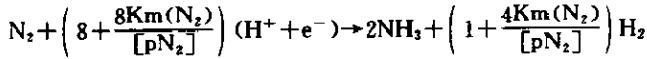


## 固氮酶催化的放 H<sub>2</sub> 反应\*

张振水 吴柏和 李季伦

(北京农业大学生物学院微生物专业,北京 100094)

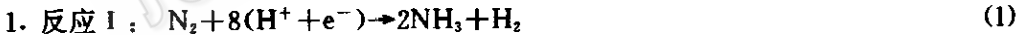
以不同来源的纯化固氮酶定量地研究了在不同 pN<sub>2</sub>(N<sub>2</sub> 分压)条件下,催化 N<sub>2</sub> 还原和 H<sub>2</sub> 释放的反应,并对两者之间的关系进行了动力学分析,得出了固氮酶催化 N<sub>2</sub> 还原和 H<sub>2</sub> 释放反应的化学计量式:



从而提出了双位点放 H<sub>2</sub> 的模式,并合理地解释了在正常条件下,每还原 1 摩尔 N<sub>2</sub> 总是放出大于 1 摩尔 H<sub>2</sub>,和 H<sub>2</sub> 是 N<sub>2</sub> 还原反应的竞争性抑制剂,而 N<sub>2</sub> 却是放 H<sub>2</sub> 反应的非竞争性抑制剂等难以理解的问题。

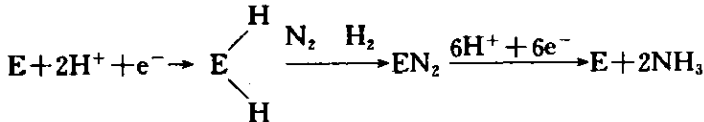
关键词:固氮酶;固氮反应;放氢反应;化学计量式

众所周知,固氮酶催化 N<sub>2</sub> 还原成 NH<sub>3</sub> 的同时要放 H<sub>2</sub>。当前被公认的固氮反应化学计量式为 N<sub>2</sub> + 8(H<sup>+</sup> + e<sup>-</sup>) → 2NH<sub>3</sub> + H<sub>2</sub><sup>[1-5]</sup>。据此计算式,每还原 1 摩尔 N<sub>2</sub> 成为 2 摩尔 NH<sub>3</sub> 的同时要放出 1 摩尔 H<sub>2</sub>,即 75% 的电子(能量)用于生成 NH<sub>3</sub>,25% 的电子用于放 H<sub>2</sub>。但实际上,在正常条件下,纯固氮酶催化放 H<sub>2</sub> 所消耗的电子却总是大于 25%<sup>[6]</sup>,即使在 50 大气压的 pN<sub>2</sub> 下,仍有 27% 的电子用于放 H<sub>2</sub><sup>[7]</sup>。这说明固氮酶还催化另外的放 H<sub>2</sub> 反应。迄今所知,固氮酶可催化四种放 H<sub>2</sub> 反应:



此反应最初由 Schrauzer 等<sup>[1]</sup>提出,其后其他学者进行了修正<sup>[2,3,5]</sup>,一般认为 H<sub>2</sub> 是

在 N<sub>2</sub> 与还原态的酶(  $\begin{matrix} H \\ | \\ E \\ | \\ H \end{matrix}$  )进行络合时被置换下来的。

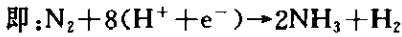


本文于 1992 年 12 月 4 日收到。

\* 国家教委博士点基金资助项目。

致谢:本文经厦门大学蔡启瑞教授、中国科学院上海植物生理学研究所沈善炯教授、中国科学院微生物研究所张树政教授及中国科学院生物物理研究所徐建兴研究员审阅,并提出宝贵意见。在研究工作过程中得到美国威斯康辛大学生化系 R. H. Barris 教授的指教,在此深表谢意。

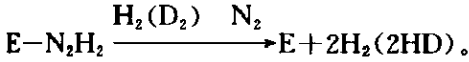
缩写:pN<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> 分压;Av1、Av2:分别代表棕色固氮菌的钼铁蛋白及铁蛋白;同理 Kp1 和 Kp2 与 Cp1 和 Cp2 分别代表肺炎克氏杆菌及巴氏梭菌的钼铁蛋白与铁蛋白。



此式是当前所公认的固氮反应式。此放 H<sub>2</sub> 反应是依赖 N<sub>2</sub> 的,而且每还原 1 摩尔 N<sub>2</sub> 必定放 1 摩尔 H<sub>2</sub>。此反应受 CO 抑制。



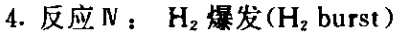
此反应是在 N<sub>2</sub> 还原过程中发生的,当 N<sub>2</sub> 被络合在酶上随即被还原成 E-N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>(不脱离酶的中间产物),在反应体系中有 H<sub>2</sub>(或 D<sub>2</sub>)时,使之降解成 N<sub>2</sub> 和 2H<sub>2</sub>(或 2HD),即:



放 H<sub>2</sub>(或 HD 形成)的量在一定范围内,随 pN<sub>2</sub> 增加而增加,当达到一定的 pH<sub>2</sub> 后, N<sub>2</sub> 反而抑制此反应<sup>[6]</sup>,当 pN<sub>2</sub> 达到 ∞ 时则完全被抑制<sup>[9]</sup>。此反应也受 CO 抑制。



在没有可还原的底物时,全部电子用于放 H<sub>2</sub>。因为此反应需要 ATP,故 Bulen 等<sup>[10]</sup>称此为依赖 ATP 的放 H<sub>2</sub> 反应,以区别由氢酶催化的可逆的放 H<sub>2</sub> 反应(不需 ATP)。此反应受 N<sub>2</sub> 抑制,但不受 CO 抑制。



Liang 和 Burris<sup>[11]</sup>认为 H<sub>2</sub> 爆发发生的固氮酶的前稳态期,即当固氮酶与反应物混合的初期。放 H<sub>2</sub> 量与反应体系中钼铁蛋白的 Mo 原子数相当。其后即建立起稳定态的催化反应。据此,他们认为 H<sub>2</sub> 爆发并非催化反应,而是一个激活过程。但 Lowe 和 Thorneley<sup>[12]</sup>则对 N<sub>2</sub> 与酶络合时置换 H<sub>2</sub> 的过程称为 H<sub>2</sub> 爆发(我们已将这种放 H<sub>2</sub> 列为反应 I)。

在上述四种放 H<sub>2</sub> 反应中,只有反应 I 和 II 是重要的。因为按照 Liang 和 Burris<sup>[11]</sup>的观点,反应 III 只发生在前稳态期,并非催化反应,而且放 H<sub>2</sub> 只相当于反应体系中钼铁蛋白 Mo 原子的数量。在一般反应体系中,钼铁蛋白的用量大约为 1nmol 左右,Mo 原子的数量则为 2nmol,所以由 H<sub>2</sub> 爆发所产生的 H<sub>2</sub> 量只不过 2nmol 左右,这与反应 30 分钟后由固氮酶所催化产生的 H<sub>2</sub> 量(一般为 1000nmol 以上)相比,可以忽略不计。此外,由反应 I 产生的 H<sub>2</sub> 量也有限,反应 30 分钟后的总放 H<sub>2</sub> 量也不过 0.2(kPa)左右,从 Li 和 Burris<sup>[8]</sup>的报道可知,在 pN<sub>2</sub> = 40(kPa), pD<sub>2</sub> = 0.2(kPa)时,经反应 30 分钟后,用于 HD 形成所消耗的电子尚不足总电子消耗的 1%,而总放 H<sub>2</sub> 所消耗的电子为 30%,二者相比,由 HD 生成方式产生的放 H<sub>2</sub> 量甚少,本文推导中未计。

尽管前人已研究了反应 I 和反应 II,但大多是分别独立论述的,而对两者之间的关系却未被重视。文献中常是笼统地提固氮酶催化的放 H<sub>2</sub> 而不加区分,容易引起混乱,对有些现象难以解释,如 H<sub>2</sub> 是固氮的竞争性抑制剂,而 N<sub>2</sub> 却是放 H<sub>2</sub> 反应的非竞争性抑制剂;以及在一般正常条件下,由固氮酶催化的放 H<sub>2</sub> 量却总是大于 N<sub>2</sub> 被还原的量,并不符合当前公认的固氮酶催化的 N<sub>2</sub> 还原和放 H<sub>2</sub> 反应的化学计量式。

为了进一步了解固氮酶的催化反应机制,我们用来自不同生态型的纯固氮酶定量研究了其在不同 pN<sub>2</sub> 下所催化的 N<sub>2</sub> 还原和放 H<sub>2</sub> 反应,并从动力学上论证了放 H<sub>2</sub> 反应 I 和反应 II 两者之间的定量关系。从而提出了固氮酶同时催化的 N<sub>2</sub> 还原及放 H<sub>2</sub> 反应的化学计量式和双位点放 H<sub>2</sub> 的反应模式,较合理地解答了上述的问题。

## 材料和方法

### (一) 菌株

棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii* OP) (简称 Av); 肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae* M5al) (简称 Kp); 巴氏梭菌 (*Clostridium pasteurianum* W5) (简称 Cp), 均由 R. H. Burris 实验室提供。

### (二) 方法

固氮酶的分离与纯化, 酶活测定,  $N_2$  还原及放  $H_2$  研究的方法均采用了 Li 和 Burris<sup>[8]</sup> 所报道的方法。

酶反应是在最适条件下进行的; 钼铁蛋白与铁蛋白的摩尔比为 1:4-5, 反应温度为 30℃, 反应时间为 20 分钟, 每毫升反应液内含: 40mmol/L Mops-KOH 缓冲液 (pH7.0), 5mmol/L ATP, 10mmol/L  $MgCl_2$ , 20mmol/L 连二亚硫酸钠, 40mmol/L 磷酸肌酸, 0.2mg 磷酸肌酸激酶。

