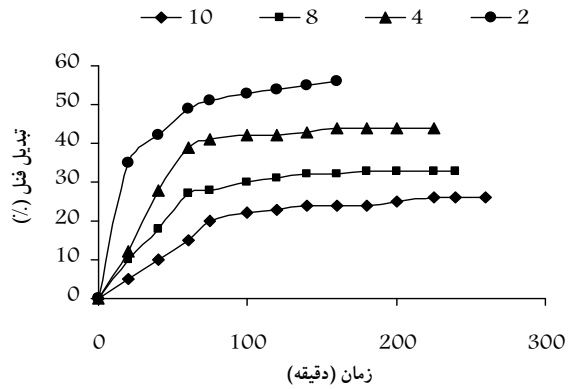
۳-۴- زمان بهینه واکنش

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که ۱۰۰ دقیقه زمان برای حذف قابل قبول فنل لازم است. پس از طی این زمان تغییرات چندانی در بازده حذف مشاهده نشد. آزمایش‌های لازم برای بررسی سایر پارامترهای مؤثر ۱۰۰ دقیقه به‌طول انجامید. پروفیل واکنش حذف پی-کلروفنل با پراکسیداز تثبیت شده بر روی حامل آمینوپروپیل گلاس (APG)[1] نیز زمان واکنش بهینه ۱۰۰ دقیقه را به‌دست آورد ولی مقدار حذف تقریباً ۲۰ درصد بود [۲۲].

بررسی پیشرفت واکنش با سایر غلظتها نشان داد که واکنش‌ها در تمامی غلظتها از روند یکسانی تبعیت می‌کنند (شکل ۲). تبدیل فنل بر حسب زمان برای هر دو آنزیم آزاد و تثبیت شده، بررسی شد. مقایسه بین این دو نشان داد که این مقادیر بسیار به یکدیگر نزدیک هستند (شکل۳). این امر نشانگر آن است که برای هر غلظت فنل، آنزیم دارای غلظت بهینه‌ای است.

۳-۵- بررسی اثر غلظت آنزیمی

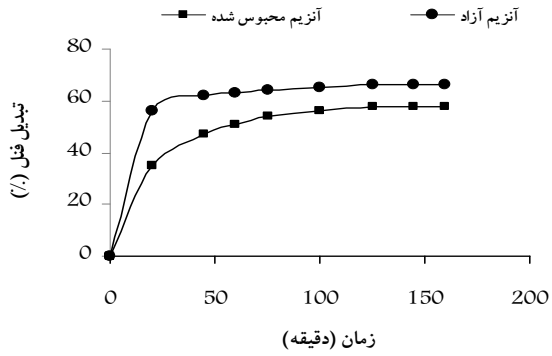
شکل ۴ نشان می‌دهد که مقدار آنزیم بر غلظت اولیه فنل تأثیر دارد. برای محلول فنل ۲ میلی‌مولار، با افزایش غلظت آنزیمی از ۰/۱۵ به ۰/۸ واحد بر گرم، حذف فنل افزایش یافت و با فراتر رفتن از این مقدار دیگر تغییرات قابل ملاحظه‌ای در حذف فنل مشاهده نشد. در نتیجه غلظت فنل باقیمانده که تفاوت بین غلظت فنل اولیه و نهایی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



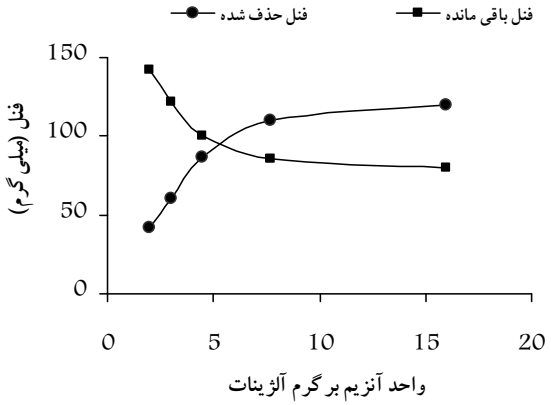
شکل۲- بررسی پیشرفت واکنش آنزیمی در حضور ۷/۵ واحد بر میلی‌لیتر از آنزیم محبوس شده برای چهار غلظت ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میلی‌مولار فنل

