

中華民國第42屆中小學科學展覽會

::: 作品說明書 :::

高中-化學科

科 別：化學科

組 別：高中組

作品名稱：低碳數烯烷類氣體分子在甲烷單氧化酵素的反應性之比較

關 鍵 詞：嗜甲烷菌、sMMO、pMMO

編 號：040217

學校名稱：

臺北市立第一女子高級中學

作者姓名：

石翔文、王緯貞

指導老師：

黃進松



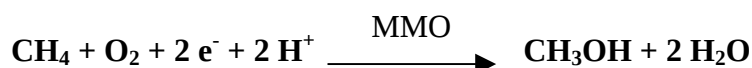
低碳數烴烷類氣體分子在甲烷單氧化酵素的反應性之比較

壹、研究動機

近幾十年來,工業化及科技進步帶來了文明及生活的便利,卻也藉此讓大自然原有的平衡發生改變,例如溫室效應,便是由於大氣中的分子組成發生變化,如二氧化碳或甲烷等氣體,它們因為吸收了太陽光中的紅外線,造成了溫室效應,改變了全球的氣候環境,研究對於在自然界中碳循環有重要貢獻的嗜甲烷菌(Methanotrophic bacteria 或 methanotroph),將有助於改善我們日漸增加的溫室效應。根據 Söchnngen 在 1906 年的推測,與甲烷代謝相關的微生物將在減少大氣中大量甲烷分子濃度當中,扮演重要的角色。因此,我們試圖基於此項觀點,推測當環境中甲烷濃度有升高的趨向時,是否會出現相對應的微生物有大量繁殖的傾向。嗜甲烷菌為格藍氏陰性細菌,轉化甲烷為甲醇作為此菌能量及碳源的來源,在有氧氣和烴類氣體的環境下,它也可以將烴類轉化成相對應的醇類,烯類轉化成相對應的環醚類,如丙烷變正丙醇及異丙醇,丙烯經作用後成為環丙醚。嗜甲烷菌可以生長在許多不同條件的環境中,從海水、淡水、沈澱物、泥炭沼澤、土壤和溫泉等都有被發現(Murrell et al., 2000)。

貳、研究目的

嗜甲烷菌催化甲烷成甲醇的方程式如下：



這樣的反應,在嗜甲烷菌中是由 MMO—甲烷單氧化酶,來進行相關的催化反應方法。普遍上均使用 *Methylococcus capsulatus* (Bath) 和 *Methylosinus trichosporium* (OB3b) 這兩種菌株,在我們實驗室則使用 *M. capsulatus* 來產生所需的酵素,從這個菌可以萃取出來的兩種明顯不同的甲烷單氧化酶。其一為位於細胞質的溶解性單氧化酶(soluble MMO, 簡稱為 sMMO),另一種則是鍵結在細胞膜上的微粒單氧化酶(particulate MMO, 簡稱為 pMMO)。

而 sMMO 已被解出其結構和催化反應的機制,但 pMMO 早期較少被人們研究,因為它具有不穩定的活性和技術上難以被單離的事實,造成研究上的瓶頸。直到最近,許多膜鍵結蛋白質的技術開發,pMMO 才漸漸被了解。它可以在一般的溫度和壓力下催化五個碳以下的直鏈烴類如正丙烷、及正丁烷,但對於含支鏈的烴類如異丙烷或異丁烷,則不具反應性。基於上述溶解性及微粒甲烷單氧化酶的特性,我們想藉此了解各式烴類分子在甲烷單氧化酶的活性差異,甚至進而能夠對從此差異性中推論出相關酵素或微生物的存在,相信生態環境的指標與污染程度的判斷,或許可以成為新的分析方法。

一般尋找新菌種的方法,不外乎從現地的環境條件著手,推測其可能出現的菌種,以培養皿利用類似的環境,促使菌株生成單一菌落後,將單一菌體單離出來,但很可能因生長條件不合適而喪失其微生物生態的普遍性,另外,若利用萃取或直接以氣相層析儀分析

土壤或溶液中醇類或環醚類的含量，也可能由於成份的複雜而造成分析上的困難，在這個研究中，我們將利用二種或三種的烷類或烯類的混和氣體，直接分析密閉酵素反應系統中，氣相組成的成分變化，來推斷酵素反應的種類及現地的環境。

	溶解性單氧化酶	微粒單氧化酶
縮寫	sMMO	pMMO
蛋白質出處	細胞質	細胞膜
蛋白質中心金屬	鐵	銅
受質分子限制	八個碳以下有分支或直鏈的分子、芳香族分子	五個碳以下的直鏈分子
催化位置選擇性	相同	相同
反應機制	自由基反應	協調反應
活化所需環境	無銅離子	含銅離子
受質反應位置	C1	C2

