

## بررسی کارایی فرایند پلیمریزاسیون آنزیمی در حذف فنل از فاضلاب مصنوعی

محمد تقی قانعیان<sup>۱</sup>، قادر غنی زاده<sup>۲</sup>

نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، مجتمع آموزشی ولایت، دانشکده بهداشت، گروه بهداشت محیط [qanizadeh@yahoo.com](mailto:qanizadeh@yahoo.com)

دریافت: ۸۷/۱۱/۳۰ پذیرش: ۸۸/۳/۱۳

### چکیده

**زمینه و هدف:** ترکیبات فنلی در فاضلاب صنایع مختلف موجود بوده و جزء آلاینده های دارای تقدم می باشند. کاربرد برخی فرایندهای متداول حذف این ترکیبات از فاضلاب های صنعتی، به دلیل هزینه بالا و کارایی پایین با محدودیت هایی مواجه می باشند. فرایند پلیمریزاسیون آنزیمی به عنوان یک روش نوین، پتانسیل رقابت با روش های متداول را دارد. این مطالعه با هدف بررسی کارایی عصاره گیاه تربچه (*Raphanus Sativus*) به عنوان منبع آنزیم پراکسیداز در پلیمریزاسیون و حذف فنل از فاضلاب مصنوعی در حضور پراکسید هیدروژن انجام شد. روش بررسی: در این مطالعه کارایی حذف فنل از فاضلاب مصنوعی در مقیاس آزمایشگاهی و به صورت منقطع بررسی شده است. مقادیر غلظت فنل و فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از اسپکتروفتومتر و از طریق روش رنگ سنجی (۴- آمینو آنتی پیرین) اندازه گیری گردید. غلظت فنل در فاضلاب مصنوعی مورد آزمایش ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر و میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره گیاه تربچه ۳/۱۰۷ (واحد بر میلی لیتر) بوده است.

**یافته ها:** نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش حجم عصاره گیاه، راندمان حذف فنل افزایش می یابد. به طوری که برای حجم عصاره ۵ و ۵۰ میلی لیتر، به ترتیب راندمان حذف ۷/۶ و ۹۸/۲ درصد بوده است. به علاوه با افزایش تعداد دفعات افزودن عصاره گیاه و پراکسید هیدروژن، راندمان حذف بهبود یافته، به طوری که در افزودن یک مرحله ای و سه مرحله ای پراکسید هیدروژن و زمان واکنش ۳ ساعت، راندمان حذف فنل به ترتیب ۸۴/۲ و ۹۳/۱ درصد بوده است.

**نتیجه گیری:** فرایند پلیمریزاسیون آنزیمی به عنوان یک فرایند مناسب می تواند جهت حذف فنل و ترکیبات آن از فاضلاب مورد استفاده قرار گیرد. جهت دستیابی به راندمان مناسب لازم است نسبت آنزیم به فنل و نسبت پراکسید هیدروژن به فنل و تواتر افزودن عوامل شرکت کننده در واکنش در حد مناسب تنظیم گردد.

**واژگان کلیدی:** پلیمریزاسیون، آنزیم پراکسیداز، عصاره گیاه تربچه، فنل، فاضلاب مصنوعی

۱- دکترای بهداشت محیط، استادیار گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

۲- دکترای بهداشت محیط، استادیار گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

مقدمه

فنل (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O) با وزن مولکولی ۹۴/۱۱ گرم بر مول، یک هیدروکربن حلقوی است که در حالت خالص بی رنگ یا جامد سفید می باشد. ترکیبات فنلی هیدروکربن هایی هستند که در ساختمان مولکولی آنها گروه هیدروکسیل با اتم کربن حلقه بنزنی پیوند تشکیل داده است. فنل به صورت طبیعی از قطران زغال سنگ و تقطیر بنزین و به صورت مصنوعی در اثر حرارت دادن سولفات بنزن سدیمی با سود آبدار در فشار بالا تولید می شود. فنل ها به طور گسترده در صنایع پتروشیمی و صنایع شیمیایی مختلف نظیر صنایع تولید پلاستیک، مواد منفجره، تولید عایق، چسب های صنعتی، عطر، صابون، رنگ، دترژنت و مواد گندزدا، عوامل حفاظت کننده چوب، نگهدارنده مواد غذایی و حتی در تولید دارو (ترکیب ۰/۱ تا ۴/۵ درصد به صورت مایع، ژل، پماد، لوسیون و اسپری) کاربرد دارند (۱).  
 باتوجه به کاربرد گسترده فنل در فرایندهای صنعتی، این آلاینده به طرق مختلف به محیط زیست وارد می شود. ترکیبات فنلی دارای حلالیت زیادی در آب بوده و در نتیجه امکان حضور آنها در منابع آب وجود دارد. حلالیت ترکیبات فنلی به نوع ماده وابسته است، برای مثال حلالیت فنل غیراشباع در آب ۷۷/۹ گرم در لیتر، ۲، ۴- دی کلروفنل ۹/۷ گرم در لیتر و ۲، ۴، ۶- تری کلروفنل ۰/۸ گرم در لیتر است. باتوجه به ویژگی فنل نظیر حلالیت در آب و پایداری در محیط زیست، این ترکیب برای مدت زمان طولانی در محیط باقی مانده و از طریق منابع آب قادر به انتقال تا مسافت های طولانی است. ترکیبات فنلی به دلیل ویژگی های خاص نظیر سمیت، اثر بر طعم و بوی آب و اثر سوء بر سلامت انسان و موجودات زنده، براساس طبقه بندی آژانس حفاظت محیط زیست امریکا جزء آلاینده های دارای تقدم می باشند (۲، ۳، ۱). آلاینده های دارای تقدم ترکیبات آلی یا معدنی با اثرات شناخته شده یا مشکوک سرطان زایی، جهش زایی، آسیب رسانی به جنین یا سم زایی بسیار شدید می باشند (۴).  
 بنابراین تشخیص، شناسایی و تعیین میزان ترکیبات فنلی در

