

微生物的氮素代謝

B. A. 梅 萊

科学出版社

微生物的氮素代謝

高 人 著



● ● ● ● ●

微生物的氮素代謝

B. A. 福萊著

刘麟祥譯

科学出版社

1958

B. A. FRY
THE NITROGEN METABOLISM
OF MICRO-ORGANISMS

Methuen & Co. Ltd.

內 容 提 要

本書是福萊 (B. A. Fry) 博士根据他在英国 Sheffield 大学为一年級研究生开设的微生物学的講稿写成的。全書共分十章，述及微生物氮素代謝各个方面。首先講到微生物以含氮化合物作为能量来源的一些問題，即氨基酸的氧化、醃酵以及自养的确化和反硝化作用，然后討論微生物如何固定分子态氮和利用簡單的含氮化合物，如氨、氨基酸等合成复杂的含氮化合物，如蛋白質、核酸等。关于蛋白質的合成是分章討論的：由分子态 N_2 、 NH_3 合成氨基酸开始，繼而討論吸收氨基酸的机制，肽在中間代謝中的作用，一直到氨基酸用肽键連接在一起而形成蛋白質。核酸的合成則自成一章。本書最終以討論蛋白質水解作用中各种酶的一章作为氮素代謝問題的結束。这样就可以看出，把各章所討論的問題連接起来就成为一个完整的“氮素循环”。在最后一章里，“化学藥剂的作用方式”是根据已知的它們对于含氮化合物代謝的影响而加以討論的。每一章后面都附有很多文獻，可供深入研究时参考。

微 生 物 的 氮 素 代 謝

B. A. 福 萊 著

刘 麟 祥 譯

*

科学出版社出版 (北京朝阳門大街 117 号)

北京市书刊出版业营业許可証出字第 051 号

中国科学院印刷厂印刷 新华书店总經售

*

1958 年 7 月第 一 版

书号：1236 字数：124,000

1959 年 7 月第二次印刷

开本：850×1168 1/32

(京) 1,551—3,550

印张：5 1/16 插圖：1

定价：(10) 1.00 元

原 序

毫無疑問，氮素是許多具有生物学意义的化合物的一个組成成分，所有熟習現代生物化学的人都知道，在过去的十年中，生物化学中的重点已由研究复杂物質的分解过程轉移到合成作用的机制方面，特別是蛋白質的合成以及核酸在代謝中的作用方面。現已日益証明，在闡述氨基酸，核苷酸以及其他化合物在生物体内的合成途徑时，微生物是非常有用的，並且長期以来，用它們来闡明很多水溶性物質(这些物質現在都包括在乙类維生素中)的功能的實驗也得到了很大的成功。

在这本專書里作者試圖尽可能詳尽地對於微生物的氮素代謝作一个概述，並且在处理这个問題的时候要反映現代微生物学中的發展趋势。本書是根据在 Sheffield 大学为一年級研究生所開設的微生物学課程中一系列講演写成的，希望其他大学的高年級学生和有关的研究工作者在學習和研究微生物的生物化学中这样一个重要的章节的时候，这本书能够作为一个便利而簡單的引論。如果認為作者在本書中對於某些章节給予了过份的重視的話，那么作者对此應該負責。他是根据下面兩点来选择这些題目的，一，它們具有比較广泛的意义，二，希望對於这些了解得还很少的題目能够引起讀者們的注意。虽然，这本书的題目是包罗万象的，而且書中所举出的例子也是取材於細菌、真菌、藻类和原生动物的實驗的，但是重点还是很自然地在前二者上，因为絕大部分的工作都是用各种細菌和真菌来完成的。因为篇幅关系不可能把所有已經研究过的微生物都加以敘述，但是讀者們可以从本書所推荐的一般參考書目和附在每章后面的文獻中寻求更多的知識。

