



بررسی کارایی عصاره ناخالص آنزیمی استخراج شده از ریشه ترب کوهی در حذف کاتکول

سهیلا امیری حسینی^۱، فاطمه نجات زاده^۲، اسماعیل بابانژاد^۳، فتح اله غلامی بروجنی^{۴*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران

۲- گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوی، خوی، ایران

۳- استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران

۴- دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

کاتکول یکی از ترکیبات فنلی (با فرمول شیمیایی $C_6H_6O_2$) است که به عنوان ماده خام اولیه و یا محصول نهایی صنایع شیمیایی، پتروشیمی و پالایشگاه‌های نفت است. به دلیل بالا بودن سمیت جزء آلاینده‌هایی است که باید مورد توجه قرار گیرد. کاربرد برخی فرایندهای متداول برای حذف این ترکیبات به دلیل هزینه بالا و کارایی کم با محدودیت‌هایی همراه است. امروزه استفاده از روش‌های آنزیمی به دلیل کارایی بالا بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی کارایی عصاره ترب به عنوان آنزیم ناخالص در حذف کاتکول از فاضلاب در حضور آب اکسیژنه انجام گرفت. در یک مطالعه تجربی، کارایی حذف کاتکول از فاضلاب سنتتیک در مقیاس آزمایشگاهی در فاز ناپیوسته، آنزیم ناخالص استخراج شده از گیاه ترب در فرایند حذف آنزیمی کاتکول مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام مطالعه کارایی فرایند، متغیرهای آنزیم ناخالص (۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر در لیتر)، غلظت‌های آب اکسیژنه (۰/۵۸، ۱/۱۷، ۲/۳۵ مول بر لیتر) در مدت زمان ۲۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. پس از واکنش، غلظت کاتکول خروجی فرایند با دستگاه HPLC در طول موج ۲۷۵ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت آب اکسیژنه و ثابت نگهداشتن غلظت آنزیم در ابتدا روند افزایشی در حذف کاتکول مشاهده شد، ولی پس از ده دقیقه زمان تماس با افزایش بیشتر آب اکسیژنه تغییر محسوسی در راندمان ایجاد نشد. به طوری که برای غلظت‌های آب اکسیژنه (۰/۵۸، ۱/۱۷، ۱/۷۸ مول بر لیتر) و آنزیم (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتر بر لیتر) به ترتیب راندمان حذف ۴۵٪، ۶۰٪ و ۸۰٪ به دست آمد. ولی با مقادیر غلظت‌های آب اکسیژنه (۱/۱۷، ۲/۳۵، ۳/۵۳ مول بر لیتر) و غلظت آنزیم ثابت راندمان حذف به ترتیب ۴۲٪، ۵۸٪ و ۸۱٪ بوده است. فرایند تصفیه آنزیمی به عنوان یک فرایند مناسب می‌تواند جهت حذف کاتکول و ترکیبات جانبی آن از فاضلاب مورد استفاده قرار گیرد و برای به دست آوردن راندمان حذف مناسب، بهتر است نسبت آنزیم به آب اکسیژنه و سایر متغیرها در حد بهینه تنظیم شود.

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخ دریافت:

۱۴۰۱/۰۵/۱۲

تاریخ پذیرش:

۱۴۰۱/۱۱/۲۵

دسترسی آنلاین:

۱۴۰۱/۱۱/۳۰

کلید واژه‌ها:

آنزیم،

هورس‌رادیش پراکسیداز،

کاتکول،

فاضلاب سنتتیک



The efficiency of crude enzyme extracted from horseradish root in removal of catechol

Soheyla Amiri-Hosseini¹, Fatemeh-Nejatzadeh², Esmail-Babanezhad³, Fathollah Gholami-Borujeni^{4*}

- 1- MSc Student in Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Mazandran University of Medical Sciences, Sari, Iran
- 2- Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Khoy Branch, Khoy, Iran
- 3- Assistante professor, Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Mazandran University of Medical Sciences, Sari, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Mazandran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received:
03/08/2022

Accepted:
14/02/2023

Available online:
19/02/2023

Keywords:
Enzyme,
Horse radish
peroxidase,
Catechol,
Synthetic wastewat

Abstract

Catechol is one of the phenolic compounds (with chemical formula (C₆H₆O₂)) which is used as a raw material or final product of chemical, petrochemical and oil refineries. Due to its high toxicity, Catechol is one of the pollutants that should be considered. The application of some common processes to remove these compounds is associated with limitations due to high cost and low efficiency. Today, using enzymatic methods has been given more attention due to its high efficiency. In this study, the efficiency of horseradish extract as a gross enzyme and removal of catechol from wastewater in the presence of hydrogen peroxide was investigated on a laboratory scale. In order to study the efficiency of variable enzyme processes (20, 10, 40, ml/L), hydrogen peroxide concentrations (0.58, 1.17, 2.35 mol/L) were tested for 20 minutes. Then, the outlet catechol concentration of the process was measured by HPLC at a wavelength of 275 nm. The results of this study showed that by increasing the volume of hydrogen peroxide and keeping the concentration of the enzyme constant, an increasing catechol removal trend was observed at first, but after ten minutes with a further increase in hydrogen peroxide, no significant change was observed in efficiency. So that, for different concentrations of hydrogen peroxide (0.58, 1.17, 1.78 mol/l) and enzyme (10, 20, 40 ml/L), removal efficiencies of 45%, 60% and 80% were obtained, respectively. However, with the values of hydrogen peroxide concentrations (1.17, 2.35, 3.53 mol/L) and the constant enzyme concentrations, the removal efficiency was 42%, 58% and 81%, respectively. Enzymatic treatment process as an appropriate process can be used for removal of catechol and its compounds from wastewater. To obtain the appropriate efficiency, it is better to set the ratio of enzyme to hydrogen peroxide and other variables in the reaction at the optimal levels.

