

رنگ‌بری پساب خمیر کاغذ شیمیایی - مکانیکی با استفاده از

عمل آوری بیولوژیکی - شیمیایی

- ❖ **سمانه کریمی؛** دانش آموخته دکتری، دانشگاه پوترا، پوترا، مالزی
- ❖ **علی عبدالخانی*؛** دانشیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- ❖ **حمیدرضا رودی؛** استادیار، گروه فناوری تولید سلولز و کاغذ، دانشکده انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، زیراب، ایران
- ❖ **علی‌نقی کریمی؛** استاد گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- ❖ **یحیی همزه؛** استاد گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

در این تحقیق کارایی و بازده عمل‌آوری اکسایشی، تیمار آنزیمی، و روش ترکیبی بر روی رنگ‌بری پساب خمیر کاغذ شیمیایی - مکانیکی بررسی شد. پساب تیره با استفاده از اکسایش در حضور واکنشگر فتون در حضور و غیاب نور ماوراء بنفش عمل‌آوری شد. همچنین دو نوع آنزیم قارچی شامل لاکاز از قارچ *Teramete sversicolor* و آنزیم پراکسیداز جامع از قارچ *Bjerkandera adusta* برای عمل‌آوری پساب در حضور یک واسطه خارجی انتخاب و به کار گرفته شد. عمل‌آوری با هر دو آنزیم به کار گرفته شده سبب تغییر رنگ پساب از قهوه‌ای تیره به رنگ زرد روشن شد. همچنین استفاده هم‌زمان آنزیم‌ها و عمل‌آوری شیمیایی با واکنشگرهای فتون به همراه نور ماوراء بنفش اثر چشمگیری بر بهبود رنگ پساب داشت. نتایج توالی‌های گوناگون نشان داد که اعمال تیمار شیمیایی پس از مرحله آنزیمی کارایی بهتری در بهبود رنگ پساب دارد.

واژگان کلیدی: بهبود رنگ، پراکسیداز، پساب، فتوفتون، فتون، لاکاز.

مقدمه

صنعت خمیرکاغذ از مهم‌ترین مصرف‌کنندگان منابع اولیه چوبی در دنیاست. این صنعت همچنین یکی از مصرف‌کنندگان عمده آب و انرژی است و به همان نسبت مقدار زیادی پساب آلوده‌کننده تولید می‌کند. تعداد زیادی کارخانه خمیرکاغذ و کاغذ در دنیا وجود دارند که تقاضای رو به ازدیاد محصولات گوناگون کاغذ را فراهم می‌کنند.

در تهیه خمیرکاغذ شیمیایی - مکانیکی (CMP) از روش‌های شیمیایی و مکانیکی استفاده می‌شود. خرده‌های چوب با مواد شیمیایی پیش‌تیمار و سپس با استفاده از فرایندهای مکانیکی به خمیرکاغذ تبدیل می‌شوند. بازده این خمیرکاغذها در حدود ۷۰-۸۰ درصد است و مقاومت آن‌ها از خمیرهای مکانیکی بیشتر است.

در طی فرایند تولید خمیرکاغذ CMP آب مصرفی در برخی بخش‌های کارخانه به‌صورت پساب ابتدا تصفیه و سپس دفع می‌شود. ترکیب شیمیایی پساب‌ها به‌خصوص در مورد کارخانه‌های خمیرکاغذ شیمیایی و پساب حاصل از رنگ‌بری خمیرکاغذ به‌طور کامل شناخته‌شده نیستند. این مسئله ارزیابی آثار منفی و در نتیجه اتخاذ راهکاری مناسب برای کاهش آن‌ها را دچار مشکل می‌کند.

تحقیقات اخیر بر فرایندهای زیست‌فناوری با استفاده از قارچ‌های پوسیدگی سفید به‌دلیل فعالیت مؤثر آن‌ها بر تخریب لیگنین منعطف شده است [۱]، [۲]. تیمارهای آنزیمی به‌طور مؤثری باعث بهبود رنگ پساب کارخانه‌های کاغذسازی می‌شوند. فرایندهای اکسیداسیون پیشرفته (AOP)^۱ همانند فتون^۲ و فتوفنتون^۳ راهکارهای مناسبی برای تیمار حذف رنگ از پساب‌ها هستند. این فرایندها سبب بهبود رنگ

رنگدانه‌های صنعتی در واکنش‌های کوتاه‌مدت می‌شوند [۳، ۴]. AOP فرایندهای اکسیداسیونی اند که سبب ایجاد رادیکال‌های غیر گزیننده هیدروکسیل در مقیاس وسیع می‌شوند که قادرند طیف وسیعی از آلاینده‌های آلی موجود در پساب را تخریب کنند [۵]. رادیکال‌های هیدروکسیل پتانسیل اکسایش بالاتری در مقایسه با آنیون‌های پروکسیل (OOH⁻)، که از پراکسید هیدروژن در محیط قلیایی به‌دست می‌آید، دارند [۶]. آنزیم‌های مخرب لیگنین شامل پراکسیداز و لاکاز به‌طور گسترده‌ای در بهبود رنگ پساب‌های کارخانجات خمیر و کاغذسازی استفاده می‌شوند [۷-۹]. آنزیم پراکسیداز به شکل‌های فعال منگنز پراکسیداز و لیگنین پراکسیداز وجود دارد [۱۰]. آنزیم پراکسیداز جامع^۴ با دارا بودن ویژگی‌های توأم آنزیم‌های منگنز - پراکسیداز و لیگنین - پراکسیداز توانایی تخریب بیشتری در تخریب سوبسترا دارند. در این مطالعه کارایی آنزیم‌های لاکاز و پراکسیداز جامع به همراه معرف فتون در حضور نور فرابنفش در بهبود رنگ پساب CMP بررسی شد.

مواد و روش‌ها

منبع پساب و نمونه‌برداری

پساب مورد استفاده از کارخانه چوب و کاغذ مازندران واقع در جنوب ساری تهیه شد. نمونه‌گیری از کانال‌های باز پساب از یک‌سوم ارتفاع پساب در انتهای کانال انجام شد. از بطری‌های پلاستیکی مقاوم در برابر نفوذ هوا با حجم ۱ لیتر و ارتفاع ۱۵cm برای نمونه‌گیری استفاده شد. نمونه‌ها از آخرین کانال که پساب را به حوضچه ته‌نشینی منتقل می‌کند جمع‌آوری شد. در طول یک شبانه‌روز ۱۲ بار نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها به‌منظور همگن‌سازی

1. Advanced Oxidation Process
2. Fenton
3. Photo-Fenton

هیدروکسید، و $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ همگی از شرکت مرک با خلوص آزمایشگاهی خریداری و استفاده شد.

تیمار فتون

یک میلی لیتر پساب تا حجم ۵ ml با آب مقطر اسیدی ($\text{pH}=4/5$) رقیق و به آن محلول آبی $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (۱ میلی مول) اضافه شد. سپس ۵۷۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن (۲۰ میلی مول) به محلول اضافه شد. نمونه‌ها در شرایط کنترل شده در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه، به مدت ۲ ساعت به هم زده شد. از سولفیت سدیم برای اتمام واکنش‌ها استفاده شد. نمونه‌ها در محیط تاریک تا انجام طیف‌سنجی فرا بنفش نگهداری شد.