作者於 1953 年

目 录

原序.....	i
第一章 导言.....	1
第二章 氨基酸的分解代謝.....	8
第三章 硝化作用和反硝化作用.....	29
第四章 固氮作用.....	41
第五章 氨基酸的合成作用.....	55
第六章 微生物對於氨基酸的吸收.....	75
第七章 肽和蛋白質.....	87
第八章 蛋白質水解酶.....	103
第九章 核苷酸和核酸.....	116
第十章 化学藥剂的作用方式.....	136
索引.....	148
菌名索引.....	155

第一章 导 言

生物学系统中的能量关系

近年来运用已经确定的热力学原则来分析生物学系统中能量关系的研究工作已经很自然地把注意力集中在这样一些产生能量和利用能量系统中的反应上^[6]。当供给一个系统以能量或者当能量由一个系统释放出来的时候,能量由一种形态到另一种形态的转变受很多的限制(热力学第二定律)。换句话说,在任何一个系统中只有一部分的能量可用来作功,这种有效的能量叫作自由能。放出自由能的化学反应叫做放能反应,吸取自由能的化学反应叫吸能反应。生殖、生长和生命的维持都是吸能的过程,因此这些过程就和那些能够供给它们能量的作用紧密地联系着。

通常我们都相信在生物学系统中氧化作用的直接的和最终的结果是使能量有效化^[8,10]。一种物质的氧化必然伴随着另一种物质的还原,而生物学的氧化-还原作用则包含着氢原子或电子的传递^[14]。因此,被氧化的物质往往被称为氢给予体(H-给予体),同时另一被还原的物质就叫做氢接受体(H-接受体)。任何一种物质的完全氧化都是以一个简单步骤或是分作几个简单的步骤而进行的,其中每一个步骤又都是由适当的酶所促成的,而在所有已知的反应中,氢原子或电子之传递到最终的H-接受体都是由一个或很多的中間载体来完成的。在好气性微生物中,分子氧是H-接受体,因起作用的酶的不同,其最终产物是水或过氧化氢。当微生物偶然地或者是由于需要而生活在无氧的情况下时,就必须利用氧以外的其他物质来达到这一目的。这样的物质可以从环境中取得(如 CO_2 , 硝酸盐或醋酸盐),也可以是这种微生物分解代谢的一个

产物(比如在乳酸菌中,丙酮酸鹽被氧化为乳酸鹽)。

無机正磷酸鹽的酯化作用是这样一种机制的主要部分,吸能的反应通过这种机制就能够利用那些由氧化还原作用所提供的有效能量。我們关于这一机制的概念主要是由 Lipmann^[10] 来的,他指出磷酸化的化合物可以根据它們水解时所释放的能量的多少而分为兩类:有些化合物每一克分子可以产生大約 3,000 卡的能量,而同时另一些化合物每克分子就可以放出 10,000 到 16,000 卡的能量。Lipmann 建議后者叫做高能(或富能)磷酸化合物,按照他的定名它們含有高能(或富能)磷酸鍵,高能磷酸鍵水解时产生 10,000 多卡的自由能並放出一克分子的無机正磷酸鹽。某些生物学的氧化-还原作用的重要性就在於它們和富能磷酸鍵的形成有关:这些富能磷酸鍵或者是在有机物的真正氧化作用中产生的,或者是在氢(或电子)到 H-接受体的傳遞过程中产生的。在前一种情况下,有机物質的氧化作用是伴随着它的酯化作用的(为正磷酸所酯化),其結果由氧化作用所产生的有效能量並不以热的形式释放出来,而是和剛剛結合起来的磷酸根一起保留在被氧化的物質中。仅有的由非氧化性的反应所产生的富能磷酸根是在烯醇式-2-磷酸丙酮酸中發現的,它是 2-磷酸甘油酸在烯醇化酶的作用下脱水而形成的一种物質。在适当的酶(磷酸激活酶)的作用下,磷酸根和它們所帶的能量可以傳遞給二磷酸腺苷(ADP)或者有时候傳遞給一磷酸腺苷(AMP),这样就分別地形成了三磷酸腺苷(ATP)或ADP。

