

钼酸盐-柠檬酸盐络合物及有机酸 对棕色固氮菌生长的影响

杨胜利¹, 龙敏南¹, 周朝晖², 徐惠娟¹,
侯书雅², 张凤章¹, 许良树¹, 万惠霖²

(1. 厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,

2. 厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 将经过 0.9% NaCl 溶液处理 8 h 的棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii* OP) 作为菌种分别接入 Burk's 培养基和用不同有机酸替代柠檬酸三钠或用不同等摩尔的钼络合物替代钼酸钠的各种改良的 Burk's 培养基中, 分别测定菌体生长曲线和固氮活性。结果发现, 与 Burk's 培养基相比, 以高柠檬酸、苹果酸、马来酸替代柠檬酸三钠或以 $K_6[MoO_5(cit)_2] \cdot 5H_2O$ 、 $K_4[MoO_5(Hcit)_2] \cdot 4H_2O$ 和 $Na_2[MoO_2(Hcit)] \cdot 3H_2O$ 替代柠檬酸三钠和钼酸钠的培养基能促进菌体的生长; 以乙醇酸替代柠檬酸三钠的培养基则会抑制固氮菌的生长; 各种培养条件下菌体细胞的 C_2H_2 还原活性表现了类似的规律。讨论了固氮酶活性中心 $FeMoCo$ 在装配过程中钼的可能运输方式和装配机理。

关键词: 棕色固氮菌; 柠檬酸钼络合物; 有机酸; 生长曲线

中图分类号: Q 554

文献标识码: A

固氮酶由钼铁蛋白和铁蛋白组成。钼铁蛋白含有两个金属中心即 M-簇 ($FeMoCo$) 和 P-簇, 前者被认为是底物络合和还原的活性部位^[1,2], 后者被认为是固氮酶的电子库, 在固氮酶催化底物还原时参与电子和质子的传递^[3,4]。根据 K-R 模型^[5], $FeMoCo$ 是由 $MoFe_3S_3$ 和 $FeFe_3S_3$ 两个亚簇通过 3 个无机硫桥连接而成的类双立方烷, 有一个高柠檬酸分子通过一个羧基氧和一个羟基氧与钼原子相连^[6]。 $FeMoCo$ 的生物合成至少需要 6 种 *nif* 基因 (*nif Q*, *nif V*, *nif B*, *nif H*, *nif N* 和 *nif E*) 产物的参与^[7]。 $FeMoCo$ 是在固氮微生物细胞中装配好后插入缺辅基的固氮酶钼铁蛋白 (apodinitrogenase) 中的^[8]。*nif B* 基因的产物 *nif B-co* 是一种含 Fe 和 S 的 $FeMoCo$ 前体^[9]。然而, 钼和高柠檬酸是怎样装配到 *nif B-co* 上的目前尚不清楚。本研究试图通过各种改良的 Burk's 培养基中柠檬酸钼络合物和有机酸对菌体生长的不同作用探讨钼的运输及装配问题。

1 材料与方法

1.1 实验材料

棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii* OP) 由中国科学院北京植物所提供。小分子有机酸马来酸、苹果酸、乙醇酸和柠檬酸三钠等为国产分析纯试剂, 高柠檬酸 (homocitric acid) 由本校化学系固氮组合成。钼酸盐-柠檬酸盐络合物按周朝晖等^[10]的方法合成。不同络合物的化学组成见图 4 中说明。

1.2 实验方法

菌种处理: 将棕色固氮菌 OP 先接种于 Burk's 培养基 (pH7.2) 中, 于 30℃ 下振荡培养 14 h 后 (OD_{475} 达到 0.43), 将菌液离心 (4 000 r/min) 10 min, 收集菌体, 用 0.9% NaCl 洗涤并离心 3 次以除去原始培养基中的残留的营养成份。最后将离心得到的菌体接种于 25 mL 0.9% NaCl 溶液^[11] 中, 于 30℃ 下振荡培养 8 h (OD_{475} 值达到约 0.94)。收集菌液作为备用菌种。

各种培养基的配制: 以等摩尔的钼酸盐-柠檬酸盐络合物代替 Burk's 培养基中的钼酸钠和柠檬酸三钠, 或以等摩尔的有机酸 (包括马来酸、苹果酸、乙醇酸、高柠檬酸等) 代替 Burk's 培养基中的柠檬

收稿日期: 2003-01-17

基金项目: 国家自然科学基金 (39970176, 29933040) 资助

作者简介: 杨胜利 (1977-), 男, 硕士研究生。

酸三钠, 配制各种不同的改良的 Burk' s 培养基.