表一、sMMO 與 pMMO 之比較

首先，我們想藉由 pMMO 只催化五個以下的直鏈烷類分子這樣的特性，來找出一種指標氣體，希望此種氣體本身不會與 pMMO 反應，亦不會抑制甲烷和 pMMO 的催化反應，從其他氣體在氣相色層分析儀上的消長，以此分子為標準，便可以測定其反應的活性。在自然界中，最佳且符合這樣條件的氣體分子便是異丁烷，除了利用異丁烷外，同時具備反應性的丙烯及丙烷也同時與甲烷做比較，以求得其反應前後氣體比例的變化，相對應推測初期反應的差異性。

除了此實驗外，再以含 sMMO、pMMO 不同濃度但定量的菌液放入 45°C 的氣密式培養箱，分別在不同的時間以氣相層析儀測其氣體比例的消長，以觀察反應速率與時間的關係。

最後蒐集適合嗜甲烷菌生長的地點進行採集的工作，如垃圾掩埋場、溫泉區、水田、沼澤地等處，在大約 10 公分左右有嗜甲烷菌出現的土層挖掘。再以相同的步驟進行菌的培養及分析工作。

參、研究方法及步驟（含器材及藥品）

我們的實驗可分為三個部分：菌的培養、有機合成以及酵素反應分析。

（一）嗜甲烷菌的大量培養

嗜甲烷菌 *M. capsulatus*(Bath) (ATCC 33009)，具有培養時間短且培養溫度(45 °C)較一般細菌高等優點，藉由銅離子(CuSO₄ and Cu-EDTA)的多寡可分別表現微粒型甲烷單加氧酶(pMMO)或是溶解型甲烷單氧化酶(sMMO)。嗜甲烷菌的碳源來自於甲烷氣體，因此培養條件必須於氣密的環境中，才能維持固定的氣體濃度；此外，嗜甲烷菌為好氧菌，代謝過程成需氧加入反應，所以培養過程必須在甲烷和氧氣比例大約相等的情況下進行。

Kpi 緩衝溶液 (100 X)			
KH ₂ PO ₄	27.2 g		
Na ₂ HPO ₄	28.4 g		
EDTA	144 mg		
NMS 培養液 (10 X)			
CaCl ₂ · H ₂ O	2 g		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 g		
KNO ₃	10 g		
加入二次去離子水 1000 mL			
微量元素溶液 (200 X)			
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg	H ₃ BO ₄	30 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	20 mg	NiCl ₂ · 6H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3 mg	加入二次去離子水 1000 mL	
維他命溶液 (100 X)			
Biotin	2 mg	Folic acid	2 mg
Thiamine HCl	5 mg	Ca ²⁺ pantothenate	5 mg
Vitamin B ₁₂	0.1 mg	Bioflavin	5 mg
Nicotinamide	5 mg	加入二次去離子水 1000 mL	
Fe/EDTA 溶液 (1000 X)			
EDTA	1.4 g		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5 g		
H ₂ SO ₄	0.5 mL		
加入二次去離子水 1000 mL			

表二、嗜甲烷菌之培養液配方

1. 培養皿培養及選種

嗜甲烷菌 *M. capsulatus*(Bath)菌種首先培養在含硝酸鹽培養液(Nitrate Mineral Salts medium, NMS 緩衝液) 的固態洋菜膠培養皿中，在甲烷含量佔 20%的空氣混合氣體中，經由一至二個禮拜生長、選種後取出。

取 25 mL NMS 加入 270 mL 二次去離子水，再加入 4.5 g Bacto-Agar，121 °C、1.5 atm 滅菌 30 分鐘，待冷卻後，使用注射過濾含 2.5 mL Kpi、2.5 mL 維他命溶液、125 mL 微量元素溶液及微量五水合硫酸鐵和二水合氯化錳的混合液。搖晃均勻後分裝至 6-10 個培養皿

中，靜置 24 小時，將單一菌株轉移至培養皿上，置於氣密式培養缸，保持甲烷：空氣為 1:4 的濃度，溫度 45 °C。大約 4-8 天，將菌株轉移至錐形瓶中培養。

2. 錐形瓶培養放大

一升 *M. capsulatus*(Bath)培養液配製：

NMS	100 mL
加水 890 mL，121 °C、1.5 atm 滅菌 30 分鐘。	
Kpi	10 mL
微量元素溶液	0.5 mL
維他命溶液	10 mL
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 mg (發酵槽培養)
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1 mg (發酵槽培養)
Fe/EDTA 溶液	500 mL (錐形瓶培養)
過濾消毒併入 NMS 中。	

錐形瓶培養依上述所列以比例配製，其中鐵離子供給方式依培養不同而改變，當錐形瓶培養階段時，以 Fe/EDTA 溶液加入，供給 sMMO 生成時活性中心所需鐵離子。移轉培養皿中獨立菌株於內含 30 mL NMS 培養液的 250 mL 錐形瓶中，在含 20% 甲烷的空氣混合物，一大氣壓的狀況下，連續振盪約兩天後；轉至內含 300 mL 同質培養液的 2 L 錐形瓶中，以相同條件培養至 Late Log Phase 或 Stationary Phase，可以由 UV 595 nm 偵測細菌濃度；所需時間亦約兩天，此時之培養液將作為發酵槽培養的來源。

