

# 硝化作用的生化原理

郑 平 冯孝善

(浙江农业大学环保系 杭州 310029)

**关键词** 硝化作用, 氨氧化, 亚硝酸氧化

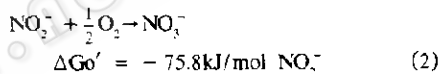
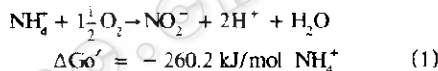
**分类号** Q504 **文献识别码** C **文章编号** 0253-2654(1999)-03-0215-217

硝化作用是自然界氮素循环的重要环节之一, 有着很大的应用价值。在农业上, 可利用硝化作用提高氮素的有效性, 从而促进作物对氮素的同化; 也可通过抑制硝化作用, 以减少反硝化作用引起的氮素损失<sup>[1]</sup>。在环保上, 可利用硝化作用开发硝化工艺, 控制氨对水生生物的毒害; 也可与反硝化作用联合, 用于污水生物脱氮<sup>[2]</sup>。掌握硝化作用的生化原理, 有助于该反应的调控, 本文拟就硝化细菌的能量利用特性、硝化细菌的生物氧化反应和硝化反应的酶学特性作一综述。

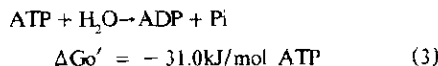
## 1 硝化细菌的能量利用特性

硝化作用包括两个步骤, 即氨氧化为亚硝酸和亚硝酸氧化为硝酸。分别由氨氧化菌和亚硝酸氧化菌完成。至今还没有发现能够把氨直接氧化为硝酸的微生物<sup>[3]</sup>。氨和亚硝酸依次是氨氧化菌和亚硝酸氧化菌进行自养生长的唯一能源。

从热力学上看, 上述两种硝化基质均为低级能源。氨和亚硝酸的生物氧化反应为:

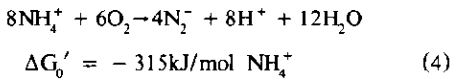


ATP的水解反应为:



比较反应式(1)、(2)和(3)可知, 氨和亚硝酸生物氧化所能释放的自由能不大; 即使全部转化为ATP, 充其量也只能产生8.4molATP/mol  $\text{NH}_4^+$  和2.4molATP/mol  $\text{NO}_2^-$ 。事实上, 相对于呼吸链上的电子载体而言, 氨和亚硝酸的氧化还原电位值 [ $E_0'(\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+) = 340\text{mV}$ ,  $E_0'(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-) = 430\text{mV}$ ] 均偏高, 氧化磷酸化的效率很低, 所能产生的ATP非常有限。从能量利用方式上看, 如果把氨氧化成氮气, 基质的能量利用率可大为改善。氨氧化成氮气反应为:

1998-01-13收稿, 1998-10-12修回



它所释放的自由能明显高于硝化反应[(1)或(2)],此外,由于  $E_0'(N_2/NH_4^+) = -270\text{mV}$ , 低于氨和亚硝酸的氧化还原电位值, ATP 的合成效率也相应提高。

值得深思的是: (1) 硝化基质(氨)本身含能不高, 从理论上说, 应更有利于支持一种微生物的生长; 在自然界, 它所含的低能量却偏偏支持了两种细菌(氨氧化菌和亚硝酸氧化菌)而不是一种细菌的生长。(2) 氨氧化成氮气可比氧化成硝酸释放更多的自由能, 硝化细菌却偏偏要将氨氧化成硝酸而不是氮气。

