

化学模拟 生物固氮进展

科学出版社

52.174.338

1

DF17/29

化学模拟生物固氮进展

吉林大学化学系固氮小组等编译



科学出版社

1973

内 容 简 介

本书共包括“固氮生物化学研究现状及展望”、“温和条件下化学固氮问题”、“分子氮的固定和氮合成反应”、“分子氮络合物”四篇文章,书中介绍了国际上有关化学模拟生物固氮近来的进展情况。

书末附有固氮生物化学、化学固氮、氮分子络合物和其他有关文献目录。

可供有关研究人员、高等院校师生和工厂科技工作者参考。

化学模拟生物固氮进展

吉林大学化学系固氮小组等编译

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1973 年 11 月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1973 年 11 月第一次印刷 印张: 7 3/4

印数: 0001—8,500 字数: 175,000

统一书号: 13031·108

本社书号: 218·13-10

定 价: 0.80 元

13031

说 明

生物固氮是生物学科学研究的一个重要问题。从 1960 年以来,国际上固氮生物化学研究进展迅速,已能分离、提纯固氮酶,并得到了固氮酶钼铁蛋白的结晶,为深入研究固氮酶的结构与功能打下了基础。随着固氮生物化学研究的进展,从 1964 年起,开始了化学模拟固氮酶的研究工作,探索在温和条件下合成氨的途径。

中国科学院 1972 年在长春召开了“化学模拟生物固氮”座谈会,分析了国际动态,进行了经验交流。现将座谈会部分资料整理刊印,供有关研究人员、高等学校师生和工厂的科技工作者参考。

目 录

固氮生物化学研究现状及展望	中国科学院植物研究所 上海植物生理研究所 编 (1) 吉林大学化学系固氮小组
一、概述	(1)
二、生物固氮的基本条件	(4)
1. 固氮酶	(4)
2. ATP	(12)
3. 还原剂、电子供体和电子传递体	(13)
三、生物固氮的原理	(16)
1. Burris 模式图	(16)
2. Hardy 模式图	(18)
3. 双核络合物假设	(20)
四、问题与展望	(22)
1. 固氮酶的提纯与结晶	(23)
2. 固氮酶活性中心的结构	(23)
3. 固氮酶系铁蛋白和钼铁蛋白的功能	(23)
4. 电子传递、质子传递和能量传递	(23)
5. 固氮酶的抑制剂与保护作用	(23)
温和条件下化学固氮问题	吉林大学化学系固氮小组编 (28)
一、氮分子的结构	(28)
二、温和条件下合成氨的三个环节	(31)

1102867

• 1 •

1. 络合过程.....	(40)
2. 还原过程.....	(43)
3. 加 H^+ 过程	(45)
三、过渡金属含分子氮络合物.....	(46)
1. 过渡金属.....	(50)
2. 配位体.....	(53)
3. 几何构型.....	(54)
四、对于温和条件下化学固氮的几点看法...	(56)
1. 铁-钼系均相催化的研究	(57)
2. 非铁-钼系过渡金属催化剂的研究	(57)
3. EDA 络合催化剂的研究.....	(57)
4. 对稳定含 N_2 络合物进行还原工作的研究 ...	(58)
分子氮的固定和氨合成反应.....	
..... 吉林大学化学系固氮小组译	(60)
前言.....	(60)
一、氮分子的电子结构和化学活化的原理...	(61)
二、固定氮络合物.....	(64)
1. 由有机盐固定氮.....	(73)
三、化学氮固定和氨合成反应.....	(75)
1. Vol'pin-Olivé-van Tamelen 系	(75)
2. 电子授受体络合物系.....	(82)
四、酶体系固定氮.....	(89)
1. Chatt 的模型	(94)
2. Brintzinger 模型	(95)
3. Parshall 模型	(95)

