

问题讨论

## 固氮酶催化还原 $C_2H_2$ 和 $N_2$ 的探讨

蔡 玉 奎

(中国科学院福建物质结构研究所,福州)

自从 Dilworth 等<sup>[1]</sup>发现固氮酶对  $C_2H_2$  的还原活性以来,用乙炔还原法研究生物固氮作用的文献大大超过  $^{15}N$  示踪的方法,这可能是前一方法更灵敏简便。近年来化学模拟生物固氮研究也把催化乙炔还原为乙烯的反应作为固氮酶活性中心模拟物络合活化底物的一种判据<sup>[2]</sup>,依其还原活性的大小推测模型物与固氮酶活性中心的相似程度,用以指导模型物的合成。

然而,固氮酶对乙炔的还原活性是否完全等同于固氮活性是值得商榷的,固氮酶活化还原乙炔的活性部位与活化还原  $N_2$  的部位是否一致至今尚不清楚。许多研究者用乙炔还原的方法来估计固氮活性的文章,常按照理论上  $C_2H_2/N_2$  等于“3”来计算氮的固定量,而 Burris 等曾对此提出异议,并建议研究者对自己的实验系统定出可行的换算系数。各实验室测得的  $C_2H_2/N_2(C_2H_4/NH_3)$  分子比率也有较大差别(见表 1)<sup>[3]</sup>,这些值与理论比率“3”不同的原因众

同,这是必须引起注意的。如果固氮酶活化氮分子与活化乙炔的机制不同,在化学模拟合成固氮酶活性中心原子簇化合物的研究中,能否以  $C_2H_2$  还原反应为探针就需进一步探讨。

### 一、 $C_2H_2$ 与 $N_2$ 还原时所需活化能不同

乙炔与  $N_2$  虽然都具有三重键,都是固氮酶的底物,但其键的性质有较大差别。卢嘉锡教授在提出固氮酶固氮活性中心的结构模型时,特别指出了氮分子中  $N \equiv N$  三重键具有异常惰性<sup>[4]</sup>,并说明了氮分子化学稳定性的结构成因。 $N \equiv N$  键长只有 1.0976 Å,而  $C_2H_2$  分子中的  $C \equiv C$  键长为 1.205 Å,  $N_2$  分子中  $N \equiv N$  三重键的第一键需要耗用特别大的能量才能把它裂解,所需能量可以用  $N \equiv N$  和  $N=N$  两个键能之差(等于  $225-100=125$  千卡/克分子,即 5.4 eV)来表示,比起  $C_2H_2$  的相应能量 47 千卡/克分子(即 2.0 eV)大了一倍以上。因此比  $C \equiv C$  三重键短得多的  $N \equiv N$  三重键,实际上要稳定得多,即要打开  $N \equiv N$  三重键实际要难得多。从  $N_2$  与  $C_2H_2$  的氧化还原电位也说明了同样的问题,图 1 为  $N_2$  与  $C_2H_2$  的氧化还原电位图,还原剂的氧化还原电位必须低于①线才具备热力学上把  $N_2$  还原为  $NH_4^+$  或  $NH_4OH$  的可能性,如果要求把  $N_2$  还原为  $NH_3$ ,则要求还原剂的氧化还原电位必须低于②线。而  $C_2H_2$  还原为  $C_2H_4$  的氧化还原电位(从自由能计算)与 pH 的关系如图中③线,表明从热力学上看,  $C_2H_2$  的还原比  $N_2$  的还原要容易得

表 1 实验上测得  $C_2H_2/N_2(C_2H_4/NH_3)$  的分子比率

体 系	$C_2H_2/N_2$ ( $C_2H_4/NH_3$ ) 的分子比率	体 系	$C_2H_2/N_2$ ( $C_2H_4/NH_3$ ) 的分子比率
理论值	3.0	克氏菌属	3.0
棕色固氮菌	2.7—6.0	豆科	1.5—8.4
梭状芽孢菌属	2.4—4.9	非豆科	2.0—2.8
红硫细菌属	3.4—3.5	固氮体系	3.0—6.9
大豆	2.8—3.9	离体大豆根瘤	2.7—4.2
固氮菌属	3.0—6.0	兰藻门	4.2—4.8

