

# 漆酶催化偶氮染料酸性橙脱色的研究

华煜,程耕,王莹茹\*

(武汉工程大学化学与环境工程学院,湖北武汉430205)

**摘要:**利用米曲霉菌漆酶对偶氮染料酸性橙进行脱色实验,考察反应时间、pH、加酶量、温度、染料质量浓度等因素对脱色率的影响。结果表明,漆酶催化酸性橙的适宜条件为:反应时间为50 min、pH=6、加酶量为2 mL、反应温度为50℃、染料质量浓度为0.1 g/L,最适条件下酸性橙的脱色率达88.32%。同时研究了金属离子、酶抑制剂对酸性橙脱色的影响,结果发现十二烷基硫酸钠(SDS)显著抑制漆酶的催化活性,Fe<sup>2+</sup>对漆酶脱色有完全抑制作用;Mg<sup>2+</sup>对脱色有一定的促进作用。

**关键词:**漆酶;酸性橙;催化;脱色

中图分类号:X703

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2020)07-0183-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2020.07.039

## Decolorization of acid orange azo dye catalyzed by laccase

HUA Yu, CHENG Geng, WANG Ying-ru\*

(School of Chemistry and Environmental Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China)

**Abstract:** Degradation of acid orange, which is a typical azo dye, is investigated by using laccase extracted from *aspergillus oryzae*. Influences of reaction time, pH value, adding amount of laccase, temperature, dye concentration on decolorization rate are explored. Besides, the decolorization effects of EDTA, SDS mediator and metal ions are studied. The suitable decolorization conditions for acid orange are found as follows: the reaction time is 50 minutes, pH=6, the enzyme dosage is 2 ml, the reaction temperature is at 50℃, and the initial dye concentration is 0.1 g·L<sup>-1</sup>. Decoloration rate of acid orange is 88.32% under the most suitable conditions. The effects of metal ions and enzyme inhibitors on the decolorization of acid orange are also studied. It is found SDS can inhibit the catalytic activity of laccase significantly, Fe<sup>2+</sup> has a whole inhibition to laccase, and Mg<sup>2+</sup> has certain promoting effect on decolorization.

**Key words:** laccase; acid orange; catalyze; decolorization

合成染料可分为偶氮、蒽醌、杂环、三苯甲烷或酞菁类染料<sup>[1]</sup>,偶氮染料占有合成染料的70%<sup>[2]</sup>。化学工业产生的染料废水是彩色废水的主要贡献者,如印刷、染色、纺织、食品、化妆品、造纸等行业。每年生产的染料超过7×10<sup>5</sup> t,其中约15%的染料被各种染色工业释放到环境中<sup>[3]</sup>。这些加工行业所用染料由于不可生物降解性、毒性、潜在的致癌性和致突变性,会对生态环境产生不利影响<sup>[4]</sup>。

染料废水常见的处理方式有物理法和化学法,如吸附、萃取、电化学氧化、光催化氧化等,这些方法普遍存在成本高、能耗大、二次污染严重等问题<sup>[5-6]</sup>。相对于物理法和化学法,生物处理方法具有成本低、不产生二次污染等特点,近年来利用酶催化脱色提高染料的可生化性作为一种环境友好技术备受关注<sup>[7]</sup>。

漆酶(Laccase; EC 1.10.3.2.)是一种多酚氧化还原酶<sup>[8]</sup>, Piao等<sup>[9]</sup>将漆酶固定于介孔二氧化硅中,并在循环流化床反应器中处理双酚A(BPA),可操作性和稳定性明显提高,25 mg/L BPA可在8 h

内被降解90%。Sun等<sup>[10]</sup>利用平菇漆酶和阳离子结合通过自由基偶联催化反应可有效地去除三氯生(TCS)。漆酶能催化多种芳香族化合物的降解,在反应中,漆酶催化带电荷的染料进行单电子氧化,同时将氧分子还原成水<sup>[11-12]</sup>。笔者采用米曲霉菌漆酶催化降解偶氮染料酸性橙,确定最佳工艺条件,同时还研究了一些金属离子和助剂的存在对漆酶催化效果的影响,以便为漆酶用于实际废水的处理提供理论依据。

## 1 实验部分

### 1.1 主要试剂

酸性橙,上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产,结构式如图1所示;漆酶,沧州夏盛酶生物技术

