

探討白腐菌對偶氮染料的脫色效果

Efficient decolorization of azo dye by white-rot fungi

饒文娟¹ 李柏堅² 蔡杏元³
Win-Chun Jao¹ Bo-Chuan Li² Xing-Yuan Cai³

¹中華科技大學生物科技系助理教授

²中華科技大學企業管理系助理教授

³中華科技大學生物科技系健康科技碩士班

¹Assistance Professor, Department of Biological Science and Technology

²Assistance Professor, Department of Business Administration

³Master, Master Program of Health Science and Technology

China University of Science and Technology

摘 要

紡織業所排放的染料廢水對環境帶來嚴重的破壞。本研究利用白腐菌對紡織業染料中甲基紅及甲基橙進行脫色效率評估，利用中央合成設計應用於有效因子尋找實驗方法及最適化條件。設定不同濃度的染料濃度、馬鈴薯葡萄糖培養基濃度、溫度及 pH 值來進行甲基紅及甲基橙脫色試驗分析，進行反應曲面法最佳化設計。由實驗結果觀察白腐菌對甲基紅及甲基橙的脫色速率隨溫度及 pH 增加而提升，在 pH 值接近 7.0 及溫度接近 30°C，有利於白腐菌對甲基紅及甲基橙之脫色效果。

關鍵字：白腐菌、甲基橙、甲基紅、反應曲面法、脫色

Abstract

Dyes released by the textile industries pose threat to environment. In this study, the white-rot fungus has been evaluated for the removal of textile dyes containing methyl orange and methyl red. A full factorial central composite design was employed for experimental design and optimization of results. The effect of concentrations of azo dye, potato dextrose broth, temperature and pH on dye removal was evaluated. Response surface methodology (RSM) was applied to optimize the decolorization of the methyl orange and methyl red dyes. The removal of methyl orange and methyl red

dyes increased with the temperature and pH. Results show that the optimum temperature and pH for decolorization process were found to be 30°C and pH 7.0, respectively.

Keywords: white-rot fungus; methyl orange; methyl red; response surface; methodology; decolorization.

一、前言

早期人們所使用的資源尚未工業化學化，天然的染料物質很容易被微生物經碳循環所分解，隨著科技進步，技術不斷更新，使其化學合成染料成份愈來愈複雜。而自然環境的分解速率趕不上工業科技所產生的化學合成染料廢棄物量，造成環境污染的情況是日趨嚴重(Yagub *et al.*, 2014)。合成染料雖帶給了人類很多商業利益和便利性，但也同時帶來了嚴重的環境污染問題。科學家以化學合成的方式開發出新的各種染料來供應不同的需求，並用工業方式加工以大量生產，使得染料的性質變得極為複雜且讓生物難以分解。染料中多具有複雜芳香烴結構、分子較大且由穩定的化學結構所組成，在環境當中具有毒性和穩定性，且滯留期較長，等待它在自然環境中完全降解極其困難。因此，這種廢水若直接排放，則對環境造成嚴重污染，並有可能通過食物鏈直接或間接造成健康危害(Banat *et al.*, 1996；Shyam *et al.*, 1995)。

染料工業廢水的主要污染物具有複雜化學結構及大分子芳香烴化合物，屬於有機含量高、生化性差、成分複雜、有毒性、高化學需氧量(COD)、高色度及生物難降解(低 BOD/COD 比值)之污染物。色度是無法用一般傳統方法去去除，具有色度之廢水除了會污染河川，造成環境污染外，會阻止光線進入水體，妨礙水中植物進行光合作用，會造成水中溶氧量的不足，破壞水中生態之平衡，常常會引起二次污染(Srinivasan & Viraraghavan, 2010；Sahinkaya, 2013)。

微生物處理有機污染物過程具有反應條件溫和、低成本、化學品消耗少、無毒和不會產生二次污染等優點。微生物處理法處理染料廢水主要通過物理過程和化學過程。微生物處理法其中物理過程指的是，生物菌體的絮凝和吸附作用，該方法不能夠達到徹底去除染料的目的，但是，微生物的絮凝和吸附作用，能夠使水中的非親水性染料，絮凝、失穩從而被微生物捕獲，以利於降解處理。微生物處理法中化學過程指的是，微生物利用酶的作用氧化或還原染料分子，使染料分子結構發生變化，通常是發色集團的破壞或染料分子結構的徹底破壞，從而達到染料廢水脫色、降解的目的(Banat *et al.*, 1996；Kirby *et al.*, 1995；Swamy & Ramsay, 1999；Nilsson *et al.*, 2006)。因此，研究開發高效能環保處理方法去除芳香族污染物已經成為人類急需解決的問題。微生物學家已經分離出許多種類的微生物，皆

具有分解有機性毒物的能力(Banat *et al.*, 1996; Kirby *et al.*, 1995; Swamy & Ramsay, 1999; Nilsson *et al.*, 2006)。多數真菌具有吸附染料功能及降解染料的功能，染料分子先吸附在菌體上，然後通過細胞酶的作用逐漸降解，其降解機制包括氧化、還原、甲基化、羥基化的複合過程(Srinivasan & Viraraghavan, 2010; Saratale *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2015)。

偶氮染料分子結構含有發色基團偶氮鍵($-N=N-$)的染料，氮雙鍵上接有芳香族胺化物，由一級芳香胺和偶氮鹽反應生成的，因製造廉價被大量開發使用，廣泛應用於印染、食品和造紙等工業，它在種類和數量上居於榜首(Chang *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2004)。偶氮染料因具有發色基團偶氮鍵，其污水進入水體後，使水體的透光率降低，進而導致水體生態系統遭受破壞。偶氮類化合物可經由皮膚吸收進入人體，經酵素和腸胃內細菌分解後衍生出致癌性或致突變性的化合物。因此，在對水中染料的降解和脫色研究中，偶氮染料備受關注。