结束语.....	(98)
分子氮络合物	吉林大学化学系固氮小组译 (103)
绪论.....	(103)
一、氮分子的物理和化学性质.....	(104)
二、非金属衍生物和氮的反应.....	(108)
1. 在气相中的碰撞络合物.....	(108)
2. H_2O , HCl , BF_3 和氮分子的相互作用	(109)
3. 亚碳化合物及其同系物与氮的作用.....	(111)
三、金属表面上的氮络合物.....	(113)
四、过渡金属化合物和氮的络合物(固氮基 类)	(117)
1. 固氮基类的合成和化学性质.....	(117)
2. 络合物的结构和 $M-N_2$ 化学键的本质	(129)
3. 分子氮络合物的生成机理.....	(146)
4. 在氮的还原固定中作为中间生成物的分子氮 络合物.....	(148)
文献目录.....	(167)
1. 固氮生物化学文献目录.....	(168)
2. 化学固氮、氮分子络合物 和其它有关文献目 录.....	(192)

固氮生物化学研究现状及展望

一、概 述

早在十九世纪末叶,人们就已经用试验的方法,发现了自生固氮菌和根瘤菌与高等植物共生后可以固定空气中的氮素的现象,但是生物固氮的化学历程的研究,则是随着生物化学的发展才开始的。当时,主要是用自生固氮菌的完整细胞为材料,探索固氮的代谢途径。新的研究工具 N^{15} 的应用,确定了 NH_3 为分子氮固定的产物,从而基本上否定了氮分子固定通过羟胺为中间产物的传统看法。1960年 Carnahan 等^[1]用巴氏梭菌非细胞提取液,成功地实现了 N_2 还原成 NH_3 的试验,使固氮生化研究,从整体细胞推进到非细胞水平。1966年 Mortenson 等^[2]和 Bulen 等^[3]分别从巴氏梭菌和棕色固氮菌的抽提液中分离出固氮酶的两种半纯化的酶蛋白,通称钼铁蛋白和铁蛋白。这就标志着固氮生化研究从非细胞提取液水平进到分子水平。1970年 Burns 等^[4]第一次获得了白色针状结晶的钼铁蛋白,但铁蛋白尚未得到结晶。固氮酶提纯的成功,意味着生物固氮原理的研究进入更本质的阶段。从此人们可以探索固氮酶的结构与功能的关系。这一关系的研究,将为化学模拟固氮酶在温和条件下合成氨的研究工作提供明确的依据。

六十年代以来,固氮生物化学的研究,吸引各方面人员参加。从取得的主要进展来看大致可以分四个阶段,用图1

表示进展阶段和研究水平。

我们知道工业合成氨是在高温(500℃)、高压(300 大气压)下进行的,不但需要特殊的设备,而且合成氨的效率很低

(只有 7—20%)。可是自然界中的固氮生物:自生固氮菌(如巴氏梭菌、棕色固氮菌等)和共生固氮菌(如大豆根瘤菌等)以及某些蓝藻等却能在常温常压下固定空气中的分子氮并将其还原成氨。因此,研究固氮生物为什么能在常温常压下将 N_2 合成 NH_3 ? 实现常温常压

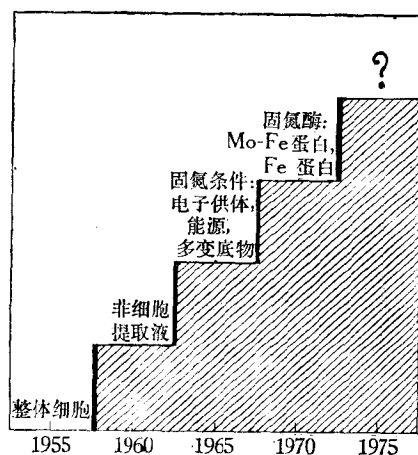
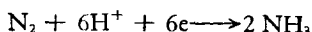


图 1 固氮生化发展的阶段

下合成氨必须具备那些基本条件? 生物固氮是怎样进行的? 就具有重大的意义。

我们知道 $N \equiv N$ 键的键能很高(230 千卡),因此在 N_2 分子中 N 原子之间的结合十分牢固,很难打开。要打开 $N \equiv N$ 键必须提供电子,提供带有配位体的过渡元素以及能量,然后才能加上 H^+ , 还原成 NH_3 。



从这里我们可以看到,要实现 N_2 还原成 NH_3 , 必须提供四个基本条件:

- ① 带有配位体的过渡元素, 拉出 $N \equiv N$ 键的电子, 同时反馈电子以削弱 $N \equiv N$ 键;
- ② 还原剂, 提供电子;

③ 能源;

④ H^+ 。

这些条件在固氮生物体内是如何满足的? 1966 年 Bulen 等^[3]用棕色固氮菌超离心的非细胞提取液(S_{144-1} , 包含固氮酶)做了不同条件的固氮实验, 结果如表 1 所示。

表 1

反 应 系 统	30 分钟生成的氮量(微克)
完全的 ¹⁾	72.9
缺 ATP	13.8
缺 CP 和 CK	25.0
缺 ATP、CP、CK	0
缺 $Na_2S_2O_4$	0
缺 S_{144-1}	0
缺 Mg^{2+}	39

1) 完全的反应系统 (2 毫升)

ATP	10 微克分子
磷酸肌酸 (CP)	120 微克分子
磷酸肌酸激酶 (CK)	0.5 毫克
$Na_2S_2O_4$	40 微克分子
S_{144-1}	0.5 毫升 (15 毫克蛋白)
$MgCl_2$	5 微克分子
二甲砷酸钾	50 微克分子 pH7.0、 N_2

由表 1 可知, 固氮酶、 $Na_2S_2O_4$ (还原剂) 和 ATP (与 ATP 发生系统 CP 和 CK) 是生物固氮不可缺少的三个基本条件。固氮酶系统的反应过程需要的反应物有:

① 电子供体;

② ATP 和二价金属 (如 Mg^{2+} 做激活剂);

③ 电子受体, 包括水中的质子或可被还原的底物 (如氮、乙炔等)。

其相应的反应产物有:

① 氧化的电子供体；

② ADP 和 P_i ；

③ 氢 (H_2) 或被还原的底物 (如氨、乙烯等) 可用图 2 表示^[5]。

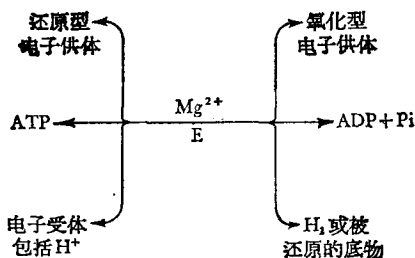


图 2 固氮酶系统的反应物和产物

二、生物固氮的基本条件

1. 固氮酶

(1) 固氮酶的提纯和结晶

固氮酶的提纯和结晶是深入研究生物固氮的基础。1964 年以前, 非细胞固氮酶系统的纯化只取得有限的进展。借助在氢气下 60°C 加热非细胞提取液 10 分钟, 用硫酸鱼精蛋白、磷酸钙凝胶处理, 将酶系统分成为供氢系统和氮活化系统两个部分^[6,7]。氮活化系统只在 N_2 中培养的细胞中存在, 而供氢系统则同时存在于 N_2 或铵盐中培养的细胞内。

Bulen 等^[3]将好气性的棕色固氮菌粗提取液经初步提纯后, 通过 DEAE 纤维素柱, 用含不同浓度的 NaCl 缓冲液洗脱, 将固氮酶分成两个蛋白部分, 称为酶 1 和酶 2。对于固氮和与之相伴的需要 ATP 的放氢反应^[8]及需要还原剂的 ATP 水解

反应^[9],酶 1 和酶 2 必需互补才能产生活力。与此同时, Mortenson 等^[10]利用 Sephadex G-100 柱层析,将嫌气性的巴氏梭菌的固氮酶系统分成两个酶蛋白,其性质与好气性固氮菌中酶 1 和酶 2 相仿。在铵盐中生长的菌均缺乏这两个酶蛋白。

应用类似方法,在其他固氮生物,如多粘杆菌^[11]、克氏杆菌^[11]、大豆根瘤菌^[12]、圆褐固氮菌^[13]、光合细菌和蓝藻^[14]也分离出固氮酶系统的两个独立的酶蛋白。

