

Enzymatische vorming en oxidatie van H_2

Ontwikkeling van waterstof vindt plaats gedurende de groei van een groot aantal obligaat- of facultatief-anaerobe bacteriën, fotosynthetische bacteriën en algen, en kan worden opgevat als een mechanisme om elektronen (reductie-equivalenten), vrijgemaakt in oxidatieve stofwisselingsprocessen, kwijt te raken (1). Bovendien kunnen zekere organismen in deze groepen, maar ook strikt-aerobe bacteriën, zoals *Hydrogenomonas* en *Azotobacter*, waterstof gebruiken als bron voor energie en/of reductie-equivalenten.

De interesse in het mechanisme van de waterstof-stofwisseling door micro-organismen is sterk toegenomen door de noodzaak nieuwe methoden voor energieproductie te vinden en het besef dat biologische katalysatoren wellicht kunnen worden gebruikt voor de omzetting op grote schaal van zonne-energie in waterstof (of een precursor) of in synthetische reacties zoals de reductie van N_2 in NH_3 . Voor ze echter kunnen worden toegepast op deze praktische problemen, is meer basiskennis nodig over de eigenschappen van deze enzymen (hydrogenasen). Ofschoon in de literatuur hydrogenasen uit vele organismen zijn beschreven, zijn tot op heden slechts twee hydrogenasen uit obligaat-anaerobe bacteriën (2-6) en één uit een fotosynthetische bacterie (7) enigszins gezuiverd. Hoewel ten dele gekarakteriseerd, is weinig directe kennis – voor een deel tegenstrijdig – beschikbaar over hun structuren, redox-eigenschappen en het mechanisme waarmee zij met hun elektronen donors/acceptors reageren en waarmee H^+/H_2 gereduceerd/geoxideerd wordt.

Een project dat beoogt hydrogenasen uit verschillende organismen te zuiveren en daarna te bestuderen is onder auspiciën van de SON Werkgemeenschap voor Bio-energetica aangevangen en omvat samenwerking en gecoördineerde onderzoeken van het Laboratorium voor Microbiologie, Vrije Universiteit, Amsterdam en de Laboratoria voor Biochemie van de Gemeentelijke Universiteit, Amsterdam en de Landbouwhogeschool, Wageningen.

Eigenschappen van het hydrogenase

De gekatalyseerde overall reactie is $H_2 \rightleftharpoons 2 H^+ + 2 e^-$. (Het mechanisme van de waterstofwisseling is als specialistische notitie opgenomen op pagina 384). Uit

isotoopuitwisselingsexperimenten tussen H_2 en HDO of HTO blijkt, dat het enzym H_2 heterolytisch splitst, waarbij een enzym-hydride en een proton worden gevormd ($E + H_2 \rightarrow EH^- + H^+$) dit in tegenstelling tot de homolytische reactie aan de Pt-electrode. Metingen van de HD uitwisselingssnelheid zijn de grondslag voor een activiteitsbepaling van het hydrogenase; twee alternatieve bepalingsmethoden voor het enzym zijn een manometrische bepaling van de gasproductie uit $S_2O_4^{2-}$ in aanwezigheid van methyl violo-geen als elektronen carrier, of de gas opname onder invloed van een kleurstof zoals benzyl violo-geen of methyleen blauw als elektronen acceptor. Niet alle hydrogenasen de beide laatste reacties kunnen katalyseren.

Volgens de literatuur is de hydrogenase activiteit gelocaliseerd in of de oplosbare of aan de membraanstructuren van de cel. In sommige organismen wordt activiteit gevonden in beide fracties. In die gevallen waar dit is waargenomen, is het niet duidelijk of deze verdeling fysiologische betekenis heeft of dat de relatieve verhouding oplosbaar en membraan-gebonden enzym afhankelijk is van de methode gebruikt om de cellen te openen. Tegenstrijdige rapporten zijn dan ook gepubliceerd over de oplosbaarheid van één soort hydrogenase.

Het is sinds jaren bekend, dat hydrogenasen worden geremd door CO . In het begin werd dit aangenomen als aanwijzing, dat zoals haemoglobine – dat eveneens CO bindt – hydrogenase haem bevatten. Hoewel er bovendien aanwijzingen waren, dat ook Fe een rol speelde, is uit later onderzoek gebleken, dat een structuur overeenkomend met die van de ferredoxinen (8) een rol speelt. Naast het Fe zit een vorm van zwavel in deze structuur; bij aanzuren wordt H_2S vrijgemaakt (het zogenaamde zuur-labele zwavel).