白腐菌(White rot fungi) 是一類絲狀真菌，因腐生在樹木或木材上引起木質的白色腐爛而得名，為一種降解芳香化合物能力最強的微生物，因而在廢水處理中也有廣泛的應用前景(Kirby *et al.*, 1995; Swamy & Ramsay, 1999; Nilsson *et al.*, 2006)。研究發現白腐菌及其產生的降解酶能與有毒的酚類化合物、多環芳族化合物、氯化芳族化合物等發生作用，使染料降解，並最終將它們分解成 CO_2 和 H_2O (Christian *et al.*, 2005; Marco-Urrea & Reddy, 2012)。白腐菌對染料的脫色主要依靠白腐菌自身分泌的胞外酶與染料分子反應，進行染料脫色(Nilsson *et al.*, 2006)。

對於多變數因子系統的最適化，反應曲面實驗設計法(Response surface method, 簡稱 RSM)是一種可同時測出各因子與因子之間彼此的交互作用，用來找尋找出最適條件的有效方式(Box & Hunter, 1957; Box & Behnken, 1960)。反應曲面法可用來找培養基各成分的最適值，使其所生產的產物(例如菌體、酵素或代謝產物)達到最適值。

本研究選定白腐菌作為吸附劑，添加於甲基橙和甲基紅偶氮染料溶液中，探討在改變不同濃度的染料濃度、馬鈴薯葡萄糖培養基濃度、溫度及 pH 值等條件下，白腐菌對甲基橙和甲基紅偶氮染料之脫色效果進行反應曲面法最佳化設計。

二、實驗材料與方法

白腐菌(*Phanerochaete chrysosporium*, BCRC 36201)，食品工業研究所；甲基橙(methyl orange)，Sigma USA；甲基紅(methyl red)，Sigma USA；馬鈴薯葡萄糖

培養基(Potato dextrose broth, Difco USA); 馬鈴薯葡萄糖瓊脂(Potato dextrose agar, Difco USA)。

購回的白腐菌經 PDB 液體培養基活化保存。將 4°C 保存的白腐菌，室溫活化 24 小時，塗盤至固態培養基，放置培養箱中等待 1 個星期取出備用。培養條件：(1)馬鈴薯葡萄糖液態培養基濃度有 12 g/L 和 18 g/L 二組；(2)甲基紅/甲基橙濃度有 50 ppm、75 ppm 和 100 ppm 三組；(3)恆溫振盪培養箱培養溫度有 22°C、26°C 和 30°C 三組；(4)pH 有 5.8、6.4 和 7.0 三組。接種環取白腐菌孢子(直徑 0.4 cm)放入配置好之上述條件培養基(馬鈴薯葡萄糖培養基 75mL+染料 75 mL)中，放入震盪培養 21 天。培養 21 天期間，每 3 天使用分光光度計設定甲基紅/甲基橙波長為 435 nm/460 nm 測試其 OD 值各組封閉試管取出 2 ml 各放入離心試管中標示，放入離心機，離心 2 分鐘。離心機取出離心試管後，使用分光光度計設定甲基紅/甲基橙波長為 435 nm/460 nm，先進行校正歸零，從離心試管中取條件培養基，至比色管中以分光光度計測量並記錄。此步驟每 3 天重覆一次至 21 天。

白腐菌對偶氮染料降解速率的比較，其降解動力學方程式可利用以下方程式 (Marques *et al.*, 2009)：

$$\ln \frac{C_t - C_f}{C_i - C_f} = -kt \quad [1]$$

其中 k 為速率常數(degradation rate constant)， C_i 是在起始時偶氮染料的濃度， C_f 是在 final 時偶氮染料的濃度， C_t 是在 t 時間(day)偶氮染料的濃度。偶氮染料降解速率常數(k)(day⁻¹)，可經由 $-\ln [(C_t - C_f)/(C_i - C_f)]$ 對時間 t 作圖之斜率而得。

實驗結束後，將記錄的數據輸入至 Microsoft Office Excel，套入公式，將結果輸入至 SPSS 統計軟體。結合數學與統計方法，找出為實驗設計之最佳解。

三、結果與討論

(一)在不同溫度下，白腐菌對甲基橙和甲基紅染料的降解率分析

在 22°C、26°C 和 30°C 時，不同培養基濃度和不同甲基橙和甲基紅染料濃度，白腐菌對甲基橙和甲基紅染料的降解率結果，套入降解動力學方程式[1]後得到表 1。由表 1 可知在不同溫度，白腐菌對甲基橙和甲基紅的速率常數(k)。

表 1、在不同溫度，白腐菌對甲基橙和甲基紅的速率常數(k)

溫度(°C)	培養基(g)	染料濃度 (ppm)	$k_{\text{甲基橙}}$	$k_{\text{甲基紅}}$
22	12	100	0.35691	0.129997
22	12	75	0.10103	0.150394
22	12	50	0.02017	0.110611
22	18	100	0.208675	0.1175
22	18	75	0.131699	0.02633
22	18	50	0.151104	0.26891
26	12	100	0.163719	0.11414
26	12	75	0.188452	0.22244
26	12	50	0.089333	0.08045
26	18	100	0.151782	0.03308
26	18	75	0.123151	0.18676
26	18	50	0.322372	0.08768
30	12	100	0.20746	0.218264
30	12	75	0.193542	0.24557
30	12	50		0.245568
			0.1935418	
30	18	100	0.369003	0.18007
30	18	75	0.179545	0.31715
30	18	50	0.245714	0.29673