菌体生长曲线的测定: 将经过 0.9% NaCl 溶液中温育处理的棕色固氮菌菌种按 1% 接种量接种于各种改良的 Burk' s 培养基中, 在 30℃ 下振荡培养 16~ 20 h, 其中每隔 2 h 取一次培养液, 用 722 型分光光度计测定 OD_{475} 值, 分别绘制菌体生长曲线.

固氮菌固氮酶 C_2H_2 还原活力的测定: 在上述取样测定菌液 OD 值的同时, 从培养的菌液中取出 4 mL 菌液, 置于 25 mL 的疫苗瓶中, 以反口橡皮塞密封, 注入 2 mL C_2H_2 , 于 30℃ 水浴中振荡反应 2 h, 用注射器抽取反应瓶中的气体, 用 103 型气相色谱仪(氧化铝柱, 阿比松为固定相, 火焰离子化检测器)测定乙烯的生成量, 计算固氮菌催化乙炔还原活力($nmol C_2H_4$ formed/ $min \cdot mL$).

2 实验结果

2.1 棕色固氮菌在 0.9% NaCl 溶液中的生长状况

在 Burk' s 培养基中培养的菌体, 经 0.9% NaCl 溶液温育(30℃)处理(饥饿处理)时, 在最初的 8 h 时间内, 菌体仍能生长(图 1). 由图 1 可见, 在 0.9% NaCl 溶液中, 随着时间的推移, 其菌液的 OD_{475} 值由 0.43 逐渐上升至 0.94, 8 h 后, 菌液的 OD 值开始下降. 这表明, 在营养饥饿的条件下, 固氮菌仍能利用细胞内积累的营养物质继续生长, 待胞内养份耗尽后, 细胞就停止生长.

2.2 不同有机酸对棕色固氮菌生长的影响

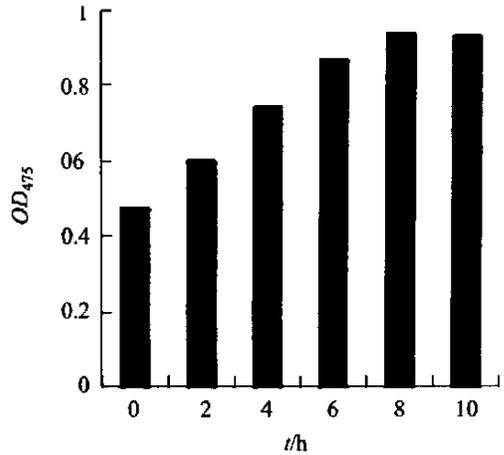


图 1 棕色固氮菌在 0.9% NaCl 溶液中的生长状况
Fig. 1 Growth situation of *A. vinelandii* OP in 0.9% NaCl solution

将经过饥饿处理的棕色固氮菌按 1% 的接种量接入 Burk' s 培养基中和以马来酸、高柠檬酸等替代其中的柠檬酸三钠的改良的 Burk' s 培养基中, 在 30℃ 下振荡培养, 测定其菌体生长曲线及相应的 C_2H_2 还原活性曲线, 结果见图 2. 由图 2 可以看出, 在加入苹果酸和高柠檬酸的培养基中, 菌体的生长速率在 16 h 之前明显高于在含柠檬酸三钠的培养基即 Burk' s 培养基中的生长速率, 而在加入马来酸的培养基中的菌体的生长速率也比 Burk' s 培养基中的高; 而在加入乙醇酸的培养基中, 菌体的生长速率则略低于在 Burk' s 培养基中的生长速率. 在对数生长期和后期(16 h 后), 菌体的生长速率虽仍有较大的差别, 但逐渐缩小, 趋向一致. 只有加入乙醇酸