* Corresponding author E-mail address: gholami_b_f@yahoo.com

مقدمه

تصفیه موثر انواع فاضلاب‌ها به ویژه فاضلاب‌های صنعتی به منظور حفظ محیط زیست از اهمیت زیادی برخوردار است. امروزه بدلیل گسترش روزافزون صنایع شیمیایی به ویژه بر پایه نفتی، پالایش نفت خام و تولید فراورده‌های مربوطه و نیاز گسترده به آب در فرایند تولید، انواع پساب‌های خطرناک حاوی ترکیباتی چون هیدروکربورها، چربی و روغن، فنل، سولفید هیدروژن، دترجنت‌ها و غیره به طبیعت وارد می‌شوند (Libutti et al., 2018; Threrujirapong, Khanitchaidecha, & Nakaruk, 2017; Udaiyappan, Hasan, Takriff, & Abdullah, 2017). در چند دهه اخیر آلودگی منابع آب به فنل و ترکیبات فنلی، باعث ایجاد نگرانی‌های زیادی در رابطه با بهداشت عمومی افراد شده است. فنل و ترکیبات فنلی عمدتاً از طریق فاضلاب‌های صنعتی وارد محیط زیست می‌شود. به دلیل اثرات سمی ترکیبات فنلی بر نفوذپذیری غشا سلولی و انعقاد سیتوپلاسمی، این ترکیبات میتوانند باعث ایجاد آسیب به سلول‌های حساس بدن انسان و موجودات زنده و در نتیجه صدمات جبران ناپذیر بهداشتی و مشکلات زیست محیطی شود (Bayramoğlu & Arica, 2008; Kalaiarasan & Palvannan, 2007; Nazari, Esmaili, Mahmoudi, Rahimi, & Moosavi-Movahedi, 2014). غلظت ترکیبات فنلی در فاضلاب‌های خروجی صنایع مربوطه معمولاً بیشتر از حد استاندارد است که این امر تصفیه اینگونه فاضلاب‌ها را ضروری می‌سازد (Udaiyappan et al., 2017). فنل و ترکیبات فنلی به عنوان آلاینده‌های الویت دار توسط سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا طبقه‌بندی شده‌اند (Martí, Aguado, Segovia, & Martínez, Bouzas, & Seco, 2011). کاتکول یکی از ترکیبات فنلی (با فرمول شیمیایی $C_6H_6O_2$) است که بعنوان ماده خام اولیه و یا محصول نهایی صنایع شیمیایی، پتروشیمی و پالایشگاه‌های نفت بوده و سمیت بسیار بالایی دارد و مطالعات نشان داده است که سمیت بالاتری نسبت به فنل دارد، بطوری که دوز کشنده (LD_{50})¹ خوراکی کاتکول برای موشها 260 mg/kg گزارش شده است و همچنین آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC)² این ترکیب را در گروه 2B (خطر سرطانزایی متوسط در انسان) طبقه بندی کرده است (Amato et al., 2018; Bramhachari, Reddy, & Kotresha, 2016; Shakir, Ghoneimy, Elkafrawy, Beheir, & Refaat, 2008; Suresh, Srivastava, & Mishra, 2012). کاتکول دارای ساختار حلقوی بوده و به شدت چشم، پوست و دستگاه تنفسی را تحریک میکند. همچنین میتواند منجر به تخریب DNA، اثر بر گلبول‌های قرمز، کاهش عملکرد کبد، کما و مرگ شود (Bukowska, Michałowicz, & Marczak, 2015). مطابق استاندارد سازمان حفاظت محیط زیست ایران حداکثر غلظت مجاز تخلیه ترکیبات فنلی به آب‌های سطحی کمتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (Moussavi, Aghapour, & Yaghmaeian, 2014). کاتکول در صنایع مختلف از جمله صنعت عکاسی، صنایع تولید کننده روغن و روان کننده‌ها، مهارکننده‌های پلیمریزاسیون، رنگ و آنتی اکسیدانها و صنایع دارویی پالایشگاه‌های نفت و تبدیل زغال سنگ مطرح می‌باشد. با توجه به خصوصیات ترکیب کاتکول از جمله قابلیت انحلال زیاد در آب، سمیت بالا و مقاومت در برابر تجزیه میتواند باعث آلودگی محیط زیست و تهدید سلامتی انسانها و حیوانات و گیاهان شود (Bukowska et al., 2015; Moussavi et al., 2014; Shakir et al., 2008). توجه به روش‌های کارآمد در حذف این ترکیب سمی و خطرناک از پساب صنایع امری ضروری به نظر می‌رسد. روش‌های متعددی برای تصفیه فاضلاب‌های دارای ترکیبات فنلی وجود دارد. روش‌های فیزیکی مانند فرایند جذب سطحی که در آن آلودگیها از سطح فاز مایع به فاز جامد منتقل می‌شود (Suresh et al., 2012). ولی همچنان اثرات زیانبار آن وجود دارد. روش‌های شیمیایی مانند فرایندهای فتوکاتالیستی، فنتون، فتوفنتون و فرایندهای ازن‌زنی است، که جز فرایندهای گرانیقیمت مطرح می‌باشند (Bayramoğlu & Arica, 2008; J. Xiao et al., 2016). همچنین تشکیل محصولات جانبی حاصل از این فرایندها، میتواند خطرات زیادی برای سلامت انسان و محیط زیست داشته باشد. روش‌های بیولوژیک، روش‌های نسبتاً ارزان قیمت قابل اعتماد و کارآمد در حذف آلودگیها از محیط‌های آبی هستند ولی در حذف ترکیبات سمی نیاز به سازگاری اولیه دارند و همچنین لجن تولیدی در فرایندهای بیولوژیکی میتواند از محدودیت‌های این روش‌ها محسوب شود (Moussavi et al., 2014). 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 (Chiong, Lau, Lek, Koh, & Danquah, 2016; Gholami, Borujeni, Faramarzi, Nejatizadeh-Barandozi, & Mahvi, 2013). مزایای تصفیه آنزیمی نسبت به سایر روش‌های تصفیه عبارتند از: کارایی بالای آنزیم‌ها در حذف ترکیبات مقاوم به تجزیه بیولوژیکی، بهره‌برداری در غلظت پایین و بالای آلاینده، بهره‌برداری در شرایط شوک‌های غلظت و دبی، کاهش حجم لجن تولیدی، سهولت کنترل فرایند و سرعت بالای واکنش.