تیمار فوتوفتون

عمل آوری همانند فرایند فتون انجام شد با این تفاوت که به همراه فتون نمونه‌ها در معرض نور فرابنفش قرار گرفتند. عمل آوری نوری به مدت ۲ ساعت انجام شد. برای پرتوافشانی از ۴ عدد لامپ UV-Blacklight با قدرت ۱۵ W و دامنه تشعشعی ۳۰۰-۴۰۰ نانومتر استفاده شد. منبع نور به فاصله ۵ cm در بالای سطح نمونه‌ها در راکتور UV نصب شد. دمای واکنش در حد مطلوب ۲۰ درجه سانتی گراد با استفاده از ۲ فن در انکوباتور حفظ شد. از سولفیت سدیم برای اتمام واکنش‌ها استفاده شد. نمونه‌ها در محیط تاریک تا انجام طیف‌سنجی فرابنفش نگهداری شد.

عمل آوری آنزیمی

تیمار پراکسیداز جامع (VP)

فعالیت پراکسیداز جامع به کمک اندازه‌گیری پیوسته افزایش جذب در طول موج ۲۷۰ نانومتر تعیین شد. مقدار ۱-۲ میلی گرم آنزیم به یک میلی لیتر پساب به

با یکدیگر مخلوط شدند و به کمک فیلتر^۱ برای جداکردن ذرات درشت فیلتر شدند و سپس برای جداسازی دیگر مواد جامد سانتریفیوژ شدند (-rpm 15 min ۸۰۰۰). سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان مصرف نگهداری شدند. خواص عمومی پساب کارخانه خمیر کاغذ مازندران در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. مشخصات عمومی پساب استفاده شده در آزمایش‌ها

مقدار	متغیر
۸-۸/۵	pH
۱۸۹۰	واحد رنگ (CU)
۵۶۸	مقدار جامد (mg/l)
۶۹۰	(mg/l) BOD
۱۱۷۸	(mg/l) COD

واکنشگرها

واکنشگرهای تیمار آنزیمی

از آنزیم‌های لاکاز و پراکسیداز جامع به علت تأثیر زیاد در تخریب ریزساختار لیگنین استفاده شد. پراکسیداز جامع (EC: 1.11.1.7) 1.11.1.7 (8.3 U/mg) از قارچ *Bjerkandera adusta* (EC: 1.10.3.2) (34.7) و لاکاز (34.7) از *Terametes versicolor* از شرکت Jena Bioscience آلمان خریداری شد. پراکسید هیدروژن (۳۰٪)، سدیم مالونات، استیک اسید گلاسیال، سدیم استات، 3-azino-bis (2, 2'- ABTS) ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid و دیگر نمک‌ها از شرکت مرک با خلوص آزمایشگاهی خریداری و استفاده شد.

واکنشگرهای فرایندهای فتون و فوتوفتون

پراکسید هیدروژن (30% W/W; H_2O_2)، هیدروکلریک اسید (37% W/W; HCl)، سدیم

نمونه‌های تیمار شده توسط پراکسیداز جامع اضافه شد. شرایط تیمار برای دو آنزیم مشابه شرایط مذکور قبلی برای هر آنزیم بود.

تیمار شیمیایی - بیولوژیکی

عمل‌آوری بیولوژیکی - شیمیایی و توالی شیمیایی - بیولوژیکی به کار گرفته شدند تا مقدار کارایی ترکیب تیمارها بر روی نمونه‌های پساب تعیین شود. در توالی تیمار ترکیبی، شرایط فرایند تیمار آنزیمی همانند تیمار آنزیمی مشروح در قسمت قبلی به کار گرفته شد. مقدار ۱ میلی‌گرم از هر آنزیم در توالی‌ها استفاده شد. تیمار پراکسیداز جامع بدون افزودن واسطه خارجی انجام شد. در ضمن، تیمار لاکاز یک بار با افزودن ABTS و یک بار بدون حضور واسطه خارجی انجام شد. شرایط واکنش AOP نیز همانند شرایط بیان شده در بخش‌های قبلی بود. پس از پایان زمان واکنش، از محلول سولفیت سدیم برای متوقف کردن واکنش‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

تیمار شیمیایی (فتتون و فرایندهای فوتوفتون)

شکل ۱ نتایج فرایند رنگبری پساب را نشان می‌دهد. در این شکل، فعالیت رنگبری به صورت تغییر جذب در طول موج ۴۶۵ نانومتر با توجه به کاهش رنگ نشان داده شده است. یافته‌ها نشان می‌دهد که بین مقدار جذب نور مرجع و نمونه‌های تیمار شده با هر دو روش شیمیایی فتتون و فوتوفتون تفاوت چشمگیری وجود دارد. رنگ محلول در طول فرایند رنگبری از قهوه‌ای روشن به رنگ زرد تغییر کرد. رنگ پساب به‌طور عمده مربوط به ساختارهای اشباع‌نشده ناشی از تخریب شدید ساختارهای لیگنینی است.

همراه ۴ میلی‌لیتر بافر مالونات (pH=۴/۵) اضافه شد. آزمایش‌ها در حضور ۰/۵ میلی‌مول Mn^{2+} به صورت $MnCl_2$ و بدون آن انجام شد. واکنش‌ها با اضافه کردن ۰/۲ میلی‌مول پراکسید هیدروژن آغاز شد. در ادامه، در فواصل معین ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن به نمونه‌ها اضافه شد و واکنش‌ها تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور انجام گرفت. ۳۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در فواصل ۳۰ دقیقه، ۶۰ دقیقه، ۹۰ دقیقه، ۱۲۰ دقیقه، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت، و ۷۲ ساعت برای طیف‌سنجی استفاده شد.

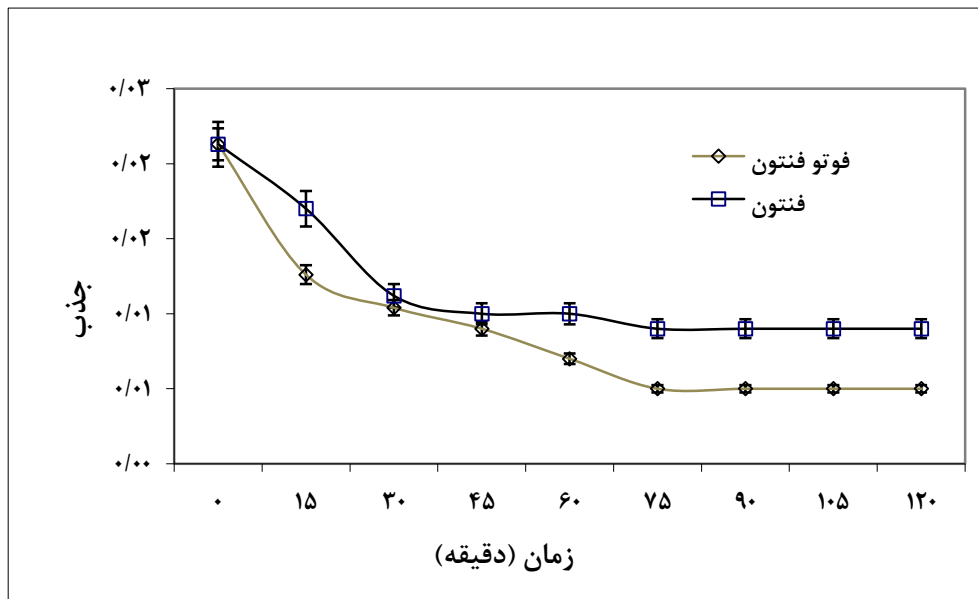
تیمار لاکاز

فعالیت آنزیم لاکاز از طریق طیف‌سنجی پیوسته افزایش مقدار جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین شد [۱۱]. بر این اساس، یک واحد آنزیم معادل مقدار آنزیمی است که قادر به اکسایش ۰/۱ میکرومول ABTS در دقیقه در pH ۴/۵ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است.