## 结 果

### (一) $pN_2$ 对 Av、Kp 和 Cp 固氮酶催化的 $NH_3$ 生成及放 $H_2$ 反应的影响

研究表明, 随着  $pN_2$  的增加, 固氮酶用于放  $H_2$  所消耗的电子逐渐减少, 而用于  $NH_3$  生成所消耗的电子逐渐增加 (图 1、2 和 3)。在  $pN_2=100$  (kPa) 时, 仍有 32%、34% 和 29% 的电子分别用于 Av、Kp 和 Cp 固氮酶的放  $H_2$ , 均大于式 (1) 给出的理论值 (25%)。

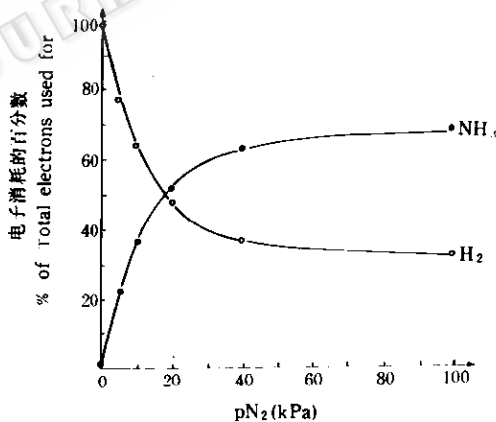


图 1  $pN_2$  对棕色固氮菌固氮酶催化的  $NH_3$  生成及放  $H_2$  反应的影响

Fig. 1 Effect of  $pN_2$  on  $NH_3$  formation and  $H_2$  evolution by nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* Av1, 180 $\mu$ g; Av2, 225 $\mu$ g; Av1 specific activity, 1700nmol of  $C_2H_2$  reduced  $\cdot$  min<sup>-1</sup>. (mg of protein)<sup>-1</sup>; Av2 specific activity, 1600 nmol of  $C_2H_2$  reduced  $\cdot$  min<sup>-1</sup>. (mg of protein)<sup>-1</sup>

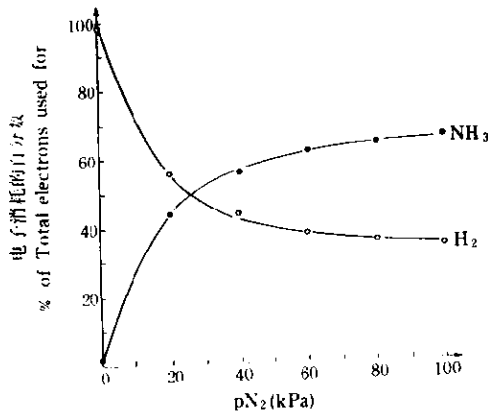


图 2 pN<sub>2</sub> 对肺炎克氏杆菌固氮酶催化的 NH<sub>3</sub> 生成及放 H<sub>2</sub> 反应的影响

Fig. 2 Effect of pN<sub>2</sub> on NH<sub>3</sub> formation and H<sub>2</sub> evolution by nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae* Kp1, 220μg; Kp2, 288μg; Kp1 specific activity, 1512 nmol of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduced · min<sup>-1</sup> · (mg of protein)<sup>-1</sup>; Kp2 specific activity, 1008 nmol of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduced · min<sup>-1</sup> · (mg of protein)<sup>-1</sup>

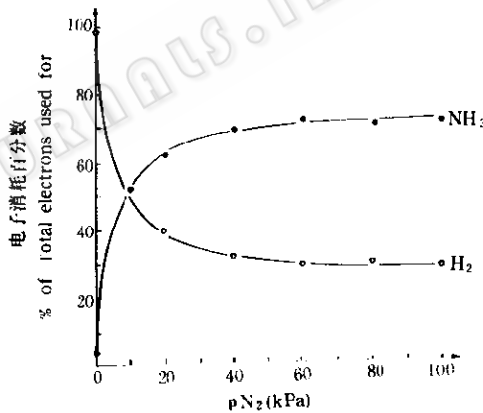


图 3 pN<sub>2</sub> 对巴氏梭菌固氮酶催化的 NH<sub>3</sub> 生成及放 H<sub>2</sub> 反应的影响

Fig. 3 Effect of pN<sub>2</sub> on NH<sub>3</sub> formation and H<sub>2</sub> evolution by nitrogenase from *Clostridium pasteurianum* Cp1, 180μg; Cp2, 180μg; Cp1 specific activity, 1096 nmol of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduced · min<sup>-1</sup> · (mg of protein)<sup>-1</sup>; Cp2 specific activity, 1733 nmol of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduced · min<sup>-1</sup> · (mg of protein)<sup>-1</sup>

## (二) 固氮酶催化 N<sub>2</sub> 还原反应的动力学

由于在研究固氮酶催化的底物浓度与反应速度试验中没有发现起始延迟现象 (Hwang 等<sup>[13]</sup>, Rivera-Ortiz 和 Burris<sup>[14]</sup>, Li 和 Burris<sup>[8]</sup>, Jensen 和 Burris<sup>[9]</sup>), 并且 Hwang 等, Rivera-Ortiz 和 Burris 及 Guth 和 Burris<sup>[15]</sup>曾利用 Lineweaver-Burk plot (双

