

醌还原酶-醌类化合物对偶氮染料脱色的作用

周觅, 柳广飞, 周集体, 金若菲*, 陈明翔, 王艳青

(大连理工大学环境与生命学院, 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 大连 116024)

摘要: 外加醌类化合物作介体, 利用细菌胞内的醌还原酶考察基因工程菌 *Escherichia coli* YB 对偶氮染料的脱色能力, 以及甲基氢醌预处理对 *E. coli* JM109 和厌氧污泥脱色的影响。结果表明, 介体 2-羟基-1,4-萘醌(lawsone, LQ) 的存在对胞内过量表达醌还原酶 AZR 的 *E. coli* YB 的脱色能力有显著的促进作用, 0.2 mmol·L⁻¹ LQ 存在下, 苋菜红(1 mmol·L⁻¹) 在 2 h 内可脱色 75%。LQ 存在时 *E. coli* YB 对高浓度的染料也有脱色效果, 8 h 可使苋菜红(5 mmol·L⁻¹) 脱色 50% 左右。与 LQ 相比, 甲萘醌作为介体对脱色的促进效果较差, 2.5 mmol·L⁻¹ 甲萘醌存在下脱色 70% 需 12 h。LQ 存在时 *E. coli* YB 对苋菜红的重复脱色能力稳定, 12 h 内能完成 4 次重复脱色。LQ 的存在对于结构较复杂的 2 种偶氮染料酸性大红 GR 和活性艳红 K-2BP 的脱色也有促进作用, 在最适 LQ 浓度下, 分别在 9 h 和 30 h 脱色 70%。甲基氢醌预处理对 *E. coli* JM109 和厌氧污泥的脱色能力都有促进作用。预处理后在 LQ 存在下, *E. coli* JM109 在 5 h 可脱色苋菜红(1 mmol·L⁻¹) 80% 左右, 而污泥可在 11 h 脱色 75% 以上。

关键词: 基因工程菌; 醌还原酶; 氧化还原介体; 偶氮染料

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0253-3301(2009)06-1810-08

Decolorization of Azo Dyes Using Quinone Reductase and Quinoid Compounds

ZHOU Mi, LIU Guang-fei, ZHOU Ji-ti, JIN Ru-fei, CHEN Ming-xiang, WANG Yan-qing

(Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, Ministry of Education, School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Using quinoid redox mediator and bacterial cellular quinone reductase, we investigated the decolorization ability of gene-engineered strain *Escherichia coli* YB and the effects of methylhydroquinone (MHQ) pretreatment on decolorization performance of *E. coli* JM109 and anaerobic sludge. The results indicate that lawsone is an effective accelerator for azo dye decolorization by *E. coli* YB overexpressing cellular quinone reductase AZR. In the presence of 0.2 mmol·L⁻¹ lawsone, 75% Amarant (1 mmol·L⁻¹) can be decolorized in 2 h. *E. coli* YB can also decolorize high concentration of azo dye in the presence of lawsone. Around 50% Amarant (5 mmol·L⁻¹) is decolorized in 8 h. Compared to lawsone, menadione is a less effective mediator. *E. coli* YB takes 12 h to reach 70% decolorization in the presence of 2.5 mmol·L⁻¹ menadione. Repeated decolorization studies showed that *E. coli* YB had stable decolorizing ability in the presence of lawsone. Four rounds of repeated decolorization can be completed in 12 h. Lawsone can also accelerate the decolorization of azo dyes with complex structures such as Acid Scarlet GR and Reactive Brilliant Red K-2BP. With the optimal LQ concentrations, 70% Acid Scarlet GR and Reactive Brilliant Red K-2BP are decolorized in 9 h and 30 h, respectively. Decolorization performances of *E. coli* JM109 and anaerobic sludge pretreated with MHQ are improved. After MHQ pretreatment, in the presence of lawsone, 80% Amarant (1 mmol·L⁻¹) can be decolorized in 5 h by *E. coli* JM109, while more than 75% Amarant can be removed in 11 h by sludge.

Key words: genetically engineered bacteria; quinone reductase; redox mediator; azo dyes

染料废水是较难处理的工业废水之一^[1,2], 而偶氮染料是使用最广泛的一类染料, 占到染料使用总量的 60%~70%^[3]。偶氮染料生物降解的第一步也是最关键的一步是由偶氮还原酶催化完成的偶氮键的断裂, 生成相应的芳香胺。近年来, 人们考察了多种不同来源的偶氮还原酶, 并利用这些偶氮还原酶基因构建了基因工程菌^[4~12]。但研究表明, 这些胞内过量表达了偶氮还原酶的基因工程菌并没有明显表现出较野生菌更强的脱色能力。Bl mel 等^[4]比较了 *Xenophilus azovorans* KF46F 及携带有其偶氮还原酶基因 *azoB* 的重组大肠杆菌的细胞提取物的偶氮还原酶活性, 发现后者的偶氮还原酶活性是前者的 50 倍; 但重组大肠杆菌在完整细胞水平上却未检测到