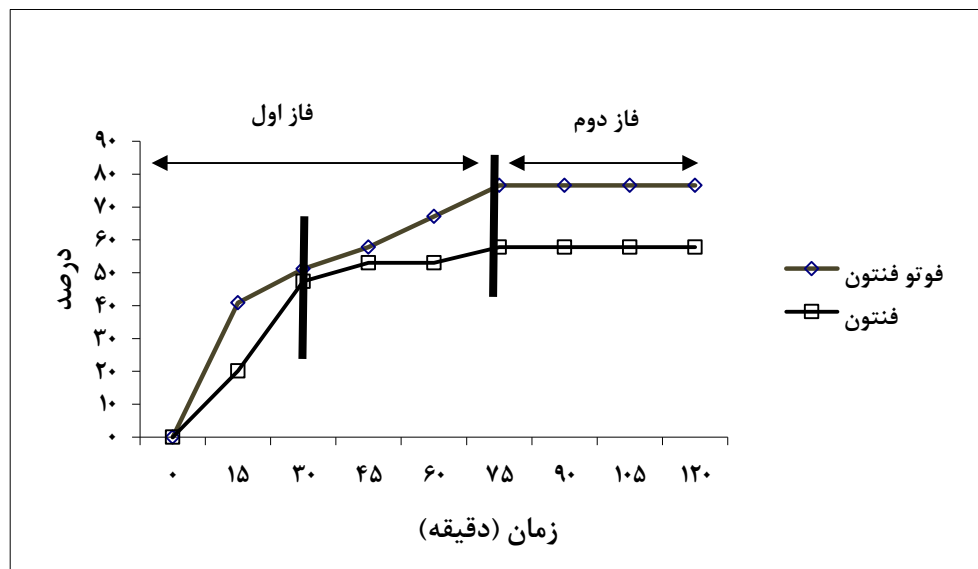
برای عمل‌آوری پساب با آنزیم لاکاز، ۱-۲ میلی‌گرم آنزیم به ۱ میلی‌لیتر پساب اضافه شد. برای بررسی تأثیر واسطه خارجی، ۰/۴ میلی‌لیتر ABTS به نمونه‌ها اضافه شد. ۴ میلی‌لیتر بافر استات با غلظت ۵۰ میلی‌مول (pH=۴/۵) به محلول‌ها اضافه شد و محیط واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۷۲ ساعت هم زده شد. ۳۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در فواصل زمانی ۳۰ دقیقه، ۶۰ دقیقه، ۹۰ دقیقه، ۱۲۰ دقیقه، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت، و ۷۲ ساعت برای طیف‌سنجی استفاده شد.

تیمار توالی آنزیمی

نمونه‌های پساب ابتدا با ۱ میلی‌گرم پراکسیداز جامع تیمار شدند و سپس ۱ میلی‌گرم لاکاز (در حضور واسطه خارجی و بدون واسطه خارجی) بر روی



شکل ۱. تأثیر عمل آوری فنتون و فوتوفنتون بر جذب رنگ پساب خمیر کاغذ CMP
[Fenton: pH: 4.5, FeSO₄.2H₂O (1 mM), H₂O₂ (20 mM)]



شکل ۲. فازهای گوناگون حذف رنگ پساب CMP بر اثر عمل آوری های فنتون و فوتوفنتون

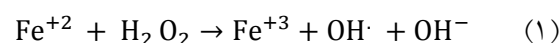
و در فاز دوم مقدار رنگبری کاهش می یابد. این یافته ها به وضوح نشان می دهد که حدود ۲۰ درصد و ۴۱ درصد از رنگ اصلی پساب بعد از ۱۵ دقیقه، به ترتیب در طی واکنش های فنتون و فوتوفنتون به سرعت کاهش یافته است. این فرایند پس از حدود ۳۰ دقیقه در فرایند فنتون برای CMP متوقف شد. در

شکل ۲ فرایند بهبود رنگ پساب به صورت تابعی از زمان تحت شرایط مشخص شده را نشان می دهد. در این شکل، فرایند بهبود رنگ از پساب توسط واکنش فنتون و فوتوفنتون به دو فاز تقسیم شده است. در فاز ۱ رنگبری چشمگیر و نسبتاً سریع است که پس از اضافه کردن H₂O₂ به محلول رخ داده است

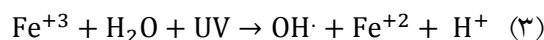
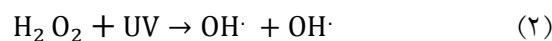
۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که هر یک از تیمارهای ارزیابی شده در طی این مطالعه، پساب‌ها را به درجات متفاوت بی رنگ می‌کند. جداسازی و تحلیل محصولات حاصل از واکنش‌های مذکور با HPLC نشان داد که اگرچه مکانیسم‌های انجام‌شده متفاوت است، هر دو روش تا حدودی موفق به تخریب اجزای ساختاری پساب شده‌اند. نتایج تحلیل‌های HPLC در شکل ۳ نشان داده شده است. مقایسه انجام‌شده بین استفاده از پراکسید هیدروژن و تابش فرابنفش صورت گرفته است. اگرچه ترکیبات تجزیه‌شده شناسایی نشده‌اند، مقایسه کیفی کروماتوگرام‌ها به خوبی تأثیر تیمارها را در شکستن ساختار ترکیبات پساب - همان‌طور که در الگوی توزیع واضح است - نشان می‌دهد. مقایسه تیمار تابش اشعه فرابنفش یا پراکسید هیدروژن، اثربخشی روش به کار گرفته شده را نشان می‌دهد. بنابراین مقایسه کروماتوگرام‌ها در زمان‌های شویش مختلف نشان می‌دهد که هرچند ترکیبات تفکیک‌شده شناسایی نشده‌اند، تفاوت‌های بسیار مهم کیفی در مقدار تخریب، در نمونه‌های تیمار شده با پراکسید هیدروژن به تنهایی و همراه با نور وجود دارد.

همین حال، زمان در فرایند فوتوفتون برای CMP در حدود ۷۵ دقیقه بود.