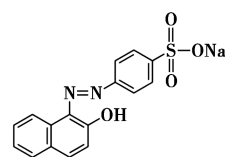


图1 酸性橙分子结构式

收稿日期:2019-09-08;修回日期:2020-05-11

作者简介:华煜(1996-),男,硕士研究生,研究方向为污水处理,799066711@qq.com;王莹茹(1972-),女,博士,副教授,研究方向为水污染控制技术,通讯联系人,wangyr96@163.com。

有限公司生产,该酶为米曲霉菌漆酶;其他试剂均为分析纯。

## 1.2 主要仪器

紫外-可见分光光度计,UV2900 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司生产;水浴恒温振荡器,SHZ-C 型,上海跃进医疗器械厂生产;电子天平,FA2004N 型,上海菁海仪器有限公司生产。

## 1.3 染料最大吸收波长测定

利用紫外-可见分光光度计于波长 200~800 nm 处对酸性橙染料溶液进行扫描测定,确定染料的最大吸收波长为 484 nm。

反应体系中,通过控制变量法依次改变脱色时间、pH、加酶量、温度、染料浓度进行试验。分别测定脱色前后的吸光度( $A$ ),脱色率计算式为:

$$\text{脱色率}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100\%$$

式中: $A_0$  和  $A_1$  分别为脱色反应前后溶液在最大吸收峰处的吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应时间对脱色效果的影响

在 pH 为 6.0、加酶量为 2 mL、温度为 50℃、染料质量浓度为 0.1 g/L 的条件下,于恒温振荡摇床中脱色反应,每隔一段时间取样并在最大吸收波长处测其吸光度,计算脱色率。漆酶催化降解酸性橙脱色率随时间变化曲线如图 2 所示。

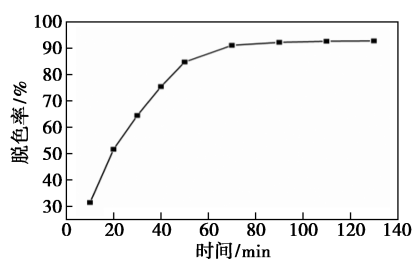


图 2 漆酶催化降解酸性橙脱色率随时间变化曲线

由图 2 中可以看出,随着反应时间的延长脱色率逐渐增大,在反应的前 50 min 脱色效果明显,脱色率变化较快,表明酶与染料分子充分接触并催化使其脱色,继续延长反应时间,脱色率基本趋于稳定。反应 50 min 时,脱色率达到 85%,1 h 后脱色率稳定在 90%,相差不大,因此在后续试验中确定反应时间为 50 min。

### 2.2 pH 对脱色效果的影响

在加酶量为 2 mL、温度为 50℃、染料质量浓度为 0.1 g/L 的条件下,于恒温振荡摇床中反应 50 min,

探究 pH 对酸性橙脱色的影响,结果如图 3 所示。

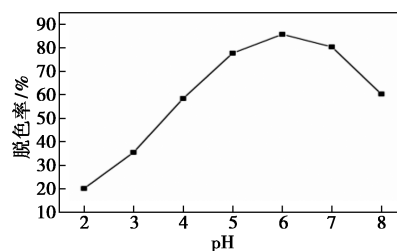


图 3 pH 对漆酶催化酸性橙脱色的影响

由图 3 可知,随着 pH 的增大,脱色率呈先上升后下降的趋势,pH 在 5~7 范围内,漆酶的脱色率均可达到 70% 以上,pH 为 6 时脱色效果最好,脱色率为 85.67%。这与文献[13]中报道的漆酶的酶活在偏酸的环境中较高一致。

### 2.3 漆酶用量对脱色效果的影响

在 pH 6.0、温度为 50℃、染料质量浓度为 0.1 g/L 条件下,于 50℃ 恒温振荡摇床中反应 50 min,探究漆酶用量对染料的脱色影响,结果如图 4 所示。

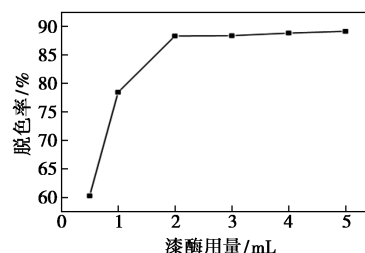


图 4 漆酶用量对漆酶催化酸性橙脱色的影响

由图 4 可知,当加酶量小于 2 mL 时,随着加酶量的增加,染料的脱色率随之增大,表明酶量越大,活性位点越多,越有利于酶与底物的结合,脱色效果越好;加酶量为 2 mL 时脱色率为 88.32%,继续加大酶量,脱色效果并无增加,说明底物已与酶全部结合。因此,该条件下漆酶的最佳用量为 2 mL。

