کاربرد بالقوه‌ی آنزیم‌ها در تصفیه‌ی ضایعات*

مترجمان: احمد نصیراحمدی (استادیار)، محمد پازوکی (استادیار)
گروه محیط زیست پژوهشکده‌ی انرژی
پژوهشگاه مواد و انرژی

تکمیل و اجرای استانداردهای دقیق و رو به افزایش مربوط به تخلیه‌ی ضایعات در محیط زیست، توسعه‌ی فرایندهای دیگر را در زمینه‌ی تصفیه‌ی ضایعات ناگزیر ساخته است. یک بازنگری تحقیقاتی در جهت توسعه‌ی سیستم‌های عملیات آنزیمی برای ضایعات جامد، مایع و خطرناک ارائه شد. آزمایش‌ها نشان داده است که تعداد زیادی از آنزیم‌های با منشاء گیاهی مختلف و ریزاندامگان نقش مهمی در تصفیه‌ی ضایعات ایفا می‌کنند. آنزیم‌ها می‌توانند در عملکرد بر روی آلاینده‌های ناسازگار ویژه، آنها را از طریق رسوب دادن حذف و یا به محصولات دیگر تبدیل کنند. آنزیم‌ها می‌توانند ویژگی ضایعات را به‌منظور مستعدتر نمودن‌شان در عملیات بعدی یا کمک در تبدیل مواد ضایعات به محصولات با ارزش افزوده تغییر دهند.

مقدمه

در طول دو دهه‌ی گذشته، تحقیقات قابل توجهی بر روی امکانات جدید در قابلیت آنزیم‌ها برای تصفیه‌ی ضایعات انجام شده است. این تحقیقات از سه زمینه‌ی اساسی منشاء شده است: ۱ـ سرعت ورود آلاینده‌های آلی سازگار و ناسازگار بر محیط زیست رو به افزایش است و برطرف‌کردن این آلاینده‌ها با استفاده از روش‌های متداول سخت‌تر بوده و در نتیجه، توسعه‌ی روش‌های جایگزینی که سریع‌تر، ارزان‌تر، مطمئن‌تر و با سهولت اجرا در مقایسه با روش‌های جاری دیگر باشد لازم و ضروری است. ۲ـ مقبولیت استفاده از آنزیم‌ها برای یک آلاینده در حال افزایش است. ۳ـ پیشرفت‌های اخیر علم زیست‌فناوری، تولید آنزیم‌های ارزان‌تر و قابل دسترس را از طریق جداسازی و تخلیص امکانپذیر ساخته است.

اکثر فرایندهای تصفیه‌ی ضایعات را می‌توان به یکی از فرایندهای فیزیکی، شیمیایی یا زیست‌شناختی تقسیم‌بندی نمود. تصفیه‌ی آنزیمی به‌دلیل به کارگیری فرایندهای شیمیایی یا زیست‌شناختی که براساس کاتالیزورهای زیستی عمل می‌کند در بین این دو گروه مرسوم قرار می‌گیرد. مزیت بالقوه‌ی تصفیه‌ی آنزیمی در مقایسه با تصفیه‌های جاری عبارت است از: الف) کاربرد در ترکیبات مقاوم زیستی[۱]، ب) قابلیت بکارگیری در غلظت‌های پایین و بالای آلاینده‌ها، ج) کاربری در گستره‌ی وسیع pH، د) دما و شوری، هـ) عدم وجود اثرات بارگذاری ضربه‌یی، و) عدم وجود تأخیرات وابسته به عادت‌کردن زیست‌توده، ز) کاهش حجم لجن (تولیدنشدن زیست‌توده)، ح) سهولت و راحتی کنترل فرایند.[۱]

در شناسایی این مزیت‌های بالقوه، تحقیقات جاری بر روی توسعه‌ی فرایندهای آنزیمی در تصفیه‌ی ضایعات، ضایعات جامد، ضایعات خطرناک و خاک‌ها متمرکز شده‌اند. هدف از این مقاله، ارائه‌ی خلاصه‌یی از تحقیقات آنزیمی در محدوده‌ی تصفیه‌ی ضایعات و تخمین توان این آنزیم‌ها در آینده برای کاربرد در مقیاس بالاتر است.

آلاینده‌های فنولیک و ترکیبات آن

ترکیبات آروماتیک، شامل فنل‌ها و آمین‌های آروماتیک، از آلاینده‌های اصلی به شمار می‌روند که در کشورهای مختلف به شدت کنترل شده‌اند. این آلاینده‌ها در پساب بسیاری از کارخانجات از جمله تبدیل زغال، پالایشگاه نفت، رزین و پلاستیک، نگهداری چوب، آبکاری فلزها، رنگ‌ها و مواد شیمیایی، نساجی، معدن و فرآوری خمیر و کاغذ وجود دارند. بیشتر ترکیبات آروماتیک سمی هستند و بایستی آنها را از پساب‌ها قبل از ورودشان به محیط زیست حذف کرد. تصفیه‌ی آنزیمی به‌عنوان یکی از روش‌های بالقوه به‌جای روش‌های مرسوم توسط بسیاری از دانشمندان پیشنهاد شده است. این امر به چند دلیل مشخص صورت گرفته است: اول این که آنزیم‌ها بسیار انتخابی عمل می‌کنند و می‌توانند به‌طور مؤثر حتی آلاینده‌هایی با غلظت پایین را نیز تصفیه کنند.[۲] دوم، خطر جلوگیری از تأثیرات آنها توسط موادی که برای

ریزاندامگان سمی هستند اندک و هزینه‌ی تمام‌شده‌ی آنها نیز چنانچه در مقیاس صنعتی تولید شوند از روش‌های دیگر به‌صرفه‌تر است. افزون بر آن، آنزیم‌ها در یک طیف وسیع از غلظت ترکیبات آروماتیک عمل می‌نمایند و زمان ماند[۲] آنها در مقایسه با روش‌های دیگر تصفیه کم است.[۳] در زیر، به برخی از این آنزیم‌ها اشاره می‌شود:

پراکسیدازها

پراکسیدازها اکسیدوردا کتازهایی هستند که توسط شماری از ریزاندامگان و گیاهان تولید می‌شوند. آنها تعداد زیادی از واکنش‌های شیمیایی را تسریع نموده و برای فعال شدن، نیاز به حضور پراکسیدهایی چون پراکسید هیدروژن (H_2O_2) دارند. پراکسید هیدروژن در ابتدا آنزیم را اکسید نموده و آن نیز به‌نوبه‌ی خود سوبسترا[۳] را اکسید می‌کند. پراکسیدازهایی که در تصفیه‌ی آلاینده‌های آروماتیک و در مقیاس آزمایشگاهی به کار می‌روند شامل پراکسیدازهای خردل[۴]، پراکسیدازهای لیگنین و.... هستند.

پراکسیداز خردل (HRP)

پراکسیداز خردل (EC 1.11.1.7) از جمله آنزیم‌هایی است که در طیف جدید تصفیه‌ی آنزیمی ضایعات مطالعه‌ی بیشتری بر روی آن صورت گرفته است. وقتی آنزیم توسط (H_2O_2) فعال شد، HRP می‌تواند اکسیدشدن ترکیبات آروماتیک سمی زیادی را که شامل فنل‌ها، بی‌فنل‌ها، آنیلین‌ها، بنزدین‌ها و ترکیبات هتروآروماتیک هستند تسریع کند. محصولات واکنش از طریق یک فرایند غیر آنزیمی بسپارش شده که منجر به ایجاد رسوب غیر محلول می‌شود که می‌توان آن را به‌سادگی از آب پساب با رسوب‌زدایی یا صافی جدا کرد. HRP به‌دلیل قابلیت حفظ فعالیت خود در طیف‌های وسیع pH و دما برای تصفیه‌ی ضایعات مناسب‌تر است.[۴] سازوکار مربوط به HRP کاملاً شناخته شده و با روش ریاضی مدل‌سازی شده است.[۵]

بیشترین کاربردهای HRP در تصفیه‌ی آلاینده‌های فنلی متمرکز شده است.[۴،۶-۸] استفاده از HRP در تصفیه‌ی آلاینده‌هایی شامل آنیلین‌ها، هیدروکسی کوینولین و آریل‌آمین‌های سرطان‌زا مانند بنزیدین‌ها و نفتیل‌آمین‌ها در مقیاس آزمایشگاهی نشان داده شده است.[۷،۹] علاوه‌بر آن، HRP می‌تواند با هم‌رسوبی آلاینده‌هایی که حذفشان مشکل است ــ شامل موادی که HRP بر آنها بی‌تأثیر است ــ همراه با آلاینده‌هایی که به‌سادگی حذف می‌شوند بسپارهای مخلوطی را تشکیل دهند که به‌راحتی قابل حذف‌اند.[۷] این پدیده برای پساب‌هایی که آلاینده‌های مختلف دارند، کاربرد عملی دارد. یکی از کاربردهای این پدیده در ضایعات خطرناک است که پلی‌بی‌فنیل‌های کلردار با هم‌رسوبی فنل‌ها از محلول حذف می‌شوند.[۸] این کاربرد ویژه HRP در تحقیقات دیگر پی‌گیری نشده است. همچنین، کوشش‌هایی با هدف تثبیت حذف فنل‌ها با استفاده از خاصیت کاتالیزوری HRP درمحلول انجام شده است.

