

* 专题评述 *

固氮酶催化机制及化学模拟 生物固氮研究进展*

王友绍^{①②} 李季伦^①

(①中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; ②莱阳农学院, 莱阳 265200)

摘要 综述了固氮酶催化机制及化学模拟生物固氮研究的最新进展和问题。根据固氮酶在生理条件下, 具有固氮和放氢双重功能的事实, 认为在研究确定 N_2 络合和还原位点的同时, 也应确定 H^+ 还原成 H_2 的位点, 才能为化学模拟生物固氮提供全面信息, 以指导化学模拟物的设计与合成; 并提出组成固氮酶活性中心原子簇的 $[FeS_3Fe_3]$ 和 $[MoS_3Fe_3]$ 可能分别是 N_2 还原和 H^+ 还原位点的设想。此设想如经验证, 将会简化模拟物的化学合成, 可望加速实现在较温和的条件下 ($< 300^\circ C$, $< 5066\text{ kPa}$ (50 atm)) 将 N_2 还原成 NH_3 。

关键词 固氮酶 铁钼辅因子 催化机制 化学模拟

生物固氮在自然界氮素循环中起着重要作用, 据估计全球每年所固定的 N_2 量约达 2 亿吨^[1], 为生物生长繁殖提供了大量氮素。生物固氮是由固氮微生物体内的固氮酶在常温常压下将 N_2 还原成 NH_3 的^[2], 而化学合成 NH_3 则需要高温 (350 或 $500^\circ C$) 和高压 ($50\ 662$ 或 $35\ 464\text{ kPa}^1$) 下进行, 消耗大量能源并污染大气。因此, 研究固氮酶催化机制及化学模拟生物固氮, 不仅在生命科学和化学催化科学上理论意义重大, 而且对农业持续发展和环境保护将会产生深远影响。近年来, 由于全世界面临能源、粮食、人口和环境等问题的挑战, 生物固氮的研究在各国都受到重视, 其进展十分迅速。本文着重综述固氮酶的催化机制及其化学模拟研究的新进展和存在的问题。

1 固氮酶的组成、结构与功能

1.1 固氮酶的组成

固氮酶(Nitrogenase)是由钼铁蛋白和铁蛋白组成的复合体。这两种蛋白单独存在时都不呈现固氮酶活性, 只有两者形成复合体后才具有还原氮的能力。固氮酶对氧极敏感, 浓度大于 1×10^{-6} 的 O_2 就使其失活。钼铁蛋白也称组分 1 或二氮酶(Dinitrogenase); 铁蛋白也称组分 2

1999-08-17 收稿, 1999-11-22 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 39970006)、农业生物技术国家重点实验室和国家博士后科学基金资助项目

1) $1\text{ atm} = 101.325\text{ kPa}$

或二氮酶还原酶(Dinitrogenase reductase)。为了区分不同来源的固氮酶组分,常以固氮微生物的属名和种名的第 1 个拉丁字母代表不同来源的微生物,以 1 和 2 分别代表钼铁蛋白和铁蛋白。例如 Av1 是指 *Azotobacter vinelandii* 的钼铁蛋白, Cp2 是指 *Clostridium pasteurianum* 的铁蛋白等。

1.2 固氮酶的结构与功能

1.2.1 二氮酶(Dinitrogenase)

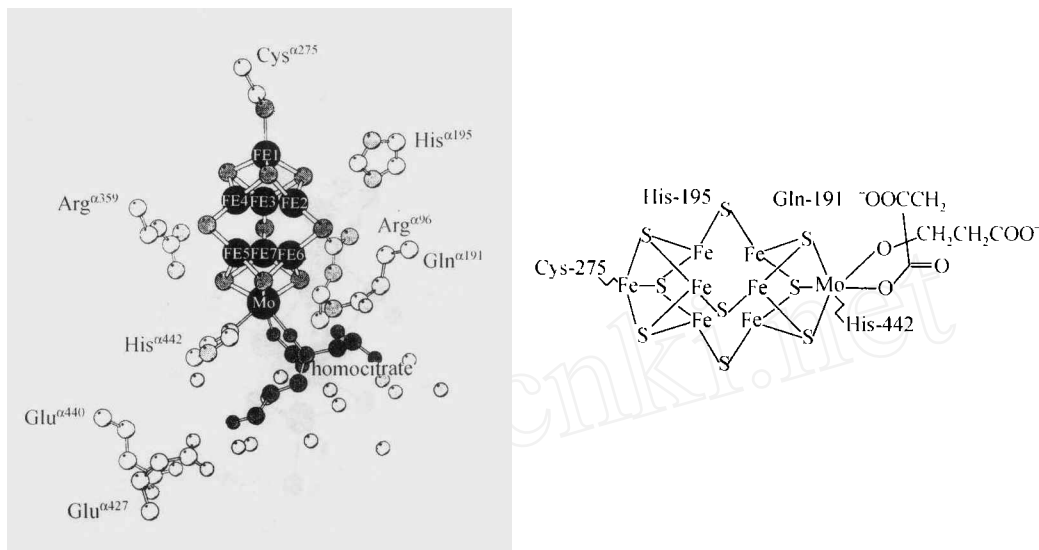
1960 年, Carnahan 等人^[3,4]成功地建立了具有稳定固氮活性的无细胞提取物的方法。不久, Mortenson 等人^[5]首先确定了固氮酶是双组分酶复合体。之后, Kennedy 等人^[6]通过 SDS-PAGE 证明钼铁蛋白(因含钼和铁而得名)有两种亚基。现已确定它是一个 $\alpha_2\beta_2$ 型的四聚体, 分子量为 220~230 ku (因不同来源而异)。 α 亚基分子量约为 55 000 u, 由 *nifD* 基因编码; β 亚基分子量约为 60 000 u, 由 *nifK* 基因编码。不同来源固氮酶钼铁蛋白一级结构的氨基酸序列有 47%~66% 同源性, 相当保守。目前在固氮菌中已鉴定出 3 种固氮酶体系: 钼铁固氮酶、钒铁固氮酶和铁铁固氮酶, 后两种并不常见, 只有某些固氮微生物在缺钼条件下才产生, 而且固氮活性低, 放 H_2 活性高。在本文中, 若非特别指出, 所提固氮酶均指钼铁固氮酶。