偶氮还原活性。同样, 携带有偶氮还原酶基因 *fre* 的重组 *Sphingomonas* sp. strain BN6 的细胞提取物的偶氮还原酶活性较野生菌提高了 30 倍, 而其完整细胞对偶氮染料苋菜红和煤染黄 3 的还原速率却只比野生菌提高了约 3 倍^[12]。Liu 等^[13]的研究也表明, 胞内过量表达了偶氮还原酶 AZR 的重组 *Escherichia coli* YB 的细胞提取物的偶氮还原酶活性是野生光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737 的 10 倍左右, 但其完整细胞却没有表现出更强的脱色能力。由于偶

收稿日期: 2008-09-04; 修订日期: 2008-10-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(50808029)

作者简介: 周觅(1983~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: mizhou@yahoo.cn

* 通讯联系人, E-mail: jinrifei@dlut.edu.cn

氮染料通常分子结构复杂, 含有高极性的取代基, 其还原受到细胞膜通透性的限制^[3], 使得胞内过量表达的偶氮还原酶在细菌脱色偶氮染料过程中难以发挥作用。

近年来, 有许多厌氧条件下细菌利用氧化还原介体如黄素类化合物 FAD、FMN 和核黄素, 及醌类化合物蒽醌-2-磺酸(AQS)、蒽醌-2, 6-二磺酸(AQDS)和 2-羟基-1, 4-萘醌降解偶氮染料的报道^[14~19]。醌类化合物作为介体促进偶氮染料脱色依赖于细菌细胞膜上或细胞质内的醌还原酶, 在醌还原酶的作用下, 醌类化合物被还原为相应的氢醌, 氢醌再通过纯化学的作用将偶氮染料还原使其脱色^[20~22]。此外, 近来有报道认为与 *E. coli* 偶氮/醌还原酶 Azor 具有 30% 一致性的 *Bacillus subtilis* 偶氮还原酶 Azor1 和 Azor2 的表达受到甲基氢醌等亲电化合物的诱导^[23, 24]。

此前研究发现偶氮还原酶 AZR 具有醌还原酶活性, 2-羟基-1, 4-萘醌等醌类化合物为其更适合的底物^[25]。本实验利用 AZR 的醌还原酶活性, 选用醌类化合物作为氧化还原介体, 研究了基因工程菌 *E. coli* YB 对偶氮染料的脱色, 得到了目前已报道最快的细菌比脱色速率。此外, 本研究还考察了甲基氢醌预处理对 *E. coli* JM109 和厌氧污泥脱色偶氮染料的影响。研究结果对于偶氮染料废水的污染整

治有着非常重要的理论意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及污泥来源

E. coli JM109 为基因工程操作出发菌株。*E. coli* YB 含有插入 *R. sphaeroides* AS1.1737 偶氮还原酶基因 *azr* (GenBank 登录号为 AAN17400) 的质粒 pGEX-AZR, 由本实验室前期工作构建^[12]。厌氧污泥取自大连市春柳河污水处理厂, 经厌氧培养驯化。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 100 mL 培养基中含有 0.5 g 酵母膏, 1 g 蛋白胨, 1 g NaCl, 调节 pH=7.2, 用于细菌的好氧增殖培养。

脱色培养基: 由无机盐培养基中加入葡萄糖(10 mmol·L⁻¹)制成。100 mL 无机盐培养基中含有 0.1 g NH₄Cl, 0.1 g NaHCO₃, 0.02 g K₂HPO₄, 0.02 g MgSO₄·7H₂O, 0.05~0.2 g NaCl, 生长因子 1 mL, 微量元素 1 mL, 蒸馏水 97 mL, 调节 pH=7.0, 用于考察偶氮染料的脱色。

1.1.3 偶氮染料

苋菜红为本研究的模式偶氮染料, 与其它偶氮染料均由大连理工大学染料合成实验室合成, 偶氮染料的化学结构及最大吸收波长如图 1 所示。

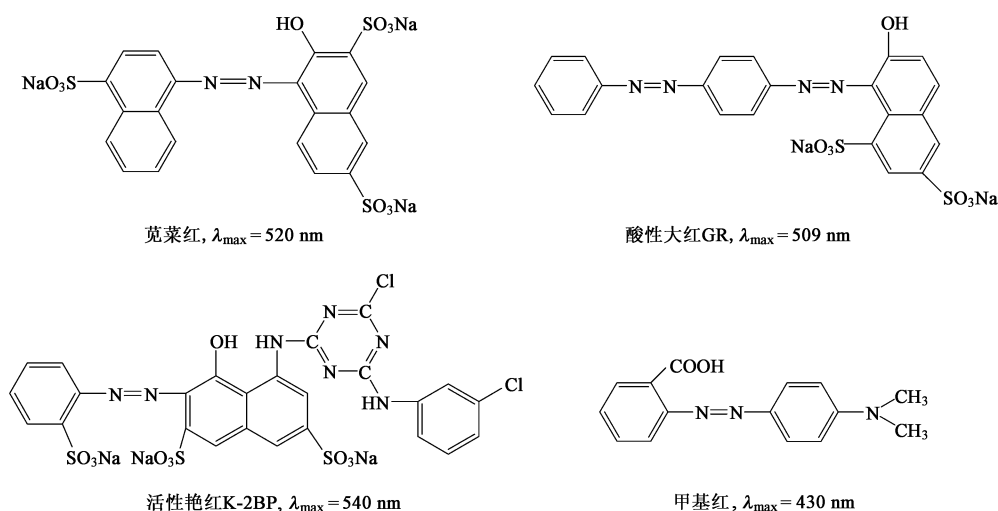


图 1 本研究中所使用的偶氮染料

Fig. 1 Azo dyes used in this study

1.1.4 主要药品

甲萘醌(menadione)、2-羟基-1, 4-萘醌(lawsone, IQ)、甲基氢醌(methylhydroquinone, MHQ)和 NADH 等购自 Sigma 公司; 氨苄青霉素、牛血清白蛋白和考

