

固定化灵芝漆酶脱色氨基黑反应体系优化

方金涛,夏敏,董冰雪,陈彩玉,杨玉娇,金秀婷,董文浩

(南阳师范学院生命科学与技术学院,河南南阳473061)

摘要:采用响应面分析法,对固定化灵芝漆酶(Lac)降解氨基黑10B脱色反应体系进行优化分析.首先采用单因素实验分别获取反应体系中6个影响脱色率因素的最佳值;然后通过Plackett-Burman设计法对选取的6个影响因素进行筛选,确定主要影响因素为ABTS浓度和Lac酶量;再用最陡爬坡实验逼近ABTS浓度和Lac酶量2个主要因素的最大响应区域,并通过中心组合设计和响应面分析,确定2个主要影响因素的最佳值.优化后的氨基黑10B脱色200 μL 反应体系为:pH值4.6、温度30 $^{\circ}\text{C}$ 、ABTS浓度0.07 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硫酸铜浓度1.75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Lac酶量6.23 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、初始底物浓度100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.该反应体系氨基黑10B脱色率可达60.02%,比单因素法脱色率提高了44.46%.

关键词:氨基黑10B脱色;单因素实验;Plackett-Burman设计法;响应面分析

中图分类号:Q819

文献标志码:A

染料废水主要来源于印染业、印刷业、纺织业、食品加工、染料制造等领域,是公认的难以处理的污染物之一.在染料生产及使用过程中有10%~15%的染料以废水的形式排放到环境中,造成了严重的环境污染和生态系统的破坏^[1-3].全球染料每年产量约为800万t,偶氮类染料占据一半以上,且该类染料具有致畸、致癌、致突变的“三致效应”^[4].偶氮类染料因其具有复杂芳香环结构,生物降解困难;目前运用化学或物理的方法虽然能对偶氮类染料废水处理起到了较好的效果^[5-6],但利用理化方法处理存在对环境造成二次污染和成本高的现象,使其在处理偶氮类染料废水的推广运用受到了限制^[7-9].相对理化方法酶法降解偶氮类染料因具有不造成环境二次污染、反应快速、条件温和等特点而受到生产者的青睐.漆酶作用底物范围广,能够使多种染料脱色,但漆酶稳定性差、易降解.研究表明,固定化漆酶处理染料及印染工业废水比游离漆酶具有明显的优越性^[10-14].漆酶的固定化一方面提高了酶的稳定性,另一方面减少了酶在工业处理废水应用中损失量、降低了工业中的处理成本,实现了酶的循环利用.

氨基黑10B属偶氮类染料,是实验室常用的蛋白质染色剂,使用后大多直接以废水方式排出,造成环境污染.目前氨基黑处理大多使用物理化学的方法进行吸附脱色,尚未发现直接用漆酶脱色氨基黑10B的研究报道.

酶法脱色染料是一个复杂的体系,受多种因素的影响,应作为一整体来进行研究.常用的单因素法工作量较大,简单的实验设计忽略了各因素之间的交互作用,难以得到理想结果.正交试验具有实验设计的合理,几种影响因素同时考虑的优点,但是还存在对整个区域因素和响应值之间的函数关系不能明确的建立,因而各个对响应值的影响因素不能进行最佳的组合^[15-17].

本研究以灵芝固定化漆酶为研究对象,用偶氮染料氨基黑10B做测试染料,氨基黑10B脱色率为响应值,采用单因素法、PB设计法等筛选出固定化灵芝漆酶脱色氨基黑10B的主要影响因素;通过最陡爬坡试验、中心组合实验和响应面分析方法^[18-20]确定固定化灵芝漆酶脱色氨基黑10B的最优方案.以期偶氮类

收稿日期:2015-05-10;修回日期:2015-06-10.

基金项目:国家自然科学基金(31300669);河南省科技厅科技攻关项目(112102210385;142102210479);南阳师范学院高层次人才科研启动项目(zx20110007);河南省教育厅科学技术重点研究项目(13A18081;14B180003).

第1作者简介:方金涛(1988-),男,河南南阳人,南阳师范学院硕士研究生,研究方向为酶工程.

通信作者:董冰雪(1977-),女,河南南阳人,南阳师范学院讲师,研究方向:酶工程,E-mail:dongbingxue2004@163.com

染料工业废水脱色提供科学合理的理论依据和方法技术的指导.

