生物工程学报
journals.im.ac.cn
cjb@im.ac.cn

Chin J Biotech 2008, September 25; 24(9): 1511-1519
Chinese Journal of Biotechnology ISSN 1000-3061
© 2008 *Institute of Microbiology, CAS & CSM*, All rights reserved

综 述

甲烷氧化菌及甲烷单加氧酶的研究进展

韩冰[1], 苏涛[2], 李信[2], 邢新会[1]

1 清华大学化工系生物化工研究所, 北京 100084
2 中国农业科学院研究生院, 北京 100081

摘 要: 甲烷氧化菌是以甲烷作为唯一碳源和能源进行同化和异化代谢的微生物, 其关键酶之一是甲烷单加氧酶(MMOs), 可以在氧气的作用下催化甲烷等低碳烷烃或烯烃羟基化或环氧化, 甲烷氧化菌在自然界碳循环和工业生物技术中具有重要的应用价值。因此, 近 20 年来对于甲烷氧化菌和 MMOs 的研究一直倍受生物学家的关注。以下从现代生物技术的角度, 对近年来国内外在甲烷氧化菌的分类与分布, MMOs 的结构与功能、甲烷氧化菌与 MMOs 的基因工程等方面取得的研究成果进行了总结, 全面综述了甲烷氧化菌及 MMOs 的应用基础研究现状, 并对其今后的研究和应用方向提出了展望。

关键词: 甲烷氧化菌, 甲烷单加氧酶, 甲烷, 分子生物学, 工业生物技术

journals.im.ac.cn

Research Progresses of Methanotrophs and Methane Monooxygenases

Bing Han[1], Tao Su[2], Xin Li[2], and Xinhui Xing[1]

1 *Institute of Biochemical Engineering*, *Department of Chemical Engineering*, *Tsinghua University*, *Beijing* 100084, *China*
2 *Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100081, *China*

Abstract: Methanotrophs are a group of bacteria capable of utilizing methane as the sole carbon and energy source for their anabolism and catabolism. Since methanotrophs contain the unique enzymes of methane monooxygenases (MMOs), which can catalyze the oxidation of methane and short-chain alkanes and alkenes, they have potential applications in carbon recycle of nature and industrial biotechnology. Therefore, methanotrophs have been paid much more attention by the researchers in recent 20 years. In this paper, the latest progresses in studies of methanotrophs and MMOs were reviewed, including taxonomy, function and distribution of methanotrophs, and structure, function and genetic engineering of MMOs. The future research directions of methanotrophs and MMOs as well as their applications were also discussed.

Keywords: methanotroph, methane monooxygenase, methane, molecular biology, industrial biotechnology

甲烷是重要的化工原料和化学能源, 在人类的生产生活中扮演着重要的角色。同时, 甲烷又是地球大气中仅次于二氧化碳的第二号温室气体, 它引起的温室效应是同等质量二氧化碳的 20~30 倍[1]。可工业利用的甲烷主要来源于天然气和厌氧发酵沼气。有效、合理地利用甲烷, 必将对全球能源利用、

Received: January 18, 2008; **Accepted:** May 7, 2008
Supported by: the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20336010 and 20676071) and the National High Technology Research & Development Program (863 Program) of China (No. 2006AA02Z203).
Corresponding author: Xinhui Xing. Tel: +86-10-62794771; Fax: +86-10-62773004; E-mail: xhxing@tsinghua.edu.cn
国家自然科学基金项目(Nos. 20336010 和 20676071)和科技部 863 计划(No. 2006AA02Z203)项目资助。

环境保护和循环经济产生重大的影响。作为天然气和沼气主要成分的甲烷是一种非常稳定的小分子，具有很高的 C-H 键能，但是现有的通过甲烷催化氧化制甲醇的工艺所需反应条件非常苛刻，通常在高温高压下进行，反应的选择性和转化率都较低[2]。而自然界中的一类特殊微生物——甲烷氧化菌——却可以在常温常压下无污染的实现这一转化。