近几年来固氮酶系两个蛋白的纯化工作,达到了比较完善的程度。1970 年, Burns 等^[4]借降低钼铁蛋白溶液中离子强度,从棕色固氮菌得到了不含铁蛋白的白色针状的钼铁蛋白的结晶,其大小约 $1-4 \times 30-50$ 微米。其分子量为 270000—300000,并且指出钼铁蛋白还可能分成亚单位。最近 Dalton 等^[15]用分部沉淀的方法,在二天内从巴氏梭菌制得 2 克纯化的单体钼铁蛋白,分子量为 168000。

Moustafa 等^[16]在巴氏梭菌提取液中用硫酸鱼精蛋白分部沉淀和 Sephadex G-100 柱层析,得到纯化程度 90—95% (根据超离心及凝胶电泳分析)的铁蛋白。他们利用铁蛋白在 60℃ 下加热处理不易受到破坏的特点,声称从棕色固氮菌中分离到了不含钼铁蛋白的铁蛋白^[17]。不久以前, Nakos 等^[18]用硫酸十二烷基钠处理巴氏梭菌的铁蛋白(二聚体),使其分解为两个分子量为 27500 ± 1350 的亚单位,每个亚单位含 4 个铁原子和 4 个不稳定硫。这两个亚单位大小和化学特性都相似。

根据最近得到的数据,钼铁蛋白和铁蛋白的物理化学常数列于表 2 和表 3。

Fisher 等^[19]发现用化学方法诱变棕色固氮菌,可以得到不能固氮的但能分离出活跃的铁蛋白的变种。他们指出,进一

表2 钼铁蛋白的物理化学常数

材 料	分 子 量	钼:铁:半胱氨酸:不稳定 S^{2-}	文 献
棕色固氮菌	270000—300000 (二聚体)	1:20:20:15	4
巴氏梭菌	168000	1:14:23:16	15

表3 铁蛋白的物理化学常数

材 料	分 子 量	非血红素铁	酸不稳定 S^{2-}	文 献
棕色固氮菌	40000	2	2	16
巴氏梭菌	55000 $\pm$ 5000 (二聚体)	4	4	18

步仔细筛选,能够得到相反的变种,并建议可以利用这种诱变种的方法来得到纯化的钼铁蛋白和铁蛋白。Simon 等^[20]最近也分离到一个巴氏梭菌的不固氮的变种,它只含有铁蛋白而缺钼铁蛋白。

早年发现的非细胞固氮酶系统对冷的不稳定性^[3,22,23],已被证明是铁蛋白的特征。提纯后的铁蛋白,在 0° — 1°C 很快钝化,而加 10% 酒精或丙酮却有保护作用。

非细胞固氮酶系统对氧的不稳定性,使得分离和纯化造成不少困难。巴氏梭菌固氮酶的提取和纯化操作,从头到底都要在无氧条件下进行。对好气性的固氮菌来说,在第一步纯化后,下一步的各个操作同样也必需在无氧下进行^[24]。

Mortenson 曾提出在非细胞固氮酶系统中,氮的固定需要一个从在氨生长的细胞中或其培养液中提出的第三个蛋白^[2],但没有得到其他人实验结果的支持^[24]。Shuzo 等^[21]曾经报道固氮酶系可以分离成三个蛋白组分。最近 Taylor^[25] 对

巴氏梭菌非细胞提取液的固氮进行酶学研究时,指出氮的固定与乙炔还原的要求有所不同,前者比乙炔还原需要多一个酶蛋白。随后, Jeng 等^[26]重复了 Taylor 的实验,得到不同的结果,即无论是氮的固定或乙炔还原,都同样只需要仅在 N_2 中生长的菌中存在的钼铁蛋白和铁蛋白。

各种固氮生物中,钼铁蛋白和铁蛋白的互补作用,曾经用 N_2 , N_3^- , CN^- , C_2H_2 为底物进行了研究^[11, 27-30], 嫌性的克氏杆菌和多粘杆菌的酶蛋白,一般能和其他来源固氮菌的两个酶蛋白互补而产生活力。一般来说,同一固氮菌的两个酶蛋白的活力高于不同来源固氮菌的两个酶蛋白互补所产生的活力。