1 材料与方法

1.1 材料

供试灵芝(*Ganoderma lucidum*)菌株 AM21 由中山大学生物实验室赠送,保存于南阳师范学院生物实验室;氨基黑 10B、ABTS 均购于美国 Sigma 公司;硫酸铜、磷酸氢二钠、柠檬酸、海藻酸钠、氯化钙均为分析纯,购于上海生工.

1.2 方法

1.2.1 固定化灵芝漆酶的制备

用 500 mL 三角瓶配制 250 mL 的液体 MYG 培养基(葡萄糖 1 g、酵母粉 1 g、麦芽糖 2.5 g,加水至 250 mL,自然 pH),接入灵芝菌丝,29 °C、200 r·min⁻¹摇床培养 5 d,取上清作为粗酶液,使用海藻酸钙微球包埋法制备固定化灵芝漆酶^[21].

1.2.2 固定化灵芝漆酶活性检测

酶活性测定使用 ABTS 法^[22]:将一定质量的固定化漆酶加入含 0.5 mmol·L⁻¹ ABTS 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中(pH 5.0),30 °C 催化反应 3 min,冰浴 10 min 终止反应,离心取上清液,用 Bio-rad EXL 800 酶标仪 405 nm 下测定吸光值变化.以单位时间内催化 1 μmol ABTS 转化为蓝绿色 ABTS 阳离子所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)($\epsilon=3.6\times 10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).经检测,本研究制备的固定化灵芝漆酶酶活达到 0.868 U·mg⁻¹.

1.3 单因素分析

以脱色率作为固定化灵芝漆酶对氨基黑 10B 脱色效果的评价指标,脱色率高的即为最适脱色条件.每个单因素实验均重复 3 次取平均值,所有单因素实验在 200 μL 反应体系中反应 4 h 后,在 Bio-rad EXL 800 酶标仪 630 nm 波长下测量不同因素条件下氨基黑 10B 脱色前后吸光值,根据脱色前后氨基黑 10B 吸光值计算脱色率,脱色率=(脱色前的吸光值-脱色后的吸光值)/脱色前的吸光值×100%.

1.3.1 最适 pH 值

以柠檬酸-磷酸氢二钠为缓冲液,设置 2.2、2.6、3.0、3.6、4.0、4.6、5.0、5.6、6.0 等共 9 个 pH 梯度,体系内含 Lac 5 mg、100 mg·L⁻¹ 的氨基黑 10B、0.1 mmol·L⁻¹ 的硫酸铜、0.15 mmol·L⁻¹ 的 ABTS;温度 30 °C,反应 4 h 后测定吸光值,计算不同 pH 条件下氨基黑 10B 脱色率,筛选出最适脱色 pH.

1.3.2 最适温度

设置 20、25、30、35、40、45 °C 等共 6 个温度梯度.pH 4.6、其他条件同 1.3.1,反应 4 h 后测定吸光值,计算不同温度条件下氨基黑 10B 脱色率,筛选出最适脱色温度.

1.3.3 最适 ABTS 浓度

设置 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45 mmol·L⁻¹ 等共 9 个 ABTS 浓度梯度,pH 值 4.6、温度 30 °C、其它条件同 1.3.2,反应 4 h 后测定吸光值,计算不同 ABTS 浓度条件下氨基黑 10B 脱色率,筛选出最适脱色 ABTS 浓度.

1.3.4 最适硫酸铜浓度

设置 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25、2.50 mmol·L⁻¹ 等共 9 个硫酸铜浓度梯度,pH 值 4.6、温度 30 °C、ABTS 浓度 0.07 mmol·L⁻¹、其它条件同 1.3.3,反应 4 h 后测定吸光值,计算不同硫酸铜浓度条件下氨基黑 10B 脱色率,筛选出最适脱色硫酸铜浓度.

1.3.5 最适酶量

设置 1.25、2.50、3.75、5.00、6.25、7.50、8.75 mg 等共 7 个 Lac 酶量梯度,pH 值 4.6、温度 30 °C、ABTS 浓度 0.07 mmol·L⁻¹、硫酸铜浓度 1.75 mmol·L⁻¹、其它条件同 1.3.4,反应 4 h 后测定吸光值,计算不同 Lac 梯度条件下氨基黑 10B 脱色率,筛选出最适脱色 Lac 酶量.