倒数作图法)研究了固氮酶的各种可还原底物之间的关系,故我们也采用此法对图1、2和3进行了处理(见图4),求得 $A_v$ 、 $K_p$ 及 $C_p$ 固氮酶的 $K_m(N_2)$ 分别为12.5(kPa)、13.5(kPa)和4.8(kPa)。在 $pN_2 = \infty$ 时,用于 $NH_3$ 形成所消耗的电子百分数 $[V_{max}(NH_3\%)]$ 分别为79.0%( $A_v$ )、75.5%( $K_p$ )和76.8%( $C_p$ ),接近由 $N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$ 所给出的 $NH_3$ 消耗电子的理论值75%,由此可见,此化学计量式只是在 $pN_2 = \infty$ 时,才适合固氮酶所催化的 $N_2$ 还原及放 $H_2$ 反应。

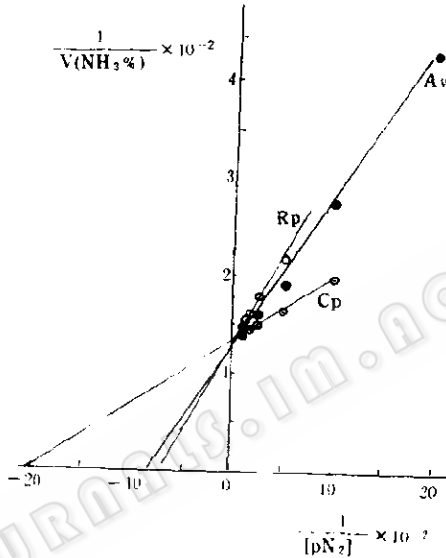


图4  $V(NH_3\%)$  与  $pN_2$  的双倒数作图

Fig. 4 Double-reciprocal plot of  $V(NH_3\%)$  and  $pN_2$   
 $K_m(N_2)$ :  $A_v$ , 12.5(kPa);  $K_p$ , 13.5(kPa);  $C_p$ , 4.8(kPa)

由米氏酶反应方程及  $V_{max}(NH_3\%) = 75\%$  的理论值可给出不同  $pN_2$  下用于  $NH_3$  形成所消耗的电子百分数  $[V(NH_3\%)]$  的计算式:

$$V(NH_3\%) = \frac{75\% [pN_2]}{K_m(N_2) + [pN_2]} \quad (4)$$

据此,则用于放  $H_2$  所消耗的电子百分数  $[V(H_2\%)]$  的计算式应为:

$$V(H_2\%) = 100\% - \frac{75\% [pN_2]}{K_m(N_2) + [pN_2]} \quad (5)$$

根据式(4)计算的结果与试验结果比较,两者基本一致(见表1)。

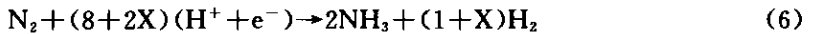
表 1 不同 pN<sub>2</sub> 下,不同来源的固氮酶用于 NH<sub>3</sub> 生成所消耗的电子百分数Table 1 The percentage of electrons used for NH<sub>3</sub> formation under different pN<sub>2</sub> by various nitrogenases

固氮酶 Nitrogenase	pN <sub>2</sub> (kPa)	实验值(V(NH <sub>3</sub> %)) Experimental value	计算值 V(NH <sub>3</sub> %) Calculated value
Av 固氮酶 Av N <sub>2</sub> ase	5	23	21
	10	36	33
	20	49	46
Kp 固氮酶 Kp N <sub>2</sub> ase	40	58	57
	100	68	67
	20	44	45
Cp 固氮酶 Cp N <sub>2</sub> ase	40	56	56
	60	62	61
	80	64	64
Cp 固氮酶 Cp N <sub>2</sub> ase	100	66	66
	10	51	50
	20	61	60
Cp 固氮酶 Cp N <sub>2</sub> ase	40	68	67
	60	71	69
	80	70	71
	100	71	71

由此表明,在最适条件下,固氮酶催化的 N<sub>2</sub> 还原反应,基本上遵循酶米氏反应规律,说明式(4)是可以成立的。

### (三) 固氮酶催化 N<sub>2</sub> 还原与放 H<sub>2</sub> 反应的化学计量式推导

试验数据表明,在  $0 < pN_2 \leq 100$  (kPa) 范围内,在还原 1 摩尔 N<sub>2</sub> 的同时所放 H<sub>2</sub> 的摩尔数总是大于 1,那么除了  $N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$  这条放 H<sub>2</sub> 反应 I 途径外,必定还有另外的放 H<sub>2</sub> 途径。从前言阐述中可知在 N<sub>2</sub> 还原的同时(固氮的最适条件下)放 H<sub>2</sub> 主要来自放 H<sub>2</sub> 反应 I 与放 H<sub>2</sub> 反应 II,因此设 X 为放 H<sub>2</sub> 反应 II 在 1 摩尔 N<sub>2</sub> 还原的同时所放 H<sub>2</sub> 的摩尔数,则在 1 摩尔 N<sub>2</sub> 还原的同时,由放 H<sub>2</sub> 反应 I 与反应 II 共放 H<sub>2</sub>(1+X) 摩尔,于是有下式:



由式(6)可给出总放 H<sub>2</sub> 所消耗的电子百分数(V(H<sub>2</sub>%)):

$$V(H_2\%) = \frac{2 \cdot (1+X)}{8+2X} \times 100\% \quad (7)$$

因为式(5)=式(7),两式联立,化简得:

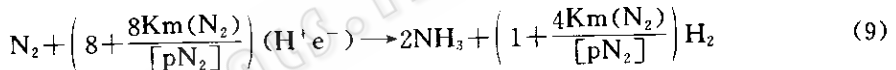
$$X = \frac{4Km(N_2)}{[pN_2]} \quad (8)$$

式(8)表明,在 1 摩尔 N<sub>2</sub> 还原的同时,放 H<sub>2</sub> 反应 I 与反应 II 的放 H<sub>2</sub> 量与 Km(N<sub>2</sub>) 成正比,与 pN<sub>2</sub> 成反比,这与试验结果是一致的(图 1、2 和 3 及表 2)。

表 2 不同  $pN_2$  下,  $H_2/N_2$  的实验值与理论计算值的比较Table 1 Comparison of  $H_2/N_2$  value between experiment and calculation under different  $pN_2$ s

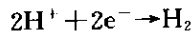
固氮酶 Nitrogenase	$pN_2$ (kPa)	实验值( $H_2/N_2$ ) Experimental value	计算值( $H_2/N_2$ ) Calculated value
Av 固氮酶	5	10.0	11.0
	10	5.4	6.0
	20	3.1	3.5
Av $N_2$ ase	40	2.1	2.3
	100	1.4	1.5
	20	3.6	3.7
Kp 固氮酶	40	2.4	2.3
	60	2.0	1.9
	80	1.6	1.7
Kp $N_2$ ase	100	1.5	1.5
	10	2.8	3.0
	20	1.9	2.0
Cp 固氮酶	40	1.4	1.5
	60	1.2	1.3
	80	1.3	1.3
Cp $N_2$ ase	100	1.2	1.2

将式(8)代入式(6), 得出还原 1 摩尔  $N_2$  的同时, 放  $H_2$  反应 I 与反应 III 同时放  $H_2$  的化学计量式:



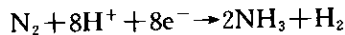
根据式(9)计算的不同  $pN_2$  下的  $H_2/N_2$  值与试验得出的  $H_2/N_2$  值相比, 两者基本相符(表 2), 说明式(9)是可以成立的。

当  $pN_2=0$  时, 此时既无  $N_2$  还原反应, 又无放  $H_2$  反应 I 的放  $H_2$ , 则式(9)为:



此时放  $H_2$  全部来自放  $H_2$  反应 III。Hwang 等<sup>[13]</sup>及本实验室也得了同样的实验结果, 即在无其它可还原底物时, 或有可还原底物而有 CO 时, 放  $H_2$  量是一样的。

当  $pN_2=\infty$  时, 则式(9)为:



这表明, 此时放  $H_2$  反应 III 已被  $N_2$  完全抑制,  $H_2$  则全部由放  $H_2$  反应 I 产生。

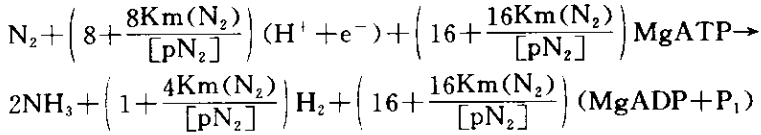
当  $0 < pN_2 < \infty$  时, 式(9)表明放  $H_2$  反应 I 与反应 III 两条途径同时进行, 在 1 摩尔  $N_2$  被还原的同时, 应放出  $\left( 1 + \frac{4Km(N_2)}{[pN_2]} \right)$  摩尔  $H_2$ 。

## 讨 论

### (一) 固氮反应所消耗的能量

由于固氮酶在催化  $N_2$  还原的同时要放  $H_2$ , 而且至少有两种放  $H_2$  反应, 因此按照 Schrauzer 等人提出的  $[N_2 + 8(H^+ + e^-) \rightarrow 2NH_3 + H_2]$  化学计量式来计算能量的消耗, 则是每还原 1 摩尔  $N_2$  要消耗 16 摩尔 ATP (按每传递 1 个电子消耗 2 个 ATP 计算<sup>[16]</sup>),

这个数值是偏低的,前人的试验已说明了这一点<sup>[17-19]</sup>。如果考虑到还有放 H<sub>2</sub> 反应 III,那么固氮酶所催化的反应将遵循以下的计量式:



因为在单位时间内所消耗的总电子数(或能量)是恒定的,用于 N<sub>2</sub> 还原和放 H<sub>2</sub> 的电子分配应随 pN<sub>2</sub> 和酶的 K<sub>m</sub>(N<sub>2</sub>)的大小而变化。pN<sub>2</sub> 越高,消耗的能量越低。当 pN<sub>2</sub>=∞ 时,ATP/N<sub>2</sub> 才达到最小值 16,此外,酶的 K<sub>m</sub>(N<sub>2</sub>)越小,对 N<sub>2</sub> 的亲合力越高,分配给 N<sub>2</sub> 还原的电子也越多。Cp 固氮酶的 K<sub>m</sub>(N<sub>2</sub>)比 Av 和 Kp 都低,所以 N<sub>2</sub> 还原的效率,放 H<sub>2</sub> 量比 Av 和 Kp 都相对要少。