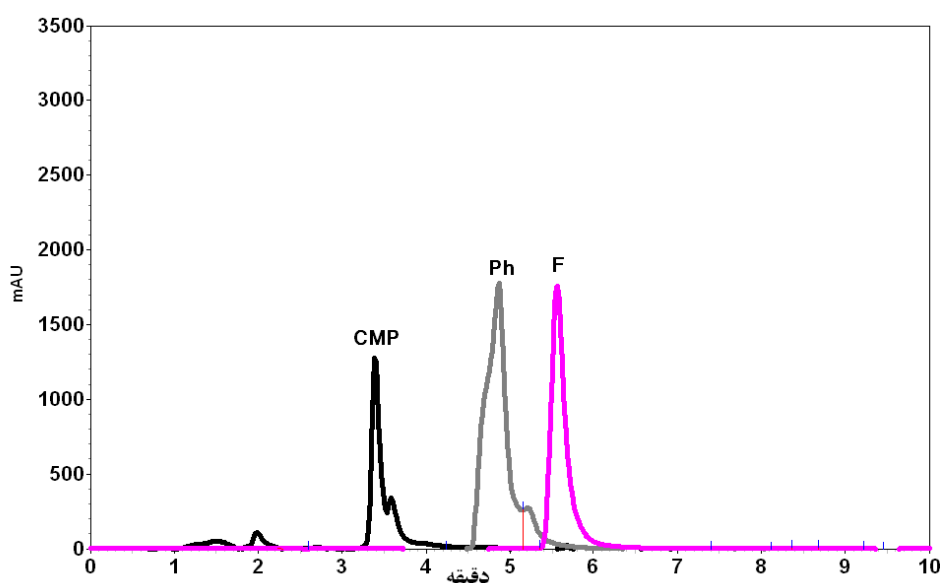
فرایند رنگ‌بری بر اثر عمل‌آوری‌های فتون و فوتوفتون بدون تابش نور یا در تاریکی نسبتاً آهسته است. از این رو، آشکار است که میزان رنگ‌بری به سبب استفاده هم‌زمان از پرتو فرابنفش با معرف فتون افزایش یابد. تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل توسط پرتو فرابنفش از طریق تجزیه شیمیایی پراکسید هیدروژن بر اثر نیروی تابشی مستقیم رخ می‌دهد. همچنین، این رادیکال‌ها در واکنش فتون به وسیله تجزیه پراکسید توسط یون‌های آهن ایجاد می‌شوند. این فرایند در معادله ۱ نشان داده شده است:



تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل، همچنین در فرایند فوتوفتون که ترکیبی از اشعه فرابنفش، آهن (II)، و H_2O_2 آن گونه که در واکنش ذیل نشان داده شده رخ می‌دهد:



مقایسه این آثار و اثرهای فتون تاریک در شکل



شکل ۳. کروماتوگرام HPLC پساب CMP پس از عمل‌آوری فتون و فوتوفتون؛ F فتون و Ph فوتوفتون.

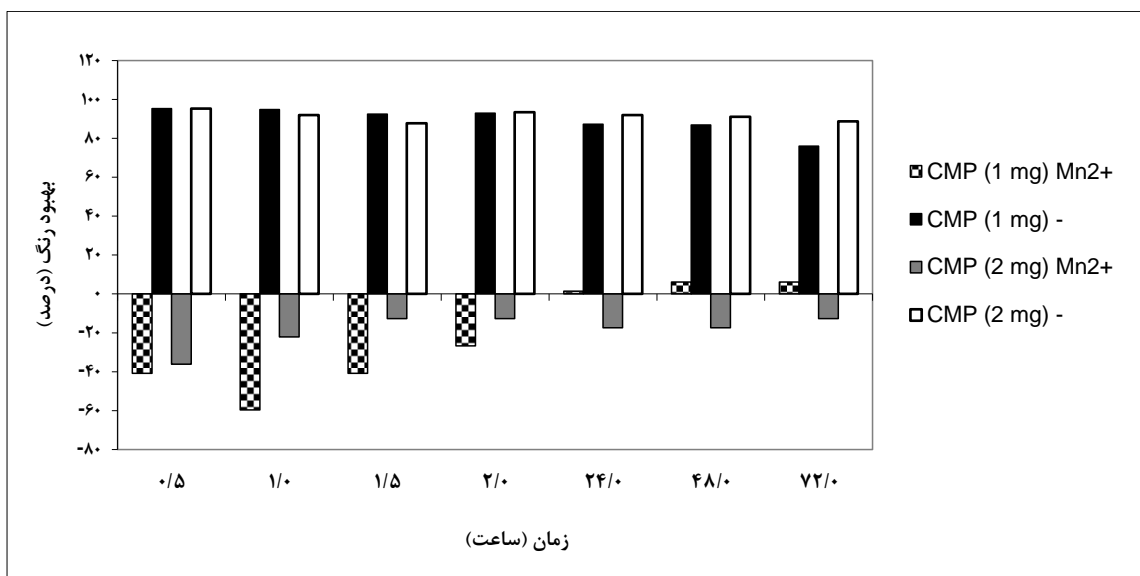
عمل‌آوری با پراکسیداز جامع (VP)

اثرهای کلی تیمار VP در پساب CMP، پس از ۷۲ ساعت تیمار، در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تفاوت چشمگیری در نتایج به‌دست‌آمده پس از تیمار VP، در حضور یون‌های Mn^{+2} و در نبود آن وجود دارد. مقدار جذب پساب در حضور یون‌های منگنز افزایش یافته است و این به آن مفهوم است که کارایی بهبود رنگ در حضور یون‌ها کاهش یافته است. به‌طور کلی عملکرد پراکسیداز جامع در مقایسه با لیگنین پراکسیداز (LiP) و منگنز پراکسیداز (MnP) متفاوت است. پراکسیداز جامع به‌طور مؤثری می‌تواند Mn^{+2} را به Mn^{+3} اکسید کند. این در حالی است که به‌طور هم‌زمان این آنزیم بدون حضور یون‌های Mn^{+2} قادر است ساختارهای آروماتیک موجود در ساختار لیگنین تخریب‌شده موجود در پساب را تخریب کند [۱۲]. از سوی دیگر، برخی تحقیقات نشان داده که یون‌های منگنز در بهبود رنگ پساب ناشی از هیدروکربن‌های پلی آروماتیک ناکارآمد است [۹].

از سوی دیگر، افزایش در جذب می‌تواند در نتیجه تشکیل کمپلکس‌های شیمیایی بین لیگنین و Mn^{+3} ناشی از اکسیداسیون Mn^{+2} باشد [۱۳]. این

پدیده سبب افزایش مقدار جذب در ناحیه مرئی می‌شود. با وجود این نمی‌توان فقط بر پایه اندازه‌گیری جذب نتیجه‌گیری کرد که یون‌های Mn^{+2} اثر منفی بر فعالیت آنزیم داشته‌اند، زیرا اطلاعات کیفی طیف‌سنجی نور فرابنفش هیچ اطلاعاتی درباره تخریب لیگنین در طی تیمار آنزیمی ارائه نمی‌دهد.

