

# 臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：化學科

作品名稱：嗜甲烷菌對丙烯催化模式之比較-溶解型與微粒  
體型甲烷單氧化酵素

得獎獎項：化學科第三名

紐西蘭二〇〇三年科學覽會

學 校：臺北市立第一女子高級中學

作 者：王緯貞

## Abstract

In methanotrophs, the oxidation of methane to methanol is catalyzed by methane monooxygenase. There are two distinct forms of the enzyme associated with different gene products. One is the soluble methane monooxygenase (sMMO) expressed in the cytosolic portion of the cell and grown under copper-limiting growth conditions. The other enzyme is the particulate methane monooxygenase (pMMO), a membrane-associated protein that is expressed under high copper-to-biomass ratios. In addition to the natural substrates of methane gas, simple aliphatic alkanes, alkenes, or even aromatic compounds could be used as the substrates of the methane monooxygenase. In those gaseous simple alkenes and alkanes, propylene converted to propylene oxide by methane monooxygenase has been considered as popularly use for enzymatic activity determination because of its comparable activity to the methane gas. To measure the catalytic behavior of the methanotroph directly, we design a method to choose isobutane as the internal standard because of the negligible activity in the methane monooxygenase. The catalytic activity can be simply inferred from the decrease of the gaseous propylene signals in the GC chromatograms by generating the liquefied epoxides mediated by MMO within the methanotrophic bacteria. Under various kinetics measurements, when we incubate the methanotroph grown under copper-limiting concentrations, we observed the diminishment of propylene follow a first-order kinetic behavior with the over-expression of soluble methane monooxygenase. However, the growth of bacteria under  $40 \text{ M}$  presents the zero-order kinetic trend with the bulk expression of pMMO. After the quantification of the dissolved propylene in the deionized water, soluble proteins solution as well as membrane proteins solution, we observe the membrane proteins could adsorb more propylene molecules in comparison with the other solution mixtures. By considering Michaelis-Menten kinetics, we conclude the propylene conversion in sMMO is under substrate limiting catalysis whereas the pMMO has attended the optimized velocity of propylene conversion.

## 一、 摘要

在嗜甲烷菌中，甲烷與甲醇間的轉化是由甲烷單氧化酵素來進行。目前已知有兩種型態的甲烷單氧化酵素，一種是溶解型甲烷單氧化酵素，存在於較低銅離子濃度之水溶液環境中；另外一種為微粒體甲烷單氧化酵素，鑲嵌在細胞內質膜上，表現於較高的銅離子濃度環境下。除了本身的天然基質－甲烷之外，其他種類之簡單烷烯類化合物，甚至芳香族化合物，均可作為此酵素催化的基質。其中，甲烷單氧化酵素將丙烯轉化成環氧丙烯與甲烷轉化成甲醇的催化活性非常接近，因此丙烯普遍被用來作為酵素活性測量的基質。為了直接測量它們的活性，我們設計出一種方法，可以讓我們直接利用氣相色層分析儀，來偵測細胞的催化反應過程。基於異丁烷在甲烷單氧化酵素幾乎不存在任何活性，故我們將其作為內標準氣體，並藉由丙烯在氣相色層分析儀中吸收訊號的遞減來偵測細胞的催化活性。在多樣性的動力學實驗中，我們發現以 sMMO 為催化酵素時，丙烯的轉化是依據一級動力學反應趨勢而減少。相對的，以 pMMO 為催化酵素時，丙烯的減少趨勢則是依據零級動力學反應模式進行。在比較完 Pipes 緩衝液、上清液蛋白質及內質膜蛋白質溶液之丙烯吸附量測試結果後，我們發現內質膜蛋白可吸附的丙烯分子相對於其它兩種溶液是最多的。依據 Michaelis-Menten 動力學理論，可得到以下結論：丙烯的轉化在 sMMO 中是以基質受限的催化形式進行，而在 pMMO 中則已達到最佳的催化速率。