在生物学系統中,能量由一个放能反应放出並有效地供給一个吸能反应的唯一途徑就是由一种物質把它們偶联起来,这种物質是同时参加这两个反应的。ATP 的功能就是在产生能量和利用能量的反应之間用它的高能磷酸根起一个能量載体的作用。三磷酸腺苷参加利用能量的反应,与其中一个反应物起反应,同时也就活化了这个反应物;因此,反应物的总自由能含量就上升到至少与

产物的自由能含量相等,而往往远超过产物的自由能含量。从能量关系的观点上来看,这样的条件有利于产物的形成,而这种方式 ATP 的利用就伴随着无机正磷酸盐的出现。

虽然通常我们都认为所有有机体的能量代谢都和富能磷酸键有关,但是除了在葡萄糖和丙酮酸的无氧分解过程外,它们是如何形成的还知道得很少。现代的研究结果指出在富能磷酸根的产生及其利用中含硫醇基的辅助因子大概起着很重要的作用,而硫醇酯的合成可能是这些反应的重要中间阶段[参考谷胱甘肽在磷酸三碳酐脱氢酶系统中^[16]和辅酶 A (Co. A) 在柠檬酸及其他化合物合成作用中^[2]的作用]。我们相信具有 ATP 的特性的物质在所有的有机体中都是存在的,而事实上 ATP 已经从酵母[参考 4]、许多绿色植物^[1]和动物中分离出来了,但是在细菌中它的存在大多基于推断,而不是基于分离成纯净的状态^[3,7,9,11,12,13,15]。

营养:一般的情况

不论什么样的有机体,它们生命的维持和细胞质的合成都需要同样的基本物质:那就是,矿物质类、水和碳源、氮源,同时还需要一种供给能量的机制,这种能量是以一种能为生物学系统所用的形式而供给的。自养微生物可以完全用 CO_2 (有些微生物可以用 CO) 来满足它们对碳源的需要。而另一方面,异养微生物则需要更复杂的碳源:一种有机化合物,还要有 CO_2 。而且异养微生物的能量通常都是从有机含碳化合物的分解代谢中取得的,因此与自养微生物就大不相同,自养微生物的能量是从日光(光能合成自养菌)或者无机物质的氧化,如 H_2S , S , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, NH_4^+ , NO_2 , H_2 或 Fe^{++} (化能合成自养菌)取得的。每一种化能合成自养菌都氧化一种特殊的化合物,或者氧化一类在化学上很相近的化合物,可能在这些氧化作用过程中所放出的部分能量是以富能磷酸根的形式变成可被利用的能量的。被光合细菌的叶绿素所吸收的日光能怎样转变成可为酶反应利用的形式目前还不清楚,但是近来的一

