

## 专论与综述



## 微生物亚硝酸盐还原酶的研究进展

张庆芳<sup>Δ1,2</sup> 李美玉<sup>Δ1,2</sup> 王晓辉<sup>1,2</sup> 胡善松<sup>1,2</sup> 于爽<sup>1,2</sup> 迟乃玉<sup>\*1,2</sup>

1 大连大学生命科学与技术学院 辽宁 大连 116622

2 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心 辽宁 大连 116622

**摘要:** 亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase, 简称 NiR, EC1.7.2.1)是催化亚硝酸盐(Nitrite, 简称 NIT)还原的一类酶, 可降解 NIT 为 NO 或 NH<sub>3</sub>, 是自然界氮循环过程的关键酶。本文详细阐述亚硝酸盐还原酶的分类、结构特点、催化机制以及现阶段的应用领域, 为深入研究亚硝酸还原酶提供参考。

**关键词:** 亚硝酸盐, 亚硝酸盐还原酶, 结构域, 作用机制

## Research progress of microbial nitrite reductase

ZHANG Qing-Fang<sup>Δ1,2</sup> LI Mei-Yu<sup>Δ1,2</sup> WANG Xiao-Hui<sup>1,2</sup> HU Shan-Song<sup>1,2</sup>  
YU Shuang<sup>1,2</sup> CHI Nai-Yu<sup>\*1,2</sup>

1 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China

2 Liaoning Technology of Marine Microbiological Engineering Research Center, Dalian, Liaoning 116622, China

**Abstract:** Nitrite reductase (NiR, EC1.7.2.1) is a kind of enzyme that catalyzes the reduction of nitrite (NIT). NiR is a key enzyme in the natural nitrogen cycle, which can degrade nitrite into NO or NH<sub>3</sub>. The classification, structural characteristics, catalytic mechanism and current application fields of nitrite reductase are reviewed in this report, which provides reference for further study of nitrite reductase.

**Keywords:** Nitrite, Nitrite reductase, Domain, Mechanism

氮(N)是生物圈中非常重要的元素, 通过 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>之间的转换, 氮元素参与了多种化合物的合成和分解, 即氮的生物地球化学循环(图 1), 该循环涉及大量的氧化还原反应。其中反硝化作用是将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>转换为 N<sub>2</sub> 或者 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的反应, 亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase, 简称 NiR, EC1.7.2.1)是该过

程中的关键酶<sup>[1]</sup>。

亚硝酸盐还原酶将 NIT 降解为 N<sub>2</sub> 或 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 减少了亚硝态氮在环境中的积累。在植物细胞内, 亚硝酸盐还原酶位于叶绿体或非绿色组织的质体中, 存在于竹子、水稻等高等植物中的 NiR 可以促进植物再生, 提高愈伤组织的愈伤率<sup>[2]</sup>。铜绿微囊藻、

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2018YFC0311100); National Natural Science Foundation of China (31500039); Natural Science Foundation of Liaoning Province (20170520167, 20180550728); Dalian Youth Science and Technology Star Project (2017RQ155)

ΔThese authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: E-mail: zqf7566@126.com

Received: 17-11-2018; Accepted: 08-03-2019; Published online: 28-03-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC0311100); 国家自然科学基金(31500039); 辽宁省自然科学基金(20170520167, 20180550728); 大连市支持高层次人才创新创业项目(2017RQ155)

Δ对本文贡献相同

\*通信作者: E-mail: zqf7566@126.com

收稿日期: 2018-11-17; 接受日期: 2019-03-08; 网络首发日期: 2019-03-28

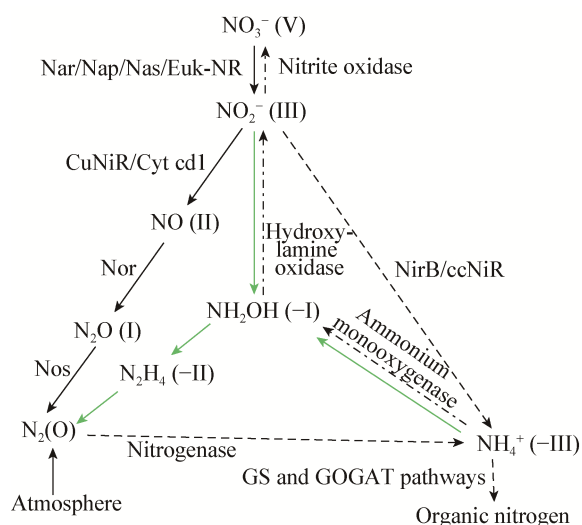


图1 氮的生物地球化学循环  
Figure 1 Nitrogen biogeochemical cycle

水华蓝藻、杜氏盐藻等<sup>[3]</sup>藻类细胞内存在的亚硝酸盐还原酶,可以保护其生长不受 NIT 的抑制。在微生物中,蜡状芽孢杆菌、胃幽门螺杆菌、铜绿假单胞菌中均发现了 NiR,含有 NiR 的反硝化细菌能降解环境中的 NIT,可用于污水处理<sup>[4-6]</sup>。植物乳杆菌、乳链球菌、嗜热乳链球菌、干酪乳杆菌、短乳杆菌等食品中含有的乳酸菌也含有较高的 NiR<sup>[7-12]</sup>。为深入研究其作用机制,进一步开拓应用领域,本文对亚硝酸盐还原酶的分类、结构特点、催化机制以及现阶段的应用领域进行综述。

## 1 亚硝酸盐还原酶的分类与结构特点

按照反应物和辅助因子的不同,亚硝酸盐还原

酶分为铜型亚硝酸盐还原酶(CuNiRs)、细胞色素 cd1 型亚硝酸盐还原酶(cd1NiRs)、多聚血红素 c 亚硝酸盐还原酶(ccNiRs)和铁氧化还原蛋白依赖的亚硝酸盐还原酶(FdNiRs)<sup>[1]</sup>等类型。

### 1.1 铜型亚硝酸盐还原酶(CuNiRs)

Gao 等<sup>[13]</sup>从 *Bacillus firmus* GY-49 中分离出铜型亚硝酸盐还原酶(CuNiRs)。CuNiRs (图 2A)是由 3 个相同亚基组成的三聚体蛋白,每个单体都包含两种类型的铜原子活性中心<sup>[14]</sup>,即提供电子的 T1Cu 中心和起催化作用的 T2Cu 中心<sup>[15]</sup>(图 2B)。在 T1Cu 位置,Cu 由 2 个 His、1 个 Cys 和轴向 Met 配位形成四面体几何形状。Cu(II)和 Cu(I)态之间的 T1Cu 位点的结构变化很小。