(二) 固氮酶双位点催化的放 H<sub>2</sub> 反应模型

由于 CO 抑制 N<sub>2</sub> 还原反应,而放 H<sub>2</sub> 反应 I 正是在 N<sub>2</sub> 还原过程中产生的,故 CO 也抑制放 H<sub>2</sub> 反应 I,又因为 CO 不抑制放 H<sub>2</sub> 反应 III<sup>[13]</sup>,故推测放 H<sub>2</sub> 反应 I 与放 H<sub>2</sub> 反应 III 应是由固氮酶的两个不同位点催化的。

放 H<sub>2</sub> 反应 III 不在 N<sub>2</sub> 还原点的另一个证据是,H<sup>+</sup>是在固氮酶处于较低的还原态下即可被还原为 H<sub>2</sub>,而 N<sub>2</sub> 则不能被还原;只有当固氮酶处于高还原态时,N<sub>2</sub> 才可被还原成 NH<sub>3</sub><sup>[20,21]</sup>。在此,本文提出一个由固氮酶两个位点催化的放 H<sub>2</sub> 反应模型(图 5)。

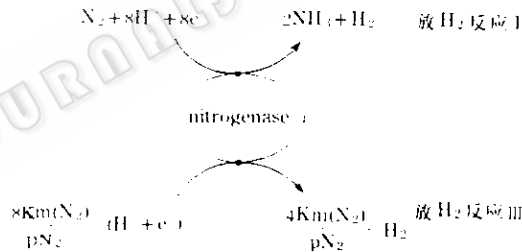


图 5 固氮酶双位点催化的放 H<sub>2</sub> 反应模型

Fig. 5 The two sites model of H<sub>2</sub> evolution catalyzed by nitrogenase

此模型的工作方式为:当 pN<sub>2</sub>=0 时,只有放 H<sub>2</sub> 反应 III 的放 H<sub>2</sub>;当 pN<sub>2</sub>=∞ 时,只有放 H<sub>2</sub> 反应 I 的放 H<sub>2</sub>;当 0 < pN<sub>2</sub> < ∞ 时,两条放 H<sub>2</sub> 途径同时进行,伴随 1 摩尔 N<sub>2</sub> 还原的同时,共放  $\left( 1 + \frac{4K_m(N_2)}{[pN_2]} \right)$  摩尔 H<sub>2</sub>。

此模型与前人提出的固氮酶催化位点的模型<sup>[4,22]</sup>的区别在于:除了有质子还原位点的放 H<sub>2</sub> 外(放 H<sub>2</sub> 反应 III),在 N<sub>2</sub> 还原位点上还有放 H<sub>2</sub> 反应 I 的放 H<sub>2</sub> (在 Burris 等所提出的模型中,N<sub>2</sub> 还原位点只催化 N<sub>2</sub> + 6(H<sup>+</sup> + e<sup>-</sup>) → 2NH<sub>3</sub> 的 N<sub>2</sub> 还原反应,而没有 H<sub>2</sub> 的释放)。这样就可解释在 pN<sub>2</sub>=∞ 时,N<sub>2</sub> 不能完全抑制放 H<sub>2</sub> 的现象,这是由于此时尽管放 H<sub>2</sub> 反应 III 已被完全抑制,但是 N<sub>2</sub> 不抑制放 H<sub>2</sub> 反应 I 的放 H<sub>2</sub>,此时仍有 25% 电子



用于放  $H_2$ 。

另外,此模型与解释还原 1 摩尔  $N_2$  放 1 摩尔  $H_2$  的单位点模型<sup>[1-5]</sup>的区别在于:在  $0 < pN_2 < \infty$  时,固氮酶催化的放  $H_2$  是由放  $H_2$  反应 I 与反应 III 两条途径同时产生的(在单位点模型中,在  $N_2$  还原的同时只有反应 I 的放  $H_2$ )。这样,就解释了每还原 1 摩尔  $N_2$  的同时要放出大于 1 摩尔  $H_2$  的事实。

关于放  $H_2$  反应 I 与放  $H_2$  反应 III 的位点问题,Stiefel<sup>[2]</sup>认为,Mo 是  $H^+$  还原的位点,Fe 是  $N_2$  还原及放  $H_2$  反应 I 的位点,而 Chatt<sup>[5]</sup>则推测  $H^+$  还原与  $N_2$  还原及放  $H_2$  反应 I 都发生在 Mo 原子上,对于这个问题,还有待进一步研究论证。

### (三) 固氮和放 $H_2$ 的反应途径

按照 Liang 和 Burris<sup>[11]</sup>的观点,放  $H_2$  反应 IV 只发生在前稳态期,而在稳态期此反应不再进行(即其为非催化反应)。此反应与反应 I、II 和 III 并不同时进行,后三者在前稳态期则可同时进行<sup>[3,8,9]</sup>。现将放  $H_2$  反应 I、II 和 III 归纳于图 6。

