

假单胞菌 S-42 对偶氮染料的脱色和降解代谢

刘志培 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

假单胞菌 S-42 (*Pseudomonas* S-42) 对活性艳橙 KN-4R、直接深棕 M、酸性媒介棕 RH 等偶氮染料具有良好的脱色作用, 该菌株的细胞悬液、无细胞提取液和纯酶的脱色条件较一致, 最适 pH 为 7.0, 最适温度为 37℃。细胞悬液对上述三种染料的脱色率都可达 90%。当细胞浓度为 15mg/ml, 反应 5h, 其脱色活力分别为 1.75、2.4、0.95 μg 染料/mg 细胞; 无细胞提取液和纯酶要求厌氧和加有 NADH 时才具有活性; 纯酶属于偶氮还原酶, 分子量为 34000 ± 2000 , 对活性艳橙 KN-4R 的最大反应速度 $V_{\max}$ 为 $13\mu\text{mol} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 米氏常数 $K_m = 54\mu\text{mol}$ 。S-42 菌株降解活性艳橙 KN-4R 的反应产物的吸收光谱和亚硝酸钠反应等方法检测结果表明, 偶氮染料的生物降解开始于偶氮双键的还原裂解。本文还提出了 S-42 菌株降解活性艳橙 KN-4R 的假设反应式。

关键词 假单胞菌 S-42; 偶氮染料脱色和降解; 偶氮还原酶

染料是人工合成的大分子化合物, 品种繁多, 结构复杂, 生物难以降解, 有些还具有毒性^[1]。从染料制造、纺织印染、食品等工业的排出水中, 都含有此类污染物, 广泛污染水源, 引起国内外的极大关注。

早在 30 年代, 就发现着色的乳制品由乳酸杆菌引起的脱色现象, 此后陆续研究各种细菌的染料脱色作用, 已报道的脱色菌以假单胞菌和芽孢杆菌居多^[2]。Meyer 报道, 偶氮染料的微生物脱色可以在好氧和厌氧条件下进行, 厌氧脱色是由一些具有非专一性酶的微生物完成。Kulla^[3]、Zimmermann^[4]、Meyer 等人^[5]对偶氮还原酶的特性、影响因素, 以及偶氮染料的代谢产物进行了研究。近年来, 我国开始了染料脱色菌的分离^[6], 研究了固定化细胞的脱色^[7]以及投加高效菌株进行印染废水的处理的研究^[8]。但是对染料生物降解代谢的研究还未见报道。

本文选择我国纺织印染厂常用的活性艳橙 KN-4R(DBO-RR)、直接深棕

M(DBM)、酸性媒介棕 RH(EBR) 三种偶氮染料, 研究假单胞菌 S-42 对它们的脱色作用和条件, 以及粗酶液和纯酶的脱色速度、纯酶的动力学性质; 和该菌降解活性艳橙 KN-4R 及其代谢机理。

材 料 和 方 法

(一) 菌种和培养基

假单胞菌 S-42 (*Pseudomonas* S-42) 由微生物所环境微生物组分离, 用普通牛肉汁培养基培养。

(二) 染料

试验所用的染料列于表 1。

(三) 完整细胞悬液和无细胞提取液的制备

取 30℃、24h 摇床培养的细菌培养物, $5000 \times g$ 离心收集细胞, 用 0.067mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液洗涤数次, 悬浮于相同的缓冲液中即完整细胞悬液; 取完整细胞用细菌破碎器 (X-Press) 低温冷冻破碎, 加入一定量的磷酸缓冲液, 充分搅拌均匀, $19000 \times g$ 离心 30min, 取上清液既为无

本文于 1988 年 4 月 1 日收到。

本课题由国家自然科学基金资助。

表 1 偶氮染料及其结构
Table 1 Azo dyes and their structures

偶氮染料 Azo dyes	结 构 Structures	$\lambda_{\max}(\text{nm})$
活性艳橙 KN-4R Diamira brilliant orange RR (DBO-RR)		486
直接深棕 M Direct brown M (DBM)		416
酸性媒介棕 RH Eriochrome brown R (EBR)		420—430

