

真菌异化硝酸盐还原机理的研究进展

黄 灿^{1,2*} 何清明¹ 鄢红东² 彭绪亚^{1,2}

(1. 重庆大学城市建设与环境工程学院 重庆 400044)

(2. 重庆大学三峡库区生态环境教育部重点实验室 重庆 400044)

摘 要: 真菌异化硝酸盐还原途径的发现打破了反硝化仅存在于原核细胞这一传统观念。真菌异化硝酸盐还原途径是在环境中氧供给受限的情况下发生的, 包括反硝化和氨的发酵。硝酸盐能诱导产生反硝化作用的酶, 其中, 硝酸盐还原酶与亚硝酸盐还原酶位于线粒体中, 它们所催化的酶促反应能偶联呼吸链ATP合成酶合成ATP, 同时产生NO。与参与反硝化作用前两个酶不同, 真菌NO还原酶能以NADH为直接电子供体将NO还原为N₂O, 在NAD⁺的再生和自由基NO的脱毒中起着重要作用。氨发酵则将硝酸盐还原成NH₄⁺, 同时偶联乙酸的生成和底物水平磷酸化。此文从参与该过程的关键酶、关键酶的表达调节、真菌与细菌异化硝酸盐还原的比较等角度综述了真菌异化硝酸盐还原的最新研究进展。

关键词: 异化硝酸盐还原, 氨发酵, 反硝化, 真菌

Study Progress on the Mechanism of Dissimilatory Nitrate Reduction in Fungi

HUANG Can^{1,2*} HE Qing-Ming¹ WU Hong-Dong² PENG Xu-Ya^{1,2}

(1. College of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

(2. Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: The finding of dissimilatory nitrate reductase in fungi breaks the traditional concept that denitrification has been considered to only occur in a prokaryotic cell. Dissimilatory nitrate reduction in fungi includes denitrification and ammonia fermentation, which occurs under the conditions of limited aeration. Nitrate and nitrite can induce denitrification-related enzymes, which include nitrate reductase, nitrite reductase and nitric oxide reductase. Nitrate reductase and nitrite reductase exists in mitochondria, and enzymatic reactions they catalyze are coupled with ATP generation through ATP synthase in the respiratory chain and produce nitric oxide(NO). In contrast to the two enzymes, NO reductase uses NADH as the direct electron donor and thus might function in the regeneration of NAD⁺ and detoxification of the toxic radical, NO. Ammonia fermentation can reduce nitrate to ammonium and couples acetogenic reaction with substrate-level phosphorylation. In this review, the latest progress about the involved main enzymes, their gene expression regulation, and the comparison of the dissimilatory nitrate reduction between fungi and bacteria were discussed.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 20807059); 重庆大学青年骨干教师创新能力培育基金资助(No. CDCX025)

* 通讯作者: Tel: 86-23-65120758; E-mail: huangcancan@163.com

收稿日期: 2008-11-16; 接受日期: 2009-02-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Keywords: Dissimilatory nitrate reduction, Ammonia fermentation, Denitrification, Fungi

硝酸盐在微生物生命活动中具有两种功能, 其一, 在有氧或无氧条件下所进行的同化性硝酸盐还原作用, 也即利用硝酸盐作为其氮源营养物; 其二, 在无氧条件下, 利用硝酸盐作为呼吸链的末端电子受体被还原为亚硝酸, 有时亚硝酸还可进一步通过亚硝酸氨化作用(Nitrite ammonification)而产生氨或进一步通过反硝化作用(Denitrification)产生 NO 、 N_2O 或 N_2 。长久以来, 反硝化和氨化作用被认为仅发生于原核微生物中。直至上世纪 90 年代初, Shoun 等^[1]发现了一直被误认为是严格好氧的尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)等多种真菌能进行反硝化作用后, 这一观点才得以校正。随后, 一些研究者也在厌氧条件下, 在*F. oxysporum*等真菌中发现氨化作用的存在^[2]。这些研究结果显示, 除了细菌等原核微生物, 许多真核微生物也能在低氧或厌氧条件下使用复杂的ATP产能系统进行反硝化或氨化作用。当前, 有关细菌反硝化作用的机理报道很多^[3,4], 而对真菌异化硝酸盐还原机理的研究相对较少。本文综述了国外有关真菌异化硝酸盐还原酶促反应及其调节机理的最新研究进展, 以期对这一重要的生理、生化过程有一个更为全面和深入地认识。

