

氢化酶结构研究进展

杜明^{1,2}, 任南琪^{1,*}, 张璐¹, 许继飞¹, 邱颀¹

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 哈尔滨 150090;

2. 哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院, 哈尔滨 150090)

摘要: 氢化酶是微生物代谢产氢过程中的关键酶,也是目前生物制氢领域的研究热点。本文综述了厌氧发酵产氢微生物中氢化酶的分类及特点,以及[Ni-Fe]、[Fe-Fe]和[Fe-S cluster-free]三种氢化酶晶体结构和活性中心结构;阐述了多种微生物来源的氢化酶结构的研究进展,对几种典型氢化酶的结构及活性中心进行了对比分析,并根据当前研究热点,对氢化酶的研究方向进行了展望。本文阐述的内容信息量丰富且具有一定的实用性,对于氢化酶相关领域研究具有重要的意义。

关键词: 氢化酶; 晶体结构; 厌氧菌; 进展

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1672- 5565(2009) - 04- 323- 05

Review on Structure of Hydrogenase

DU Ming^{1,2}, REN Nanqi^{1,*}, ZHANG Lu¹, XU Jifei¹, QIU Jie¹

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China;

2. College of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Hydrogenase is the key enzyme and plays an important role in the process of biohydrogen production, which is an interesting topic in this research field. In the paper, the classification of hydrogenase was described. According to lots of research results, the recent reports of crystal structure and active site structure of the three kinds of hydrogenases, [Ni-Fe], [Fe-Fe] and [Fe-S cluster-free], were quoted and contrasted. Moreover, some new approach and direction for hydrogenases were indicated. This review is informative and useful. The overall presentation is good for the relative studies on hydrogenases.

Key Words: Hydrogenase; Crystal Structure; Anaerobe bacteria; Advance

能源对于人类的生存、繁荣与发展是至关重要的。目前人类主要利用煤和石油等化石燃料作为初级能源,而这些能源却给人类带来全球气候改变,环境污染,生态变异和健康问题。解决这些问题并实现人类的可持续发展目标,必然离不开可替代的清洁能源,以构筑新的能源体系。可再生清洁能源中,氢能源是极具潜力的未来替代能源之一^[1,2]。

氢化酶(hydrogenase),也称为氢酶,是一类存在于微生物体内的生物酶,它能可逆催化氢气的氧化还原反应。1931年,Stephenson等人将微生物体内可以分解甲酸产生氢气的物质称为氢化酶。40多年以后,人们才首次从巴氏梭菌中分离得到纯化的氢化酶。此后的很长时间内,氢酶的研究并未引起人们的重视,直到能源危机和环境污染等问题的出现,清洁能源的研发迫在眉睫,氢化酶的潜在

重要性才逐渐被人们所认识。

目前,多种微生物来源的氢酶的分子结构、催化机理都在不同程度上得到了阐明。随着人类对能源需求急剧增加,利用微生物制取氢气已成为研究的热点问题,而对氢酶结构及活性中心的研究将为生物制氢技术提供重要的理论基础。

1 氢酶的分类

根据氢酶的催化特性,可将氢酶分为吸氢酶、放氢酶和双向氢酶等类型。根据氢酶所含金属原子的种类可将氢酶分为[Ni-Fe]氢酶、[Fe-Fe]氢酶和[Fe-S cluster-free]氢酶。具体的类型、分类依据及各自的特点如表1所示。

收稿日期: 2009- 05- 09; 修回日期: 2009- 06- 09.