محیط زیست و به ویژه منابع آب و پایش های زیست محیطی متعاقب آن اهمیت زیادی در کنترل انتشار این مواد و کاهش اثرات این آلاینده ها بر محیط زیست دارد.  
 فرایندهای متداول حذف ترکیبات فنلی و آمین های آروماتیک از فاضلاب های صنعتی شامل استخراج، جذب سطحی با کربن فعال، تقطیر بابخار، اکسیداسیون شیمیایی و بیولوژیکی، روش های الکتروشیمیایی، پرتو دهی و غیره است. غالب این روش ها دارای معایبی نظیر هزینه بالای تصفیه، نیاز به تصفیه اضافی، تشکیل فراورده های جانبی خطرناک، راندمان پایین و قابلیت کاربرد برای غلظت های محدودی از آلاینده می باشند.  
 با توجه به این محدودیت ها، در سال های اخیر کاربرد آنزیم پراکسیداز جهت حذف فنل از جریان فاضلاب های صنعتی مطرح شده است. در فرایند پلیمریزاسیون آنزیمی، فنل در حضور آنزیم پراکسیداز و پراکسید هیدروژن اکسید و به رادیکال فنوکسی تبدیل می شود، این رادیکال ها با انجام یکسری واکنش های متوالی در طی چند دقیقه به پلیمرهای نامحلول تبدیل می شوند که با تغییر رنگ محلول همراه است. در پایان واکنش، پلیمرهای نامحلول را می توان به روش رسوب دهی از جریان فاضلاب جداسازی کرد.  
 حذف فنل به روش پلیمریزاسیون آنزیمی به شرایط بهینه واکنش نظیر pH و رابطه استوکیومتری بین دوز آنزیم، فنل و پراکسید هیدروژن وابسته است (۵، ۶، ۷، ۸).  
 شرکت بین المللی Enzymol امریکا از آنزیم پراکسیداز سویا برای تولید رزین پلی فنل (بدون فرمالدئید) با خلوص بالا از طریق فرایند پلیمریزاسیون آنزیمی استفاده نموده است (شکل ۱).  
 در این روش تولید رزین فنل در حضور آنزیم، ترکیب فنلی و پراکسید هیدروژن انجام شده و وزن مولکولی پلیمرهای تولیدی با توجه به نوع ترکیب فنلی، میزان pH و پراکسید هیدروژن قابل کنترل است. این ترکیبات دارای کاربردهایی در تهیه مواد کپی، بسته بندی، چسب و وسایل الکترونیکی هستند. این روش به عنوان یک روش سازگار با محیط زیست برای

مؤثر بوده است. بر این اساس هیدروکربن های متداول در فاضلاب پالایشگاه اثر سوء مشهودی بر فرایند حذف نداشته ولی ترکیبات لیگنینی موجود در فاضلاب Pulping Kraft در جلوگیری از غیر فعال شدن آنزیم در حین واکنش مؤثر بوده است (۱۶، ۱۵).

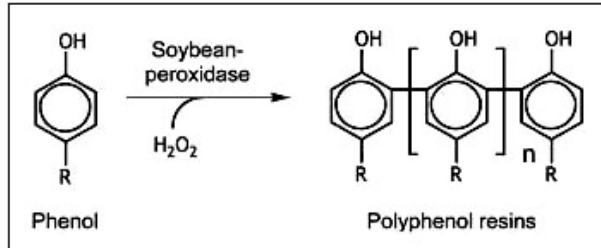
هر چند آنزیم پراکسیداز حاصل از گیاه تربچه برای سم زدایی از خاک و پلیمریزاسیون ترکیبات فنلی کاربرد دارد، با این حال پراکسیداز حاصل از سویا و شلغم نیز با توجه به بررسی های انجام شده توسط کینزلی و نیکل در سال ۲۰۰۰ و دوارت و ازکوز و همکارانش در سال ۲۰۰۳ برای پالایش زیستی فاضلاب های آلوده به فنل ها، کرزول و ترکیبات فنلی کلرینه کاربرد داشته است (۱۷، ۳). در بررسی که در سال ۱۹۹۴ توسط ال کسیم و همکارانش انجام شد، از پراکسیداز حاصل از قارچ کوپرینوس ماکروهیزوس برای حذف سموم آلی از فاضلاب مصنوعی استفاده شد. بر این اساس نوع راکتور و نحوه افزودن آنزیم و پراکسید هیدروژن بر راندمان حذف فنل مؤثر بوده است (۱۸).