## 二、 研究動機

日前，墾丁外海發生希臘油船漏油事件且造成不小的生態破壞，而生命科學 微生物的世界 這一章正好提到，有一種細菌可以將油船漏油所造成的油污分解掉，這讓我聯想到，近幾十年來，工業化及科技進步帶來了文明及生活的便利，卻也因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。這些氣體因為吸收了太陽光中的紅外線，而造成溫室效應，改變了全球的氣候環境。然而，有沒有一種細菌也能分解掉二氧化碳或甲烷呢？而它們又是如何進行此類反應的呢？於是，我到了一個研究嗜甲烷菌的實驗室（使用 *M. capsulatus* 來產生所需的酵素），觀摩並參與養菌的過程，了解嗜甲烷菌催化反應的進行。從嗜甲烷菌可以萃取出兩種明顯不同的甲烷單氧化酵素－其一為位於細胞質的溶解型甲烷單氧化酵素(soluble MMO, 簡稱為 sMMO)，另一種則是鍵結在細胞膜上的微粒體型甲烷單氧化酵素 (particulate MMO, 簡稱為 pMMO)。根據文獻記載，在自然界中，所有的嗜甲烷菌均具備 pMMO，卻不一定具備 sMMO，這是為什麼呢？此兩種酵素在催化反應上有什麼不同嗎？

## 三、 研究目的

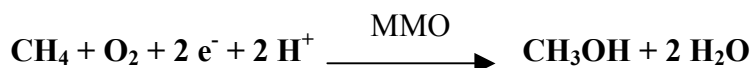
比較溶解型甲烷單氧化酵素 (sMMO) 與微粒體型甲烷單氧化酵素 (pMMO) 在丙烯中催化模式之差異。

## 四、 文獻探討

嗜甲烷菌 (Methanotrophic bacteria 或 methanotroph) 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，在有氧氣和烷類氣體的環境下，它也可以將烷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—甲烷單氧化酵素，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），從這種菌可以萃取出兩種明顯不同的甲烷單氧化酵素—其一為位於細胞質的溶解型甲烷單氧化酵素(soluble MMO, 簡稱為 sMMO)，另一種則是鍵結在細胞膜上的微粒體型甲烷單氧化酵素（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烷類如正丙烷、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。

表一、溶解型甲烷單氧化酵素和微粒體型甲烷單氧化酵素之比較

	溶解型甲烷單氧化酵素	微粒體型甲烷單氧化酵素
縮寫	sMMO	pMMO
蛋白質出處	細胞質	細胞膜
蛋白質中心金屬	鐵	銅
活化所需環境	無銅離子	含銅離子
受質反應位置	C1	C2

## 五、 研究方法

本實驗的實驗目的在試圖找出溶解型甲烷單氧化酵素與微粒體型甲烷單氧化酵素在氣體烷烴反應催化的差異，烷烴化合物因本身不具極性，性質趨近於理想氣體，會是測定其催化反應過程的良好素材；其中甲烷雖然為本酵素的天然基質，但因比空氣輕，有測量不易的缺點，而根據文獻記載，丙烯同樣具備不錯的活性，且較空氣重，因此，我們選用丙烯作為此實驗活性測定的指標氣體。

另一方面，在標準氣體的選擇上，應該選擇在二者（sMMO 和 pMMO）中均不易反應的氣體分子；而其分子大小及性質則必須與指標氣體較接近才行，如此一來，我們才可以以標準氣體的反應量為依據，推測出活性氣體的反應效能。綜觀可能具備此條件的氣體分子，最接近的，要屬異丁烷。其具備支鏈，在反應上有較大的立體障礙，同時也因為結構複雜而不易進入酵素中的活化中心，因此，可作為絕佳的對比氣體。

選定丙烯和異丁烷作為指標氣體和標準氣體後，以其一比一的混合氣體，分別和含 sMMO、pMMO 不同濃度但定量的菌液放入 45°C 的氣密式培養箱（Orbital Shaking Incubater），並且在不同的時間以氣相層析儀（GC）測其氣體比例的消長，以觀察反應速率

與時間的關係。

另外，藉由不同體積（以常壓下之體積算）的丙烯找出其重量和 GC 訊號的關係，以作為本實驗定量的依據。

最後，取失去活性之上清液蛋白（含 sMMO）和膜蛋白（含 pMMO），作丙烯吸附量的測試。

## 六、 研究過程（含器材及藥品）

本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(CuSO<sub>4</sub> and Cu-EDTA)的多寡可分別表現微粒體型甲烷單氧化酵素(pMMO)或是溶解型甲烷單氧化酵素(sMMO)。嗜甲烷菌的碳源來自甲烷氣體，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。