(二) 化合物的合成

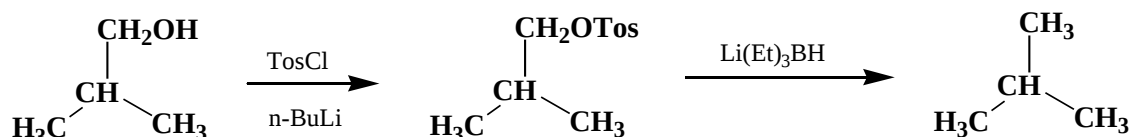
正丙烷及丙烯均可由化學藥品公司購得，至於異丁烷則因為時效性的關係，我們則以 1-異丙醇為起始物。先將反應物經磺酸醯化後，經去磺酸醯反應收集我們想要的氣體。將此氣體混合甲烷，作為酵素反應的準備。

250mL 燒瓶	1 個
汽球	數個
攪拌石	1 個
血清塞	1 個
n-BuLi	27.4mL
TosyCl	6.68g
異丁烷	4.10mL
己烷	60mL
乙醚	1 瓶

1. 取一個 250mL 的燒瓶裝入異丁烷+己烷和攪拌石，以血清塞塞住。
2. 將汽球中灌滿 Argon 並插在血清塞上以平衡內外壓力，再把燒瓶放入冰浴中。
3. 用針筒抽取 27.4mL 的 n-BuLi(1.6M in 己烷)一滴滴緩緩加入，直到反應物成乳白粥狀。

*注射完需立即清洗針筒，以免生成的鹽類阻塞針頭。

4. 反應進行 1.5~2hrs。
5. 打開血清塞，快速加入 TosyCl 6.68g 在蓋上血清塞，反應 2hrs。
6. 加入乙醚萃取，反覆 3~4 次。
7. 用旋轉真空機抽乾存放。
8. 要使用時再去磺酸鹽反應把 Tosy 拿掉。



1. 材料準備

(1) 製備混合氣體

- ① 將一 15mL 針筒截半，套上汽球並纏橡皮筋，最後纏上 parafilm，務必使汽球不漏氣
- ② 取一個 30mL 血清瓶，塞上血清塞並封好鋁蓋，插入汽球
- ③ 將該瓶抽至真空後，充滿氣體如甲烷（除（二）合成之異丁烷外，鋼瓶裝之甲烷、丙烷、丙烯皆以①~③步驟取得）
- ④ 再取一血清瓶，封瓶，抽至真空，加入兩種氣體各 15 cc，即可得混合氣體如甲烷+異丁烷

- ① 從發酵槽取出的菌液平均 1 L 中有 5 g~ 10 g 的活菌，經過高速離心後，取出下層的深褐色固體，以相等重量的 PIPES 緩衝液將其溶解至組織研磨器中，得新的菌液 A。

- ② 取菌液 A 0.5mL

(3) 微粒甲烷單氧化酶的萃取

- ① 利用圖一（見附錄）步驟萃取菌液 A 中的 pMMO，（注意：使用的緩衝溶液中需加入 50 μ M CuSO_4 水溶液，及第二次超高速離心後，所取用為下層略帶淡紅色的膠狀固體。）

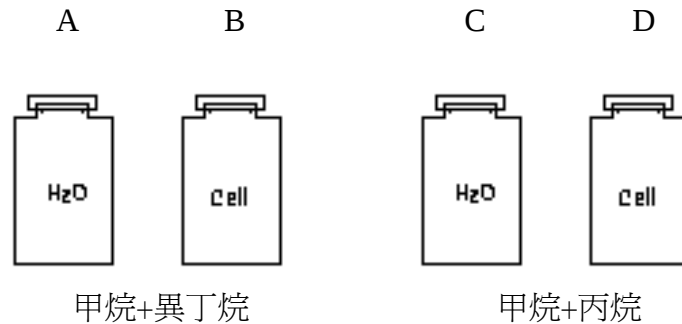
- ② 將膠狀固體刮至組織研磨器中，並加入和原先細菌濕重比相同毫升數之含 50 μ M CuSO_4 的 10 mM PIPES 緩衝溶液，均質化後即為 pMMO 萃取液。

2. 標準品的校正實驗

(1) 用菌液

- ① 取四個 30mL 血清瓶，標示 A、B、C、D
- ② A、C 瓶分別加入 H_2O 1mL，B、D 瓶分別加入 pipes 緩衝液 0.9mL 及 0.1mL 菌液 A 後以血清塞及鋁蓋封口

