

## 地中海拟无枝菌酸菌 U-32 对硝酸盐的同化及其硝酸还原酶特性\*

李果龙 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

**摘 要** 对地中海拟无枝菌酸菌 U-32 菌株的研究发现,像植物及真菌硝酸还原酶一样,地中海拟无枝菌酸菌 U-32 硝酸还原酶也是诱导酶,其合成受铵盐阻遏,受硝酸盐的诱导。氯霉素抑制实验的结果表明,该菌株硝酸还原酶的诱导涉及到蛋白质的新合成。钼和钨的竞争实验说明 U-32 菌株硝酸还原酶也为一种钼酶。另外在离体实验中,发现硝酸还原酶活力受到 KCN 和 NADH 的抑制,但至今未能找到其生理电子供体。此外, U-32 菌株硝酸还原酶也不表现类似于植物的黄递酶等组份酶活性。该菌株硝酸还原酶和其力复霉素产量有一定相关性,但两者确切的关系尚待研究。

**关键词** 地中海拟无枝菌酸菌, 硝酸还原酶, 诱导, 阻遏

地中海拟无枝菌酸菌 U-32 菌株为力复霉素产生菌。本实验室早期的工作发现, 0.8% 的硝酸钾能使力复霉素的产量提高 1.7 倍。硝酸盐对 U-32 菌株力复霉素产量的影响涉及到碳代谢和氮代谢的多个方面<sup>[2]</sup>。硝酸盐的这一多效性可能在 U-32 菌株次级代谢中的调节作用, 而这一重要的调节因素很可能就是负责硝酸盐同化的硝酸还原酶(NR)<sup>[2]</sup>。

对植物、真菌来源的 NR 的研究发现, 该酶是一个诱导酶, 其合成受硝酸盐的诱导, 受其它易于利用氮源的阻遏<sup>[2,6]</sup>。根据电子供体的专一性, 硝酸还原酶可分为两类, 一类是依赖于铁氧还蛋白的 NR, 常存在于蓝绿藻, 一类是依赖于 NAD(P)H 的 NR, 存在于真核有机体中。NR 的诱导合成有两种机制, 一种涉及到蛋白质的从头合成<sup>[1,2,4]</sup>。另一种 NR 的诱导机制认为硝酸盐只对 Mo、Co 的合成是必需的<sup>[2,6]</sup>, 而对于脱辅基蛋白的合成并不是必需的, 只是合成 Mo、Co 后 NR 才表现硝酸还原活力。对于硝酸盐诱导的详细机制并不清楚, 只在黑曲霉中有一个硝酸盐诱导的自身控制的模型<sup>[3]</sup>, 无硝酸盐时, NR 分子与一调节基因产物结合, 而这一调节基因刺激 NR 和 NiR 结构基因的表达。对细菌 NR 的研究主要集中在参与硝酸盐呼吸的异化硝酸还原酶上, 而对同化硝酸还原酶因其极端不稳定性<sup>[2,5]</sup>, 报道极少。通过改进 NR 的稳定性, 作者已得到电泳纯的地中海拟无

\* 本文采用缩写符号: NR: 硝酸还原酶; NiR: 亚硝酸还原酶; PMSF: 苯甲磺酰氟; DTT: 二硫苏糖醇; EDTA: 乙二胺四乙酸; CytC: 细胞色素 C; PQQ: 吡咯-喹啉醌; MoCo: 硝酸还原酶的钼蛋白因子; Fd: 铁还原蛋白; M (B) V: Methyl (Benzyl) viologen。

本文于 1994 年 4 月 24 日收到。

枝菌酸菌 U-32 的 NR<sup>[6]</sup>, 并对其基本的酶学性质进行了研究。本文报道地中海拟无枝菌酸菌 U-32 对硝酸盐同化的一些基本特性。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和培养条件

1.1.1 菌种: 地中海拟无枝菌酸菌 U-32, 为力复霉素 SV 高产菌株<sup>[1,3]</sup>。

#### 1.1.2 培养基:

种子培养基(%) : 葡萄糖 2, 黄豆粉 0.5, 蛋白胨 1, 酵母膏 0.2, CaCO<sub>3</sub> 0.2, NaCl 0.2, 自然 pH。

发酵培养基(%) : 葡萄糖 4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, CaCO<sub>3</sub> 0.5, NaCl 0.1, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1, 微量元素溶液 0.1ml, 最后加入适当氮源, 调节 pH 至 7.0。微量元素溶液(%) : FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.1, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1。