در بررسی که توسط واسودوان در سال ۱۹۹۶ انجام شد، اثر غلظت های پراکسیداز و پراکسید هیدروژن بر حذف فنل و راندمان حذف فنل از محلول به عنوان تابعی از زمان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد در شرایطی که فنل و پراکسید هیدروژن به صورت استوکیومتری با نسبت مولی یک به یک واکنش داده، تقریباً تمام فنل در طی ۱۰ دقیقه پلیمریزه می شود و غلظت های زیادتر پراکسید هیدروژن دارای اثر باز دارندگی بر واکنش است (۱۹). در این مطالعه فرایند پلیمریزاسیون آنزیمی با استفاده از عصاره گیاه تربچه به عنوان یک روش نوین جهت حذف فنل از فاضلاب مصنوعی مورد بررسی قرار گرفته است.

### مواد و روش ها

در این تحقیق از عصاره گیاه تربچه (*Raphanus Sativus*) (پس از عبور از صافی) به عنوان منبع آنزیم پراکسیداز جهت

تولید رزین پلی فنل مطرح بوده و می تواند جایگزین روش تولید رزین فنل فرمالدئید گردد (۹، ۱۰).



شکل ۱: الگوی شماتیک پلیمریزاسیون آنزیمی فنل و تولید رزین پلی فنل

آنزیم پراکسیداز از گونه های مختلف گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم ها جداسازی شده است. این آنزیم در حضور پراکسید هیدروژن قادر به اکسید کردن انواع مختلفی از ترکیبات آروماتیک می باشد. به دلیل هزینه مربوط به آنزیم خالص پراکسیداز تربچه (HRP)، یکی از مهم ترین معایب این روش هزینه آنزیم مورد نیاز جهت تصفیه است. بررسی ها نشان داده که هزینه های مربوط به آنزیم، به طور قابل ملاحظه ای با کاهش میزان غیر فعال شدن آنزیم از طریق مصرف ترکیبات افزودنی محافظت کننده نظیر پلی اتیلن گلیکول (PEG) کاهش می یابد (۱۱، ۱۲، ۱۳).

بررسی های انجام شده توسط Nicell در سال ۱۹۹۶ قابلیت کاربرد HRP در حذف فنل از چندین فاضلاب صنعتی را نشان داده است (۱۴). آنزیم HRP دارای توانایی کاتالیستی در محدوده گسترده ای از درجه حرارت، pH، غلظت آلاینده و شوری است. با توجه به این که فاضلاب واقعی دارای تغییرات زیادی در غلظت آلاینده های آروماتیک، جامدات معلق، غلظت مواد آلی (BOD، COD) و غلظت ترکیبات شیمیایی مزاحم فرایند پلیمریزاسیون می باشند، کاربرد این روش در مقیاس کامل نیازمند کنترل شرایط و تصفیه مؤثر است. در بررسی های انجام شده توسط واگنر و نیکل بر روی فاضلاب پالایشگاه نفت و فاضلاب حاصل از Pulping Kraft، فرایند پلیمریزاسیون آنزیمی ضمن حذف فنل، در کاهش COD و سم زایی نیز

جدول ۱: میانگین مقادیر پارامترهای کیفی آب مورد استفاده در آزمایش

پارامتر کیفی	واحد	میانگین
pH	-----	۷/۴۵
هدایت الکتریکی	μs/cm	۲۸۱/۶
کل جامدات محلول	mg/L	۱۷۹/۸
قلیائیت کل	mg/L CaCO <sub>3</sub>	۱۲۰/۳
سختی کل	mg/L CaCO <sub>3</sub>	۱۵۵/۴
کلسیم	mg/L Ca <sup>++</sup>	۴۶/۴
منیزیم	mg/L Mg <sup>++</sup>	۹/۶
آمونیاک	mg/L NH <sub>3</sub>	۰/۱۴
نیتريت	mg/L NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	۰/۳
نیترات	mg/L NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	۳/۷
کلرور	mg/l Cl <sup>-</sup>	۴/۶
سولفات	mg/L SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	۲۵/۴
سدیم	mg/L Na <sup>+</sup>	۱۰/۳
پتاسیم	mg/L K <sup>+</sup>	۲/۱

### نتایج

بر اساس شکل ۱ و ۲ با افزایش حجم عصاره گیاه، راندمان حذف افزایش می‌یابد، به طوری که راندمان حذف برای حجم عصاره گیاه ۵ میلی لیتر، ۷/۶ درصد بوده و برای حجم‌های ۴۵،۴۰ و ۵۰ میلی لیتر به ترتیب ۹۳/۱۰۹، ۹۶/۱۶ و ۹۸/۲ درصد بوده است. مقایسه نسبت‌های مختلف حجم عصاره گیاه به حجم فاضلاب مورد نظر نشان می‌دهد که نسبت ۰/۴ دارای راندمان قابل قبولی بوده، بنابراین این نسبت به عنوان مبنای مطالعه استفاده شده است. در مرحله ای از مطالعه فاضلاب مصنوعی از ابتدا در تماس با نسبت ۰/۴ حجم عصاره گیاه به حجم فاضلاب بوده و پراکسید هیدروژن در طی ۱ تا ۳ مرحله به محیط واکنش افزوده شد (شکل ۳). در حالی که در مرحله دیگری از تحقیق مقادیر مختلفی از عصاره گیاه و پراکسید هیدروژن طی ۱ تا ۳ مرحله به محیط واکنش اضافه گردید (شکل ۴). مقایسه نتایج این دو مرحله نشان داد که با