1.3.6 最适底物浓度

设置 10、25、50、75、100、125、150、200 mg · L⁻¹ 等共 8 个氨基黑 10B 的浓度梯度, pH 值 4.6、温度 30 °C、硫酸铜浓度 1.75 mmol · L⁻¹、ABTS 浓度 0.07 mmol · L⁻¹、Lac 酶量 6.23 mg, 反应 4 h 后测定吸光值, 计算不同氨基黑 10B 浓度条件下氨基黑 10B 脱色率, 筛选出最适脱色氨基黑 10B 浓度。

1.4 PB 试验设计

采用 PB 两水平法, 筛选影响氨基黑 10B 脱色率的主要因素。以脱色率为响应值, 对影响脱色率的 6 个单因素进行全面筛选, PB 设计时选用 $N=11$, 并设置 5 个虚拟变量以作误差分析。PB 实验因素和水平如表 1, 根据表 1 设计实验方案(见表 2), 所有测量均重复 3 次取平均值, 采用“Design Expert 8.0”(Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA) 软件对数据进行研究分析。

表 1 PB 试验因素设计

水平	因素					
	A	B	C	D	E	F
-1	4	0.875	30	0.1	2.5	50
1	5	5.25	35	0.6	15	300

注: A: Ph; B: 硫酸铜, mmol · L⁻¹; C: 温度, °C; D: ABTS 浓度, mmol · L⁻¹; E: Lac 酶量, mg; F: 初始底物浓度, mg · L⁻¹。下表同。

表 2 $N=11$ PB 试验设计

试验点	因素										
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
4	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
5	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
6	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
8	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
9	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
12	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1

1.5 最陡爬坡试验

从 PB 实验可以确定对脱色率起关键作用的因素, 进而以主要因素为变量设计最陡爬坡试验, 非主要因素使用单因素最适值进行试验。根据影响因素对脱色率影响的大小及实际结果分别设定最陡爬坡实验的步长, 并进行优化处理。

1.6 中心组合设计和响应面分析

在最陡爬坡试验确定的区域内, 以脱色率为响应值设计中心组合实验^[23], 对实验结果进行响应面分析和回归分析, 并对分析结果做方差检验。用“Design Expert 8.0”软件对设计相关实验、分析相关数据和模型建立, 其中 α (轴向点) 为 1.414 21。

1.7 拟合度试验

以响应面分析主要影响因素的结果为最佳浓度, 其它因素采用单因素测得的最适浓度, 进行固定化灵芝漆酶对氨基黑 10B 的脱色试验, 所有测量均重复 3 次取平均值, 研究分析预测响应值和真实实验响应值的契合度。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 pH 对氨基黑 10B 脱色的影响

固定化灵芝漆酶脱色氨基黑的最佳 pH 为 4.6, 此时脱色率达 32.5%。在 pH 不超过 4.6 时, 随着 pH 增

大,氨基黑脱色率迅速上升,超过 4.6 脱色能力反而下降(见图 1). 所以选择 pH4.6 作为后续实验的最适 pH. 不同来源漆酶脱色偶氮染料时都存在类似情况,只是最适 pH 有所不同. 杜东霞等报道^[24],粗毛栓菌灵芝漆酶脱色偶氮染料刚果红的最适 pH 为 4.5,和我们的结果近似. 来源于芽孢杆菌的漆酶脱色偶氮类染料最适 pH 在 pH6.0~7.0^[25],嗜热色串孢 (*Scytilidium thermophilum*) 漆酶脱色偶氮染料的最适 pH 为 pH5.0~6.0^[26].

2.1.2 温度对氨基黑 10B 脱色的影响

脱色率随着反应体系温度的升高表现出先升高后下降的趋势,在温度 30 °C 时达到最大值,此时脱色率最高达 25.53%(见图 2). 温度高于 35 °C 后脱色率低于 5%,高温使脱色率下降可能与酶的部分失活有关. 不同来源漆酶脱色偶氮染料的最适温度不同,在 40~65 °C 之间^[24-26]. 灵芝属于中温菌,生产的漆酶反应条件更温和,染料脱色时能耗更低.