钼铁蛋白中含有两种金属原子簇: M-簇和 P-簇。M-簇通常称为铁钼辅因子(FeMoco), 是固氮酶的活性中心, 70 年代末由 Shah^[7]经酸处理钼铁蛋白后, 用有机溶剂提取出来, 在适当的条件下, 能直接催化乙炔加氢成乙烯。每分子钼铁蛋白含 2 个 FeMoco, 每个 $\alpha\beta$ 二聚体中含有一个。FeMoco 由 1 个 Mo, 7 个 Fe 和 6~8 个酸不稳定 S 组成, 后来又发现 FeMoco 上还连有 1 个高柠檬酸分子^[8]。FeMoco 是钼铁蛋白特征性电子顺磁共振(EPR)的信号来源。P-簇最初由 Kurtz 等人^[9]自钼铁蛋白中分离出来, 由 2 个 $4Fe_4S$ 组成, 负责传递电子; 每个 $\alpha\beta$ 二聚体含有一个 P-原子簇。

1992 年以来, 美国学者 Kim 和 Rees 等人^[10~13]用 X 光衍射技术, 先后解析了 *A. vinelandii* (0.29 nm 分辨水平) 和 *C. pasteurianum* (0.30 nm 分辨水平) 的钼铁蛋白及其 FeMoco 和 P-簇的三维结构, 使人们对固氮酶的结构及其催化机制有了更深入的认识。

钼铁蛋白的 α 亚基和 β 亚基呈现出相似的折叠, 都由 3 个 α/β 型结构域和一些单独的 α 螺旋组成。每个亚基有 3 个结构域, 它们之间有一个裂缝, FeMoco 位于 α 亚基裂缝的底部, 距蛋白表面约 1.0 nm。钼铁蛋白的 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体是由 2 个 $\alpha\beta$ 二聚体非对称组成。P-簇位于 $\alpha\beta$ 二聚体的交界处, 距钼铁蛋白表面大约 1.0 nm, 距 FeMoco 大约 1.5 nm^[11]。在二聚体中 α 和 β 亚基以轴对称的方式结合, 与 $\alpha\beta$ 二聚体相关联的四聚体的双折叠轴为 β 亚基中的 6 个 α 螺旋所包围, 形成了一个直径 0.8~1.0 nm, 长为 3.5 nm 的通道^[10]。

FeMoco 是由 2 个缺口的立方烷型簇合物 MoS_3Fe_3 和 Fe_3Fe_3 通过 3 个非蛋白配体 S 桥联而成^[11,14,15], 其高柠檬酸通过 1 个羟基氧和 1 个羧基氧与 FeMoco 的 Mo 原子共价连接(图 1)。高柠檬酸也可与 Gln¹⁹¹ 侧链以氢键结合, 其周围有大量水分子, 这些水分子很可能是底物还原所需 H^+ 的来源。Peters 等人^[16]的研究表明, 至少有一部分 H^+ 是在 FeMoco 上被还原的, 高柠檬酸在放 H_2 反应中起中介作用。若高柠檬酸被柠檬酸取代, N_2 的还原活力会大大下降, 放 H_2 反应对 CO 的抑制变得较为敏感。 α 亚基提供了所有的多肽环境, His⁴⁴² 和 Cys²⁷⁵ 分别与 FeMoco 的 Mo 端和 Fe 端共价结合, His¹⁹⁵ 可通过其咪唑基团的 NH 与 FeMoco 中央的一个桥 S 原子以氢键结合^[17], 而 His¹⁹⁵ 和 Gln¹⁹¹ 之间, 以及 Gln¹⁹¹ 与高柠檬酸末端羧基之间也都可能形成

图 1 FeMoco 的三维结构及其周围多肽环境^[13]