#### 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 <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1 mg (發酵槽培養)
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> 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

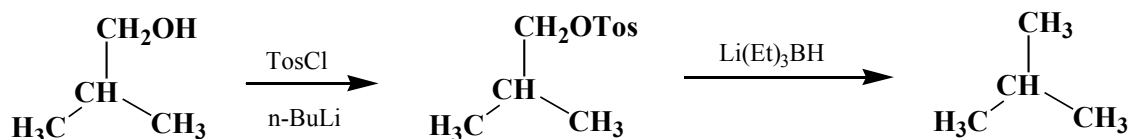
壓的狀況下，連續振盪約兩天後；轉至內含 300 mL 同質培養液的 2 L 錐形瓶中，以相同條件培養至 Late Log Phase 或 Stationary Phase，可以由 UV 595 nm 偵測細菌濃度；所需時間亦約兩天，此時之培養液將作為發酵槽培養的來源。

## (二) 化合物的合成

丙烯可由化學藥品公司購得，至於異丁烷則因為時效性的關係，必須在實驗室合成。以 1-異丙醇作為起始物，經過 Tosylation 將 Tosyl 基接在 O 上，使得 OTos 成為一個很好的離去基；同時，在接有強拉電子基 OTos 的作用下，可使得旁邊的碳原子成為很好的親電子基。等到我們需要用異丁烷的時候，則選用含鋰氫化試劑 "Li(Et)<sub>3</sub>BH" 中具親核性的氫負離子來將 OTos 脫去，由於此試劑運用了三個乙基的強推電子基來穩定氫負離子，可使帶負電的 H<sup>-</sup>打到帶正電的 C 上的反應性具備十分完整的 SN<sub>2</sub> 反應型態，使得整個 OTos 脫去，不僅產率高而且僅有少量的副產物生成。

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. 要使用時再以 Li(Et)<sub>3</sub>BH 去磺酸醯反應將 OTos 脫去。



## (三) 酵素反應分析

### 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，充滿丙烯氣體。
- ④ 再取一血清瓶，封瓶，抽至真空，加入丙烯、異丁烷各 15mL，測 GC 調整至兩者訊號為一比一。

## (2) 菌的純化及菌液配製

- 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) 微粒體甲烷單氧化酶的萃取

- ① 利用圖三（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  $50 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  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。若需取得可溶性甲烷單氧化酶，則取用上清液部分。）
- 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  $50 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  的 10 mM PIPES 緩衝溶液，均質化後即為 pMMO 萃取液。

## 2. 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) 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。

### (2) 用菌液 (sMMO)

- ① 同 (三) 2. (1) 步驟 (但不用加 0.5mL sodium formate)

## 3. 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。

## 4. Protein 濃度定量

- (1) 取 2 $\mu\text{L}$  膜蛋白( 或上清液部分 )，加入 198 $\mu\text{L}$  DI water 充分混合。
- (2) 取 (1) 步驟之混合溶液 20 $\mu\text{L}$ ，加入 100 $\mu\text{L}$  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 光譜。

## 5. 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 丙炔，測氣相層析儀
- (3) 取瓶 A 加入膜蛋白 (membrane portion) 2.5mL 及 PIPES 緩衝液 2.5mL，取瓶 B 加入可溶性部分 (soluble portion) 之蛋白 5mL，瓶 C 加入 PIPES 緩衝液 5mL，充分混合 3 分鐘後測氣相層析儀。

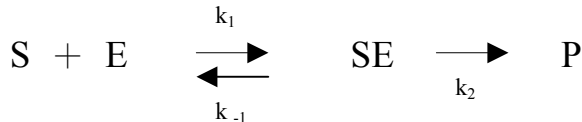
## 七、 研究結果與討論

(一)

由圖四、五(見附錄)可看出丙炔在溶解型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°C 的環境下，溶解型甲烷單氧化酵素的活性是隨時間而慢慢下降的。

而圖六、七(見附錄)可看出丙炔在微粒體型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溶解型甲烷單氧化酵素來得好。其中圖六為微粒體型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：