尽管 CuNiRs 具有相同的配体残基,但是作为 CuNiRs 的主要发色团,T1Cu 位点影响 CuNiRs 的颜色,已发现存在蓝色、绿色、红色和紫色<sup>[16-17]</sup>。研究者通过比较蓝色和绿色 CuNiRs 的结构并结合第一和第二配位脱落残基的诱变结果,获得了 T1Cu 几何形态、颜色和氧化还原电位之间的关系,结果显示蓝色 CuNiRs 通常表现出长的、弱的 Cu-Met 键,约 2.9 Å,而在绿色 CuNiRs 中,该键较短,约为 2.0 Å。

Solomon<sup>[16]</sup>研究表明,CuNiRs 存在两种光谱形式,这两种光谱形式之间的转变显著依赖于温度。在低温条件下,较强的 Met-Cu 相互作用使绿色形式占优势;在高温条件下,较弱的 Cu-Met 相互作用使蓝色形式占优势。此外,T1Cu 的几何形

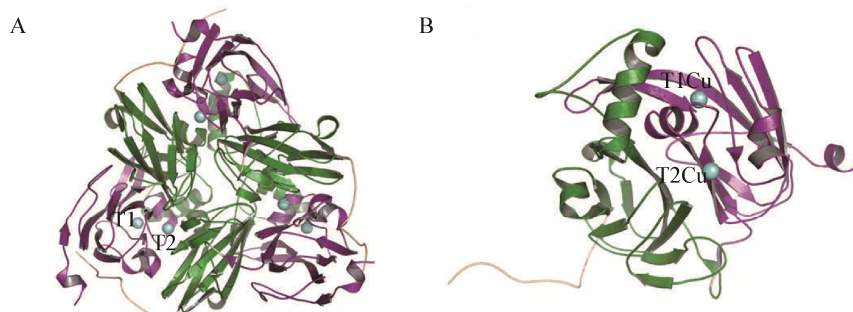


图2 CuNiRs 的结构域和寡聚结构<sup>[14-15]</sup>

Figure 2 Domain and oligomeric structure of CuNiRs<sup>[14-15]</sup>

注: A: 双结构域蛋白形成三聚寡聚物; B: 每个单体存在 2 个铜氧还蛋白结构域(绿色和紫色)。

Note: A: Double domain proteins form trimerized oligomers; B: Two cupredoxin domains (green and purple) per monomer.

态、颜色和氧化还原电位受到配体残基突变的显著影响,并进一步对酶活性产生影响。

催化性的 T2Cu 与 T1Cu 之间的键长约 12.6 Å,其中心由 T1Cu 配体中的 Cys 和 T2Cu 配体中的 His 组成的 Cys-His 桥连接(用于电子快速传递)<sup>[15]</sup>。T2Cu 在静息状态呈(His)<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O 四面体几何结构(图 3),这 3 个 His 配体中的一个由 CuNiRs 三聚体的相邻单体提供。在还原过程中(在没有底物的情况下),T2Cu 失去配位的 H<sub>2</sub>O,变成 Cu-(His)<sub>3</sub><sup>[18]</sup>。T2Cu 配体结合区含有几个保守的残基,具有与底物通路、特异性、活性、电子转移和质子转移相关的功能性作用<sup>[19]</sup>。结构研究显示位于 T2Cu 结合位点上方的异亮氨酸(Ile<sub>CAT</sub>)残基影响底物取向并以此影响催化活性<sup>[20]</sup>。

## 1.2 细胞色素 cd1 型亚硝酸盐还原酶(cd1NiRs)

Radoul 等<sup>[21]</sup>从 *Pseudomonas aeruginosa* 中分离出细胞色素 cd1 型亚硝酸盐还原酶(cd1NiRs)。cd1NiRs (图 4)是可溶的同株异核生殖蛋白,能够催化 NO<sub>2</sub> 生成 NO,包含 2 个亚基(60 kD)的二聚体,每个亚基都含有一个 Hd1 和一个共价的 Hc, Hc 有两个轴向的 His 配体(His-17, His-69), His-200 与 Tyr-25 将 Hd1 和 Hc 连接, Hd1 是单核的铁中心,是亚硝酸盐还原的活性中心。Hd1 和 Hc 分别位于单独结构域中,需要电子的移动来完成催化反应<sup>[22-23]</sup>。

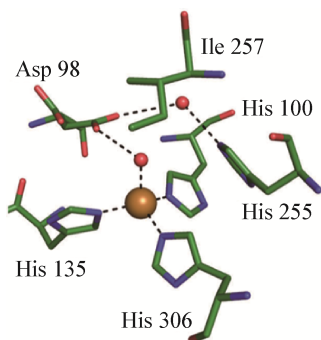


图 3 静息态 CuNiRs 中 T2Cu 的结构<sup>[15]</sup>

Figure 3 Structure of T2Cu in the resting state CuNiRs<sup>[15]</sup>

注:水分子与 T2Cu 结合。

Note: Water molecules combined with T2Cu.

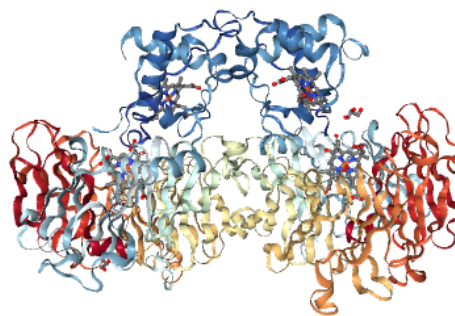


图 4 cd1NiRs 的三维结构<sup>[21]</sup>

Figure 4 Ribbon representation of the three-dimensional structure of cd1NiRs<sup>[21]</sup>

注:上半部分为 Hc, 下半部分为 Hd1.

Note: The upper half is Hc and the lower half is Hd1.