原生质体制备用培养基(%) : (1) 一级培养用培养基: 葡萄糖 1, 牛肉膏 0.3, 蛋白胨 0.5, NaCl 0.5, KNO<sub>3</sub> 0.5, pH 7.2。(2) 二级培养用培养基: 同发酵培养基。

### 1.2 菌体干重测定

准确吸取 10ml 发酵液, 用布氏漏斗抽滤后, 用蒸馏水充分洗涤菌体, 将覆盖菌体的滤纸于 80℃ 烘干后称重。

### 1.3 力复霉素效价测定

用杯碟法测力复霉素效价。用藤黄八叠球菌作检定菌。

### 1.4 蛋白质含量测定

按照费林法<sup>[9]</sup>或考马氏亮蓝 G-250 染料结合<sup>[17]</sup>的方法测定蛋白含量, 所用标准蛋白为牛血清白蛋白。

### 1.5 酶活力的测定

MV-硝酸还原酶活力的测定采用文献<sup>[16]</sup>的方法。30℃ 每分钟产生 1 nmol/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的酶量定义为一个酶活力单位, 比活力是每毫克蛋白的活力单位数。

NADH-NR 的测定参见文献<sup>[13]</sup>的方法。Fd-NR 的测定参见文献<sup>[10]</sup>的方法, PQQ-NR 的测定参见文献<sup>[4]</sup>的方法。在测定前首先把 1ml 无细胞抽提物和 2ml NR 缓冲液及 0.25ml 2 mmol/L PQQ 在 30℃ 保温 15 分钟, 然后加入 80μl 1mol/L 的 KNO<sub>3</sub>, 30℃ 反应 10 分钟后测定形成的亚硝酸。

### 1.6 铁氧还蛋白及相关 Fe-S 蛋白和 Fd-NADP 还原酶的部分纯化

1.6.1 铁氧还蛋白和 Fd-NADP 还原酶的部分纯化: 参照文献<sup>[20]</sup>的方法。经一次 DEAE-Cellulose (5×25cm) (预先用 pH 7.5 0.15 mol/L Tris-HCl 缓冲液平衡) 柱层析后, 使铁氧还蛋白和 Fd-NADP 还原酶分离, 用不同盐浓度的缓冲液洗脱后, 就得到二者的粗制品。

1.6.2 Erythrodexin 相关 Fe-S 蛋白的部分纯化: 参照文献<sup>[18]</sup>的方法, 在此过程中检测 Fe-S 蛋白<sup>[5,7]</sup>。

## 2 结果和讨论

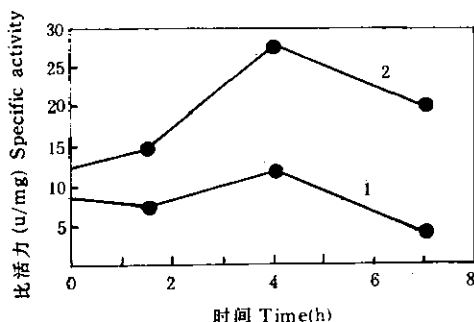


图2 地中海拟无枝菌酸菌 U-32 硝酸还原酶的诱导

Fig. 2 NR induction of *A. mediterranei* U-32 using  $\text{KNO}_3$  as the sole nitrogen source

1. 经  $\text{KNO}_3$  培养的菌丝重新悬浮在不含  $\text{KNO}_3$  的基本培养液中;
2. 经  $\text{KNO}_3$  培养的菌丝重新悬浮在含 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$  的基本培养液中.
1. Resuspension of  $\text{KNO}_3$ -cultured mycelium in minimal medium containing no  $\text{KNO}_3$ ;
2. Resuspension of  $\text{KNO}_3$ -cultured mycelium in minimal medium containing 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$ .

后,细胞内存在有明显的这些基因的转录产物。用免疫学技术对 *Candida nitrotophila* NR 合成的研究及用 6-甲基嘌呤处理小球藻细胞匀浆得出了同样的结论<sup>[23]</sup>。但也有些植物及微生物细胞中,存在有组成型表达的 NR 基因产物,但只有加入硝酸盐以后,才表现有活力的硝酸还原活性。