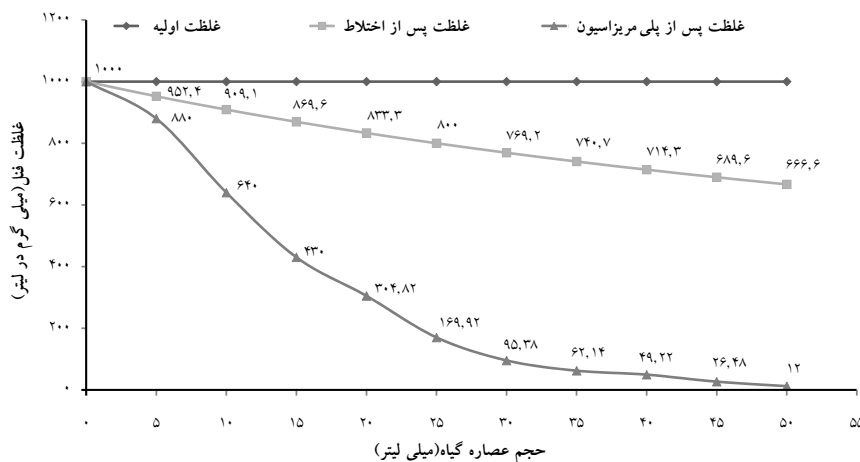
اکسیداسیون آنزیمی و پلیمریزاسیون فنل استفاده گردید. برای تهیه عصاره، گیاه تربچه را تهیه و پس از شستشو با استفاده از آبمیوه گیری برقی گیاه را خرد کرده و عصاره حاصله پس از عبور از صافی به عنوان منبع آنزیم پراکسیداز استفاده گردید. مطالعه بر روی فاضلاب مصنوعی (آب شبکه عمومی شهر که به صورت مصنوعی آلوده شده) حاوی غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر فنل در یک راکتور منقطع (ارلن های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر نمونه) انجام شد، نتایج کیفیت شیمیایی آب مورد استفاده برای آزمایش‌ها در جدول (۱) ارائه شده است. در این مطالعه تأثیر نسبت فنل به پراکسید هیدروژن، میزان عصاره گیاه تربچه (غلظت آنزیم پراکسیداز) و زمان واکنش در راندمان پلیمریزاسیون و حذف فنل بررسی گردید. جهت اختلاط و تماس مناسب بین آنزیم، فنل و پراکسید هیدروژن از شیکر اریتالی با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه استفاده گردید. با توجه به پلیمریزه شدن فنل در حضور آنزیم پراکسیداز و پراکسید هیدروژن، برای هر یک از مراحل آزمایش، مواد پلیمری تشکیل شده با استفاده از سانتیفریوژ (مدل Eppendorf R ۵۸۱۰) با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و حداکثر زمان ۳۰ دقیقه جداسازی و مقادیر فنل باقیمانده در فاضلاب تصفیه شده اندازه گیری شد.

در این تحقیق جهت سنجش غلظت فنل موجود در فاضلاب خام و پساب از روش رنگ سنجی ۴-آمینو آنتی پیرین با استفاده از اسپکتروفتومتر Visible/UV مدل Philips PU۸۷۰۰ در طول موج ۵۰۰ نانومتر، بر اساس روش ارائه شده در کتاب روش‌های استاندارد برای آزمایش‌های آب و فاضلاب (۲۰) و برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از محلول فنل، ۴-آمینو آنتی پیرین و پراکسید هیدروژن استفاده و جهت تعیین فعالیت آنزیمی تغییرات جذب در دقیقه محاسبه شد (۲۱). از بین مواد شیمیایی مورد استفاده ۴-آمینو آنتی پیرین مصرفی محصول شرکت سروا، فنل محصول شرکت کوالیجنس و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در انجام آزمایش‌های محصول شرکت مرک بوده است.

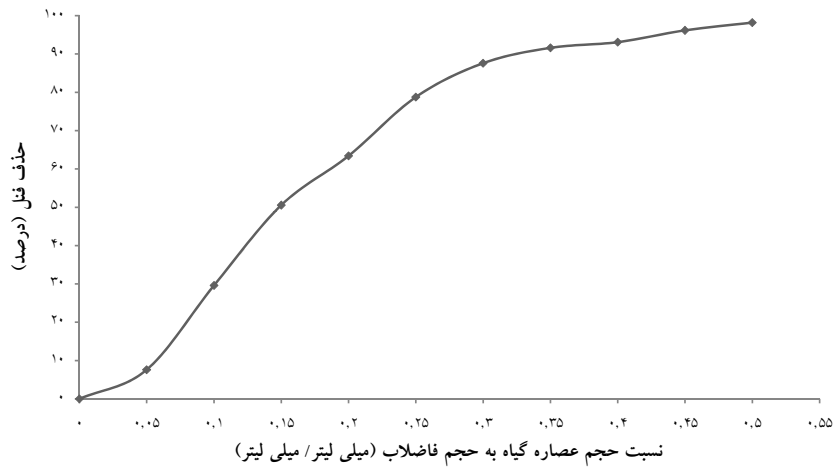
تصفیه، راندمان حذف کاهش می یابد. مطالعه آزمایشگاهی حاضر نشان داد که غلظت پراکسید هیدروژن، میزان عصاره گیاه تربچه و زمان واکنش تأثیر بسزایی در اکسیداسیون آنزیمی و حذف فنل دارد. با توجه به اهمیت تناوب افزودن پراکسید هیدروژن، نتایج آزمایش ها نشان داد که با ثابت نگه داشتن حجم کل پراکسید هیدروژن اضافه شده، افزایش دفعات افزودن پراکسید هیدروژن راندمان حذف را بهبود می بخشد. در مراحل ابتدایی کار، بررسی تأثیر شدت اختلاط نشان داد که استفاده از شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه دارای کارایی مطلوب و نسبتاً مشابه با همزن مغناطیسی با سرعت حدود ۱۵ دور در دقیقه می باشد. از طرفی اختلاط با سرعت پایین منجر به افت راندمان و اختلاط شدید، اتلاف انرژی، کف کردن محلول و افت جزئی راندمان را در پی دارد. با توجه به اهمیت سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره گیاه مورد استفاده، میزان فعالیت آنزیم اندازه گیری شد که میزان میانگین و انحراف معیار آن (IU/mL)  $3/107 \pm 0/146$  بوده است. براساس شکل ۶، با افزایش غلظت محصولات واکنش و افزایش نسبت پراکسید هیدروژن به فنل میزان فعالیت آنزیمی باقیمانده در محلول در انتهای واکنش کاهش یافته که ناشی از اثر بازدارندگی پراکسید هیدروژن بر آنزیم و چسبیدن محصولات واکنش در جایگاه فعال آنزیم می باشد.