含有 cd1NiRs 的菌株可利用 O<sub>2</sub> 或 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>等化合物进行呼吸。cd1NiRs 是位于细胞周质的双催化酶,其反应过程为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+2H<sup>+</sup>+e<sup>-</sup>→NO+H<sub>2</sub>O (1), O<sub>2</sub>+4H<sup>+</sup>+4e<sup>-</sup>→2H<sub>2</sub>O (2), 因此, cd1NiR 也被称为细胞色素氧化酶。cd1NiRs 和 CuNiRs 都能够降解 NIT, 这两类 NiR 的重要区别是 CuNiRs 不能催化反应(2)。

此外, 研究显示亚硝酸盐还原酶 CuNiRs 和 cd1NiRs 在同一菌株中不会同时出现<sup>[24]</sup>。虽然这两种蛋白的结构完全不同, 但功能作用相同<sup>[25-26]</sup>。cd1NiRs 在细菌中的分布较 CuNiRs 广泛, CuNiRs 催化完成 30%已发现的反硝化反应。在已知的菌株中, 含有 CuNiRs 的菌株占大多数, 但研究显示富氧土地来源的反硝化菌株普遍含有 cd1NiRs, 但不排除更多含有 CuNiRs 的细菌尚未发现, 或已发现的细菌中所含有的 NiR 的类型未被鉴定为 CuNiRs<sup>[21]</sup>。

## 1.3 ccNiRs 蛋白

Stein 等<sup>[27]</sup>研究了 *Shewanella oneidensis* 中的 ccNiRs。ccNiRs 蛋白通常是个双亚基复合体, 由 NrfA 和 NrfH 两个亚基组成(61 kD 和 19 kD), 分别由 *nrfA* 和 *nrfH* 基因编码, 其中包含多个细胞色素 c<sup>[27]</sup>。ccNiRs 通过转移 6 个电子将亚硝酸盐转化为氨, ccNiRs 也可以还原 NO 和 NH<sub>2</sub>OH<sup>[28]</sup>。从普通脱硫弧菌 (*Desulfovibrio vulgaris*) 分离获得的 ccNiR (NrfA4NrfH2) 显示, 每个 NrfH 都与一个 NrfA

二聚体相互作用(图 5)。ccNiRs 中, NrfH 位于外周胞质上, 含有 4 个血红素, 其疏水结构域与细胞膜锚定, 具有传递细胞膜上电子的能力。NrfA 作为催化中心, 氨基酸序列分析显示, NrfA 含有 5 个血红素, 3 个位于可溶结构域, 1 个位于疏水结构域<sup>[29]</sup>。

#### 1.4 铁氧化还原蛋白依赖的亚硝酸还原酶(FdNiRs)

Hirasawa 等<sup>[30]</sup>从 *Chlamydomonas reinhardtii* 中分离铁氧化还原蛋白依赖的亚硝酸还原酶(FdNiRs)。FdNiRs 主要存在于藻类和蓝细菌等光合微生物中, 是由 3 个结构域组成的球状蛋白, 3 个结构域中间包含 Fe-S 簇(4Fe-4S)和 Siroheme 两个辅基(图 6)<sup>[31]</sup>。FdNiRs 是一条存在于光合组织中的多肽链(60–65 kD), 能够通过转移 6 个电子将 NIT 还原为氨。铁氧化还原蛋白作为电子供体, 将电子转移到 Siroheme 部位。Siroheme 与亚硝酸根离子结合并将其还原为氨, 其催化过程如下:  $\text{NiR-NO}_2^- \rightarrow \text{NiR-NO} \rightarrow \text{NiR-NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NiR-NH}_4^+$ 。

研究显示以上 4 种类型的亚硝酸还原酶在结构和氧还原中心存在巨大差异, 但都具有催化亚硝酸还原反应的能力<sup>[30,32]</sup>, 但是目前尚未发现以上 4 种类型的亚硝酸盐还原酶同时存在于同一个微生物体内<sup>[32]</sup>。大部分的亚硝酸盐还原酶存在于革兰氏阴性菌中, 定位于细胞的周质空间; 少数来自于革兰氏阳性菌<sup>[33]</sup>, 具有较强的膜吸附能力。

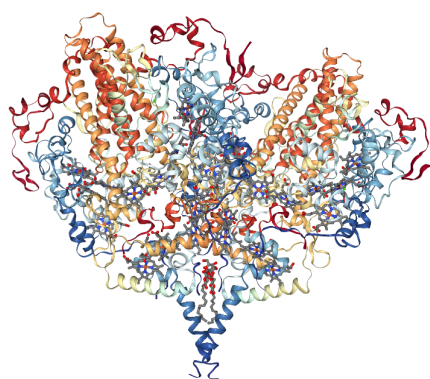


图 5 脱硫弧菌中的 ccNiR 结构<sup>[29]</sup>

Figure 5 The cytochrome c nitrite reductase in *Desulfovibrio vulgaris*<sup>[29]</sup>

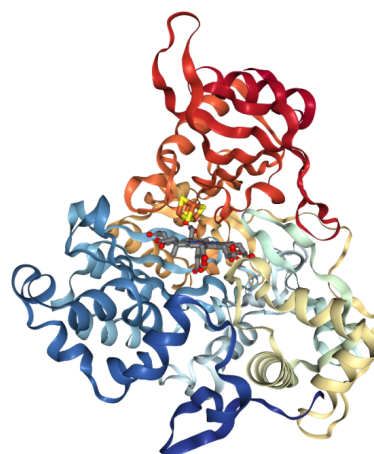


图 6 菠菜铁氧还原蛋白和 NiR 复合体结构图<sup>[31]</sup>

Figure 6 A model of the complex between ferredoxin and NiR of spinach<sup>[31]</sup>

## 2 亚硝酸盐还原酶的作用机制

目前, 铜型亚硝酸盐还原酶催化机制研究最为透彻, 研究显示: CuNiRs 还原  $\text{NO}_2^-$  的步骤包括  $\text{NO}_2^-$  与酶的结合、还原反应、结合的中间产物脱水以及 NO 的释放和酶的重新形成。其中,  $\text{NO}_2^-$  与氧化形式的 T2Cu 中心结合而替换一个可溶性分子, 并在 Asp98 残基和  $\text{NO}_2^-$  的一个氧原子间形成氢键。当电子从 T1Cu 传递到 T2Cu 后, 该氢键的质子从 Asp98 残基转移到底物的氧原子上形成中间产物  $\text{O=N-O-H}$ , 该氧原子的 N-O 键随后断裂并形成产物 NO 在活性中心被释放<sup>[34]</sup>。