- ③ 四瓶皆以針筒抽掉 5mL 的空氣，接著 A、B 瓶分別打入甲烷+異丁烷 5mL，C、D 瓶分別打入甲烷+丙烷 5mL



- ④ 將四瓶一起放入氣密式培養箱 中，一小時後取出測氣相層析儀
 (2) 將菌液改為細胞膜，同 (三) 2. (1) 步驟

3.找標準物的實驗

(1) 用菌液

- ① 取三個 30mL 血清瓶，標示 a、b、c
- ② 皆加入 0.1mL 甲酸鈉及 0.9mL pMMO 後封瓶
- ③ 皆抽出 15mL 空氣後，瓶 a 加入 15mL 甲烷+異丁烷，瓶 b 加入 15mL 甲烷+丙烷，瓶 c 加入 15mL 甲烷+丙烯
- ④ 放入氣密式培養箱中，一小時後取出測氣相層析儀

- (2) 將菌液改為細胞膜，0.1mL 甲酸鈉改為 5mM NADH，同 (三) 3. (1) 步驟

4.活菌及 pMMO 在不同混合氣體的反應性之比較

(1) 製備標準物的混合氣體

- ① 參考 (三) 1. (1) 製備甲烷+異丁烷、甲烷+丙烷、甲烷+丙烯之混合氣體

(2) 用菌液 (pMMO)

- ① 同 (三) 3. (1) 步驟，瓶 b 加入 15mL 甲烷+丙烷，瓶 c 加入 15mL 甲烷+丙

(3) 用菌液 (sMMO)

- ① 同 (三) 4. (2) 步驟

5. 隨時間測活菌在異丁烷和丙烯為 1：1 混合氣體中之活性變化

(1) 製備異丁烷和丙烯比例為 1：1 的混合氣體

- ① 參考 (三) 1. (1) 製備異丁烷+丙烯之混合氣體
- ② 測氣相層析儀調整到異丁烷和丙烯比例為 1：1

(2) 用菌液 (pMMO)

- ① 取一個 30mL 血清瓶，加入 4mL pipes 緩衝液、0.5mL sodium formate、0.5mL 菌液
A
- ② 將①加入充滿異丁烷和丙烯比例為 1：1 之混合氣體瓶中
- ③ 放入氣密式培養箱 中，第一小時每 20 分鐘測一次氣相層析儀，第二個小時每

30 分鐘測一次氣相層析儀（每次測氣相層析儀的同時皆抽 0.5mL 溶液作萃取）

（3）用菌液（sMMO）

① 同（三）5.（2）步驟

6.反應氣體消耗及氧化物生成之分析與對照

（1）偵測反應氣體消耗量及消耗速率

① （三）5.（2）及（3）測氣相層析儀之結果

（2）菌液中生成物之萃取及分析

① 將抽出之菌液加入等量的二氯甲烷

② 充分搖晃後離心 20 分鐘

③ 取下清液測氣相層析儀

7. 丙烯定量

（1）取一血清瓶封蓋抽至真空

（2）每次打入 5mL 丙烯(2.5mg)，測氣相層析儀

（3）直到瓶內充滿丙烯氣體(30 mL)即停止

8. Protein 濃度定量

（1）取 2 μ L 膜蛋白(上清液部分)，加入 198 μ L DI water 充分混合

（2）取 （1）步驟之混合溶液 20 μ L，加入 100 μ L 溶液 A 充分混合

（3）加入 0.8mL 溶液 B 充分混合，靜置 15 分鐘後測 UV

9. 丙烯吸附性測試

（1）取三血清瓶封蓋標示 A、B、C

（2）三瓶皆抽掉 20mL 空氣再打入 15 mL 丙烯，測氣相層析儀

（3）取瓶 A 加入膜蛋白 2.5mL 及 PIPES 緩衝液 2.5mL，取瓶 B 加入膜蛋白 5mL，瓶 C 加入 PIPES 緩衝液 5mL，充分混合 3 分鐘後測氣相層析儀

肆、實驗結果與討論

（一）

各混合氣體在密閉的反應條件下，其氣體組成部分，將水作為標準品，經過二小時，45 °C 的培養條件下，其氣體組成的消長，經氣相色層分析儀分析所得之結果。

	甲烷/丙烷	甲烷/丙烯	甲烷/異丁烷
水(緩衝溶液)	1.00	1.00	1.00
喪失活性的細胞	0.98	1.02	0.92
含 sMMO 的細胞	1.08	0.85	0.62
含 pMMO 的細胞	0.98	0.84	0.96