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

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

$$\begin{aligned} [SE] &= k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \\ &= k_1[S] \{ [E_0] - [ES] \} - (k_{-1} + k_2) [ES] \\ &= k_1[S] [E_0] - k_1[S] [ES] - (k_{-1} + k_2) [ES] \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} [ES] &= \frac{k_1[E_0][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \\ &= \frac{[E_0][S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \end{aligned}$$

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

當基質相對於酵素為過量時

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

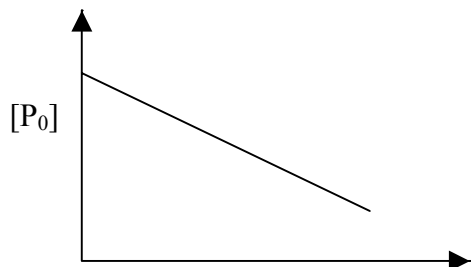
$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [E_0]$$

## 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

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

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

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

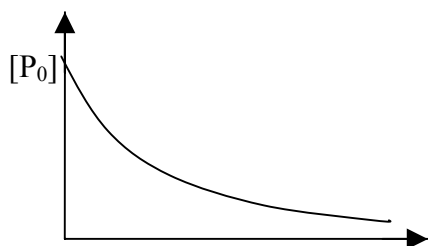
$$\ln \frac{[P]}{[P]_0} = -k_2 t$$

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

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

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

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



由此可看出，丙烯和異丁烷為一比一的比例時，溶解型甲烷單氧化酵素催化丙烯生成丙醇之反應隨時間變化的趨勢和一級反應的圖形很相似，因此我們推測該反應為一級反應。在酵素動力學的穩定狀態下，該反應的基質濃度遠小於  $k_M$ —即  $[S] \ll [(k_{-1}+k_2)/k_1]$ ，表示溶解型甲烷單氧化酵素在自然情況下，因受到基質濃度的影響，無法達到其最大反應效能。另一方面，在同樣的條件下，微粒體型甲烷單氧化酵素催化丙烯生成丙醇之反應隨時間變化的趨勢和零級反應的圖形很相似，因此我們推測該反應為零級反應，在酵素動力學的穩定狀態下，該反應的基質濃度遠大於  $k_M$ —即  $[S] \gg [(k_{-1}+k_2)/k_1]$ ，也就是說，此酵素已達到最快的反應效能。

## (二)

由圖八(見附錄)我們可以推測丙烯的重量幾乎與氣相層析(GC)圖訊號呈線性關係。根據本實驗的結果，在常溫常壓下，丙烯的重量和體積成正比；而在血清瓶的密閉環境中，隨著氣體的加入，瓶內的壓力也因而增加，且為壓力正比於氣體分子數的關係。這樣的結果，幾乎完全符合理想氣體方程式  $PV=nRT$ ，且其氣體分子應呈均勻分布的狀態(定容下)，也就是  $PM=dRT$ ，即每次取樣的氣體比例，均可代表瓶內氣相之氣體比例，這對我們以 GC 訊號作為定量的依憑有莫大的支持。

## (三)

表三、5mL Pipes 緩衝液，含 sMMO 之上清液蛋白質及含 pMMO 之細胞膜  
蛋白質內的丙烯含量。\*蛋白質含量為 67  $\mu$ M

溶液種類	Pipes 緩衝液	上清液蛋白質*	質內膜蛋白質*
平均值	0.28±0.16 mg	0.60 ±0.39mg	1.77±0.92 mg

由表三可看出在失去活性的蛋白質，丙烯吸附情形為—membrane portion > soluble portion > Pipes Buffer。綜合以上的討論可以發現，在溶解型甲烷單氧化酵素進行催化反應時， $[S] \ll [k_M]$ ，即 0.16mg/mL 遠小於  $k_M$  值，表示該反應位於  $V-[s]$  圖形  $[s] \ll k_M$  的區段；而在微粒體型甲烷單氧化酵素進行催化反應時， $[S] \gg [k_M]$ ，即 0.412mg/mL 遠大於  $k_M$  值，表示該反應位於  $V_{max}$  的區段。根據文獻資料，此兩種甲烷單氧化酵素在單位時間內能催化的基質量差不多，卻有兩種截然不同的動力學反應趨勢，推測應和基質存在的相有某一程度的關係。在 sMMO 高度表現的菌液中，呈現一級動力學反應趨勢，表示烷類和烯類在水溶液中的溶解度較低；而在 pMMO 高度表現的菌液中，則呈現零級動力學反應趨勢，表示烷類和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。