Antonyuk 等<sup>[35]</sup>研究了 CuNiRs 的结构, 发现邻近单体残基形成一个底物进入的可能路径, 是 6 Å 宽的疏水性通道。Ellis 等<sup>[36]</sup>发现 Asp 残基与底物识别有关, 是 CuNiRs 中 T2Cu 的关键残基; Leu106 和 Ala137 多个残基与 Asp98 共同作用来引导底物。晶体结构数据显示 Asp98 残基具有产物形成/释放和底物引导的多个功能。当底物靠近位点时, 部分残基的构象变化引导其进入 T2Cu 位点(图 7)<sup>[15]</sup>。这说明在  $\text{NO}_2^-$  与 NiRs 相结合的过程中, NiRs 结构中的一些关键残基起到对底物的识别作用。

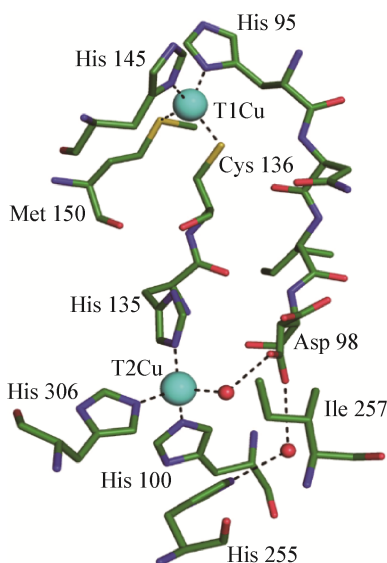


图 7 CuNiR 中 T1Cu 和 T2Cu 中心与它们之间蛋白质的联系<sup>[15]</sup>

Figure 7 The relationship between T1Cu and T2Cu centers in CuNiR and their proteins<sup>[15]</sup>

### 3 亚硝酸盐还原酶基因的克隆表达

通常野生菌株 NiR 产量较低,发酵时伴随其他酶的分泌,增加了 NiR 的分离纯化难度,对 NiR 产业化造成了严重影响。随着分子生物学技术的发展,基因克隆和表达成为提高 NiR 产量的重要措施。目前,多种微生物来源的 NiR 被克隆,并在大肠杆菌(*E. coli* BL21)和毕赤酵母(*P. pastoris*)等宿主中表达。

2011 年,陈燕红等<sup>[37]</sup>根据沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris* 2-8)中的亚硝酸盐还原酶基因(*nir*)序列,通过 PCR 扩增的方法对 2-8 菌株的亚硝酸盐还原酶基因进行鉴定,发现该菌株的亚硝酸盐还原酶为 Cu 型亚硝酸盐还原酶。2016 年,袁会兰等<sup>[38]</sup>将中华根瘤菌 NP1 (*Sinorhizobium* sp. NP1)的 *nir* 基因克隆表达于 *E. coli* BL21。2018 年,陈思敏等<sup>[39]</sup>将蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* LJ01)的 *nir* 基因成功表达于 *E. coli* BL21。2017 年,本实验室魏计东等<sup>[6]</sup>将木糖氧化产碱菌(*Achromobacter xylosoxidans* DL-1)的 *nir* 基因与 pET-22b 载体连接,转化至 *E. coli* BL21 并成功表达。*E. coli* 表达系统

具有成本低、繁殖快、表达量高、遗传背景清楚以及有大量可利用宿主、表达载体和纯化系统等优点,是目前应用最广的表达体系<sup>[40]</sup>。目前,国内外研究中以真菌作为 *nir* 基因的表达宿主鲜有报道。2016 年,张薇薇<sup>[41]</sup>首次将大型真菌美味牛肝菌的 *nir* 基因克隆表达至毕赤酵母菌株 GS115 感受态细胞,但表达不佳,无法获得目的蛋白,可能是该蛋白并没有表达分泌至培养基中。

### 4 亚硝酸还原酶的酶学特性

徐龙等<sup>[42]</sup>研究微球菌中的 NiR 活性,发现 NiR 活性受 pH 影响, pH<5.0 使酶活性急剧下降。Ellis 等<sup>[36]</sup>从无色杆菌(*Achromobacter guttatus*)中分离获得 NiR,该酶最适反应条件为 30–40 °C 和 pH 7.4,还原型 FAD 和 NADP 可以增加其酶活性。Kakutani 等<sup>[43]</sup>从红假单胞菌(*Rhodopseudomonas sphaeroides*)中分离出 NiR,其最适温度为 30 °C,最适 pH 为 7.0, NIT 耐受力为 51 μmol/L;该酶被甲碘酸盐活化,被二乙基二硫氨基甲酸酯、氰化钾和 CO 抑制。2011 年,陈燕红等<sup>[37]</sup>从沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris* 2-8)中扩增 *nir* 基因,获得重组 NiR,研究表明该菌株的亚硝酸盐还原酶为 Cu 型亚硝酸盐还原酶,分子量为 40.2 kD,等电点 pI 为 6.2。2016 年,袁会兰等<sup>[38]</sup>从中华根瘤菌 NP1 (*Sinorhizobium* sp. NP1)中获得 NiR,大小约为 40 kD,酶活力约为 247.15 U/mL,最适 pH 6.5,最适反应温度 37 °C,该酶对 NaCl 的耐受性为 0.3 mol/L。2018 年,陈思敏等<sup>[39]</sup>从蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* LJ01)分离纯化出 NiR,其分子量约为 60 kD,该酶中同时存在铁离子和铜离子,且含量分别为 51.0 mg/kg 和 184.5 mg/kg。2017 年,本实验室魏计东等<sup>[6]</sup>从木糖氧化产碱菌(*Achromobacter xylosoxidans* DL-1)中扩增并表达纯化了 NiR,测定其理论分子质量约为 38.924 kD,等电点 pI 为 4.83,酶活检测显示比活力为 123.82 U/mg。