برخی مشتقات سولفونات‌دار رنگ‌های آزو در حضور Mn^{+2} بهتر اکسید می‌شوند، در حالی که دیگر تحقیقات از بهبود رنگ در صورت عدم وجود Mn^{+2} خبر داده‌اند [۱۴]. پراکسیداز جامع تهیه‌شده از B. *adusta* به‌سبب توانایی آن در اکسایش رنگ‌ها در غیاب واسطه رداکس "dyeperoxidase" نامیده شده است [۱۵]. با وجود تجزیه و تحلیل HPLC، نتایج به‌دست‌آمده از طیف‌سنجی فرابنفش نشان داد که حضور یون‌های Mn^{+2} برای رنگ‌زدایی از پساب توسط VP ضروری نیست، و پراکسید هیدروژن خود می‌تواند به‌عنوان پذیرنده الکترون در فرایند عمل کند. فرایند رنگ‌بری توسط VP از طریق تخریب ساختارهای آروماتیک انجام می‌شود. سپس، پلیمری‌شدن بخش‌های تخریب‌شده در حضور آنزیم صورت می‌گیرد. ترکیبات پلیمری‌شده به‌دلیل وزن مولکولی بالا در محلول رسوب می‌کنند.

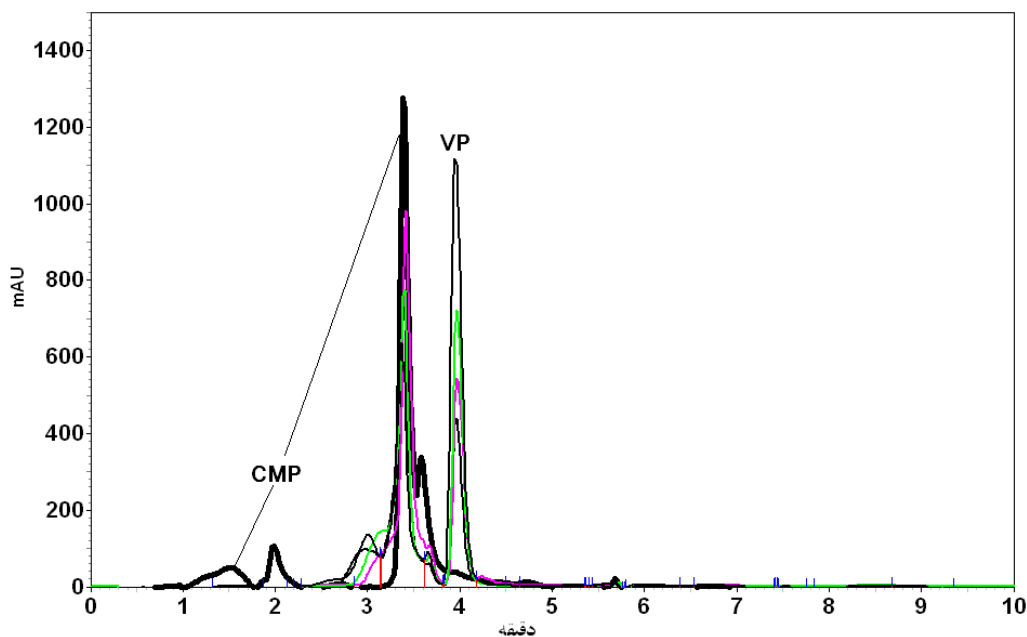


شکل ۴. تأثیر عمل‌آوری با آنزیم پراکسیداز جامع بر بهبود رنگ پساب CMP

لیگنین بر اثر فعالیت پراکسیداز چندمنظوره به سبب تغییر شدت پیک‌ها در کروماتوگرافی کنترل شد، که در شکل ۵ نشان داده شده است.

عملکرد آنزیم ممکن است پلیمری شدن، تخریب کروموفوری، یا تخریب مولکول لیگنین باشد. اگرچه ممکن است سه واکنش رخ داده باشد، ته نشین شدن بخش‌های پلیمری لیگنین در پساب بر اثر فعالیت آنزیم نشان می‌دهد که آنزیم سبب پلیمری شدن بخش‌های الیگومری شده است و بدین ترتیب با افزایش وزن مولکولی و کاهش حلالیت ذرات کلوئیدی حاصل در پساب، ذرات ته نشین می‌شوند. تشکیل رسوب قهوه‌ای به حذف توده با وزن مولکولی بالای لیگنین از محلول و کاهش رنگ منجر می‌شود [۱۷]. نتایج نشان می‌دهد که افزایش مقدار آنزیم روند تخریب لیگنین را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد و در نتیجه باعث کاهش در بازده رنگ‌بری می‌شود. مقدار آنزیم یا پروتئین بیشتر ممکن است سبب پایداری ذرات کلوئیدی در محلول و از سوی دیگر سبب انحلال مجدد ذرات تثبیت شده شود.

در این تحقیق، روند تخریب پساب CMP توسط آنزیم VP از قارچ *B. adusta* به وسیله HPLC کنترل شد. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، بالاترین میزان تخریب در پساب توسط VP در حضور Mn^{+2} انجام شده است. افزودن مقدار ۰/۵ میلی‌مول Mn^{+2} به‌طور مؤثری سبب تخریب ترکیب پساب می‌شود. مزیت استفاده از پراکسیداز جامع در مقایسه با LiP توانایی آن در تخریب ساختارهای غیر فنولی است. VP همچنین پایداری بیش‌تری در برابر اثر غیرفعال‌کننده H_2O_2 و فنل‌ها در مقایسه با LiP دارد [۱۶]. بنابراین پراکسیداز قادر به انجام هر دو واکنش اکسیدکننده Lip، یعنی اکسیداسیون ساختارهای آروماتیک غیر فنولی از طریق رادیکال‌های آروماتیک و اکسیداسیون Mn^{+2} به Mn^{+3} است. نتایج نشان می‌دهد که پراکسیداز جامع در مقایسه با MnP و LiP، که برای فعالیت نیاز به سویسترا (همانند وراتریل‌الکل، چربی‌های اشباع‌نشده، و غیره) دارند، به‌طور مستقیم قادر به فعالیت بر روی آلاینده‌های آروماتیک است. همان‌طور که در بخش قبل گفته شد، تخریب ساختار



شکل ۵. کروماتوگرام HPLC پساب CMP پس از عمل‌آوری با آنزیم VP (پراکسیداز)