些實驗已經提出一種可能的機制的某些預兆^[17]。

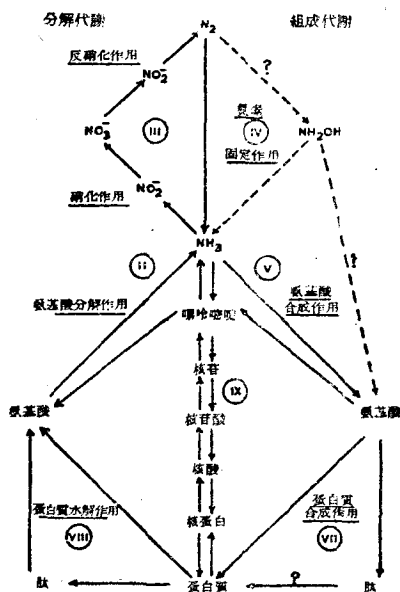
所有的自養微生物都是從一種無機化合物取得氮源的，視微生物的種類而定，這些無機物可能是分子態 N_2 ， NH_4^+ ，硝酸鹽或亞硝酸鹽。雖然後三種也可以完全作為某些異養微生物的氮源，但是大部分異養微生物的營養要求並不這麼簡單。這些異養微生物不能夠合成原生質中一種或幾種的有機成分，因此它們只能在周圍環境中存在這些物質時才能生長，也就是說它們需要這些物質。微生物合成複雜的有機氮化化合物的能力是區別很大的，有些微生物僅僅需要一種化合物，比如說，*Salmonella typhosa* 需要色氨酸，*Proteus vulgaris* 需要尼克酸，而另一些異養微生物的營養則是很複雜的，比如 *Leuconostoc mesenteroides* P-60 需要十八種氨基酸和至少十一種生長輔助物質（這裡所謂的生長輔助物質和動物營養中的維生素具有同樣的意義）。至於用以合成細胞物質的碳的量，那麼作為碳源和能源的有機化合物所佔的比重是與異養微生物從周圍環境所取得的細胞質的組分的數目成反比的：在一個豐富的培養基中這些化合物主要是起能源的作用。以前，曾根據這麼兩點來區分自養微生物與異養微生物：第一，異養微生物不能把 CO_2 中的碳結合在有機的分子中，第二，自養微生物可以完全地單獨地靠消耗無機物質來生活。現在有足夠的知識來證明這兩種說法都需要加以修改^[18,19,5]。事實上，異養微生物的生長也需要 CO_2 ，並且已經知道它們具有固定 CO_2 的酶系統：不過，這種固定作用雖然重要，但 CO_2 對於異養微生物來說既不是完全的也不是主要的碳源。而且，已經確定有些被認為是自養微生物的微生物也能够異養地生存。比如，在有適當的 H-接受體時，紫色硫細菌（*Thiorhodaceae*）從日光取得能量，同時以 CO_2 和 NH_3 （或 N_2 ）作為完全的 C 和 N 源。這個 H-接受體可以是硫這樣的無機物，也可以是一種有機物質像脂肪酸，因此 *Thiorhodaceae* 可以看作是兼性自養的微生物。另一方面，綠硫細菌僅僅利用一個無機物的 H-接受體，因

而似乎是一种專性的自养細菌 *Athiorhodaceae* (紫色非硫菌)需要一些生長輔助物質和一个有机的 H-接受体,那就是說,它們是異养微生物,虽然它們也从日光取得能量。

本書概要

很多微生物能够从含氮化合物中直接或間接地取得它們的能量,它們代謝作用中这一特征的許多实例分别在以下兩章中敘述,其中一章研究異养微生物中氨基酸的醱酵和氧化,另一章研究自养的硝化細菌。在自然界中,氨基酸分解过程中所产生的氨有三条出路:(1)被硝化細菌氧化为硝酸鹽(第三章),(2)氧化为硝酸鹽后,又轉变为分子态 N_2 和氧化氮(第三章),(3)結合到有机的分子中(第五章)。氮素代謝的合成方面最后形成兩类主要的复杂物質,蛋白質和核酸。核酸的合成自成一章,而關於蛋白質的合成則一步步地討論,首先从氮素怎么样由分子态 N_2 和 NH_3 进入有机物的分子开始。在論述了合成氨基酸和从环境中吸收氨基酸的作用的那些机制以后,就着重来敘述肽在中間代謝中的作用、蛋白質合成問題以及氨基酸怎么样用肽鍵連在一起。本書的这一部分最终以討論蛋白質水解作用中的各种酶的一章作結束,蛋白質水解作用是最終产生自由氨基酸的一个过程。氨基酸的分解代謝在本書的一开头討論,最后讀者就可以看到,氨基酸和蛋白質的代謝是就一个循环中的各个阶段来討論的。本書的基本題材不过是所有的生物学家都知道的氮素循环,我們在这里不过是試圖从各种反应的生物化学的观点以及有关各种微生物的观点来分析这一循环中的各个步驟(圖 1.1)。

純粹是为了方便,同时也为了避免混乱,微生物中核苷酸,核苷,嘌呤和嘧啶的代謝放在單獨的一章里討論。这一領域的問題目前已經研究得很深入了,但是由於時間关系不能把很多迅速积累起来的实验事实加以整理。部分是由於这个原因,部分是受着篇幅的限制,各章的内容就限制在少数的几个选题上。



G. B.

SUMNER, J. B. and MYRBÄCK, K. (editors), (1950), *The Enzymes*, Academic Press, U.S.A.