马斯亮蓝 G-250 购自上海华美生物工程公司; IPTG 购自宝生物工程(大连)公司; 其余药品均为国产分析纯。

1.2 粗酶的提取及蛋白含量的测定

实验以细菌细胞提取物为粗酶液,提取方法如文献[11].简述如下:将培养后离心($8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 20 min)收集的菌体先在低温冰箱($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)中冷冻保存,取出后于室温融化,采用超声破碎器于冰浴中破碎细胞 30 min,脉冲 1.0,然后离心($22\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 20 min)收集上清液,即得粗酶.采用 Bradford 法^[26]测定酶液蛋白含量,以牛血清白蛋白作为标准蛋白.

1.3 酶活分析体系

反应体系的总体积为 2 mL, $\text{pH}=7$, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. 此体系由 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液配制,含有 $5\sim 100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基红或 $2.5\sim 50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LQ, 一定量粗酶及 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADH. 反应以加入 NADH 开始,混合均匀后迅速放入 JASCO V-560 型分光光度计中,以缓冲溶液为参比,在相应最大吸收波长下测定反应体系的吸光度随时间的变化情况,计算相应的酶活.酶活力单位(U)定义为:在特定条件下($\text{pH}=7$, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$),每 min 内转化 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 底物所需酶量.酶的比活力为单位蛋白的酶活力.

通过检测甲基红 [$\lambda_{\text{max}}=430\text{ nm}$, $\varepsilon=23.4\text{ L}\cdot(\text{mmol}\cdot\text{cm})^{-1}$] 最大吸收峰波长处吸光度的降低计算偶氮还原酶的酶活.

由于 LQ 在可见光区有吸收干扰,故通过检测 NADH [$\lambda_{\text{max}}=340\text{ nm}$, $\varepsilon=6.22\text{ L}\cdot(\text{mmol}\cdot\text{cm})^{-1}$] 的氧化来计算醌还原酶的酶活^[25].

1.4 脱色培养方法及脱色的测定

将培养后收集的菌体重悬于血清瓶中的脱色培养基,使菌体终浓度(干重)达到 $0.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,加入一定量的醌类化合物,曝氮气 15 min,再加入偶氮染料(染料终浓度 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,瓶内溶液总体积为 50 mL),密封后放入 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养箱内,观察其脱色情况.在选定时间间隔内,取样、将含染料以及菌体的培养液离心($8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min)后,以未加染料的脱色培养基为参比,测量其最大吸收波长处的吸光度.并按下式计算其脱色率:

$$r = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\%$$

式中, A_0 : 初始时刻的吸光度; A_t : 培养时间 t 后的吸光度.

当染料达到 70% 左右的脱色率时,重新补料加入,使培养基中染料浓度大致回复到初始值,考察细菌重复脱色能力.

1.5 偶氮染料还原电势的测定

电化学分析采用三电极体系,以玻碳电极($d=$

3 mm) 为工作电极,铂电极($2\text{ cm}\times 2\text{ cm}$) 为辅助电极,饱和甘汞电极(SCE) 为参比电极($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 染料, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_4 溶液, $\text{pH}=6$). 实验中用 PARSTAT 2273 型电化学工作站测试并做循环伏安曲线.实验前经高纯氮气除氧 15 min,扫描速率为 $50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$,在 $-800\sim 500\text{ mV}$ 范围内循环扫描 3 次.

1.6 MHQ 预处理对脱色的影响

在 LB 中培养 *E. coli* JM109,待菌液 D_{600} 达到 0.6 左右时,将菌株收集洗净后,重悬于加入一定量 MHQ 的脱色培养基中,菌体终浓度(干重)为 $0.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,好氧培养 10 min;而后加入 LQ ($0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),曝氮气 15 min,加入染料苋菜红($1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)考察厌氧脱色.收集并洗净厌氧污泥(污泥终浓度 $\text{MLSS}=4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)取代 *E. coli* JM109 考察 MHQ 预处理对污泥脱色偶氮染料的影响.

2 结果与分析

2.1 粗酶液酶活及 *E. coli* 完整细胞脱色苋菜红的考察

分别以 *E. coli* JM109 和 *E. coli* YB 的细胞提取物为粗酶,考察其还原甲基红及 LQ 的能力.由图 2(a) 可见, *E. coli* YB 的提取物具有比 *E. coli* JM109 更高的偶氮还原酶活性,当甲基红浓度为 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,前者的比活力为后者的 5 倍以上.而由图 2(b) 可知 *E. coli* YB 提取物的醌还原酶活性也远远大于 *E. coli* JM109,当 LQ 浓度为 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,前者的比活力是后者的 17 倍以上.