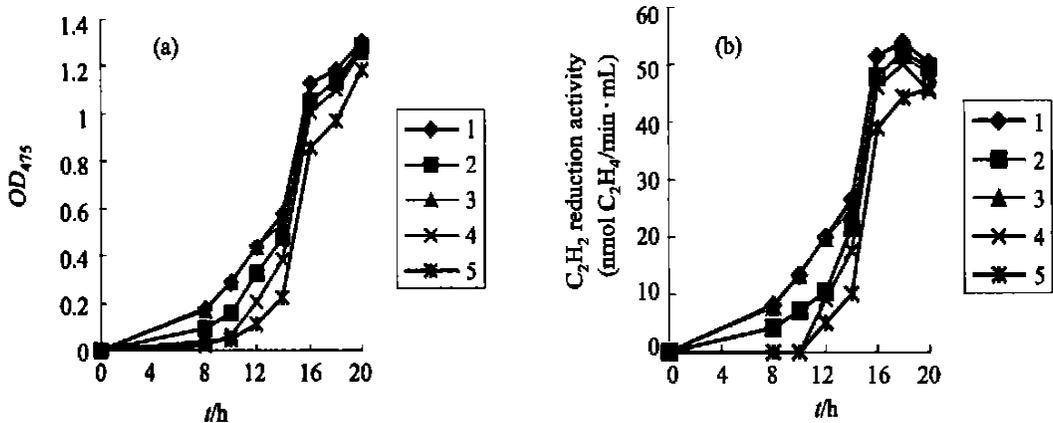


图 2 棕色固氮菌在含不同有机酸的改良的 Burk' s 培养基中的生长曲线(a)和 C_2H_2 还原活力曲线(b)

1: malic acid; 2: maleic acid; 3: homocitric acid; 4: trisodium citrate; 5: glycolic acid

Fig. 2 The growth curves (a) and a C_2H_2 reduction activity curves (b) of *A. vinelandii* cultured in modified Burk' s

medium containing different organic acids

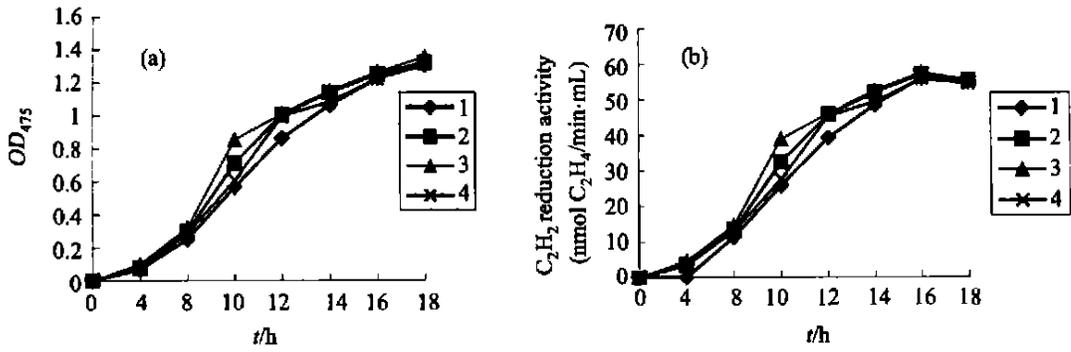


图 3 棕色固氮菌在含不同钼化合物的改良的 Burk's 培养基中的生长曲线 (a) 和 C₂H₂ 还原活力曲线(b)

1: Na₂MoO₄+ citrate; 2: K₆[Mo₂O₅(cit)₂]·5H₂O; 3: K₄[Mo₂O₅(Hcit)₂]·4H₂O; 4: Na₂[MoO₂(Hcit)]·3H₂O

Fig. 3 The growth curves (a) and C₂H₂ reduction activity curves (b) of *A. vinelandii* cultured in modified Burk's medium containing different molybdenum compounds

的差别较大一些. 这些结果表明, 与在 Burk's 培养基中生长的菌体相比较, 高柠檬酸和苹果酸及马来酸对固氮菌的生长有明显的促进作用, 而乙醇酸则相反, 表现出一定的抑制作用.

从 C₂H₂ 还原活性曲线可以看出, 在含不同有机酸的培养基中固氮菌 C₂H₂ 还原活力的变化规律与生长变化规律基本一致, 即在含高柠檬酸、苹果酸及马来酸的培养基中培养的菌体的 C₂H₂ 还原活力明显高于在 Burk's 培养基中培养的菌体的活力, 而在含乙醇酸的培养基中培养的菌体, 其 C₂H₂ 还原活力则相对较低. 这是因为菌体生长速率越高, 同一时刻内菌液的细胞密度越大, 同样体积的菌液的固氮酶的固氮活力就越高.