WERKMAN, C. H. and WILSON, P. W. (editors), (1951), *Bacterial Physiology*, Academic Press, U.S.A.

文 献

- [1] Albaum, H. G., Ogur, M. and Hirshfeld, A. (1950), *Arch. Biochem.*, **27**, 130.
- [2] Barker, H. A. (1950), in *Phosphorus Metabolism*, **1**, 204 (Ed. McElroy, W. D. and Glass, B., Johns Hopkins Press, U.S.A.)
- [3] — and Lipmann, F. (1949), *J. biol. Chem.*, **173**, 247.
- [4] Dounce, A. L., Rothstein, A., Boyer, G. T., Meier, R. and Freer, R. M. (1948), *J. biol. Chem.*, **174**, 361.
- [5] Gest, H. (1951), *Bact. Rev.*, **15**, 183.
- [6] Hearon, J. Z. (1951), *Fed. Proc.*, **10**, 602.
- [7] Hersey, D. F. and Ajl, S. J. (1951), *J. biol. Chem.*, **191**, 113.
- [8] Kaplan, N. O. in *The Enzymes*, **2** (i), Chap. 45.
- [9] Lepage, G. A. and Umbreit, W. W. (1943), *J. biol. Chem.*, **147**, 263, **143**, 255.
- [10] Lipmann, F. (1941), *Advances in Enzymology*, **1**, 99; (1946), **6**, 231. (1949), *Fed. Proc.*, **8**, 597.
- [11] Lohmann, K. (1928), *Biochem. Z.*, **203**, 164.
- [12] Lutwak-Mann, C. (1936), *Biochem. J.*, **30**, 1405.
- [13] Mesrobeanu, L. (1936), Thesis: Paris, *Contribution a l'étude des corps puriques de la cellule bacterienne*
- [14] Michaelis, L. in *The Enzymes*, **2** (i), Chap. 44.
- [15] O'Kane, D. J. and Umbreit, W. W. (1942), *J. biol. Chem.*, **142**, 25.
- [16] Racker, E. and Krimsky, I. (1952), *Nature*, **169**, 1043.
- [17] Vishniac, W. and Ochoa, S. (1952), *J. biol. Chem.*, **195**, 75.
- [18] Umbreit, W. W. (1947), *Bact. Rev.*, **11**, 157.
- [19] *Bacterial Physiology*, Chaps. 11 and 19.

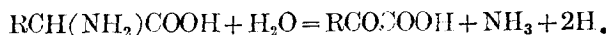
第二章 氨基酸的分解代謝

除碳水化合物外,很多異养微生物还能够利用有机含氮化合物作为碳素和能量的主要来源。一般地說,氮素首先从这些化合物上移去,然后,它的产物通过与碳水化合物和脂肪酸分解代謝中同样的末端途徑被醱酵和氧化。某些異养微生物,特别是不能同化胞外醱的类型,就需要完全依靠有机含氮化合物,如氨基酸,嘌呤或嘧啶等作为碳素和能量的来源。虽然对这些微生物分解代謝的最終产物都已經做过研究,但是关于它們形成的途徑和个别步驟中相应的酶知道得还很少。