细胞提取液。

(四) 酶的制备与纯化

取无细胞提取液用硫酸铵 (25%—45% (W/V)) 分步沉淀后,再用 DEAE-纤维素亲和层析和 Sephadex G-200 排阻层析纯化。

(五) 脱色活力的测定

1. 完整细胞的脱色作用: 在各种染料的最大吸收峰处,测定反应前后的吸光度,以百分数表示其脱色率;或以每毫克细胞脱除的染料微克数做为细胞脱色活力 (μg 染料/ mg 细胞)。

2. 无细胞提取液的脱色测定条件按 Walker 等人^[12]所述的方法进行,以百分数表示其脱色率,或以脱色比活 (μg 染料· mg 蛋白⁻¹· min^{-1})表示:

无细胞提取液脱色比活

$$= \frac{\text{所脱除染料的总微克数}}{\text{蛋白总毫克数} \times \text{作用时间}(\text{min})}$$

3. 脱色酶的脱色,以相对酶活单位*表示。

(六) 化学分析方法

1. 芳香伯胺的测定,根据芳香伯胺在酸性环境中与 NaNO_2 反应形成芳香重氮盐,在碱性条件下芳香重氮盐与 β -萘酚反应形成橙红色沉淀定性测定^[10]。

2. 抽提物的吸收光谱,按照 Yatome 等人^[11]的方法,细胞与染料反应后的混合物用正丁醇抽

提,离心取上层正丁醇相,在 DU-7 型分光光度计 (Beckman) 上进行吸收光谱扫描。

3. 蛋白质含量按 Lowry 法测定。

4. 蛋白质分子量采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[12]测定(标准蛋白采用 Sigma 公司产品)。

结果和讨论

(一) 完整细胞的脱色

1. 脱色的最适 pH 和最适温度: 反应体系中细胞浓度为 15mg (湿重)/ ml ,染料浓度为 50ppm ,在 37°C 水浴中反应 8h ,然后测定脱色率。结果(表 2)表明,S-42 完整细胞对这三种染料的最适 pH 均为 7.0,但对 DBO-RR 的脱色 pH 范围较广;对酸性媒介棕 RH(EBR) 的脱色 pH 范围要小一些,而且在酸性条件下较在碱性条件下为好。脱色的最适温度见表 3,反应条件同 pH 试验,其反应 pH 为 7.0,在不同温度下反应 8h ,S-42 菌株完整细胞对三种

*: 酶的相对活性单位定义为: 在 30min 内,平均每分钟消耗 $1\mu\text{g}$ DBO-RR 所需的酶量为一个活性单位。

表2 完整细胞脱色的最适 pH
Table 2 The optimia pH of decolorization by intact cells

脱色率(%) Decolorization rate	pH					
		5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
染料 Dyes						
活性艳橙 KN-4R (DBO-RR)		81.6	88.6	95.3	88.2	83.2
直接深棕 M (DBM)		70.3	88.8	91.8	86.3	77.4
酸性媒介棕 RH (EBR)		70.5	76.3	78.5	49.1	10.9

表3 完整细胞脱色的最适温度
Table 3 The optimum temp. of decolorization by intact cells

脱色率(%) Decolorization rate	温度(℃) Temp.	4	13	22	30	37	45	55
染料 Dyes								
DBO-RR		0.2	6.3	38.3	59.0	94.8	81.5	61.4
DBM		0.4	9.7	33.5	60.7	90.6	67.3	44.2
EBR		4.6	11.2	31.3	51.6	75.8	60.3	31.3

染料的脱色最适温度都为 37℃。

2. 细胞浓度对脱色的影响: 用不同浓度的完整细胞, 在 pH7.0、37℃ 下保温反应 5h, 测定细胞对不同偶氮染料的脱色活力(图1)。以细胞浓度为 15mg (湿重)/ml 时最适。

3. 完整细胞对偶氮染料的脱色最适时间: 将细胞浓度为 15mg (湿)/ml 和染料浓度为 50ppm 的反应混合物, 在最适条件下进行脱色反应, 不同时间取样测其脱色率(图 2)。S-42 菌株完整细胞对不同的染料具有不同的脱色能力, 对 DBO-RR 和 DBM 的脱色能力较强, 对 EBR 较差; 在本试验条件下, 要达到较高的脱色率, 一般需要反应 8-10h, 而在反应 4h 之内, 脱色率上升较快, 随后逐渐减慢。