افزایش تعداد دفعات افزودن پراکسید هیدروژن، افزایش میزان عصاره گیاه و نسبت مولی پراکسید هیدروژن به فنل، راندمان حذف فنل افزایش می یابد. با توجه به شکل شماره ۳ و ۴ بیشترین میزان راندمان حذف فنل در حالت کاربرد یک مرحله ای آنزیم و پراکسید هیدروژن، در طی ۱۰ دقیقه ابتدای شروع واکنش اتفاق می افتد که در نسبت حجم عصاره گیاه به حجم فاضلاب ۰/۴، ۵۴/۶ درصد و برای زمان های واکنش ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه به ترتیب ۸۳/۵ و ۸۴/۲ درصد بوده است. از طرفی با توجه به اثرات بازدارندگی پراکسید هیدروژن و محصولات واکنش بر فرایند و زمان ماند محدود پراکسید هیدروژن، افزودن چند مرحله ای پراکسید هیدروژن راندمان حذف را افزایش داده است. به طوری که در افزودن ۳ مرحله ای پراکسید هیدروژن و یک مرحله ای عصاره گیاه، راندمان حذف در زمان واکنش ۱۸۰ دقیقه معادل ۹۳/۱۰۹ درصد بوده است.

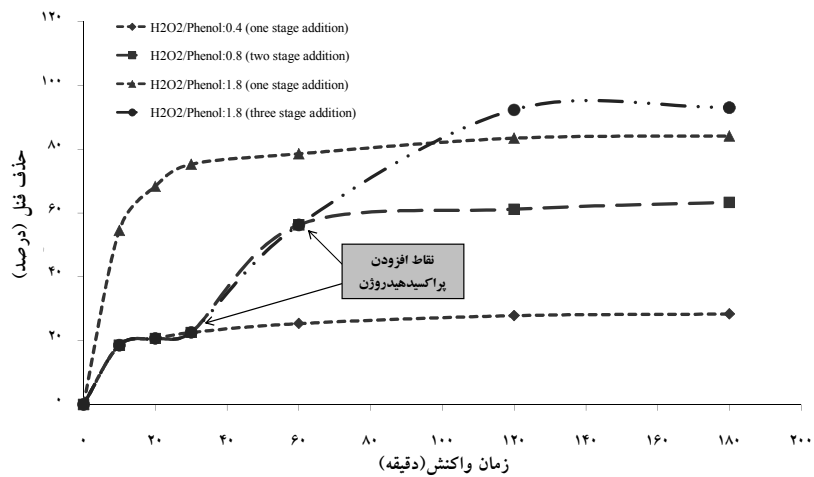
براساس شکل ۵، در حالت کاربرد ۳ مرحله ای پراکسید هیدروژن، بیشترین راندمان حذف فنل در نسبت پراکسید هیدروژن به فنل ۱/۸ میلی مول بر میلی مول اتفاق افتاده است. از طرفی افزودن مقادیر کمتر از حد بهینه پراکسید هیدروژن، اکسیداسیون آنزیمی فنل را محدود و راندمان حذف را کاهش می دهد و افزودن مقادیر بیش از حد پراکسید هیدروژن دارای اثر بازدارندگی بر عملکرد آنزیم بوده و ضمن افزایش هزینه



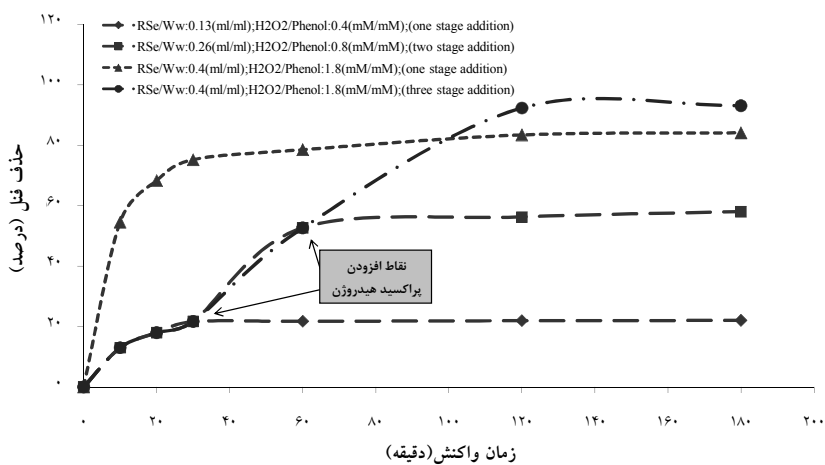
شکل ۱: تأثیر حجم عصاره گیاه تربچه بر حذف فنل