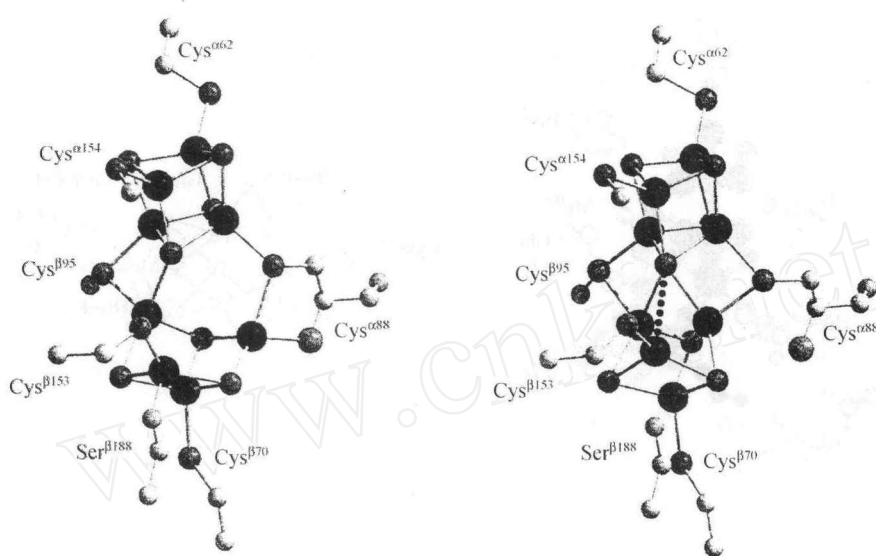
氢键。

利用定位诱变技术对 FeMoco 周围氨基酸进行替换,既可以了解各氨基酸与 FeMoco 的相互关系,又可为研究催化机制提供信息。目前已基本明确与 FeMoco 共价连接的 Cys²⁷⁵ 和 His⁴⁴² 都是高度保守的氨基酸,它们将 FeMoco 固着在多肽链上,如被置换则突变株内游离 FeMoco 的丰度大为增加,并完全丧失其活性;当 His¹⁹⁵ 被置换时,也丧失固氮活性,但仍有低水平还原放 H₂ 活性^[18, 19];用 Lys 替换 Gln¹⁹¹ 得到的 Lys¹⁹¹ 突变型也有类似的情况^[20], N₂ 还原所需 H⁺ 和电子无法传递,而 H⁺ 还原仍低水平进行,说明 N₂ 还原和 H⁺ 还原不在同一个位点。Kim 和 Newton 等人^[21, 22] 利用 Asn 和 Gln 等替换 His¹⁹⁵ 所得到的多种突变钼铁蛋白,分别研究它们的催化活性,发现 Gln¹⁹⁵ 突变钼铁蛋白能络合 N₂ 但不能还原 N₂, 放 H₂ 反应受 N₂ 的强烈抑制,说明放 H₂ 反应只发生在 M-簇上,而不是在 P-簇上,这就排除了 Kim^[12] 最初认为有一个放 H₂ 位点是在 P-簇的二硫键上的可能性。FeMoco 的结构及其周围多肽环境的变化对固氮酶活性的影响是目前研究固氮酶催化机制的最活跃领域之一。

FeMoco 结构的特别之处,是两个原子簇之间的 6 个 Fe 所呈现三角形几何学配位,这些不饱和的铁原子可能与底物的结合有关。由于一个 N₂ 还原成氨至少需 8 个 H⁺ 和 8 个电子,所以在 FeMoco 附近必有一些潜在的质子和电子通道。

现已确定 P-簇是由 8Fe7S 组成,1 个 4Fe4S 和 1 个 4Fe3S 共用 4Fe4S 的 1 个 S 原子(还原态)或 1 个 4Fe4S 和 1 个 4Fe3S(氧化态)通过 2 个半胱氨酸残基(Cys⁸⁸ 和 Cys⁹⁵)的 S 与邻近 Fe 桥联而成^[23](图 2),其余 4 个 Fe 分别与 Cys⁶², Cys¹⁵⁴, Cys⁸⁷⁰ 和 Cys⁸¹⁵³ 的巯基单独相连,将其固定在 α 和 β 亚单位的交界处。目前普遍认为 P-簇在铁蛋白的 4Fe4S 簇和钼铁蛋白的 FeMoco 之间传递电子,但这仅是根据光谱学和动力学研究的推测,还缺少生物化学和遗传学的研究证据。

1.2.2 二氮酶还原酶(Dinitrogenase reductase) 二氮酶还原酶是由两个相同亚基组成的 γ_2 型二聚体,分子量约 60 ku(因菌种不同略有差异),每个亚基的分子量约 30 ku,由 *nifH* 基因编

图 2 P-簇的结构^[23]

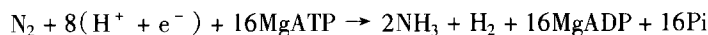
码. 它只含 Fe 不含 Mo, 故又称铁蛋白, 它的功能是提供二氮酶还原底物所需要的电子. Georgiadis 等人^[24]对 *A. vinelandii* 铁蛋白 (Av2) 的晶体结构进行了分析: 它是一个轴对称的二聚体 (图 4 上半部分), 对称轴从正中穿过铁蛋白的 4Fe4S 簇, 并沿着二聚体两个亚基之间的界面伸展. 每个亚基的结构均是一个大的 α/β 结构域 (由 8 个平行 β 折叠片与 9 个 α -螺旋构成, α -螺旋包围着 β 折叠片核心), 两个亚基之间通过 4Fe4S 簇桥联. 除了与 4Fe4S 的共价连接外, 围绕 4Fe4S 簇还有大量的疏水键和盐桥, 以保证二聚体的稳定性. 在铁蛋白内有两个 MgATP 结合-水解位点^[17], 一个在铁蛋白 Walker motifA 肽段 N-末端的第 9~16 位氨基酸处, 它与 MgATP 的 β, γ -磷酸基团和 Mg^{2+} 结合; 另一个 Walker motif 在第 125~128 位氨基酸之间, 它与 motifA 一起完成整个蛋白与 Mg-核苷酸基团的相互作用. Mg-ATP 结合-水解位点和 4Fe4S 簇靠近, 两者直接关系到电子由铁蛋白向钼铁蛋白的传递. 每传递一个电子需要消耗 2 个 ATP. 除 4Fe4S 簇和 MgATP 结合-水解位点外, 有的铁蛋白 (如深红螺菌和巴西固氮螺菌的铁蛋白上) 还有一个 ADP-R (ADP-ribose) 结合位点, 在有铵的条件下, 铁蛋白的 Arg^{101} 被 ADP-R 共价修饰而失活; 无铵时脱去 ADP-R 的修饰, 又恢复其传递电子活性.