考察 *E. coli* JM109 和 *E. coli* YB 完整细胞对苋菜红的脱色发现,48 h 后,两者对苋菜红的脱色率都仅为 12% 左右.尽管基因工程菌 *E. coli* YB 在胞内表达了大量的偶氮还原酶 AZR,且其提取物在体外考察中也表现出更高的酶活,但其在细菌细胞水平上的脱色效果却并不强于 *E. coli* JM109.有报道认为,对于磺酸取代类偶氮染料的脱色,由于染料分子复杂的结构及其取代基的高极性使其很难进入胞内被还原^[3,12],因此在胞内过量表达的偶氮还原酶难以发挥作用.

2.2 LQ 对 *E. coli* 脱色苋菜红的影响

向脱色培养基中加入不同终浓度的 LQ 后,考察 *E. coli* 的脱色情况.如图 3(a),无介体存在时 *E. coli* JM109 对苋菜红基本不脱色, $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ LQ 存在下对脱色的促进作用最为显著,6 h 可脱色 75%.但随着介体浓度进一步提高,促进效果反而下降,可能是由于高浓度的 LQ 更多发挥与染料竞争

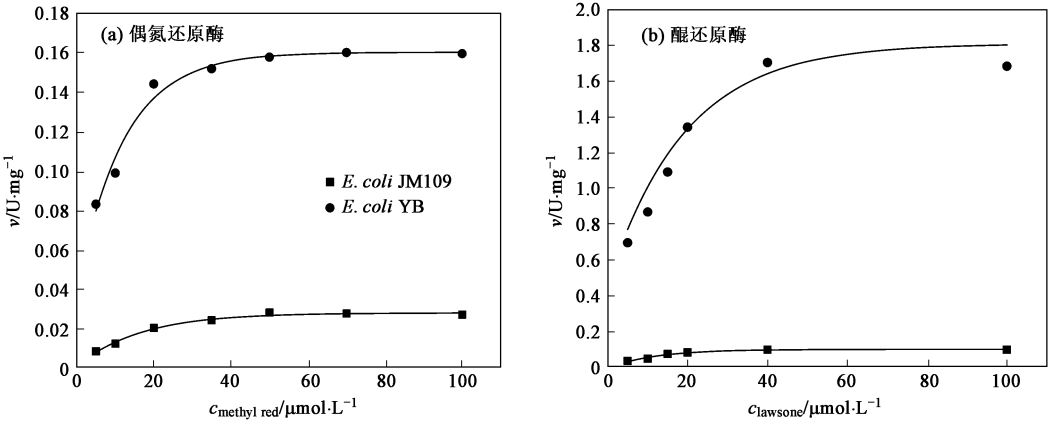


图 2 粗酶液的偶氮还原酶和醌还原酶活性

Fig. 2 Azoreductase and quinone reductase activities of crude enzymes

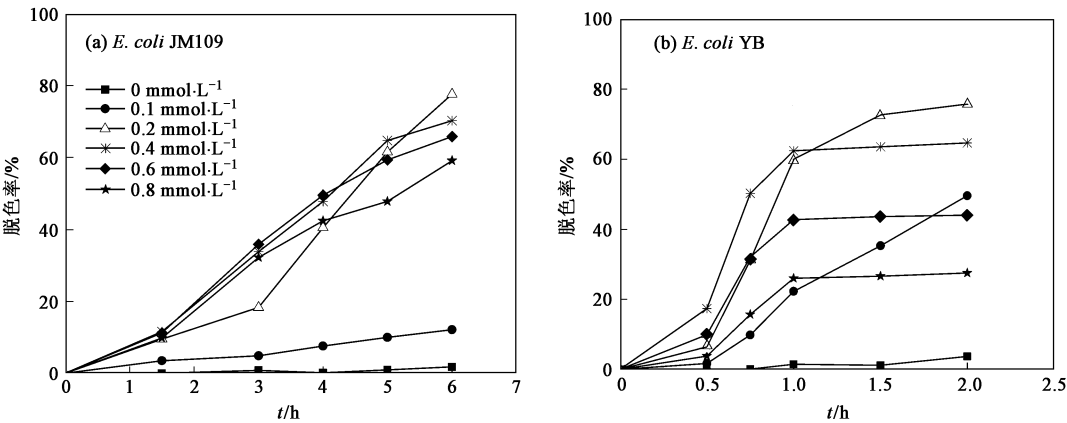


图 3 lawsone 对 *E. coli* JM109 和 *E. coli* YB 脱色苋菜红的影响

Fig. 3 Effects of lawsone on decolorization of Amaranth by *E. coli* JM109 and *E. coli* YB

电子的作用而介体作用不明显,也可能由于高浓度的 LQ 给细胞带来毒性.如图 3(b)可见,介体 LQ 的存在也能促进 *E. coli* YB 的脱色能力,其最适介体浓度也为 0.2 mmol·L⁻¹,2 h 就可脱色 75%.上述结果表明菌株 *E. coli* YB 胞内过量表达的醌还原酶 AZR,与介体共同参与脱色,提高了菌株的脱色能力.LQ 存在时 *E. coli* YB 对高浓度的染料也有脱色效果.0.2 mmol·L⁻¹ LQ 存在下,8 h 可使苋菜红(5 mmol·L⁻¹)脱色 50%.