甲烷氧化菌(Methanotrophic bacteria, methanotrophs)是以甲烷作为生长的唯一碳源和能源的微生物。广泛存在于泥土、沼泽、稻田、河流、湖泊、森林和海洋中[3]。甲烷单加氧酶(Methane monooxygenase, MMO, EC.1.14.13.25)是甲烷氧化菌代谢甲烷过程中的重要酶系，它可以在分子氧和还原性辅酶 NADH 的作用下催化甲烷氧化为甲醇，为化学工业催化甲烷制甲醇提供了极为重要的补充。同时，由于甲烷氧化菌的代谢过程涉及到许多 C1 物质，因而其在自然界碳循环中也扮演了非常重要的角色。甲烷氧化菌及 MMO 在生物转化、生物修复、生物产品生产和 CH_4 减排中具有重要的应用价值，如图 1 所示。

甲烷氧化菌和 MMO 的研究一直受到科学工作者的关注。通过 SCI 检索发现，自 1990 年以来关于甲烷氧化菌或 MMO 的研究报道已经超过 1600 篇。现有关于甲烷氧化菌的综述如表 1 所示，这些综述主要关注于其生理生化性质、分子生态学的研究以及 MMO 催化机理研究等，但却缺少对其应用研究的概述和展望。虽然甲烷氧化菌具有重要的工业应用潜力，但由于一些瓶颈问题，如细胞生长速度慢、密度低，催化反应受还原性辅酶再生的影响，可用的菌种资源有限, MMO 的基因工程技术不成熟等问题还没有得到解决，限制了甲烷氧化菌的应用发展。随着现代分子生物学和系统生物学的发展，生物技术为从本质上了解和认识甲烷氧化菌及 MMO 提供了重要的方法，是解决甲烷氧化菌工业应用难题的科学基础。本文着重从分子生物学角度出发，系统综述了甲烷氧化菌及 MMO 的应用基础研究的现状，并对其今后的研究和应用方向提出了展望。

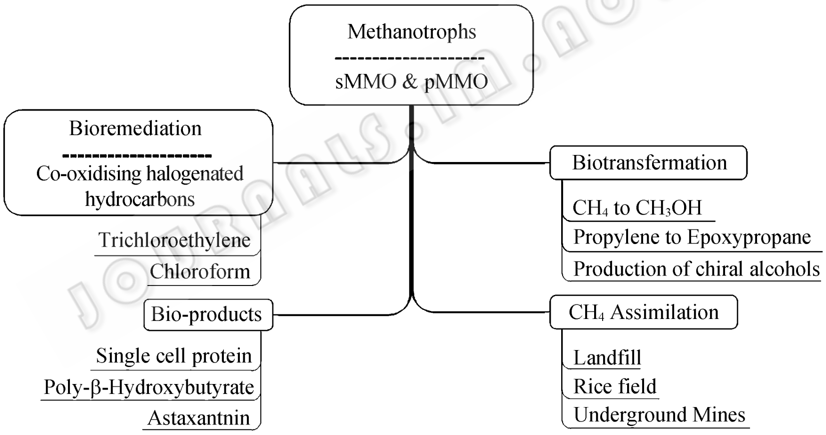

图 1 甲烷氧化菌和甲烷单加氧酶的应用

Fig. 1 Applications of methanotrophs and methane monooxygenases

表 1 国内外甲烷氧化菌或甲烷单加氧酶的综述

Table 1 Reviews on methanotrophs or methane monooxygenases published so far

Year	Title	Topic	Organization
2000	Molecular biology and regulation of methane monooxygenase[4]	Gene regulation	University of Warwick, UK
2000	Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions[5]	Cu^{2+} effect	University of Warwick, UK
2002	Soluble methane monooxygenase: activation of dioxygen and methane[6]	sMMO property	Massachusetts Institute of Technology, USA
2004	Biological Methane Oxidation: Regulation, Biochemistry, and Active Site Structure of Particulate Methane Monooxygenase[7]	pMMO property	Northwestern University, USA
2004	Advances in the research of methanotroph.[8]	Ecology studies on methanotrophs	Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, China
2005	The natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria[9]	History of methanotrophs	University of Warwick, UK
2007	The biochemistry of methane oxidation[10]	Biochemistry	Northwestern University, USA