(2) 固氮酶的结构

据上所述,固氮酶系是由铁蛋白和钼铁蛋白组成。由于这两种蛋白不久前才分别得到提纯和结晶,所以其化学结构和空间结构尚不清楚。这里所指的结构,仅仅是用化学物理方法所得的一些数据,推测两种蛋白活性中心可能的结构。

(a) 钼铁蛋白的结构 Burns 等^[4]测定棕色固氮菌钼铁蛋白的吸收光谱,在 410—420 毫微米 (nm) 处有一吸收峰。用 $Na_2S_2O_4$ 处理后,420 毫微米吸收增加,并在 525 毫微米和 557 毫微米处有两个吸收峰。顺磁共振测定, g (朗德因子) = 4.30, 3.67, 2.01 和 1.94。Dalton 等^[15]测定巴氏梭菌的钼铁蛋白,顺磁共振谱 $g = 4.30$ 和 2.01。在空气中暴露一分钟, $g = 4.30$ 的讯号减弱, $g = 2.01$ 讯号增宽。用 $Na_2S_2O_4$ 还原天然蛋白, $g = 4.30$ 讯号缩小。把氧化了的样品进行还原, $g = 2.01$ 不能缩小, $g = 4.30$ 也不能复原。他认为: $g = 4.30$, 可能是高自旋的 Fe^{3+} , 在空气中 $g = 2.01$ 讯号增宽,说明是 $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ 的结果。棕色固氮菌的钼铁蛋白在天然状态时,主要是高自旋的 Fe^{3+} , 少量高自旋的 Fe^{2+} 。

Kelly 等^[31]用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理肺炎克氏杆菌钼铁蛋白, 核 γ 共振光谱(莫斯鲍尔光谱)讯号表明有高自旋亚铁, 在 CO 存在时特别激烈, 证明铁参予固氮过程。Фролов 等^[32]基于用特殊的顺磁标记的铁与一SH 基络合反应, 表明铁原子不是单个分布, 而是成群分布。用顺磁试剂替代铁原子时, 带有自旋标记的铁就进入其位。在这种情况下, 示踪钼铁蛋白的顺磁共振谱表明: 在基团中有一对以上的铁原子是结合状态, 与铁相连的半胱氨酸的一SH 基团不被拉成一直线。动力学资料证明, 铁原子连接成一个不少于由三个相互作用的中心所组成的联合系统。核 γ 共振谱也证实所连接的相互作用的中心有强烈的自旋——自旋相互作用的 Fe^{3+} —— Fe^{3+} 。用 NO 对钼铁蛋白作用, 形成亚硝酰基络合物, 顺磁共振讯号表明它是属于半胱氨酸和硫化物配位的一类络合物。

Meriwether 等^[33]研究了钼-巯基络合物作为含钼的酶模型, 指出其顺磁共振讯号 $g = 1.98$, 推测它非常可能属于八面体结构的 Mo-半胱氨酸络合物。

(b) 铁蛋白的结构 在天然状态下, 至今还没有观察到铁蛋白中的铁原子的顺磁共振讯号, 但是 Hardy 等^[5]却有报道, 暴露在空气中的铁蛋白有讯号 $g = 1.94$ 。

Kelly 等^[31]用 NO 处理, 得到亚硝酰基络合物, 顺磁共振讯号表明属于亚硝酰基-半胱氨酸铁络合物。用核 γ 共振谱在 77°K 时测定, 铁蛋白中的铁原子基本上都是属于高自旋的三价状态。此外, 还可观察到不超过总量 10% 强度的讯号, 认为是高自旋的二价或一价状态的铁的特征讯号。核 γ 共振谱还表明, 两个铁原子之间有强烈的相互交换作用, 在氧的作用下有一个一SH 基被氧化, 证实铁蛋白中络合的铁与一SH 基位置接近(图 3)。