1 真菌异化硝酸盐还原作用的发现和种类

自从Shoun等^[1]发现反硝化作用不局限于原核微生物, 真菌也有反硝化能力以来的近二十年中, 镰刀菌属(*Fusarium*)、木霉属(*Trichoderma*)、柱孢属(*Cylindrocarpon*)、毛壳属(*Chaetomium*)、水稻恶苗病属(*Giberella*)、青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)及其它半知菌类、丝状真菌、酵母菌等陆续被发现能通过反硝化作用生成 N_2O ^[5]。Shoun等^[5]发现在低氧压条件下, 对许多具有反硝化能力的真菌而言, 亚硝酸盐是一个比硝酸盐更适合合成 N_2O 的底物。除了 N_2O , 一些真菌, 如黄蓝状菌(*Talaromyces flavus*), 其反硝化作用产物更多的为 NO ; 茄病镰孢菌(*Fusarium solani*)、苔藓柱孢菌(*Cylindrocarpon tonkinense*)等真菌则能通过反硝化作用生成 N_2 ^[5]。从以上研究报道可以看出, 真菌的反硝化作用广泛存在于子囊菌纲(Ascomycetes)、接合菌纲(Zygomycetes)、担子菌纲(Basidiomycetes)以及半知菌类(Imperfect fungi)中, 并不局限于哪个专门

的类属。

2 真菌反硝化作用的关键酶

2.1 硝酸盐还原酶

与细菌反硝化不同, 许多具有反硝化能力的真菌缺乏将 NO_3^- 还原为 NO_2^- 和 N_2O 还原为 N_2 的酶, 因而真菌反硝化作用多是 NO_2^- 通过 NO 中间产物, 形成 N_2O 。但*F. oxysporum*、*C. tonkinense*等真菌却能利用 NO_3^- , 并将其反硝化为 N_2O 。Kobayashi等^[6]在*F. oxysporum*菌线粒体中检测到了硝酸盐还原酶(Nitrate reductase, Nar)活性, 且该酶能使用苹果酸、丙酮酸和琥珀酸为呼吸底物, 通过呼吸链偶联氧化磷酸化合成ATP。

最近, 与*F. oxysporum*菌线粒体膜结合的Nar已被部分纯化和鉴定, 它能以呼吸链上的泛醌为电子供体, 这表明它与可溶性、依赖NADH的同化型硝酸盐还原酶的不同^[7]。Uchimura等^[8]研究证实, *F. oxysporum*菌泛醌-Nar位于线粒体中, 且该酶促反应过程能与氧化磷酸化偶联, 从生理学角度而言, 该反应属于 NO_3^- 的呼吸。进一步研究发现, *F. oxysporum*菌线粒体上的Nar的光谱学特性、酶活性中心结构、分子量大小、辅助因子均与大肠杆菌或其它反硝化细菌Nar具有相似性, 该酶由钼喋呤、细胞色素*b*和一个Fe-S蛋白组成^[8]。在随后的研究中, Takaya等^[9]在*F. oxysporum*菌的线粒体上检测到了甲酸-硝酸盐氧化还原酶活性, 这显示, 甲酸脱氢酶(Formate dehydrogenase, Fdh)、Nar、泛醌之间存在着偶联关系, 这也是第一个真核微生物Fdh与呼吸链有关的报道。*F. oxysporum*菌的Nar与Fdh的偶联再次表明, 真菌线粒体上的Nar系统与大肠杆菌等细菌中的Nar有许多相似性^[9]。