研究表明, NiR 在环境中存在 NIT 的情况下能被诱导生成,因此是一种诱导酶。2002 年 Fedtke

等<sup>[44]</sup>通过研究肉糖葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)中 NIT 还原系统的分子特性表明, NIT 和厌氧是 NiR 的诱导因素, 尽管检测到其转录过程, 但在好氧条件下, 即使存在 NIT, NiR 也无活性, 这表明在转录时有氧控制步骤, 可能是由于好氧呼吸链竞争夺取了电子, 进而抑制了其表达。此外, 2007 年 Vigliotta 等<sup>[45]</sup>研究发现, 一种酵母 *Debaryomyces hansenii* TOB-Y7 能够在微需氧条件下, 在 NIT 作为唯一氮源的纯化学合成培养基中发酵产酶, 而添加电子传递体 NAD(P)H 有助于 NiR 的产生, 而且除诱导物外, NiR 的合成还取决于细胞内的电子供体和细菌所处的环境。因此, 诱导酶的合成取决于内部和外部两个因素。

## 5 微生物 NiR 的应用

### 5.1 微生物 NiR 在食品中的应用

#### 5.1.1 微生物 NiR 在肉制品中的应用

中国传统饮食中, 腌肉、腊肉和香肠等肉制品广受喜爱。在肉制品制作过程中, 人们常会添加一定量的 NIT, 可以作为抑菌剂, 也可以改善肉制品。魏计东等<sup>[6]</sup>从巨大芽孢杆菌中分离纯化得到亚硝酸盐还原酶, 在肉制品加工过程中加入后 NIT 的残留量降低了 70% 以上。2002 年 Ellis 等<sup>[36]</sup>研究在香肠加工中应用 NiR 降低 NIT 残留, 结果表明在煮熟香肠中加入 NiR, NIT 残留降低了 30%–40%。2009 年郑怀忠<sup>[46]</sup>通过紫外诱变、优化培养基条件提高了巨大芽孢杆菌 MPF-906 的产酶能力, 使其酶活力达到 45.94 U/mL, 将其应用在香肠生产中时, 与对照相比, NIT 含量降低了 82.50%。2010 年 Trofimov 等<sup>[47]</sup>从嗜盐碱硫氧化非氨化细菌(*Thioalkalivibrio nitratireducens*)中分离和提纯到高活性的 NiR, 该酶能催化减少羟胺和 NIT 生成氨, 而没有其他中间产物。亚硝酸盐还原酶在肉制品中的应用起源于 20 世纪 70 年代, 但至今相关的研究仅局限于 NIT 的降解, 缺少酶对肉制品的储存、质构、营养变化、色泽及安全性等方面的研究。

#### 5.1.2 微生物 NiR 在蔬菜发酵制品中的应用

蔬菜发酵制品是我国人民非常喜欢的传统食

品, 然而在蔬菜腌制发酵过程中, NIT 也随之生成, 在食品中添加微生物来源的 NiR 成为消除 NIT 危害的重要方式。张庆芳等<sup>[10]</sup>认为乳酸菌对  $\text{NO}_2^-$  的降解分为酸降解和酶降解 2 个时期, 培养基  $\text{pH}>4.5$  时, 主要为 NiR 降解  $\text{NO}_2^-$ ; 当  $\text{pH}<4.0$  后, 主要为  $\text{H}^+$  降解  $\text{NO}_2^-$ 。迟雪梅等<sup>[48]</sup>以产亚硝酸盐还原酶植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)等菌株进行接种发酵东北酸菜, 并与传统自然发酵酸菜对比发现, 接种发酵酸菜中 NIT 含量显著低于自然发酵酸菜。高世阳<sup>[49]</sup>在腌制榨菜过程中添加产 NiR 的乳酸菌, 使 NIT 峰值  $<0.3 \mu\text{g/mL}$ , 远低于对照组中  $1.6 \mu\text{g/mL}$ 。夏姣<sup>[50]</sup>在四川泡菜发酵过程中添加产 NiR 的乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、食蜜魏斯氏(*Weissella cibaria*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)等乳酸菌, 接种发酵中 NIT 降解率明显高于自然发酵。Luo 等<sup>[51]</sup>对自然发酵白菜和接种产 NiR *Enterococcus faecium* 的发酵白菜进行比较分析发现, 接种发酵的白菜发酵速度更快, 且发酵液中 NIT 一直保持较低含量。与自然发酵相比, 产 NiR 的 *Enterococcus faecium* 作为一株安全菌株, 可有效地控制病原和腐败微生物, 降低 NIT 浓度, 提高发酵蔬菜安全性。

### 5.2 微生物 NiR 在饲料、肥料中的应用

硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶在初级氮同化中起重要作用, 硝酸盐还原酶首先将硝酸盐降解为 NIT 后, NiR 将 NIT 降解为氨, 最终氨参与到蛋白质的合成反应中。因此 NiR 已作为生物肥料添加剂应用于农业生产。

蚕沙中丰富的养分使其具有饲料开发潜力, 但蚕食用桑树会使蚕沙中的 NIT 含量较高, 影响到饲料的饲喂安全性, 因此采用发酵处理方法降解蚕沙中的 NIT。发酵物料中的杂菌居多, 鲜蚕沙在发酵前期可能致使物料中的 NIT 含量上升。研究发现, 多种微生物(包括真菌、细菌)可由 NIT 诱导产生 NiR 再降解 NIT<sup>[52]</sup>。饲料中 NIT 的生物法降解是一种高效、安全的方法<sup>[53]</sup>。陈乐乐等<sup>[54]</sup>验证了微生物发酵产生的 NiR 可显著降低鲜蚕沙中的 NIT 含量。余光

辉<sup>[55]</sup>在蔬菜肥料中添加产 NiR 的微生物,降低土壤中 NIT 含量,从而降低 NIT 在蔬菜内的累积,同时减少地下水的氮污染。

### 5.3 微生物 NiR 在生物传感器中的应用

目前,氮肥的大量使用导致土壤和水体中的 NIT 含量超标,因此使用生物传感器测定环境中 NIT 含量,控制 NIT 摄入、预防 NIT 的潜在危害有着极其重要的理论和实践意义。