铁蛋白的功能除作为固氮酶的组分之一参与固氮酶对底物的还原外, 还有一些与催化无关的功能^[25~29]: 它参与 FeMoco 的生物合成与组装; 也参与钒-铁固氮酶和铁-铁固氮酶系统中的 *anfH* 和 *vnfH* 基因的表达调控.

2 固氮酶催化机制

Hageman, Burris, Thorneley 和 Lowe 等人于 70 年代末至 80 年代中期, 总结固氮酶催化 N_2 还原的过程是: 2MgATP 与铁蛋白结合, 铁蛋白-2MgATP 与钼铁蛋白结合成复合物, ATP 水解, 复合物内发生电子转移 (在生理条件下由铁氧还蛋白或黄素蛋白提供的电子, 经铁蛋白的 4Fe4S 转移到钼铁蛋白的 8Fe7S, 继而进入 FeMoco), 底物结合与还原, 铁蛋白-2MgADP 复合物与钼铁蛋白分离, 2MgATP 替换出 2MgADP 又形成铁蛋白-2MgATP 复合物, 如此完成一次循环.

每循环一次传递1个电子,并消耗2个ATP.因此,每还原1分子氮生成2分子氨需循环8次(见图3).一般公认的固氮反应化学计量式为



在上述过程中^[17],游离的铁蛋白和与钼铁蛋白结合的铁蛋白都可与MgATP结合,但只有铁蛋白-钼铁蛋白复合物才具有水解ATP的活性,ATP水解发生在电子传递之前,在铁蛋白-钼铁蛋白解离之前只发生一个电子传递,ATP水解和电子传递是分别进行的.ATP的作用一方面提供电子传递所需能量,另一方面引起铁蛋白构型改变.

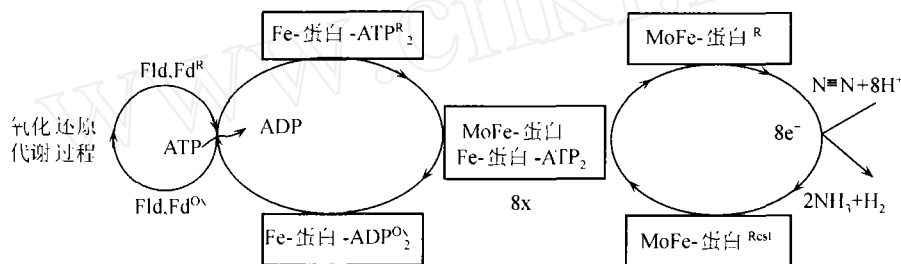


图3 固氮酶催化反应示意图^[17]

Kim和Rees^[10,11]根据*A. vinelandii*铁蛋白和钼铁蛋白的三维结构,进一步提出了两者相互聚合和解离的模式,即镶嵌模式(Docking model,见图4).在这一模式中,铁蛋白二聚体与钼铁蛋白的功能单位 $\alpha\beta$ 二聚体结合,由靠近铁蛋白4Fe4S簇一侧的Arg¹⁰⁰和Glu¹¹²残基连接在钼铁蛋白 $\alpha\beta$ 二聚体上.铁蛋白二聚体的对称轴与 $\alpha\beta$ 二聚体的对称轴基本重合.在P-簇上方的冠状结构内有一条沟,当两个蛋白靠近时,这条沟可以容纳从铁蛋白伸展出来且围绕4Fe4S簇的一些 α -螺旋.在进行这一“螺旋嵌入沟槽”的定向过程中,使铁蛋白的4Fe4S簇与钼铁蛋白的P-簇靠近,同时也引起钼铁蛋白构型变化,使P-簇更靠近FeMoco的高柠檬酸的羧基,距离缩短到1.4 nm.如此沟通了电子传递通道.在此结合区域中,钼铁蛋白表面上具有带电和极性

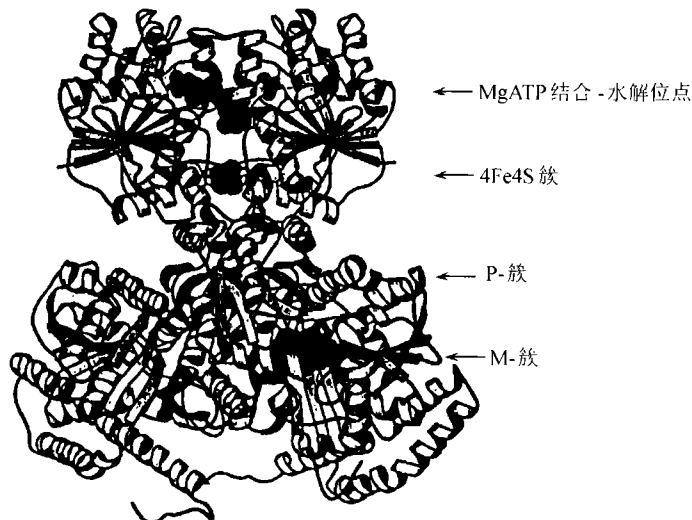


图4 铁蛋白-钼铁蛋白的镶嵌模式^[10,13]

的残基,和铁蛋白之间形成盐桥和氢键是至关重要的. 蛋白之间可能有大量的离子键相互作用,并存在一些潜在的重要的疏水作用. 与钼铁蛋白 $\text{Phe}^{\beta 125}$ 有关的一系列氨基酸间的联系,可能是从钼铁蛋白传递信号至铁蛋白上,使其发生 ATP 水解的通道^[16,30-33]. 动力学研究表明,伴随 ATP 的水解所引起的铁蛋白构型的变化,有利于电子自铁蛋白向钼铁蛋白的转移. Mg-ATP 水解成 Mg-ADP 和 P_i 不会造成铁蛋白-钼铁蛋白复合体的解离.