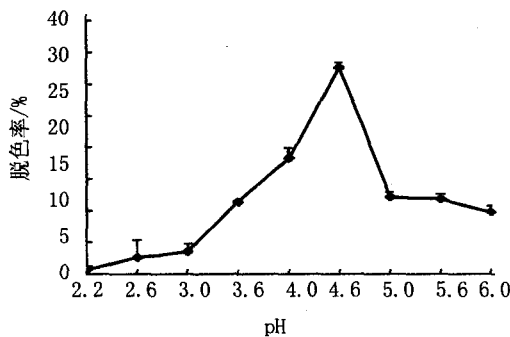


图 1 pH对氨基黑10B脱色的影响

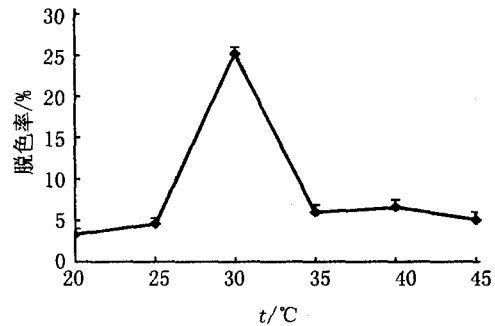


图 2 温度对氨基黑10B脱色的影响

2.1.3 硫酸铜对氨基黑 10B 脱色的影响

氨基黑脱色的最适硫酸铜浓度为 $1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,此时最高脱色率为 35.38%(见图 3). 当 Cu^{2+} 浓度低于 $1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,硫酸铜能对固定化灵芝漆酶对氨基黑 10B 的脱色起到促进作用,主要因为 Cu^{2+} 不仅是固定化灵芝漆酶的一个活性中心,而且还是固定化灵芝漆酶分子一个重要组成成分,能起到激活漆酶活性的作用. 硫酸铜浓度高于 $1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,氨基黑 10B 的脱色率呈现缓慢下降的趋势,由此可以看出过高浓度 Cu^{2+} 会抑制氨基黑 10B 的脱色效率^[27].

2.1.4 ABTS 对氨基黑 10B 脱色的影响

偶氮类染料为漆酶的非直接底物,小分子介体(如 ABTS、HBT 等)的存在可以提高染料脱色^[8]. 促进氨基黑脱色的最适 ABTS 浓度为 $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,此时最高脱色率为 33.44%(见图 4). 过高的 ABTS 浓度对促进氨基黑脱色没有任何贡献,甚至会对脱色起到抑制作用. 故后续实验 ABTS 浓度选择为 $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 本实验验证了 Wang 和 Yu 在研究漆酶脱色偶氮类和靛青类染料时需要小分子介体提高脱色率的推论^[27].

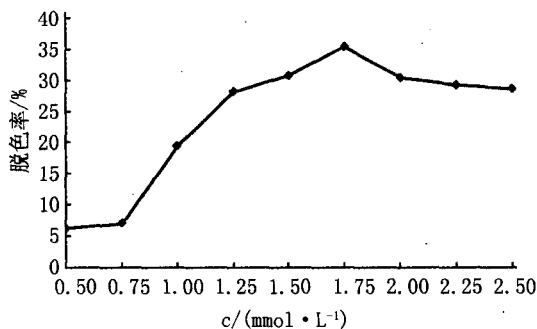


图 3 硫酸铜对氨基黑10B脱色的影响

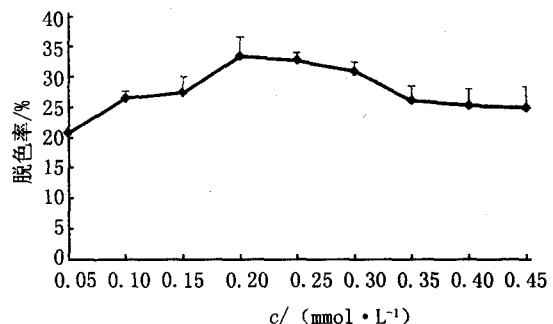


图 4 ABTS对氨基黑10B脱色的影响

2.1.5 Lac 酶量对氨基黑 10B 脱色的影响

200 μL 体系,脱色氨基黑的最适 Lac 量为 5.00 mg,此时脱色率可达 34.16%. 低于 5.00 mg 时随酶量的

增加氨基黑脱色率迅速上升,超过 5.00 mg 脱色率反而下降(见图 5). 过氧化物酶在脱色偶氮类染料时也存在酶量过大抑制脱色率的现象^[28],但是早期也有研究报道过量的酶既不增加染料脱色率脱色率也不会抑制染料脱色^[29].