در زمینه‌ی افزایش طول عمر آنزیم‌ها و کاهش اقتصادی هزینه‌های تصفیه پیشرفت‌هایی به دست آمده است. این پیشرفت تحت تأثیر چند عامل بوده است: استفاده از یک سیستم واکنشگر مناسب[۱۰]، تثبیت‌کردن آنزیم‌ها[۵،۱۲-۱۴]، استفاده از افزودنی‌هایی مانند بورات سدیم، ژلاتین و پلی‌اتیلن گلیکول برای جلوگیری از حذف آنزیم‌ها در لایه‌های بسپار رسوبی[۱۲،۱۴]، و اضافه‌کردن جاذب‌ها (تالک) که عمل آنزیم‌ها را از اکسید کننده‌ها حفظ می‌کند.[۱۵]

لیگنین پراکسیداز (LiP)

لیگنین پراکسیداز (با EC ناشناخته)، که به نام لیگنیناز یا دی‌آریل‌پروپان اکسیژناز نیز شناخته می‌شود، برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ گزارش شده است.[۱۶] این آنزیم قسمتی از آنزیم سیستم خارج سلولی قارچ White-rot بنام *Phanerochaete Chrysosporium* است.[۱۷،۱۸] LiP نشان داده است که تعدادی از ترکیبات آروماتیک ناسازگار را تخریب و تعدادی از آروماتیک‌های چندحلقه‌یی و ترکیبات فنلی را نیز اکسید می‌نماید.[۱۶،۱۹] نقش LiP در بسپارش مجدد لیگنین نیز به اثبات رسیده است.[۱۷،۱۹-۲۱] نحوه‌ی عمل LiP شباهت زیادی با HRP دارد.[۱۹]

پایداری LiP که تأثیر زیادی بر روی قابلیت بالفعل و اقتصادی کاربرد آنزیم در تصفیه‌ی ضایعات دارد، توسط آتکن و اروین[۶] مطالعه شده است.[۱۷] تحقیقات نشان داده است که LiP در pHهای پائین به‌سهولت غیر فعال می‌شود. پایداری آنزیم با افزایش pH، افزایش غلظت آنزیم و نگهداری آنزیم در حضور سوبسترای الکل وراتریل[۷] افزایش می‌یابد. به همین ترتیب، شرایط تثبیت شده برای حذف ترکیبات فنلی شامل، غلظت بالای آنزیم، pH بالای ۴ و افزایش کنترل شده (H_2O_2) مشاهده شده است.[۱۷] کرن ول[۸] و همکارانش گزارشی ارائه نمودند مبنی بر اینکه LiP تثبیت شده بر روی پایه‌های سرامیک متخلخل پایداری LiP را تغییری نداده و برای تجزیه‌ی آروماتیک‌های مقاوم در محیط‌های زیستی نتایج خوب بالقوه‌یی از خود نشان داده‌اند.[۲۱] ونکاتادری و اروین[۹]، یک واکنشگر غشاء سیلیکونی که قادر به تصفیه‌ی ضایعات خطرناک و تولید LiP است، تهیه نموده‌اند.[۱۸]

پراکسیدازهای دیگر

کلروپراکسیداز (CPO, EC 1.11.1.10) تولیدشده از قارچ *Caldariomyces fumago* چندین ترکیب فنولی را اکسید می‌کند.

همچنین، CPO بعضی از واکنش‌های انتقال اکسیژن مانند اکسایش اتانل به استالدئید یا اکسایش یون‌های کلرید را تسریع می‌کند. در آخرین واکنش یاد شده وقتی یون‌های کلر به مخلوط که در آن کلروپراکسیداز وجود دارد واکنش نشان داد، باعث به وجود آمدن محصولاتی با طیف مختلف ــ که ممکن است سمی باشد ــ می‌شود.[۱۶]

پراکسیداز منگنز (MnP، با آنزیم ناشناخته) که از طریق *Phanerochaete chrysosporium* به دست می‌آید، اکسایش فنل‌های تک‌حلقه‌یی و رنگ‌های آروماتیک را تسریع می‌کند، اما این واکنش‌ها به حضور منگنز دوظرفیتی و بافر بستگی دارد.[۱۷] در حقیقت، MnP اکسایش Mn(II) را به Mn(III) در حضور لیگاند پایدارکننده‌ی Mn(III) تسریع می‌سازد. کمپلکس Mn(III) به دست آمده می‌تواند واکنش اکسایش سوبسترای آلی را انجام دهد.[۱۶] علاوه بر آن، نیاز آنزیم به غلظت زیاد Mn(III) قابلیت استفاده از آن را برای تصفیه‌ی پساب مورد تردید قرار می‌دهد.[۱۶]

استفاده از پراکسیداز میکروبی به دست آمده از *Coprinus macarorhizus* در مقایسه با آنزیم HRP برای حذف ترکیبات آروماتیک از پساب مورد بررسی قرار گرفته است.[۲۲] در مقایسه با HRP کارایی این آنزیم بهتر است و می‌تواند همان واکنش‌ها را تسریع سازد؛ ضمن آنکه به‌سهولت غیر فعال می‌شود. استفاده از هموگلوبین (EC 1.14.99.3) به جای HRP توسط چپسال[۱۰] و همکارانش پیشنهاد شده بود که از نقطه نظر قیمت و کارایی قابلیت استفاده را داشت.[۲۳]

استفاده از گیاهان

آدلر[۱۱] و همکاران از پراکسیدازهایی که از گوجه‌فرنگی و نیلوفر آبی[۱۲] استخراج شده بود برای بسپارش سوبستراهای فنلی استفاده کرده‌اند.[۲۴] آنها همچنین از ریشه‌ی گیاه در آزمایش‌های محیط کشت برای حذف آلاینده‌ها استفاده نمودند. پراکسیدازهای مطالعه شده در آزمایش به‌منظور حذف سوبسترای گوایاکول[۱۳] به خوبی عمل کردند و ریشه‌ی گیاه آلاینده‌ی فنلی را بر روی سطح ریشه رسوب دادند. آدلر و همکارانش استفاده از ریشه‌ی گیاهان را به‌عنوان سیستم آنزیم تثبیت‌شده برای تصفیه‌ی آلاینده‌های فنلی از سیستم‌های آبی و خاک‌ها پیشنهاد کردند. آنها بر این باور هستند که پراکسیدازهای موجود در ریشه، به کاهش جذب ترکیبات فنل در گیاه، با رسوب دادن آن در سطح ریشه کمک می‌نمایند.

دک و بولاگ[۱۴] نیز تصفیه‌ی آب‌های آلوده به ترکیبات فنلی را به وسیله‌ی گیاهان نشان داده‌اند.[۲۵] پراکسیدازهای به دست آمده از خردل، سیب‌زمینی و ترب‌های سفید له‌شده برای حذف ۲،۴ـ دی‌کلروفنل تا غلظت ۸۵۰ میلی‌گرم در لیتر به کار برده شده‌اند که نتایج به دست آمده قابل مقایسه با HRP تصفیه شده است. مطالعات بهینه‌سازی با خردل نشان داد که سرعت حذف آلاینده به pH مخلوط واکنش، اندازه خردل‌های بریده شده، مقدار خردل، (H_2O_2) اضافه شده و مدت زمان بستگی دارد. کوپر و نیسل[۱۵] آب استخراج شده از ریشه‌ی خردل را برای تصفیه‌ی ضایعات ریخته‌گری با موفقیت استفاده نمودند.[۲۶] آنان وقتی درجه و کارایی تصفیه را با بازدهی HRP خالص و ناخالص بررسی کردند نتایج یکسانی به دست آمد.

اکسیدازهای پلی‌فنل

اکسیدازهای پلی‌فنل خانواده‌ی دیگری از اکسیدورداکتازهایی هستند که نشان داده‌اند قادر هستند واکنش‌های اکسایش ترکیبات فنلی را تسریع نمایند. این آنزیم‌ها به دو زیرمجموعه تقسیم می‌شوند: تایروسینازها و لاکازها. هر دو گروه آنزیم‌ها نیاز به وجود مولکول اکسیژن برای فعالیت دارند ولی به کوآنزیم نیازی ندارند.[۲۷]

تایروسیناز

تایروسیناز (EC 1.14.18.1) که به نام‌های پلی‌فنل‌اکسیداز، فنلاز یا کتکلاز نیز شناخته می‌شوند، دو واکنش پی در پی را تسریع می‌کنند: ۱ـ هیدروکسیل‌کردن منوفنل‌ها با مولکول اکسیژن منجر به ۰ـ دی‌فنل می‌شود و ۲ـ دی هیدروژناسیون ۰ـ دی‌فنل‌ها با اکسیژن ۰ـ کوینن‌ها را به دست می‌دهد. کوینن‌ها ناپایداری بیشتری دارند و با بسپارش غیرآنزیمی به مواد غیر محلول در آب تبدیل می‌شوند و به‌آسانی با عمل صاف کردن حذف می‌شوند.[۲۸ـ۳۰]

آتلو[۱۶] و همکارانش رسوب دادن و در نتیجه حذف فنل‌ها در مقیاس ۰/۰۱ تا ۱ گرم بر لیتر از پساب‌های صنعتی را نشان داده‌اند.[۲۸] وادا[۱۷] و همکارانش به نتایجی برخلاف آتلو و همکاران وی رسیدند که در آن هیچ‌گونه رسوبی از بسپارش فنل‌ها با تایروسیناز به وجود نیامد، بلکه یک تغییر رنگ محلول از بی‌رنگ تا قهوه‌یی پررنگ به دست آمد. وادا و همکارانش فرض کردند که مقدار خلوص تایروسیناز ممکن است نقش تعیین‌کننده‌یی را در به وجود آمدن رسوب داشته باشد.[۲۹] به دلیل مشاهده‌نشدن رسوب، آنان برای جذب محصول به دست آمده متوسل به استفاده از کیتین و کیتوزان شدند.[۲۹] کیتین یک پلی‌ساکارید ارزان و فراوان موجود در ضایعات پولک ماهی است. اگر چه کیتوزان برای حذف محصول رنگی واکنش بهتر از کیتین است ولی هر دو در جذب محلول عمل می‌کنند. استفاده‌ی موفقیت‌آمیز کیتوزان در جذب کوینن‌های به دست آمده از تایروسیناز و ترکیبات میانی، توسط سان و همکارانش گزارش شده است.[۳۰] از مزایای اصلی این روش تبدیل محصولات ضایعاتی از صنعت پولک ماهی به یک محصول قابل استفاده است. افزون

بر آن، چنانچه نیاز به حذف مواد جذب شده توسط کیتوزان به منظور استفاده‌ی مجدد از آن باشد، قیمت تمام‌شده‌ی چنین عملی به‌خاطر اتصال جذبی قوی کوینئی به کیتوزان ممکن است غیر اقتصادی باشد.[۳۰] وادا و همکاران از تایروسیناز تثبیت شده همراه با کیتوزان برای تصفیه‌ی فنل استفاده کردند که در طی دو ساعت صددرصد فنل حذف گردید.[۲۹] تثبیت کردن تایروسیناز دارای مزیت نگهداری آنزیم در راکتور و محافظت آنها از غیرفعال شدنشان در واکنش با کوینن‌ها است.[۳۱و۲۹] تثبیت کردن تایروسیناز، فعالیت آن را برای ۱۰ چرخه حفظ می‌کند. در نتیجه، مشاهده خواهد شد که تثبیت کردن تایروسیناز با کیتوزان یک راه مؤثر برای حذف فنل‌های سمی است. اگر چه بر خلاف سودی که در رابطه با استفاده‌ی اکسیژن به‌عنوان اکسیدکننده حاصل می‌شود در حال حاضر ارزش آنزیم تایروسیناز قارچ، خیلی بالاست.