除了线粒体上的泛醌-Nar参与了真菌的反硝化作用外, 近几年研究者在胞浆中也检测到了Nar活性。Watsuji等^[10]报道, 在 NO_3^- 还原、 N_2O 形成的条件下, *C. tonkinense*菌中能检测到NADH-Nar活性, 这表明NADH-Nar与反硝化过程紧密相关。NADH-Nar催化的反应与*F. oxysporum*菌线粒体的Nar不同, 它仅存于细胞胞浆。此外, Zhou等^[2]发现, 真菌NADH-Nar的异化硝酸盐作用也能产生氨(氨的发酵), 它是在厌氧条件下, NO_3^- 还原成 NH_4^+ 过程中发生底物磷酸化而产能供菌体细胞生长。在构巢曲

霉(*Aspergillus nidulans*)编码NADH-Nar基因(*niaD*)突变菌株的研究中,发现该菌株丧失发酵氮的能力^[11]。这表明,*niaD*基因也是真菌氮发酵所必需的。进一步研究显示,NADH-Nar不仅参与了硝酸盐的异化(反硝化和氨发酵)作用,也在硝酸盐的同化过程中扮演重要角色^[12]。

2.2 亚硝酸盐还原酶

许多真菌当环境中含有亚硝酸盐时能产生 N_2O 。研究者在试图鉴定催化NO合成的酶时,偶然发现了亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase, Nir),该酶催化亚硝酸盐为NO,同时偶联线粒体中ATP的合成。Nir分子量为41.8 kD,是一个同型二聚体^[13],具有可溶性,位于线粒体内膜和外膜之间^[6]。Nir活性能被螯合剂可逆抑制,如当添加EDTA时能使酶的活性减少10%,但随后在室温下加入0.1 mmol的硫酸铜孵育10 min则能使该酶的活性得到完全恢复^[13]。*F. oxysporum*菌能合成一种类天青蛋白(15 kD)作为Nir的电子供体^[14]。

异化亚硝酸还原酶共脱氮现象很长时间以来被认为是细菌所独有的。真菌异化亚硝酸还原酶的一个重要特征就是具有共脱氮的能力。真菌细胞中异化亚硝酸还原酶的合成能够被硝酸盐和亚硝酸盐所诱导,然而,该酶也催化亚硝酸盐上的亚硝基酰基团转移至亲核化合物,如叠氮、 NH_4^+ 、水杨酰异羟肟酸,这就是我们所说的共脱氮现象^[15]。当*F. oxysporum*菌生长在含亚硝酸盐的培养基时,加入叠氮化合物或水杨酰异羟肟酸,经过一段时间适应后,能增加氮氧化物的生成量,此外,该过程也能观察到分子氮的产生^[15]。真菌和细菌共脱氮的区别在于,细菌的终产物为 NO_2 ,而真菌为 N_2O 或 N_2 。使用标记的 ^{15}N 叠氮、 $^{14}NO_3^-$ 、 ^{14}N 水杨酸进行共脱氮实验,发现 $^{15}N_2$ 中的两个N原子均来自 ^{15}N 叠氮,而 N_2O 中的两个N原子则是 ^{14}N ^{14}NO 和 ^{15}N ^{14}NO 的混合物^[15]。

2.3 NO还原酶

1993年,Nakahara等^[16]发现在真菌的反硝化作用中,一种细胞色素P450起着NO还原酶作用,能以NADH为直接电子供体将NO还原为 N_2O ,他将该种细胞色素P450称为NO还原酶细胞色素P450(P450nor)。P450nor是一种可溶性单血红素源细胞色素P450,分子量约为44371 D,静息状态P450nor在EPR光谱中表现为高自旋和低自旋的混

合体,其氧化还原电位为-307 mV,比其它细胞色素P450要低^[17]。真菌细胞色素P450催化NO还原的速度约为300 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{kg})$,是细菌NO还原酶的5倍,该酶酶促反应的米氏常数(K_m)约为0.1 mmol/L,也较细菌高^[17]。