2.3 不同含钼化合物对棕色固氮菌生长的影响

将经饥饿处理的固氮菌菌液按 1% 接种量接种于含不同钼化合物的培养基 (以等摩尔的不同柠檬酸钼络合物代替 Burk's 培养基中的钼酸钠和柠檬酸三钠) 中, 培养 8 h 后, 每隔 2 h 取菌液测定 OD₄₇₅ 值, 同时取菌液测定其 C₂H₂ 还原活力, 结果如图 3 所示. 由图 3 可见, 不同含钼化合物对棕色固氮菌生长的影响是不一样的, 在含 K₄[Mo₂O₅(Hcit)₂]·4H₂O 和 K₆[Mo₂O₅(cit)₂]·5H₂O 的培养基中培养的固氮菌, 其菌体生长速率明显高于在 Burk's 培养基中的生长速率. 而在含 Na₂[MoO₂(Hcit)]·3H₂O 的培养基中培养的固氮菌的生长速率略高于

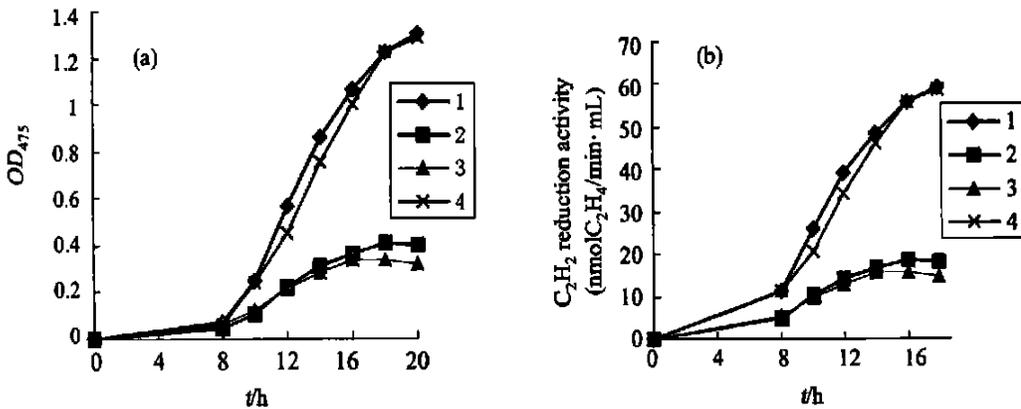


图 4 棕色固氮菌在含不同过渡金属化合物的改良的 Burk's 培养基中的生长曲线 (a) 和 C₂H₂ 还原活力曲线(b)

1: Na₂MoO₄; 2: Na₂WO₄; 3: Na₆[W₂O₅(cit)₂]·10H₂O; 4: V₂O₅

Fig. 4 The growth curves (a) and C₂H₂ reduction activity curves (b) of *A. vinelandii* cultured in modified Burk's medium containing different transient metal compounds

在 Burk' s 培养基中的生长速率. 在含 $K_4[MoO_3(cit)] \cdot 2H_2O$ 的培养基中培养的固氮菌的生长速率与前者相同(图 3 中未列出). 各种培养物的 C_2H_2 还原活性曲线的变化也表现了类似的规律.

2.4 不同过渡金属化合物对棕色固氮菌生长的影响

将经饥饿处理的固氮菌菌液按 1% 接种量分别接种于用 V_2O_5 , Na_2WO_4 及 $Na_6[W_2O_5(cit)_2] \cdot 10H_2O$ 等化合物取代钼酸钠和柠檬酸三钠的改良的 Burk' s 培养基中, 以 Burk' s 培养基培养物为对照, 培养 8 h 后每隔 2 h 取样测菌液的 OD 值, 同时取样测定其菌液的 C_2H_2 还原活力(图 4). 由图 4 可见, 在含 V_2O_5 的培养基中培养的固氮菌生长良好, 虽然其生长状况不如在钼酸钠存在的培养基中生长的状况好, 但这一结果与棕色固氮菌存在第 2 套固氮酶即 V-固氮酶的事实相符; 而在含 Na_2WO_4 和 $Na_6[W_2O_5(cit)_2] \cdot 10H_2O$ 的培养基中培养的固氮菌, 其菌体生长缓慢.