لاکاز

لاکاز (EC 1.10.3.2) که توسط چندین قارچ به دست می‌آید، قادر است سمیت ترکیبات فنلی را از طریق فرایند بسپارش کاهش دهد.[۳۲] همچنین به‌علت نداشتن ویژگی نسبی می‌تواند فنل‌های آلاینده را با فنل‌های طبیعی پیوند دهد.[۳۲] در حقیقت لاکاز قادر به اکسید کردن ترکیبات فنلی به رادیکال‌های آنیونی آزاد آنها ــ که بسیار فعال نیز هستند ــ می‌باشد.[۲۷]

در یک تحقیق که بر روی لاکاز به دست آمده از قارچ *Rhizoctonia Praticola* صورت پذیرفت، بولاگ[۱۸] و همکارانش توانایی آنزیم برای از بین بردن سمیت بعضی از فنل‌های آزمایش‌شده را نشان دادند.[۳۲] به نظر می‌رسد از بین بردن سمیت یک فنل مشخص به توانایی آنزیم در انتقال آن ماده بستگی دارد که با ناپدید شدن فنل اولیه در آزمایش معین می‌شود. افزون بر آن، محصول واکنش به دست آمده یکسان نیست. بولاگ و همکارانش نتیجه گرفتند که توانایی لاکاز برای از بین بردن سمیت یک محلول دارای فنل به ترکیب ماده‌ی مورد تصفیه، منبع آنزیم و عوامل دیگر زیست‌محیطی بستگی دارد.[۳۲]

خمیر و ضایعات کاغذ

پراکسیدازها و لاکاز

فرایند کرافت[۱۹] که درخمیر چوب استفاده می‌شود، ۸ـ۵ درصد (w/w) لیگنین تغییریافته را در خمیر نگه می‌دارد. این لیگنین باقیمانده‌ی عامل رنگ قهوه‌یی خمیر است و در صنعت به‌وسیله‌ی سفیدکننده‌هایی مانند کلرین یا اکسیدهای کلرین از بین می‌رود.[۳۳] این فرایند رنگ زدایی، پسابی قهوه‌یی رنگ تولید می‌نماید که دارای ترکیبات سمی کلردار یا ترکیبات تغییریافته‌ی کلردار است و مخاطرات زیست‌محیطی را به دنبال دارد.[۳۴]

فرر[۲۰] و همکارانش استفاده از پراکسیداز خردل و پراکسیداز لیگنین (LiP) را در رنگ‌زدایی پساب از طریق فرایند کرافت نشان دادند.[۳۵] به نظر می‌رسد که هر دو آنزیم دارای قابلیت بالقوه‌یی هستند و در شکل تثبیت شده بهتر از آنزیم‌های آزاد کارایی دارند. مشاهده شده است که LiP به دست آمده از *P. chrysosporium* نقش مثبتی در رنگبری پساب‌ها در فرایندهای رنگ‌زدایی داشته است. این خاصیت رنگبری بدین ترتیب تشریح می‌شود که LiP ابتدا لگنین را از طریق تسریع اکسایشی واحدهای آروماتیک به رادیکال‌های آزاد تجزیه نموده و این رادیکال‌های آزاد بعداً به خودی خود تجزیه می‌شوند.[۳۶]

تحقیقات نشان داده‌است که لاکاز هم می‌تواند احتمال دیگری برای رنگ‌زدایی و تصفیه‌ی پساب‌ها باشد.[۳۷،۳۸] میلزتین[۲۱] و همکارانش نشان دادند که برای حذف کلروفنل‌ها و کلرولیگنین‌ها از پساب‌ها، به روش رسوبی لاکاز می‌تواند فنل‌ها با وزن مولکولی کم را بسپارش کرده و در نتیجه حذف آنها را با واکنش و رسوب‌دادن با پلی‌اتیلن‌امین سهولت بخشد.[۳۸] رویر[۲۲] و همکارانش، آنزیم‌های (ناشناخته) داخل سلولی قارچ *Coriolus Versicolor* را دارای قابلیت رنگ‌زدایی دانستند.[۳۴] در مطالعاتی که آنزیم‌های آزاد رنگ‌زدایی قابل ملاحظه‌یی داشتند آنزیم‌های تثبیت شده نتایج بهتری را از خود نشان داده‌اند.

آنزیم‌های سلولی

گزارش هایی مبنی بر استفاده از آنزیم‌های سلولی برای تصفیه‌ی لجن‌های خمیر چوب و جوهربری[۲۳] وجود دارد. دوف[۲۴] و همکارانش آزمایشاتی را انجام دادند که در آن امکان هیدرولیزکردن لجن‌های دارای مواد سلولزی زیاد حاصل از فرایندهای خمیر و کاغذ را برای تولید یک منبع انرژی مانند اتانول مورد بررسی قرار گرفت.[۳۹] از آنجایی که برای تولید هر تن خمیر کاغذ ۶۰ کیلوگرم لجن رها می‌شود، تولید اتانول یک راه جذاب برای کاهش مقدار لجن به وجود آمده است که بایستی به‌نحوی آن را جابه‌جا کرد و یا از بین برد. آنزیم‌هایی که در این خصوص استفاده می‌شوند شامل مخلوطی‌از آنزیم‌های سلوبایوهیدرولاز (EC 3.2.1.91)، سلولاز (EC 3.2.1.4) و βـگلوکوسیداز (EC 3.2.1.21) است. در یک تحقیق دیگر دوف و همکارانش آزمایش‌هایی را بر روی تبدیل سوبستراهای سلولزی کم‌ارزش به دست آمده از یک واحد بازسازی فیبر و جوهرزدایی به شکرهای قابل تخمیر انجام دادند.[۴۰] فعالیت آنزیم‌های استفاده شده نه‌تنها به‌وسیله‌ی غلظت زیاد جوهر کم نشد بلکه در حضور مواد فعال سطحی[۲۵] سرعت هیدرولیز آنزیمی افزایش قابل توجهی خصوصاً در ابتدای واکنش داشته است.

آفت‌کش‌ها

آفت‌کش‌ها شامل علف‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها و قارچ‌کش‌ها، برای حفظ گیاهان به‌طور گسترده استفاده می‌شود و انتظار می‌رود تداوم استفاده از آنها رو به افزایش رود.[۴۱] تأثیرات مضر بالقوه‌یی که صنعت آفت‌کش‌ها می‌تواند بر روی محیط زیست داشته باشد ناشی از دور ریختن ضایعات در طول تولید و شکل‌بندی این آفت‌کش‌ها، خنثی‌سازی سمیت ظروف نگهداری تانکرهای پاششی، آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی به‌وسیله‌ی مجاری آفت‌کش‌هاست.[۴۲،۴۳] روش‌های معمول تصفیه شامل سوزاندن روش‌های شیمیایی و دفن زمینی است، لیکن این روش‌ها محدودیت‌های جدی دارند که شامل قیمت زیاد، تولید محصولات جانبی خطرناک، دورریزی محلول‌های شیمیایی، آسیب‌پذیری سیستم‌های تصفیه‌ی بیولوژیکی حساس به بارگذاری ضربه‌یی[۲۶] است.[۴۴]

پاراتیون هیدرولاز ــ با EC ناشناخته ــ که فسفوتری استراز نیز نامیده می‌شود برای سمیت‌زدایی آفت‌کش‌ها پیشنهاد شده است و به نظر می‌رسد که یک روش مناسب به جای روش‌های متداول باشد. پاراتیون هیدرولاز از طریق چندین باکتری از جمله پسودوموناس، فلاووباکتری PET و استرپتومیسس نوترکیب به دست می‌آید.[۴۱،۴۵] این آنزیم نشان داده است که قادر به هیدرولیز کردن شماری از آفت‌کش‌هاست که استفاده‌ی وسیع دارند؛ مانند متیل و اتیل پاراتیون، دایازینون، فنسولفوتیون، دورسبان و کومافوس.[۴۲،۴۴] این آفت‌کش‌های ارگانوفسفات‌ها حجم وسیعی از آفت‌کش‌های کشاورزی را شامل می‌شود که در حال حاضر در حدود ۸۰۰ هزار مورد مسمومیت آفت‌کش‌ها را شامل می‌شود.[۴۴]

کومافوس برای از بین بردن کنه‌ی گاوها با فروبردن گاوها در استخر که دارای کومافوس هستند استفاده می‌شود. با کلرزدایی بی‌هوازی کومافوس (شبیه استفاده از فروبردن در استخر) محصولی بنام پوتاسان[۲۷] به دست می‌آید. محصول هیدرولیز کومافوس و پوتاسان به ترتیب کلروفرون و ۴ـ متیل‌امبلی‌فرون است.[۴۱] محصولات این هیدرولیز محلول‌تر از سوبسترای اولیه هستند و می‌توانند از طریق اوزن و نور ماوراء بنفش (UV) تصفیه شوند.

پاراتیون هیدرولاز به‌طور موفقیت‌آمیزی نشان داده است که کومافوس را سریع‌تر از روش شیمیایی هیدرولیز می‌کند. افزون بر آن، در صورت استفاده از مقدار معینی آنزیم، پوتاسان هیدرولیز می‌شود و این در حالی است که کومافوس بی‌اثر می‌ماند.[۴۵] مزیت فرایند یاد شده افزایش طول عمر کومافوس و کاهش تولید ضایعات آن است. علت آن است که پوتاسان برای گاوها سمی است و محتوی استخرها بایستی همیشه جایگزین شوند و به این ترتیب حجم زیادی ضایعات بر پایه‌ی کومافوس ایجاد می‌شود.[۴۱] در آزمایشگاه پاراتیون هیدرولاز آزاد در دمای ۵۰C–۴۵ و در pHهای ۵/۵ تا ۱۰ پایدار است. آنزیم تثبیت شده در دماهای ۵۰C–۴۵ و pH تثبیت شده ۸/۵ پایدار است. مونیکه[۲۸] با استفاده از پاراتیون هیدرولاز تثبیت شده بر روی شیشه توانست آفت‌کش‌های ارگانوفسفات‌ها را با موفقیت هیدرولیز نماید.[۴۲] مزایای آنزیم‌های تثبیت‌شده حفظ فعالیت آنزیم[۴۵]، پتانسیل تصفیه‌ی جریان مستمر[۴۴] و احتمال استفاده‌ی مجدد آن است[۴۲].