1 甲烷氧化菌的分类与生态学研究

1.1 甲烷氧化菌分类

在甲烷氧化菌细胞内, MMO 在分子氧的作用下将甲烷氧化为甲醇, 甲醇在甲醇脱氢酶(Methanol dehydrogenase, MDH)的作用下氧化为甲醛, 继而通过丝氨酸循环(Serine pathway)或戊糖磷酸途径(Ribulose monophosphate pathway)进行细胞合成, 同时在甲醛脱氢酶(Formaldehyde dehydrogenase, FADH)和甲酸脱氢酶(Formate dehydrogenase, FDH)的作用下将甲醛进一步氧化成CO_2和H_2O, 为细胞代谢提供 NADH。甲烷氧化菌的代谢途径如图 2 所示。人们根据甲烷氧化菌吸收甲醛代谢途径的不同以及细胞膜结构等差异, 对其进行了分类, 如表 2 所示。

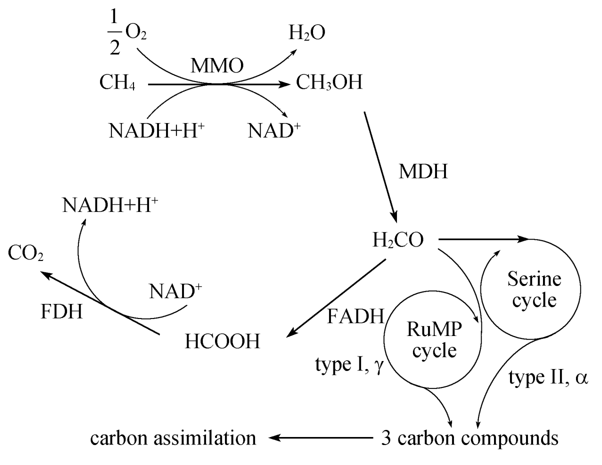

图 2 甲烷氧化菌的代谢途径
Fig. 2 Metabolic pathway of methanotrophs

表 2 甲烷氧化菌的分类
Table 2 Classification of methanotrophs

Type	Phylum	Genus	Description
Type I	γ-*Proteobacteria*	*Methylobacter, Methylomonas, Methylosoma, Methylomicrobium, Methylococcus, Methylocaldum, Methylothermus, Methylohalobius, Methylosarcina*	RuMP pathway of formaldehyde assimilation. Possess bundles of intracytoplasmic membranes.
Type II	α-*Proteobacteria*	*Methylocystis, Methylosinus, Methylocapsa, Methylocella*	Serine pathway of formaldehyde assimilation. Possess intracytoplasmic membranes arrayed around the periphery of the cell.
Others	γ-*Proteobacteria*	*Crenothrix polyspora*[11]	Filamentous
	γ-*Proteobacteria*	*Clonothrix fusca*[12]	Filamentous
	Verrucomicrobia	*Methylokorus infernorum*[13]	Extremely acidophilic
	Verrucomicrobia	*Acidimethylosilex fumarolicum*[14]	Extremely acidophilic
	Verrucomicrobia	*Methyloacida kamchatkensis*[15]	Extremely acidophilic

journals.im.ac.cn

1.2 甲烷氧化菌的生态学研究

1.2.1 *甲烷氧化菌在生态中的分布和作用*

甲烷是地球大气中仅次于二氧化碳的第二号温室气体。多年来对大气甲烷的产生、转运、循环以及调控的研究表明, 80%以上的甲烷是通过微生物的活动产生的, 一部分在进入大气前被甲烷氧化菌吸收利用, 减少了甲烷排入大气量。这样, 大气中甲烷的净含量绝大部分是产甲烷微生物和甲烷氧化菌相互作用的结果。因此甲烷氧化菌引起了生态学家的关注, 对其在各种生态环境中的分布及其对环境的影响进行了研究, 涉及到的自然环境包括海洋、湖泊、草地、沼泽、稻田、森林、垃圾填埋场等。