## 2.2 钼盐和钨盐对硝酸还原酶诱导的影响

试验结果表明,不同来源的 NR 虽然在分子量、亚基等方面存在着很大的差异。但纯化的 NR 都是一种含有钼蝶呤辅基的氧化还原酶<sup>[23]</sup>。

由于目前对原核生物的 NR 仍研究甚少,为初步了解地中海拟无枝菌酸菌 U-32NR 是否也为一含钼的酶,进行了如下的实验:在以  $\text{KNO}_3$  为唯一氮源的培养基中培养细胞,然后加入钼酸的类似物钨酸继续培养一段时间,菌体洗涤后,重新悬浮于以下四种溶液中:(1)含有 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$ , 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ; (2)含有 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$ , 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  和 50  $\mu\text{g/ml}$  的氯霉素; (3)含有 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ; (4)含有 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$ 。然后不同时间取样,测定 NR 的比活力,结果见图 4。

图 4 在 (1) 的情况下,经 3—5 小时后, NR 活力大为增强。这可能是由于非活性的钨-NR 逐渐转化为有活性的钼-NR 的结果。加入氯霉素抑制蛋白质的合成以后, NR 活力只有小幅度的增加,这可能是由于在没有蛋白质合成的条件下,只有已存在的非活性钨-NR 转变为活性钼-NR 的结果。而只加入  $\text{KNO}_3$  和  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  则 NR 一直处于低水平,两者均因缺乏提供 NR 的钼辅因子而不能表现 NR 活力所致,因此认为 U-32 菌株为一钼酶。

## 2.3 NADH 和氰化物对硝酸还原酶活力的影响

NADH 和氰化物对 NR 活力有着明显的抑制作用(表 2)。这种抑制有可能与小球藻的 NR 有某些相似性<sup>[22]</sup>, 小球藻 NR 有活性和非活性两种状态,一种还原剂如 NADH 或

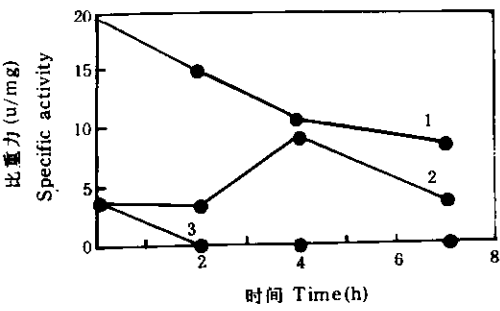


图 3 地中海拟无枝菌酸菌 U-32 硝酸还原酶的诱导及氯霉素对其的抑制  
Fig. 3 Induction of NR from *A. mediterranei* U-32 and its inhibition by chloramphenicol

- 1. 经  $\text{KNO}_3$  培养的菌丝重新悬浮在含 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$  的基本培养液中;
  - 2. 无  $\text{KNO}_3$  培养所得菌丝重新悬浮在含 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$  基本培养液中;
  - 3. 无  $\text{KNO}_3$  培养所得菌丝重新悬浮在含 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$  和 50  $\mu\text{g/ml}$  氯霉素的基本培养液中。
1. Resuspension of  $\text{KNO}_3$ -cultured mycelium in minimal medium containing 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$ ;
2. Resuspension of  $\text{KNO}_3$ -free cultured mycelium in minimal medium containing 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$ ;
3. Resuspension of  $\text{KNO}_3$ -free cultured mycelium in minimal medium containing 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$  and 50  $\mu\text{g/ml}$  chloramphenicol.

连二亚硫酸钠和氰化物可使活性的 NR 转化为非活性的状态。有关这种抑制的机制：有人认为是由于 NR 的钼与氰化物的直接反应<sup>[14]</sup>，但也有与此相反的结论<sup>[15]</sup>。

表 2 NADH、KCN 对硝酸还原酶的抑制作用

Table 2 Inhibition of NR from *A. mediterranei* U-32 by NADH and KCN

加入量 Inhibitor added	比活力 (u/mg) Specific activity	抑制百分数 (%) Percentage inhibited
—	7.985	—
0.25 mg/ml NADH	3.735	53.2
0.15 mmol/L KCN	4.347	45.6
NADH 和 KCN	1.522	80.9

氰化物也抑制其他钼酶的活性<sup>[12]</sup>，氰化物对牛的黄嘌呤氧化酶的抑制是由于氰化物和酶的过硫化物基团反应形成一个游离的硫氰酸的结果。

作者对 U-32 菌株 NR 研究的结果，也揭示 NR 为一含钼的酶，但其尽管受 NADH 的抑制，NADH 并不能作为其生理电子供体。NADH 可能只是作为一种简单的还原剂和氰化物协同抑制 NR 的活力，在作者对 U-32 的研究过程中，也发现另一种还原剂连二亚硫酸钠也极易使硝酸还原酶失活。但不同于小球藻 NR 之处在于 U-32 菌株 NR 的这种抑制尚无法逆转，因此二者在机理上可能有所不同。另外，对 *Streptomyces cyanoviridis* NR 的