¹ Lethal Dose² International Agency for Research on Cancer

با توجه به مزایای گفته شده مطالعات به طرف تصفیه آنزیمی و استفاده از آنزیم در تصفیه فاضلابهای خطرناک و خاک‌های آلوده معطوف شده است. از مهمترین آنزیم‌هایی که مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است پراکسیدازها می‌باشند. پراکسیدازها آنزیم‌های اکسیداسیون- احیاء می‌باشند که از برخی از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان تولید می‌شود. پراکسیداز آنزیمی است که بطور 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 (Horseradish) است. مهمترین استفاده از این آنزیم‌ها در ساخت کیت‌های ایمنوهایستوشیمی و آنزیمی است (Gholami-Borujeni et al., 2013). پراکسیدازها متعاقب فعال شدن با آب اکسیژنه می‌توانند بسیاری از مواد آروماتیک را اکسید کنند. این آنزیم‌ها واکنشهای زیادی را کاتالیز می‌کنند ولی همه آنها نیاز به پراکسیدی مثل آب اکسیژنه 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 (Al-Ansari et al., 2009; Bayramoğlu & Arica, 2008; Chiong et al., 2016).

- 1) $E + H_2O_2 \rightarrow E_i + H_2O$
- 2) $E_i + AH_2 \rightarrow E_{ii} + AH^*$
- 3) $E_{ii} + AH_2 \rightarrow E + AH^* + H_2O$

در این فرمول‌ها:

E: آنزیم

E_i: ترکیب میانی ۱

E_{ii}: ترکیب میانی ۲

AH₂: ترکیب حلقوی (در این مطالعه کاتکول)

AH⁰: رادیکال آزاد

آنزیم با استفاده از آب اکسیژنه اکسید شده و به فرم ترکیب میانی فعال ۱ (E_i) تبدیل می‌شود این ترکیب نیز یک مولکول از ترکیب حلقوی (کاتکول) 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 (Bayramoğlu & Arica, 2008; Gholami-Borujeni et al., 2013).

مطالعات مختلفی در زمینه کاربرد آنزیم HRP بصورت آزاد و تثبیت شده بر روی بسترهای مختلف در حذف آلاینده‌های زیست محیطی مانند رنگ، روغن و فنل انجام شده است (Al-Ansari et al., 2009; Forgiarini & de Souza, 2007; Gholami-Borujeni et al., 2013; Singh, Singh, & Singh, 2015). با توجه به مکانیزم فعالیت این آنزیم، امکان استفاده از آن به منظور اکسیداسیون سایر ترکیبات حلقوی از جمله کاتکول نیز وجود دارد. بررسی متون نشان می‌دهد تاکنون مطالعه‌ای در زمینه استفاده از آنزیم HRP در اکسیداسیون کاتکول انجام نشده است. در این مطالعه به بررسی کارایی سیستم بیوکاتالیستی (HRP (Horseradish Peroxidase) و H₂O₂ در اکسیداسیون کاتکول از فاضلاب سنتتیک پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی - کاربردی بود که به صورت ناپیوسته در مقیاس آزمایشگاهی بر روی غلظت‌های مختلفی از محلول سنتتیک حاوی آنزیم ناخالص، آب اکسیژنه، کاتکول انجام گرفت.

مشخصات مواد مورد استفاده

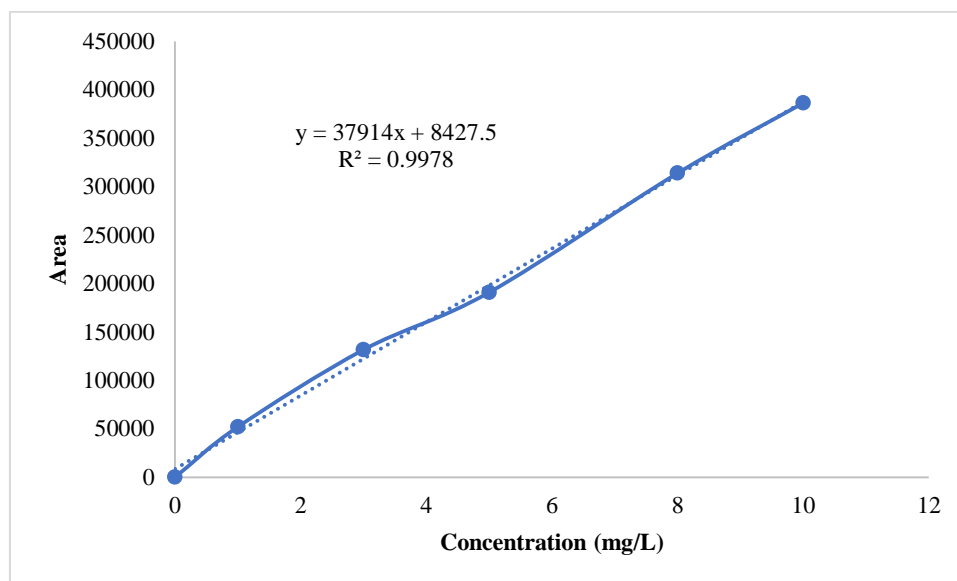
مواد مورد نیاز در این پژوهش شامل کاتکول با درجه خلوص ۹۵٪، آب اکسیژنه ۳۰٪، متانول، آب HPLC گرید، از شرکت Sigma - Aldrich خریداری شده است. محلول استوک کاتکول (۱۰۰۰ میلی گرم برلیتر) با استفاده از آب و متانول (به نسبت ۵۰ درصد حجمی) به عنوان حلال تهیه شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شدند.