Pogingen om het hydrogenase te zuiveren,

hebben vele jaren schipbreuk geleden door de eigenschap dat vele hydrogenasen snel geïnactiveerd worden door O_2 . Op dit moment is het echter duidelijk, dat de O_2 -gevoeligheid afhankelijk is van de bron van het enzym; hydrogenasen van obligaat-anaerobe bacteriën zijn in het algemeen gevoeliger dan het enzym uit facultatief-anaerobe of fotosynthetische bacteriën. O_2 schijnt twee effecten te hebben; het veroorzaakt inactivering alsmede een vorm van remming, die kan worden opgeheven door het enzym te reduceren met $Na_2S_2O_4$ en methyl violo-geen. De chemie van deze O_2 -effecten is echter volledig onbegrepen. Om deze effecten te voorkomen, dient het enzym – vooral de zeer gevoeligen – te worden gezuiverd onder uitsluiting van O_2 .

Een aantal fysisch-chemische parameters van de hydrogenasen die zijn gezuiverd is samengevat in Tabel I.

Er is grote onzekerheid over de gehalten aan Fe en zuur-labele S in het hydrogenase uit *C. pasteurianum* maar het lijkt erop alsof een minimum gehalte van 4 atomen Fe per molecuul eiwit nodig is voor volle activiteit. Een gelijk gehalte aan Fe is bepaald in het hydrogenase uit de fotosynthetische bacterie *Chromatium*, maar het mol. gewicht van dit eiwit is hoger en verschilt in andere aspecten eveneens van de hydrogenasen uit obligaat-anaerobe bacteriën.

Er zijn publikaties geweest, waarin werd gesteld, dat onzuivere preparaten van hydrogenase Mo en/of flavine bevatten, essentieel voor de activiteit. Deze waarnemingen zijn echter niet bevestigd uit de analyses van de hoog-gezuiverde enzymen. De mogelijkheid dat één of meer componenten verloren zijn gegaan bij zuivering kan echter niet worden uitgesloten. Van belang is ook het feit, dat nitrogenase Mo bevat, terwijl de elektronen-carrier flavodoxine, welke een rol speelt in dit proces, flavine bevat.

Al deze meer of minder zuivere preparaten absorberen zichtbaar licht en hebben een breed absorptie-maximum bij ongeveer 400 nm, en hebben in dit opzicht daarmee dezelfde karakteristieken als de veel kleinere ferredoxinen, die 4 of 8 Fe en S^{2-} atomen per molecuul bevatten. De absorptie in het zichtbare spectrum neemt af na reductie van het enzym met $Na_2S_2O_4$ of H_2 .

Het EPR spectrum van het door H_2 -gereduceerde hydrogenase uit *C. pasteurianum* lijkt op dat van de gereduceerde

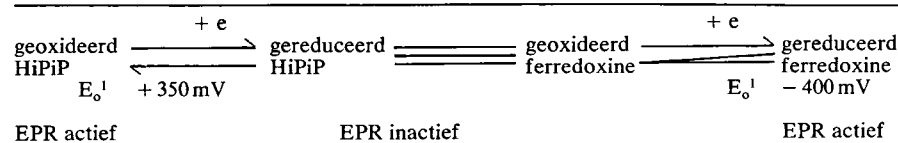
Tabel 1

Bron	Referentie	Mol. Gewicht	Subeenheden	Fe (g.atomen/mol)	label S ²⁻
<i>Clostridium pasteurianum</i>	2	60 000	2	4	4
	3,9	60 500	1	12	12
	4	60 000	1	4-5	4-5
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> (soluble)	5	60 000	2	3,5	3,2
(particulate)	6	60 000	—	8	—
<i>Chromatium</i>	7	98 000	2	4	4

bacteriële ferredoxinen (4 Fe,S per cluster (8)); het spectrum van het enzym na oxidatie met H⁺ of kleurstoffen lijkt sterk op dat van het hoge-potentiaal ijzereiwit (HiPiP). Het lijkt er op dat het redox centrum van hydrogenase 2 elektronen kan opnemen. Maar om de resultaten van de HD uitwisseling te kunnen verklaren, welke aantonen dat een half-geoxideerde vorm van H₂ aan het enzym wordt gebonden, wordt aangenomen, dat gedurende de katalytische cyclus de Fe-S clusters oscilleert tussen de volledige en de half-gereduceerde vorm. Deze half-gereduceerde vorm, die geen EPR signaal geeft – dit in tegenstelling tot de volledig gereduceerde vorm en de hoge-potentiaal vorm, die beide zeer karakteristieke signalen hebben – is in feite een toestand, die equivalent is met de geoxideerde vorm van bacteriële ferredoxine.