表三

由表三中可以得知，在本實驗的培養條件下，喪失活性的細胞本體除了異丁烷有較強的吸附之外，丙烷、丙烯與甲烷的吸附程度近乎一致，所以其比例的消長，幾乎可以代表相對反應速率的快慢；從甲烷與丙烯的混合氣體實驗中，可以得知甲烷的反應性較丙烯來的快，但其反應速率的比例，則必須由產物發生的比例或反應物減少的比例求得，可由液體中甲醇及環丙醚等相對產物的比例求得。再者，在甲烷及異丁烷的實驗中，經由喪失活性的細胞之空白實驗校正後，可以得知，甲烷在溶解性甲烷單氧化酵素中，反應速率較異丁烷來的快，但在微粒甲烷單氧化酵素中，此二種氣體的反應速率，則不是一樣快，要不就是異丙烷本身具備抑制的效果，使得甲烷或異丁烷無法被氧化。另外，在甲烷及丙烷的例子中，則和甲烷和異丙烷經微粒甲烷單氧化酵素催化後所得結果類似，並未得到氣體組成成分的消長。由以上的分析發現，異丁烷幾乎不反應，且在核磁共振光譜上也找不到異丁醇的訊號，於是選定異丁烷作為標準物進行接下來的實驗。

(二)

	甲烷/異丁烷	丙烷/異丁烷	丙烯/異丁烷
水(緩衝溶液)	4.46	12.20	6.54
含 sMMO 的細胞	3.96	12.08	6.11
含 pMMO 的細胞	4.35	12.16	4.21

表四

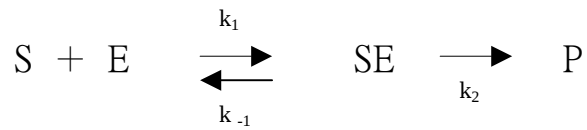
表四中，甲烷與異丁烷的混合氣體實驗結果如同表三。而在丙烷與異丁烷的混合氣體實驗中，丙烷在溶解性甲烷單氧化酵素中和在微粒甲烷單氧化酵素中，反應速率相類似。另外，在丙烯與異丁烷的混合氣體實驗中，可以得知，丙烯在微粒甲烷單氧化酵素中的反應性比在溶解性甲烷單氧化酵素中要快的多。異丁烷雖然作為本實驗目前最理想的標準物，但其有無抑制的效果，還要繼續實驗觀察，因此將要隨時間測量甲烷單氧化酵素的活性變化。我們選用丙烯和異丁烷作為反應氣體，選丙烯的原因可由表四看出來，丙烷的反應性是最差的，甲烷次之，丙烯最好，因此選用丙烯。

(三)

由圖二、三(見附錄)可看出丙烯在可溶性甲烷單氧化酵素中的反應速率是慢慢下降的，也就是說，在氣密式培養箱 45℃ 的環境下，可溶性甲烷單氧化酵素的活性是隨時間而慢慢下降的。

而圖四、五(見附錄)可看出丙烯在微粒體甲烷單氧化酵素中的反應趨勢接近零級反應，且其酵素反應效能較可溶性甲烷單氧化酵素來得好。其中圖四為微粒體甲烷單氧化酵素在不含銅離子的情況下之反應趨勢，可明顯看出在一段時間後酵素幾乎完全喪失活性。

我們可以由酵素動力學在穩定狀態下可推導出以下的結果：



$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[SE]$$

$$\frac{d[SE]}{dt} = 0, \quad E = E_0 - [SE]$$

$$[SE] = k_1[S][E] - k_{-1}[SE] - k_2[SE] = 0$$

$$= k_1[S] \{ [E_0] - [SE] \} - (k_{-1} + k_2) [SE]$$

$$= k_1[S] [E_0] - k_1[S] [SE] - (k_{-1} + k_2) [SE]$$

$$k_1[S] [E_0] = [k_1[S] + (k_{-1} + k_2)] [SE]$$

$$[SE] = \frac{k_1[E_0][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}$$

$$= \frac{[E_0][S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}}$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 \frac{[E_0][S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}}$$

當基質相對於酵素為過量時

$$[S] > \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

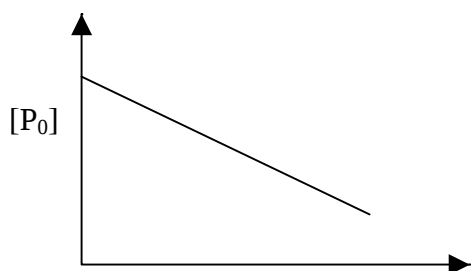
$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [E_0]$$

零級反應

$$\frac{d[P]}{dt} = k$$

$$d[P] = k_2 dt$$

$$\int_{[P]_0}^{[P]} d[P] = \int_0^t k_2 dt [P]_0 - [P] = -k_2 t$$



一級反應

$$\frac{d[P]}{dt} = -k_2[P]$$

$$\int_{[P]_0}^{[P]} \frac{d[P]}{[P]} = \int_0^t -k_2 dt$$

$$\ln[P] - \ln[P]_0 = -k_2 t$$

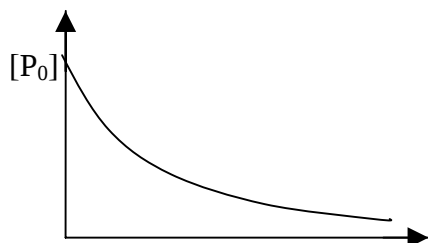
$$\ln \frac{[P]}{[P]_0} = -k_2 t$$

$$\frac{[P]}{[P]_0} = e^{-k_2 t}$$

$$[P] = [P]_0 e^{-k_2 t}$$

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \gg [S]$$

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[E_0][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} = \frac{k_1 k_2 [E_0][S]}{k_{-1} + k_2}$$