[1] Amino Propyle Glas (APG)

www.SID.ir
Archive of SID



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

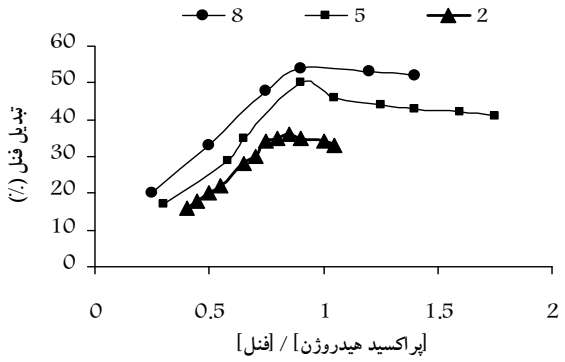


شکل ۴- بررسی غلظت آنزیم محبوس شده بر حذف فنل فنل حذف شده و فنل باقیمانده

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

۳-۶- بررسی اثر غلظت پراکسید هیدروژن

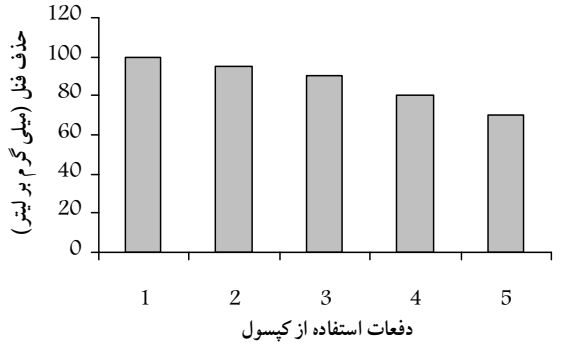
حذف فنل در واکنش آنزیمی را می‌توان با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن به مقدار مشخصی افزایش داد. در شکل ۵ بیشینه تبدیل فنلی در غلظتهای مختلف در مقابل نسبت بهینه رسم شده است. رفتار منحنی حذف فنل با نسبت پراکسید هیدروژن به فنل در تمامی موارد مشابه بود. در ابتدا مقدار حذف فنل با افزایش پراکسید هیدروژن به سرعت افزایش یافت و پس از رسیدن به مقدار مشخصی که بیشینه بازده حذف در آن نسبت صورت می‌گیرد، روندی نزولی پیش گرفت. دلیل این مطلب می‌تواند وجود مقدار اضافی پراکسید هیدروژن باشد که موجب تشکیل سریع واسطه‌های واکنش می‌گردد که خود به‌عنوان مهار کننده آنزیمی رفتار می‌کنند. لازم به ذکر است که مقدار اضافی پراکسید هیدروژن به تنهایی نیز قادر است آنزیم را غیر فعال می‌کند. با توجه به شکل ۵، این نسبت‌ها در بازه غلظتی فنل مورد استفاده بین ۰/۹۴ تا ۱/۱۵ متغیر است که این انحراف از مقدار واحد می‌تواند ناشی از تشکیل پلیمرها و یا محدودیتهای نفوذ به داخل ژل باشد [۲۳].



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

۳-۷- استفاده مجدد

پس از گذشت ۱۰۰ دقیقه از آغاز واکنش، کپسول‌ها از محلول خارج شده و به‌طور کامل شسته شدند و برای استفاده مجدد در محلول فنلی انداخته شدند. پس از ۵ دور استفاده از کپسول‌ها، بازده حذف فنلی کاهش یافت (شکل۶). این اثر می‌تواند مربوط به تجمع رادیکال‌ها در داخل کپسول و یا مسدود شدن حفرات غشاء احاطه کننده آنزیم باشد که سایت فعال آنزیم یا حتی ملکول‌های آنزیمی را به دام انداخته و باعث غیر فعال شدن آنزیمی می‌شود. در بررسی دیگری نشان داده شده است که آنزیم تثبیت شده بر روی حامل، ۵۰ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۵ دور استفاده از دست می‌دهد [۲۲].



شکل۶- استفاده پذیری مجدد کپسول‌ها، غلظت فنل ۲ میلی‌مولار مقدار آنزیمی ۷/۵ واحد بر میلی لیتر

۴- نتیجه‌گیری

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

www.SID.ir

گرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده پراکسیداز ترب کوهی محبوس شده در کپسول آلژینات می‌تواند در حذف موثر فنلی به‌کار گرفته شود. کارایی حذف فنلی متأثر از غلظت فنل، مقدار پراکسید هیدروژن، مقدار آنزیم به‌کار رفته و نیز pH محیط آبی است. فعالیت باقیمانده، محبوس شدن و ریزش آنزیمی به شرایط آماده‌سازی ژل و کپسول وابسته است و یافتن مقادیر بهینه برای کمیتهای مذکور بستگی به نوع آلژینات مورد استفاده دارد. فعالیت آنزیم محبوس شده در محیط‌های بازی و اسیدی که شرایط عمومی برای جریان پسابها می‌باشند، به نسبت بیشتر است. اگرچه بازده حذف فنلی بر اثر محبوس شدن به‌دلیل در دسترس نبودن آنزیم کاهش می‌یابد لکن بررسی استفاده مجدد و نیز پیشرفت واکنش، امکان رسیدن به بازده بالاتر و نیز کنترل بهتر واکنش را فراهم می‌نماید. آزمایش‌ها نشان داد که این بیوکاتالیست‌ها در چهار دوره متوالی بدون کاهش قابل توجهی در عملکرد خود می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

۵- مراجع

1- Aitken, M.D. (1993b). "Wastewater treatment applications of enzymes: Opportunity and obstacles." *J. of Chemical Eng.*, 52 (2), 49-58.