پروتکل انجام آزمایشات

در این تحقیق عصاره ترب (پس از عبور از صافی) به عنوان منبع آنزیم پراکسیداز جهت اکسیداسیون آنزیمی کاتکول مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه عصاره، ترب تهیه و پس از شستشو با استفاده از خردکن برقی، ترب را خرد کرده و عصاره آن را گرفته و پس از عبور از صافی به عنوان آنزیم ناخالص پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت. جهت انجام مطالعه غلظت‌های اولیه از کاتکول با مقادیر (۱، ۳، ۵، ۸، ۱۰ میلی گرم در لیتر با استفاده از محلول استوک تهیه شد. برای هر کدام از غلظت‌ها، نمونه‌های با مقادیر ۵ سی سی از نمونه به اضافه ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه و ۵۰ میکرولیتر آنزیم ناخالص تهیه و درون سل شیشه ای ریخته و بمدت زمان تماس ۲۰ دقیقه به دستگاه تزریق HPLC گردید. در مراحل بعد با دوبرابر کردن یک بار آب اکسیژنه و ثابت نگهداشتن غلظت آنزیم ناخالص و بار دوم با دوبرابر کردن غلظت آنزیم ناخالص و ثابت نگهداشتن غلظت آب اکسیژنه نمونه‌ها با زمان تماس ۲۰ دقیقه به دستگاه تزریق گردید. تمامی مطالعات در مقیاس آزمایشگاهی و دردمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتیگراد) صورت گرفت.

اندازه‌گیری غلظت کاتکول باقیمانده

برای اندازه‌گیری کاتکول باقی مانده منحنی استاندارد با استفاده از HPLC رسم گردید. غلظت کاتکول با استفاده از دستگاه HPLC با دو فاز آب HPLC گردید و متانول (با نسبت حجمی ۵۰ درصد به ۴۵ درصد) مورد آنالیز قرار گرفت. سرعت جریان ۰/۷۵ میلی لیتر در دقیقه و فاز متحرک آب HPLC گردید و متانول (۵۵:۴۵ حجمی) بود که با طول موج ۲۷۵ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت. پیش از سنجش باقیمانده کاتکول منحنی کالیبراسیون دستگاه با استفاده از غلظت‌های کاتکول ترسیم شد. که این منحنی در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- منحنی کالیبراسیون دستگاه HPLC مورد استفاده در سنجش کاتکول

محاسبه راندمان حذف کاتکول

پس از انجام فرایند اکسیداسیون آنزیمی، غلظت ثانویه کاتکول آنالیز شد و راندمان حذف با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$Efficiency(\%) = \frac{C_{out} - C_{in}}{C_{out}} \times 100$$

که در این معادله C_{in} غلظت کاتکول اولیه و C_{out} غلظت کاتکول ثانویه بوده است.

تعیین میزان COD^۱ ایجاد شده توسط کاتکول

مقدار COD یا میزان اکسیژن خواهی شیمیایی فاضلاب از جمله فاکتورهای مهم و تاثیرگذار در فرآیند تصفیه فاضلاب‌های صنعتی و شهری است که با مقدار مواد اکسید شونده در پساب‌ها ارتباط مستقیم دارد. این فاکتور در واقع مقدار اکسیژن مورد نیاز برای اکسید شدن مواد شیمیایی موجود در فاضلاب را مشخص می‌کند. هر چه مواد شیمیایی موجود در پساب‌ها بیشتر باشد، به همان نسبت به اکسیژن بیشتری برای اکسیداسیون آنها نیاز است و در نهایت باعث افزایش مقدار پارامتر COD در فاضلاب می‌شود. به عبارت دیگر، هر چه مقدار اکسیژن خواهی شیمیایی فاضلاب بیشتر باشد، مقدار مواد شیمیایی اکسید شونده در آن بیشتر بوده و پساب‌ها آلوده تر هستند.

برای بررسی میزان COD ایجاد شده توسط کاتکول غلظت‌های (۱، ۳، ۵، ۸، ۱۰ میلی گرم در لیتر از کاتکول) تهیه شده و برای هر کدام از غلظت‌ها مقدار ۲/۵ میلی لیتر از غلظت کاتکول و ۱/۵ میلی لیتر دی کرومات پتاسیم و ۳/۵ میلی لیتر از اسیدهاضم به ویال COD اضافه کرده، به مدت ۲ ساعت در راکتور COD قرار داده بعد سرد شدن نمونه با کمک (FAS) فرو آمونیوم سولفات ۰/۰۲۵ نرمال تیتراسیون را انجام داده تا رنگ آجری نمایان شود با نمایان شدن رنگ عمل تیتراژ را قطع نموده و مقدار FAS مصرفی یادداشت شد. همین مراحل برای نمونه شاهد هم انجام شد و با کمک فرمول زیر مقدار COD بدست آمد.