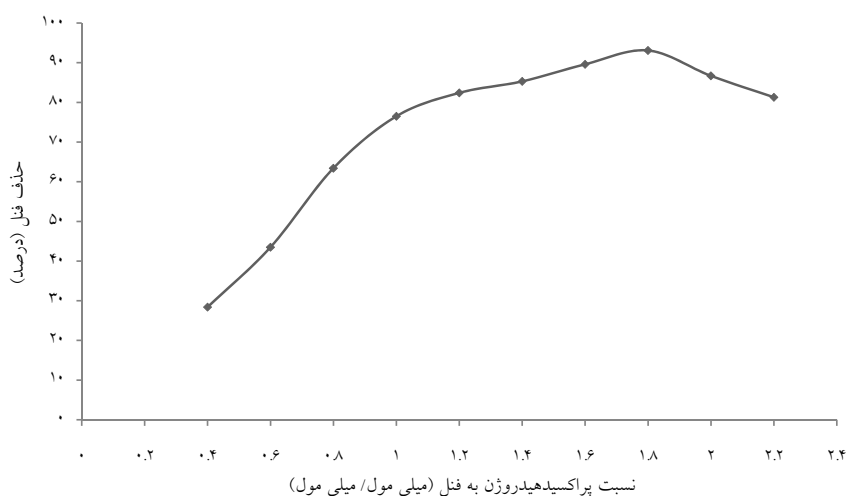
شکل ۲: تأثیر نسبت حجم عصاره گیاه به حجم فاضلاب بر راندمان حذف فنل



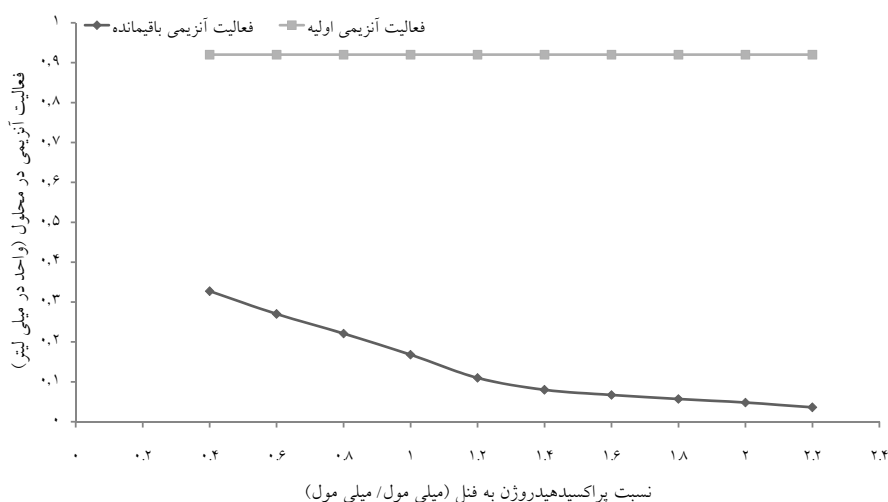
شکل ۳: تأثیر زمان واکنش و تناوب افزودن  $H_2O_2$  بر راندمان حذف فنل



شکل ۴: تأثیر زمان واکنش، میزان عصاره گیاه و تناوب افزودن  $H_2O_2$  بر راندمان حذف فنل



شکل ۵: تأثیر نسبت پراکسید هیدروژن به فنل بر راندمان حذف فنل



شکل ۶: فعالیت آنزیم پراکسیداز قبل از شروع و در انتهای واکنش پلیمریزاسیون آنزیمی در مقایسه با نسبت مولی پراکسید هیدروژن به فنل

## بحث و نتیجه گیری

با توجه به مطالعه ای که توسط ماسودا و همکارانش (۲۰۰۱) انجام شد، با افزایش میزان فنل موجود در محلول مورد آزمایش، میزان آنزیم مورد نیاز نیز افزایش می یابد. بنابراین نسبت ۰/۴ به دست آمده از مطالعه حاضر، مقدار بهینه عصاره گیاه برای شرایط خاص موجود در این بررسی را نشان داده و برای سایر شرایط نیاز به تعیین این نسبت می باشد (۵). هرچند در مطالعه انجام شده توسط بودالو و همکارانش (۲۰۰۵)

در مطالعه ای که توسط نقیبی و همکارانش (۲۰۰۳) انجام شد، میزان بهینه حجم عصاره گیاه تربچه اضافه شده به ۲۰ میلی لیتر آب حاوی ۰/۹ میلی مول فنل در حد ۵ تا ۷ میلی لیتر تعیین شد. که معادل نسبت حجم عصاره گیاه به حجم فاضلاب ۰/۲۵ تا ۰/۳۵ بوده و نتایج حاصل از آن با توجه به غلظت اولیه و راندمان حذف فنل، با میزان نسبت بهینه به دست آمده در مطالعه حاضر (۰/۴ mL/mL) مطابقت دارد (۲۲).