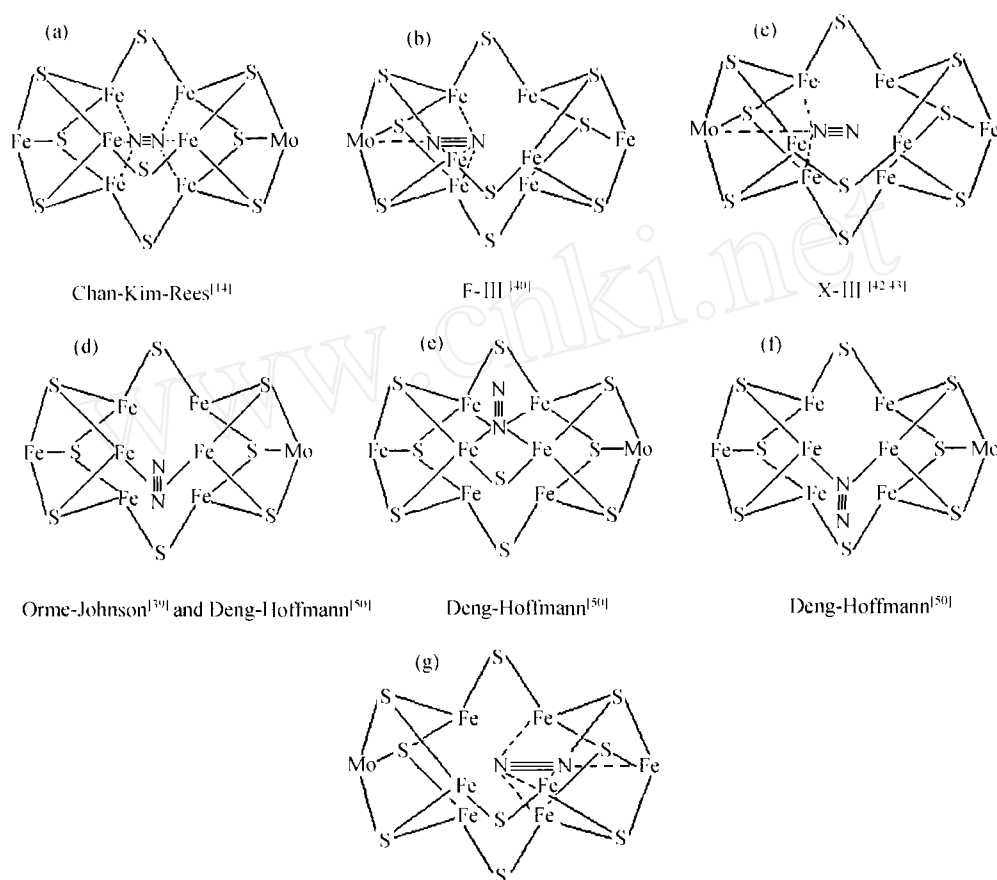
P-簇和 FeMoco 之间 4 个定向且平行排列的螺旋($\alpha 63-\alpha 74$, $\alpha 88-\alpha 92$, $\alpha 191-\alpha 209$ 和 $\beta 93-\beta 106$) 在电子传递中起主要作用,其中和 P-簇 $\text{Cys}^{\alpha 62}$ 和 $\text{Cys}^{\alpha 88}$ 相连的 $\alpha 63-\alpha 74$ 和 $\alpha 88-\alpha 92$ 可能是潜在电子传递通道. 固氮酶还原所需的质子来源于 FeMoco 周围蛋白表面的 H_3O^+ , 高柠檬酸附近的水化网参与了质子的传递,其中 $\text{Gln}^{\alpha 440}$ -高柠檬酸- FeMoco 和 $\text{His}^{\alpha 195}$ - FeMoco 可能是通向 FeMoco 潜在的质子通道^[10].

3 化学模拟生物固氮——历史和现状

近几十年来,化学模拟生物固氮的研究一直是国际上生物化学和化学工作者研究的一个热点. 特别是自美国学者 Rees 等人^[10,11]阐明了固氮酶的活性中心原子簇及其周围多肽分子的三维结构后,化学模拟生物固氮的研究再次掀起高潮.

早期化学模拟生物固氮的研究,由于人们对固氮酶催化作用机制还不完全清楚,加之 FeMoco 的组成及结构不明,要提出一个固氮酶活性中心原子簇的化学模型是相当困难的. 在 FeMoco 的三维结构未明确之前,国内外科学家提出了许多固氮酶活性中心原子簇的化学模型,这些模型可归纳为三派:(1) 钼派:认为氮络合在钼上.(2) 铁派:认为氮络合在铁上.(3) 钼-铁派:认为钼、铁对氮均有络合作用. 早在 70 年代,卢嘉锡和蔡启瑞等人^[34,35]就参与 FeMoco 的结构研究,分别先后提出了福州模型和厦门模型,即“单网兜和双网兜状混合簇李重煊体的福州模型 I, II”和“活口类立方烷和共角($[\text{Mo}]$) 并联活口双立方烷的厦门模型 I, II”,引起国际重视. Schrauzer^[36]也于 70 年代提出了 N_2 , C_2H_2 和 H^+ 在固氮酶中的络合与还原模型,Mo 原子是固氮酶的催化活性中心, N_2 还原过程中的放 H_2 是由于中间产物 N_2H_2 的分解所致; CO 只抑制 N_2 的还原而不抑制放 H_2 . Stiefel^[37]曾指出活性中心的 Fe 原子是 N_2 的络合和还原位点,而由 Mo 原子提供用于还原 N_2 的 H^+ 和电子. 由于当时对 FeMoco 的组成及结构尚不明确,因而所提出的许多 N_2 络合在固氮酶活性中心的化学模型在结构上也不一致. 尽管目前 FeMoco 的组成及结构已明确,但关于 N_2 究竟是络合在 FeMoco 的 Mo 上,Fe 上,还是 Mo 和 Fe 上,仍是众说纷纭^[38],而且大多未考虑 FeMoco 的另一主要功能, H^+ 的还原发生在何处?