$$FAS = A \text{ مصرفی برای شاهد}$$

$$FAS = B \text{ مصرفی برای نمونه}$$

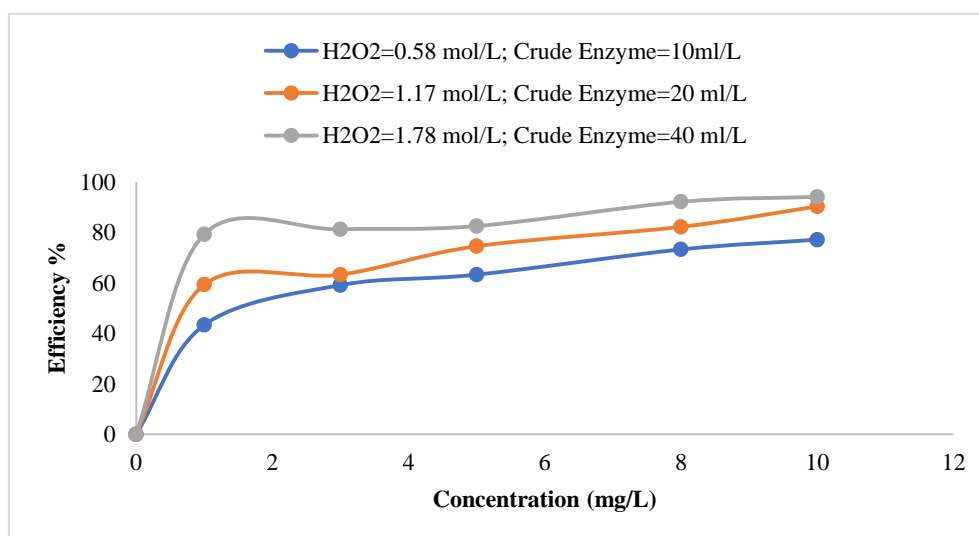
$$N = \text{نرمالیتت FAS}$$

$$V = \text{حجم نمونه بر حسب میلی لیتر}$$

$$COD = \frac{(A-B) \times N \times 8000}{V}$$

یافته‌های پژوهش

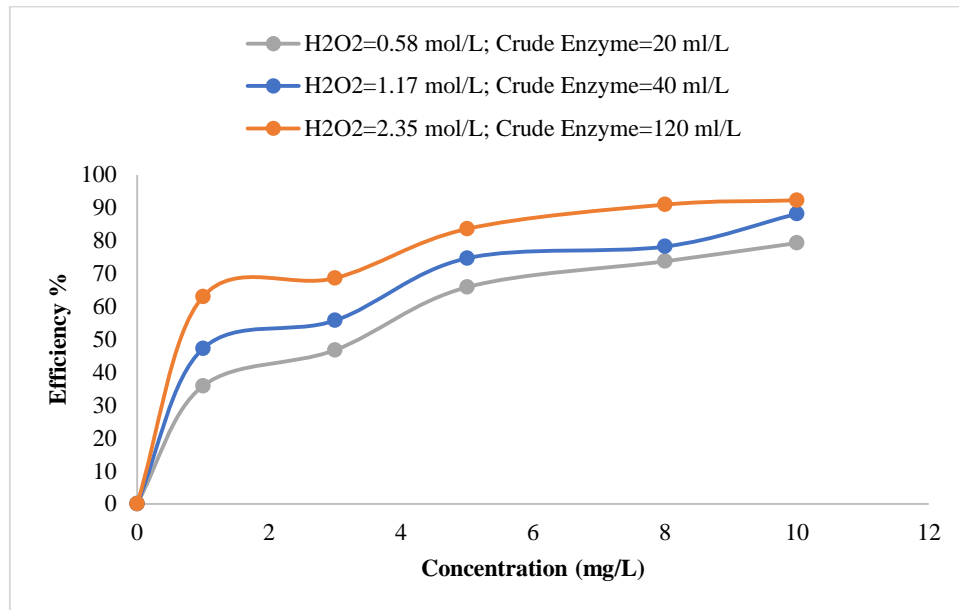
به منظور تعیین اثر غلظت متغیرهای مختلف (غلظت کاتکول، آنزیم و آب اکسیژنه) در راندمان حذف کاتکول در مقیاس پیوسته، با ثابت نگه داشتن سایر متغیرها، یک متغیر را تغییر داده و راندمان حذف کاتکول مورد بررسی قرار گرفت. اثر غلظت آب اکسیژنه و عصاره آنزیمی بر فرایند حذف کاتکول با غلظت‌های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۲ داده نشان داده شده است، با افزایش مقدار غلظت آب اکسیژنه و ثابت نگهداشتن مقدار آنزیم ناخالص، راندمان روند صعودی داشته اما افزایش مقادیر بیش از حد آب اکسیژنه اثر زیادی بر راندمان حذف نداشته و دارای اثر بازدارندگی بر عملکرد آنزیم بوده و فقط باعث افزایش هزینه تصفیه و کاهش راندمان حذف شد.



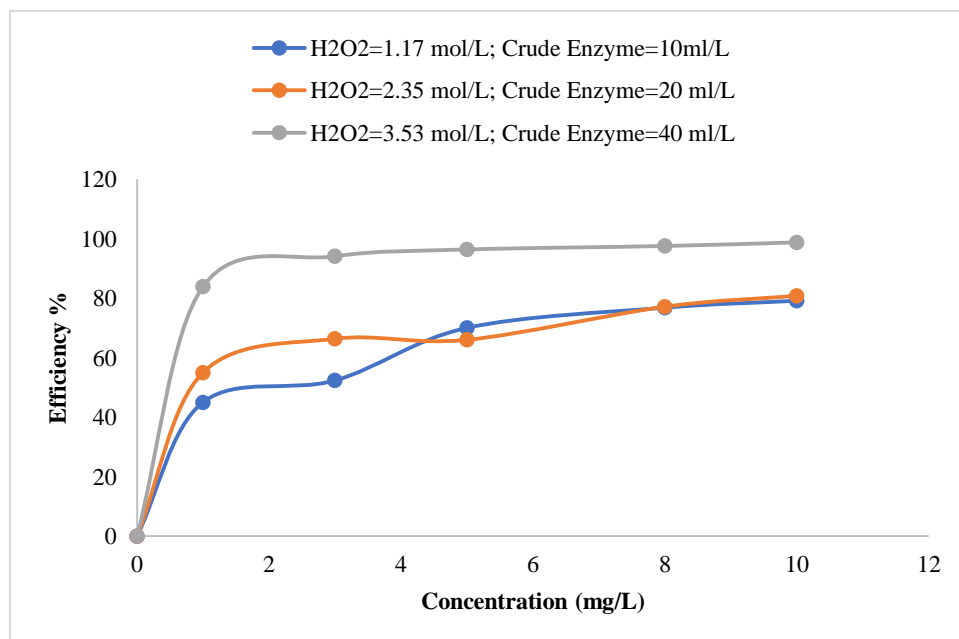
شکل ۲ - اثر غلظت آب اکسیژنه و عصاره آنزیمی بر فرایند حذف کاتکول با غلظت‌های مختلف

^۱ Chemical Oxygen Demand

نتایج بررسی اثر تناوب افزودن آب اکسیژنه و آنزیم ناخالص (با غلظت بالا) و همچنین تناوب افزودن آب اکسیژنه (با غلظت بالا) و آنزیم ناخالص به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ آورده شده است. براساس شکل ۳ و ۴ برای بررسی تاثیر تناوب آب اکسیژنه و آنزیم ناخالص به فرایند با توجه به چرخه فعالیت آنزیمی که در مقدمه به آن اشاره شد در هر مرحله از فعالیت آنزیمی که کمپلکس آنزیم سوپسترا ایجاد می‌شود در هر گردش دو ملکول ترکیب حلقوی اکسید می‌شود. با توجه به آنالیز داده‌ها در شکل به نظر می‌رسد که افزودن مرحله‌ای آنزیم ناخالص-آب اکسیژنه به فرایند می‌تواند از غیرفعال شدن آنزیم در اثر کاتکول جلوگیری نماید و منجر به افزایش راندمان فرایند آنزیمی شود.