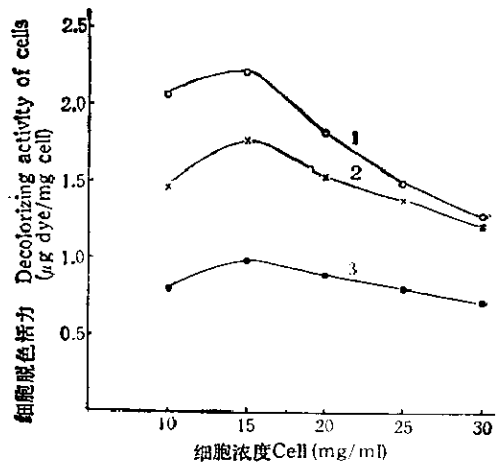


图1 细胞浓度对其偶氮染料脱色的影响
Fig. 1 The influence of cell concentration on the decolorization of azo dyes by intact cells
1. DBM; 2. DBO-RR; 3. EBR

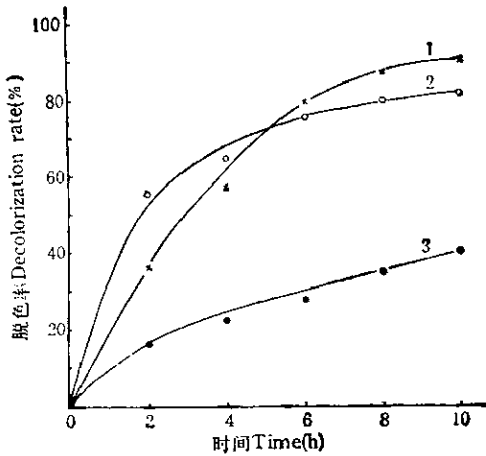


图2 S-42 菌株细胞悬液的脱色活性
Fig. 2 The decolorizing activity of intact cells of S-42

1. DBO-RR; 2. DBM; 3. EBR

(二) 无细胞提取液的脱色

1. 氧和 NADH 对脱色的影响: 为了进一步试验粗酶液(即无细胞提取液)的脱

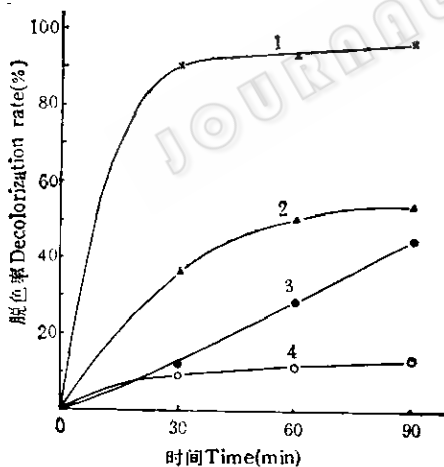


图3 氧和 NADH 对无细胞提取液的 DBO-RR 脱色反应的影响

Fig. 3 The influences of oxygen and NADH on the decolorizing reaction of DBO-RR by cell-free extract

1. 通氮, 加 NADH Gassed with nitrogen, NADH;
2. 不通氮, 加 NADH No gassed with nitrogen, NADH;
3. 通氮, 不加 NADH Gassed with nitrogen, no NADH;
4. 不通氮, 不加 NADH No gassed with nitrogen, no NADH

色能力, 采用 DBO-RR 作为试验染料, S-42 菌株的无细胞提取液的脱色条件与完整细胞的相似, 在此条件下测定了脱色时对氧和 NADH 的要求, 本试验以通氮作为厌氧反应, 不通氮作为好氧反应, 以及加与不加 NADH 四种条件下, 用完整细胞和无细胞提取液进行了脱色反应的比较, 结果发现, 氧和 NADH 对完整细胞的脱色没有影响, 推测完整细胞为多酶体系, 可解除氧对脱色的抑制作用; 此外细胞本身亦能提供 NADH, 无需外加。然而, 氧和 NADH 对无细胞提取液的脱色作用有很大的影响(图 3)。氧对无细胞提取液的脱色表现出明显的抑制作用, NADH 则表现为促进作用, 本结果与 Kulla 等人^[3]所报道的偶氮还原酶性质相符, 表明无细胞提取液中脱除 DBO-RR 的酶可能属于偶氮还原酶。