### 2.4 温度对脱色效果的影响

在 pH 为 6.0、染料质量浓度为 0.1 g/L、漆酶用量为 2 mL 的条件下反应 50 min,探究温度对酸性橙脱色的影响,结果如表 1 所示。

表 1 温度对漆酶催化酸性橙脱色的影响

温度/℃	20	30	40	50	60	70
脱色率/%	39.82	59.75	80.45	86.41	77.06	37.03

由表 1 中可知,温度小于 50℃ 时,随着温度的升高,漆酶对酸性橙的脱色效果明显升高,在 50℃ 时脱色率达到最大值,为 86.41%,继续升高反应温度,脱色率反而下降。这是因为酶是生物体内产生

的起催化作用的蛋白质,温度过高会导致蛋白质变性失活,从而使其催化活性下降。故确定漆酶催化酸性橙脱色的最适温度为 50℃。

## 2.5 染料初始质量浓度对脱色效果的影响

在 pH 为 6.0、漆酶用量为 2 mL、温度为 50℃ 条件下,于 50℃ 恒温振荡摇床中反应 50 min,探究染料初始质量浓度对染料的脱色影响,结果如表 2 所示。

表 2 染料初始质量浓度对漆酶催化酸性橙脱色的影响

初始质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	0.05	0.10	0.15	0.2	0.25
脱色率/%	82.95	84.97	83.36	83.22	80.50

由表 2 中可以看出,在染料质量浓度为 0.05~0.25 g/L 范围内,脱色效果略呈下降趋势,但脱色率相差不大。表明米曲霉所产漆酶能耐受较高质量浓度的酸性橙染料。

## 2.6 金属离子对脱色效果的影响

实际废水中大都含有 Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup> 等金属离子,因此,在反应体系中分别加入不同金属离子 (Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Ni<sup>2+</sup>) 的硫酸盐,以未添加金属离子的酸性橙脱色率作参照,探究金属离子对染料脱色效果的影响,结果如表 3 所示。

表 3 不同金属离子及不同质量浓度离子

金属离子	对酸性橙的脱色率 %		
	离子浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )		
	1	5	10
Na <sup>+</sup>	99.43	100.57	101.68
Mn <sup>2+</sup>	93.09	85.75	74.56
Mg <sup>2+</sup>	103.46	106.32	109.86
Cu <sup>2+</sup>	89.69	83.33	77.35
Ni <sup>2+</sup>	91.01	92.89	94.52
Fe <sup>2+</sup>	0	0	0
Al <sup>3+</sup>	52.20	45.95	44.09
Zn <sup>2+</sup>	88.16	88.93	89.25
无	100	100	100

由表 3 可知,Na<sup>+</sup> 对酸性橙脱色几乎没有影响,Mg<sup>2+</sup> 对反应有促进作用,因为 Mg<sup>2+</sup> 通常是很多氧化还原酶的激活剂,而其他离子对脱色都有不同程度的抑制作用,其中 Fe<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup> 对酸性橙脱色抑制作用明显,尤其是 Fe<sup>2+</sup>,属于完全抑制,由文献[14-15]可知,Fe<sup>2+</sup> 会使漆酶在 420 nm 的吸光度为零,此时漆酶暂时失去活性。Cu<sup>2+</sup> 是漆酶的活性中心,对漆酶脱色有促进作用。而实验结果与之相反,Cu<sup>2+</sup> 不但没有起促进作用反而还有一定的抑制作用,且随

着 Cu<sup>2+</sup> 浓度的增大抑制效果更明显。这是由于在铜离子浓度较高时,其自身色泽加深的效应大于漆酶活力的提升效应,从而表现出抑制作用<sup>[16]</sup>。重金属离子也会与蛋白质结合使蛋白质变性从而影响脱色反应。此外,随着金属离子浓度的增加,对漆酶的催化活性(激活或抑制)影响越大。

## 2.7 抑制剂对脱色效果的影响

EDTA、SDS 是漆酶抑制剂,通常通过与漆酶铜离子形成复合物来抑制酶活性,从而修饰漆酶活性位点。在前期实验得到的最佳条件下,分别加入 0、5、10 mmol/L 的 EDTA-钠、SDS,探究酶抑制剂对脱色率的影响,结果如表 4 所示。