شکل ۳- تناوب افزودن آب اکسیژنه و آنزیم ناخالص (با غلظت بالا) با حذف غلظت‌های مختلف کاتکول

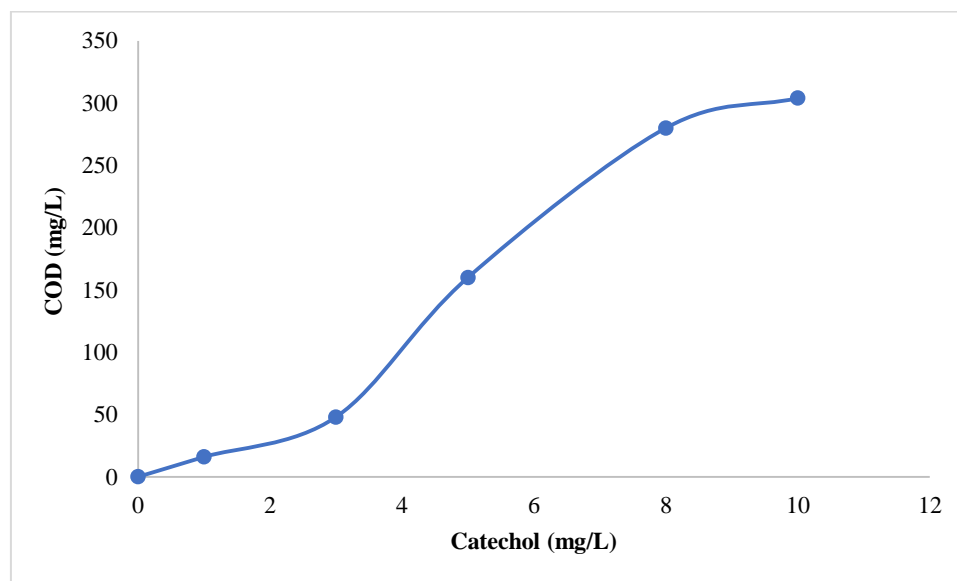


شکل ۴- تناوب افزودن آب اکسیژنه (با غلظت بالا) و آنزیم ناخالص در حذف غلظت‌های مختلف کاتکول

نتایج مطالعات نشان داد که در نبود آب اکسیژنه، آنزیم ناخالص به تنهایی قادر به فعال‌سازی نمی‌باشد. با افزایش غلظت آب اکسیژنه و ثابت نگه داشتن غلظت آنزیم ناخالص در مدت زمان ۲۰ دقیقه نشان می‌دهد تا یک حد مشخص (۱ میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش راندمان حذف شد.

بررسی میزان COD ایجاد شده با غلظت‌های مختلف کاتکول

بررسی آزمایش COD برای غلظت‌های (۱، ۳، ۵، ۸، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) از کاتکول که آنالیز آن در شکل ۵ نشان داده شده است. همان‌طوری که مشاهده می‌شود با ارتباط نسبتاً خطی بین میزان COD و غلظت کاتکول در محلول وجود دارد.



شکل ۵- میزان COD ایجاد شده با غلظت‌های مختلف کاتکول

بررسی اثر تصفیه آنزیمی در کاهش COD

به‌منظور بررسی کارایی فرایند تصفیه در کاهش بار آلودگی پساب تصفیه شده با فرایند آنزیمی، از پارامتر COD استفاده شده است که نشان‌دهنده بار آلودگی مواد آلی است. به این منظور در شرایط بهینه (شرایطی که بیشترین کارایی حذف کاتکول مشاهده شده است)، میزان COD خروجی اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در شکل ۵ مشخص شد با افزایش غلظت کاتکول، میزان COD تولیدی افزایش می‌یابد بطوری که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کاتکول ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر COD به آب اضافه می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد در شرایط بهینه و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کاتکول، COD خروجی برابر با ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بوده است. با توجه با استاندارد خروجی پساب‌های تصفیه شده سازمان حفاظت محیط زیست ایران که استاندارد COD خروجی پساب را برای تخلیه به آبهای سطحی و تخلیه به چاه‌های جاذب ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر بیان داشته است، این میزان COD بسیار کمتر از حد استاندارد تخلیه پساب به محیط زیست است.

بحث و نتیجه گیری

نتایج بررسی اثر غلظت آب اکسیژنه و عصاره آنزیمی بر فرایند حذف کاتکول با غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد با افزایش مقدار غلظت آب اکسیژنه و ثابت نگهداشتن مقدار آنزیم ناخالص، راندمان روند صعودی داشته است. این نتایج در مطالعه جوان و همکاران در سال ۲۰۲۰ نیز گزارش شده است و نسبت بهینه آنزیم به آب اکسیژنه برابر ۰/۵ برای حذف آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین بدست آمد (Javan, Zazouli, Babanezhad, & Gholami-Borujeni, 2020). بیشترین راندمان حذف کاتکول در غلظت ۱/۷۸ مول بر لیتر آب اکسیژنه و غلظت ۴ میلی‌لیتر بر لیتر آنزیم به‌دست آمد به‌طوری که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کاتکول، راندمان حذف به ۹۱٪ رسید.