然而, 关于甲烷氧化菌的生态研究, 一般都是以自然界中的沼泽、湖泊、森林、草原等天然环境为目的的。但对于人类参与的环境中甲烷氧化菌的分布的研究则较少。瓦斯煤矿与其他自然环境相比, 往往具有更高的甲烷浓度, 人们在进行煤矿开采时, 大量的甲烷气体随之从煤矿中释放出来进入大气。根据 IPCC[16]报告统计, 1990 年全球由于人类活动产生的甲烷总量约为 3.1 亿吨, 其中有 1/4 是由于化石能源提取过程所产生的(例如采煤, 采油等)。本实验室利用多种互补的分子生态学方法对我国典型的瓦斯煤矿土壤中的甲烷氧化菌群分布和吸收甲烷的活性进行了研究, 发现在瓦斯煤矿中有大量的 I 型和 II 型甲烷氧化菌存在, 且都具有较高的吸收甲烷的活性[17]。从生态学的角度对煤矿甲烷氧化菌群落进行解析, 可以增进对甲烷氧化菌在生态中分布的认识, 获得具有特殊功能的甲烷氧化菌信息; 同时可以为将甲烷氧化菌应用于煤矿瓦斯防治提供研究基础。

1.2.2 *极端环境中的甲烷氧化菌*

甲烷氧化菌在许多极端环境(如温泉、火山等)中也广泛的存在。这些甲烷氧化菌不仅可以极大地吸收环境中的甲烷，降低温室效应；同时，它们也是巨大的甲烷氧化菌资源库，人们在这些环境中发现了各式各样的甲烷氧化菌，包括极端嗜酸、嗜碱、嗜盐、耐热、耐寒的甲烷氧化菌，如表 3 所示。这些极端环境中的甲烷氧化菌可以满足在不同条件下进行生物催化的需要，因此，具有新功能的甲烷氧化菌菌种的发现倍受人们的关注与重视，近几年来陆续有刊登在《Nature》、《PNAS》等重要学术杂志上关于新发现的甲烷氧化菌的报道。

表 3 极端甲烷氧化菌及最适生长条件

Table 3 Extreme methanotrophs and their cultivation conditions

Methanotroph		Growth optimum	Environment	References
Thermophiles	*Methylococcus capsulatus* Bath	42°C	—	[18]
	Methylococcus thermophilus	55°C	—	[19]
	Methylocaldum gracile	42°C	—	[20]
	Methylocaldum tepidum	42°C	Farm land	[20]
	Methylocaldum szegediense	55°C	Hot spring	[20, 21]
	Methylothermus sp. HB	55~62°C	Hot spring	[22]
	Methylobacter psychrophilus	5~10°C	North Russia	[23]
Psychrophiles	*Methylomonas scandinavica*	15°C	Ground water	[24]
	Methylocystis rosea	5~27°C	Arctic wetland soil	[25]
Acidophiles	*Methylocella palustris*	pH 5.0~5.5	Acidic bog	[26]
	Methylocapsa acidophila	pH 5.0~5.5	Acidic bog	[27]
Halophiles	*Methylomicrobium pelagicum*	0.5%~2% NaCl	Deep ocean	[28]
	Methylomicrobium mdestohalophilum	2% NaCl	Soda lake	[29]
Alkaliphiles	*Methylomicrobium alcalkphilum*	pH 9	Soda lake	[30]
	Methylomicrobium buryatense	pH 7.5~9.5	Soda lake	[31]
	Methylomicrobium sp. AMO1	pH 9~10	Soda lake	[32]