ضایعات سیانوری

میزان استفاده از مواد سیانوری را سالانه حدود ۳ میلیون تن تخمین زده‌اند که در صنایع مختلف از جمله صنایع شیمیایی حد واسط، فیبرهای سنتزی، لاستیک، داروسازی و همچنین در صنایع استخراج معدن، فرآوری زغال و آبکاری فلزها به کار برده می‌شوند.[۴۶] بسیاری از گیاهان، میکروب‌ها و حشرات قادر به رهاسازی HCN توسط هیدرولیز آنزیمی بعضی از موادی که ترشح می‌کنند هستند.[۴۷] در نهایت، پساب‌های صنایع غذایی و خوراکی هم سیانور قابل ملاحظه‌یی دارا هستند که منبع آنها گلیکوزیدهای سیانوری مواد گیاهی مختلف است.[۴۶] با توجه به اینکه سیانور یک بازدارنده‌ی سوخت‌وسازی بوده و می‌تواند برای انسان‌ها و ریزاندامگان دیگر کشنده باشد، ضروری است که قبل از دور ریختن پساب‌ها از آن حذف شوند.[۴۶،۴۷]

سیانیداز

سیانیداز ــ با EC ناشناخته ــ آنزیم جدیدی است که در تصفیه‌ی فاضلاب و در طی یک واکنش تک‌مرحله‌یی توانایی تبدیل سیانور به آمونیاک و فرمات را دارا است.[۴۶،۴۷] سیانیداز بر روی برخی از باکتری‌های گرم منفی جدا شده از نوع *Alcaligenes denitrificans* پایه‌گذاری شده و توسط روش‌های تجاری تهیه می‌شود. از مشخصه‌های این آنزیم تمایل و پایداری زیاد در برابر سیانور بوده و قابلیت حذف سیانور در حد خیلی پایین یعنی کمتر از ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر سیانور را داراست.[۴۶]

سینتیک سیانیداز از مدل ساده‌ی مایکلز منتون[۲۹] پیروی می‌کند.[۴۶] فعالیت سیانیداز نه با یون‌های معمول در پساب‌ها (مثل Ni^{+2}، Zn^{+2}، Fe^{+2})، و نه با سوبسترای آلی مانند استات، فرمامید، استامید و استونیتریل تغییر نمی‌کند. دامنه‌ی pH مناسب بین ۸/۳ ـ ۷/۸ گزارش داده شده است که در pHهای بالاتر از ۸/۳ فعالیت خود را به صورت برگشت‌ناپذیر از دست خواهد داد.

در یک تحقیق بر روی سمیت‌زدایی شیره‌ی سیانوری که از فرایند حذف تلخی هسته‌های زردآلو با استفاده از سیانیداز انجام گرفت، بشیر[۳۰]

و همکارانش واکنشگرهایی از نوع غشای پهن نفوذی[۳۱] طراحی کردند که کارایی بالاتری نسبت به واکنشگرهای همزنی و با بستر دارند.[۴۷] مزیت واکنشگر DMR شامل حفظ آنزیم از ذرات مزاحم و مولکول‌های بزرگ برای جلوگیری از سایش و آسیب‌های برش به بستر ثابت است. سیانور از غشای نیمه‌تراوا نفوذ می‌نماید و با آنزیمی که در پشت این غشا محبوس است واکنش کرده و محصول واکنش برگشت شده از غشا گذشته وارد محلول می‌شود.

هیدراتاز سیانور

هیدراتاز سیانور (EC 4.2.1.66) که به نام هیدرولاز فرمامید نیز نامیده می‌شود، سیانور را به شکل آمید هیدرولیز می‌نماید.[۴۷،۴۸] هیدراتاز سیانور توسط تعدادی از قارچ‌ها تولید شده و موجب می‌شود که قارچ در معرض غلظت کم سیانور عکس‌العمل نشان دهد. نازلی[۳۲] و همکارانش متوجه شدند که هیدراتاز سیانور در بستر ثابت پایدارتر است و آنزیم به دست آمده از *Gloeocercospora sorghi* خیلی پایدارتر از آنزیمی است که توسط *Stemphylium loti* به دست می‌آید. آنان پیشنهاد کردند که هیدراتاز سیانور قارچی تثبیت شده در تصفیه‌ی پساب‌های سیانوری مناسب‌تر است.

ضایعات فرآوری غذایی

صنعت فرآوری غذایی یکی از عمده‌ترین صنایعی است که مقدار زیادی ضایعات تولید می‌کند. علاوه بر آن، ضایعاتی که توسط دیگر صنایع به وجود می‌آید زیان‌بخش‌اند و باید از طریق طرح‌های مناسب آنها را خنثی و بی‌ضرر ساخت. ضایعات غذایی از این نظر مزیت‌هایی دارد که به مواد غذایی یا محصولات غیر غذایی با ارزش افزوده تبدیل می‌شود. محققان در سال‌های اخیر، به کارگیری آنزیم‌ها را در تبدیل ضایعات غذایی پیشنهاد کرده‌اند.[۴۹] آنزیم‌ها می‌توانند از طریق فرایندهای آنزیمی در کاهش ضایعات غذایی و تبدیل آن به محصولات جنبی با ارزش و کمک در پاکسازی جریان ضایعات غذایی به کار گرفته شوند.[۵۰]

پروتئازها

پروتئازها گروهی از هیدرولازها هستند که به‌طور گسترده‌یی در صنایع غذایی به‌منظور فرآوری ضایعات ماهی و گوشت به کار می‌روند. پروتئازها می‌توانند پروتیین‌های موجود در ضایعات را به صورت محلول درآورند که به صورت کنسانتره‌ی مایع یا جامدات خشک با ارزش غذایی برای ماهی و دام‌ها قابل بازیافت‌اند.[۵۰] پروتئازها طی یک سری از فرایند چندمرحله‌یی، پروتیین‌های غیر محلول را هیدرولیز می‌کنند که به موجب آن آنزیمی که در مراحل اولیه به سطح سوبسترای جامد متصل می‌گردد زنجیرهای پلی‌پپتیدی را که به‌صورت ناپایدار به سطح متصل‌اند شکسته و جدا می‌کنند. سپس، عمل حل‌شدن به‌آهستگی ــ که بستگی به توزیع آنزیم در مکان‌های فعال سطحی ذرات اصلی دارد ــ صورت می‌گیرد.[۵۱]

دالو[۳۳] به کارگیری پروتییناز قلیایی ــ با EC ناشناخته ــ از *Bacillus subtilis* در فرایند ضایعات پر، درکشتارگاه‌های مرغ را نشان داد.[۵۲] پنج درصد وزنی ضایعات پر را بدن مرغ تشکیل می‌دهد که یک منبع پروتیین قابل ملاحظه‌یی برای تغذیه بوده و موجب تخریب کامل ساختار کراتین سخت، می‌شود. حل شدن کامل پر بعد از ترکیب شدن اولیه‌ی آن با هیدروکسید سدیم، خردشدن مکانیکی و هیدرولیز توسط آنزیم حاصل می‌شود. محصول نهایی یک پودر سنگین قهوه‌یی رنگ حاوی پروتیین زیاداست که می‌تواند به‌عنوان یک مکمل غذایی عمده استفاده شود.

ونوگوپال[۳۴] و همکارانش سلول‌های *Bacillus megaterium* *Pseudomonas marinoglutionsa* و *Acromonas hydrophila* را در آلژینات کلسیم تثبیت کردند. پروتئازهای مازاد سلولی که از طریق این سلول‌ها تراوش کردند در حل‌کردن گوشت ماهی مورد استفاده قرار گرفت.[۵۱] آنان نشان دادند که سلول‌های تثبیت شده در واکنشگرهای پیوسته کارایی بهتری نسبت به واکنشگرهای غیر پیوسته به دست می‌دهند.

آمیلازها

آمیلازها هیدرولازهای پلی‌ساکارید هستند که به‌طور همزمان در قندسازی و تخمیر نشاسته[۴۹] و عملیات فاضلاب‌های غذایی حاوی نشاسته به کار گرفته می‌شوند[۵۰]. شومیکر[۳۵] نشان داد که از آمیلازها در تولید الکل از فاضلاب مربوط به فرایند برنج می‌توان استفاده کرد.[۵۰] آمیلازها عملیات مربوط به لجن‌های فعال فاضلاب‌ها را با کاهش زمان افزایش می‌دهند.

کولمان[۳۶] گزارش جالبی راجع به α-آمیلاز (EC 3.2.1.1) و گلوکوآمیلاز (EC 3.2.1.3) در تولید پلاستیک‌هایی که توسط نور و فرایند زیستی تجزیه می‌شوند ارائه داد.[۵۳] فرایند به کار گرفته شده شامل تبدیل مواد نشاسته‌یی موجود در آب پنیر یا ضایعات سیب‌زمینی در فرآوری تجاری غذایی به پلاستیک‌ها که طی فرایند زیستی تجزیه می‌شوند است. α-آمیلاز ابتدا موجب شکست زنجیرهای طولانی مولکول نشاسته به قسمت‌های کوچکتر می‌شود. این قسمت‌های کوچکتر سپس توسط گلوکوآمیلاز از طریق قندسازی به گلوکز تبدیل می‌شود ــ بیش از ۹۰ درصد از نشاسته به گلوکز تبدیل می‌شود. گلوکوز نیز توسط سوشی از باکتری‌های اسیدلاکتیک‌ساز به اسید لاکتیک تخمیر می‌شود. اسید لاکتیک سرانجام بازیافت و خالص شده برای تولید

پلاستیک‌های قابل تجزیه توسط نور و فرایندهای زیستی به کار گرفته می‌شود. سرعت تجزیه‌ی این پلاستیک‌ها می‌تواند با مخلوط کردن دقیق همپارهای مختلف اسید لاکتیک و دیگر ترکیبات، کنترل شود. محصول نهایی تجزیه شامل ۹۵ درصد اسید لاکتیک و ۵ درصد مواد بی‌ضرر زیست‌محیطی است.