(二)在不同 pH 值下，白腐菌對甲基橙和甲基紅染料的降解率分

在 pH=5.8、6.4 和 7.0 時，不同培養基濃度和不同染料濃度，白腐菌對甲基橙和甲基紅染料的降解率結果，套入降解動力學方程式[1]後得到表 2。由表 2 可知在不同 pH 值下不，白腐菌對甲基橙和甲基紅的速率常數(k)。

表 2、在不同 pH 值下，白腐菌對甲基橙和甲基紅的速率常數(k)

pH	培養基(g)	染料濃度(ppm)	$k_{\text{甲基橙}}$	$k_{\text{甲基紅}}$
5.8	12	100	0.046878	0.09167
5.8	12	75	0.136591	0.14735
5.8	12	50	0.137834	0.05212
5.8	18	100	0.109709	0.09666
5.8	18	75	0.060061	0.07904
5.8	18	50	0.033442	0.0431
6.4	12	100	0.230056	0.33273
6.4	12	75	0.116542	0.23698

6.4	12	50	0.170111	0.18927
6.4	18	100	0.366078	0.17976
6.4	18	75	0.140416	0.21157
6.4	18	50	0.364174	0.25775
7.0	12	100	0.305627	0.15847
7.0	12	75	0.467693	0.08033
7.0	12	50	0.083649	0.21162
7.0	18	100	0.256233	0.30272
7.0	18	75	0.360229	0.21684
7.0	18	50	0.357335	0.24351

(三)二水準因子之實驗設計

改變溫度下，研究選擇以染料濃度(以 X_1 表示)、溫度(以 X_2 表示)、培養基(以 X_3 表示)為自變數(independent variable)，而產生的甲基橙和甲基紅的速率常數(k)為應變數(dependent variable)，每個自變數分為三個變級(levels)，中心點(0,0,0)以二重複再配合 2^3 因子實驗設計法設計一階 RSM 實驗，實驗設計如表 3：

表 3、在不同溫度，一階反應曲面實驗設計

Independent Variable	Code Level		
	-1	0	1
X_1 染料濃度 (ppm)	50	75	100
X_2 Temp. (°C)	22	26	30
X_3 培養基(g)		12	18

實驗中的變數以染料濃度 X_1 、溫度 X_2 、培養基 X_3 。 X_1 有 3 種變化， X_2 有 3 種變化， X_3 有 2 種變化，所以共進行 $3 \times 3 \times 2 = 18$ 組實驗，其所得的數據如下表 4：

表 4、溫度改變下，一階反應曲面實驗設計數據

X_1	X_2	X_3	$k_{\text{甲基橙}}$	$k_{\text{甲基紅}}$
50	22	12	0.02017	0.110611
50	22	18	0.151104	0.26891
50	26	12	0.089333	0.08045
50	26	18	0.322372	0.08768
50	30	12	0.1935418	0.245568
50	30	18	0.245714	0.29673

100	22	12	0.35691	0.129997
100	22	18	0.208675	0.1175
100	26	12	0.163719	0.11414
100	26	18	0.151782	0.03308
100	30	12	0.20746	0.218264
100	30	18	0.369003	0.18007
75	22	12	0.10103	0.150394
75	22	18	0.131699	0.02633
75	26	12	0.188452	0.22244
75	26	18	0.123151	0.18676
75	30	12	0.193542	0.24557
75	30	18	0.179545	0.31715

依據表 3 的設計，利用變數變換將 X_1, X_2, X_3 正規化，改為 $\hat{X}_1, \hat{X}_2, \hat{X}_3$ ，計算方法為

$$\hat{X}_1 = \frac{X_1 - 75}{25}, \hat{X}_2 = \frac{X_2 - 26}{4}, \hat{X}_3 = \frac{X_3 - 12}{6}, \text{實驗數據修改後如下表 5:}$$

表 5、溫度改變下，一階反應曲面實驗設計正規後數據

\hat{X}_1	\hat{X}_2	\hat{X}_3	$k_{\text{甲基橙}}$	$k_{\text{甲基紅}}$
-1	-1	0	0.02017	0.110611
-1	-1	+1	0.151104	0.26891
-1	0	0	0.089333	0.08045
-1	0	+1	0.322372	0.08768
-1	+1	0	0.1935418	0.245568
-1	+1	+1	0.245714	0.29673
+1	-1	0	0.35691	0.129997
+1	-1	+1	0.208675	0.1175
+1	0	0	0.163719	0.11414
+1	0	+1	0.151782	0.03308
+1	+1	0	0.20746	0.218264
+1	+1	+1	0.369003	0.18007
0	-1	0	0.10103	0.150394
0	-1	+1	0.131699	0.02633
0	0	0	0.188452	0.22244

0	0	+1	0.123151	0.18676
0	+1	0	0.193542	0.24557
0	+1	+1	0.179545	0.31715

將資料代入 SPSS 進行複迴歸分析運算，得方程式[2]及[3]：

$$k_{\text{甲基橙}} = 0.168 + 0.036\tilde{X}_1 + 0.035\tilde{X}_2 + 0.41\tilde{X}_3 \quad [2]$$

$$k_{\text{甲基紅}} = 0.169 - 0.025\tilde{X}_1 + 0.058\tilde{X}_2 - 0\tilde{X}_3 \quad [3]$$

從[[2]及[3]式子中可看出溫度(X_2)係數的增加對甲基橙和甲基紅皆有增加降解率的影響，培養基(X_3)對甲基紅不甚影響，甲基橙反之，染料濃度(X_1)愈高則甲基橙降解率愈高，甲基紅則反之。

在 pH 改變值情況下，研究選擇以染料濃度 (以 X_1 表示)、pH 值(以 X_2 表示)、培養基(以 X_3 表示)為自變數(independent variable)，而產生的甲基橙及甲基紅的速率常數(k)為應變數(dependent variable)，每個自變數分為三個變級(levels)，中心點(0,0,0)以二重複再配合 2^3 因子實驗設計法設計一階 RSM 實驗，實驗設計如表 6：