2. 无细胞提取液的脱色活性: 在最适条件下, 染料反应浓度为 50ppm, 用无细胞提取液对 DBO-RR 进行脱色反应, 测定不同反应时间的脱色率和脱色比活, 图 4 表明反应 15min 以前, 脱色率以直线上

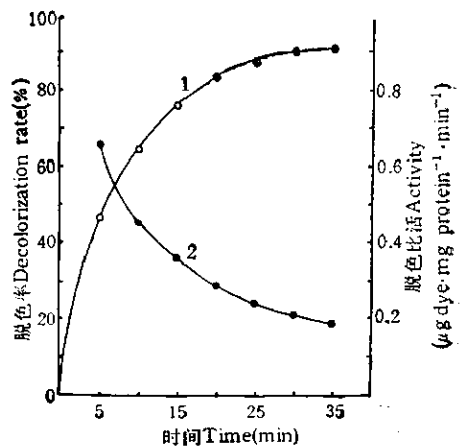


图4 无细胞提取液对 DBO-RR 的脱色
Fig. 4 The decolorization of DBO-RR by cell-free extract

1. 脱色率 Decolorization rate(%);
2. 比活 Specific activity

升,随着反应时间的延长,脱色速度逐渐缓慢。25min 后趋于平衡状态。脱色活性从 5min 时的 $0.65 \mu\text{g} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 下降到 35min 时的 $0.18 \mu\text{g} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

(三) 脱色酶的纯化与特性

1. 取无细胞提取液(粗酶液),以硫酸铵分步沉淀, DEAE-cellulose 柱层析

($2.6 \times 35\text{cm}$) 以 240ml、pH4.5、0.2mol/L 的乙酸缓冲液预洗后,以相同缓冲液中 0—1mol/L 氯化钠梯度洗脱 (0.4ml/min, 4ml/管收集), Sephadex G-200 柱层析 ($1.6 \times 100\text{cm}$), 用无离子水以 0.4ml/min 的速度洗脱 (4ml/管收集), 它们的蛋白吸收图谱如图 5 和图 6。分别测定各蛋白吸收峰

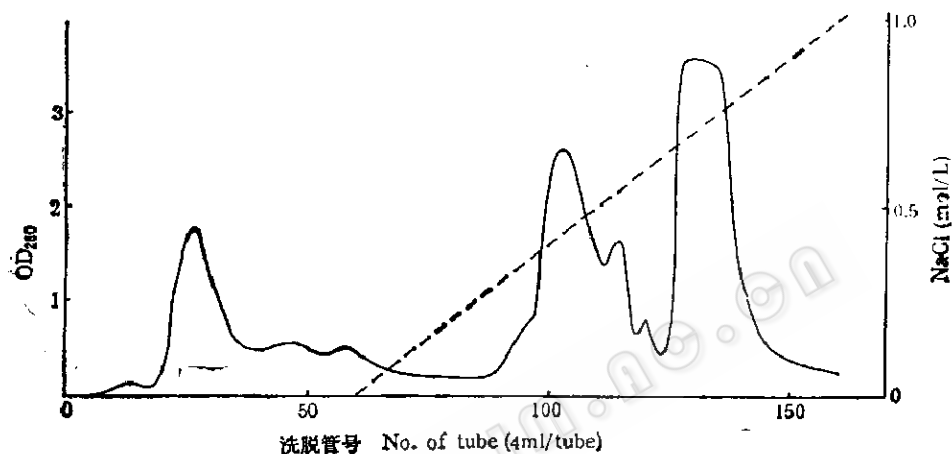


图 5 DBO-RR 脱色酶的 DEAE-纤维素柱层析的图谱
(活性主要出现在第 114—117 管)

Fig. 5 Column chromatography on DEAE-cellulose of DBO-RR decolorizing activity (activity mainly contained in tubes 114—117)

的脱色酶活性,则经 DEAE-cellulose 柱层析纯化后,其活性主要出现在第 114—117 管,而经 Sephadex G-200 柱层析纯化后,活性主要出现在第 40—47 管。从图 7 可见,纯化之后的脱色酶,经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳只有一条带,表明它是纯酶。另外,从表 4 可见,经过上述步骤纯化后,酶提纯了 27.6 倍,得率为 8%。与 Zimmermann 等人^[4]所报道的橙黄 II 偶氮还原酶相近。