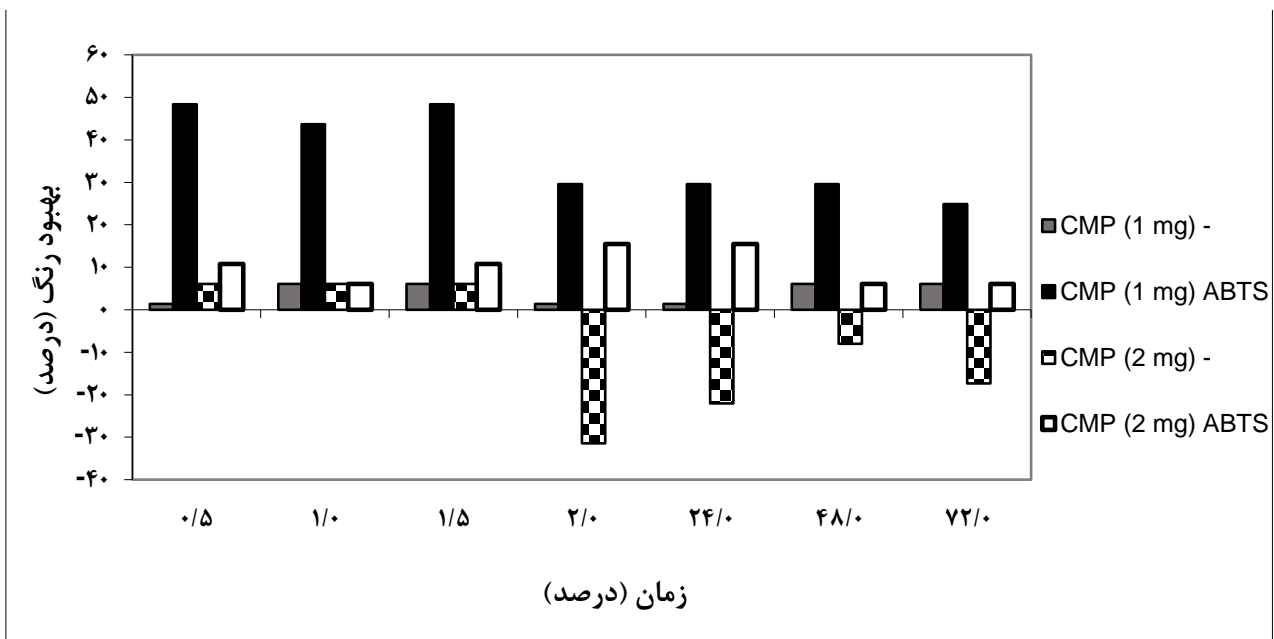
حضور واسطه خارجی ABTS کارایی رنگ‌بری تقویت می‌شود.

بستر اکسیدشده به شکل رادیکال‌های کاتیونی است که پس از تشکیل به سرعت به ترکیبات ساده‌تر شکسته می‌شوند [۱۸]. در غیر این صورت، حتی در صورتی که این رادیکال‌های کاتیونی زمان ماندگاری طولانی داشته باشند، بر اثر واکنش با ساختارهای غنی از الکترون، مانند اجزای ناشی از گسسته شدن لیگنین در پساب، ترکیب می‌شوند و به حالت اولیه برمی‌گردند. بنابراین پساب از طریق میانجی‌گری ABTS و یک مکانیسم انتقال الکترونی قابل اکسایش است. نرخ اولیه رنگ‌بری پساب پس از افزودن ABTS، به علت تشکیل رادیکال‌های ABTS در محلول بافر ابتدا افزایش و سپس به سبب تخریب رادیکال‌ها با گذشت زمان کاهش می‌یابد. شکل ۷ عملکرد آنزیم لاکاز در رنگ‌بری پساب در حضور میانجی‌گر ABTS را نشان می‌دهد.

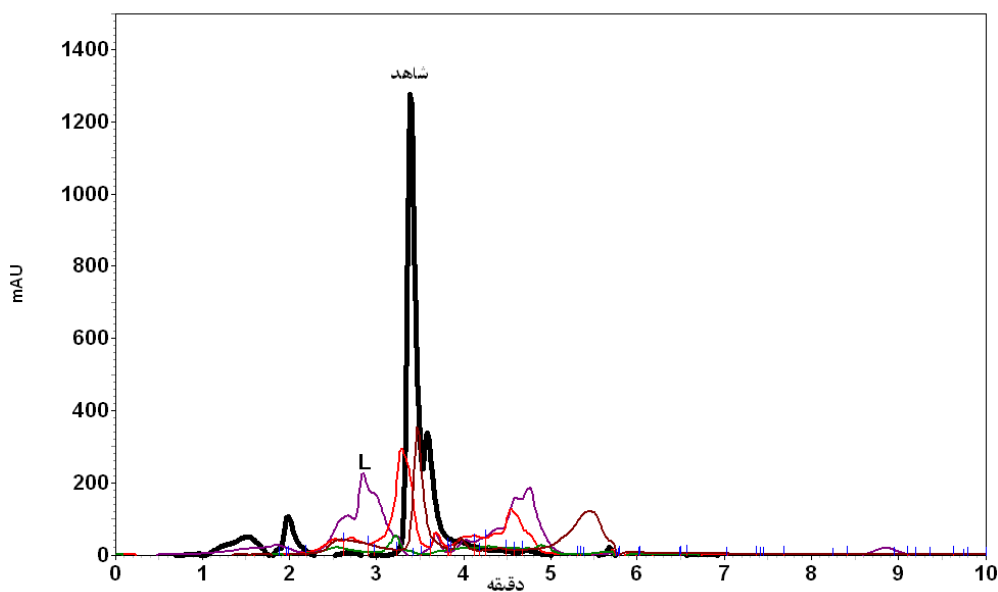
عمل‌آوری با لاکاز

داده‌های به دست آمده از عمل‌آوری با لاکاز نشان می‌دهد که مقدار جذب نور ترکیبات پساب CMP را می‌توان تا حدی با افزودن لاکاز کاهش داد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که فعالیت لاکاز به طور چشمگیری بر اثر افزودن واسطه خارجی ABTS افزایش می‌یابد. همان‌طور که در شکل ۶ ملاحظه می‌شود، عمل‌آوری پساب CMP با آنزیم لاکاز سبب بهبود رنگ پساب شده است و مقدار تغییر رنگ با غلظت آنزیم متناسب نیست.

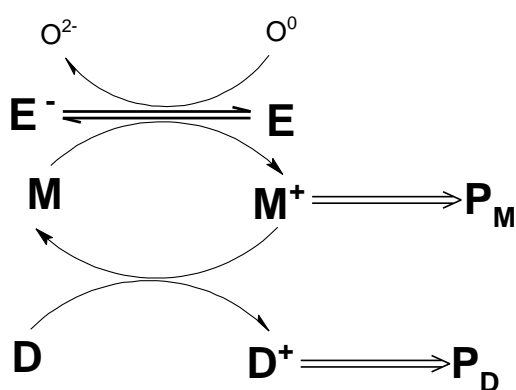
در عملیات رنگ‌بری پساب توسط آنزیم لاکاز بدیهی است که پساب بستر مستقیم آنزیم نیست و تخریب آن به واسطه یک متابولیت میانجی‌گر انجام می‌گیرد که در این تحقیق برای ارزیابی فعالیت لاکاز از ABTS که یک ترکیب مصنوعی است به عنوان واسطه خارجی استفاده شد. نتایج نشان داد که در



شکل ۶. تأثیر عمل‌آوری با لاکاز بر بهبود رنگ پساب CMP طی شرایط متفاوت



شکل ۷. کروماتوگرام HPLC پساب CMP پس از عمل آوری با آنزیم لاکاز (L لاکاز)



شکل ۸. مکانیسم پیشنهادی فعالیت آنزیم لاکاز. واسطه (M)، واسطه کاتیونی (M^+)، ساختار رنگی (D)، ساختار رنگی اکسید شده (D^+)

ABTS (M) به‌عنوان بستر فعال لاکاز، به کمک آنزیم اکسید و به رادیکال کاتیونی تبدیل می‌شود (M^+). این رادیکال‌ها طی دو مسیر پایدار می‌شوند: این رادیکال‌ها یا به مولکول دیگر (PM) که پایداری بیشتری دارد تجزیه می‌شوند یا از طریق واکنش با یک ساختار لیگنین (D) و برگشت به حالت اولیه (M) پایدار می‌شوند (شکل ۸). به‌طور مشابهی مولکول لیگنین اکسید شده به فرآورده‌های دیگر (PD) تجزیه می‌شود.