表 6、在不同 pH 值下，一階反應曲面實驗設計

Independent Variable	Code Level		
	-1	0	1
X_1 染料濃度 (ppm)	50	75	100
X_2 pH 值	5.8	6.4	7.0
X_3 培養基(g)		12	18

實驗中的變數以染料濃度 X_1 、pH 值 X_2 、培養基 X_3 。 X_1 有 3 種變化， X_2 有 3 種變化， X_3 有 2 種變化，所以共進行 $3 \times 3 \times 2 = 18$ 組實驗，其所得的數據如下表 7：

表 7、pH 值改變下，一階反應曲面實驗設計數據

X_1	X_2	X_3	$k_{\text{甲基橙}}$	$k_{\text{甲基紅}}$
50	5.8	12	0.137834	0.05212
50	5.8	18	0.033442	0.0431
50	6.4	12	0.170111	0.18927
50	6.4	18	0.364174	0.25775
50	7.0	12	0.083649	0.21162

50	7.0	18	0.357335	0.24351
100	5.8	12	0.046878	0.09167
100	5.8	18	0.109709	0.09666
100	6.4	12	0.230056	0.33273
100	6.4	18	0.366078	0.17976
100	7.0	12	0.305627	0.15847
100	7.0	18	0.256233	0.30272
75	5.8	12	0.136591	0.14735
75	5.8	18	0.060061	0.07904
75	6.4	12	0.116542	0.23698
75	6.4	18	0.140416	0.21157
75	7.0	12	0.467693	0.08033
75	7.0	18	0.360229	0.21684

將 X_1, X_2, X_3 變數變換改為 $\bar{X}_1, \bar{X}_2, \bar{X}_3$ ，依據表 7 計算方法為

$$\bar{X}_1 = \frac{X_1 - 75}{25}, \bar{X}_2 = \frac{X_2 - 6.4}{0.6}, \bar{X}_3 = \frac{X_3 - 12}{6}, \text{轉換後實驗數據如如表 8:}$$

表 8、pH 值改變下，一階反應曲面實驗設計正規後數據

\bar{X}_1	\bar{X}_2	\bar{X}_3	$k_{\text{甲基橙}}$	$k_{\text{甲基紅}}$
-1	-1	0	0.137834	0.05212
-1	-1	+1	0.033442	0.0431
-1	0	0	0.170111	0.18927
-1	0	+1	0.364174	0.25775
-1	+1	0	0.083649	0.21162
-1	+1	+1	0.357335	0.24351
+1	-1	0	0.046878	0.09167
+1	-1	+1	0.109709	0.09666
+1	0	0	0.230056	0.33273
+1	0	+1	0.366078	0.17976
+1	+1	0	0.305627	0.15847
+1	+1	+1	0.256233	0.30272
0	-1	0	0.136591	0.14735
0	-1	+1	0.060061	0.07904
0	0	0	0.116542	0.23698

0	0	+1	0.140416	0.21157
0	+1	0	0.467693	0.08033
0	+1	+1	0.360229	0.21684

將資料代入 SPSS 進行複迴歸分析運算，得方程式[4]及[5]：

$$k_{\text{甲基橙}} = 0.188 + 0.014\tilde{X}_1 + 0.109\tilde{X}_2 + 0.039\tilde{X}_3 \quad [4]$$

$$k_{\text{甲基紅}} = 0.167 + 0.014\tilde{X}_1 + 0.059\tilde{X}_2 + 0.014\tilde{X}_3 \quad [5]$$

從[4]及[5]式子中可看出 k 值函數越高，代表降解率快，根據研究指出 pH 值 (X_2)，高，有助於白腐菌降解染料，鹼性的環境白腐菌之降解能力之增強，因為在白腐菌的分解過程中會釋放出酸，而在偏鹼的環境下能中和白腐菌所釋出的酸，因此酸性的環境下會使白腐菌生長減緩，而染料(X_1)及培養基(X_3)的數值應成正比，根據之前的研究數據中指出，培養基(X_3)濃度越低，有助於白腐菌吸收染料，轉換成能源；然而染料的濃度過高在無適當的營養源環境下，染料的降解率將會下降，因為養份不足以支撐白腐菌分泌出胞外酶來分解、吸收染料。

(四) 中心混成實驗設計

一階 RSM 實驗只能粗略地搜尋影響所在之區域，若想要更精確尋找極值點的位置，須再設計一組完整二階 RSM 實驗。在此我們使用二階方程式，更能詳細描述反應曲面的立體變化，以 SPSS 利用最小平方法尋找所有一次與二次項的係數，再將中心混成實驗設計之結果(表 9)估計的二次方程式以雙變數微分的技巧尋找到極值點的座標，這裡的變數：染料濃度(ppm) = X_1 ，Temp ($^{\circ}\text{C}$) = X_2 。

表 9、中心混成實驗設計之結果(培養基 12 g)

X_1 染料濃度 (ppm)	X_2 Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	$k_{\text{甲基橙}}$	$k_{\text{甲基紅}}$
50	22	0.02017	0.110611
50	26	0.089333	0.08045
50	30	0.1935418	0.245568
100	22	0.35691	0.129997
100	26	0.163719	0.11414
100	30	0.20746	0.218264
75	22	0.10103	0.150394
75	26	0.188452	0.22244
75	30	0.193542	0.24557

正規化的原則如下

$$\bar{X}_1 = \frac{X_1 - 75}{25}, \quad \bar{X}_2 = \frac{X_2 - 26}{4}, \quad \text{正規化的結果如表 10, 帶入 SPSS 計算二}$$