علاوه بر کاهش ضایعات غذایی نشاسته و تولید محصولات ارزشمند، پلاستیک‌های تجزیه‌شونده توسط نور و فرایندهای زیستی در تهیه‌ی فیلم‌های مالچی[۳۷] جهت پوشاندن ریشه‌ی درختان تازه نشانده شده و کیسه‌های هم‌بند به کار می‌رود و می‌تواند در سیستم‌های حمل آفت‌کش‌ها و کوددهنده‌ها با برنامه مورد استفاده قرار گیرد.[۵۳]

آنزیم‌های دیگر

گزارش شد که پکتین استراز (EC 3.1.1.11) از *Clostridium thermosulfurogenes* و پکتین‌لیاز (EC 4.2.2.10) از *Clostridium beijerinckii* پکتین را تجزیه می‌کنند ــ پکتین ماده‌ی محلول در آبی است که به جداره‌های دیواره‌ی سلولی گیاهان متصل می‌شود. تفاله‌ی سیب (ضایعات فرایند غذایی)، می‌تواند تجزیه شده به بوتانول تبدیل شود.[۴۹]

آنزیم L-گالاکتونولاکتون اکسیداز (EC 1.1.3.24) از خمیر *Candida norvegensis* می‌تواند در تبدیل زیستی گالاکتوز حاصل از هیدرولیز لاکتوز موجود در مایع پنیر به اسید اسکوربیک که یک ماده ارزشمند شیمیایی است به کار گرفته شود.[۵۰]

لاکتازها نیز می‌توانند در فرآوری ضایعات لبنیاتی برای تولید محصولات باارزش افزودنی بیشتر به کار روند.[۴۹،۵۰] پروتیین تغلیظ‌شده‌ی آب پنیر را می‌توان از جامدات چکیده‌یی که حاوی مقدار زیادی لاکتوز است جدا کرد که به نظر می‌رسد تجزیه و تبدیل آنها از طریق عملیات آنزیمی انجام گیرد.[۴۹] سالانه بیلیون‌ها کیلوگرم آب پنیر تولید می‌شود.[۴۹،۵۰] بنابراین، هرگونه عملیات مفید بر روی آب پنیر اثر مثبتی در محیط زیست خواهد داشت.

کیتیناز (EC 3.2.1.14) از *Serratia marcescens* QMB 1466 نیز قادر است که کیتین را تجزیه کند. در حقیقت، تبدیل زیستی کیتین به خمیر پروتیین تُک‌یاخته[۳۸] به‌عنوان راه دیگری در دفع ضایعات صدف ماهی که دارای کیتین زیادی است پیشنهاد شده است.[۵۴] فرایندی که توسط کوسیو[۳۹] و همکارانش توصیف شد شامل کاهش اندازه‌ی ضایعات میگو، پروتیین‌زدایی و حذف مواد معدنی است که منجر به تولید مواد کیتین می‌شود که آن را می‌توان به آسانی توسط کیتیناز به تکپار N-استیل گلوکوز آمین تبدیل کرد.[۵۴] N-استیل گلوکوز به‌عنوان یک ماده‌ی اولیه برای تولید پروتیین تک‌یاخته به کار می‌رود.

ضایعات جامد و عملیات بر روی لجن

در طول دهه‌ی گذشته علاقه‌مندی در هیدرولیز آنزیمی سلولز رو به افزایش نهاد.[۵۵] این علاقه‌مندی بر پایه‌ی این امتیاز بود که چنین فرایندی تبدیل ضایعات لیگنوسلولزی و سلولزی را به منبع انرژی مفید یعنی تولید قندها، اتانول، بیوگاز یا دیگر محصولات نهائی انرژی‌زا فرارو قرار می‌دهد.[۵۶،۵۷] به هر حال، تاکنون تولید صنعتی شکر از سلولز توسط تعدادی از عوامل مربوط به تولیدات آنزیمی و هزینه‌ی تولید و تهیه‌ی ماده‌ی اولیه دچار وقفه گردید.[۵۵،۵۶] هم‌اکنون، گزارش‌هایی مربوط به راه‌های عملی هیدرولیز آنزیمی سلولز موجود در قسمت آلی ضایعات جامد شهری[۴۰] در تولید قندهای قابل تخمیر و سرانجام اتانول یا بوتانول در دست است. کلانت[۴۱] و همکارانش با به کارگیری سلولازهای به دست آمده از *Trichoderma reesei* CL 847، سوش *Penicillium* CLD 20 و قارچ‌های گرماخواه CL 240 توانسته‌اند از قسمت‌های آلی ضایعات جامد شهری (MSW) مواد هیدرولیز شده به دست آورند که به‌عنوان اساس محیط تخمیری به کار گرفته می‌شوند.[۵۵] قند به غلظت‌های تا ۴۵ گرم در لیتر برای سوبسترا- آب به نسبت ۶۰۰-۴۰۰ گرم در لیتر در یک واکنشگر ستونی پر شده به دست آمده و ماده‌ی هیدرولیزشده‌ی حاصل می‌تواند در تخمیرهای بی‌هوازی استون-بوتانول یا اسید آلی تولید کند. آنزیم‌های موجود در واکنشگر ستونی را پس از جداسازی قند، از طریق فراپالایش می‌توان باز یافت.

ریورز[۴۲] و امرت[۴۳] آثار تعدادی از عواملی نظیر ساختار ماده‌ی اولیه، بلور سلولزی و اندازه‌ی ذرات بر بازده هیدرولیز آنزیمی در روی دو سری از ضایعات جامد شهری (MSW) یعنی کاغذ روزنامه و مقواهای مچاله‌شده را مورد مطالعه قرار دادند.[۵۸] هدف نخست آنها این بود که تغییرات روی ضایعات جامد شهری را که منجر به افزایش تبدیل آن به اتانول می‌شود تعیین کنند. برای این کار یک سیستم کامل سلولاز از Qm *Trichoderma reesei* 9414G را مورد استفاده قرار دادند. سیستم آنزیم مرکب از اندوگلوکوناز ــ با EC ناشناخته ــ و سلوبیوهیدرولاز (EC 3.2.1.91) و سلوبیاز (EC 3.2.1.21) است. نتایج نشان می‌دهد که عوامل بلور سلولزی و اندازه‌ی ذرات، عامل عمده در تعیین قابلیت دسترسی و مستعد تبدیل لیگنوسلولزها به آنزیم سلولزی نیستند. بهترین عملیات اولیه بر روی کاغذ روزنامه خردکردن مرطوب آن است در صورتی که برای مقواهای مچاله‌شده خردکردن خشک آن مناسب‌تر است.

در مطالعه‌ی دیگری که شامل تهیه‌ی آنزیم‌های قارچی اکوناز است، اثر آنزیم‌های سلولوتیکی بر تخریب ضایعات جامد شهری مورد بررسی قرار گرفت.[۵۷] اکوناز عمدتاً شامل اندو-۴و۱-β-D گلوکوناز (EC 3.2.1.4)، سلوبیوهیدرولاز و اگزو-۴و۱-β-D گلوکوزیداز (EC

3.2.1.74) است. افزون بر آن تعدادی از آنزیم‌های دیگر را نیز شامل می‌شود. به کارگیری اکوناز موجب افزایش تخریب ضایعات جامد شهری و سلولز می‌شود.

جدا از هیدرولیز ترکیبات سلولزی ضایعات جامد شهری، کارهایی درخصوص به کارگیری آنزیم‌ها در بی‌آب‌کردن لجن‌ها انجام گرفته است. توماس[۴۴] و همکارانش به‌منظور اصلاح قابلیت آب‌زدایی لجن‌های فاضلاب و افزایش مقدار آب در هنگام فشرده‌کردن آن جهت دستیابی به کاهش حجم حقیقی از محصولات آنزیمی شامل کربوهیدراز (با EC ناشناخته)، لیپاز (EC 3.1.1.3) و فعال‌سازهای پروتیناز استفاده کردند.[۵۹] اثر اضافه‌کردن آنزیم موجب شکست اتصال آب و درشت‌مولکول‌ها گردید. با وجود این که مقدار ۵-۲/۵ میلی‌گرم در لیتر آنزیم موجب کارایی بالا می‌شود، افزایش بیش از آن موجب پیدایش گروه‌های انتهای آب‌دوست در نتیجه اثر منفی در فرایند آب‌زدایی می‌شود.

فعالیت‌هایی در زمینه‌ی آب‌زدایی لجن‌های فسفات توسط آنازیا[۴۵] و میسرا[۴۶] انجام گرفته است.[۶۰] لجن‌های فسفاتی حاوی مقدار قابل ملاحظه‌یی از مواد رس مانند متورم شونده و ذرات ریز آنها همراه نه‌نشین‌شدن آهسته‌شان، بی‌آب شدن آنها را دچار مشکل می‌کند. آنازیا و میسرا به‌منظور بهبود در آب‌زدایی این لجن‌ها به کارگیری پراکسیداز را پیشنهاد کردند.[۶۰] در گزارش آنها آمده است که ترکیب پراکسیداز با لجن‌ها پیش از هر عملیاتی موجب اتصال مکانیکی بیشتر ذرات لجن و پراکسیداز و در نتیجه افزایش رشد قارچ و کپک با اثر مفید در افزایش تجمع ذرات و گرانروی بالا و قدرت ژلی می‌شود. چنین گرانروی بالا و قدرت ژلی باعث کمک رسوب‌گذاری بعدی می‌شود.

هاکولینن[۴۷] از به کارگیری سلولاز و آنزیم باکتریایی لیزوزیم (EC 3.2.1.17) یا مورامیداز در آب‌زدایی لجن خبر داد.[۶۱] هر چند سلولاز در به کارگیری با پنی‌سیلین نتایج نسبتاً ضعیفی به دست داد، با این حال، لیزوزیم قادر است به‌طور مؤثری سرعت آب‌زدایی را افزایش دهد.

حذف فلزهای سنگین

فلزهای سنگین مثل ارسنیک، مس، کادمیم، سرب و کروم همراه با دیگر فلزها، آلاینده‌های خطرناکی‌اند که در ضایعات جاری مقداری از صنایع و معادن و همچنین ضایعات جامد، لجن‌های فاضلاب شهری و شیرابه‌های آن وجود دارد.[۶۲] برای مثال، کادمیم در ضایعات کارخانجاتی که با قال‌گذاری، آبکاری، مخلوط کردن و رنگدانه همراه‌اند وجود دارد در صورتی که دیگر فلزها در نیروگاه‌های هسته‌یی، صنایع دفاع و تجدید فرآوری سوختی به کار گرفته می‌شوند.[۶۳،۶۴] با توجه به سمیت فلزهای سنگین، از نفوذ آنها به آب باید جلوگیری شود.