2.1.6 氨基黑初始浓度对氨基黑 10B 脱色的影响

最适氨基黑的浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,此时脱色率可达 33.33%. 低于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时随氨基黑浓度升高脱色率也升高,达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后继续增加氨基黑浓度脱色率逐渐下降(见图 6). 酶降解多种染料时都存在一定范围内随染料浓度升高脱色率上升,超过一定值后脱色率反而下降的现象^[30-31].

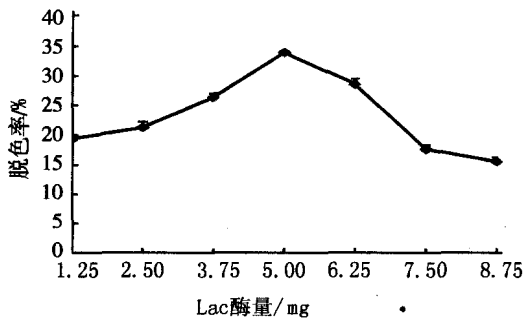


图 5 Lac酶量对氨基黑10B脱色的影响

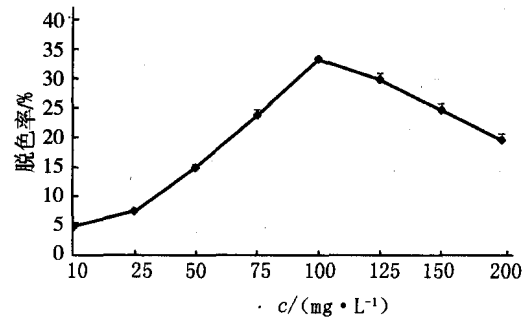


图 6 氨基黑浓度对氨基黑10B脱色的影响

2.2 影响氨基黑 10B 脱色的主要因素

通过 PB 试验确定影响氨基黑 10B 脱色率的主要因素. 模型和方差分析结果见表 3,所建模型效果显著 ($P < 0.05$); 6 个影响氨基黑 10B 脱色率的因素中, ABTS 浓度和 Lac 酶量对氨基黑 10B 脱色效果影响显著 ($P < 0.05$),因此把 ABTS 浓度和 Lac 酶量两个因素作为影响氨基黑 10B 脱色率的主要影响因素,根据实际实验数据制定最陡爬坡试验.

表 3 PB 试验结果方差分析表

影响因子	方差汇总	自由度	方差平均值	F 值	P 值
模型 Model	2808.58	6	468.10	6.19	0.0320
A	496.67	1	496.67	6.57	0.0504
B	144.90	1	144.90	1.92	0.2247
C	308.21	1	308.21	4.08	0.0994
D	859.42	1	859.42	11.37	0.0198
E	704.06	1	704.06	9.32	0.0283
F	295.33	1	295.33	3.91	0.1050
残余	377.82	5	75.56	—	—
总计	3186.39	11	—	—	—

2.3 最陡爬坡实验

ABTS 浓度和 Lac 酶量步长分别为 $0.0125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 1.25 mg ,最陡爬坡试验的设计和结果如表 4 所示. 由表 4 可知,实验 3 的氨基黑 10B 脱色率最高,因此以该实验所对应的 ABTS 浓度 ($0.125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 LAC 酶量 (5.00 mg) 作为响应面试验的中心点.

表 4 最陡爬坡试验的设计及结果

试验编号	ABTS/(mmol·L ⁻¹)	LAC/mg	脱色率/%
1	0.1000	2.50	29.44
2	0.1125	3.75	36.48
3	0.1250	5.0	50.55
4	0.1375	6.25	37.63
5	0.1500	7.50	29.45
6	0.1625	8.75	27.36
7	0.1750	10.0	9.34

2.4 中心组合设计及响应面分析

中心组合试验的各因素和各因素的水平以及试验设计和结果见表5. 借助 Design Expert 8.0 软件对 PB 试验的实验数据进行分析, 分析的响应面回归方程为:

$$Y = -36.2243 + 6.88911A + 139.7257B - 3.2717AB - 0.5246A^2 - 5^2.5331B^2.$$

本实验得到的实验模型为极显著 ($R^2 = 0.9777$, $P < 0.001$), 模型可以解释响应面 97.77% 的差异变化, 拟合度良好. 因此可以利用上述模型代替真实实验点对氨基黑 10B 脱色率进行分析和预测. 从表 6 中的 P 值还可以看出, 上述方程中各影响因素均显著, 其中 Lac 酶为极显著.