次反應曲面方程式係數摘要如表 11。

表 10、正規化數據(培養基 12 g)

\bar{X}_1	\bar{X}_2	$k_{\text{甲基橙}}$	$k_{\text{甲基紅}}$
-1	-1	0.02017	0.110611
-1	0	0.089333	0.08045
-1	+1	0.1935418	0.245568
+1	-1	0.35691	0.129997
+1	0	0.163719	0.11414
+1	+1	0.20746	0.218264
0	-1	0.10103	0.150394
0	0	0.188452	0.22244
0	+1	0.193542	0.24557

表 11、中心混成實驗設計甲基橙之迴歸分析摘要(培養基 12 g)

	B 之估計值	標準誤差	R	R^2	\bar{R}^2
常數	0.140	0.045			
\bar{X}_1	0.071	0.025			
\bar{X}_2	0.019	0.025			
\bar{X}_1^2	0.011	0.043	0.921	0.848	0.595
\bar{X}_2^2	0.032	0.043			
$\bar{X}_1\bar{X}_2$	-0.081	0.030			

依變數： $k_{\text{甲基橙}}$

由上表所估計的二元二次方程式如[6]

$$k(\bar{X}_1, \bar{X}_2) = 0.140 + 0.071\bar{X}_1 + 0.019\bar{X}_2 + 0.011\bar{X}_1^2 + 0.032\bar{X}_2^2 - 0.081\bar{X}_1\bar{X}_2 \quad [6]$$

對 $k(\bar{X}_1, \bar{X}_2)$ 偏微分得

$$\frac{\partial k}{\partial \bar{X}_1} = 0.071 + 0.022\bar{X}_1 - 0.081\bar{X}_2 = 0$$

探討白腐菌對偶氮染料的脫色效果

$$\frac{\partial k}{\partial \tilde{X}_2} = 0.019 + 0.064\tilde{X}_2 - 0.081\tilde{X}_1 = 0$$

以 Cramer's 法解此二元一次方程組

$$\hat{X}_1 = \frac{\begin{vmatrix} -0.071 & -0.081 \\ -0.019 & 0.064 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} 0.022 & -0.081 \\ -0.081 & 0.064 \end{vmatrix}} = -0.593 \quad \hat{X}_2 = \frac{\begin{vmatrix} 0.022 & -0.071 \\ -0.081 & 0.019 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} 0.022 & -0.081 \\ -0.081 & 0.064 \end{vmatrix}} = 1.03$$

求出臨界點(critical point)座標為(-0.593, 1.035)，但這個座標已經超出本設計-1 \hat{X}_1, \hat{X}_2 1的範圍，而且以二次偏微分檢定判別式

$$D = \frac{\partial^2 k}{\partial \hat{X}_1^2} \frac{\partial^2 k}{\partial \hat{X}_2^2} - \left(\frac{\partial^2 k}{\partial \hat{X}_1 \partial \hat{X}_1} \right)^2 = (0.022)(0.064) - (-0.081)^2 < 0 \quad [7]$$

我們所估計的反應曲面可以斷定此臨界點為鞍點(Saddle Point)，鞍點的特性是從左右看是極大值，但從前後看卻是相對極小值，這樣的點不是極大值也不是極小值，如圖 1 所示。

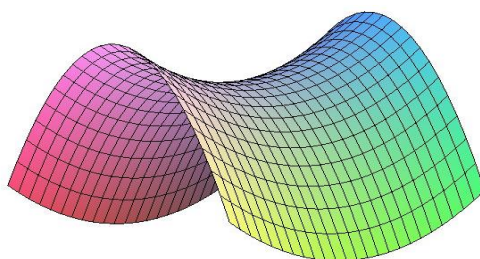


圖 1、鞍點的狀況

但就我們實驗設計的範圍-1 \hat{X}_1 1觀察反應曲面發現\hat{X}_1在接近 1(也就是說染料濃度較高有較佳的降解率，如圖 2 所示，而在\hat{X}_2在接近-1(也就是說溫度在 22°C)實有較佳的降解率，如圖 3 所示。

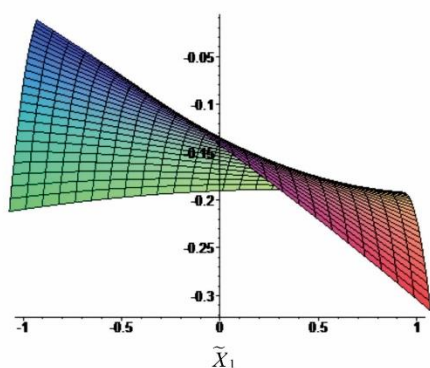


圖 2、 \hat{X}_1 方向的側視圖(甲基橙，培養基 12 g)

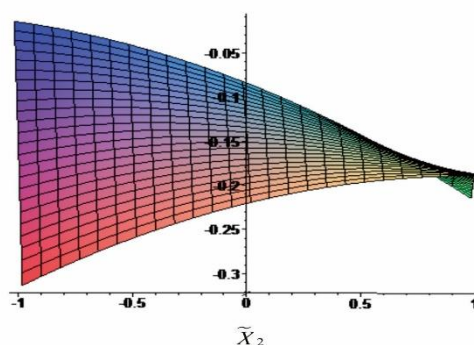


圖 3、 \hat{X}_2 方向的側視圖(甲基橙，培養基 12 g)

在培養基 12 g 為前提下，甲基紅的 SPSS 估計二次方程式係數與配適度摘要如表 12。

表 12、中心混成實驗設計甲基紅之迴歸分析摘要(培養基 12 g)