## 2 氨氧化菌的生物氧化反应

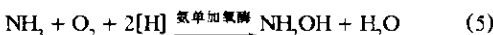
### 2.1 氨氧化为羟胺

**2.1.1 氧化反应:** 氨作为氨氧化菌的基质很早就已被人们所认识, 但当时并不清楚真正的基质是  $\text{NH}_3$ 。Suzuki 等发现, *Nitrosomonas europaea* 的表观  $K_m(\text{NH}_3 - \text{NH}_4^+)$  随 pH 值升高而剧降。如果以  $K_m(\text{NH}_3)$  取代  $K_m(\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+)$ , 则  $K_m$  可不受 pH 值的影响。用 *N. europaea* 无细胞抽提物做试验, 也取得了类似的结果。据此, Suzuki 等确认  $\text{NH}_3$  才是 *N. europaea* 的真正基质。

Bock 等在 *N. europaea* 细胞培养液中, 检出了羟胺<sup>[2]</sup>; Bruijn 等则以氨和羟胺为混合基质, 成功地培养了 *N. europaea*, 并证明后者能有效地代谢羟胺。据此可以确定, 羟胺是氨生物氧化的中间产物。

在羟胺形成中有氧原子摄入。Hollocher 等用  $^{18}\text{O}_2$  示踪证明, 该氧原子来自分子氧。他们用氨和联氨培养氨氧化菌, 并用  $^{18}\text{O}_2$  取代正常  $\text{O}_2$ , 在培养液中检出了  $\text{NH}_2^{18}\text{OH}$ <sup>[3]</sup>。处于饥饿状态的 *N. europaea* 对氨的代谢有一个滞后期, 这种滞后现象可用羟胺消除。在 *N. europaea* 无细胞抽提物中, 添加 NADH 和羟胺也有类似的作用<sup>[4]</sup>。可见, 该生化反应需要还原剂。业已证实, 催化这一生化反应的酶是氨单加氧酶<sup>[5]</sup>。

氨转化为羟胺的生物氧化反应可表示为:



**2.1.2 氨单加氧酶:** 氨单加氧酶(AMO)是膜内酶, 至今尚未被分离纯化。关于其结构, 催化活性和作用机理的资料, 都是通过对完整细胞的抑制试验而间接获得的。

Hyman 等研究发现, AMO 含铜, 对硫脲等金属螯合剂敏感。他们还发现, 用  $^{14}\text{C} \equiv ^{14}\text{C}$  培养 *N. europaea*, 可使  $^{14}\text{C}$  共价结合至一个分子量为 28kD 的膜内在多肽上。

这个被标记的多肽可能是 AMO 的活性部位, 因为它被乙炔共价修饰的程度越高, 保留的氢氧化活性越低; 反之, 当 AMO 的氢氧化活性完全丧失时, 被  $^{14}\text{C} \equiv ^{14}\text{C}$  标记的多肽也不再增多<sup>[5]</sup>。AMO 能利用多种基质。除氨以外, *N. europaea* 还可将甲烷氧化成甲醇, 乙烯转化成环氧丙烷, 环己烷转化为环己醇, 苯转化为苯酚, CO 转化为  $\text{CO}_2$ , 酚转化为醌<sup>[4]</sup>。这些基质既可与氨竞争 AMO 活性部位, 也可与氨竞争还原剂, 因而对氨的生物氧化有抑制作用。乙炔是一种自杀性基质, 可被 AMO 转化为不饱和的环氧化物; 环氧化物及其降解产物则可作用于一个或多个与铜结合的氨基酸侧链, 致使 AMO 结构破坏而永久性失活<sup>[5]</sup>。此外, Yoshioka 等发现 AMO 对紫外线敏感<sup>[6]</sup>。Shears 等进一步发现, 经紫外线照射后, 出现于对照细胞的 380nm 附近的吸收峰消失<sup>[7]</sup>。由于 AMO 的许多性状与酪氨酸酶相似, Shears 等参照酪氨酸酶的作用机理, 提出了 AMO 的催化循环假说(图 1)。