2.3 menadione 对 *E. coli* YB 脱色苋菜红的影响

前期实验工作发现,与 LQ 相比,同为萘醌衍生物的 menadione 是醌还原酶 AZR 更为适合的底物^[25].因此,考察 menadione 对 *E. coli* YB 脱色苋菜红的影响.由图 4 可知,menadione 对脱色也有一定的促进作用,不存在 menadione 的情况下 24 h 仅能脱色 10%,而 2.5 mmol·L⁻¹ menadione 存在下 12 h 能脱色 70%以上,促进作用最为显著,但与 LQ 相比,促进效果较差.

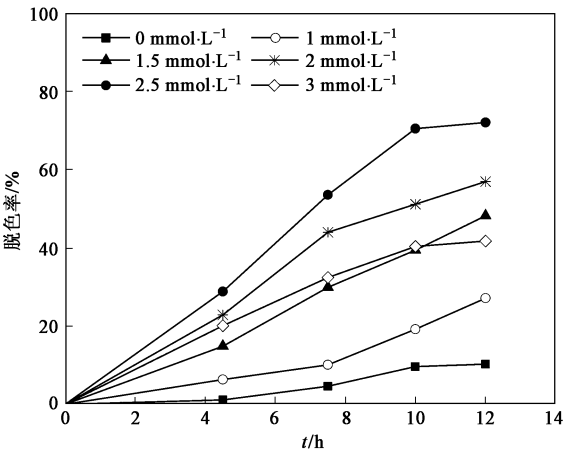


图 4 menadione 对 *E. coli* YB 脱色苋菜红的影响

Fig. 4 Effects of menadione on decolorization of Amaranth by *E. coli* YB

2.4 LQ 存在时 *E. coli* YB 对苋菜红的连续脱色

考察 LQ 存在时 *E. coli* YB 重复脱色苋菜红能

力的稳定性. LQ 存在时, *E. coli* JM109 在 12 h 内仅能完成 2 次脱色. 而图 5 表明, 12 h 内 *E. coli* YB 能完成 4 次脱色, 脱色能力稳定. 第 3、4 次的脱色相对于前 2 次有所变慢, 可能是由于电子供体葡萄糖被逐渐消耗浓度降低所致, 也可能是降解代谢物毒性积累所致.

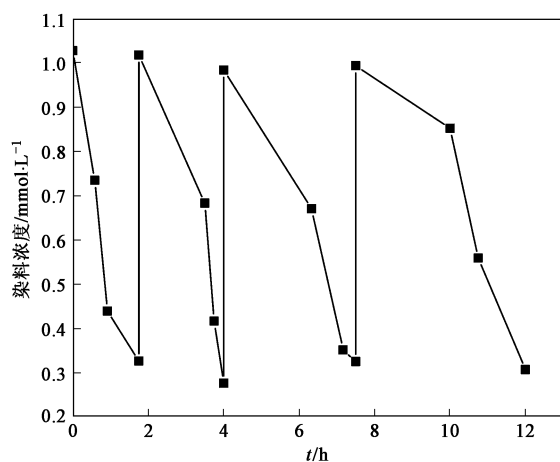


图 5 *E. coli* YB 重复脱色中的稳定性

Fig. 5 Stability of repeated decolorization by *E. coli* YB

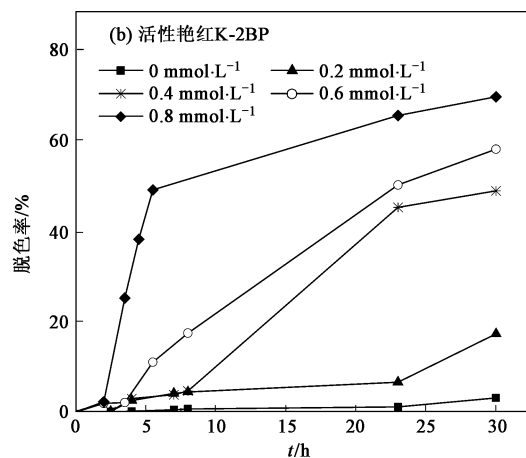
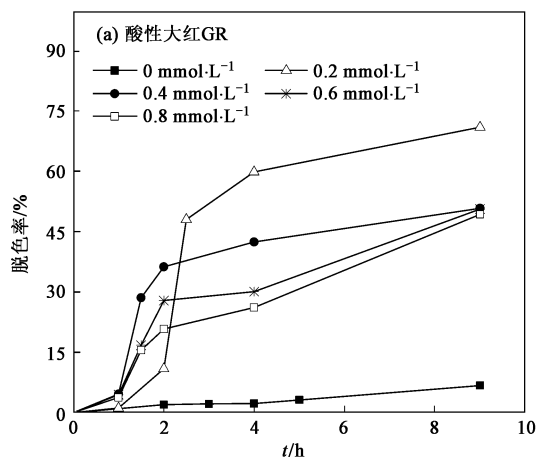


图 6 lawsone 对 *E. coli* YB 脱色酸性大红 GR 和活性艳红 K-2BP 的影响

Fig. 6 Effects of lawsone on decolorization of Acid Scarlet GR and Reactive Brilliant Red K-2BP by *E. coli* YB

3 讨论

氧化还原介体是加速电子从最初电子供体传递到最终电子受体的化合物, 它可以使反应速率增大 1 至几个数量级^[27]. 在有氧化还原介体存在时, 偶氮染料的还原性脱色可分为不同的 2 步, 第 1 步是非特异性的介体的酶还原, 第 2 步是偶氮染料被介体化学还原^[28]. 近来研究发现醌类化合物可作为氧化还原介体, 在厌氧条件下, 通过细胞膜上或细胞质内的醌还原酶的还原, 氢醌将细胞内的还原当量传递