	B 之估計值	標準誤差	R	R^2	\bar{R}^2
常數	0.177	0.031			
\hat{X}_1	0.004	0.017			
\hat{X}_2	0.053	0.017	0.916	0.840	0.573
\hat{X}_1^2	-0.056	0.030			
\hat{X}_2^2	0.044	0.030			
$\hat{X}_1\hat{X}_2$	-0.012	0.021			

依變數： $k_{\text{甲基紅}}$

由上表所估計的二元二次方程式如[8]

$$k(\hat{X}_1, \hat{X}_2) = 0.177 + 0.004\hat{X}_1 + 0.053\hat{X}_2 - 0.056\hat{X}_1^2 + 0.044\hat{X}_2^2 - 0.012\hat{X}_1\hat{X}_2 \quad [8]$$

對 $k(\hat{X}_1, \hat{X}_2)$ 偏微分得

$$\frac{\partial k}{\partial \hat{X}_1} = 0.004 - 0.102\hat{X}_1 - 0.012\hat{X}_2 = 0$$

$$\frac{\partial k}{\partial \hat{X}_2} = 0.053 + 0.088\hat{X}_2 - 0.012\hat{X}_1 = 0$$

仍然以 Cramer's 法解此二元一次方程組得到

探討白腐菌對偶氮染料的脫色效果

$$\hat{X}_1 = \frac{\begin{vmatrix} -0.004 & -0.012 \\ -0.053 & 0.088 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} -0.102 & -0.012 \\ -0.012 & 0.088 \end{vmatrix}} = 0.108$$

$$\hat{X}_2 = \frac{\begin{vmatrix} -0.102 & 0.004 \\ -0.012 & 0.053 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} -0.102 & 0.012 \\ -0.012 & 0.088 \end{vmatrix}} = -0.58$$

求出臨界點(critical point)座標為(0.108, - 0.587)，以二次偏微分檢定判別式

$$D = \frac{\partial^2 k}{\partial \hat{X}_1^2} \cdot \frac{\partial^2 k}{\partial \hat{X}_2^2} - \left(\frac{\partial^2 k}{\partial \hat{X}_1 \partial \hat{X}_2} \right)^2 = (-0.102)(0.088) - (-0.012)^2 < 0$$

此說明可以斷定此臨界點(0.108, - 0.587)為鞍點(Saddle Point)，不是極大值也不是極小值。

從 \hat{X}_1 方向的側視圖可以發現 $\hat{X}_1 = 0.108$ ，如圖 4，換算染料濃度為 $75 + 25\hat{X}_1$ ，也就是 $= 75 + 25(0.108)$ 時甲基紅達到最高的降解率。在 \hat{X}_2 方向 $\hat{X}_2 = -0.58$ 為相對極小值，但在 $\hat{X}_2 = 1$ 時出現最高的降解率，也就是溫度高較佳，如圖 5。

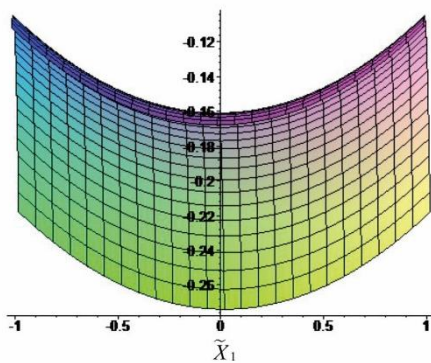


圖 4、 \hat{X}_1 方向的側視圖(甲基紅，培養基 12 g)

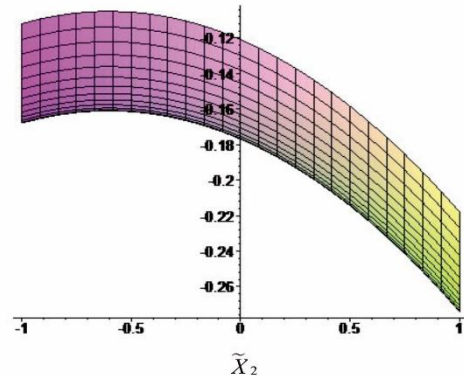


圖 5、 \hat{X}_2 方向的側視圖(甲基紅，培養基 12 g)

下面進行培養基 18 g 的分析，中心混成實驗設計之數據如表 13。

表 13、中心混成實驗設計之結果(培養基 18 g)

X_1 染料濃度 (ppm)	X_2 Temp. (°C)	$k_{\text{甲基橙}}$	$k_{\text{甲基紅}}$
50	22	0.151104	0.26891
50	26	0.322372	0.08768
50	30	0.245714	0.29673
100	22	0.208675	0.1175
100	26	0.151782	0.03308
100	30	0.369003	0.18007
75	22	0.131699	0.02633
75	26	0.123151	0.18676
75	30	0.179545	0.31715

正規化的原則仍然如下

$$\hat{X}_1 = \frac{X_1 - 75}{25}, \hat{X}_2 = \frac{X_2 - 26}{4}, \text{ 正規化的結果如表 14。}$$

表 14、正規化數據(培養基 18 g)

\hat{X}_1	\hat{X}_2	$k_{\text{甲基橙}}$	$k_{\text{甲基紅}}$
-1	-1	0.151104	0.26891
-1	0	0.322372	0.08768
-1	+1	0.245714	0.29673
+1	-1	0.208675	0.1175
+1	0	0.151782	0.03308
+1	+1	0.369003	0.18007
0	-1	0.131699	0.02633
0	0	0.123151	0.18676
0	+1	0.179545	0.31715

在使用 SPSS 估計二次方程式係數過程中發現配適度非常不好，調整後的 \bar{R}^2 竟然為負值，顯示自變數過多，於是刪除顯著性最差的兩個變數 \hat{X}_1 與 \hat{X}_2^2 ，得到下列迴歸分析摘要如表 15。

表 15、中心混成實驗設計甲基橙之迴歸分析摘要(培養基 18 g)