基金项目: 中国博士后科学基金(20070420861)和黑龙江省博士后基金(LBH- Z07115)。

作者简介: 杜明, (1977-), 副教授, 环境科学与工程专业博士后(在站), 主要从事于蛋白质结构与功能研究。

* 通讯作者: 任南琪, 教授, 主要从事于环境科学与工程研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 氢化酶的分类
Table 1 Classification of hydrogenase

分类依据	类型	特点	备注
根据 氢 酶 的 催 化 特 性 的 不 同 划 分	(1) 吸氢酶	特定催化吸氢反应	在细胞外几乎所有的氢酶都具有双向催化特性, 在细胞内氢酶主要具有单向催化特性 ^[3] 。
	(2) 放氢酶	特定催化放氢反应	
	(3) 双向氢酶	根据细胞内生理条件的不同而化不同的反应	
根据 氢 酶 活 性 中 心 所 含 金 属 原 子 的 种 类 不 同 划 分	(1) [Ni- Fe] 氢酶	分子中结合 Ni 和 Fe 两种金属原子 (Ni- Fe), 有的还含有 Se 原子 (Ni- Fe- Se)。	绝大多数氢酶含有金属原子; 目前研究的氢酶多数属于 Fe 氢酶和 NiFe 氢酶。
	(2) [Fe- Fe] 氢酶	分子中结合 Fe 一种金属原子 (Fe- Fe), Fe 氢酶一般具有较高的催化产氢活性。	
	(3) [Metal- free] 或 [Fe - S cluster- free] 氢酶	这种氢酶分子中含有非催化活性的功能性铁原子 ^[4] 。	

2 氢化酶的分子结构与活性中心

自 1931 年氢酶被发现以来, 科学家们陆续发现许多微生物含氢酶^[5]。1974 年 Chen 等^[6] 首先从巴氏梭菌中分离纯化了可溶性氢酶, 随后有多种氢酶从不同的微生物中得到纯化。目前已有数十种微生物氢酶被分离纯化, 如 *Dsulfobivrio gigas*, *Megasphara elsdenii*, *Rhizobium japonicum*, *Chromatium vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Thiocapsa roseopersicina*, *Dsulfobivrio vulgaris* 等。[Ni- Fe] 氢化酶是在细菌和弧菌中发现的, 由大小不同的两个亚基组成。活性中心在大亚基上, 具有连接到铁原子上的两个 CN 分子和一个 CO 分子, 小亚基上具有 [Fe- S] 簇^[7]。[Fe- Fe] 氢化酶是在细菌和真核生物中发现的, 它的活性中心是两个 Fe 原子组成的双金属中心, 每个铁原子上连有三个 CO 分子和两个 CN 分子, 活性中心是通过 Fe 上的一个硫代半胱氨酸与近端的 [4Fe- 4S] 簇相连而连接在酶分子上的^[8]。2006 年 Pilak 等^[9] 人报道了 [Fe- S cluster- free] 氢化酶的晶体结构。

2.1 [Ni- Fe] 氢酶的晶体结构与活性中心

近年来, 随着科学技术的飞速发展, 氢化酶结构和功能的研究也取得了巨大进展。1995 年, Fontecilla- Camps 在 Nature 上发表了 [Ni- Fe] 氢化酶的晶体结构^[7,10]。迄今为止已有多种细菌的 [Ni- Fe] 氢酶的晶体结构被阐明, 包括 *Desulfobivrio gigas*, *Desulfobivrio fructosovorans*, *Desulfobivrio vulgaris*, *Desulfobivrio desulfuricans* 和 *Desulfomicrobium baculatum* 等。通过对比分析可知, 已阐明的氢酶分子的折叠具有很高的相似性, 不同的是这些氢酶活性中心 Ni、Fe 二原子上非蛋白配体的结构上存在差异^[11]。

2.2 唯铁氢化酶的结构

1998 年, Peters 等^[8] 人在 Science 上发表了巴氏梭菌唯铁氢化酶的晶体结构。研究表明在催化位点中包含五个 [Fe- S] 簇, 其中一个特殊的 H 簇。H

簇中含有两个明显的有机金属 Fe 原子, 通过两个配体 CO 和 CN 实现金属和碳的结合。1999 年, Fontecilla- Camps 等^[12] 人得到了分辨率为 1. 6Å 的脱硫弧菌唯铁氢化酶的晶体结构。