微生物 NiR 是在 NIT 生物传感装置中发挥生物识别作用的重要元素<sup>[56]</sup>。不同类型的微生物 NiR 已经在生物传感器中得到应用<sup>[57]</sup>。利用 NiR 来制作酶电极,可以有效地检测食品工业和临床诊断中的 NIT 含量。目前检测 NIT 含量采用的荧光分析法、高效液相法以及盐酸萘乙二胺法等方法具有时间长、检测成本高、灵敏度低等问题。NiR 传感器的原理即是以微生物 NiR 作为生物识别原件,NiR 催化产生的变化通过换能器以信号形式传输出来<sup>[58]</sup>。NiR 传感器具有反应的特异性,检测水和食品中的 NIT 时可以降低其他物质的影响,具有灵敏度高、检测时间短的特点。细菌来源的 NiR 制作酶传感器具有高选择性、活性和稳定的特点,在过去 15 年食品工业的 NIT 检测中取得了重大进展<sup>[59]</sup>。阎博<sup>[56]</sup>首次构建成功了一种基于有机-无机杂化材料的电流型亚硝酸还原酶电极,其工作电位为 $-0.68\text{ V}$ ,以甲基紫精为电子媒介体,具有较好的稳定性。毛燕等<sup>[60]</sup>将微生物 NiR 固定在聚吡咯(PPy)纳米复合物-碳纳米管(CNT)修饰的铂电极上,构建了 NiR 生物传感器,在 $+0.8\text{ V}$  检测电位下,检测 NIT 的线性范围为 $100\text{ nmol/L}$ – $1\text{ mmol/L}$ 。NiR 生物传感器被认为是环境健康的分析工具,受到了人们的关注,这也是未来的发展趋势。

### 5.4 微生物 NiR 在医学中的应用

陈浩<sup>[61]</sup>发现,人体内的线粒体、肌红蛋白和血红蛋白中的氧化酶可以将硝酸盐还原为 NIT,NiR 可以将 NIT 还原为 NO。适量的 NO 具有杀菌、防止线粒体损伤、调节血管舒张和增加组织血流量的作用,对心血管系统起保护作用<sup>[62]</sup>。NiR 降解对人

体有害的 NIT 的同时产生对人体有益的 NO,因此科学家认为食用食品级微生物来源 NiR 具有一定的益处。

许多研究发现,在人们参加极限运动时,NIT 的摄入可以明显减少肺对  $\text{O}_2$  的吸收,从而提高骨骼肌效率。这种现象很可能是因为硝酸盐在人体内代谢生成 NIT,经 NiR 降解产生 NO,因此微生物 NiR 在医学上有良好的应用前景。

## 6 展望

NIT 是一种重要的食品添加剂,但过量使用会对人体产生严重危害,研究可降解 NIT 的微生物亚硝酸盐还原酶,利用微生物降解食品及环境中的 NIT 具有广泛的应用前景。但亚硝酸盐还原酶工业化生产仍存在产量低、成本高等一系列问题。国内的研究仅局限于粗酶在肉制品中的应用效果研究,但 NiR 的纯化、固定化和晶体结构及其应用有待进一步深入研究。此外,对微生物亚硝酸盐还原酶作用机理的研究相对较少,如:(1) CuNiR 内部残基间以及与 2 个铜活性中心的电子传递过程;(2) 催化过程中 NiR 内部有关电子传递的氨基酸残基结构变化;(3) NiR 与其他反硝化酶之间的基因表达调控,深入研究上述领域可以进一步开发亚硝酸还原酶,为生物脱氮开辟新途径,使亚硝酸盐还原酶的应用具有更大的空间和价值。

## REFERENCES

- [1] Ding SN. Research of nitrite reductase in *Lactobacillus plantarum*[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Normal University, 2013 (in Chinese)  
丁少南. 植物乳杆菌中亚硝酸还原酶的研究[D]. 上海: 上海师范大学硕士学位论文, 2013
- [2] Guo XM. Genetic transformation by non-tissue culture on *Phyllostachys edulis* and phenotype analysis of the offspring of 35S::DhNiR rice[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang A&F University, 2017 (in Chinese)  
郭晓梅. 毛竹非组培转基因及转 DhNiR 基因水稻后代性状分析[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2017
- [3] Li SK. Isolation and characterization of nitrate reductase-deficient mutants of *Dunaliella salina*[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University, 2006 (in Chinese)  
李慎柯. 杜氏盐藻硝酸盐还原酶突变株的筛选和鉴定[D]. 郑州: 郑州大学硕士学位论文, 2006