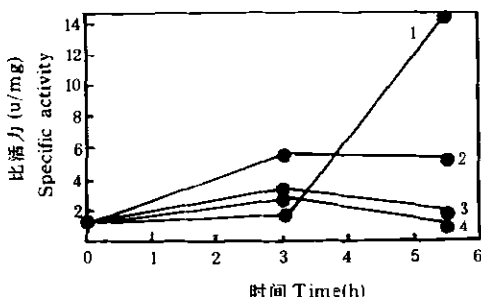


图4 钼, 钨对地中海拟无枝菌酸菌 U-32 硝酸还原酶诱导的影响

Fig. 4 Effect of Mo, W on NR induction of *A. mediterranei* U-32

1. 溶液含 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$  和 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ;
2. 溶液含 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$ , 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  and 50  $\mu\text{g/ml}$  氯霉素;
3. 溶液含 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ;
4. 溶液含 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$ .

1. Solution containing 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$  and 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ;

2. Solution containing 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$ , 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  and 50  $\mu\text{g/ml}$  chloramphenicol;

3. Solution containing 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ;

4. Solution containing 40 mmol/L  $\text{KNO}_3$ .

研究发现无细胞抽提物中 NR 活力受到 NADH 和 FAD 的刺激, 有关的机理尚不清楚<sup>[19]</sup>。

## 2.4 硝酸还原酶的电子供体

细菌中 NR 的电子供体多数尚难以确定<sup>[21]</sup>, 有报道发现 *Rhizobium japonicum* 有一个颗粒型的 NR, 类似于 *E. coli* 的 DNR, 利用 NADH 或琥珀酸作为电子供体。另外还发现一个可溶性的 NR, 其电子供体尚未确定, 但不能利用 NADH 或琥珀酸作为电子供体, 而且对氧十分敏感, 这两种 NR 之间的关系仍未确定<sup>[8]</sup>。对于 *Pseudomonas aeruginosa* 则有完全不同的 DNR 和 ANR, 前者类似于 *E. coli* 的 DNR, 而对其 ANR 则因其不稳定性研究极少<sup>[21]</sup>。从以上结果不难看出细菌 NR 的复杂性。

对 U-32 菌株 NR 的研究发现, NADH/NADPH 不能作为其生理电子供体, 作者进一步测定了许多其它可能的电子供体, 发现甲酸、琥珀酸、 $\text{FADH}_2$ 、 $\text{FMNH}_2$ 、CytC 和 PQQ 均不能作为其电子供体。另一种可能的电子供体铁氧还蛋白(来自菠菜、U-32 菌株和芽孢杆菌)也不能作为其电子供体。为此, 根据 Hutchinson 等纯化 Erythrodexin 的方法<sup>[18]</sup>, 部分纯化了其可能作为电子供体的 Fe-S 蛋白, 然后加入到 Fd-NR 的测定体系中, 但也未能测出硝酸盐的还原活性。

U-32 菌株只在以甲基紫精为电子供体的测定体系中能够测出硝酸盐还原活力。在其它已研究的细菌同化 NR 中, 也发现人工电子供体 MV (或 BV) 是非常好的 NR 电子供体。

在以硝酸盐为唯一氮源的基本培养基上生长的 U-32 细胞，经一定时间的生长后，能够在培养液中测出硝酸盐的还原，洗涤菌体后，再次悬浮于基本培养基中生长，也能测到亚硝酸，但收集的细胞破碎后，再加入底物则不能测出硝酸盐的还原。作者推测，由硝酸盐到亚硝酸盐的电子传递可能涉及到一个结构较为复杂的多电子传递体的链式传递，超声波或高氧分压都能迅速使其失活，从而失去电子传递能力。这可能与蓝绿藻有某些相似之处，在细胞内其 NR 是由一个依赖于光的反应使 Fd 还原而提供电子的<sup>[20]</sup>。