Cohen 等^[13] 人在研究唯铁氢化酶中氢气扩散通道时, 于 2005 年在 Structure 上报道的巴氏梭菌唯铁氢化酶的晶体结构。巴氏梭菌唯铁氢化酶空间结构中具有包裹在内部的 H 簇和 [Fe- S] 簇, 而且有一些连接到两个主要气体通道的氨基酸残基在外部溶液(底物) 和分子内部包裹的 H 簇的联系上起到了重要作用。Michael 等^[14] 人以巴氏梭菌为研究对象, 阐述了糖氧化产氢的电子传递过程。丙酮酸氧化后电子通过铁氧还蛋白(Fd) 传递给氢化酶, 到达 H 簇至少要经过七个 [Fe- S] 簇^[15]。

2.3 [Fe- S Cluster- free] 氢化酶的晶体结构与活性中心

[Fe- S Cluster- free] 氢化酶(Hmd) 是一个同型二聚体, 分子尺寸约为 90Å× 50Å× 40Å 分子结构中间具有一个球状单元, 两边线形地连接在两个外周单元上, 每个外周单元由 α 或 β 结构组成并属于 Rossmann 折叠蛋白家族。2006 年 Pilak 等^[9] 人报道的 [Fe- S cluster- free] 氢化酶 (Hmd, EC 1. 12. 98. 2) 的晶体结构。Hmd 由三个球状的单元组成: 两个同样的由类似于亚基 N- 末端的 Rossmann 折叠组成的外周单元; 一个由上述两个亚基的 C- 末端缠绕组成的中心单元。

Hmd 氢化酶的活性位点裂隙位于 Hmd 分子中心球形单元和外周单元之间。有的 Hmd 氢化酶的活性位点裂隙是开放的如 *M. jannaschii* Hmd 裂隙结构, 有的是闭合的如 *M. kandleri* Hmd 裂隙结构。在结构测定过程中开放式结构可以检测到一个 U- 型电子密度, 而在 *M. jannaschii* Hmd 的闭合结构中则是被完全包埋的。

3 研究展望

氢气是理想的清洁能源, 所以氢能的研究开发已成为诸多科学家关注的焦点之一, 而氢化酶又是微生物代谢产氢过程中极为重要的一种酶。因此, 从那些方面开展对氢化酶的研究才能对生物制氢产业产生最有力的推动, 这是科研工作者们需要思考的问题。

微生物都具有不同程度的产氢能力, 因此利用发酵产氢微生物, 将葡萄糖等生物质转化为氢气在技术本身没有问题。而一直困扰其应用过程的是经济性的问题, 即如何降低发酵制氢的成本, 使之可以和石化能源催化制氢的经济性相比拟, 或者可以与其他生物能源过程相竞争。核心问题是如何提高糖的转化率, 如何降低底物成本, 如何在生物反应器水平上实现高效产氢^[16]。

目前报道的发酵产氢微生物主要是梭菌属细菌和肠杆菌属细菌, 产氢能力通常可以达到 30 mmol H₂/g- drycell·h^[17]。据报导, 从厌氧产甲烷污泥中分离到自絮凝产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) HU-101 和突变体 AY-2, 产氢速率为 58 mmol H₂/L- culture·h 和 101.5 mmol H₂/L- culture·h, 是目前报导的最高产氢速率值。HU-101 和 AY-2 是最先被发现具有凝集现象的发酵产氢细菌, 它们的分泌物能让菌体絮凝。本课题组分离得到了产乙醇杆菌(*Ethanoligenens*) YUAN-3T, 其最大产氢能力达到 27.6 mmol H₂/g- drycell·h, YUAN-3 具有十分良好的菌体细胞自凝集特性^[18], 这对于减少菌株的流失和降低生物制氢成本等方面具有重要意义。有关自凝集产氢细菌的报道目前世界上还很少见, 具有自凝集特性的产氢细菌将为生物制氢领域开辟出一个重要的研究方向。因此深入开展 YUAN-3 和 HU-101 等高效优质菌株中的氢化酶的结构与功能的研究具有重要意义。

参考文献(References):

[1] Zhu H, Suzuki T, Tsygankov AA, et al. Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels [J].

Int. J. Hydrogen Energy, 1999, 24: 305- 310.

[2] Lay J J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen [J]. Biotechnol. Bioeng., 2000, 68 (3): 269- 278.