2- Singh, N., and Singh, J. (2002). "An enzymatic method for removal of phenol from industrial effluent." *Prep. Biochem. Biotechnol*, 32 (2), 127-133.

3- Kilbanov, A.M., Alberti, B.N., Morris, E.D., and Felshin, L.M. (1980). "Enzymatic removal of toxic phenols and aniline from wastewater." *J. Appl. Biochem.*, 2 (5), 414-421.

4- Wright, H., and Nicell, J. A. (1999). "Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols." *Biores. Technol.*, 70, 69-79.

5- Kilbanov, A.M., Tu, T.M., and Scott, K. P. (1983). "Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal conversion wastewater." *J. of Science*, 221, 259-261.

6- Cooper, V.A., and Nicell, J.A. (1996). "Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase." *Water Res.*, 30 (4), 954-964.

7- Tatsumi, K., Wada, S., and Ichikawa, H. (1996). "Removal of chlorophenol with immobilized horseradish peroxidase." *Biotechnol. Bioeng.*, 51 (1), 126-130.

8- Azevedo, A.M., Vojinovic, V., Cabral, J.M.S., Gibson, T.D., and Fonseca, L.P. (2004). "Operational stability of immobilized horseradish peroxidase in mini-packed bed bioreactors." *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, 28 (3), 121-128

9- Wilberg, K., Assenhaimer, C., and Rubio, J. (2002). "Removal of aqueous phenol catalyzed by a low purity soybean peroxidase." *J. Chem. Technol. and Biotechnol.*, 77 (7), 851-857.

10- Fernandes, K.F., Lima, C.S., Pinho, H. and Collins, C.H. (2003). "Immobilization of horseradish peroxidase on to polyaniline polymers." *Process Biochem.*, 38 (9), 1379-1384.

11- Cheng, J., Yu, S.M., and Zuo, P. (2006). "Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater." *Water Res.*, 40 (2), 283-290.

12- Caromori, S.S., and Fernandes, K.F. (2004). "Covalent immobilization of horseradish peroxidase onto poly (ethylene terephetalate)- poly (aniline) composite." *Process Biochem*, 39 (7), 883-888.

13- Lai, Y.C., and Lin, S.C. (2005). "Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-Chlorophenol from aqueous solution." *Process Biochem*, 40, 1167-1174.

14- Caza, N., Bewtra, J.K., Biswas, N., and Taylor, K.E. (1999). "Removal of phenolic compound from synthetic wastewater using soybean peroxidase." *Water Res.*, 33 (13), 3012-3018.

15- Nakamoto, S., and Machida, N. (1992). "Phenol removal from aqueous solution by peroxidase-catalyzed reaction using additives." *Water Res.*, 26 (1), 49-54.

16- Kinsely, C., and Nicell, J.A. (2000). "Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene Glycol." *Biores. Tech.*, 73 (2), 139-146.

Archive of SID

www.SID.ir

17- Nigma, S.C., Tsao, I. F., Sakoda, A., and Wang, H.Y. (1988). "Techniques for preparing hydrogel membrane capsule." *Biotechnol. Tech.*, 2 (4), 271-276.

18- Peterson, G. L. (1977). "Simplification of the protein assay method of lowry et al. that is more generally applicable." *Anal Biochem*, 83 (2), 346-356.

19- Nicell, J. A., and Wright, H. (1997). "A model peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide." *Enzyme Microb. Technol*., 21 (4), 302-309.

20- Wu, Y., Taylor, K.E., Biswas, N., and Bewtra, J.K. (1997). "Comparison of additive in the removal of phenolic compound by peroxidase-catalyzed polymerization." *Water Res.*, 31 (11), 2699-2704.

21- Wu, Y., Taylor, K.E., Biswas, N., and Bewtra, J.K. (1999). "Kinetic model for removal of phenol by horseradish peroxidase with PEG." *J. Environ. Eng*., 125 (5), 451-458.

22- Lai, Y. C., and Lin, S.C. (2005). "Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-Chlorophenol from aqueous solution." *Process Biochem*., 40, 1167-1174.

23- Nicell, J.A., Bewtra, J. K., Biswas, N., and Pierre, C.S. (1993). "Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compound from wastewater." *Canadian J. of Civil Eng*., 20 (5), 725-730.

Archive of SID

www.SID.ir