در مطالعه ای که توسط ویلبرگ و همکارانش (۲۰۰۰) بر روی فاضلاب مصنوعی حاوی فنل با غلظت های ۱۰، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۲ میلی مول انجام شد، زمان های واکنش مختلف (۴۵ دقیقه تا ۴/۵ ساعت) بررسی گردید. نتایج مطالعه فوق نشان داد که تغییر قابل ملاحظه ای در راندمان حذف از زمان های ۲ تا ۴/۵ ساعت اتفاق نمی افتد. در مطالعه ای که توسط ماسودا و همکارانش (۲۰۰۱) در زمینه بررسی تأثیر شرایط واکنش بر پلیمریزاسیون و حذف فنل انجام شد، حداکثر میزان پلیمریزاسیون در ۱۰ دقیقه ابتدای واکنش اتفاق افتاده است. از طرفی نتایج مطالعه انجام شده توسط واسودوان (۱۹۹۶) نشان داد در شرایطی که فنل و پراکسید هیدروژن به صورت استوکیومتری با نسبت مولی یک واکنش می دهند، تقریباً تمام فنل در طی ۱۰ دقیقه پلیمریزه شده و غلظت های زیادتر پراکسید هیدروژن دارای اثر بازدارندگی بر واکنش است. بنابراین نتایج مطالعه حاضر در زمینه تأثیر زمان واکنش بر راندمان حذف با نتایج مطالعات فوق مطابقت دارد (۵، ۱۴، ۱۹). با این حال با توجه به شکل ۳ و ۴، زمان واکنش ۳ ساعت مبنای مطالعه بوده که با مطالعه انجام شده توسط رایت و نیکل مطابقت دارد (۸).

با توجه اثرات سوء بهداشتی و زیست محیطی فنل و امکان تولید رزین و مواد قابل استفاده از آنها، این روش را می توان به عنوان یک روش مناسب در حذف فنل از فاضلاب های صنعتی، استفاده مجدد از پساب و کاهش اثرات سوء غیر قابل جبران زیست - محیطی آنها مطرح نمود.

بر روی پراکسیداز خالص (SBP, HRP)، مطالعه انجام شده توسط ویلبرگ و همکارانش (۲۰۰۰) بر روی پراکسیداز تربچه و مطالعه ای که توسط ماسودا و همکارانش (۲۰۰۱) بر روی پراکسیداز قارچ کوپرینوس سینروس انجام شد، نسبت بهینه پراکسید هیدروژن به فنل ۱ (مول برمول) گزارش شده است (۵، ۱۴، ۲۳). با این حال ال کسیم و همکارانش (۱۹۹۴) گزارش نمودند برای رسیدن به حذف کامل فنل نسبت های بیش از یک پراکسید هیدروژن به فنل نیاز است (۱۸). در مطالعه دیگری که توسط نقیبی و همکارانش (۲۰۰۳) انجام شد، راندمان حذف فنل در نسبت های پراکسید هیدروژن به فنل ۱:۱ و ۱/۱:۱ (مول بر مول) برای میزان ۱٪ عصاره تربچه به ترتیب ۷۸ و ۸۰ درصد گزارش شده و نسبت ۱/۱:۱ دارای راندمان بهتری بوده است. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که برای نسبت عصاره گیاه به فاضلاب ۰/۴ (میلی لیتر بر میلی لیتر)، نسبت پراکسید هیدروژن به فنل ۱/۸:۱ دارای درصد حذف بالاتری بوده است. شکل ۵ (۲۲).

در مطالعه ای که توسط ال کسیم و همکارانش (۱۹۹۴) بر روی بهینه سازی حذف فنل به وسیله پراکسیداز قارچ کوپرینوس ماکروهیزوس انجام شد، نتایج مطالعه نشان داد که افزودن متناوب پراکسید هیدروژن و آنزیم راندمان حذف فنل را بهبود می بخشد. در مطالعه حاضر نیز نتایج آزمایش ها نشان داد که افزودن متناوب عصاره گیاه و پراکسید هیدروژن (۳ مرحله در تناوب های ۳۰ دقیقه ای) در مقایسه با افزودن یک مرحله ای آن، راندمان حذف را بهبود می بخشد (۱۸).

## منابع

1. Rappoport Z. The Chemistry of Phenols, John Wiley & Sons, Ltd, 2003.
2. ErsÖz , Denizli . Adil S, Izzet A, Ayca D, Sibel S.R. Removal of Phenolic Compounds With Nitrophenol-Imprinted Polymer Based on  $\pi$ - $\pi$  and Hydrogen-Bonding Interactions ,, Separation and Purification Technology . 2004 ; 38: 173- 179.
3. Kinsley C , Nicell J. A. Treatment of Aqueous Phenol With Soybean Peroxidase in the Presence of Polyethylene Glycol , Bioresource Technol . 2000; 22: 139-146 .
4. Tchobanoglous G, Burton F. L, Stensel H.D. Wastewater engineering treatment and reuse>> Metcalf and Eddy, McGraw-Hill, Inc, Fourth