2. DBO-RR 脱色酶的最适 pH 和最适温度: 在一定 pH 范围和温度范围内,外加 NADH 和通氮条件下,以稀释 10 倍的酶液对浓度为 50ppm 的 DBO-RR 进行脱色反应。结果表明, DBO-RR 脱色酶在偏酸性条件下,比在偏碱性条件下有较高

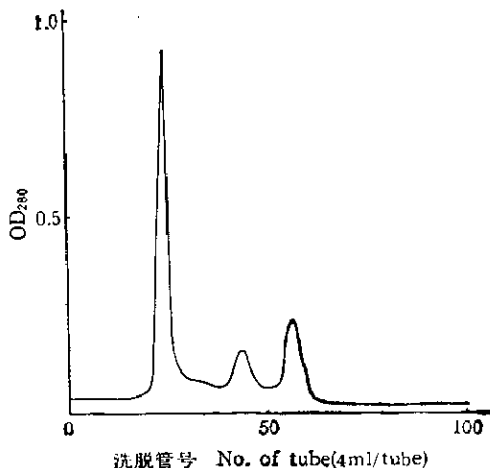


图 6 DBO-RR 脱色酶的葡聚糖凝胶柱层析
(活性主要出现在 40—47 管)

Fig. 6 Gel filtration on Sephadex G-200 of DBO-RR decolorizing activity (activity mainly contained in tubes 40—47)

表 4 DBO-RR 脱色酶的纯化
Table 4 The purification of DBO-RR decolorizase

纯化步骤 Purification step	总蛋白 (mg) Total pr.	比活 (1/mg) Specific activity	得率 (%) Yield	纯化倍数 Purification fold
无细胞提取液 Cell-free extract	12,000	0.51	100	1
硫酸沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ (25—45W/V)	6,240	0.94	95.5	1.84
DEAE-cellulose	320	2.34	12.2	4.59
Sephadex G-200	35	14.07	8.0	27.6

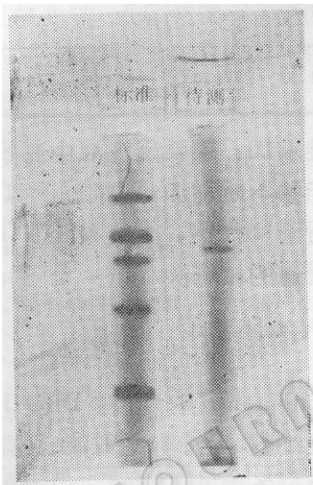


图 7 DBO-RR 偶氮还原酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
Fig. 7 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of DBO-RR azoreductase

的活性,最适 pH 为 7.0,符合文献报道^{[4][43]}的其它偶氮还原酶的特性;该酶的最适温度为 37℃。

3. DBO-RR 脱色酶的反应速度和 K_m 值的测定: 在标准条件下,以 DBO-RR 为底物使其最终浓度分别为 16.5、33.0、58.0、83.0 $\mu\text{mol/L}$, 分别测定酶活力,按 $[S]/v$ 对 $[S]$ 法作图(图 8),求得此酶作用 DBO-RR 的米氏常数 K_m 值为 54 $\mu\text{mol/L}$, 最大反应速度 V_{max} 为 13 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,表明 DBO-RR 是该酶的良好底物。依据以上试验,假单胞菌 S-42 菌株对

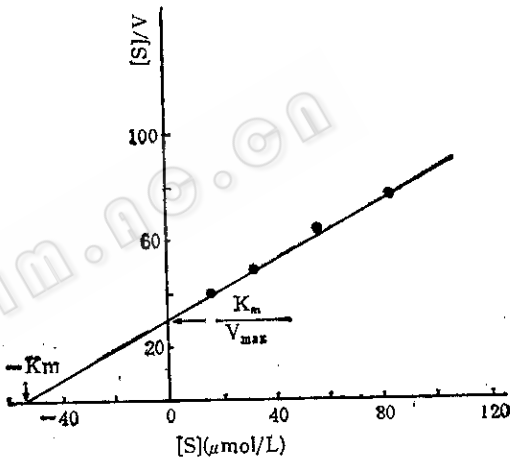


图 8 $[S]/v$ 对 $[S]$ 作图
Fig. 8 The $[S]/v$ to $[S]$ plot for DBO-RR azoreductase

DBO-RR 的脱色酶可以称为 DBO-RR 偶氮还原酶。

4. DBO-RR 偶氮还原酶分子量的测定: 纯酶的分子量按 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定(图 7),各种标准蛋白和待测样品的分子量与相对迁移率(m_R)列于表 5,经计算 DBO-RR 偶氮还原酶的分子量为 34000 $\pm$ 2000,与 Zimmermann 等人^[4]所报道的橙黄 II 偶氮还原酶的分子量相近。