- [4] Kim HT, Kim S, Na BK, et al. Structural insights into the dimer-tetramer transition of FabI from *Bacillus anthracis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2017, 493(1): 28-33
- [5] Sung J, Kim N, Park YH, et al. Rifabutin-based fourth and fifth-line rescue therapy in patients with for *Helicobacter pylori* eradication failure[J]. The Korean Journal of Gastroenterology, 2017, 69(2): 109-118
- [6] Wei JD, Zhang QF, Dou SH, et al. Cloning, expression and purification of copper nitrite reductase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(14): 101-105 (in Chinese)  
魏计东, 张庆芳, 窦少华, 等. 亚硝酸还原酶基因克隆、表达与纯化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(14): 101-105
- [7] Zhang QF, Chi NY, Xue JZ, et al. Nitrite influence on fermentation of *Lactobacillus brevis* 4903[J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(3): 25-27 (in Chinese)  
张庆芳, 迟乃玉, 薛景珍, 等. 亚硝酸盐影响 *Lactobacillus brevis* 4903 发酵的研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(3): 25-27
- [8] Zhang QF, Dong S. Study on fermented Chinese cabbage fermented by lactic acid bacteria[J]. Food Science and Technology, 2009, 34(7): 37-40 (in Chinese)  
张庆芳, 董硕. 乳酸菌菌剂发酵腌渍酸菜的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(7): 37-40
- [9] Chi XM, Zhang QF. Evaluation of highly efficient degradation of  $\text{NO}_2^-$  fermentation by lactic acid bacteria in food[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(6): 78-84 (in Chinese)  
迟雪梅, 张庆芳. 食品中常见乳酸菌高效降解  $\text{NO}_2^-$  发酵性能评价[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(6): 78-84
- [10] Zhang QF, Chi NY, Zheng Y, et al. The study on mechanism of nitrite degradation by lactic acid bacteria[J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(8): 27-31 (in Chinese)  
张庆芳, 迟乃玉, 郑燕, 等. 乳酸菌降解亚硝酸盐机理的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(8): 27-31
- [11] Zhang QF, Chi NY, Zheng Y, et al. Making inquiry about nitrite in fermentation of pickled vegetables[J]. Journal of Microbiology, 2003, 23(4): 41-44 (in Chinese)  
张庆芳, 迟乃玉, 郑燕, 等. 关于蔬菜腌渍发酵亚硝酸盐问题的探讨[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(4): 41-44
- [12] Zhang QF, Chi NY, Zheng XF, et al. Study on removal of nitrite by *Lactobacillus brevis*[J]. Microbiology China, 2004, 31(2): 55-60 (in Chinese)  
张庆芳, 迟乃玉, 郑学仿, 等. 短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) 去除亚硝酸盐的研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 55-60
- [13] Gao HF, Li CQ, Ramesh B, et al. Cloning, purification and characterization of novel Cu-containing nitrite reductase from the *Bacillus firmus* GY-49[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(1): 10
- [14] Adman ET, Godden JW, Turley S. The structure of copper-nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* at five pH values, with  $\text{NO}_2^-$  bound and with type II copper depleted[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(46): 27458-27474
- [15] Horrell S, Kekilli D, Strange RW, et al. Recent structural insights into the function of copper nitrite reductases[J]. Metallomics, 2017, 9(11): 1470-1482
- [16] Solomon EI. Spectroscopic methods in bioinorganic chemistry: blue to green to red copper sites[J]. Inorganic Chemistry, 2006, 45(20): 8012-8025
- [17] Hosseinzadeh P, Tian SL, Marshall NM, et al. A purple cupredoxin from *Nitrosopumilus maritimus* containing a mononuclear type 1 copper center with an open binding site[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(20): 6324-6327
- [18] Strange RW, Murphy LM, Dodd FE, et al. Structural and kinetic evidence for an ordered mechanism of copper nitrite reductase[J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 287(5): 1001-1009
- [19] Silaghi, Dumitrescu R. Copper-containing nitrite reductase: a DFT study of nitrite and nitric oxide adducts[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006, 100(3): 396-402
- [20] Boulanger MJ, Murphy MEP. Directing the mode of nitrite binding to a copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6: characterization of an active site isoleucine[J]. Protein Science, 2003, 12(2): 248-256
- [21] Radoul M, Bykov D, Rinaldo S, et al. Dynamic hydrogen-bonding network in the distal pocket of the nitrosyl complex of *Pseudomonas aeruginosa*  $\text{cd}_1$  nitrite reductase[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(9): 3043-3055
- [22] Fülöp V, Moir JWB, Ferguson SJ, et al. The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome  $\text{cd}_1$ [J]. Cell, 1995, 81(3): 369-377
- [23] Baker SC, Saunders NFW, Willis AC, et al. Cytochrome  $\text{cd}_1$  structure: unusual haem environments in a nitrite reductase and analysis of factors contributing to  $\beta$ -propeller folds[J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 271(2): 294-295
- [24] Serra AS, Jorge SR, Silveira CM, et al. Cooperative use of cytochrome  $\text{cd}_1$  nitrite reductase and its redox partner cytochrome c552 to improve the selectivity of nitrite biosensing[J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 693(1/2): 41-46
- [25] Centola F, Rinaldo S, Brunori M, et al. Critical role of His369 in the reactivity of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome  $\text{cd}_1$  nitrite reductase with oxygen[J]. The FEBS Journal, 2006, 273(19): 4495-4503
- [26] Fülöp V, Moir JWB, Ferguson SJ, et al. Crystallization and preliminary crystallographic study of cytochrome  $\text{cd}_1$  nitrite reductase from *Thiosphaera pantotropha*[J]. Journal of Molecular Biology, 1993, 232(4): 1211-1212
- [27] Stein N, Love D, Judd ET, et al. Correlations between the electronic properties of *Shewanella oneidensis* cytochrome c nitrite reductase (ccNiR) and its structure: effects of heme oxidation state and active site ligation[J]. Biochemistry, 2015, 54(24): 3749-3758
- [28] Youngblut M, Pauly DJ, Stein N, et al. *Shewanella oneidensis* cytochrome c nitrite reductase (ccNiR) does not disproportionate hydroxylamine to ammonia and nitrite, despite a strongly favorable driving force[J]. Biochemistry, 2014, 53(13): 2136-2144
- [29] Rodrigues ML, Oliveira T, Matias PM, et al. Crystallization and preliminary structure determination of the membrane-bound complex cytochrome c nitrite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough[J]. Acta Crystallographica Section