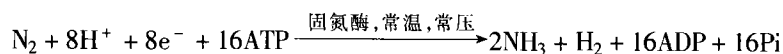
Kim 等人^[14]于 1993 年提出 N_2 是络合在 FeMoco 的 6 个铁原子上(图 5(a)), 这样的络合方式将使 $\text{N}\equiv\text{N}$ 键被削弱,更有利于 N_2 的还原. Orme-Johnson^[39]认为在 Kim 模型中与高柠檬酸同侧—S 桥间的两个铁原子都可容纳 N_2 使其还原(图 5(d)), Mo 在 N_2 的还原过程中不起直接作用. 卢嘉锡^[40](福州模型 III) 和 Stavrev 等人^[41]认为 N_2 在与 FeMoco 结合的过程中, MoS_3Fe_3 是 N_2 的催化活性中心(图 5(b));蔡启瑞^[42,43](厦门模型 III)认为 N_2 在固氮酶中的键合位很可能是 FeMoco 笼内位 $6\text{Fe}[\mu_6(\eta^2, \epsilon_4)]$ 模式和 $3\text{Fe} + 1\text{Mo}$ 位 $[\mu_4(\eta^3, \epsilon_4)]$ 模式,而不是笼口的 2Fe 模式(如图 5(c)). 近几年来,国内外理论化学工作者^[44-49]依据 Rees 的 FeMoco 中心络合模型^[14],提出了他们各自不同的有关 N_2 的键合模型,但基本未超出 Hoffmann^[50]所提 N_2

图5 N_2 与 FeMoco 的结合方式^[14, 39, 40, 42, 43, 50]

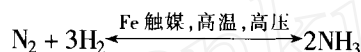
在 FeMoco 内的 3 种可能络合方式(图 5(d) ~ (f)). Eady 和 Leigh^[51] 最初认为 N_2 是和 FeMoco 中的多个铁原子络合的, 而后 Leigh 等人^[52] 又提出另一种可能的结合方式, N_2 通过取代高柠檬酸的羧基而与 Mo 结合, 高柠檬酸仍保留羟基氧与钼原子相连. Steven 等人^[53] 认为在非缺口的立方烷 Mo 的外侧将 $N=N$ 还原, 推测 N_2 是络合在 FeMoco 的 Mo 上. 总之, 现今所提出的这些关于 N_2 在 FeMoco 中络合和还原的模型(图 5(a) ~ (f)), 仍为三派: 即钼铁派^[40,42,43]、铁派^[14, 39, 44~50] 和钼派^[52,53]. 这些模型都缺少直接的试验验证, 而且除蔡启瑞^[42,43] 提出的厦门模型外, 大多未涉及到放 H_2 的方式. 根据 Liang 等人^[54] 在研究固氮酶前稳态期的 H_2 爆发和 90 年代初我们提出的固氮酶双位点放 H_2 模式^[55], 我们认为独立于 N_2 络合和还原位点之外的另一放氢位点, 可能是发生在 FeMoco 的 Mo 原子上, 而 FeMoco 的 Fe_3Fe_3 可能是 N_2 络合还原中心(图 5(g)). 目前, 化学模拟生物固氮的研究仍主要处于理论化学研究阶段^[38], 所有已提出的固氮酶活性中心原子簇络合 N_2 的化学模型正确与否有待通过实验进一步加以验证.

总之, 对 FeMoco 的功能, 除确定 N_2 的络合还原部位外, 还需要确定 H^+ 还原放 H_2 的部位, 因为固氮酶在生理条件下催化 N_2 还原生成 NH_3 的同时, 也催化 H^+ 还原放出 H_2 , 使固氮酶(包括 FeMoco) 处于 H_2 气氛条件下, 免遭 O_2 的危害. 因此, N_2 和 H^+ 的确切络合位点及其还原的

质子和电子通道的阐明,就成为当今研究固氮酶活性中心催化机制及其化学模拟的关键问题. 随着定位诱变蛋白质工程和波谱技术的发展,以上问题可望得到解决. 但生物固氮的运行,除固氮酶作为催化剂外,还必须有质子、电子和 ATP 参与反应:



而化学合成氨是以 Fe 为催化剂,在高温(350℃或 500℃)高压(50 662 或 35 464 kPa)下,将 N₂ 加 H₂ 还原成 NH₃:



对比以上两反应式可以看出:化学模拟生物固氮,除模拟合成固氮酶活性中心原子簇外,还必须提供质子、电子和 ATP,才可能实现在常温常压下固氮,而提供大量的 ATP 用于化学合成氨是不现实的. 因此,通过化学模拟研究,实现在温和(< 300℃, < 5 066 kPa)条件下合成氨的设想是比较符合实际的. 由于 FeMoco 极不稳定,至今尚未获得由化学合成的、完整的 FeMoco,如果只合成与 N₂ 络合还原有关的原子簇就容易得多. 其实早在 100 多年前,法国化学家 Roussin^[56]就合成了第 1 个被称为 Roussin 黑盐(Black Roussin Salt)的铁硫簇合物阴离子 [Fe₄S₃(NO)₇]⁻,而且又被卢嘉锡^[34]证明具有催化活性. 因此,当前化学模拟生物固氮的研究策略,最好是采用这种类似 Fe₄S₃ 结构的簇合物作为催化剂,适当提高反应的温度(300℃以下)和压力(5 066 kPa 以下),以利于 H₂ 的活化和削弱 N₂ 的三重键,以及正反应的进行;且不必改变现用设备,即可达到节约能源、降低生产成本、增加经济效益的目的.

致谢 感谢蔡启瑞教授给予的指导和有益的讨论.

参 考 文 献

- 1 Newton W E. Nitrogenases: distribution, composition, structure and function. In: Palacios R, Newton W E, eds. *Newton Horizons in Nitrogen Fixation*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1993. 5
- 2 Evans H J, Burris R H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: Stacey G, Burris R H, Evans H J, eds. *Biological Nitrogen Fixation*. New York, London: Chapman & Hall, Inc, 1992. 1
- 3 Carnahan J E, Mortenson L E, Mower H F, et al. Nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*. *Biochim Biophys Acta*, 1960, 38: 188
- 4 Carnahan J E, Mortenson L E, Mower H F, et al. Nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*. *Biochim Biophys Acta*, 1960, 44: 520
- 5 Mortenson L E. Nitrogen fixation in extracts of *Clostridium pasteurianum*. In: San Pietro A, ed. *Nonheme Iron Proteins: Role in Energy Conversion*. Yellow Spring, Ohio: Antioch Press, 1965. 243
- 6 Kennedy C K, Eady P R, Kondorpsi E, et al. The molybdenum-iron protein of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenases. *Biochem J*, 1976, 155: 383
- 7 Shah V K, Brill W J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 3 249
- 8 Shah V K, Imperial J, Ugalde R A, et al. *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 1 636
- 9 Kurtz D M, Jr McMillan R S, Burgess B K, et al. Identification of iron-sulfur centers in the iron-molybdenum proteins of nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 80: 4 723
- 10 Kim J, Rees D C. Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter*

- vinelandii*. Nature, 1992, 360: 553
- 11 Kim J, Rees D C. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. Science, 1992, 257: 1 677
 - 12 Kim J, Woo D, Rees D C. X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 0.3 nm resolution. Biochem, 1993, 32: 7 104
 - 13 Kim J, Rees D C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. Biochem, 1994, 33: 389
 - 14 Chan M K, Kim J, Rees D C. The nitrogenase Fe-Mo-cofactor and P-cluster pair: 0.22 nm resolution structures. Science, 1993, 260: 792
 - 15 Bolin J T, Campobasso N, Muchmore T V, et al. The structure and environment of the metal cluster in the nitrogenase MoFe protein from *Clostridium pasteurianum*. In: Stiefel E I, Coucouvanis D, Newton W E, eds. Molybdenum Enzymes, Cofactors and Model Systems. Washington, D C: Am Chem Soc, 1993. 186
 - 16 Peter J W, Fisher K, Dean D R. Nitrogenase structure and function: A biochemical-genetic perspective. Annu Rev Microbiol, 1995, 49: 335
 - 17 Howard J B, Rees D C. Nitrogenase: a nucleotide-dependant molecular switch. Annu Rev Biochem, 1994, 63: 235
 - 18 Kent H M, Baines M, Gormal C, et al. Analysis of site-directed mutations in the α - and β -subunits of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase. Mol Microbiol, 1990, 4: 1 497
 - 19 Kent H M, Ioannidis I, Gormal C, et al. Site-directed mutagenesis of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase. Biochem J, 1989, 264: 257
 - 20 Scott D J, Dean D R, Newton W E. Nitrogenase catalyzed ethane production and CO- sensitive hydrogen evolution from MoFe proteins having amino acids substitutions in an α -subunit FeMo-cofactor binding domain. J Biol Chem, 1992, 267: 20 002
 - 21 Kim C H, Newton W E, Dean D R. Role of the MoFe protein α -subunit histidine-195 residue in FeMo-cofactor binding and nitrogenase catalysis. Biochem, 1995, 34: 2 798
 - 22 Newton W E, Fisher K, Shen C H, et al. Probing catalytic function through amino-acid substitutions in *Azotobacter vinelandii* molybdenum-dependent nitrogenase. In: Tikhonovich I A, Provorov N A, Romanov V I, et al eds. Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1995. 129
 - 23 Peter J W, Stowell M H, Solts S M, et al. Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. Biochem, 1997, 36(6): 1 181
 - 24 Georgiadis M M, Komja H, Chakrabarti P, et al. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. Science, 1992, 257: 1 653
 - 25 Rbinsin A C, Burgess B K, Dean D R. Activity, reconstitution and accumulation of nitrogenase components in *Azotobacter vinelandii* mutant strains containing defined deletions within the nitrogenase structural gene cluster. J Bacteriol, 1986, 166: 180
 - 26 Gavini N, Burgess B K. MoFe cofactor synthesis by a *nif* H mutant with altered MgATP reactivity. J Biol Chem, 1992, 267: 21 179
 - 27 Paustian T D, Shah V K, Roberts G P. Apodinitrogenase: purification, association with a 20-kilodalton protein, and activation by the iron-molybdenum cofactor in the absence of dinitrogenase reductase. Biochem, 1990, 29: 3 515
 - 28 Rbinsin A C, Chun T W, Li J C, et al. Iron-molybdenum cofactor insertion into the apoprotein of nitrogenase involves the iron protein-MgATP complex. J Biol Chem, 1989, 264: 10 088
 - 29 Joerger R D, Wolfinger E D, Bishop P E. The gene encoding dinitrogenase reductase 2 is required for expression of the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol, 1991, 173: 4 440
 - 30 Thorneley R N F, Ashby G A, Fisher K, et al. Electron transfer reactions associated with nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae*. In: Stiefel E I, Coucouvanis D, Newton W E, eds. Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems. Washington, D C: Am Chem Soc, 1993. 290
 - 31 Deits T L, Howard J B. Effect of salts on *Azotobacter vinelandii* nitrogenase activities. J Biol Chem, 1990, 265: 3 859
 - 32 Wolle D, Kim C H, Dean D R, et al. Ionic interaction in the dinitrogenase complex: properties of Fe-protein containing substations for Arg-100. J Biol Chem, 1992, 267: 3 667
 - 33 Peter J W, Fisher K, Dean D R. Identification of a nitrogenase protein-protein interaction site defined by residues 59 through 67 within the *Azotobacter vinelandii* Fe protein. J Biol Chem, 1994, 269: 28 076