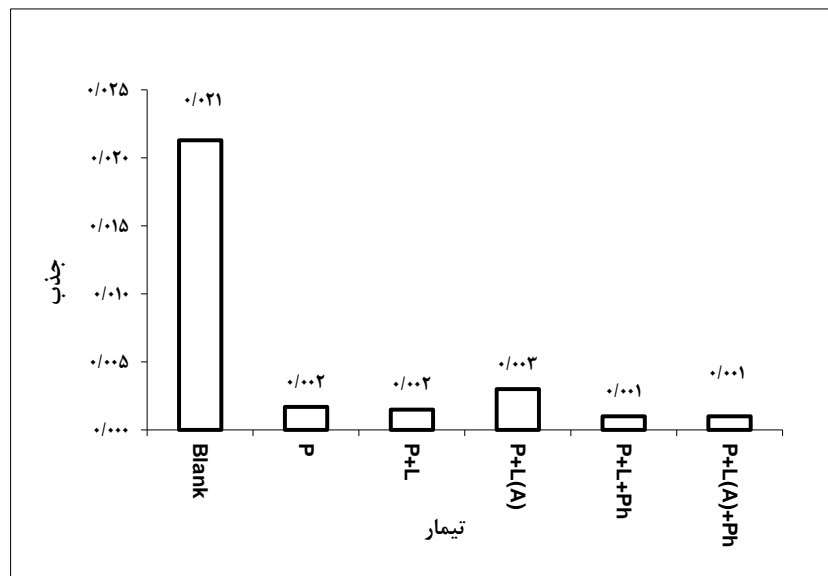
همان‌طور که ملاحظه می‌شود، تخریب پساب در ۳۰ دقیقه اول در حضور میانجی‌گر ABTS اتفاق می‌افتد. همان‌طور که شکل ۶ نشان می‌دهد، فعالیت لاکاز در رنگ‌بری پساب فقط در حضور میانجی‌گر صورت می‌گیرد. وجود ABTS اکسید شده برای اکسیداسیون ترکیبات آروماتیک غیر فنولی کاملاً حیاتی است [۱۸].

یک فرضیه برای این رخداد تحت تأثیر قرار گرفتن اکسیداسیون ساختارهای لیگنین با پتانسیل رد اکس بالا توسط پتانسیل رد اکس لاکاز و رادیکال‌های میانجی‌گر است. با در نظر گرفتن ماهیت ناهمگن پلیمر لیگنین و اندازه حجیم مولکول لاکاز، بر هم کنش مستقیم آنزیم با ساختار لیگنین یا ساختارهای مشابه تقریباً غیر ممکن است. ایجاد یک پتانسیل رد اکس بالا (بیشتر از ۹۰۰ میلی‌ولت) توسط مولکول‌هایی با وزن مولکولی پایین (ABTS) سبب حمله میانجی‌گر به ساختار لیگنین می‌شود. مکانیسمی برای رنگ‌بری پساب در حضور میانجی‌گر پیشنهاد داده شده که در شکل ۸ نشان داده شده است [۱۹].

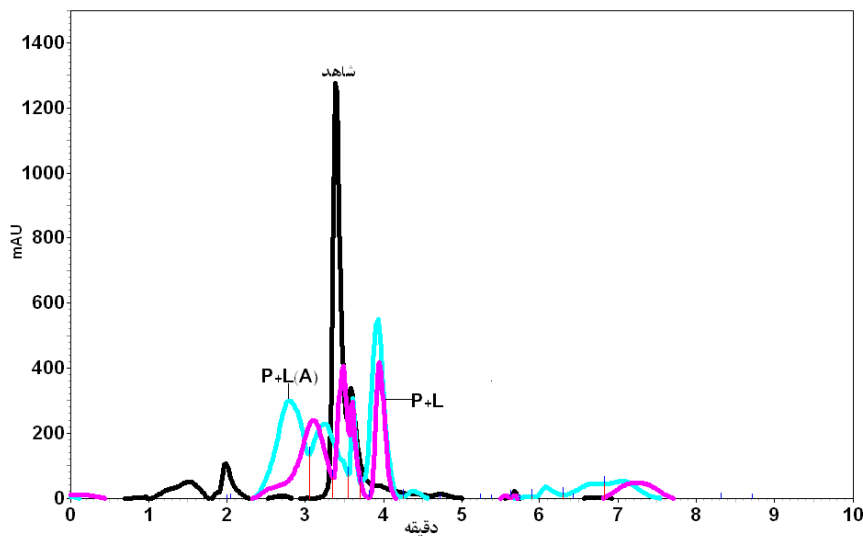
توالی تیمارها

از توالی تیمارهای آنزیمی برای حذف رنگ از نمونه‌ها به منظور بررسی کارایی رنگبری استفاده شد. از هر دو آنزیم پراکسیداز و لاکاز برای بررسی توانایی آن‌ها در از بین بردن ساختارهای رنگ‌ساز از پساب به همراه تیمار فنتون و تخریب نوری استفاده شد. نتایج نشان داد که استفاده متوالی از پراکسیداز و لاکاز سبب تغییر رنگ پساب از قهوه‌ای تیره به رنگ زرد روشن شد (شکل ۹).

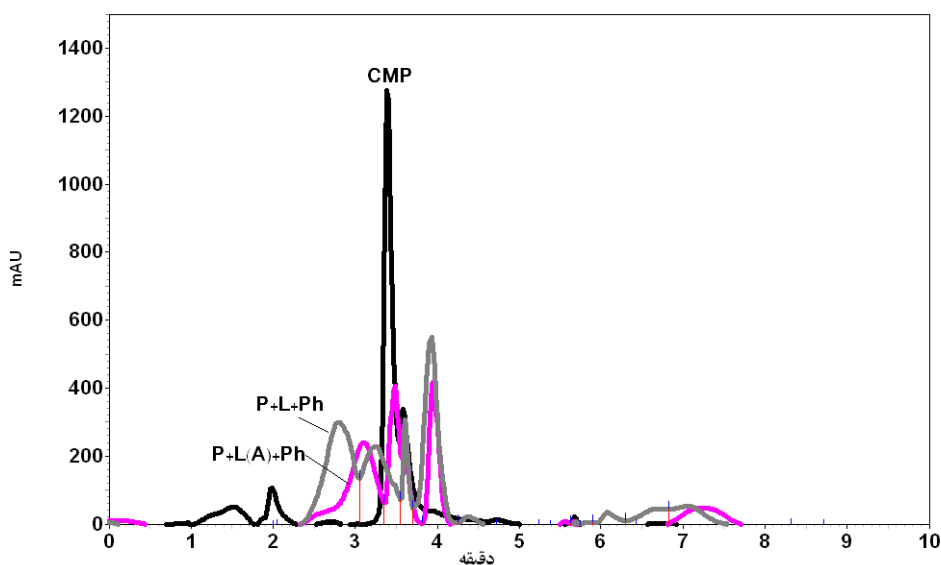
همچنین استفاده از توالی آنزیمی و اکسیداسیون شیمیایی سبب بهبود چشمگیر رنگ پساب شد. یافته‌ها نشان داد که استفاده از تیمار شیمیایی پس از مرحله آنزیمی عملکرد بهتری بر روی رنگ پساب CMP دارد. شکل ۱۰ عملکرد استفاده از آنزیم‌ها بر تخریب لیگنین را نشان می‌دهد و شکل ۱۱ نشان می‌دهد که تحلیل HPLC با نتایج ناشی از بررسی تغییر رنگ پساب مطابقت دارد.