Deuterium heeft geen duidelijk effect op

het EPR spectrum, maar ¹³CO verbreedt het spectrum, hetgeen aangeeft, dat het een complex vormt met het Fe-S centrum. Verdere aanwijzingen dat het Fe-S centrum van het hydrogenase op dat van bacteriële ferredoxine lijkt en niet op het 2Fe-S centrum van het planten type ferredoxine (8), komt uit vervangingsexperimenten met thiofenol, die het Fe₄S₄(thiofenyl)₄ dianion opleveren. De resultaten tot nu toe verkregen, suggereren dat de verschillende gezuiverde hydrogenasen verschillen in hun reactiviteit met electron acceptors/donors. Zij reageren allemaal met viologeen kleurstoffen en methyleenblauw, maar in tegenstelling tot het *C.pasteurianum* hydrogenase reageert het *Chromatium* hydrogenase niet met ferredoxine; bovendien zijn er aanwijzingen dat de hydrogenasen uit *Desulfovibrio* spp specifiek reageren met cytochrome C₃.



schappen overeenkomend met die van de bacteriële ferredoxinen. Zij zijn in staat de reductie van molybdothiol complexen te katalyseren, die worden voorgesteld als modellen voor nitrogenase (10). H₂ wordt ontwikkeld wanneer de twee complexen worden gemengd, maar het is duidelijk dat de gasvorming veroorzaakt wordt door het Mo-complex. H₂ productie door middel van Mo-vrije systemen is ook waargenomen maar de maximum gasvorming vond plaats wanneer Fe²⁺, S²⁻ en n-C₃H₇SH gemengd waren in de verhouding 1:2:6, een stoichiometrie die niet in overeenstemming is met de inzichten betreffende het actieve centrum van *C.pasteurianum* hydrogenase.

Kunstmatige systemen voor de foto-productie van waterstof

De foto-productie van H₂ uit H₂O is waargemaakt op laboratorium schaal met behulp van een systeem bestaande uit chloroplasten uit planten met bacteriële hydrogenase in aanwezigheid van een juiste lage-potentiaal electronen carrier (ferredoxine of methyl viologeen). Helaas is het chloroplasten systeem niet erg stabiel, terwijl het systeem gevoelig is voor O₂; O₂ het tweede produkt van de fotolyse van H₂O, inactieveert het hydrogenase en auto-oxideert de electronen-carrier. Methoden om het systeem te stabiliseren zijn dan ook vereist, om dit systeem praktisch toepasbaar te maken.

Het onderzoek met systemen, die H₂ produceren, kunnen zich in principe op de volgende aspecten richten.

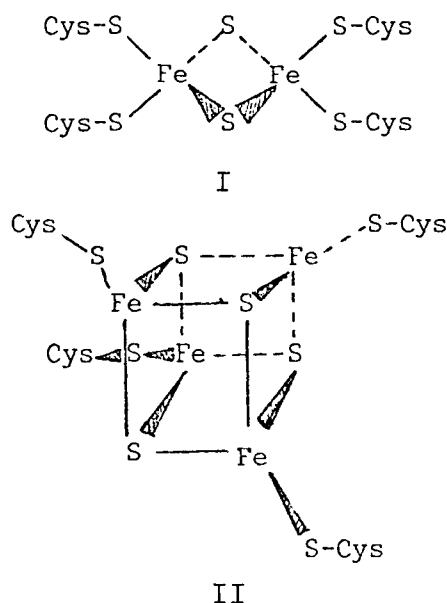
□ Het ontwikkelen van chemische Fe-S-modellen als substituenten voor biologische electronen-carriers. De modellen van Schrauzer voor de reductie van N₂ zijn in dat opzicht zeer interessant een veelbelovend.

□ Koppeling van hydrogenase met de fotosynthese. Inzicht in het mechanisme van de fotosynthese is hiervoor zeer belangrijk. Men kan de vraag stellen of gebruik kan worden gemaakt van fotoreduceerbare modelverbindingen door deze te koppelen via chemische Fe-S-modellen aan het hydrogenase systeem.