- 34 Lau J X. Research on the chemical modeling of biological nitrogen fixation in the new china——an overview of research carried out at the Fujian Institute during the 1970s and the early 1980s. In: Hong G F, ed. *The Nitrogen Fixation and Its Research in China*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1992. 1
- 35 Tsai K R, Wan H L. On the structure-function relationship of nitrogenase M-cluster and P-cluster pairs. *Journal of Cluster Science*, 1995, 6(4): 485
- 36 Schrauzer G N. Nitrogen fixation: past progress and recent advances. In: Banerjee D, ed. *Coordination Chemistry-20*. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt: Pergamon Press, 1980. 149
- 37 Stiefel E I. The mechanisms of nitrogen fixation. In: Newton W E, Postgate J R, Rodriguez-Barrueco C, eds. *Recent Developments in Nitrogen Fixation*. London, New York, San Francisco: Academic Press, 1977. 1
- 38 Richards R L. Chemical models for the function of nitrogenase. In: Elmerich C, Kondorosi A, Newton W E, eds. *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1998. 17
- 39 Orme-Johnson W H. Nitrogenase structure: where to now? *Science*, 1992, 257: 1 639
- 40 吴新海, 卢嘉锡. 固氮酶活性中心网兜模型研究的回顾与展望. *科学通报*, 1995, 40(7): 577
- 41 Stavrev K K, Zerner M C. A theoretical model for the active site of nitrogenase. *Chem Eur J*, 1996, 2(1): 83
- 42 万惠霖, 黄静伟, 蔡启瑞, 等. 化学探针方法研究固氮酶 M-簇和 P-簇对的结构与功能关系. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1996, 35: 890
- 43 黄静伟, 张凤章, 许良树, 等. 固氮酶及合成氨催化剂中 N_2 的络合位. *高等学校化学学报*, 1995, 16(6): 920
- 44 Plass W. Electronic structure of the iron-molybdenum and alternative cofactors of nitrogenases: a comparison and its consequences. *J Mol Struct*, 1994, 315: 53
- 45 Dance I G. The binding and reduction of dinitrogen at an Fe_4 face of the FeMo cluster of nitrogenase. *Aust J Chem*, 1994, 47: 979
- 46 Dance I G. Calculated details of a mechanism for conversion of N_2 to NH_3 at the FeMo cluster of nitrogenase. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1997: 165
- 47 Dance I G. Understanding structure and reactivity of new fundamental inorganic molecules: metal sulfides, metallocarboradrenes, and nitrogenase. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1998: 532
- 48 Machado F B C, Davidson E R. N_2 activation by iron-sulfur complex. *Theor Chim Acta*, 1995, 92(5): 315
- 49 Zhang S J, Liu C W. Possible binding modes for dinitrogen activation by the FeMo-cofactor in nitrogenase. *Polyhedron*, 1997, 16: 653
- 50 Deng H, Hoffmann R. How N_2 might be activated by the FeMo-cofactor in nitrogenase. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1993, 32(7): 1 062
- 51 Early R R, Leigh G J. Metals in the nitrogenases. *J Chem Soc, Dalton Trans*, 1994: 2 739
- 52 Leigh G J. The chemical mechanism of biological nitrogen fixation and the chemistry of model systems. In: Tikhonovich I A, Provorov N A, Romanov V I, et al eds. *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1995. 129
- 53 Steven M M, Anton M S, Patrich E M, et al. Catalytic reduction of cis-dimethyldiazene by the $[MoFe_3S_4]^{3+}$ cluster. The four-electron reduction of a $N \equiv N$ bond by a nitrogenase-relevant cluster and implications for the function of nitrogenase. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 1 662
- 54 Liang J H, Burris R H. Hydrogen burst associated with nitrogenase-catalyzed reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 9 446
- 55 张振水, 吴柏和, 李季伦. 固氮酶催化的放 H_2 反应. *微生物学报*, 1993, 33(5): 320
- 56 卢嘉锡, 陈志达. 过渡金属原子簇的类芳香性. *物理化学学报*, 1992, 8(6): 834