关于钼铁蛋白和铁蛋白的作用问题, 尚有不同看法。一

般认为：铁蛋白是电子活化中心，钼铁蛋白的两个钼原子络合 N_2 ，形成双核复合体，其中的铁原子也参于电子活化。

(3) 需还原剂的 ATP 水解和需 ATP 的放氢

应该指出：需还原剂的 ATP 水解和需 ATP 的放氢是固氮酶具有活性的特征。

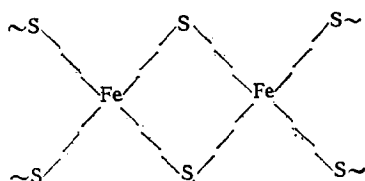


图3 铁蛋白双核活性中心图式

(a) 需还原剂的 ATP 水解 如前所述，非细胞固氮酶系统的固氮过程要求 ATP 和电子供体。在固氮的同时，发生着 ATP 的水解和氢的释放。Dilworth 等^[34]发现，只有在培养于氮中生长的巴氏梭菌提取液中，以 H_2 作电子供体，在与固氮作用相同的条件（即要求 H_2 ，ATP，铁氧还蛋白 [Fd]、 Mg^{2+} ）下，能使具有高能键的乙酰磷酸发生分解。如果用 $Na_2S_2O_4$ 作电子供体，就不需要 Fd 存在，而且 ATP 水解不受 CO 影响^[35]。同样，在有固氮能力的棕色固氮菌的非细胞提取液中，也发生需还原剂的 ATP 水解作用。需还原剂的 ATP 水解，象固氮作用一样，同样需要固氮酶的两个蛋白同时存在^[31]。

在棕色固氮菌的粗提取液中，加或不加 $Na_2S_2O_4$ 时，ATP 水解的差异较小；而在 225,000g 离心三小时得到的颗粒体中，则加或不加 $Na_2S_2O_4$ 时，ATP 水解的差异就大得多。需还原剂的 ATP 水解活力，在分部离心的各部分中与固氮活力相平行。反应系统的气相成分 (He , H_2 , N_2 , CO , N_2O) 对它的影响不大。氧化磷酸化的解联剂及抑制剂在一般浓度下也不影响 ATP 的水解^[36]。

(b) 需 ATP 的放氢活性 Bulen 等^[8]用 $Na_2S_2O_4$ 和

ATP 发生系统研究棕色固氮菌的固氮作用时,发现在固氮的同时,有氢的释放。如果气相是氩气而不是氮气,则放氢量增加四倍。这个现象不久也在巴氏梭菌中得到肯定^[37]。放氢的条件与固氮相似,需要 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, Mg^{2+} , ATP 发生系统和具有固氮活性的提取液。需 ATP 的放氢也只有生长在氮中的菌的提取液中才能发生,而且同样需要钼铁蛋白和铁蛋白两者并存。放氢活性亦不受 CO 抑制。这些特征区别于细菌中一般的氢化酶^[2,35,31],使得长期以来费解的氢代谢与固氮之间的关系得到了阐明。固氮酶与一般的氢化酶没有什么关系。需 ATP 的放氢是固氮酶固有的活性之一。

(4) 固氮酶的抑制剂和底物

前面已经提到,固氮酶的反应包括氮的固定,需还原剂的 ATP 水解和需 ATP 的放氢。其反应过程的抑制剂可以粗分为两大类:一类作用于电子的活化和传递阶段,在没有可还原的底物存在下,它们影响 ATP 水解和放氢速度;另一类抑制剂则作用于底物与酶结合的部位,在这一类抑制剂中,在过去整体细胞实验中发现的一些竞争性抑制剂^[39],其本身可为固氮酶还原,因而实际上是固氮酶的底物。

第一类抑制剂包括一些金属螯合剂,如邻菲罗啉、硫氢基化合物、高浓度的 ATP (可能是 ADP)^[36,40]、氧化磷酸化和光合磷酸化的解联剂,在一般浓度下不抑制固氮酶的 ATP 水解^[36],显示它类似底物水平的磷酸化。

第二类中, H_2 和 CO 是固氮的竞争性抑制剂,它们与酶结合的部位与 N_2 相同。虽然结合的方式可能不同,但都不影响需还原剂的 ATP 水解和需 ATP 的放氢活性。这个现象就构成了假设固氮酶存在着两个作用部位的基础^[35]。

NH_3 是整体细胞固氮的强抑制剂^[41],对非细胞固氮酶系