尽管与P450加氧酶有相似的结构,P450nor与真核生物中P450蛋白家族其它成员不同,它可将NO还原为 N_2O ,是一种还原酶,并不催化单加氧酶参与的反应^[17]。P450nor直接从NADH中获得电子,在电子从NADH转移至P450nor过程中,不需要任何黄素蛋白、铁硫蛋白或其它载体的协助^[17]。目前,P450nor已从几种真菌,包括*F. oxysporum*、*C. tonkinensis*菌中纯化出来,相关的基因也已被克隆。研究发现,*F. oxysporum*菌中P450nor有两种亚型(同功酶)(P450norA和P450norB),它们均由CYP55基因所编码,尽管两亚型的等电点不同,但它们的催化活性、光谱特征、免疫学特征几乎完全相同^[18]。两亚型的区别在于翻译起始密码子位点的不同。P450norA翻译的起始密码子后有一段能编码信号肽的基因,该信号肽可能与P450norA定位于线粒体有关^[18]。与P450norA不同,P450norB翻译的起始密码子下游并无编码信号肽的基因,有研究表明该亚型主要存在于细胞质中^[18]。P450norA编码信号肽的基因与大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因翻译融合实验表明,线粒体中 β -半乳糖苷酶的活性显著增强,这进一步说明,*F. oxysporum*菌P450norA位于线粒体中,还原NO为 N_2O ^[19]。

NO可以自由出入生物膜,线粒体中Nir产生的NO能够穿过线粒体膜进入胞质作为P450norB的代谢底物。为了进一步了解P450nor的生理意义,人们在*F. oxysporum*菌中构建了缺失P450nor基因的突变菌株,很显然,该突变菌株没有P450nor蛋白、Nor(Nitric oxide reductase, NO还原酶)活性,在反硝化条件下不能生成 N_2O ,然而菌体能够正常生长,且Nir活性是正常的,能检测到NO的生成^[20]。这些研究结果从遗传学的角度说明,P450nor是NO还原为 N_2O 必需的。既然P450nor很可能作为电子阱或参与反硝化过程形成的自由基NO的脱毒,P450nor的缺失并不影响反硝化条件下菌体细胞的生长这一现象令人费解。Shoun等^[18]研究表明,黄素血红蛋白(Flavohemoglobin, fhb)参与NO的脱毒和转化。目前已从多种微生物中分离出fhb,它能催化NO还原为

NO_3^- , 减少NO对细胞的损伤作用。Lewis等^[21]发现, 不产生P450nor和fhhb的突变菌株, 它的生长量下降, 且其呼吸系统被破坏。将编码P450nor或fhhb的基因引入突变菌株则能使菌株正常生长^[21]。这表明, P450nor或fhhb组成了一个菌株生长必需的NO降解系统, 有效降低NO的毒害作用。

3 真菌亚硝酸盐的氨化作用

除了异化硝酸盐生成氮氧化物外, *F. oxysporum*、*A. nidulans*等真菌也能异化硝酸盐生成 NH_4^+ (即氨的发酵)^[2]。 NO_3^- 还原为 NH_4^+ 的同时, 发生电子供体的氧化(如乙醇变成乙酸)和底物水平磷酸化。Zhou等^[2]研究表明, 17个真菌试样中有15个能在厌氧条件下发酵氨, 显示该代谢途径在真菌中是普遍存在的。氨发酵过程的主要步骤包括: 乙醛脱氢酶催化乙醛转变为乙酰辅酶A; 在乙酰激酶的作用下, 乙酰辅酶A发生水解, 形成ATP(见图1)^[6]。这个反应与专性厌氧的梭菌发生的氨化过程类似, 但在真核生物的细胞中却很少见^[6]。进一步研究发现, 参与氨化作用的NADH依赖的Nar、Nir与反硝化过程中线粒体中的Nar、Nir不同, 而与真菌中广为存在的同化型还原酶更为类似^[2]。