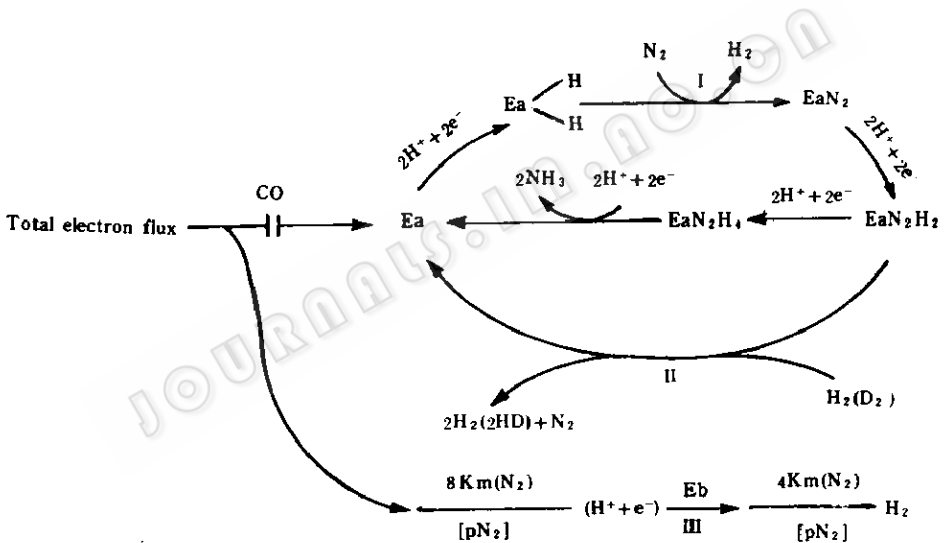


图 6 固氮与放氢的途径

Ea: 固氮酶的固氮与放  $H_2$  反应 I 和反应 II 的催化位点

Eb: 固氮酶的放  $H_2$  反应 III 的催化位点

Fig. 6 The pathway of nitrogen fixation and  $H_2$  evolution by nitrogenase

Ea: The site of nitrogen fixation and  $H_2$  evolution I and II on nitrogenase

Eb: The site of  $H_2$  evolution III on nitrogenase

在这些反应途径中(图 6),放  $H_2$  反应 I 和 II 与放  $H_2$  反应 III 是分别由固氮酶的 Ea 和 Eb 两个位点催化的。由电子流传出的电子,在放  $H_2$  反应 I、II 和 III 之间的分配是按如下方式进行的,电子的第一次分配发生在 Ea 和 Eb 位点之间。由于  $H_2(D_2)$  不抑制  $H^+$  还原(即放  $H_2$  反应 III)<sup>[13]</sup>,所以在 Ea 和 Eb 之间的电子分配只取决于  $pN_2$  及  $Km(N_2)$  两个因素。 $pN_2$  越高, $Km(N_2)$  越小,分配到 Ea 位点的电子也越多。反之,则分配到

Eb 位点的电子就越多。

分配到 Ea 位点的电子在  $EaN_2H_2$  水平上,将进行第二次分配,影响电子流向  $NH_3$  生成或流向放 H<sub>2</sub> 反应 I (放 H<sub>2</sub> (或 HD 形成)) 的因素是  $pN_2$ 、 $K_m(N_2)$  及  $pH_2$  (或  $pD_2$ ) 和  $K_i(H_2)$  (或  $K_i(D_2)$ )。当  $pN_2$  为常量时,  $pH_2$  (或  $pD_2$ ) 越高,  $K_i(H_2)$  (或  $K_i(D_2)$ ) 越小,  $K_m(N_2)$  越大,分配到放 H<sub>2</sub> 反应 I 的电子也越多。反之则分配到  $NH_3$  形成方向的电子就越多。当  $pH_2$  (或  $pD_2$ ),  $K_i(H_2)$  (或  $K_i(D_2)$ ) 和  $K_m(N_2)$  为定值时,在一定  $pN_2$  范围内,随  $pN_2$  的增加,放 H<sub>2</sub> (或 HD 形成) 所消耗的电子也增加,但当达到一定的  $pN_2$  时,  $N_2$  则对放 H<sub>2</sub> 反应 I 起抑制作用,随  $pN_2$  的增加,用于放 H<sub>2</sub> (或 HD 形成) 的电子则减少,而用于  $NH_3$  形成所消耗的电子则增加<sup>[6,9,15]</sup>。

根据这些反应途径之间的关系,就可以解释为什么 H<sub>2</sub> (或 D<sub>2</sub>) 是  $N_2$  还原的竞争性抑制剂,而  $N_2$  是放 H<sub>2</sub> 的非竞争性抑制剂的问题。这是由于  $N_2$  还原与放 H<sub>2</sub> 反应 I 是在 Ea 同一位点被催化,而  $N_2$  还原与放 H<sub>2</sub> 反应 II 则是分别由 Ea 与 Eb 两个位点催化的。事实上,  $N_2$  对放 H<sub>2</sub> 的非竞争性抑制,应是指对放 H<sub>2</sub> 反应 II 的抑制。