利用软件 Design Expert 8.0 还可以得出氨基黑 10B 脱色率与其影响因素 ABTS 浓度和 Lac 酶量之间的等高线图(见图 7)和 3D 响应面图(见图 8). 从图中可以看出 ABTS 浓度和 Lac 酶量存在极值点, 从等高线最小椭圆的中心点可以推断出两个因子在所选的范围内存在极值. 此外, 椭圆形等高线图表明两因子之间的相互作用显著^[32-33]. 运用 Design Expert 8.0 软件计算出最大响应值所对应的 ABTS 浓度和 Lac 酶量分别为 $0.07 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 6.23 mg , 计算出的最大响应值为 60.09%.

表 5 中心组合实验设计及试验结果

实验编号	因素水平		脱色率/%
	A/ABTS 浓度/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	B/Lac 酶量/mg	
1	0	$-\alpha(1.46447)$	15.47
2	0	0	55.23
3	0	0	57.74
4	$-1(0.05)$	$1(7.50)$	55.28
5	0	0	59.59
6	$\alpha(0.231)$	0	40.06
7	0	0	51.55
8	$-\alpha(0.019)$	0	53.92
9	$1(0.2)$	$1(7.50)$	35.72
10	0	0	55.60
11	$-1(0.05)$	$-1(2.50)$	29.65
12	0	$\alpha(8.53553)$	44.87
13	$1(0.2)$	$-1(2.50)$	29.72

表 6 响应面二项式模型的方差分析表

影响因子	方差汇总	自由度	方差平均值	F 值	P 值
模型 Model	2 221.05	5	444.21	61.24	<0.000 1
A(ABTS 浓度)	190.92	1	190.92	26.32	0.001 4
B(Lac 酶量)	669.87	1	669.87	92.35	<0.0001
AB	96.33	1	96.33	13.28	0.008 2
A ²	155.06	1	155.06	21.38	0.002 4
B ²	1 199.88	1	1 199.88	165.42	<0.000 1
残余 Residual	50.77	7	7.25	—	—
失拟性 Lack of Fit	14.30	3	4.77	0.52	0.689 4
纯误差 Pure Error	36.47	4	9.12	—	—
总计 Cor Total	2 271.82	12	—	—	—

2.5 拟合度实验

综合响应面分析结果可知, 在一定三维变量区域内氨基黑 10B 脱色率存在最优值. 验证试验结果表明, 3 个平行试验的灵芝固定化漆酶对氨基黑 10B 的脱色率相近, 平均值为 60.02%, 与预测值拟合度良好.

2.6 固定化酶的重复利用

以单因素实验测定的最适 pH(4.6)、最适温度(30 ℃)、最适硫酸铜浓度($1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、最适初始底物浓度($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和 PB 实验、最陡爬坡实验、中心组合实验及响应面实验获得的最适 ABTS 浓度($0.07 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、最适 Lac 酶量(6.23 mg)为反应体系, 本研究制备的固定化灵芝漆酶重复使用 5 次, 其氨基黑 10B 脱色率为 49.86%, 较最高脱色率下降 16.93%.