	B 之估計值	標準誤差	R	R ²	\bar{R}^2
常數	0.145	0.041			
\bar{X}_2	0.050	0.029	0.760	0.578	0.325
\bar{X}_1^2	0.097	0.051			
$\bar{X}_1\bar{X}_2$	0.016	0.036			

依變數： $k_{\text{甲基橙}}$

由上表所估計的二元二次方程式如[9]

$$k(\bar{X}_1, \bar{X}_2) = 0.145 + 0.05\bar{X}_2 + 0.097\bar{X}_1^2 + 0.016\bar{X}_1\bar{X}_2 \quad [9]$$

對 $k(\bar{X}_1, \bar{X}_2)$ 偏微分得

$$\frac{\partial k}{\partial \bar{X}_1} = 0.194\bar{X}_1 + 0.016\bar{X}_2 = 0$$

$$\frac{\partial k}{\partial \bar{X}_2} = 0.005 + 0.016\bar{X}_1 = 0$$

求出臨界點(critical point)座標為 (- 0.313, 3.79)，此臨界點超出實驗設計， $-1 < \bar{X}_1, \bar{X}_2 < 1$ 的範圍，說明在實驗設計的範圍並無極值存在，若再以二次偏微分檢定判別式

$$D = \frac{\partial^2 k}{\partial \bar{X}_1^2} \cdot \frac{\partial^2 k}{\partial \bar{X}_2^2} - \left(\frac{\partial^2 k}{\partial \bar{X}_1 \partial \bar{X}_2}\right)^2 = (0.194)(0) - (0.016)^2 < 0$$

圖形整體來說判別為雙曲拋物面，既使臨界點落在範圍內也是鞍點，在範圍內也肯定沒有相對極值，但在實驗範圍內 $\bar{X}_1 = 1, \bar{X}_2 = 1$ 有最高的降解率，也就是說甲基橙在染料濃度較高，溫度較高時有較佳的降解率，見圖6與圖7。

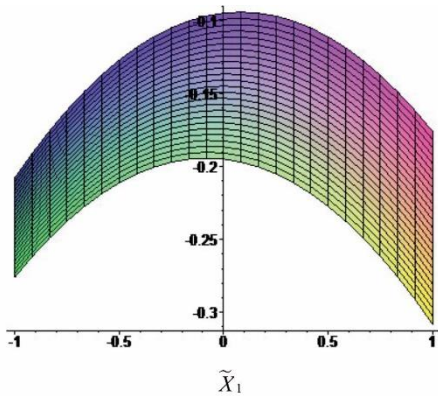


圖 6、 \hat{X}_1 方向的側視圖(甲基橙，培養基 18 g)

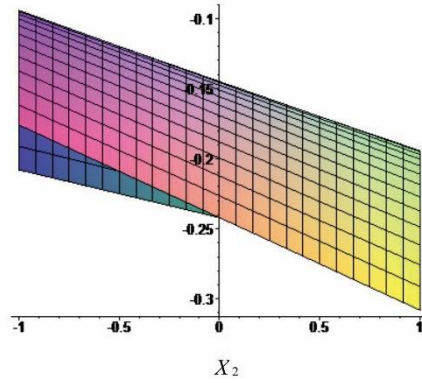


圖 7、 \hat{X}_2 方向的側視圖(甲基橙，培養基 18 g)

對於甲基紅降解率的分析，我們遇到一樣的低配適度的問題，刪除了兩個顯著性最差的變數 \hat{X}_1^2 與 $\hat{X}_1\hat{X}_2$ ，得到迴歸分析摘要於表 16。

表 16、中心混成實驗設計甲基紅之迴歸分析摘要(培養基 18 g)

	B 之估計值	標準誤差	R	R ²	\bar{R}^2
常數	0.103	0.049			
\hat{X}_1	-0.054	0.035			
\hat{X}_2	0.064	0.035	0.794	0.631	0.409
\hat{X}_2^2	0.099	0.06			

依變數： $k_{\text{甲基紅}}$

由上表所估計的二元二次方程式如[10]:

$$k(\hat{X}_1, \hat{X}_2) = 0.103 - 0.054\hat{X}_1 + 0.064\hat{X}_2 + 0.099\hat{X}_2^2 \quad [10]$$

對 $k(\hat{X}_1, \hat{X}_2)$ 偏微分得

$$\frac{\partial k}{\partial \hat{X}_1} = -0.054 = 0$$

$$\frac{\partial k}{\partial \hat{X}_2} = 0.064 + 0.198\hat{X}_2 = 0$$

$$\hat{X}_2 = -0.323$$

探討白腐菌對偶氮染料的脫色效果

沒有臨界點(critical point)座標的出現，因為綜合 $\frac{\partial k}{\partial \tilde{X}_1} < 0$ 與 $\frac{\partial k}{\partial \tilde{X}_2} \Big|_{\tilde{X}_2 = -0.323} = 0$

在空間上的幾何意義是在 \tilde{X}_1 方向為嚴格遞減函數(strictly decreasing function)且也找不到任何水平切線，既然 $\frac{\partial k}{\partial \tilde{X}_1} < 0$ ，說明了隨著 \tilde{X}_1 增加，速率常數(k)反而下降。

在 \tilde{X}_2 方向在 $\tilde{X}_2 = -0.323$ 恆有水平切線，且 $\frac{\partial^2 k}{\partial \tilde{X}_2^2} > 0$ ，說明為上凹曲面，也就是當 $\tilde{X}_2 = -0.323$ 時出現相對極小值，並不是我們所關心的，在 $\tilde{X}_2 = 1$ 出現最大值，也就是溫度較高時有較佳的降解率，見圖 8 與圖 9。