بررسی اثر غلظت آب اکسیژنه در حذف کاتکول نشان داد با افزایش غلظت این ترکیب راندمان حذف افزایش یافته ولی در غلظت‌های بالاتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر اثر کاهشی داشته است. بالا بودن درصد حذف در نتیجه بالا بودن تعداد سایت‌های فعال موجود در آنزیم و اتصال با ملکول‌های بستر (کاتکول) می‌باشد که میزان حذف بالاتری را نشان می‌دهد. اما بعد از آن در افزایش راندمان تغییر محسوسی ایجاد نگردید. که از دلایل آن می‌توان به بالا بودن نسبت استکیومتری آب اکسیژنه در مقایسه با آنزیم ناخالص اشاره کرد که باعث غیرفعال شدن آنزیم شد و همچنین اشباع شدن سایت‌های فعال آنزیم که باعث کاهش کارایی آب اکسیژنه در غلظت‌های بالا می‌شود. بنابراین غلظت بهینه آب اکسیژنه و آنزیم می‌تواند یک عامل موثر در واکنش‌های آنزیمی محسوب شود که این نتایج با مطالعات محققان دیگر در زمینه کاربرد آنزیم در حذف آلاینده مطابقت دارد (Chiong et al., 2016; Ghaneian & Ghanizadeh, 2009; Gholami- Borujeni, Nejatzaeh, & Jamalana, 2018). (Alemzadeh & Nejati, 2009). ژیانو^۱ و همکارانش در سال ۲۰۲۰، میزان حذف BPA با افزودن غلظت آنزیم هورس رادیش پراکسیداز تا ۲۰۰ میکرو گرم در لیتر به سرعت از ۰ به ۹۸/۷ درصد افزایش یافت مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد میزان حذف BPA نشان داد که افزایش غلظت آنزیم بیشتر از ۲۰۰ میکرو گرم در لیتر، تاثیر کمی در حذف BPA داشت. بنابراین غلظت مطلوب HRP مطلوب ۲۰۰ میکرو لیتر بود. هنگامی که غلظت آب اکسیژنه به بالاتر از ۲۰۰ میکرو گرم در لیتر رسید بازه حذف BPA به تدریج کاهش می‌یابد که با نتایج این مطالعه سازگاری دارد (F. Xiao, Xiao, Jiang, & Wang, 2020).

برای بررسی نتایج غلظت‌های آب اکسیژنه (۰/۵۸، ۱/۱۷، ۲/۳۵، ۴/۰، ۱۲۰ میلی لیتر در لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعات نشان داد که افزودن مرحله ای واکنشگرها (آنزیم ناخالص، آب اکسیژنه) در ابتدای واکنش بدلیل پایین بودن غلظت واکنشگرها نسبت به سوبسترا (کاتکول) راندمان حذف در مدت زمان ۲۰ دقیقه اول افزایش قابل توجهی مشاهده نشد اما با مرور زمان و افزایش غلظت‌ها راندمان فرایند افزایش قابل توجهی داشت که نتایج آزمایشات با مطالعه همکاران در این زمینه مطابقت داشت. بررسی‌های انجام شده نشان داد در بسیاری از مطالعات در مورد اثر متناوب افزودن واکنشگرها بررسی انجام نشده است (Al-Kassim, Taylor, Nicell, Bewtra, & Biswas, 1994; Gholami-Borujeni et al., 2018).

در مطالعه کلسوم^۲ و همکارانش که در سال ۲۰۲۳ انجام شد، از آنزیم استخراج شده هورس رادیش پراکسیداز برگ مورینگا اولفرا استفاده شد که بصورت آزاد و تثبیت شده بر روی نانوذرات اکسید آهن مورد استفاده قرار گرفت. از این آنزیم به منظور حذف رنگهای ری اکتیو بلو (RB) و دایرکت بلو (DB) استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد آنزیم بصورت آزاد منجر به حذف ۸۶٪ رنگهای ری اکتیو بلو (RB) و ۷۵٪ دایرکت بلو (DB) شده است. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد آنزیم تثبیت شده منجر به افزایش راندمان حذف رنگهای مورد مطالعه شده است (Kalsoom et al., 2023). در مطالعه لیو^۳ و همکارانش در سال ۲۰۲۲، از آنزیم هورس رادیش پراکسیداز به همراه فنتون در حذف سولفامتازین استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد این آنزیم قادر است این ترکیب پیچیده را تجزیه کند. همچنین فنتون منجر به افزایش راندمان فرایند شده است (Liu, Huang, & Liu, 2022).

با توجه به آثار سوء بهداشتی و زیست محیطی کاتکول و به دلیل مزایای تصفیه آنزیمی نسبت به سایر روش‌های متداول تصفیه از جمله کارایی بالا در حذف ترکیبات مقاوم به تجزیه بیولوژیکی، بهره‌برداری در غلظت‌های مختلف کم، متوسط و بالای آلاینده، امروزه مطالعات به طرف تصفیه آنزیمی و استفاده از آن در تصفیه فاضلاب‌های صنعتی و کاهش اثرات سوء آنها کشیده شده است. تصفیه آنزیمی از دیرباز به دلیل مزایایی که نسبت به سایر روش‌های متداول تصفیه ترکیبات سمی دارد، مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. آنزیم پراکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌های خانواده اکسیدوردوکتازها بوده و با EC:1.11.17 مشخص می‌شوند، که در صنایع شیمیایی، زیست محیطی، دارویی و بیوتکنولوژی کاربرد دارد. این آنزیم از منابع مختلف گیاهی مانند ریشه ترب قابل استخراج می‌باشد و با توجه به خاصیت اکسیداسیون آن در حضور آب اکسیژنه، می‌تواند به عنوان یک منبع آنزیمی ارزان قیمت در تجزیه ترکیبات سمی و خطرناک مورد استفاده قرار گیرد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد استفاده از عصاره ناخالص آنزیمی به همراه آب اکسیژنه می‌تواند به عنوان یک فرایند آنزیمی در تجزیه و اکسیداسیون کاتکول موثر باشد به طوری که بتواند COD ایجاد شده توسط این ترکیب شیمیایی را در پساب تصفیه شده به حد استاندارد و قابل قبول برای تخلیه به محیط زیست برساند. پیشنهاد می‌شود در آینده مطالعات دیگری در زمینه انواع محصولات جانبی این فرایند و همچنین میزان سمیت این محصولات انجام شود.