2.5 LQ 对 *E. coli* YB 脱色其它染料的影响

向脱色培养基中加入不同终浓度的 LQ 后, 考察 *E. coli* YB 脱色酸性大红 GR 和活性艳红 K-2BP 的情况. 由图 6 可知, LQ 的存在对 *E. coli* YB 脱色这 2 种染料也都有促进作用, 无介体存在时染料基本不脱色. 0.2 mmol·L⁻¹ LQ 存在下对酸性大红 GR 脱色的促进作用最为显著, 9 h 脱色 70% 以上; 而 0.8 mmol·L⁻¹ LQ 存在下对活性艳红 K-2BP 脱色的促进作用最为显著, 30 h 脱色 70% 左右.

2.6 MHQ 预处理对 *E. coli* JM109 和厌氧污泥脱色苋菜红的影响

考察外加 MHQ 好氧预处理 10 min 对介体促进偶氮染料脱色的影响. 由图 7(a) 可知, MHQ 预处理对 *E. coli* JM109 脱色苋菜红有促进作用. 未经 MHQ 预处理的 control 5 h 仅脱色 60%, 而经 0.5 mmol·L⁻¹ MHQ 预处理后就可脱色 80%. 如图 7(b) 所知, LQ 的存在对污泥脱色苋菜红也有促进作用^[16], 无介体存在的 control a 11 h 基本不脱色, 而 LQ 存在下 control b 11 h 达到 25% 以上脱色率. 0.5 mmol·L⁻¹ MHQ 预处理对脱色的促进作用较显著, 11 h 可脱色 75% 以上.

给胞外的偶氮染料, 实现偶氮类化合物的非酶降解^[20-22]. AZR 具有醌还原酶活性^[25], 因此研究者可以利用其醌还原酶活性, 通过外加醌介体来加速基因工程菌脱色偶氮染料.

此前有研究报道了携带有偶氮还原酶基因 *fre* 的重组 *Shingomonas* sp. strain BN6 完整细胞对偶氮染料苋菜红的脱色情况, 30 h 后脱色率达 75% 左右^[12]. Hong 等^[29] 利用 AQS 和 AQDS 作为氧化还原介体, 考察了 *Shavanella decolorationis* S12 对苋菜红的脱色. 介体的加入对脱色确实有促进作用, 8 h 后

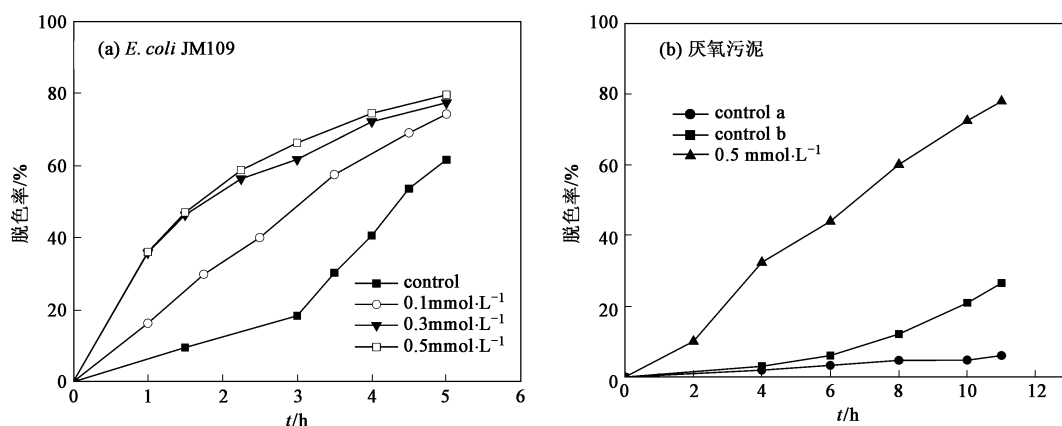


图7 MHQ 预处理对 *E. coli* JM109 和厌氧污泥脱色苋菜红的影响

Fig.7 Effects of MHQ pretreatment on decolorization of Amarant by *E. coli* JM109 and anaerobic sludge

脱色率达 75% 左右. 而本实验中首次利用醌介体加速基因工程菌脱色偶氮染料, 0.035 g 细胞(干重)在 LQ 存在下仅 2 h 脱色率就达到 75%, 为目前已报道最快的细菌比脱色速率. 介体的加入使基因工程菌在脱色上的优势得到了充分的体现.

氧化还原电势是醌类化合物能否作为氧化还原介体的决定因素. 近来研究表明, 氧化还原电势大约在 -320 ~ -50 mV 之间的醌类氧化还原介体通常都能在细菌厌氧偶氮还原中发挥有效的功能. 这一限度是由辅酶 NAD(P)H 的氧化还原电势和偶氮复合物的氧化还原电势共同决定的^[15]. LQ 的氧化还原电势为 -137 mV, 而 menadione 的氧化还原电势则高于 -50 mV^[15], 故 menadione 并不是一种理想的氧化还原介体. 但本实验却发现 menadione 的存在对苋菜红的脱色有一定的促进作用, 但其促进效果明显不如 LQ. Hong 等^[30] 对 *S. decolorationis* S12 偶氮呼吸的研究认为, 醌类化合物和细胞膜上的醌还原酶是细菌细胞膜电子传递链的重要组分. 因而 menadione 可能有利于细胞膜上的电子传递而对 *E. coli* YB 脱色苋菜红发挥了促进作用.