由此可證明可溶性甲烷單氧化酵素催化丙烯生成丙醇為一級反應

(四)

1. 由圖六(見附錄)我們可以推測丙烯的重量幾乎與氣相層析圖訊號呈線性關係。
2. 由表五可看出丙烯吸附情形為：膜部分>可溶性部分 > Pipes 緩衝液。

溶液	Pipes 緩衝液	可溶性部分*	膜部分*
平均值	0.37 mg	0.80 mg	2.06 mg

表五、5mL Pipes 緩衝液，可溶性部分及膜部分之丙烯吸附量

*蛋白質含量為 67 mM

伍、結論

由上述的實驗中，針對不同的分子，對甲烷單氧化酵素不同的氣體基質的組合，皆可表現出所處環境及任意氣體組合的差異性，藉由這些差異性，將顯現出微粒或溶解性甲烷單氧化酵素的表現型態，其氣體消長的比例，則將針對不同的需求，求得特定的誤差範圍，另外，富含酵素的反應混合物，也將經過萃取或直接抽樣的方式，由氣相層析儀分析醇類及環醚類等化合物的比例，有助於求取實際的反應條件。上述實驗將持續進行，以檢視甲烷單氧化酵素對各種氣體分子所展現的模式，希望能間接協助我們判斷嗜甲烷所處的環境。

以下是我們的結論：

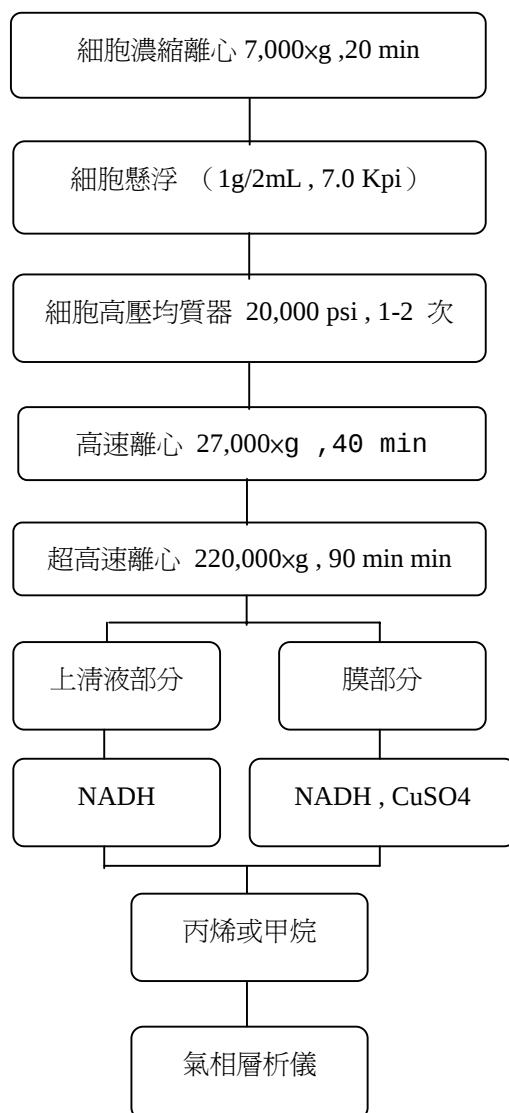
1. 由文獻上的記載得知各式氣體在甲烷單氧化酵素的活性順序依序為甲烷>丙烯>>丙烷>異丁烷，並且其產物分析結果得知丙烯可生成環氧丙醚，但以異丁烷為基質，則幾乎沒有產物的生成，因此，可提供我們作為十分有用的標準氣體，來比對待測氣體在嗜甲烷菌中的活性。丙烯由於相對具較高的活性，且在氣相層析儀具較高之靈敏度，因此，十分適合作為甲烷單氧化酵素的基質。而在丙烯與異丁烷等比例混合後測定甲烷單氧化酵素的活性，丙烯隨時間減少，與異丁烷的比較所得的曲線，呈現 sMMO 與 pMMO 其酵素反應的差別。
2. 在 sMMO 高度表現的菌液中，呈現一級的動力學反應趨勢，表示烷類與烯類在水溶液中的溶解度較低， $[(k_{-1}+k_2)/k_1] \gg [S]$ ，表示無法達成酵素最快的反應效能。在 pMMO 高度表現的菌液中，則具備零級的動力學反應趨勢，表示烷類與烯類在水溶液中的溶解度，因細胞內膜的存在，而溶入較多的基質，因此， $[(k_{-1}+k_2)/k_1] < [S]$ ，表示此酵素已達到最快的反應效能。由動力學的趨向，得知 pMMO 具備較佳的效能，這或許就是所有的嗜甲烷菌均具備此類酵素，而 sMMO 則可能是嗜甲烷菌為了適應極度環境的條件下，所表現的酵素，效能卻不及前者。
3. 在菌液中加入銅離子可延長菌液的反應時間，證明銅離子在相對應的甲烷單氧化酵素的表現上，是十分重要的因子。
4. 由氣體小分子在甲烷單氧化酵素所表現的性質及其動力學的趨向，可用來作為嗜甲烷菌其行為及習性判斷的依據，或許，它們的存在，在環境現地的分析數據上，可以提供某種程度的訊息。