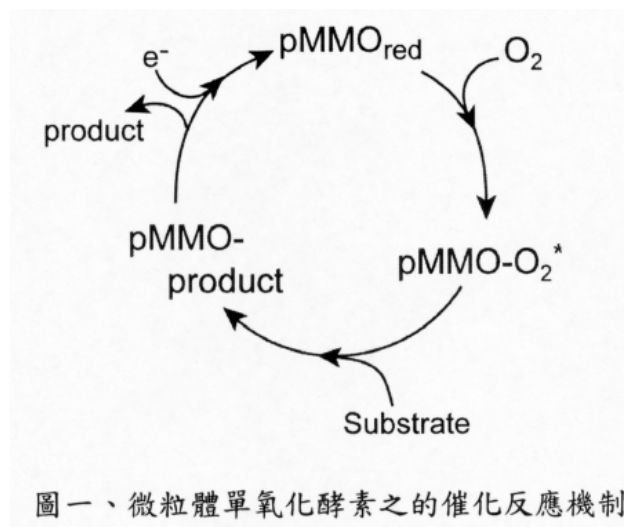
## 八、 結論

這個實驗，從 sMMO 與 pMMO 的催化曲線中，其斜率的變化可直接反應酵素動力學的行為模式，若以簡單的 Michaelis -Menten 方程式來解釋(見圖十)，丙烯在 sMMO 約反應位於大約在活性常數  $K_m$  的濃度前後，其反應的區間落在僅有少量的基質環境下催化，反之，在微粒體甲烷單氧化酵素的反應環境，則處於過量或接近過量的基質濃度下，這個結果亦從溶液在穩定狀態下的丙烯吸附實驗中得到驗證。因此，在 pMMO 下，對丙烯呈現較佳的催化效能。

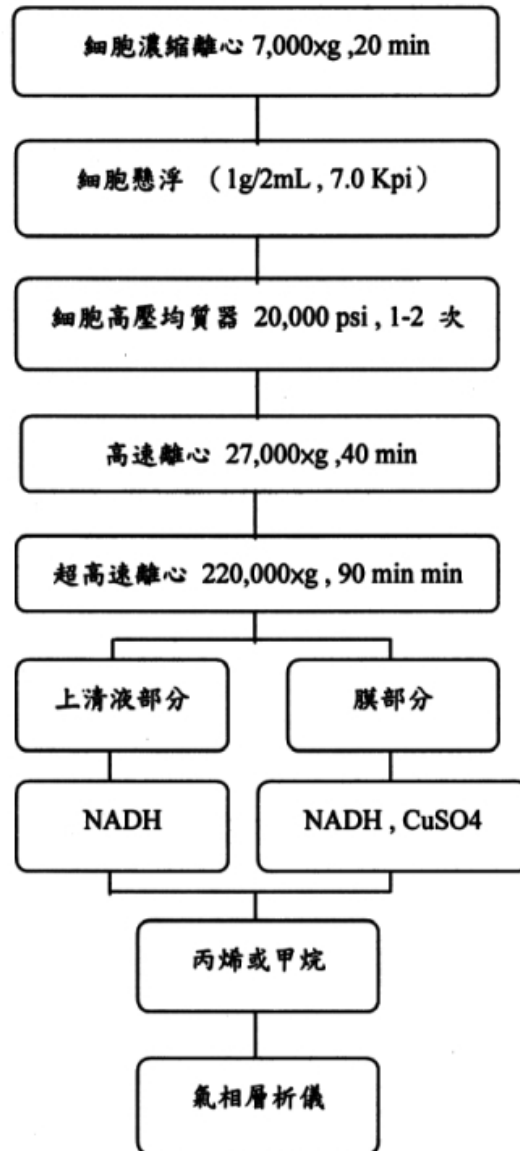
## 九、 參考文獻

- (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.