根据 Nemst 方程, 还原反应与氧化还原物质的电极电势及浓度有关. 电极电势越高, 物质越易被还原. 本实验中 3 种偶氮染料还原电势由低到高的顺序为: 酸性大红 GR ($E_r = -684$ mV) < 苋菜红 ($E_r = -540$ mV) < 活性艳红 K-2BP ($E_r = -176$ mV), 而比脱色速率由小到大的顺序却是活性艳红 K-2BP < 酸性大红 GR < 苋菜红. 酸性大红 GR 的还原电势最低, 因此较难得电子被还原; 而活性艳红 K-2BP 的还原电势虽高, 但其化学结构复杂, 偶氮键邻位存在 2 个磺基基团, 可能受到空间位阻的影响导致其难被

还原. 同时, 活性艳红 K-2BP 的最适介体浓度大于其他 2 种染料, 也可能是其复杂的化学结构所决定的.

近来有报道表明, 外加 MHQ 和儿茶酚等亲电醌类化合物经短时间的预处理, 可显著提升偶氮/醌还原酶基因的转录与表达^[23, 24]. 本研究发现 MHQ 预处理对 *E. coli* JM109 脱色偶氮染料有促进作用. 即时定量反转录 PCR 实验表明, 经 0.5 mmol·L⁻¹ MHQ 预处理 10 min 后, *E. coli* JM109 染色体上偶氮/醌还原酶的编码基因 αOR 的转录水平提升了近 50 倍 (另文发表). 因此, MHQ 的预处理可诱导提升 AzoR 等偶氮/醌还原酶的转录表达, 从而促进醌类介体存在下细菌对偶氮染料的脱色. 研究表明在很多芳香化合物的代谢途径中都会生成具有与儿茶酚和氢醌类似结构的中间体^[31]. 因此醌类化合物对偶氮、硝基和氯代等芳香化合物的降解的促进作用值得深入研究. 随着基因组学的发展, 许多细菌的全基因组序列被测序出来. 研究发现与 *E. coli* 的 αOR 基因具有一定相似性的同源基因广泛分布于许多不同种类的细菌中^[32], 而污泥中存在着大量的细菌, 数量可占污泥中微生物总量的 90% ~ 95% 左右. 本研究中 MHQ 预处理对厌氧污泥脱色偶氮染料有明显的促进作用. 活性污泥法成本低廉、简单易行, 是污水处理中常用的方法. 但脱色偶氮染料对活性污泥来说是有难度的, 通常需要较长的时间才能达到较好的处理效果. MHQ 预处理能够改善污泥的脱色效果, 加快脱色速率, 该方法的实际应用有待于深入研究.

4 结论

(1) *E. coli* YB 细胞提取物的偶氮还原酶活性和醌还原酶活性都大大高于 *E. coli* JM109, 但由于

染料分子复杂的结构及其取代基的高极性使其还原受到细胞膜通透性的限制, 因此对于磺酸取代类偶氮染料的脱色, 胞内过量表达的偶氮还原酶难以发挥作用。

(2) 介体 LQ 的存在对 *E. coli* YB 的脱色能力有显著的促进作用, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LQ 存在下, *E. coli* JM109 需要 6 h 才能脱色 75%, 而 *E. coli* YB 2 h 就可使苋菜红($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 脱色 75%。介体将胞内的还原当量传递给了胞外的偶氮染料, 其加入体现出了基因工程菌在脱色上的优势, 该比脱色速率为目前已报道的最快的。介体 LQ 存在时 *E. coli* YB 对高浓度的染料也有脱色效果。

(3) 与 LQ 相比, 氧化还原电势过高的 menadione 对脱色的促进效果较差, 表明其并不是一种理想的氧化还原介体。

(4) LQ 存在时 *E. coli* YB 对苋菜红的重复脱色能力稳定, 12 h 内菌体能完成 4 次脱色, 而 *E. coli* JM109 仅能完成 2 次。LQ 的存在对于结构较复杂的 2 种偶氮染料酸性大红 GR 和活性艳红 K-2BP 的脱色也有促进作用。

(5) MHQ 预处理对 *E. coli* JM109 和厌氧污泥的脱色能力都有促进作用。

参考文献:

- [1] 李家珍. 染料染色工业废水处理 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1999. 74-75.
- [2] 徐文东, 文湘华. 微生物在含染料废水处理中的应用 [J]. 环境污染治理技术与设备, 2000, 1(2): 9-16.
- [3] Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56(1-2): 69-80.
- [4] Bl mel S, Knackmuss H J, Stolz A. Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(8): 3948-3955.
- [5] Bl mel S, Stolz A. Cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Pigmentiphaga kullae* K24 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(2-3): 186-190.
- [6] Mazumder R, Logan J R, Mikell A T Jr, et al. Characteristics and purification of an oxygen insensitive azoreductase from *Caulobacter subvibrioides* strain C7-D [J]. J Indust Microbiol Biotechnol, 1999, 23(6): 476-483.
- [7] Moutaouakkil A, Zeroual Y, Dzayri F Z, et al. Purification and partial characterization of azoreductase from *Enterobacter agglomerans* [J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 413(1): 139-146.
- [8] Chen H Z, Wang R F, Cemiglia C E. Molecular cloning, overexpression, purification, and characterization of an aerobic FMN-dependent azoreductase from *Enterococcus faecalis* [J]. Protein Expr Purif, 2004, 34(2): 302-310.