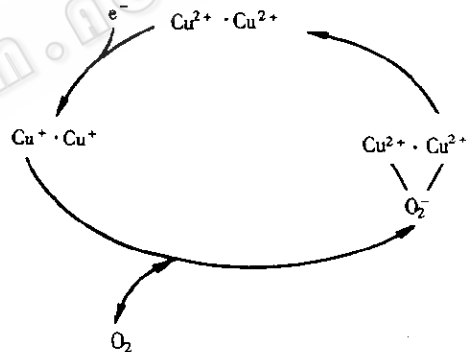
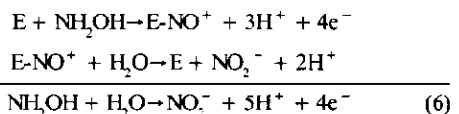


图1 AMO的催化循环<sup>[7]</sup>

### 2.2 羟胺氧化为亚硝酸

尽管氨不易被生物氧化, 但它一旦被转化成羟胺, 就很容易被进一步氧化。Anderson 等证实, 羟胺氧化所需的氧是由水提供的<sup>[8]</sup>, 也即:



催化该反应的酶是羟胺氧化酶(HAO)。 *N. europaea* 的 HAO 已被分离纯化。在制备原生质体时, HAO 即可从细胞中游离出来, 表明这种酶位于外周质中。HAO 仅含一种分子量为 63kD 的亚单位, 但结构比较复杂, 呈  $\alpha_2$  或  $\alpha_3$  寡聚形式。每个亚单位由 8 个共价结合的血红素组成, 其中 7 个为 c 型血红素, 第 8 个为  $\text{P}_{440}$  血红素,

它结合在以桥键相联的肽上,  $P_{460}$  是 HAO 的特有组分, 被认为是该酶的活性中心<sup>[9]</sup>。光谱分析表明, 在 7 个 c 型血红素中, 有 6 个血红素的  $\alpha$  带最大吸收峰出现在 553nm 附近, 只有一个出现于 559nm (Cyt b 的典型吸收峰) 附近<sup>[10]</sup>。据 Arciero 等报道,  $P_{460}$  是血红素的异常形态; 呈氧化态时, 吸收峰为 740nm; 呈还原态时, 吸收峰为 464nm。用  $H_2O_2$  处理后,  $P_{460}$  在 464nm 和 760nm 处的吸收峰均被有选择地去除。HAO 也失去催化活性<sup>[9]</sup>。

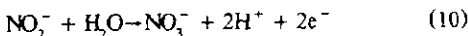
除了催化羟胺氧化为亚硝酸以外, HAO 还能催化联氨氧化, 释放的电子被用于 Cyt c-554 的还原<sup>[11]</sup>。

### 2.3 氨生物氧化中的电子传递

在 *N. europaea* 将氨氧化成亚硝酸过程中<sup>[12]</sup>, 在消耗 1 分子  $UQH_2$  的条件下, AMO 催化氨转化为羟胺; 后者又被 HAO 转化为亚硝酸, 产生 4 个电子和 5 个质子; 4 个电子被传递给 Cyt c-554, 然后与 4 个质子一起用于 2 分子  $UQH_2$  的生成; 其中, 1 分子  $UQH_2$  被 Cyt bc<sub>1</sub> 复合酶重新氧化, 释放的电子被传递至 2 分子 Cyt c-552, 再传递给 Cyt aa<sub>3</sub> 氧化酶, 最终由氧原子接受而形成水; 另一分子  $UQH_2$  被用作 AMO 的还原剂而进行新一轮的氨生物氧化。少量电子 (每氧化 20 分子氨约有 2 个电子) 被用于还原  $NAD^+$  产生  $NADH$ <sup>[4]</sup>。氨氧化菌中不存在基质水平磷酸化, 依靠氧化磷酸化贮存能量。

### 3 亚硝酸氧化菌的生物氧化反应

在进行化能自养生长时, 亚硝酸氧化菌可将  $NO_2^-$  转化为  $NO_3^-$ , 产生 ATP 和  $NADH$ , 并通过卡尔文循环固定  $CO_2$ <sup>[13]</sup>。由于在  $NO_2^-$  氧化为  $NO_3^-$  的过程中, 未检出任何中间产物, 因此认为它是一步完成的, 结合进  $NO_3^-$  的氧原子来自水, 即:



催化此反应的酶称为亚硝酸氧还原酶 (NOR)。NOR 的部分性质如下<sup>[13]</sup>: (1) 与细胞膜紧密结合; (2) 分子量 360kD; (3) 亚单位构成形式:  $\alpha, \beta$  ( $\alpha = 115kD, \beta = 64kD$ ); (4) 含 MO-Fe-S 蛋白; (5) 加入电子受体铁氰酸盐时, 可催化  $NO_2^-$  氧化; (6) 加入甲基紫精、苯甲基紫精或  $NADH$  时, 可催化  $NO_3^-$  还原, 因此是一个硝酸还原酶类型的酶。在亚硝酸氧化菌 *Nitrobacter* 细胞中, NOR 含量随生长条件而变。当以  $NO_2^-$  为能源或以  $NO_3^-$  为电子受体时, *Nitrobacter* 细胞含有大量 NOR; 当环境中不存在  $NO_2^-$  或  $NO_3^-$  时, *Nitrobacter* 进行通常的异养生长, 细胞内的 NOR 被阻遏。受阻遏的 NOR 可重新诱导产生。异

养生长于乙酸盐上的 *Nitrobacter* 细胞, 经过 3~4 周的适应, 可重新获得自养生长的能力<sup>[13]</sup>。

研究发现, 兼性能自养型亚硝酸氧化菌 *N. hamburgensis* 有两条电子传递链, 一条用于自养生长, 另一条用于异养生长。在自养生长时, NOR 起着逆向电子流载体的作用, NOR 中的 Mo-Fe-S 蛋白接受  $NO_2^-$  释放的电子, 并将其传递给 Cyt a<sub>1</sub>。在进行  $NO_3^-$  呼吸时, NOR 起着  $NO_3^-$  还原酶的作用。以氧取代  $NO_3^-$  作电子受体的异养细胞中, 未检出 NOR, 但存在正常的呼吸链组分 (FMN, Cyto 或 Cyt aa<sub>3</sub>)。

既然 *Nitrobacter* 细胞存在正常的呼吸链, 并能够进行通常的异养生长; 在利用高能量的有机物和最有效的电子受体氧作基质时, 理应与其它异养型细菌一样表现出较高的生长速率和细胞产率。但事实是, 它的两项指标都远不如其它异养型细菌, 甚至还不如其自养生长。现有的知识尚难以对此作出合理的解释。

### 参 考 文 献

- [1] Abeliovich A. Biodegradation, 1992, 3:255~264.
- [2] Bock E, Schmidt J, Stuvén R *et al.* Arch Microbiol, 1995, 163:16~20.
- [3] Hollocher T C, Tate M E, Nicholas D J D. Journal of Biological chemistry, 1981, 256:10834~10836.
- [4] Suzuki I, Kwok S C, Dular U. FEBS Lett, 1976, 72:117~120.
- [5] Hyman M R, Arp D J. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(3):1534~1545.
- [6] Yoshioka T, Yatsuka S. J Gen Appl Microbiol, 1984, 30:151~166.
- [7] Shears J H, Wood P M. Biochem J, 1985, 226:499~507.
- [8] Anderson K K, Hopper A B. FEBS Lett, 1983, 164:236~240.
- [9] Arciero D M, Hopper A B. The Journal of Biological chemistry, 1993, 268(20):14645~14654.
- [10] Collins M J, Arciero D M, Hooper A B. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(20):14655~14662.
- [11] Andersson K K, Lipscomb J D. The Journal of Biological Chemistry, 1986, 261:1126~1138.
- [12] Wehrfritz J M, Richardson D J. FEBS Lett, 1993, 335(2):246~250.
- [13] Freitag A, Rudert M, Bock E. FEMS Microbiology Letters, 1987, 48:105~109.