3 讨论

棕色固氮菌(还有其它固氮菌)含有钼贮存蛋白, 每分子钼贮存蛋白至少可以结合 15 个钼原子^[12], 贮存的钼量可超过固氮酶需钼量的 25 倍, 当贮存足量钼的固氮菌被移至缺钼的培养基时, 贮存的钼可被用于合成固氮酶. 因此, 将在 Burk' s 培养基(含 Na_2MoO_4) 中培养的棕色固氮菌, 经饥饿处理(图 1), 待细胞内贮存的钼等营养成分耗尽(约 8 h)后, 取其菌液作为种子液接入经不同改良的 Burk' s 培养基中, 比较菌液的生长速率可以消除原始培养基中的 Na_2MoO_4 、柠檬酸等有关成份的影响.

Hoover 等认为^[13], 当 MoO_4^{2-} 穿过细胞膜进入细胞后是与有机酸(如柠檬酸)形成复合物并在细胞内迁移的. 我们的实验结果证明了这一观点. 在用钼酸盐与柠檬酸的络合物作为钼源的培养基中, 棕色固氮菌的生长速率高于在 Burk' s 培养基中的生长速率, 而双钼的络合物比单钼的更好(图 3), 这可能与钼的迁移速率有关. 由此可以推测, 结合在钼贮存蛋白上的钼的形式可能是各种形式的钼酸盐-有机酸的络合物. 棕色固氮菌的饥饿处理过程显示, 菌体在无任何其它外源营养物质补充的情况下, 其 OD_{475} 仍能从 0.43 上升到 0.94, 其中氮源来源于菌体固氮, 铁来源于藏铁蛋白(Ferritin), 钼来源于钼贮存蛋白, 硫

可能来自于与铁和钼结合的含硫化合物. 另一方面, 根据 Allen 等的工作^[9], $FeMoCo$ 合成和钼的贮存以及蛋白合成在钼元素供应充足时应该是同时发生的过程. 由此我们可以推测这两种过程中钼的运输和装配形式应该是相似的, 氧代钼-有机酸络合物经还原(在 *nifH* 基因产物的作用下)为硫代钼-有机酸络合物的形式, 然后结合到 *NifB-co* 上或贮存于钼贮存蛋白上, 即钼贮存蛋白上钼的可能形式为硫代钼-有机酸的络合物, 这一点与固氮菌对铁的吸收过程(即先经过一个还原步骤)相似^[14]. 根据 Rangaraj 等的工作^[15], $FeMoCo$ 的前体最后结合在 *NifX* 上, *NifX* 参与了 $FeMoCo$ 对有机酸的特异性选择.

在用不同小分子有机酸代替柠檬酸的各种改良的 Burk' s 培养基中, 棕色固氮菌的生长速率有明显的差异. 在含高柠檬酸的培养基中菌体的生长速率明显高于含其它有机酸的培养基中菌体的生长速率, 例如含高柠檬酸的培养基中菌体 OD_{475} 值在 12 h 后为 0.480, 而在含柠檬酸的为 0.202, 含马来酸的为 0.323, 含苹果酸的为 0.450, 含乙醇酸的为 0.112. 在含不同有机酸的培养基中生长的菌体的 C_2H_2 还原活性表现类似的规律. 说明高柠檬酸的存在最有利于菌体的生长及固氮酶的合成. 它可能直接参与固氮酶铁钼辅基的合成. 在含苹果酸、马来酸和乙醇酸的培养基中培养的菌体生长速率依次递减, 可能是由于这些有机酸与钼酸盐的络合物的稳定性也是依次递减的; 而柠檬酸与高柠檬酸的结构比较相近, 在合成 $FeMoCo$ 的最后一步, 以高柠檬酸替换络合物中的有机酸时, 柠檬酸更不容易被高柠檬酸取代, 所以其菌体的生长速率及活性反而没有加入苹果酸或马来酸的培养基的高.

参考文献:

- [1] Mormingstar J E, Johnson M K, Case E E, et al. Characterization of the metal clusters in the nitrogenase molybdenum-iron and vanadium-iron proteins of *Azotobacter vinelandii* using magnetic circular dichroism spectroscopy [J]. *Biochemistry*, 1987, 26: 1775-1780.
- [2] Kim J, Rees D C. Nitrogenase and nitrogen fixation [J]. *Biochemistry*, 1994, 33: 381-397.
- [3] May H D, Dean D R, Newton W E. Altered nitrogenase MoFe proteins from *Azotobacter vinelandii*: analysis of MoFe proteins having amino acid substitutions for the conserved cysteine residues within the β -subunit [J]. *Biochemistry*, 1991, 27: 457-464.