[3] Vignais P M, Billoud B., Meyer J. Classification and Phylogeny of hydrogenases [J]. FEMS Microbiol. Rev. 2001, 25: 455- 501.

[4] Lyon EJ, Shima S, Buuman G et al. UV A/blue light inactivation of the metal free hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea [J]. Eur J Biochem, 2004, 271: 195- 204.

[5] Stephenson M, Stickland L H. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen 1. The properties of hydrogenase [J]. J Biochem, 1931, 25: 205- 214.

[6] Chen J S, Mortenson L E. Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5 [J]. Biochim Biophys Acta, 1974, 371: 283- 298.

[7] Volbeda A, Charon M H, Piras C, et al. Crystal structure of the nickel- iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* [J]. Nature 1995, 373: 580- 587.

[8] Peters J W, Lanailotta W N, Lemon B J, et al. X- Ray Crystal Structure of the Fe- Only Hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Angstrom Resolution [J]. Science, 1998, 282: 1853- 1858.

[9] Pilak O, Mamat B, Vogt S, et al. The crystal structure of the apoenzyme of the iron- sulphur cluster- free hydrogenase [J]. J. Mol. Biol., 2006, 358: 798- 809.

[10] Marr A C, Spencer D J E, Schuorder M. Structural mimics for the active site of [NiFe] Hydrogenase [J]. Coord. Chem. Rev., 2001, 219- 221: 1055- 1074.

[11] Volbeda A, Montet Y, Vemede X et al. High- resolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase [J]. Int J Hydrogen Energy, 2002, 27: 1449- 1461.

[12] Volbeda A, Fontecilla- Camps JC. Structure- function relationships of nickel- iron sites in hydrogenase and a comparison with the active sites of other nickel- iron enzymes [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2005, 249(15): 1609- 1619.

[13] Cohen J, Kim K, King P, et al. Finding Gas Diffusion Pathways in Proteins: Application to O₂ and H₂ Transport in Cpl [FeFe]- Hydrogenase and the Role of Packing Defects [J]. Structure, 2005, 13(9): 1321- 1329.

[14] 邢德峰. 产氢- 产乙醇细菌群落结构与功能研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学. 2006: 8- 13.

[15] Michael AWW, Stiefel EI. Biological Hydrogen Production: Not So Elementary [J]. Science, 1998, 282: 1842- 1843.

[16] Adams MWW, Mortenson LE, Chen JS. Hydrogenase [J]. Biochim Biophys Acta, 1981, 594: 105- 176.

[17] Xing D, Ren N, Li Q, et al. *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. nov., isolated from molasses wastewater [J]. Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56: 755- 760.

[18] Defeng Xing, Nanqi Ren, Xie Tianhui, et al. Continuous hydrogen production of auto- aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN- 3 in a continuous stirred- tank reactor. 16th World Hydrogen Energy Conference. Lyon, 2006 (Oral presentation).

(上接第 322 页)

[3] Mizuki E, Ohba M, Akao T, et al. Unique activity associated with non- insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell- killing action on human cancer cells [J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 86: 477- 486.

[4] S. Okumura, H. Saitoh, T. Ishikawa, N. Wasano, S. Yamashita, K. Kursumoto, T. Akao, E. Mizuki, M. Ohba, K. Inouye, Identification of a novel cytotoxic protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and its selective cytotoxic activity against various mammalian celllines [J]. J. Agric. Food Chem, 2005, 53: 6313- 6318.

[5] Toshihiko Akiba, Kazuhiko Higuchi, Eiichi Mizuki, et al. Nontoxic Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis* Demonstrates a Remarkable Structural Similarity to Pore- Forming Toxins [J]. PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics, 2006, 63: 243- 248.

[6] Nakamatsu Y, Koike T, Sasaki K, et al. The cadherin- like protein is essential to specificity determination and cytotoxic of the *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin [J]. FEBS Lett, 1999, 460: 385- 390.

[7] Mizuki E, Park Y S, Saitoh H, et al. Parasporin, a human leukemic cell- recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis* [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2000, (7): 625- 634.