陸、參考資料

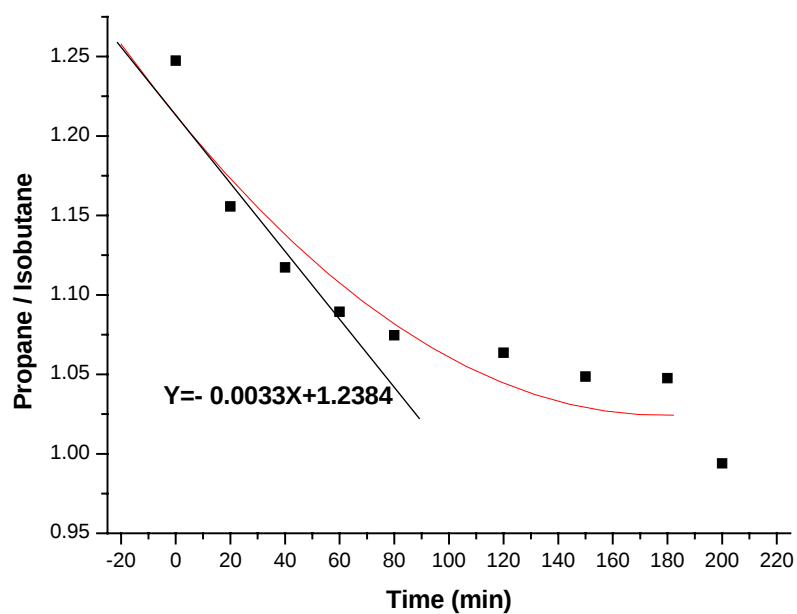
- (一) Nguye, H. -H. T., Elliott, S. J., Yip, J. H. -K. and Chan, S. I. (1998) The particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme. *J. Biol. Chem.* 273, 7957–7966.
- (二) Elliott, S. J., Zhu, M., Tso, L., Nguyen, H. -H. T., Yip, J. H.-K. and Chan, S. I. (1997) Regio- and stereoselectivity of particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Am. Chem. Soc.* 119, 9949-9955.

柒、附錄

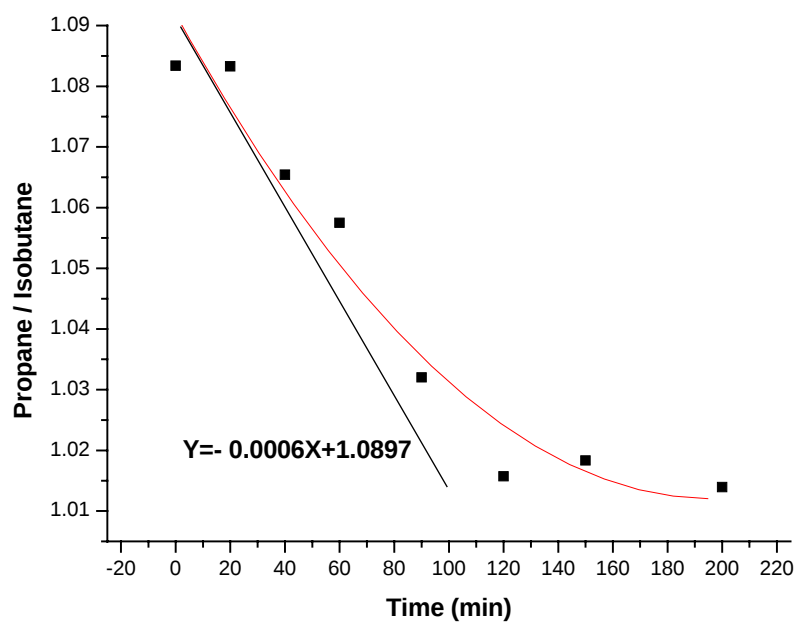
圖一、甲烷單加氧酶萃取及與丙烷(或丙烯)反應流程圖。嗜甲烷菌離心後，經過酵素萃取（高速離心和超高速離心），分別收集水溶液層和沈澱層，進行活性測試工作。