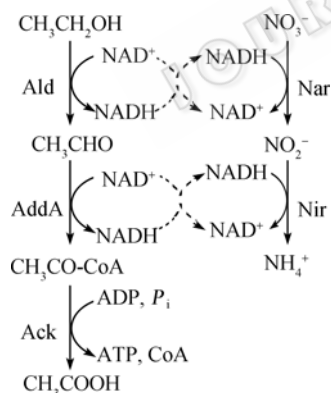


图1 真菌氨发酵的初步机制^[6]

Fig. 1 Putative mechanism of the fungal ammonia fermentation^[6]

注: Ald: 乙醇脱氢酶; Add: 乙醛脱氢酶; Ack: 乙酰激酶; Nar: 硝酸盐还原酶; Nir: 亚硝酸盐还原酶; P_i : 无机磷。

Note: Ald: alcohol dehydrogenase; Add: acetaldehyde dehydrogenase; Ack: acetate kinase; Nar: nitrate reductase; Nir: nitrite reductase; P_i : inorganic phosphorus.

4 真菌反硝化作用的调节因子

研究者对CYP55 基因(编码P450nor)的表达调控

系统进行了研究。将CYP55 的启动基因和大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因融合, 分析了融合后*F. oxysporum* CYP55 的启动基因和报告基因, 结果表明, 在反硝化基因启动子区转录起始位点上游-526 和-515 区是 NO_3^- 诱导所需的关键区域, 且参与硝酸盐同化的转录因子NirA结合的核心序列CTCCGHGG与反硝化基因启动子区转录起始位点上游-526 和-515 核苷酸序列GCATCTCCGCGG有很高的同源性^[19]。这表明, CYP55 的表达也受到硝酸盐同化转录因子的调控。CYP55 基因的另一个转录因子是含有类Rox1p 蛋白结构。基因敲除研究显示, 在无氧条件下, 另一个转录调控因子(类似酵母中的Rox1p)能与转录起始位点上游-118 至-107 核苷酸序列TCTCGTGTCTCTC 结合, 抑制CYP55 的表达, 起着副调控的作用^[19]。

5 真菌异化硝酸盐还原作用与细菌的比较

真菌反硝化是在低氧压条件下进行的, Zhou等^[22]研究了 O_2 对*F. oxysporum*菌反硝化和氨发酵的影响, 研究结果表明, 真菌的反硝化需要极少量 O_2 的诱导, 氧气一旦过量则能产生抑制作用。以 NO_3^- 和 NO_2^- 为底物时, 反硝化最适需氧量是不同的, 分别为 $690 \mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{g})$ 和 $250 \mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{g})$ 干细胞。在氧气供给合适的条件下, NO_3^- 和 NO_2^- 中分别有 80%和 52%的氮原子转化为 N_2O 。*F. oxysporum*等真菌的反硝化与细菌的最大区别在于, 细菌的反硝化是在无氧条件下进行的, 而真菌的反硝化则需要少量的氧。与反硝化不同, 真菌氨发酵则是在无氧条件下进行的。进一步研究发现, *F. oxysporum* NO_3^- 同化的突变菌株的反硝化能力是野生型的2倍, 这表明, *F. oxysporum*菌的反硝化具有独特的特征, 即最低的氧需求和与 NO_3^- 同化竞争底物^[23]。*F. oxysporum*等真菌针对环境从低氧压到无氧的转变, 可选择两条异化硝酸盐途径(反硝化或氨发酵), 这提高了其对环境的适应能力。

有证据表明, *F. oxysporum*菌反硝化和有氧呼吸使用相同的线粒体呼吸链, 可以在低氧压条件下同时进行^[6]。使用苹果酸、丙酮酸或琥珀酸和甲酸作为电子供体, 在反硝化的*F. oxysporum*菌细胞线粒体中能检测到了硝酸盐还原偶联ATP合成的酶活性。对反硝化的*F. oxysporum*菌呼吸链酶活性、光谱学特性研究显示, 线粒体中含有细胞色素c氧化酶, 且呼