ماکاسکی[۴۸] و دین[۴۹] روش‌هایی برای حذف فلزهای سنگین از ضایعات آبکاری و دیگر صنایع پیشنهاد داده‌اند.[۶۳] اینها مدعی‌اند که حذف کادمیم، سرب، مس، اورانیم و استرانسیم به‌طور موفقیت‌آمیزی انجام پذیرفته است. فرایند عملیاتی شامل به کارگیری سلول‌های سوش *Citrobacter* ممزوج شده در ژل پلی‌اکریلامید است که محلول‌های حاوی فلزها از آن عبور داده می‌شود. یک فسفاتاز متصل به سلول که از طریق فراهم‌آمدن یک ماده‌ی اولیه گلیسرول-۲-فسفات به‌عنوان تنها منبع فسفر، پیش از رشد به وجود می‌آید، فسفات معدنی را به مقداری که مورد نیاز رشد است آزاد می‌کند. فسفات معدنی به‌نوبه‌ی خود به فلز متصل شده تشکیل فسفات فلز غیرمحلول در سطح سلول می‌نماید. گزارش‌ها نشان می‌دهد که درصد فلز را می‌توان از سلول‌های ثابت بازیافت و سلول‌های ثابت را نیز مجدداً به کار گرفت.[۶۴] دمای مطلوب برای سلول‌ها ۳۰°C است و فسفاتازها در محدوده‌ی pH=۵-۹ نسبتاً پایدارند. با وجودی که حضور مقادیر زیاد یون کلراید (Cl^-) بر فسفاتاز بی‌تأثیر است، غلظت‌های یون سیانید (CN^-) به‌مقدار بیش از ۵OmM از تجمع کادمیم توسط سلول‌ها جلوگیری می‌کند. این یونها اغلب در ضایعات آبکاری یافت می‌شوند. کاربردهای ژل پلی‌اکریلامید به‌عنوان یک عامل تثبیت‌کننده به‌طور کامل بررسی نشده و به نظر می‌رسد که شیشه و دیگر پایه‌های ساکن موارد بهتری برای این منظور هستند.[۶۴]

کاربردهای بالقوه‌ی دیگر

آلوده‌زدایی خاک

بولاگ پیشنهاد کرد که افزایش آنزیم‌هایی چون لاکاز به خاک‌های آلوده به‌منظور افزایش پیوند سازگاری فرایند طبیعی و یکنواختی با خاک آلی (هوموس) امکانپذیر است.[۲۷] لاکاز از *Trametes versicolor*، *Rhizoctonia Praticola* و دیگر قارچ‌ها در افزایش پیوستگی جفت‌شدن اکسایشی فنل‌های مختلف کلردار و آمین‌های آروماتیکی با تشکیل‌دهنده‌های فنلی خاکی به کار گرفته شدند. بی‌اثر ساختن و سم‌زدایی ترکیبات خطرناک از مزایای چنین فرایندی است. پیوستگی آلاینده‌ها با مواد خاکی آلی موجب کاهش آلاینده‌های تأثیرگذار بر گیاهان و جانوران منطقه می‌شود، سمیت آلاینده‌ها را از طریق فرایند جفت‌شدن می‌کاهد و از نشت مواد شیمیایی از طریق تشکیل رسوبات نامحلول جلوگیری می‌کند. به نظر می‌رسد که مواد سازگاری که در خاک وارد شدند پایدار می‌مانند. آنها به‌طور جزیی و به‌آرامی رها می‌شوند که هیچ‌گونه خطر بهداشتی در پی ندارند و ترکیبات رهاشده می‌توانند طی فرایندهای طبیعی به ترکیبات معدنی تبدیل شوند و یا اینکه مجدداً به خاک‌های آلی متصل شوند.

خاکستر زغال سنگ و تثبیت خاک

خان[50] و سارکر[51] تأثیرات افزایش آنزیم نسبت به دوام و تثبیت خاک رس خالص و مخلوط خاک با خاکستر زغال سنگ را مورد آزمایش قرار دادند.[۶۵] آنچه از برآیند آزمایش این دو به دست آمد، عبارت بود از: افزایش آنزیم به مخلوط خاک کائولنی و خاکستر زغال سنگ (۵ درصد وزنی خاکستر زغال سنگ) به‌طور پیوسته موجب افزایش دوام مخلوط شده و با ۱۰ درصد وزنی غلظت آنزیم ــ زمانی که افزایش آنزیم متوقف شد ــ توان نامحدود مخلوط متراکم تا حدود ۵۳ درصد افزایش یافت. آنزیم به کار گرفته شده در این آزمایش تجارتی بود که با نام پرما ـ آنزیم شناخته می‌شود. تحقیقات خان و سارکر نشان داد که آنزیم محصول تخمیر بوده و اثر خورندگی یا سمیّت ندارد.

امتیازهای به کارگیری آنزیم در تثبیت خاک ـ خاکستر زغال سنگ در حقیقت حل مسأله مهم مربوط به آمادگی خاک است که در عین حال موجب افزایش دوام خاک نیز می‌شود. خاکستر زغال سنگ حدود ۹۰ درصد باقیمانده‌ی سوخت زغال سنگ را شامل می‌شود و تخمین زده می‌شود که سالانه حدود ۶۵ میلیون تن تنها در ایالات متحده آمریکا تولید می‌شود.[۶۵]

تجزیه‌ی مواد فعال سطحی

مواد فعال سطحی اجسام آلی با مولکول‌های نسبتاً بزرگ قطبی‌اند که اجزای اصلی پاک‌کننده‌ها را تشکیل می‌دهند.[۶۶] مواد فعال سطحی ممکن است عامل مهم به‌وجودآورنده‌ی مشکلات آلایندگی باشند. برای مثال وقتی که غلظت آنها در ترکیب‌بندی کارخانه‌های شامپوسازی زیاد شود وارد سیستم مدخل فاضلاب شهری شده و این امر به‌نوبه‌ی خود موجب پیدایش شرایط نامطلوب نظیر کف‌کنندگی می‌شود.[۶۷]

توماس و وایت[52] گزارش دادند که آلکیل‌سولفاتازهای ــ با EC ناشناخته ــ ثابت از پسودوموناس C12B، مواد فعال سطحی تا غلظت ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر را تجزیه می‌کنند.[۶۷] آنزیمی که ویژه‌ی سولفات‌های آلکیل نوع اول است قادر است مواد فعال سطحی سولفات آلکیل و سولفات اتوکسی آلکیل خالص و تجارتی رابه‌طور کامل تجزیه کند و بر روی برخی آریل‌سولفونات‌ها نیز تأثیر گذارد. این آنزیم قادر نیست آلکان‌سولفونات‌ها را تجزیه کند. در مجموع، آلکیل‌سولفاتازها نویدبخش خوبی هستند که در آینده برای استفاده در تجزیه‌ی تعدادی از مواد فعال سطحی موجود در ترکیب‌بندی شامپوها مورد استفاده واقع شوند.

نتیجه گیری و پیشنهادها

عامل اصلی ویژگی آنزیم‌ها در انتخاب مناسب‌ترین آنها شامل نیاز آنها به کوفاکتور (نظیر H_2O_2 یا O_2) و توانایی آنها در حفظ مقداری از فعالیتشان در زمان‌های طولانی تحت شرایط طبیعی عمل می‌باشد. ویژگی آنزیم‌ها بخصوص در حالاتی که حذف ترکیبات شیمیایی ویژه از محلول رقیق مورد نظر باشد مهم است. ویژگی بسیار گسترده‌ی یک آنزیم ممکن است اثربخشی آن را کاهش دهد. آنزیم‌هایی که به کوفاکتورهای ارزان‌قیمت (نظیر O_2 برای پلی‌فنل‌اکسید از در مقایسه با H_2O_2 برای HRP) نیاز دارند و یا آنهایی که اصلاً به کوفاکتور نیاز ندارند ترجیح داده می‌شود. سرانجام اصلاح حیات کاتالیزی آنزیم‌ها (توانایی در حفظ فعالیت برای زمان‌های طولانی) ممکن است با محدودکردن فعالیت آنزیم در غالب نگهداری آن به صورت جامد صورت پذیرد. به عبارت بهتر، در بیشتر حالات، آنزیم‌های ثابت خیلی مؤثرتر از آنزیم‌های آزاد هستند. مزایای تثبیت‌کردن آنزیم‌ها شامل پایداری، امکان تداوم در فرایند و به کارگیری دوباره‌ی آنزیم است. در برخی حالات به کارگیری آنزیم‌ها ممکن است خیلی مناسب نباشد. برای مثال اگر ضایعات حاوی مواد آلی با غلظت بالا و یا اینکه حاوی ترکیبات شیمیایی گوناگون مسأله‌ساز باشند، به کارگیری آنزیم‌ها در عملیات آنزیمی به‌دلیل نیاز مقدار زیاد آنزیم گران‌تر تمام خواهد شد.[۲] همچنین، به نظر می‌رسد افزایش آنزیم‌ها به واکنشگر لجن فعال حاوی فاضلاب شهری معمولی چندان مطلوب نباشد؛ چرا که کاتالیزورهای گرانقیمتی که به‌طور طبیعی از باکتری‌ها تولید می‌شوند نیز به‌مقدار قابل ملاحظه‌یی باید بدان اضافه شوند.

در مجموع به نظر می‌رسد که در گستره‌ی وسیعی از عملیات ضایعاتی آنزیم‌ها توان بالایی دارند. از طریق به کارگیری آنزیمی امکان تبدیل زیستی[53] ضایعات از فرآوری صنایع غذایی، صنایع خمیر کاغذ و کاغذ سازی یا ضایعات جامد معمولی شهری وجود دارد. این تبدیل زیستی مزایای دوگانه دارد. از یک سو موجب کاهش مواد بی‌ارزش می‌شود که در روی زمین ریخته می‌شود و یا به طریق دیگر مصرف می‌شود و از سوی دیگر، همزمان موجب تولید مواد ارزشمند سوخت (مثل اتانول)، غذا یا خوراک دام و دیگر محصولات می‌شود.

گزارش‌ها نشان می‌دهد که تعداد زیادی از آنزیم‌ها از گونه‌های مختلف گیاهی و ریزاندامگان نقش مهمی در تنظیم کاربردی عملیات ضایعاتی به عهده دارند. آنزیم‌ها می‌توانند آلاینده‌ی ناسازگار ویژه را از طریق رسوب دادن آنها یا تبدیل‌شان به محصولات بی‌ضرر، حذف نمایند. آنها همچنین می‌توانند ویژگی ضایعات معینی را به‌منظور مستعدکردن آن در عملیات ضایعاتی یا تبدیل حیاتی آن به محصولات با ارزش افزوده تغییر دهند.