### 参 考 文 献

- [1] Schrauzer, G. N. et al. ; *J. Am. Chem. Soc.* , **96**: 641-652, 1974.
- [2] Stiefel, E. I. ; *Recent Developments in Nitrogen Fixation*, p. 69-108, (eds. Newton, W. E. et al.), Academic Press, London, 1977.
- [3] Newton, W. E. et al. ; *ibid.* , p. 119-130, 1977.
- [4] Orme-Johnson, W. E. et al. ; *ibid.* , p. 131-178, 1977.
- [5] Chatt, J. ; *Nitrogen Fixation*, Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur. , p. 1-18, (eds. Stewart, W. D. P. ), 18th, Academic Press, London, 1980.
- [6] Hadfield, K. L. et al. ; *Biochemistry*, **8**: 5103-5108, 1969.
- [7] Simpson, F. B. et al. ; *Science*, **224**: 1095-1097, 1984.
- [8] Li, J. L. et al. ; *Biochemistry*, **22**: 4472-4480, 1983.
- [9] Jensen, B. B. et al. ; *Biochemistry*, **24**: 1141-1147, 1985.
- [10] Bulen, W. A. et al. ; *Proc. natl. Acad. Sci. U. S. A.* , **53**: 532-539, 1965.
- [11] Liang, J. H. et al. ; *ibid.* , **85**: 9446-9450, 1988.
- [12] Lowe, D. J. et al. ; *Biochem. j.* , **224**: 877-886, 1984.
- [13] Hwang, J. C. et al. ; *Biochim. Biophys. Acta*, **292**: 256-270, 1973.
- [14] Rivera-Ortiz, J. M. et al. ; *J. Bacteriol.* , **123**: 537-545, 1975.
- [15] Guth, J. H. et al. ; *Biochemistry*, **22**: 5111-5122, 1983.
- [16] Watt, G. D. et al. ; *Biochemistry*, **16**: 264-270, 1977.
- [17] Schubert, K. R. et al. ; *Recent Developments in Nitrogen Fixation*, p. 469-486, (eds. Newton, W. E. et al.), Academic Press, London, 1977.
- [18] Hill, S. ; *Journal of General Microbiology*, **95**: 297-312, 1976.
- [19] Yates, M. G. et al. ; *Nitrogen Fixation*, **1**: 95-109, (eds. Newton, W. E. ), University Park Press, Baltimore, 1980.
- [20] Silverstein, R. et al. ; *Biochemistry*, **9**: 3809-3815, 1970.
- [21] Hageman, R. V. et al. ; *Biochim. Biophys. Acta*, **591**: 63-75, 1980.
- [22] Burris, R. H. ; *Plant Physiol.* , **54**: 443-449, 1974.

## MECHANISM OF H<sub>2</sub> EVOLUTION BY NITROGENASE

Zhang Zhenshui Wu Baihe Li Jilun

(Department of Microbiology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

A modified stoichiometric equation for biological nitrogen fixation,  $N_2 + \left(8 + \frac{8K_m(N_2)}{[pN_2]}\right) (H^+ + e^-) \rightarrow 2NH_3 + \left(1 + \frac{4K_m(N_2)}{[pN_2]}\right) H_2$ , is proposed based upon quantitative study on  $N_2$  reduction and  $H_2$  evolution by purified nitrogenase (from *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*) under optimal conditions and by kinetic analysis of the interrelationship between these two reactions. In this equation, the  $H_2/N_2$  ratio is not a constant as the current stoichiometric equation,  $N_2 + 8(H^+ + e^-) \rightarrow 2NH_3 + H_2$ , has shown. The amount of  $H_2$  evolved during nitrogen fixation is variable, it is directly proportional to the apparent  $K_m(N_2)$  of the nitrogenase ( $K_m N_2$  for  $A_v N_2$ ase is 12.5 kPa, for  $K_p N_2$ ase is 13.5 kPa, for  $C_p N_2$ ase is 4.8 kPa) and inversely proportional to  $pN_2$ . When  $pN_2 = 0$ , the equation changes to  $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ ; if  $pN_2 = \infty$ , it changes to  $N_2 + 8(H^+ + e^-) \rightarrow 2NH_3 + H_2$ . A double-site model for  $H_2$  evolution catalyzed by nitrogenase is suggested. One site catalyzes  $H_2$  evolution accompanying  $N_2$  reduction, and one  $H_2$  evolved per  $N_2$  reduced. This reaction is inhibited by CO or  $H_2$ . The other site only catalyzes  $H_2$  evolution which is inhibited by  $N_2$  but not inhibited by CO or  $H_2$ , and the amount of  $H_2$  evolved is equal to  $4K_m(N_2)/[pN_2]$ . It is easy to explain, by this model, why more than one  $H_2$  evolved per  $N_2$  reduced and why  $N_2$  is an uncompetitive inhibitor for  $H_2$  evolution, whereas  $H_2$  is a competitive inhibitor for  $N_2$  reduction.

**Key words** Nitrogenase; Reaction of Nitrogen Fixation; Reaction of Hydrogen Evolution; Stoichiometric Equation