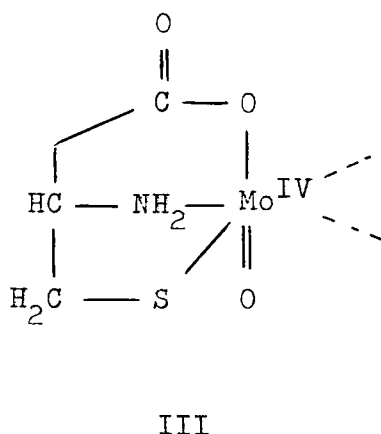
□ Koppeling van de H₂-vorming aan anaerobe fermentatie. Hoewel het zeker is dat een dergelijk proces zelfs bij optimalisering geen eindoplossing voor het energie vraagstuk oplevert, mag worden verwacht, dat bestudering van dit proces kan leiden tot inzichten, van nut voor de fotoreductieve koppeling. De fermentatieve verwerking verdient uit energetisch en economisch oogpunt de voorkeur boven meer chemische wijzen. De moeilijkheid is dat bij de specifieke afbraak tot de voor H₂ noodzakelijke verbindingen (pyruvaat, lactaat), grote hoeveelheden hogere en

Modellen voor hydrogenase

Model verbindingen voor de cubaan-achtige structuur van de Fe-S centra van bacteriële ferredoxine zijn gesynthetiseerd. Zij hebben de algemene formule Fe₄S₄(SR)₄⁻ (structuur II), waarin R aromatisch of alifatisch kan zijn. Deze verbindingen hebben fysisch-chemische eigen-



SCHEMATISCHE VOORSTELLING van ijzer, labiele zwavel en cysteinezwavel in de Fe-S structuur van I plant-type ferredoxine; II bacteriële ferredoxine en hoge-potentiaal ijzereiwit (HiPiP).



Voorgestelde structuur van een modelverbinding voor de nitrogenase.

lagere vetzuren (acetaat, propionaat en butyraat) en corresponderende alcoholen worden geproduceerd. Van groot belang zijn waarnemingen die spreken over een synergisme tussen H_2 -vormende en CH_4 -vormende bacteriën. Het gevormde H_2 wordt in een energie-gekoppelde reactie gebruikt bij de omzetting van CO_2 en vetzuren in CH_4 . Bovendien is beschreven dat bacteriële processen als de H_2S - en NH_3 -vorming door de aanwezigheid van H_2 sterk worden beïnvloed.

1. Gray, C. T. en Gest, H. (1965). Science 148, 186-192.
2. Nakos, G. en Mortenson, L. E. (1971). Biochim. Biophys. Acta 227, 576-583.
3. Chen, J. S. and Mortenson, L. E. (1974). Biochim. Biophys. Acta 371, 283-298.
4. Erbes, D. L., Burris, R. H. en Orme-Johnson, W. H. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 72, 4795-4799.
5. Le Gall, J., Dervartanian, D. V., Spilker, E., Lee, J. en Peck, H. D. Jr. (1971). Biochim. Biophys. Acta 234, 525-530.
6. Yagi, T. (1970). J. Biochem. (Tokyo) 68, 649-657.
7. Giltitz, P. H. en Krasna, A. I. (1975). Biochemistry 14, 2561-2568.
8. Mayhew, S. G. (1975), Chemisch Weekblad 71-11, p. 16.
9. Mortenson, L. E. en Chen, J. S. in Microbial Iron Metabolism, Neilands, J. B. (ed.) Academic Press, New York, 1974.
10. Tano, K. en Schrauzer, G. N. (1975). J. Amer. Chem. Soc. 97, 5404-5408.



S. G. Mayhew (35) behaalde zijn Ph. D. in 1966 aan de universiteit van Sheffield. Hij werkte 6 jaar lang op het Department of Biological Chemistry van de universiteit van Michigan en is nu verbonden aan de afdeling biochemie van de Landbouwhogeschool te Wageningen.



C. Veeger (46) studeerde in 1958 af als biochemicus en promoveerde in 1960 op een enzymatisch-mechanistisch onderwerp aan de Universiteit van Amsterdam. Hij was daarvoor werkzaam gedurende een aantal jaren bij Philips-Duphar. Hij is sinds 1964 als hoogleeraar Biochemie verbonden aan de Landbouwhogeschool te Wageningen. Hij werkte gedurende langere perioden op universitaire instituten in Sheffield, Madison, Ann Arbor, Woods Hole en Konstanz.