说不一,究竟是测定技术引起的误差(如色谱柱的分离不善)<sup>[4]</sup>,还是其活化还原机理的根本不

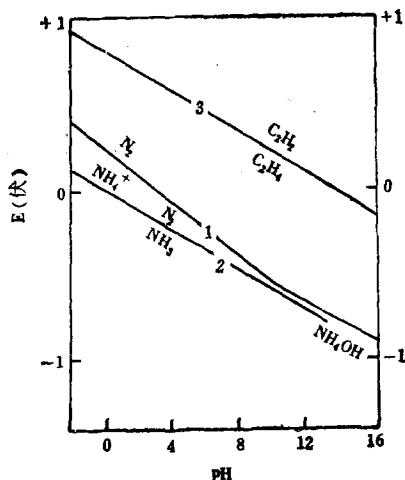


图1  $C_2H_2$  和  $N_2$  的氧化还原电位

### 三、 $C_2H_2$ 与 $N_2$ 还原的结果不同

$N_2$  在  $N \equiv N$  三重键被还原时, 没有发现  $NH=NH$  及  $NH_2-NH_2$  等中间产物, 而是三重键的彻底断裂, 而  $C_2H_2$  的还原产物是  $CH_2=CH_2$ , 仅打开三重键的第一道防线, 碳-碳键并不断裂。  $N_2$  在被还原后生成  $NH_3$ ,  $NH_3$  可继续被同化成蛋白质, 而  $C_2H_2$  的还原产物对微生物的代谢不起作用, 因此用  $C_2H_2$ 、 $N_2$  作底物测定固氮作用, 机制及结果可能有较大的不同。

### 四、 $C_2H_2$ 与 $N_2$ 所需的络合活化中心结构可能不同

卢嘉锡教授分析  $N_2$  的络合活化和还原加氢过程, 认为关键在于络合对  $N_2$  分子的活化作用, 提出了一个端基加上多侧基又能防止络合底物分子异构化的络合构型——固氮酶固氮活性中心的钼铁四核原子簇即“H型网兜”结构模型<sup>[9]</sup>。我们曾就这一结构模型的第一模型物——陆森黑盐(图2a)对  $C_2H_2$  及  $N_2$  的络合活化作用进行红外光谱跟踪观察<sup>[8]</sup>, 认为陆森黑盐与陆森红盐(图2b)对  $C_2H_2$  及  $N_2$  的催化

多<sup>[6]</sup>。在固氮酶反应的测定中, 已经知道, 每传递两个电子所需 ATP 的量对  $C_2H_2$  和  $N_2$  也是不同的<sup>[7]</sup>, 对于  $C_2H_2$ :  $ATP/2e = 4.3$  个分子, 而对于  $N_2$ :  $ATP/2e = 7$  个分子。一般认为 ATP 在固氮作用中, 由于高价磷酸键化合物水解时可以释放大能量, 用以进行电子活化和传递, 这似乎从实验证明了  $C_2H_2$  的还原比  $N_2$  还原容易得多, 所消耗能量也少得多。

### 二、 $C_2H_2$ 与 $N_2$ 所受抑制效应不同

固氮酶不同于一般酶, 它是一个多功能的氧化还原酶, 它能够在常温常压下催化  $N_2$  还原成  $NH_3$ , 还能催化许多底物的还原反应, 各种底物之间又存在错综复杂的抑制效应。在其他可还原底物不存在的情况下, 固氮酶催化放  $H_2$  反应。在  $C_2H_2$  存在下, 放  $H_2$  反应受到完全抑制。而  $N_2$  与  $C_2H_2$  不同, 它不能完全抑制  $H^+$  的还原放  $H_2$  反应。实验证明, 在大量  $N_2$  存在下, 每还原一个  $N_2$  也放出一个  $H_2$ 。  $N_2$  可以竞争性地抑制  $C_2H_2$  还原, 但是,  $C_2H_2$  却不能竞争性地抑制  $N_2$  的还原, 而是非竞争性地抑制  $N_2$  的还原, 又  $H_2$  只能竞争性地抑制  $N_2$  还原, 而不能抑制  $C_2H_2$  的还原。这些不同的抑制行为, 似乎也提示  $C_2H_2$  与  $N_2$  的络合部位不完全相同。

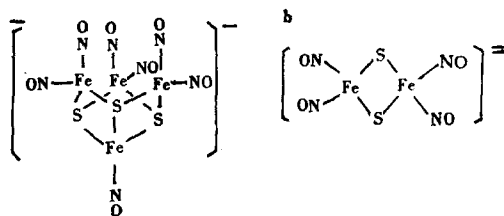


图2 陆森黑盐 (a) 和陆森红盐 (b) 结构式

表2 陆森黑盐和陆森红乙酯骨架中键长、键角比较

	$[(ON)_7Fe_4S_3]^-$	$[(NO)_4Fe_2(SEt)_2]$
Fe...Fe	2.70 Å [Fe(I)...Fe(II)] 3.57 Å [Fe(II)...Fe(II)]	2.72 Å
Fe—S	2.23 Å	2.26 Å
S...S	3.52 Å	3.61 Å
$\angle S-Fe-S$	106°	106°
$\angle Fe-S-Fe$	105° [ $\angle Fe(II)-S-Fe(II)$ ]	74°
$\angle Fe-S-Fe$	74° [ $\angle Fe(I)-S-Fe(II)$ ]	