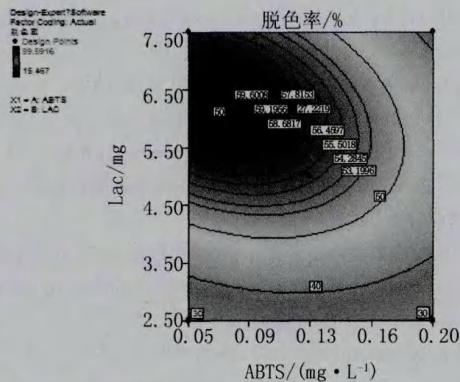


图7 响应面等高线图

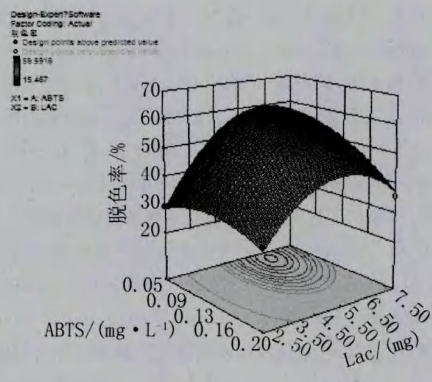


图8 响应面三维效果图

3 结论

本研究使用海藻酸钙微球包埋法制备固定化灵芝漆酶,采用单因素法和统计学方法对固定化灵芝漆酶脱色氨基黑 10B 反应体系进行了优化.建立的氨基黑脱色率的二次多项数学模型达到极显著($p < 0.0001$),从拟合度试验看,回归模型与实际情况拟合得很好.对回归方程求导得到极值点:ABTS 浓度 $0.07 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Lac 酶量 6.23 mg ,此时降解率为 60.09% ,与实际值(60.02%)基本相符.模型能够比较真实地反映各因素对氨基黑脱色的影响.优化后的反应体系氨基黑 10B 脱色率比单因素法提高了 44.46% .

参 考 文 献

- [1] Narayan H, Alemu H, Alotsi D N, et al. Fast and complete degradation of Congo red under visible light with Er^{3+} and Nd^{3+} ions doped TiO_2 nanocomposites[J]. Nanotechnology Development, 2011, 2(1): 217-221.
- [2] Wambugh D, Chianelli R R. Indigo dye waste recovery from blue denim textile effluent: a by-product synergy approach[J]. New Journal of Chemistry, 2008, 32(12): 2189-2194.
- [3] Vyas B R, Molitoris H P. Involvement of an extracellular H_2O_2 -dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol brilliant blue R[J]. Applied and environmental microbiology, 1995, 61(11): 3919-3927.
- [4] Cai M Q, Wei X Q, Du C H, et al. Novel amphiphilic polymeric ionic liquid-solid phase micro-extraction membrane for the preconcentration of aniline as degradation product of azo dye Orange G under sonication by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1349: 24-29.
- [5] 蒋进元,李勇,王国威,等. Fenton 法处理腈纶聚合单元生产废水[J]. 环境科学研究, 2010, 23(7): 897-901.
- [6] 张丽,朱晓东,张燕峰,等. 微波强化 Fenton 氧化处理邻氨基苯甲酸废水[J]. 环境科学研究, 2009, 22(5): 516-520.
- [7] Ma L, Zhuo R, Liu H, et al. Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China[J]. Biochemical Engineering Journal, 2014, 82: 1-9.
- [8] 赵世光,张焱,薛正莲,等. *Ganoderma lucidum* U-281 漆酶催化偶氮染料活性黑 5 脱色[J]. 菌物学报, 2012, 31(5): 867-877.
- [9] Nigam P, Armour G, Banat I M, et al. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues[J]. Bioresource Technology, 2000, 72(3): 219-226.
- [10] Reyes P, Pickard M A, Vazquez-Duhalt R. Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase[J]. Biotechnology Letters, 1999, 21(10): 875-880.
- [11] 肖亚中,张书祥,胡乔彦,等. 壳聚糖固定化真菌漆酶及其用于处理酚类污染物的研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 245-250.
- [12] 董科利,马晓建,鲁锋. 酶在环境保护方面的应用[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(2): 63-65.
- [13] Cristóvão R O, Tavares A P M, Brigida A I, et al. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 72(1): 6-12.
- [14] Peralta-Zamora P, Pereira C M, Tiburtius E R L, et al. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2003, 42(2): 131-144.
- [15] 徐长毫,董冰雪,李长杰,等. 响应面法优化灵芝 AM21 菌株液体深层发酵培养基配方[J]. 食用菌学报, 2011, 18(3): 42-47.
- [16] Anisha G S, Sukumaran R K, Prema P. Evaluation of α -galactosidase biosynthesis by *Streptomyces griseololbus* in solid-state fermenta-