- F-Structural Biology and Crystallization Communications, 2006, 62: 565-568
- [30] Hirasawa M, Tripathy JN, Sommer F, et al. Enzymatic properties of the ferredoxin-dependent nitrite reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Evidence for hydroxylamine as a late intermediate in ammonia production[J]. Photosynthesis Research, 2010, 103(2): 67-77
- [31] Yoneyama T, Fujimori T, Yanagisawa S, et al.  $^{15}\text{N}$  tracing studies on *in vitro* reactions of ferredoxin-dependent nitrite reductase and glutamate synthase using reconstituted electron donation systems[J]. Plant and Cell Physiology, 2015, 56(6): 1154-1161
- [32] Kuznetsova S, Knaff DB, Hirasawa M, et al. Mechanism of spinach chloroplast ferredoxin-dependent nitrite reductase: spectroscopic evidence for intermediate states[J]. Biochemistry, 2004, 43(2): 510-517
- [33] Tripathy JN, Hirasawa M, Kim SK, et al. The role of tryptophan in the ferredoxin-dependent nitrite reductase of spinach[J]. Photosynthesis Research, 2007, 94(1): 1-12
- [34] Tikhonova TV, Slutsky A, Antipov AN, et al. Molecular and catalytic properties of a novel cytochrome c nitrite reductase from nitrate-reducing haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio nitratireducens*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2006, 1764(4): 715-723
- [35] Antonyuk SV, Strange RW, Sawers G, et al. Atomic resolution structures of resting-state, substrate- and product-complexed Cu-nitrite reductase provide insight into catalytic mechanism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(34): 12041-12046
- [36] Ellis MJ, Prudencio M, Dodd FE, et al. Biochemical and crystallographic studies of the Met144Ala, Asp92Asn and His254Phe mutants of the nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* provide insight into the enzyme mechanism[J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 316(1): 51-64
- [37] Chen YH, Cheng P, Yu GH, et al. Cloning and sequence analysis of nitrite reductase gene from *Rhodopseudomonas palustris* 2-8[J]. Microbiology China, 2011, 38(5): 647-653 (in Chinese)  
陈燕红, 程萍, 喻国辉, 等. 沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* 2-8 的亚硝酸盐还原酶基因克隆和序列分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(5): 647-653
- [38] Yuan HL, Bian CK, Chen DY, et al. Expression of nitrite reductase gene of *Sinorhizobium* sp. NP1 and the enzymatic properties[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(11): 132-134, 164 (in Chinese)  
袁会兰, 边晨凯, 陈度宇, 等. 中华根瘤菌 NP1 亚硝酸盐还原酶基因的表达和酶学性质研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(11): 132-134, 164
- [39] Chen SM, Luo TH, Fei YT, et al. Cloning, expression and purification of the nitrite reductase gene from *Bacillus cereus* LJ01[J]. Food Science, 2018, 39(6): 69-74 (in Chinese)  
陈思敏, 罗彤晖, 费永涛, 等. 蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* LJ01 中亚硝酸盐还原酶的基因克隆、表达和纯化[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 69-74
- [40] Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(2): 211-222
- [41] Zhang WW. Studies on nitrite reductase from *Boletus edulis*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2016 (in Chinese)  
张薇薇. 美味牛肝菌亚硝酸盐还原酶的研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2016
- [42] Xu L, Liang RF, Jin Y. Research progress in nitrite reductase in meat products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(3): 413-416 (in Chinese)  
徐龙, 梁蕊芳, 靳焯. 肉制品中亚硝酸盐还原酶的应用进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 413-416
- [43] Kakutani T, Watanabe H, Arima K, et al. Purification and properties of a copper-containing nitrite reductase from a denitrifying bacterium, *Alcaligenes faecalis* strain S-6[J]. The Journal of Biochemistry, 1981, 89(2): 453-461
- [44] Fedtke I, Kamps A, Krismer B, et al. The nitrate reductase and nitrite reductase operons and the *narT* gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC[J]. Journal of Biochemistry, 2002, 184(23): 6624-6634
- [45] Vigliotta G, Di Giacomo M, Carata E, et al. Nitrite metabolism in *Debaryomyces hansenii* TOB-Y7, a yeast strain involved in tobacco fermentation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(3): 633-645
- [46] Zheng HZ. The study on the strain fermentation of nitrite reductase and its application in cooking sausage[D]. Xiamen: Master's Thesis of Jimei University, 2009 (in Chinese)  
郑怀忠. 产亚硝酸盐还原酶菌株发酵特性及酶在肉制品中的应用[D]. 厦门: 集美大学硕士学位论文, 2009
- [47] Trofimov AA, Polyakov KM, Boyko KM, et al. Structures of complexes of octahem cytochrome c nitrite reductase from *Thioalkalivibrio nitratireducens* with sulfite and cyanide[J]. Acta Crystallographica Section D, 2010, 66(10): 1043-1047
- [48] Chi XM, Zhang QF, Chi NY. Research progress of the safety of fermented vegetables[J]. China Brewing, 2018, 37(8): 5-8 (in Chinese)  
迟雪梅, 张庆芳, 迟乃玉. 发酵蔬菜安全性的研究进展[J]. 中国酿造, 2018, 37(8): 5-8
- [49] Gao SY. Application of lactic acid bacteria in mustard pickling process[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2014 (in Chinese)  
高世阳. 乳酸菌应用榨菜腌制工艺研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2014
- [50] Xia J. Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during the fermentation of Sichuan pickle and its effects on the flavor of pickle[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2014 (in Chinese)  
夏姣. 四川泡菜发酵过程中乳酸菌的动态变化及其对泡菜风味的影响[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2014
- [51] Luo JJ, Zheng AJ, Meng K, et al. Proteome changes in the intestinal mucosa of broiler (*Gallus gallus*) activated by probiotic *Enterococcus faecium*[J]. Journal of Proteomics, 2013, 91: 226-241
- [52] Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by

- Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3): 244-263
- [53] Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, et al. The influence of diet on the gut microbiota[J]. *Pharmacological Research*, 2013, 69(1): 52-60
- [54] Chen LL, Huang J, Kuang ZS, et al. Effect of fermentation on the degradation of nitrite in silkworm excrement from different sources[J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2018, 44(3): 458-465 (in Chinese)  
陈乐乐, 黄静, 邝哲师, 等. 发酵处理对不同来源蚕沙中亚硝酸盐的降解效果试验[J]. *蚕业科学*, 2018, 44(3): 458-465
- [55] Yu GH. Effects of rare earth element, micronutrient fertilizers and nitrification inhibitors on nitrate, nitrite contents and other qualities in leaf vegetable[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2004 (in Chinese)  
余光辉. 稀土、微肥和硝化抑制剂对叶菜类蔬菜硝酸盐和亚硝酸盐含量及其他品质的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2004
- [56] Yan B. Amperometric biosensor based on novel organic-inorganic hybrid materials[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2005 (in Chinese)  
阎博. 基于新型有机-无机杂化材料的安培型生物传感器研究[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2005
- [57] Ding SN, Gong GM. Research progress in enzyme biosensors for nitrite determination[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(8): 378-380,385 (in Chinese)  
丁少南, 龚钢明. 亚硝酸盐酶传感器的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(8): 378-380,385
- [58] Almeida MG, Serra A, Silveira CM, et al. Nitrite biosensing via selective enzymes--a long but promising route[J]. *Sensors*, 2010, 10(12): 11530-11555
- [59] Silveira CM, Besson S, Moura I, et al. Measuring the cytochrome c nitrite reductase activity-practical considerations on the enzyme assays[J]. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2010, 2010: 634597
- [60] Mao Y, Bao Y, Han DX, et al. Research progress on nitrite electrochemical sensor[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 46(2): 147-156 (in Chinese)  
毛燕, 包宇, 韩冬雪, 等. 亚硝酸盐电化学传感器研究进展[J]. *分析化学*, 2018, 46(2): 147-156
- [61] Chen H. Purification nitrite reductase and electron donor from *Lactobacillus casei* LCR6013 and their synergetic degradation of nitrites[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2016 (in Chinese)  
陈浩. 干酪乳杆菌 LCR6013 中亚硝酸盐还原酶和电子供体的纯化及其协同降解亚硝酸盐作用[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2016
- [62] Hu CS, Li CQ, Liao WB, et al. The progress on electron transport pathway and catalytic mechanism of copper-containing nitrite reductase[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(7): 1136-1142 (in Chinese)  
胡朝松, 李春强, 廖文彬, 等. 铜型亚硝酸还原酶的电子传递模式及催化机理研究进展[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(7): 1136-1142