吸链抑制剂在抑制呼吸的同时,也抑制了真菌反硝化的进行,这是反硝化和有氧呼吸偶联的直接证据[6]。

真菌呼吸是一个复合系统,电子离开呼吸链上的电子传递复合物(细胞色素 bc_1)后,有两条电子传递途径。其一是通过细胞色素氧化酶传递给氧;另一条途径是通过亚硝酸还原酶传递给 NO_2^- [24]。Zumft等[17]研究也表明,真菌中,电子离开电子传递复合物后,被转移给氧,那能比细菌的反硝化作用产生更多的跨膜质子势;低氧条件下,过多的电子也能分流给NO,被NO还原酶催化脱毒还原成 N_2O 。

参与细菌反硝化的酶有硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶、NO还原酶、 N_2O 还原酶,然而仅硝酸盐还原酶位于细胞质膜内侧,从还原型泛醌接受电子,参与跨膜电位的形成[17]。与硝酸盐还原酶不同,其它3个参与细菌反硝化的还原酶位于周质一侧,从细胞色素c中接受电子,吸收在周质空间中的质子,减少质子驱动的电化学势。这也是细菌反硝化产能效率低下,菌体生长缓慢的原因。

一直以来,线粒体被作为真核生物有氧呼吸的细胞器,真菌中发现了能异化硝酸盐还原的酶实在令人费解。当前有关线粒体细胞器的起源有一种假说。该假说认为真核细胞的祖先是一种具有吞噬能力的细胞,而线粒体的祖先——原线粒体则是一种革兰氏阴性菌,它们不仅能进行糖酵解,而且能利用氧气,把糖酵解产物丙酮酸进一步分解获得更多的能量。当这种细菌通过吞噬作用进入真核细胞,并没有被消化,而且真核细胞利用这种细菌(原线粒体)充分供给能量,原线粒体也更多地依赖宿主细胞获得更多的原料,开始这种互利的共生生活,逐渐地原线粒体失去了原有的一些特征,关闭与丢失了很多基因,但至今还保留着很多祖先的基本特征[25]。真菌在厌氧条件下能异化硝酸盐或亚硝酸盐,且反硝化过程的主要酶位于线粒体中,这也说明线粒体可能起源于细菌。但另一方面,真菌的NO还原酶无论是在结构还是功能上均与细菌中的同功能酶有着巨大的差别,这个现象又与线粒体起源于细菌的假说相矛盾。因而,真菌的反硝化系统是起源于原线粒体(细菌)还是由于环境的改变产生了进化上的适应性,目前仍不清楚。

6 展望

水体富营养化是当前各国水环境共同面临的重大问题。硝酸盐是水体富营养化的主要因子,利用微生物的反硝化作用能将水体的氮氧化物转化为NO和 N_2O 。真菌由于缺乏 N_2O 还原为 N_2 的酶,其反硝化作用的产物多为 N_2O 。 N_2O 是一种位于二氧化碳、甲烷之后的第三大温室气体,它造成的温室效应是二氧化碳的296倍。有研究表明,土壤中 N_2O 的产生,真菌的贡献率为1%~8%,在施用氮肥后的土壤中,真菌的贡献率更大[26]。因而,进一步掌握反硝化过程中 N_2O 产生规律,有效控制 N_2O 的产生量或将其转化为 N_2 将是以后研究的一个重点。此外,真菌线粒体中反硝化酶的发现将有助于更好地研究真核细胞的起源和进化。