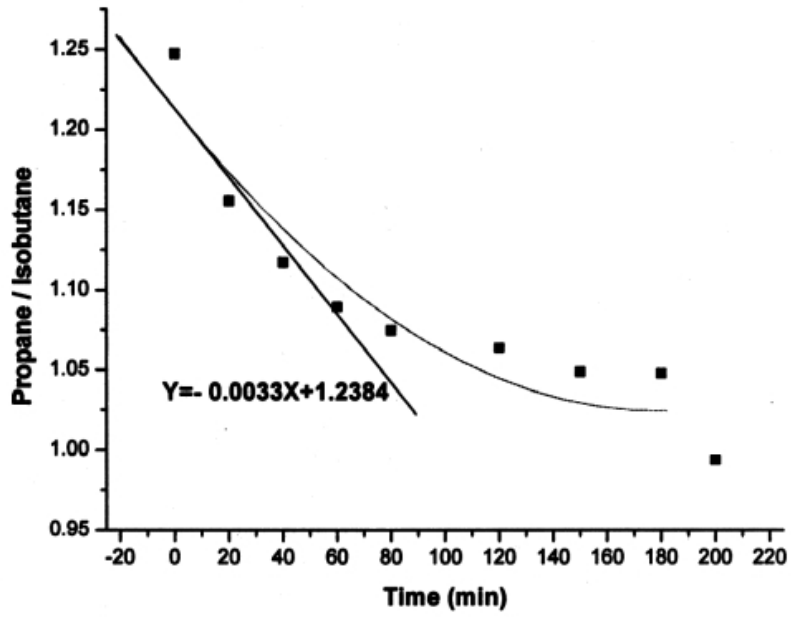
## 十、 附錄



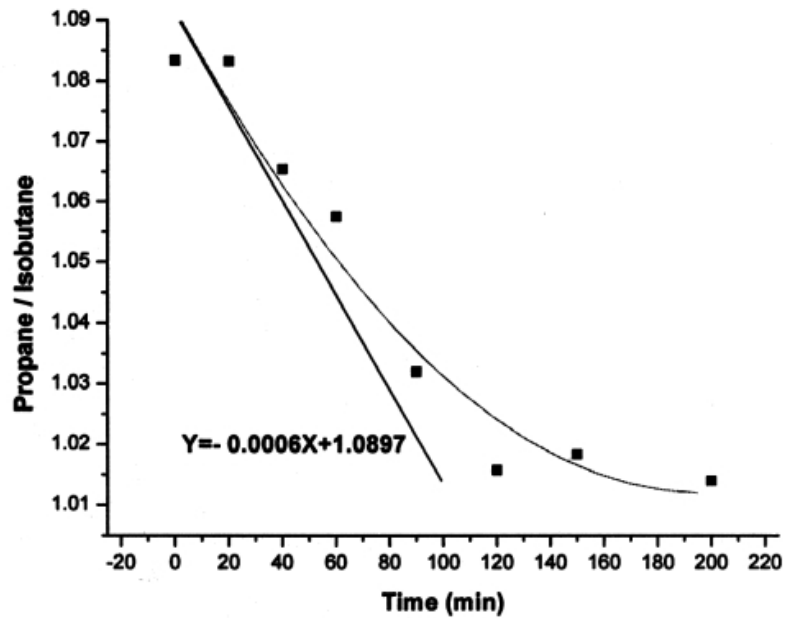
圖二、嗜甲烷菌細胞切片之電子顯微照片



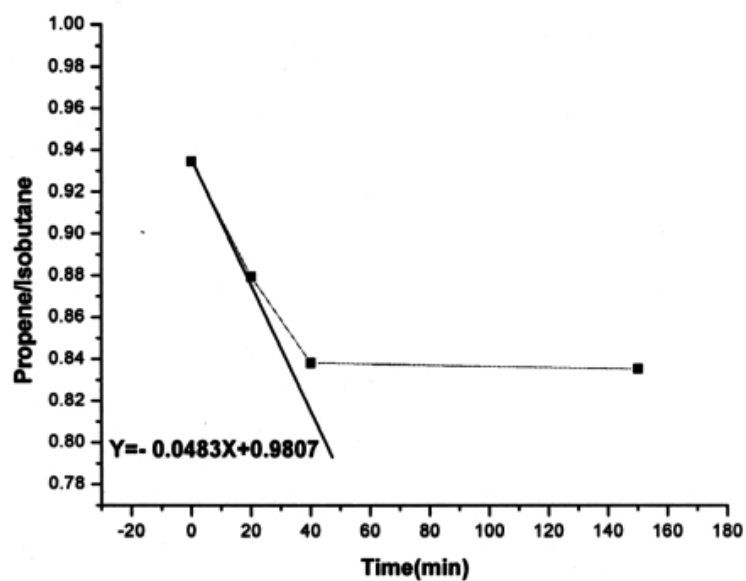
圖三、甲烷單加氧酶萃取及與丙烷(或丙烯)反應流程圖。  
嗜甲烷菌離心後，經過酵素萃取（高速離心和超高速離心），分別收集水溶液層和沈澱層，進行活性測試工作。