آنزیم‌ها آینده‌ی نویدبخشی در پیش دارند. پیش از آنکه توانمندی‌های کامل آنزیم‌ها درک شود باید تعدادی از موضوع‌ها نظیر

خلاصه‌یی از آنزیم‌ها و توانمندی کاربردهای آنها

آنزیم	منبع	کاربردها و مراجع
آلکیل سولفاتاز	*Pseudomonas* C12B	تجزیه‌ی مواد فعال سطحی[۶۸]
آمیلازها	باکتریایی	هیدرولیز نشاسته و تولید گلوکز[۴۹،۵۰و۵۳]
ـ آمیلازها (EC 3.2.1.1)		
گلوکوآمیلاز (EC 3.2.1.3)		
آنزیم‌های سلولوتیکی	منابع مختلف	هیدرولیز لجن‌های سلولزیکی از خمیر کاغذ و کاغذ جهت تولید قندها و الکل، هیدرولیز سلولز در ضایعات جامد شهری به قندها و دیگر منبع انرژی[۳۹،۴۰،۵۵،۵۷و۵۸]
سولاز (EC 3.2.1.4)		
سلوبیوهیدرولاز (EC 3.2.1.91)		
سلوبیاز (EC 3.2.1.21)		
اگزو-۴و۱-β-D-گلوکوزیداز (EC 3.2.1.74)		
کیتیناز (EC 3.2.1.14)	*Serratia marcescens*	تبدیل N-استیل گلوکوزآمین[۵۴]
کلرو-پراکسیداز (EC 1.11.1.10)	*Caldariomyces fumago*	اکسایش ترکیبات فنلی[۱۶]
سیانیداز	جداشده از *Alcaligenes denitrification*	تجزیه‌ی سیانید[۴۶و۴۷]
سیانید هیدراتاز (EC 4.2.1.66)	*Gloecercospora sorghi,*	هیدرولیز سیانید[۴۷و۴۸]
	stemphylium loti	
هموگلوبین (EC 1.14.99.3)	خون	حذف فنل‌ها و آمین‌های آروماتیک[۲۳]
L-گالاکتونو-لاکتون اکسیداز	*candida norvegenesis*	تبدیل گالاکتوز از هیدرولیز آب پنیر به L-اسید اسکوربیک[۴۹]
لاکاز (EC 1.10.3.2)	*Rhizoctonia praticola, Fums annosus,*	حذف فنل‌ها، رنگ‌زدایی و سفیدکنندگی، پساب فرایند کرافت، اتصال و پیوستگی فنل‌ها و آمین‌های آروماتیک با هوموس (خاک‌های آلی)[۲۷،۳۲،۳۷و۳۸]
	trametes versicolor	
لاکتازها	باکتریایی	فراورده‌های ضایعات لبنیات و تولید محصولات ارزشمند افزودنی[۴۹و۵۰]
لیگنین پراکسیدازها	*Phanerochate chrysosporium*	حذف فنل‌ها و ترکیبات آروماتیک رنگ‌زدایی سفیدکنندگی پساب فرایند کرافت[۱۶-۲۱،۳۵و۳۶]
لیپاز (EC 3.1.1.3)	منابع مختلف	آب‌زدایی لجن‌های اصلاح‌شده[۵۹]
لیزوزیم (EC 3.2.1.17)	باکتریایی	آب‌زدایی لجن‌های اصلاح شده[۶۱]
Mn-پراکسیداز	*P. Chrysosporium*	اکسایش فنل‌های یک‌حلقه‌یی و رنگ‌های آروماتیکی[۱۶و۱۷]
پاراتیون هیدرولاز	*Pseudomonas* sp. *Flavobacterium*	هیدرولیز آفت‌کش‌های آلی فسفردار[۴۱-۴۵]
	streptomyces	
پکتین‌لیاز (EC 4.2.2.10)	*Clostridium beijerinckii*	تجزیه‌ی پکتین[۴۹]
پکتین استراز (EC 3.1.1.11)	*Ceostridium thermosulfurogenes*	تجزیه‌ی پکتین[۴۹]
پراکسیداز (EC 1.11.1.7)	ریشه‌های خردل، تربچه‌ی سفید، گوجه فرنگی، تربچه‌ی قرمز، دانه‌ی سویا،	حذف فنل‌های و آمین‌های آروماتیک، رنگ‌زدایی، سفیدکنندگی پساب فرایند کرافت، آب‌زدایی لجن‌ها[۳-۸،۱۲-۱۵،۲۲،۲۴-۲۷،۳۵و۶۰]
	Coprinus macrorhizus	
فسفاتاز	*Citrobactor* sp.	حذف فلزهای سنگین[۶۳و۶۴]
پروتئازها	*Basillus subtilis Pseudomonas* &	حل کردن باقیمانده‌ی گوشتی و ماهی، آب‌زدایی لجن‌های اصلاح شده[۵۰-۵۲]
	Marinoglutionsa	
تیروزیناز (EC 1.14.18.1)	قارچ	حذف فنل‌ها[۲۷-۳۱]

شناسایی ویژگی محصولات جنبی واکنش‌ها، مصرف باقیمانده‌های واکنش و کاهش هزینه عملیاتی آنزیمی مورد بررسی قرار گیرد. همچنین، به‌منظور تعیین مناسب‌ترین آنزیم برای یک هدف ویژه و مطلوب ساختن یک فرایند آنزیمی پژوهش‌های بیشتری باید انجام گیرد.

* این مطلب تلخیصی است از مقاله‌ی «کاربرد بالقوه‌ی آنزیم‌ها در تصفیه‌ی ضایعات»، برگرفته از: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **69**, pp. 141-153 (1997).

پانوشت‌ها

1. biorefractory
2. retention time
3. substrate
4. Horseradish Peroxidase (HP)
5. enzyme immobilization
6. Aitken and Irvine
7. Veratryl alchohol
8. Cornwell
9. Venkatadri and Irvine
10. Chapsal
11. Adler
12. Waterhyacinth
13. Guaiacol substrate
14. Dec and Bollag
15. Cooper and Nicell
16. Atlow
17. Wada
18. Bollag
19. kraft
20. Ferrer
21. Milstein
22. Royer
23. deinking
24. Duff
25. surfactant
26. shock loading
27. Potasan
28. Munnecke
29. Michaelis Menten
30. Basheer
31. diffusional type memberain reactor
32. Nazly
33. Dalev
34. Venugopal
35. Shoemaker
36. Coleman
37. mulchian film
38. single cell protein (SCP)
39. Cosio
40. municipal solid waste (MSW)
41. Clanet
42. Rivers
43. Emert
44. Thomas
45. Anazia
46. Misra
47. Hakulinen
48. Macaskie
49. Dean
50. Khan
51. Sarker
52. White
53. bioconvert

منابع

1. Nicell, J.A., Al-Kassim, L., Bewtra, J.K. and Taylor, K.E. "Wastewater treatment by enzyme catalysed polymerization and precipitation", *Biodeterioation Abstracts,* 7(1), pp. 1-8 (1993).
2. Aitken, M.D. " Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles", *The Chemical Engineering Journal.* **52**, B49-B58 (1993).
3. Siddique, M.H., St. Pierre, C.C., Biswas, N., Bewtra, J.K. and Taylor. K.E. "Immobilized enzyme catalyzed removal of 4-chlorophenol from aqueous solution", *Water Research*, **27**(5), pp. 883-90 (1993).
4. Nicell, J.A., Bewtra, J.K., Biswas, N., St. Pierre, C. and Taylor, K.E. "Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from aqueous solution", *Canadian Journal of Civil Engineering,* **20**, pp. 225-35 (1993).
5. Nicell, J.A. "Kinetics of horseradish peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of aqueous 4-chlorophenol", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology,* **60**, pp. 203-15 (1994).
6. Klibanov, A.M. "Enzymatic removal of hazardous pollutants from industrial aqueous effluents", *Enzyme Engineering,* **6**, pp. 319-23 (1982).
7. Klibanov, A.M., Alberti, B.N., Morris , E.D. and Felshin, L.M. "Enzymatic removel of toxic phenols and anilines from waste waters", *Journal of Applied Biochemistry,* **2**, pp. 414-21 (1980).
8. Klibanov. A.M. "Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters", *Science*, **221**, pp. 259-60 (1983).