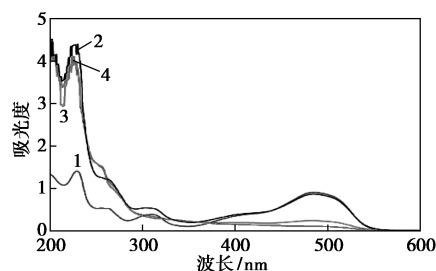
表 4 不同质量浓度 EDTA、SDS 对漆酶催化酸性橙的

初始浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )	脱色率 %			
	0	1	5	10
EDTA	78.56	82.18	81.34	78.06
SDS	78.56	84.48	20.45	5.53

由表 4 中可以看出,EDTA 对脱色的抑制作用不明显,即使浓度达 10 mmol/L 抑制效果也不明显。相反 SDS 对脱色的抑制效果明显,且随着 SDS 浓度的增大抑制效果越明显,当 SDS 浓度为 10 mmol/L 时脱色率仅为 5.53%。

## 2.8 紫外-可见吸收光谱分析

对反应前及漆酶催化脱色后的酸性橙溶液进行紫外-可见光谱分析,结果如图 5 所示。



1—染料原液;2—0 min;3—20 min;4—50 min

图 5 漆酶对酸性橙脱色紫外-可见图谱

由图 5 可知,酸性橙原液在可见光区(400~600 nm)存在 2 个特征吸收峰,这 2 个可见光范围内 484 nm 的吸收峰及 430 nm 的肩峰分别由酸性橙的 2 个同分异构体脘式结构和偶氮结构的  $n-\pi^*$  跃迁引起<sup>[17]</sup>,代表着染料的发色基团。紫外光区 230 nm 和 310 nm 处的 2 个吸收峰分别为苯环结构和萘环结构的吸收波峰<sup>[18-19]</sup>。随着反应的进行,酸性橙的 2 个特征吸收峰减弱,说明酸性橙染料分子结构中的偶氮双键被破坏,同时,由于漆酶与染料混

合后会使得 230 nm 处的吸收峰升高,随着反应时间的延长,310 nm 处的萘环吸收峰降低,反应进行到 50 min 时几乎消失,说明漆酶可以降解萘环。

### 3 结论

(1) 米曲霉菌漆酶对酸性橙有较好的脱色效果。在酶量为 2 mL、pH=6、温度为 50℃ 条件下,酸性橙质量浓度为 0 g/L 的脱色率可达 88.32%。

(2) 金属离子  $Mg^{2+}$  对漆酶脱色有一定的促进作用, $Ni^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Zn^{2+}$  对漆酶脱色有抑制作用,其中  $Fe^{2+}$  为完全抑制作用。酶抑制剂实验表明,EDTA 对脱色的抑制作用不明显,而 SDS 的抑制作用非常明显。