参考文献

- [1] Shoun H, Tanimoto T. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *J Biol Chem*, 1991, **266**(17): 11078-11082.
- [2] Zhou Z, Takaya N, Nakamura A, et al. Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *J Biol Chem*, 2002, **277**(3): 1892-1896.
- [3] Richardson DJ, Berks BC, Russell DA, et al. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci*, 2001, **58**(2): 165-178.
- [4] 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. *微生物学通报*, 2008, **35**(7): 1136-1142.
- [5] Shoun H, Kim DH, Uchiyama H, et al. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, **73**(3): 277-281.
- [6] Kobayashi M, Matsuo Y, Tanimoto A, et al. Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *J Biol Chem*, 1996, **271**(27): 16263-16267.
- [7] Averill BA. Dissimilatory nitrite and nitric oxide reductases. *Chem Rev*, 1996, **96**(7): 2951-2964.
- [8] Uchimura H, Eenjoji H, Seki T, et al. Nitrate reductase-formate dehydrogenase couple involved in the fungal denitrification by *Fusarium oxysporum*. *J Biochem*, 2002, **131**(4): 579-586.
- [9] Takaya N, Kuwazaki S, Adachi Y, et al. Hybrid respiration in the denitrifying mitochondria of *Fusarium oxysporum*. *J Biochem*, 2003, **133**(4): 461-465.
- [10] Watsuji T, Takaya N, Nakamura A, et al. Denitrification of nitrate by the fungus *Cylindrocarpus tonkinense*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, **67**(5): 1115-1120.

- [11] Takasaki K, Shoun H, Yamaguchi M, *et al.* Fungal ammonia fermentation, a novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol. *J Biol Chem*, 2004, **279**(13): 12414–12420.
- [12] Fujii T, Takaya N. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* involves NADH-nitrate reductase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, **72**(2): 412–420.
- [13] Kobayashi M, Shoun H. The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J Biol Chem*, 1995, **270**(8): 4146–4151.
- [14] Abraham ZH, Lowe DJ, Smith BE. Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (N.C.I.M.B. 11015): evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres. *Biochem J*, 1993, **295**(Pt 2): 587–593.
- [15] Tanimoto T, Nakahara K, Shoun H. Diauxic growth of *Fusarium oxysporum* during aerobic culture in the presence of nitrate/nitrite. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, **56**(12): 2058–2059.
- [16] Nakahara K, Tanimoto T, Hatano K, *et al.* Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. *J Biol Chem*, 1993, **268**(11): 8350–8355.
- [17] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, **61**(4): 533–616.
- [18] Shoun H, Fushinobu S. Physiological function, reaction mechanism, and structure of cytochrome P450nor. *Seikagaku*, 2008, **80**(6): 560–568.
- [19] Daiber A, Shoun H, Ullrich V. Nitric oxide reductase (P450nor) from *Fusarium oxysporum*. *J Inorg Biochem*, 2005, **99**(1): 185–193.
- [20] Takaya N, Shoun H. Nitric oxide reduction, the last step in denitrification by *Fusarium oxysporum*, is obligatorily mediated by cytochrome P450nor. *Mol Gen Genet*, 2000, **263**(2): 342–348.
- [21] Lewis ME, Corker HA, Gollan B, *et al.* A survey of methods for the purification of microbial flavohemoglobins. *Methods Enzymol*, 2008; **436**: 169–186.
- [22] Zhou Z, Takaya N, Antonina M, *et al.* Oxygen requirement for denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum*. *Arch Microbiol*, 2001, **175**(1): 19–25.
- [23] Takaya N, Uchimura H, Lai Y, *et al.* Transcriptional control of nitric oxide reductase gene (CYP55) in the fungal denitrifier *Fusarium oxysporum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66**(5): 1039–1045.
- [24] Morozkina EV, Kurakov AV, Nosikov AN, *et al.* Properties of nitrate reductase from *Fusarium oxysporum* 11dn1 fungi grown under aerobic and anaerobic conditions. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2005, **41**(3): 292–297.
- [25] van Hellemond JJ, van der Klei A, van Weelden SW, *et al.* Biochemical and evolutionary aspects of anaerobically functioning mitochondria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2003, **358**(1429): 205–213.
- [26] Laughlin RJ, Stevens RJ. Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil. *Soil Sci Am J*, 2002, **66**(5): 1540–1548.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度) 和 N (当量浓度) 等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: $t(h)$ (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格 (和 % 除外), 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3 ~ 5 不可写成 3~5 ; 3%~6% 不可写成 3~6% 等。