- [9] Chen H Z, Hopper S L, Cemiglia C E. Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus*, a tetrameric NADPH-dependent flavoprotein [J]. Microbiology, 2005, 151(5): 1433-1441.
- [10] Suzuki Y, Yoda T, Ruhul A, et al. Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from soil [J]. J Biol Chem, 2001, 276(12): 9059-9065.
- [11] 严滨. 球形细菌偶氮还原酶的表达与特性研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2004. 56-69.
- [12] Russ R, Rau J, Stolz A. The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(4): 1429-1434.
- [13] Liu G, Zhou J, Qu Y, et al. Decolorization of sulfonated azo dyes with two photosynthetic bacterial strains and a genetically engineered *Escherichia coli* strain [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2007, 23(7): 931-937.
- [14] Send R, Pierre D, Geuskens G, et al. Study of some important factors involved in azo derivative reduction by *Clostridium pefringens* [J]. Int J Pharm, 1998, 161(1): 45-54.
- [15] Rau J, Knackmuss H J, Stolz A. Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria [J]. Environ Sci Technol, 2002, 36(7): 1497-1504.
- [16] Field J A, Brady J. Riboflavin as a redox mediator accelerating the reduction of the azo dye Mordant Yellow 10 by anaerobic granular sludge [J]. Water Sci Technol, 2003, 48(6): 187-193.
- [17] dos Santos A B, Bisschops I A E, Cervantes F J, et al. Effect of different redox mediators during thermophilic azo dye reduction by anaerobic granular sludge and comparative study between mesophilic (30°C) and thermophilic (55°C) treatments for decolourisation of textile wastewaters [J]. Chemosphere, 2004, 55(9): 1149-1157.
- [18] dos Santos A B, de Madrid M P, Sams A J M, et al. Azo dye reduction by mesophilic and thermophilic anaerobic consortia [J]. Biotechnol Progr, 2005, 21(4): 1140-1145.
- [19] Encinas-Yocupicio A A, Razo-Flores E, Sanchez-Diaz F, et al. Catalytic effects of different redox mediators on the reductive decolorization of azo dyes [J]. Water Sci Technol, 2006, 54(2): 165-170.
- [20] Kudlich M, Keck A, Klein J, et al. Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(9): 3694-3694.
- [21] Rau J, Stolz A. Oxygen-insensitive nitroreductase NfsA and NfsB of *Escherichia coli* function under anaerobic conditions as lawsone-dependent azo reductase [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(6): 3448-3455.
- [22] Keck A, Rau J, Reemtsma T, et al. Identification of quinoid redox mediators that are formed during the degradation of naphthalene-2-sulfonate by *Sphingomonas xenophaga* BN6 [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(9): 4341-4349.
- [23] Thwe S, Leelakriangsak M, Kobayashi K, et al. The MarR-type

- repressor MhqR (YkvE) regulates multiple dioxygenases/ glyoxalases and an azoreductase which confer resistance to 2-methylhydroquinone and catechol in *Bacillus subtilis* [J]. Mol Microbiol, 2007, **66**(1): 40-54.
- [24] Leelakriangsak M, Huyen N T, Tawe S, *et al.* Regulation of quinone detoxification by the thiol stress sensing DUF24/MarR-like repressor, YodB in *Bacillus subtilis* [J]. Mol Microbiol, 2008, **67**(5): 1108-1124.
- [25] Liu G, Zhou J, Jin R, *et al.* Enhancing survival of *Escherichia coli* by expression of azoreductase AZR possessing quinone reductase activity [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, **80**(3): 409-416.
- [26] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, **72**: 248-254.
- [27] Cervantes F J. Quinones as electron acceptors and redox mediators for the anaerobic biotransformation of priority pollutants [D]. Wageningen: Wageningen University, 2002. 166.
- [28] Keck A, Rau J, Reemtsma T, *et al.* Identification of quinoid redox mediators that are formed during the degradation of naphthalene-2-sulfonate by *Sphingomonas xenophaga* BN6 [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**(9): 4341-4349.
- [29] Hong Y, Guo J, Xu Z, *et al.* Humic substances act as electron acceptor and redox mediator for microbial dissimilatory azoreduction by *Shewanella decolorationis* S12 [J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, **17**(3): 428-437.
- [30] Hong Y, Xu M, Guo J, *et al.* Respiration and growth of *Shewanella decolorationis* S12 with an azo compound as the sole electron acceptor [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, **73**(1): 64-72.
- [31] Vaillancourt F H, Bolin J T, Eltis L D. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2006, **41**(4): 241-267.
- [32] Ito K, Nakanishi M, Lee W C, *et al.* Three-dimensional structure of Azor from *Escherichia coli*: an oxidoreductase conserved in microorganisms [J]. J Biol Chem, 2006, **281**(29): 20567-20576.