(3) 紫外光谱分析表明,漆酶催化降解酸性橙时,酸性橙的偶氮双键被破坏,随着反应时间的延长萘环也会被打开。

### 参考文献

- [1] Daassi D, Frikha F, Zouarimechichi H, *et al.* Application of response surface methodology to optimize decolorization of dyes by the laccase-mediator system [J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 108(108): 84-91.
- [2] Pramanik S, Chaudhuri S. Laccase activity and Azo dye decolorization potential of *podospyna elegans* [J]. *Mycobiology*, 2018, 46(1): 79-83.
- [3] Robati D, Mirza B, Rajabi M, *et al.* Removal of hazardous dyes-BR 12 and methyl orange using graphene oxide as an adsorbent from aqueous phase [J]. *The Chemical Engineering Journal*, 2016, 284(7): 687-697.
- [4] Cai C, Zhang H, Zhong X, *et al.* Ultrasound enhanced heterogeneous activation of peroxymonosulfate by a bimetallic Fe-Co/SBA-15 catalyst for the degradation of Orange II in water [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 283(283): 70-79.
- [5] 任南琪, 周显娇, 郭婉茜. 染料废水处理技术研究进展 [J]. *化工学报*, 2013, 64(1): 84-94.
- [6] 宋昭仪, 胥维昌, 马文静. 偶氮染料废水处理技术及研究进展 [J]. *染料与染色*, 2018, 55(6): 56-60.
- [7] Mota T R, Kato C G, Peralta R A, *et al.* Decolorization of congo red by *ganoderma lucidum* laccase: Evaluation of degradation products and toxicity [J]. *Water Air and Soil Pollution*, 2015, 226(10): 351-362.
- [8] 杨波, 杜丹, 孙也. 漆酶对活性黑 KN-B 和直接大红染料的脱色性能 [J]. *环境工程学报*, 2013, 7(12): 4835-4840.
- [9] Piao M, Zou D, Ren X, *et al.* High efficiency biotransformation of bisphenol A in a fluidized bed reactor using stabilized laccase in porous silica [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 126: 1-8.
- [10] Sun K, Kang F, Waigi M G, *et al.* Laccase-mediated transformation of triclosan in aqueous solution with metal cations and humic acid [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 220: 105-111.
- [11] 薛林贵, 莫天录, 李文伟. 白腐真菌处理染料废水的研究进展 [J]. *化工学报*, 2015, (7): 1-6.
- [12] Catherine H, Frédéric D, Pennineckx M. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review [J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2016, 5: 250-266.
- [13] 詹琪, 廖红福, 张敏. 漆酶催化复合染料酸性黑 ATT 脱色的研究 [J]. *环境科学学报*, 2014, 34(5): 1236-1241.
- [14] Wang X, Hu J, Liang Y. Effects of metal ions on laccase activity [J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2011, 23(12): 5422-5424.
- [15] 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.
- [16] 赵世光, 刘强, 张庆庆. 灵芝漆酶对直接蓝 86 的催化脱色性能 [J]. *环境工程学报*, 2013, 7(2): 765-770.
- [17] 刘士姮, 汪世龙, 孙晓宇, 等. 酸性橙 7 降解的微观反应机理及动力学研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, 25(5): 776-779.
- [18] Yuan R, Ramjaun S N, Wang Z, *et al.* Effects of chloride ion on degradation of Acid Orange 7 by sulfate radical-based advanced oxidation process: Implications for formation of chlorinated aromatic compounds [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 196(1): 173-179.
- [19] Ong S A, Min O M, Ho L N, *et al.* Comparative study on photocatalytic degradation of mono azo dye acid orange 7 and methyl orange under solar light irradiation [J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 2012, 223(8): 5483-5493. ■
- [12] 余宗华, 范剑琴, 毛建军, 等. 用硫酸亚铁全液相合成颜料铁红的研究 [J]. *矿冶工程*, 1998, (4): 44-47.
- [13] Fouad N E, Ismail H M, Zaki M I. Recovery of red iron oxide pigmentary powders from chemically-modified steel-pickling chemical waste [J]. *Journal of Materials Science Letters*, 1998, 17(1): 27-29.
- [14] Acarbas O, Ozenbas M. Preparation of iron oxide nanoparticles by microwave synthesis and their characterization [J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2008, 8(2): 655-659.
- [15] 肖丁, 汪晓军. 氧化铁红生产的低污染工艺 [J]. *无机盐工业*, 2006, 38(4): 49-50.
- [16] Santhoshkumar P, Prasanna K, Jo Y N, *et al.* A facile and highly efficient short-time homogenization hydrothermal approach for the smart production of high-quality  $\alpha-Fe_2O_3$  for rechargeable lithium batteries [J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2017, 5(32): 16712-16721.
- [17] 熊国宣, 张展适. 包核法制备氧化铁红颜的研究 [J]. *无机盐工业*, 1999, (3): 6-7.
- [18] Ishikawa T, Wei Y C, Kandori K. Characterization of the thermal decomposition products of  $\delta-FeOOH$  by Fourier-transform infrared spectroscopy and  $N_2$  adsorption [J]. [Rinshō ketsueki] *The Japanese Journal of Clinical Hematology*, 1992, 88(8): 1173-1177.
- [19] 孟哲, 贾振斌, 魏雨. 非晶态  $\delta-FeOOH$  液相合成纳米级  $\alpha-Fe_2O_3$  粉体的历程研究 [J]. *化学学报*, 2004, 62(5): 485-488.
- [20] Nishida N, Amagasa S, Kobayashi Y, *et al.* Synthesis of Cu-doped  $\delta-FeOOH$  nanoparticles by a wet chemical method [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2018, 20(7): 181-189. ■

(上接第 182 页)