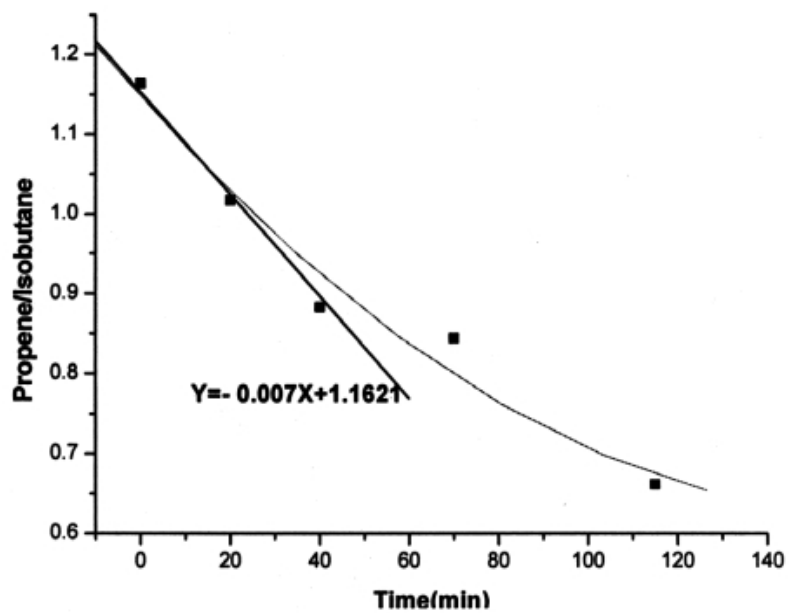
圖四、隨時間測量溶解型甲烷單氧化酵素在丙烯和異丁烷中的活性變化（第一次）



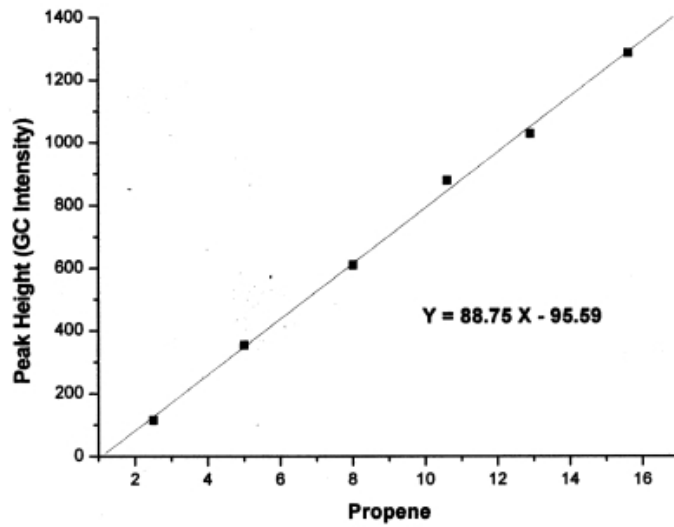
圖五、隨時間測量溶解型甲烷單氧化酵素在丙烯和異丁烷中的活性變化（第二次）



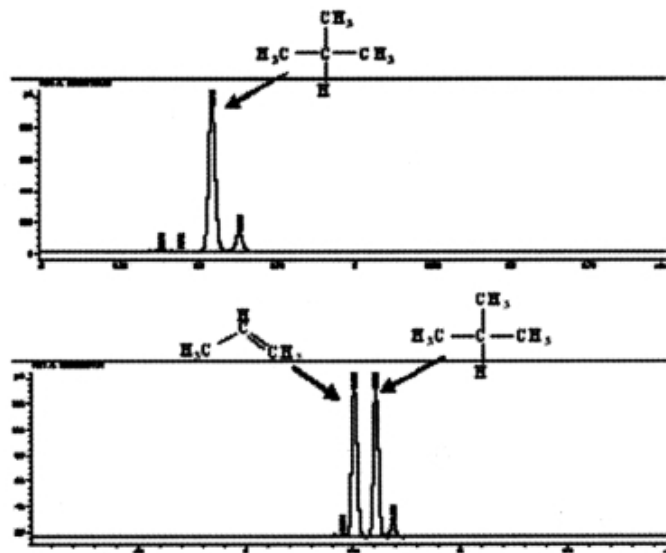
圖六、隨時間測量微粒體甲烷單氧化酵素在丙烯和異丁烷中的活性變化 (不含銅)



圖七、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 (40 $\mu$ M Cu)

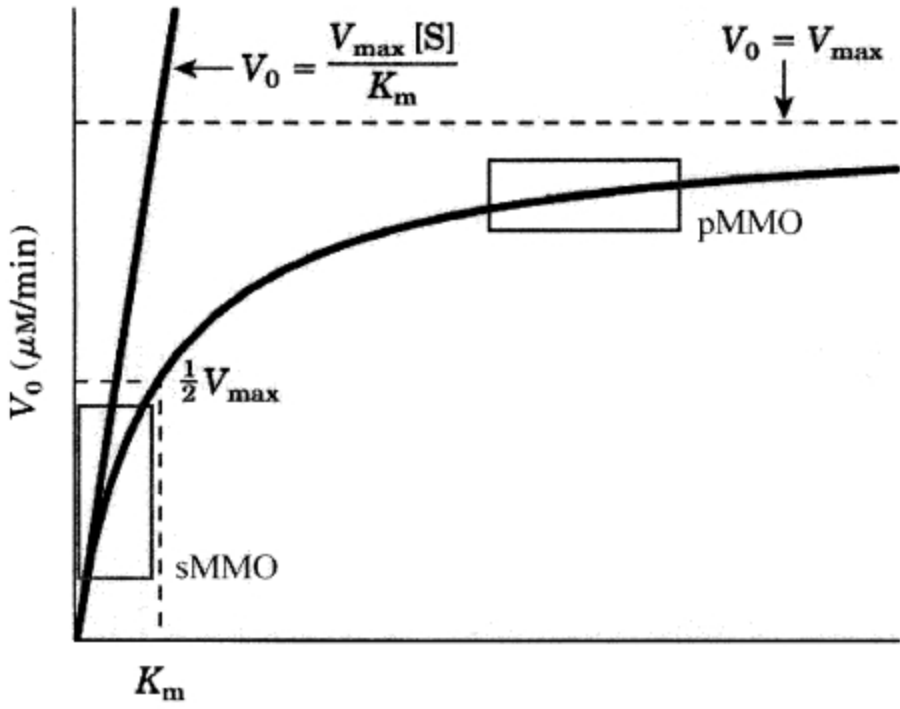


圖八、丙烯在 30 mL 封瓶內重量與氣相層析圖訊號比例關係



圖九、氣相層析儀之訊號：上圖為異丁烷，下圖為丙烯與異丁烷 1 : 1

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



圖十、Michaelis-Menten 酵素動力方程式，說明基質濃度對於酵素催化反應之初始速率的影響

表二

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

## 評語

本研究獲台北市政府的補助，在中研院副院長研究室所做的一個研究專案之 1.5 年成果。由於氣體動力學是一項很「粗糙」而不容易做的實驗，研究實作者已學到很多最前端之技巧，本身的能力也已達到副院長在這個研究之五、六成之素質。如果能更上一層再拚這個四、五成將來必有可為。推薦參加國際科展！建議將最後成果分別為「0」與「1」級反映的所需數據，精緻化與可接受的合理化。本研究非作者之創見，亦非一般高中程度或學校設備可做，推薦為第三名。