شکل ۹. تأثیر عمل‌آوری بیولوژیکی - شیمیایی با پراکسیداز، لاکاز، و فنتون بر جذب نور پساب CMP [P پراکسیداز، L لاکاز، Ph فتوفنتون، A، ABTS]



شکل ۱۰. کروماتوگرام پساب CMP پس از عمل‌آوری به وسیله پراکسیداز و لاکاز (P پراکسیداز و L لاکاز)



شکل ۱۱. کروماتوگرام HPLC پساب CMP پس از تخریب آنزیمی - شیمیایی (P پراکسیداز، L لاکاز، و Ph فتوفنتون)

رنگبری پساب به وسیله پراکسیداز و همچنین لاکاز (در حضور ABTS) به سرعت و طی ۳۰ دقیقه اول واکنش صورت می‌گیرد. هم‌افزایی استفاده از آنزیم‌ها در مقایسه با تیمارهای مجزا در رنگبری عملکرد بهتری دارد. علاوه بر این استفاده از توالی آنزیم - تیمار شیمیایی اثر چشمگیری در تغییر رنگ پساب دارد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پراکسیداز چندمنظوره قادر است با بخش‌های محلول لیگنین حتی بدون اضافه کردن هر گونه واسطه‌ای واکنش دهد، و از طریق واکنش‌های تراکمی سبب تراکم ساختارهای نامحلول شود. به‌طور کلی نتایج نشان داد که استفاده از چنین تیمارهایی به‌خصوص در مورد پراکسیداز جامع می‌تواند در بهبود رنگ پساب رنگی کارخانجات کاغذسازی مؤثر باشد و به‌کارگیری مرحله شیمیایی پس از تیمار آنزیمی نتایج بهتری در بهبود رنگ پساب به‌همراه دارد.

بر اساس داده‌های ارائه شده، شدت پیک‌ها در تیمارهای پراکسیداز و لاکاز به‌طور چشمگیری کاهش یافته است که نشان می‌دهد توالی آنزیمی به‌خوبی می‌تواند ساختارهای رنگ‌ساز را به‌نحوی تخریب کند که به‌راحتی توسط تیمارهای شیمیایی قابل تخریب شوند. مهم‌تر اینکه تخریب محلول حاوی لیگنین با استفاده از تیمار آنزیمی - شیمیایی نشان می‌دهد که استفاده از چنین تیمارهایی راه‌حل خوبی برای کاهش ترکیبات رنگی در ساختار پساب‌هاست. شدت پیک‌ها همچنین به‌طور واضح نشان می‌دهد که ترکیبات پساب بر اثر تیمارهای به‌کار گرفته شده به‌طور مؤثری تجزیه شده‌اند.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده نشان داد که فرایندهای فتون و فتوفنتون در تخریب ترکیبات آلی پساب کاملاً مؤثرند. همچنین آنزیم‌های لاکاز و پراکسیداز به‌طور مؤثری قادر به بهبود رنگ پساب CMP هستند. فرایند

References

- [1]. Virk, A.P., Sharma, P., and Capalash, N. (2012). Use of laccase in pulp and paper industry. *Biotechnology Progress*, 28 (1): 21-32.
- [2]. Kiran, S., Ali, S., and Asgher, M. (2013). Degradation and mineralization of azo dye reactive blue 222 by sequential photo-fenton's oxidation followed by aerobic biological treatment using white rot fungi. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90 (2): 208-215.
- [3]. Meza, P.R., Felissia, F.E., and Area, M. C. (2011). Reduction of the recalcitrant COD of high yield pulp mills effluents by AOP. part 1. combination of ozone and activated sludge. *BioResources*, 6 (2): 1053-1068.
- [4]. Huang, Y.-F., and Huang, Y.-H. (2009). Identification of produced powerful radicals involved in the mineralization of bisphenol A using a novel UV-Na₂S₂O₈/H₂O₂-Fe(II,III) two-stage oxidation process. *Journal of Hazardous Materials*, 162 (2-3): 1211-1216.
- [5]. Espejo, A., Aguinaco, A., García-Araya, J.F., and Beltrán, F.J. (2014). Sequential ozone advanced oxidation and biological oxidation processes to remove selected pharmaceutical contaminants from an urban wastewater. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 49 (9): 1015-1022.
- [6]. Ahmed, B., Mohamed, H., Limem, E., and Nasr, B. (2009). Degradation and mineralization of organic pollutants contained in actual pulp and paper mill wastewaters by a UV/H₂O₂ process. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48 (7): 3370-3379.
- [7]. Raghukumar, C., D'Souza-Ticlo, D. and Verma, A. K. (2008). Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: An emerging role of marine-derived fungi. *Critical Reviews in Microbiology*, 34 (3): 189 - 206.
- [8]. Zucca, P., Rescigno, A., Pintus, M., Rinaldi, A. C., and Sanjust, E. (2012). Degradation of textile dyes using immobilized lignin peroxidase-like metalloporphines under mild experimental conditions. *Chemistry Central Journal*, 6 (1): 161.
- [9]. Wang, J., Majima, N., Hirai, H., and Kawagishi, H. (2012). Effective removal of endocrine-disrupting compounds by lignin peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Current Microbiology*, 64 (3): 300-303.
- [10]. Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M., and Paszczynski, A. J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 52 (1): 1-12.
- [11]. Wolfenden, B. S., and Willson, R. L. (1982). Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: Pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (7): 805-812.
- [12]. Martinez-Inigo, M. J., and Kurek, B. (1997). Oxidative degradation of alkali wheat straw lignin by fungal lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase: A comparative study. *Holzforchung*, 51 (6): 543-548.
- [13]. Abdulkhani, A., and Mirshokraie, S. A. (2006). The effect of water quality on the optical properties of chemimechanical pulp of Northern Iranian hardwoods. *Cellulose Chemistry and Technology*, 40 (6): 431-438.
- [14]. Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M. J., Bergbauer, M., Szewzyk, U., and Martínez, A. T. (1998). A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Letters*, 428 (3): 141-146.
- [15]. Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M., and Szewzyk, U. (1998). Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters*, 165 (1): 43-50.

- [16]. Camarero, S., Böckle, B., Martínez, M.J., and Martínez, A. T. (1996). Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. Applied and Environmental Microbiology, 62 (3): 1070-1072.
- [17]. Guerra, A., Ferraz, A., Cotrim, A. R., and Da Silva, F. T. (2000). Polymerization of lignin fragments contained in a model effluent by polyphenoloxidases and horseradish peroxidase/hydrogen peroxide system. Enzyme and Microbial Technology, 26 (5-6): 315-323.
- [18]. Bourbonnais, R., Leech, D., and Paice, M. G. (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1379 (3): 381-390.
- [19]. Wong, Y., and Yu, J. (1999). Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. Water Research, 33 (16): 3512-3520.