(四) DBO-RR 降解产物的检测

将完整细胞和 DBO-RR 反应物离心,取上清液,以联苯胺为对照进行亚硝酸钠

表5 标准蛋白和待测样品的分子量及迁移率

Table 5 The molecular weight and relative mobility of standard proteins and unknown sample

蛋白样品 Protein	分子量 Molecular weight	lgMW	迁移率 (m _R) Relative mobility
溶菌酶 Lysozyme	14,300	4.16	
胰蛋白酶原 Trypsinogen	24,000	4.38	0.57
胃蛋白酶 Pepsin	34,700	4.54	0.43
卵清蛋白 Albumin, egg	45,000	4.64	0.32
牛血清蛋白 Albumin, bovine	66,000	4.82	0.18
未知样品 Unknown sample	34,000±2,000	4.53	0.44

反应试验, 未经细胞反应的 DBO-RR 形成黄色沉淀, 经过反应的样品, 和联苯胺一样, 形成了芳香伯胺所特有的橙红色沉淀, 说明 DBO-RR 经过细胞反应后, 偶氮双键还原裂解, 形成芳香伯胺类产物。此外, 用正丁醇抽提 DBO-RR 反应混合物, 测定其吸收光谱(图 9), DBO-RR 细胞反应物正丁醇相的吸收光谱, 随着反应的进行, 可见光部分的吸收不断下降, 而紫外部分的

吸收不继增加, 说明反应液中底物不断被消耗, 产物不断增加, 即细胞对 DBO-RR 不断进行降解代谢, 其结果与 Yatome 等人^[11]所报道的相符。

讨 论

Pseudomonas S-42 对 DBO-RR 的脱色, 完整细胞、无细胞提取液、纯化的脱色酶三者反应条件基本相同, 但对氧的敏感性不同, 氧可以抑制无细胞提取液和纯酶的活性, 但是对完整细胞影响不大。NADH 对无细胞提取液和纯酶的脱色活性有很大的促进作用。酶的最大反应速度和米氏常数, 都与文献报道的橙黄 II 偶氮还原酶相似^[14]。可以确定为 DBO-RR 偶氮还原酶。

根据芳香伯胺与亚硝酸钠反应物, 在 β -萘酚中形成橙红色沉淀, 细胞反应物正丁醇抽提物的吸收光谱, 可以推测假单胞菌 S-42 对 DBO-RR 的降解在有 NADH 或 NADPH 存在的条件下, 由偶氮还原酶催化偶氮双键的还原裂解而开始, 形成芳香伯胺类化合物, 在厌氧条件下该染料的降解并不彻底; 如果要得到完全的矿化作用, 必须由细胞中的其他酶类, 或是由其他

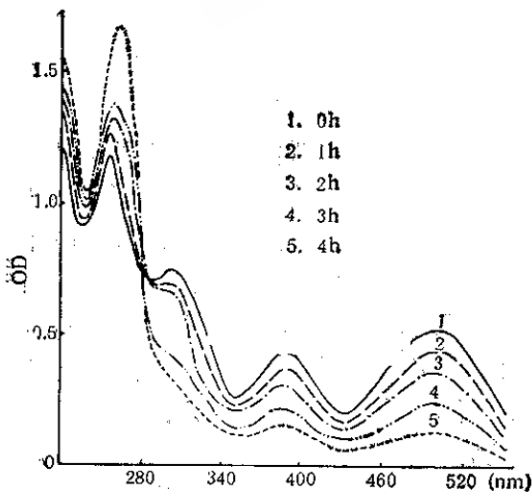
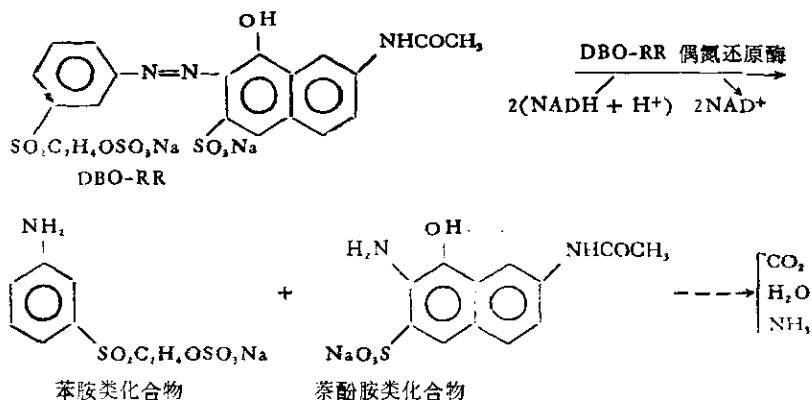