- tion using response surface methodology[J]. Letters in applied microbiology, 2008, 46(3): 338-343.
- [17] Gurkok S, Cekmecelioglu D, Ogel B Z. Optimization of culture conditions for *Aspergillus sojae* expressing an *Aspergillus fumigatus* galactosidase[J]. Biology resource Technology, 2011, 102(39): 4925-4929.
- [18] 范龚健, 韩永斌, 顾振新. 用响应面法优化红甘蓝色素提取工艺参数[J]. 南京农业大学学报, 2006, 29(1): 103-107.
- [19] 王允祥, 吕凤霞, 陆兆新. 杯伞发酵培养基的响应曲面法优化研究[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(3): 89-94.
- [20] Joosten V, Roelofs M S, Van den Dries N, et al. Production of bifunctional proteins by *Aspergillus awamori*; llama variable heavy chain antibody fragment (V_HH) R9 coupled to *Arthromyces ramosus* peroxidase (ARP)[J]. Journal of biotechnology, 2005, 120(4): 347-359.
- [21] 郑文爽. 漆酶的固定化及其对偶氮染料的脱色降解[D]. 长春: 东北林业大学, 2012.
- [22] 董冰雪, 张磊, 耿三春, 等. 突变灰盖鬼伞过氧化物酶降解刚果红的响应面法优化分析[J]. 环境工程学报, 2014, 8(2): 421-428.
- [23] Cai M H, Zhou X S, Sun X Q, et al. Statistical optimization of medium composition for aspergillide A production by marine-derived fungus *Aspergillus glaucus*[J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2009, 36(3): 381-389.
- [24] 杜东霞, 王宜磊. 固定化漆酶对刚果红染料脱色降解的研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(11): 4985-4987.
- [25] Telke A A, Ghodake G S, Kalyani DC, et al. Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. ADR[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1752-1757.
- [26] Younes S B, Bouallagui Z, Gargoubi A, et al. Investigation of dyes degradation intermediates with *Scytalidium thermophilum* laccase[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(5): 751-758.
- [27] Murugesan K, Kim Y M, Jeon J R, et al. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*[J]. Journal of hazardous materials, 2009, 168(1): 523-529.
- [28] Li X, Jia R, Li P, et al. Response surface analysis for enzymatic decolorization of Congo red by manganese peroxidase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 56(1): 1-6.
- [29] Deveci T, Unyayar A, Mazmanci M A. Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Fusarium troglodytes* ATCC 200800[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 30(1): 25-32.
- [30] Yousefi V, Kariminia H R. Statistical analysis for enzymatic decolorization of acid orange 7 by *Coprinus cinereus* peroxidase[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010, 64(3): 245-252.
- [31] Da Silva M R, de S L R V, Russo C, et al. The use of HRP in decolorization of reactive dyes and toxicological evaluation of their products[J]. Enzyme research, 2011, 703824.
- [32] Bhak G, Song M, Lee S, et al. Response surface analysis of solid state growth of *Pleurotus ostreatus* mycelia utilizing whey permeate[J]. Biotechnology letters, 2005, 27(20): 1537-1541.
- [33] 岳田利, 王云燕, 袁亚宏, 等. 短乳杆菌产葡萄糖异构酶培养基的响应面法优化[J]. 西北农林科技大学学报, 2009, 37(2): 217-224.

Optimization of Decolorization Reaction System of Amino Black 10B Using Immobilized *Ganoderma lucidum* Laccase

FANG Jintao, XIA Min, DONG Bingxue, CHEN Caiyu, YANG Yujiao, JIN Xiuting, DONG Wenhao

(College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan)

Abstract: Response surface methodology (RSM) was applied for optimization of amino black 10 B decolouration using immobilized *ganoderma lucidum* laccase. The optimum value of the six selected impact factors about decolorizing efficiency were measured through single factor experiment. A Plackett-Burman design was applied to screen potential key factors, and the steepest ascent method was adopted to approach the approximate optimal reaction system. Finally, central composite design and response surface methodology were applied to define more precisely the optical composition of the reaction system. The data revealed ABST concentration and Laccase amount to be the most influential parameters, and the composition of the optimal reaction system was determined to consist of pH 4.6, temperature 30 °C, copper sulfate concentration 1.75 mmol · L⁻¹, ABTS concentration 0.07 mmol · L⁻¹, enzyme 6.23 mg, the initial amino black 10 B 100 mg · L⁻¹. The decolorization ratio of amino black 10 B in the optimal reaction system was 60.02%, which was 44.46% higher than single factor method.

Keywords: decolouration of Amido black10 B; single factor method; plackett-Burman design; response surface methodology