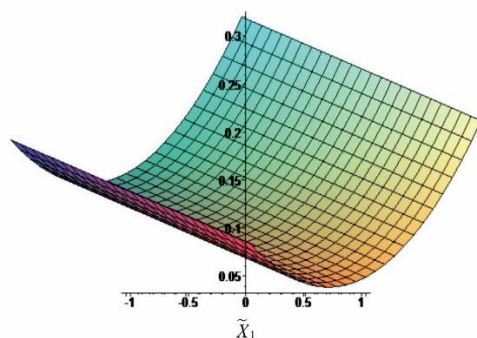


圖 8、 \tilde{X}_1 方向的側視圖(甲基紅，培養基 18 g)

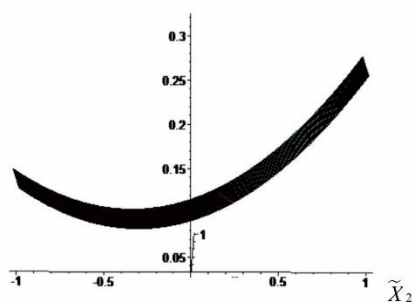


圖 9、 \tilde{X}_2 方向的側視圖(甲基紅，培養基 18 g)

這種狀況表示在本實驗設計：染料濃度 $50ppm \leq X_1 \leq 100ppm$ ，溫度 $22C \leq X_2 \leq 30C$ 的前提下，染料濃度愈大反而降低降解率，溫度較高時降解率較大。

四、結 論

本研究實驗可分兩部分(一)染料降解率的分析；(二)反應曲面實驗設計。

(一)根據白腐菌對甲基橙及甲基紅降解率的實驗結果，歸納以下結論：

1. 溫度

甲基橙：染料濃度較高(100 ppm)、溫度較高(30°C)、培養基濃度高，降解率較高。

甲基紅：染料濃度較高(75 ppm)、溫度較高(30°C)、培養基濃度高，降解率較高。

2. pH 值

甲基橙：在培養基濃度較低(12 g)、偏鹼(pH=7.0)、降解率較高。

甲基紅：在培養基濃度較低(12 g)、偏酸(pH=6.4)、降解率較高。

(二)白腐菌對甲基橙及甲基紅降解速率經由反應曲面實驗設計分析：

1. 二水準因子之實驗

溫度：溫度增加對甲基橙和甲基紅皆有增加降解率的影響，而培養基對甲基紅不甚影響，甲基橙反之，染料濃度愈高則甲基橙降解率愈高，甲基紅反之。

pH值：在偏鹼的環境下能中和白腐菌所釋出的酸；在酸性環境下，白腐菌生長減緩，培養基濃度較低，有助於白腐菌之轉換能力，促使其吸收染料；然而染料的濃度過高，無適當的營養源環境下，因白腐菌養份不足，染料的降解率下降。

2. 中心混成實驗

(1)培養基12 g

甲基橙：染料濃度較高有較佳的降解率，溫度低會有較佳降解率。

甲基紅：染料濃度介於77~78 ppm，溫度較高時達到最佳的降解率。

(2)培養基18 g

甲基橙：染料濃度較高，溫度較高時有較佳的降解率。

甲基紅：溫度較高時有較佳的降解率。

參考文獻

- Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D. and Marchant, R. (1996), Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology*. 58:217-227.
- Box, G. E. P. and Behnken, D. W. (1960), Three level design for the study of quantitative variables. *Technometrics*. 2:455-475.
- Box, G. E. P. and Hunter, I. S. (1957), Multifactor experimental design for explaining response surface. *Annual Review of Statistics*. 28:195-241.
- Chang, J. S. and Lin, Y. C. (2000), Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. *Biotechnology Progress*. 16:979-985.
- Chang, J. S., Chen, B. Y. and Lin, Y. S. (2004), Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO3. *Biotechnology Progress*. 91:243-248.
- Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H. A. and Vyas, B. R. (2005), Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: Enzymology and Mechanism Involved. *Indian Journal of Experimental Biology*. 43:301-312.
- Kirby, N., McMullan, G. and Marchant, R. (1995), Decolorization of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Letters*. 17:761-764.
- Marco-Urrea, E. and Reddy, C. A. (2012), Degradation of chloro-organic pollutants by white-rot fungi. *Environmental Science and Engineering*. 31-66.
- Marques, D. A. V., Oliveira, R. P. S., Perego, P., Porto, A. L. F., Pessoa Jr., A. and Converti, A. (2009), Kinetic and thermodynamic investigation on clavulanic acid formation and degradation during glycerol fermentation by *Streptomyces DAUFPE 3060*. *Enzyme and Microbial Technology*. 45:169-173.
- Nilsson, I., Moller, A., Mattiasson, B. T., Rubindamayugi, M. S. and Welander, U. (2006), Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 94-100.
- Sahinkaya, S. (2013), COD and color removal from synthetic textile wastewater by ultrasound assisted electro-Fenton oxidation process, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 19: 601–605.

- Saratale, R.G., Saratale, G. D., Chang, J. S. and Govindwar, S. P. (2011), Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 42:138-157.
- Shyam, S. D., Satyshari, D. and Bhattacharyya, B. C. (1995), Dye decolorization in a column bioreactor using wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Indian Chemical Engineer*. A37:176-180.
- Singh, R. L., Singh, P. K. and Singh, R. P. (2015), Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 104:21-31.
- Srinivasan, A. and Viraraghavan, T. (2010), Decolorization of dye wastewaters by biosorbents : a review. *Journal of Environmental Management*. 91:1915-1929.
- Swamy, J. and Ramsay, J. (1999), The evaluation of white rot fungi in the decolorization of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 24:130-137.
- Yagub, M. T., Sen, T. K., Afroze, S. and Ang, H. M. (2014), Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 209:172-184.