9. Klivanov, A.M. and Morris, E.D. "Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water", *Enzymeand Microbial Technology,* **3**, pp. 119-22 (1981).
10. Nicell, J.A., Bewtra, J.K., Biswas, N. and Taylor, K.E. "Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater", *Water Research*, **27**(11), pp. 1629-39 (1993).
11. Bodzek, M., Bohdziewicz, J. and Kowalska, M. "Preparation of membrane-immobilised enzymes for phenol decomposition", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology,* **61**, pp. 231-9 (1994).
12. Nakamoto, S. and Machida, N. "Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives", *Water Research,* **26**, pp. 49-54 (1992).
13. Wu. J., Taylor, K., Bewtra, J.K. and Biswas, N. "Optimization of the reaction condition for enzymatic removal of phenol from waste water in the presence of polyethylene glycol", *Water research,* **27**, pp. 1701-6 (1993).
14. Nicell, J.A., Saadi, K.W. and Buchana, I.D. "Phenol polymerization and precipitaton by horseradish peroxidase enzyme and an additive", *Bioresorce Tenchology,* **54**, pp. 5-16 (1995).
15. Arseguel, D., and Baboulene, M. "Removal of phenol from coupling of talc and peroxidase. Application for depollution of waste water containing phenolic compounds", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology,* **61**, pp. 331-5 (1994).
16. Aitken, M.D., Massar, I.I., Chen, T.F. and Heck, P.E. "Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants", *Water Research,* **28**, pp. 1879-89 (1994).
17. Aitken, M.D., and Irvine, R.L. "Stability testing of ligninase and Mn-peroxidase from Phanerochaete Chrysosporium." *Biotechnology and Bioengineering,* **34**, pp. 1251-60 (1989).
18. Venkatadri, R. and Irvine, R.L. "Cultivation of Phanerochaete chrysosporium and production of lignin peroxidase in novel biofilm reactor system: hollow fiber reactor and silicone membrane reactor", *Water Research,* **27**, pp. 591-6 (1993).
19. Aitken, M.D., Venkatadri, R. and Irvine, R.L. "Oxidation of phenolic pollutants by a lignin degrading enzyme from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium." *Water Research,* **23**, pp. 443-50 (1989).
20. Hammel, K.E. "Organopollutant degradation by ligninolytic fungi", *Enzyme and Microbial Technology,* **11**, pp. 776-7 (1989).
21. Cornwell, R.L., Tinland- Butez, M.F., Tardone, P.J., Cabasso, I. and Hammel, K.E. "Lignin degradation and lignin peroxidase production in cultures of Phanerochaete chrysosporium immobilized on porous ceramic supports", *Enzyme and Microbial Technology,* **12**, pp. 916-20 (1990).
22. Al-Kassim, L., Taylor, K.E., Nicell, J.A., Bewtra, J.K. and Biswas, N. "Enzymatic removal of selected aromatic contaminants from wastewater by a fungal peroxidase from Coprinus macrorhizus inbatch reactors", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology,* **61**, pp. 179-82 (1994).
23. Chapsal, J.M., Bourbigot, M.M. and Thomas, D. "Oxidation of aromatic compounds by haemoglobin", *Water Research,* **20**, pp. 709-13 (1986).
24. Adler, P.R., Arora, R., El Ghaouth, A., Glenn, D.M. and Solar, J.M. "Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases", *Journal of Environmental Quality,* **23**, pp. 1113-17 (1994).
25. Dec, J. and Bollag, J.M. "Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols", *Biotechnology and Bioengineering,* **44**, pp. 1132-39 (1994).
26. Cooper, V.A. and Nicell, J.A. "Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase", *Water Research,* **30**(4), pp. 954-64 (1996).
27. Bollag, J.M. "Decontaminating soil with enzymes", *Environmental Science and Technology,* **26**, pp. 1876-81 (1992).
28. Atlow, S.C., Bonadonna-Aparo, L. and Klibanov, A.M. "Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase", *Biotechnology and Bioengineering,* **26**, pp. 599-603 (1984).
29. Wada, S., Ichikawa, H. and Tatsumi, K. "Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase", *Biotechnology and Bioengineering,* **42**, 854-8 (1993).
30. Sun, W.Q., Payne, G.F., Moas, M., Chu, J.H. and Wallace, K.K. "Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater", *Biotechnology Progress,* **8**, pp. 179-86 (1992).
31. Wada, S., Ichikawa, H. and Tatsumi, K. "Removal of phenols with tyrosinase immobilized on magnetite", *Water Science and Technology,* **26**(9-11), pp. 2057-59 (1992).
32. Bollag, J.M. Shuttleworth, K.L. and Anderson, D.H. "Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds", *Applied Environmental Microbiology,* **54**, pp. 3086-91 (1988).
33. Kirk, T.K. and Yang, H.H. "Partial delignification of unbleached kraft pulp with ligninolytic fungi", *Biotechnology Letters,* **1**, pp. 347-52 (1979).
34. Royer, G., Yerushalmi, L., Rouleau, D. and Desrochers, M. "Continuous decolorization of bleached kraft effluents by Coriolus versicolor on the form of pellets", *Journal of Industrial microbiology,* **7**, pp. 269-78 (1991).
35. Ferrer, I., Dezotti, M. and Duran, N. "Decolorization of Kraft

effluent by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase", *Biotechnology Letters,* **13**, pp. 577-82 (1991).

36. Pellinen, J., Yin, C.F., Joyce, T.W. and Chang, H.M. "Treatment of chlorine bleaching effluent using a white-rot fungus", *Journal of Biotechnology,* **8**, pp. 67-76 (1988).
37. Milstein, O., Haars, A., Majcherczyk, A., Trojanowski, J., Tautz, D., Zanker, H. and Hüttermann, A. "Removal of chlorophenols and chlorolignins from bleaching effluent by combined chemical and biological treatment", *Water Science and Technology,* **20**(1), pp. 161-70 (1988).
38. Lankinen, V.P., Inkerötinen, M.M., Pellinen, J. and Hatakka, A.I. "The onset of lignin-modifying enzymes, decrease of AOX and color removal by white-rot fungi grown on bleach plant effluents", *Water Science and Technology,* **24**(3-4), pp. 189-98 (1991).
39. Duff, S.J., Moritz, J.W. and Andersen, K.L. "Simultaneous hydrolysis and fermentation of pulp mill primary clarifier sludge", *Canadian Journal of Chemical Engineering,* **72**, pp. 1013-20 (1994).
40. Duff, S.J., Moritz, J.W. and Casavant, T.E. "Effect of surfactant and particle size reduction on hydrolysis of deinking sludge and nonrecyclable newsprint", *Biotechnology and Bioengineering,* **45**, pp. 239-44 (1995).
41. Smith, J.M., Payne, G.F. and Lumpkin, J.A. "Enzyme based strategy for toxic waste treatment and waste minimization", *Biotechnology and Bioengineering,* **39**, pp. 741-52 (1982).
42. Munnecke, D.M. "Properties of an immobilized pesticide hydrolyzing enzyme", *Applied Environmental Microbiology,* **33**, pp. 503-7 (1977).
43. Munnecke, D.M. "Detoxification of pesticide using soluble or immobilised enzymes", *Process Biochemistry,* **13**, pp. 14-17 (1978).
44. Caldwell, S.R. and Raushel, F.M. "Detoxification of organophosphate pesticides using an immobilized phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta", *Biotechnology and Bioengineering,* **37**, pp. 103-9 (1991).
45. Coppella, S.J., DelaCruz, N., Payne, G.F., Pogell, B.M., Speedie, M.K., Karns, J.S., Sybert, E.M. and Connor, M.A. "Genetic engineering approach to toxic waste management: case study for organophosphate waste treatment", *Biotechnology Progress,* **6**, pp. 76-81 (1990).
46. Basheer, S., Kut, Ö.M., Prenosil, J.E. and Bourne, J.R. "Kinetics of enzymatic degradation of cyanide", *Biotechnology and Bioengineering,* **39**, pp. 629-34 (1992).
47. Basheer, S., Kut, Ö.M., Prenosil, J.E. and Bourne, J.R. "Development of an enzyme membrane reactor for treatment of cyanide-containing wastewaters from the food industry", *Biotechnology and Bioengineering,* **41**, pp. 465-73 (1993).
48. Nazly, N., Knowles, C.J., Beardsmore, A.J., Naylor, W.T. and Corcoran, E.G. "Detoxification of cyanide by immobilised fungi", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology,* **33B**, pp. 119-26 (1983).
49. Blasheck, H.P. "Approaches to making the food processing industry more environmentally friendly", *Trends in Food Science and Technology,* **3**, pp. 107-10 (1992).
50. Shoemaker, S. "The use of enzymes for water management in the food industry", *Biotechnology in Food Processing,* S.K. Harlander and T.P. Labuza, Eds. Nayes Publications, Park Ridge, NJ, pp. 259-67 (1986).
51. Venugopal, V., Alur, M.D. and Nerkar, D.P. "Solubilization of fish proteins using immobilized microbial cells", *Biotechnology and Bioengineering,* **33**, pp. 1098-103 (1989).
52. Dalev. P.G. "Utiliztion of wate feathers from poultry slaughter for production of a protein concentratc", *Bioresource Technology,* **48**, pp. 265-7 (1994).
53. Cloeman, R. "Biodegradable plastics from potato waste double 2-02 .pp ,)6(**17** ,*gnire*",*ignE larutlucirgA* ".tnemnorivne ot sgnivas (1990).
54. Cosio, I.G., Fisher, R.A. and Carroad, P.A. "Biconversion of shellfish chitin waste: waste pretreatment, enzyme production, process design and economic analysis", *Journal of Food Science,* **47**, pp. 901-5 (1982).
55. Clanet, M., Durand, H. and Tiraby, G. "Enzymatic saccharification of municipal wastes", *Biotechnology and Bioengineering,* **32**, pp. 930-4 (1988).
56. Coughlan, M.P. "Enzymic hydrolysis of cellulose: an overview", *Bioresource Technology,* **39**, pp. 107-15 (1992).
57. Lagerkvist, A. and Chen, H. "Control of two-step anaerobic degradation of municipal solid waste (MSW) by enzyme addition", *Water Science and Technology,* **27**, pp. 47-56 (1993).
58. Rivers, D.B. and Emert, G.H. "Factors affecting the enzymatic hydrolysis of municipal-solid-waste components", *Biotechnology and Bioengineering,* **31**, pp. 278-81 (1988).
59. Thomas, L. Jungschaffer, G. and Sprössler, B. "Improved sludge dewatering by enzymatic treatment", *Water Science and Technology,* **28**(1), pp. 189-92 (1993).
60. Anazia, I., and Misra, M. "Enzymatic dewatering of Florida phosphate slimes", *Minerals and Metallurgical Processes,* **6**(2), pp. 93-5 (1989).
61. Hakulinen, R. "The use of enzymes for wastewater treatment in the pulp and paper industry, a new possibility", *Water Science and Technology,* **20**(1), pp. 251-62 (1988).

62. Pradham, A.A. and Levine, A.D. "Experimental evaluation of microbial metal uptake by individual components of a microbial biosorption system", *Water Science and Technology,* **26**(9-11), pp. 2145-8 (1992).

63. Macaskie, L.E. and Dean, A.C.R. "Cadmium accumulation by a Citrobacter sp." *Journal of General Microbiology,* **130**, pp. 53-62 (1984).

64. Macaskie, L.E., Wates, J.M. and Dean, A.C.R. "Cadmium accumulation by a Citrobacter sp. immobilized on gel and solid supports: applicability to the treatment of liquid wastes containing heavy metal cations", *Biotechnology and Bioengineering,* **30**, pp. 66-73 (1987).

65. Khan, L.I. and Sarker, M. "Enzyme enhanced stabilization of soil and fly ash", *Fly Ash for Soil Improvement Proceedings of the 1993 of ASCE Annual Convention,* Dallas, Texas, pp. 43-50, 1993.

66. Sawyer, C.N., McCarty, P.L. and Parkin, G.F., *Chemistry for Environmental Engineering,* 4th edn. McGraw Hill, New York (1994).

67. Thomas, O.R.T. and White, G.F. "Immobilization of the surfactant-degrading bacterium Pseudomonas C12B inpolyacrylamide gel. III. Biodegradation specificity for raw surfactants and industrial wastes", *Enzyme and Microbial Technology,* **13**, pp. 338-43 (1991).

68. Massey, I.J., Aitken, M.D., Ball, L.M., and Heck, P.E., "Mutagenicity screening of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants", *Environmental Toxicology and Chemistry,* **11**, pp. 1743-52 (1994).

69. Karam, J., and Nicel, L.A. "Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology,* **69**, pp. 141-153 (1997).