图9 正丁醇抽提物的吸收图谱

Fig. 9 UV-spectra of the reaction products of DBO-RR in n-butanol



菌在好氧条件下把芳香伯胺氧化开环,直至形成二氧化碳、水和氨等无机物,由此,假单胞菌 S-42 降解 DBO-RR 的代谢途径假设如上。

参 考 文 献

- [1] Meyer, U.: Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds (Ed. Leisinger, T. et al.), Academic Press Inc., London, 371—386, 1983.
- [2] Roson, J. J. et al.: *Food Cosmet. Toxicol.*, 4: 419—425, 1966.
- [3] Kulla, H. G. et al.: *Arch. Microbiol.*, 135: 1—7, 1983.
- [4] Zimmermann, T. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 129: 197—203, 1982.
- [5] Meyer, U. et al.: *Textilveredlung*, 14: 15—20, 1977.
- [6] 贵州省环境保护研究所微生物组: 环境科学, 2(4): 10—14, 1981。
- [7] 韩树琴等: 环境科学学报, 8(1): 93—97, 1988。
- [8] Yang Huifang et al.: proceeding of 1987 International Symposium on Small Systems for Water Supply and Water Disposal.
- [9] Walker, R. et al.: *Xenobiotics*, 1: 221—229, 1971.
- [10] 周科衍等编: 有机化学实验, 高等教育出版社, 第二版, 北京, p. 248—249, 1984。
- [11] Yatome C. et al.: *Journal of the Society of Azo Dyes and Colourists*, 97: 166—169, 1981.
- [12] 张龙翔等编: 生化实验方法和技术, 人民教育出版社, 北京, p. 112—118, 1981。
- [13] Wahrmann, K. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biochem.*, 9: 325—338, 1980.
- [14] Kulla, H. G. et al.: *Arch. Microbiol.*, 138: 37—43, 1981.

THE DECOLORIZATION AND BIODEGRADING METABOLISM OF AZO DYES BY *PSEUDOMONAS* S-42

Liu Zhipei Yang Huifang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Pseudomonas S-42 was capable of decolorizing azo dyes such as Diamira Brilliant Orange RR (DBO-RR), Direct Brown M (DBM), Eriochrome Brown R (EBR) and so on. The cell suspension, cell-free extract and purified enzyme of *Pseud.* S-42 could decolorize azo dyes under similar conditions: the optimum pH and temperature laid 7.0 and 37°C respectively. The efficiencies of decolorizing of DBO-RR, DBM, EBR by intact cells stood more than 90%. When the cell concentration was 15 mg(wet)/ml and the reaction time was 5 hours, the decolorizing activity for above three azo dyes by intact cells were 1.75, 2.4, 0.95 $\mu\text{g dye/mg cell}$, respectively. Cell-free extract and purified enzyme could well express the decolorizing activity only under the anaerobic condition and added NADH. Puri-

fied enzyme belongs to azoreductase, its molecular weight is about 34000—2000 daltons, and its $V_{\max}$ and K_m for DBO-RR are 13 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and 54 $\mu\text{mol/L}$. The results of the detection of the biodegrading products of DBO-RR by spectrophotometric and NaNO_2 reactional methods showed that the biodegradation of azo dyes was initiated by the reduction cleavage of azo bonds. It was hypothesized that biodegrading metabolism pathway of DBO-RR by *Pseudomonas* S-42.

Key words

Pseudomonas S-42; Decolorization and biodegradation of azo dyes; Azoreductase