还原行为不同。陆森黑盐与红盐具有基本相同的化学组份,而且骨架中相应原子间的键长、键角也十分靠近(见表2),仅是骨架的结构不同。陆森黑盐为四核网兜结构,陆森红盐为双核桥式结构,在  $\text{KBH}_4$  存在下,黑盐、红盐都能活化  $\text{C}_2\text{H}_2$  还原为  $\text{C}_2\text{H}_4$ , 但只有黑盐活化  $\text{N}_2$  并把  $\text{N}_2$  还原为  $\text{NH}_3$ , 这一实验是  $\text{N}_2$  的活化结构可能比  $\text{C}_2\text{H}_2$  要复杂些的初步旁证。炔烃的双核过渡金属络合物[如

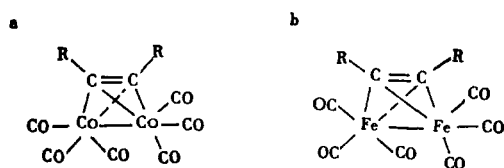
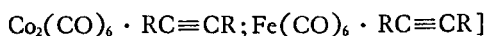


图3 炔烃多核络合物结构式

a.  $\text{Co}(\text{CO})_4 \cdot \text{RC}\equiv\text{CR}$   
 $\text{C}\equiv\text{C}$  键距为  $1.36 \text{ \AA}$

b.  $\text{Fe}(\text{CO})_5 \cdot \text{RC}\equiv\text{CR}$   
 $\text{C}\equiv\text{C}$  键距为  $1.31 \text{ \AA}$

的晶体结构分析确定这样的双核双侧基络合物(图3)已把  $\text{C}\equiv\text{C}$  键拉长至双键的键长(炔烃碳碳单、双和三键键距分别为  $1.53 \text{ \AA}$ 、 $1.34 \text{ \AA}$ 、 $1.20 \text{ \AA}$ )<sup>[9]</sup>, 说明这样的双核原子簇就已基本具备了活化  $\text{C}_2\text{H}_2$  的活性部位。

## 结 语

固氮酶可以催化  $\text{H}_3^+\text{O}$ 、 $\text{RC}\equiv\text{CH}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_3^-$ 、 $\text{N}_2$ 、 $\text{CH}_2=\text{C}=\text{CH}_2$ 、 $\text{RNC}$ 、 $\text{RCN}$  和  $\text{CN}^-$  ( $\text{HCN}$ ) 等多种底物的还原反应,而固氮酶钼铁蛋白中存在多个原子簇,这许多原子簇是协同组合成同一的活性中心对各底物起活化作用?或者各底物与各原子簇间有各自的偶合配对?

就  $\text{C}_2\text{H}_2$  与  $\text{N}_2$  而言,它们所要求活化条件相差甚远,所受抑制作用、还原产物都有较大不同,双核桥式结构的铁硫或铁钼硫原子簇已足以使乙炔活化,但却远不能活化  $\text{N}_2$ 。因此在化学模拟生物固氮的研究时要注意  $\text{C}_2\text{H}_2$  与  $\text{N}_2$  活化条件的区别。由于  $^{15}\text{N}$  技术比乙炔还原法困难和昂贵,而乙炔还原法的简单、灵敏,这使它一经发现便很快得到普及,并对生物固氮的研究起了极大的推进作用。应该承认,对于大多数整体细胞水平以上的生物固氮体系研究,它是非常可取的。但从细胞进入分子水平的研究采用此法时要特别注意,因为目前生化或化学模拟固氮酶活性中心的研究都已经达到分子水平,而乙炔可作为一种底物研究其还原机理,是一个低水平活化的指示剂,要真正了解一个活性中心化合物是否对异常惰性的  $\text{N}\equiv\text{N}$  三重键起了活化作用,必须在活化乙炔的基础上再进行  $^{15}\text{N}_2$  还原的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Dilworth, M. J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **127**, 285, 1966.
- [2] 张藩贤等:《厦门大学学报》, No. 2, 41, 1980.
- [3] Rennie, R. J. et al: "Isotopes in Biological Dinitrogen Fixation", Proceeding of an advisory group meeting, VIENNA, 21-25, No. v, pp. 107-131, 1977.
- [4] 蔡玉奎:《生物化学与生物物理进展》, No. 3, 58, 1984.
- [5] 卢嘉锡: *Nitrogen Fixation*, **1**, 341-371, 1980.
- [6] 厦门大学化学系固氮小组:《化学模拟生物固氮进展》, 第二集, 81-83 页, 1976.
- [7] Hwan, J. C. et al.: *Biochemica et Biophysica Acta* (Bioenergetics), **283**(2), 339, 1972.
- [8] 张琳娜等:《物构所通讯》, No. 1, 23, 1981.
- [9] Cotton, F. A. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **98** (7), 1774, 1976.

[本文于1985年9月28日收到]