2.5 硝酸还原酶活力与力复霉素的合成

有关无机盐对次级代谢调节作用的报道很多，特别是无机磷酸对多种抗生素合成起到抑制作用，但分子水平上的报道极少。Martin 等对 Candidicin 产生菌 *S. griseus* 的研究发现 P-aminobenzoate 合成基因存在一个 114 bp 的磷控制顺序<sup>[11]</sup>。硝酸盐对 U-32 菌株力复霉素 SV 合成的影响是否也通过类似的机制，尚需进一步证实，但硝酸盐的这种多效性使作者对 NR 这一硝酸盐同化的关键酶十分感兴趣。实验证明，高产与低产菌株 NR 活力确有不同（表 3），而且在以硝酸盐为唯一氮源的培养基上生长情况也不同，低产的 4.895 菌株生长较差。这可能表明硝酸盐同化酶系与力复霉素产量之间的某些相关性，但它们之间确切的关系仍有待证实。

表 3 硝酸还原酶活力与力复霉素产量的相关性  
Table 3 Correlation of NR activity with rifamycin SV productivity

菌 株 Strain	总活力 Total activity (u/ml)	总蛋白 Total protein (mg/ml)	比活力 Specific activity (u/mg)	力复霉素产量 Rifamycin yield (μg/ml)
U-32	25.2	6.0	4.2	1600
4.918	13.8	4.2	3.2	500
4.895	N. G.	1.69	N. G. *	100

\* N. G. :Indicates negligible.

参 考 文 献

[1] Chiao J S. Biology of Actinomycetes" 88. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1988, 412—417.  
[2] Wary J L. Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation. London: Oxford Univ. Press, 1989.  
[3] Bahns M. Garrett R H. *J Biol Chem*, 1980, **255**: 690.  
[4] Somers D A, Kuo T M, Kleinhofs A. *Plant Physiol*, 1983, **71**: 145.  
[5] Cove D J. *J Bacteriol*, 1969, **97**: 1374.  
[6] Stewart V. *Microbiol Rew*, 1988, **52**: 190.  
[7] 倪榴英, 刘慈俊, 焦瑞身, 等. 微生物学报, 1984, **24** (3): 217—223.  
[8] Lowry O H. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265.  
[9] Senmak J J, Grossberg S E. *Anal Biochem*, 1977, **79**: 544.  
[10] Santero E F, Luque F, Medina J R et al. *J Bacteriol*, 1986, **166**: 541.  
[11] Manzano C, Candau P, Gomez-Moreno C. *Mol Cell Biochem*, 1976, **10**: 161.  
[12] Hommes R W J, Dostma P W, Neijssel O M. *FEMS Microbiol Lett*, 1984, **24**: 329.

- [13] Shin M. *Methods in Enzymology*, 1971, **23**: 440.
- [14] Shafiee A, Hutchinson C R. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 1548.
- [15] King T E. *Methods in Enzymology*, 1967, **10**: 634.
- [16] Lovenberg W. *J Biol Chem*, 1963, **238**: 3899.
- [17] Solomonson L P, Barber M J. *Ann Rev Plant Physiol*, 1990, **41**: 225.
- [18] Solomonson L P. *Biochem Biophys Acta*, 1974, **334**: 297.
- [19] Massey V. *J Biol Chem*, 1970, **245**: 6595.
- [20] Notton B A, Hewitt E J. *FEBS Lett*, 1971, **18**: 19.
- [21] Nicholas D J D. *Methods in Enzymology*, 1957, **3**: 983.
- [22] Shapiro S. Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes; Nitrogen Assimilation in Actinomycetes and the Influence of Nitrogen Nutrition on Actinomycete Secondary Metabolism, CRC Press, 1988.
- [23] Sias S R, Stouthamer A H, Ingraham J L. *J Gen Microbiol*, 1980, **118**: 229.
- [24] Lowe R H. *Biochem Biophys Acta*, 1964, **85**: 377.

## NITRATE ASSIMILATION OF *AMYCOLATOPSIS MEDITERRANEI* U-32 AND SOME PROPERTIES OF ITS NITRATE REDUCTASE

Li Guolong Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

**Abstract** Preliminary results indicate that NR of *Amycolatopsis mediterranei* U-32, like that of plants and fungi, is also an inducible enzyme. Its synthesis is induced by nitrate and repressed by ammonia and other readily usable nitrogen sources. Chloramphenicol inhibitory experiment shows that NR induction involves de novo synthesis of proteins. Competition between molybdate and tungstate in NR synthesis suggested that NR of *A. mediterranei* U-32 is a molybdenum-containing enzyme. NR activity in crude extract is inhibited by KCN and NADH. The natural electron donor of NR is still unknown. Beside, NR of *A. mediterranei* U-32 does correlation between rifamycin SV productivity to specific activity of mycelial nitrate reductase.

**Key words** *A. mediterranei* U-32, Nitrate reductase, Induction, Repression