- [4] Peters J W, Fisher K, Dean D R, et al. Involvement of the P-cluster in intramolecular electron transfer within the nitrogenase MoFe protein [J]. J. Biol. Chem., 1995, 270: 27 007- 27 013.
- [5] Kim J, Rees D C. Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor from *Azotobacter vinelandii* [J]. Nature, 1992, 360: 553 - 560.
- [6] Madden M S, Kindon N D, Ledeen P W, et al. Diastereomer-dependent substrate reduction properties of a dinitrogenase containing L-fluorohomocitrate in the iron-molybdenum cofactor [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87: 6 517- 6 521.
- [7] Allen R M, Chatterjee R, Ludden P W, et al. Incorporation of iron and sulfur from NifB cofactor into the iron-molybdenum cofactor of dinitrogenase [J]. J. Biol. Chem., 1995, 270: 26 890- 26 895.
- [8] Roll J T, Shah V K, Dean D R, et al. Characteristics of NifNE in *Azotobacter vinelandii* strains Implications for the synthesis of the iron-molybdenum cofactor of dinitrogenase [J]. J. Biol. Chem., 1995, 270: 4 432- 4 437.
- [9] Allen R M, Roll J T, Rangaraj P, et al. Incorporation of molybdenum into the iron-molybdenum cofactor of dinitrogenase [J]. J. Biol. Chem., 1999, 274: 15 869- 15 874.
- [10] Zhou Z H, Wan H L, Tsai K R. Synthesis and spectroscopic and structural characterization of molybdenum (VI) citrate monomeric raceme and dimer, $K_4 [MoO_3(Cit)] \cdot 2H_2O$ and $K_4 [(MoO_2)_2O(Hcit)_2] \cdot 4H_2O$ [J]. Inorg. Chem., 2000, 39: 59- 64.
- [11] 李季伦, 张伟心, 杨启瑞, 等主编. 微生物生理学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1988. 92- 94.
- [12] 曾定. 固氮生物学 [M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1987. 381.
- [13] Hoover T R, Imperial J, Ludden P W, et al. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase [J]. Biofactors, 1988, 1: 199- 205.
- [14] Mazoy R, Botana L M, Lemos M L. Iron uptake from ferric citrate by *Vibrio anguillarum* [J]. FEMS Microbiol. Lett., 1997, 154: 145- 150.
- [15] Rangaraj P, Ludden P W. Accumulation of Mo-containing iron-molybdenum cofactor precursors of nitrogenase on NifNE, NifH, and NifX of *Azotobacter vinelandii* [J]. J. Biol. Chem., 2002, 277: 40 106- 40 111.

The Effects of Citrate-molybdate Complex and Organic Acids on the Growth of *Azotobacter vinelandii* OP

YANG Sheng-li¹, LONG Min-nan¹, ZHOU Zhao-hui², XU Hui-juan¹,
HOU Shu-ya², ZHANG Feng-zhang¹, XU Liang-shu¹, WAN Hui-lin²

(1. The Key Lab. of Edu. Ministry for Cell Biol. and Tumor Cell Eng., School of Life Sciences,
2. Dept. of Chem., Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract *Azotobacter vinelandii* OP, after being treated in 0.9% NaCl solution for 8 h at 30°C, was cultured under different Burk's medium which was modified by substituting citrate with homocitric acid and some other organic acids or by replacing molybdate and citrate with different citrate-molybdate complexes including $K_6 [Mo_2O_5(cit)_2] \cdot 5H_2O$, $K_4 [Mo_2O_5(Hcit)_2] \cdot 4H_2O$, $Na_2 [MoO_2(Hcit)] \cdot 3H_2O$, to test the effects of these substances on the growth and the corresponding C_2H_2 reduction activity of bacteria cells. It is found that homocitric, malic, maleic acid and citrate-molybdate complexes could stimulate the growth of the *A. vinelandii* in different degree, while glycolic acid inhibited the growth of the *A. vinelandii*. Among several organic acids studied, the growth rate of *A. vinelandii* reached the highest in modified Burk's medium containing homocitric acid. Similar changing pattern was also observed in the C_2H_2 -reduction activity of different cultures.

Key words: *Azotobacter vinelandii*; citrate-molybdate complexes; organic acids; growth curve