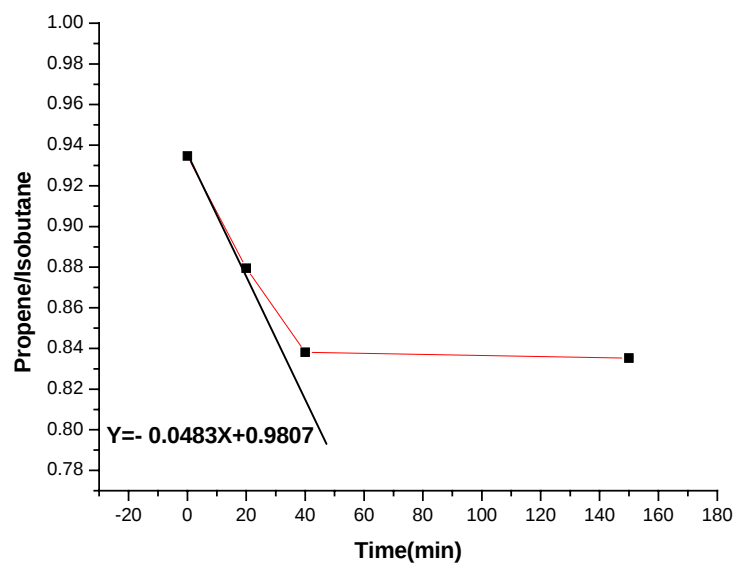
圖二、隨時間測量可溶性甲烷單氧化酵素在丙烯和異丁烷中的活性變化（第一次）



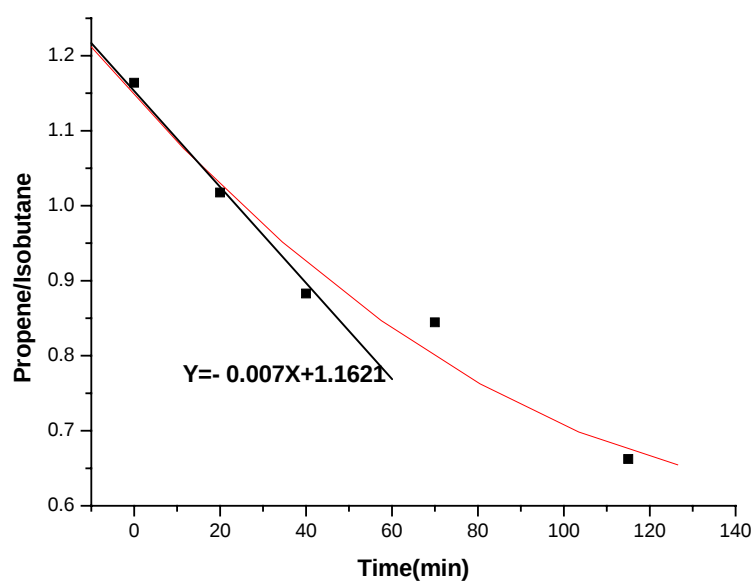
圖三、隨時間測量可溶性甲烷單氧化酵素在丙烯和異丁烷中的活性變化（第二次）



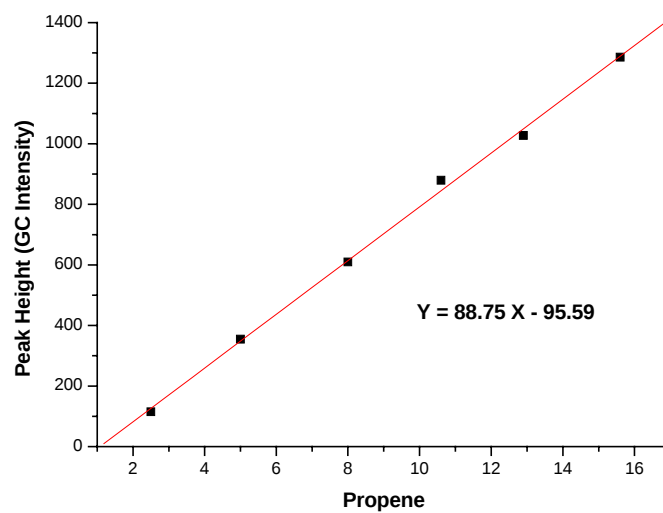
圖四、 隨時間測量微粒體甲烷單氧化酵素在丙烯和異丁烷中的活性變化（不含銅）



圖五、 隨時間測量微粒體甲烷單氧化酵素在丙烯和異丁烷中的活性變化（40mM Cu）



圖六、丙烯在 30 mL 封瓶內重量與氣相層析圖訊號比例關係



圖七、氣相層析儀之訊號 —— 上：甲烷和丙烯混合氣體加入菌液反應一小時後
中：異丁烷
下：丙烯與異丁烷 1：1