- Edition, 2003. 360-389.
5. Masuda M, Sakurai, A, Sakakibara M. Effect of Reaction Conditions on Phenol Removal by Polymerization and Precipitation Using Coprinus Cinereus Peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology.*, 2001; 28: 295-300.
  6. Buton Stephanie G. Development of Bioreactors for Application of Biocatalysts in Biotransformations and Bioremediation. *Pure and Applied Chemistry.* 2001; 73: 77-83.
  7. Nazari K., Esmaceli N., Mahmoudi A., Rahimi H, Moosavi-Movahedi A. Peroxidative phenol removal from aqueous solutions using activated peroxidase biocatalyst. *Enzyme and Microbial Technology.* 2007; 41: 226-233.
  8. Wright H., Nicell J.A. Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology.* 1999; 70: 69-79.
  9. Kobayashi S, Ritter H, Kaplan D. Enzyme-Catalyzed synthesis of polymers. *Advances in polymer Science*, first edi. New York. Springer- Verlag . 2006. 194
  11. Ghiourelotis M, Nicell J.A. Assessment of Soluble Products of peroxidase- Catalyzed Polymerization of Aqueous Phenol. *Enzyme and Microbial Technology.* 1999; 25: 185-193.
  12. Ibrahim M.S, Ali H.I, Taylor K.E, Biswas N, Bewtra J.K, Enzyme – Catalyzed Removal of Phenol from Refinery Wastewater :Feasibility Studies . *Water Environmental Research* . 2001 ;73: 165 – 172 .
  13. Nakamoto S, Machida N . Phenol Removal from Aqueous Slutions by Peroxidase – Catalyzed Reaction Using Additives . *Water Research* . 1992; 26: 49 – 54 .
  14. Wilberg K.Q, Nunes D.G, Rubio J. Removal of Phenol by Enzymatic Oxidation and Flotation" , *Brazilian Journal of Chemical Engineering* . 2000; 17: 4-7.
  15. Wagner M , Nicell J.A , Treatment of a foul condensate from kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research.* 2001; 35: 485-495.
  16. Wagner M, Nicell J.A. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater. *Water Science & Technology.* 2001;43: 253-260.
  17. Ragalado C, Garcio- Almendarez B. E, Duarte-Vazquez M.A. Biotechnological Applications of Peroxidases. *Phytochemistry Reviews* ., 2004; 3: 243-256.
  18. Al – Kassim L, Taylor K . E., Bewtra J .K., Biswas N. Optimization of Phenol Removal by a Fungal Peroxidase from Coprinus Macrorrhizus Using Batch, Continuous and Discontinuous Semibatch Reactors. *Enzyme and Microbial Technology* . 1994 ; 16: 120-124 .
  19. Vasudevan P . T. Peroxidase Catalyzed Polymerization of Phenol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* . 1996 ; 60: 73 -82 .
  20. APHA, AWWA, WPCF, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 21th edition., Washington, D.C. 2005.
  21. Worthington V. *Worthington Enzyme Manual , Enzymes and Related Biochemicals"*, Worthington Biochemical Corporation, 1993.
  22. Naghibi F , Pourmorad F, Honary S, Shamsi, M. Decontamination of water polluted with phenol using Raphanus sativus root. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research (IJPR)*. 2003; 1: 29-32.
  23. Bo'dalo' A, Go'mez E, Bastida J, Ma'ximo M.F. Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. *Chemospher.* 2006; 63: 626-632.

## Application of Enzymatic Polymerization Process for the Removal of Phenol from Synthetic Wastewater

Ghaneian M. T.<sup>1</sup>, \*Ghanizadeh Gh.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Environmental Health, Faculty of Public Health, Yazd University of Medical Sciences, Yazd, Iran

<sup>2</sup> Department Environmental Health, School of Health, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received 18 February 2009; Accepted 3 January 2009

### ABSTRACT

**Background and Objectives:** Phenolic compounds are presence in many industrial wastewaters, and have been classified as priority pollutants. Application of several conventional processes due to high cost and low efficiency has been limited. Thus, new methods such as enzymatic polymerization seem to be preferable and effective processes with high potential to substitute the conventional processes.

This study was carried out to evaluate *Raphanus sativus* extract as a peroxidase enzyme source for polymerization and removal of phenol from synthetic wastewater in the presence of hydrogen peroxide.

**Materials and Methods:** The study was performed in batch reactor at room temperature. Peroxidase enzyme was extracted from *Raphanus sativus* plant roots. Primary concentration of phenol in wastewater was 1000 mgL<sup>-1</sup>. The concentration of phenol and enzymatic activity was been measured by photometric assay.

**Results:** The results show that *Raphanus sativus* extract is a suitable source of peroxidase enzyme. Mean enzymatic activities in this extract was 3.107 Uml<sup>-1</sup>. Also, our results showed that elevation of extract volume lead to high efficiency of phenol removal, in which the increase in the extract volume from 5 to 50 ml, resulted in the efficiency of processes increased from 7.6 to 98.2 %. Also, sequencing addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and extract has improved the effects. The phenol removal efficiency of the reaction time after 3 h with single and three stages adding of reactants was 84.2 and 93.1%, respectively.

**Conclusion:** Enzymatic polymerization can be used as an appropriate process for the removal of phenolic compounds from wastewaters. To meet the optimized condition in process, the ratios of phenol/ enzyme and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ phenol and sequences of the adding of reactants should be considered.

**Keywords:** Polymerization, Peroxidase enzyme, Raphanus Sativus extract, Phenol, Wastewater

---

\*Corresponding Author: qanizadeh@yahoo.com

Tel: +98 21 26127269 Fax: +98 21 26127252