¹ Xiao² Kalsoom³ Liu

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح پژوهشی با عنوان " بررسی میزان حذف کاتکول از فاضلاب مصنوعی طی فرایند آنزیمی با استفاده از آنزیم هورس رادیش پر اکسیداز" با کد IR.MAZUMS.REC.1397.1360 مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است. نویسندگان از همکاران و حمایت آن معاونت کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

- Al-Ansari, M. M., Steevensz, A., Al-Aasm, N., Taylor, K., Bewtra, J., & Biswas, N. (2009) Soybean peroxidase-catalyzed removal of phenylenediamines and benzenediols from water. *Enzyme and microbial technology*, 45(4), 253-260.
- Al- Kassim, L., Taylor, K. E., Nicell, J. A., Bewtra, J. K., & Biswas, N. (1994) Enzymatic removal of selected aromatic contaminants from wastewater by a fungal peroxidase from *Coprinus macrorhizus* in batch reactors. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 61(2), 179-182.
- Alemzadeh, I., & Nejati, S. (2009) Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2-3), 1082-1086.
- Amato, A., Migneco, L. M., Martinelli, A., Pietrelli, L., Piozzi, A., & Francolini, I. (2018) Antimicrobial activity of catechol functionalized-chitosan versus *Staphylococcus epidermidis*. *Carbohydrate polymers*, 179, 273-281.
- Bayramoğlu, G., & Arıca, M. Y. (2008) Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *Journal of hazardous materials*, 156(1-3), 148-155.
- Bramhachari, P., Reddy, D. R. S., & Kotresha, D. (2016) Biodegradation of catechol by free and immobilized cells of *Achromobacter xylosoxidans* strain 15DKVB isolated from paper and pulp industrial effluents. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 7, 36-44.
- Bukowska, B., Michałowicz, J., & Marczak, A. (2015) The effect of catechol on human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Environmental toxicology and pharmacology*, 39(1), 187-193.
- Chiong, T., Lau, S. Y., Lek, Z. H., Koh, B. Y., & Danquah, M. K. (2016) Enzymatic treatment of methyl orange dye in synthetic wastewater by plant-based peroxidase enzymes. *Journal of environmental chemical engineering*, 4(2), 2500-2509.
- Forgiarini, E., & de Souza, A. A. U. (2007) Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, 147(3), 1073-1078.
- Ghaneian, M., & Ghanizadeh, G. (2009) Application of enzymatic polymerization process for the removal of phenol from synthetic wastewater. *Iranian Journal of Health and Environment*, 2(1), 46-55.
- Gholami-Borujeni, F., Faramarzi, M. A., Nejatizadeh-Barandozi, F., & Mahvi, A. H. (2013) Oxidative degradation and detoxification of textile azo dye by horseradish peroxidase enzyme. *Fresen Environ Bull*, 22, 739-744.
- Gholami-Borujeni, F., Nejatizadeh, F., & Jamal, M. (2018) Efficacy of horseradish peroxidase (HRP) enzyme process and H₂O₂ in removal of linear alkyl benzene sulfonate (LAS) from aqueous solution. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 27(157), 217-229.
- Javan, F., Zazouli, M. A., Babanezhad, E., & Gholami-Borujeni, F. (2020) Removal efficiency of Enzyme Horseradish Peroxidase in Removal of Tetracycline and Ciprofloxacin from Synthetic Wastewater. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 30(189), 95-106.
- Kalaiarasan, E., & Palvannan, T. (2014) Removal of phenols from acidic environment by horseradish peroxidase (HRP): aqueous thermostabilization of HRP by polysaccharide additives. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(2), 625-634.
- Kalsoom, U., Khalid, N., Ibrahim, A., Ashraf, S. S., Bhatti, H. N., Ahsan, Z., et al. (2023) Biocatalytic degradation of reactive blue 221 and direct blue 297 dyes by horseradish peroxidase immobilized on iron oxide nanoparticles with improved kinetic and thermodynamic characteristics. *Chemosphere*, 312, 137095.
- Libutti, A., Gatta, G., Gagliardi, A., Vergine, P., Pollice, A., Beneduce, L., et al. (2018) Agro-industrial wastewater reuse for irrigation of a vegetable crop succession under Mediterranean conditions. *Agricultural Water Management*, 196, 1-14.
- Liu, H., Huang, Z., & Liu, C. (2022) Development of a horseradish peroxidase-Fenton-like system for the degradation of sulfamethazine under weak acid condition. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.

- Martí, N., Aguado, D., Segovia-Martínez, L., Bouzas, A., & Seco, A. (2011) Occurrence of priority pollutants in WWTP effluents and Mediterranean coastal waters of Spain. *Marine pollution bulletin*, 62(3), 615-625.
- Moussavi, G., Aghapour, A. A., & Yaghmaeian, K. (2014) The degradation and mineralization of catechol using ozonation catalyzed with MgO/GAC composite in a fluidized bed reactor. *Chemical Engineering Journal*, 249, 302-310.
- Nazari, K., Esmaeili, N., Mahmoudi, A., Rahimi, H., & Moosavi-Movahedi, A. (2007) Peroxidative phenol removal from aqueous solutions using activated peroxidase biocatalyst. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 226-233.
- Shakir, K., Ghoneimy, H., Elkafrawy, A., Beheir, S. G., & Refaat, M. (2008) Removal of catechol from aqueous solutions by adsorption onto organophilic-bentonite. *Journal of hazardous materials*, 150(3), 765-773.
- Singh, R. L., Singh, P. K., & Singh, R. P. (2015) Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes—A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 21-31.
- Suresh, S., Srivastava, V. C., & Mishra, I. M. (2012) Adsorption of catechol, resorcinol, hydroquinone, and their derivatives: a review. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 3(1), 1-19.
- Threrujirapong, T., Khanitchaidecha, W., & Nakaruk, A. (2017) Treatment of high organic carbon industrial wastewater using photocatalysis process. *Environmental nanotechnology, monitoring & management*, 8, 163-168.
- Udaiyappan, A. F. M., Hasan, H. A., Takriff, M. S., & Abdullah, S. R. S. (2017) A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 20, 8-21.
- Xiao, F., Xiao, P., Jiang, W., & Wang, D. (2020) Immobilization of horseradish peroxidase on Fe₃O₄ nanoparticles for enzymatic removal of endocrine disrupting chemicals. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(19), 24357-24368.
- Xiao, J., Wang, C., Lyu, S., Liu, H., Jiang, C., & Lei, Y. (2016) Enhancement of Fenton degradation by catechol in a wide initial pH range. *Separation and Purification Technology*, 169, 202-209.