氨基酸的分解代謝或者开始於氧化的脫氮作用,或者开始於移去某一基团的非氧化的过程。不能認為后者就是直接使能量能为有机体所利用的作用,因为在上述两种情况下,都有这种例子:它們的产物繼續代謝时能形成富能的磷酸根。比如,非氧化性的絲氨酸脫氮作用或者由氧化性的丙氨酸脫氮作用可以得到丙酮酸,而在丙酮酸氧化酶系統的作用下,它的氧化就伴随着富能磷酸根的形成^[39]。本章的第一部分討論氨基酸氧化分解代謝的机制和完成这些作用的各种酶,第二部分專門研究这些酶系統,它們的主要作用方式是非氧化性的。

氨基酸氧化酶类

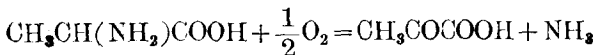
氨基酸氧化酶能將氨基酸氧化为相应的酮酸,而且这些氧化酶對於基質的 L 或 D 立体異構体是有特异性的,



氮之由氨基酸到一个适当的接受体(典型的接受体是 O_2)的傳遞是由一个或一个以上的傳遞物質作为媒介的,通常这种酶都含有一

个能够起这种作用的輔基。 *Neurospora crassa* 和 *N. sitophila*^[7], *Proteus vulgaris*^[58], *Penicillium notatum* 和 *Aspergillus niger*^[37] 的 L-氨基酸氧化酶就屬於这种类型。每一个这种氧化酶都能够作用於許多种氨基酸,不过也还有这种可能:即观察到的活性是由於几种極其相似但却有特異性的酶的作用所致。氧气可以人工地用还原态的染料(如用甲烯藍)或鉄氰化物来代替。已經証明, *N. crassa* 的酶含有一个輔基,腺嘌呤黄素二核苷酸(adenine flavin dinucleotide),这个輔基能够使氮直接傳遞給 O_2 , 結果形成 H_2O_2 ^[10]。在过氧化氢酶(*Neurospora* 就含有这种酶)存在的情况下,一克分子氨基酸的氧化需要吸收一克分子的氧气。 *N. crassa* 的菌絲也含有一个类似的对 D-氨基酸特異的氧化酶^[7]。

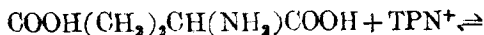
Pr. vulgaris 的氧化酶是不是也含有一个黄素的輔基还没有确定,同时,虽然每分子氨基酸被氧化时需要吸收一个氧原子,但是还没有証明 H_2O_2 是首先形成而随后被过氧化氢酶所分解的。在 *Pr. vulgaris* 中必然有一种以上的氧化酶,因为洗过的悬液比無細胞的酶制品能够氧化更多种的氨基酸^[58]。由洗过的 *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* 和 *Bacillus mycoides* 的悬液所引起的甘氨酸,丙氨酸和谷氨酸的脫氨作用是需要氧的[参考 25]: 利用甲苯处理过的細胞以防止丙酮酸的进一步代謝,可以証明 *Esch. coli* 的丙氨酸脫氨作用是按照下式定量地进行的:

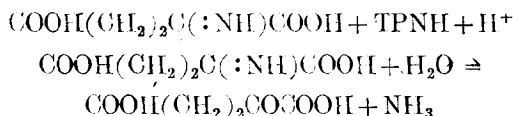


但是关于这种酶的特性一点都不知道。

谷氨酸脫氨酶

Esch. coli 的谷氨酸脫氨化作用是由 L-谷氨酸脫氨酶和輔酶三磷酸吡啶核苷酸(TPN)来完成的^[2]: 它的最終产物是 α -酮基戊二酸,我們相信这个还原作用分兩步进行:





这一系統是可逆的，其平衡偏於谷氨酸的合成。相似的特異谷氨酸脫氫酶在 *Saccharomyces cerevisiae*^[1]，*Clostridium sporogenes*^[44]，*N. crassa*^[23]，也可能在 *Haemophilus pertussis*^[34] 和 *H. parainfluenzae*^[36] 中存在。*Haemophilus influenzae* 只有在卟啉 (porphyrin, X-因子) 和二磷酸吡啶核苷酸 (DPN)，TPN 或烟鹼酸醯胺核苷 (nicotinamide riboside, V-因子) 存在时才能生長。从缺乏 V-因子的培养基上得到的細胞，它的氧化力在加入 DPN 或 TPN 时大大地增高，Klein 曾用这一方法証明天門冬氨酸和谷氨酸氧化为 CO_2 ， NH_3 和醋酸的作用中也包括 DPN 或 TPN^[36]。与 *H. parainfluenzae* 不同，*H. pertussis* 既不需要 X-因子也不需要 V-因子，它在氨基酸的氧化作用中不形成揮發性的脂肪酸，而在 Jebb 和 Tomlinson 所採用的实验条件下，只有谷氨酸中的碳才参加到細胞物質中去^[34]。

Pseudomonas spp. 對於色氨酸的氧化

Pseudomonas 屬中各个种的一个特征就是它們具有或者很快地就能得到这种本领，即利用任何一种可氧化的有机物質作为碳源和能源，这种特性在 Stanier^[51] 用“同时适应” (Simultaneous adaptation) 的方法来研究代謝途径时已經被广泛地利用了。假如，一种生物對於某种物質表現很少的或者不可測出的活性，同时假如在它周圍的环境中引进这种物質，这种生物在不进行細胞分裂的情况下，大大地增加了对这种物質的代謝能力，那么，我們說适应已經發生了。“同时适应”的假說假定，假如一种生物可以利用某一种物質，那么它也可以用同样的速度立即利用这种化合物代謝中其他任何一种中間产物 (假定这种中間产物能够进入細胞的話)。假如在达到同样的利用速度之前有一个延迟的阶段，那么就

可以断定这种物質不能被現有的代謝系統所利用,換句話說,它不是一个中間产物,它仅仅是在适应之后才被利用的。根据这样的材料就有可能推断一种物質在分解代謝中的可能途徑,但是要得到确鑿無疑的証明不仅需要得到这些中間产物的形成的直接証据,而且还需要分离出那些起作用的酶来。 *Pseudomonas* 各个种的喜氧性表明整个細胞的全部分解代謝过程都可以以 O_2 吸收表示的气压法(manometry)来进行研究,關於色氨酸分解的研究^[55],就給这种技术提供了一个实例。当 *Pseudomonas* 生長在,或者說适应於色氨酸时,其中一些菌株同时适应於甲醯狗尿氨酸(formyl-kynurenine)、狗尿氨酸(kynurenine)、磷氨基苯甲酸(anthranilic acid)和兒茶酚,而另一些菌株則适应於狗尿氨酸和狗尿酸(kynurenic acid),但对磷氨基苯甲酸和兒茶酚不适应。用無細胞的提取物研究^[30]的結果表明色氨酸的吡咯环(圖 2.1)首先被一个过氧化物酶-氧化酶系統破坏,在这一酶系統中包含有 H_2O_2 和 O_2 ,然后它的产物甲醯狗尿氨酸又在甲酸酶(formylase)的作用下水解为甲酸和狗尿氨酸。在某些菌株中,吡咯环重新組合形成狗尿

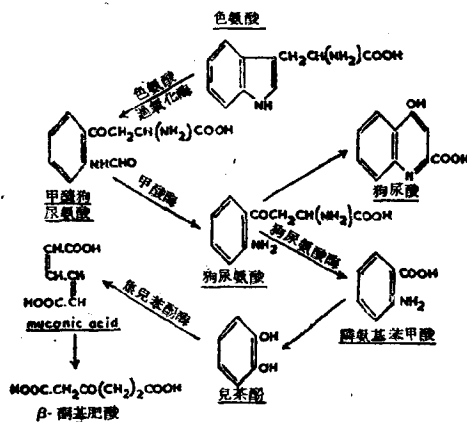


圖 2.1 在 *Pseudomonas* spp. 中色氨酸的分解途徑