Journals.im.ac.cn

1.2.3 *微生物分子生态学的研究方法*

随着分子生物学和生物信息学的发展，特别是近年来刚刚兴起的宏基因组学，加速了对甲烷氧化菌的认识，大量的基于核酸、脂肪酸等的分子生态学方法被应用于甲烷氧化菌的解析中，包括核酸限制性片段多样性分析、 荧光原位杂交、 变性梯度凝胶电泳、生物芯片、 磷脂脂肪酸分析、 稳定性同位素探针技术等[33]。分子生态学不需要培养微生物，就可以获得环境中菌群的信息，为进一步分离含有特殊功能的甲烷氧化菌提供帮助。

2 甲烷单加氧酶的结构与调控

甲烷氧化菌中存在两种 MMO，一种是分泌在周质空间中的可溶性甲烷单加氧酶(Soluble methane monooxygenase, sMMO)，存在于部分甲烷氧化菌中；另一种是与细胞膜结合的颗粒性甲烷单加氧酶(Particulate methane monooxygenase, pMMO)，存在于除 *Methylocella* 以外的所有已发现的甲烷氧化菌中。MMO 作为甲烷氧化菌最关键的酶，对它的研究是利用甲烷氧化菌作为高效生物催化剂的关键。

2.1 MMO 的结构

sMMO 存在于细胞质中，不含卟啉铁，底物广泛，许多的烃类化合物和芳香族化合物都能被其氧化。对 *Methylococcus capsulatus* Bath 和 *Methylosinus trichosporium* OB3b 的研究发现, sMMO 的基因簇共 5.5 kb，按 *mmoXYBZDC* 排列，分别编码羟化酶亚基α(MMOHα)，羟化酶亚基β(MMOHβ)，调控蛋白 B(MMOB)，羟化酶亚基γ(MMOHγ)，MMOD 和还原酶 C(MMOR)。羟化酶的晶体结构于 1993 年首次被 Rosenzweig 等人[34]发现，如图 3(a)所示，它的 3 个亚基α、β、γ大小分别是 60 kD、45 kD 和 20 kD，组成 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$。羟化酶的活性中心为μ-氧桥双铁核结构[35]。如果调控蛋白 B 氨基端的氨基水解，会造成活性的改变[36]。还原酶 C 分子量为 39 kD，含有 FAD，依赖

于 NADH 和[2Fe-2S]结构, 从 NADH 处接受电子, 并将其转移到羟化酶的μ-氧桥双铁核上。

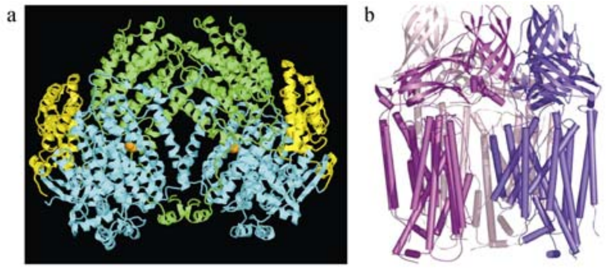

图 3 sMMO 羟化酶(a)和 pMMO(b)的晶体结构[34,37]
Fig. 3 Crystal structures of sMMO hydroxylase(a) and pMMO(b)

与 sMMO 不同, pMMO 存在于细胞膜上而非细胞质中, 底物选择性相对较窄, 能氧化五碳以内的烷烃和烯烃, 但不能氧化芳香烃。编码 pMMO 的基因簇按 *pmoCAB* 排列, 其中 *pmoB* 编码 47 kD 的α亚基, *pmoA* 编码 24 kD 的β亚基, *pmoC* 编码 22 kD 的γ亚基。由于 pMMO 为膜结合蛋白, 分离纯化困难, 直到 2005 年, 其晶体结构才被人们揭示[37, 38], pMMO 的蛋白是以$(\alpha\beta\gamma)_3$三聚体的形式存在的, 如图 3(b)。尽管目前人们对于这个晶体结构的报道还持有许多疑问, 但这一发现必将加快人们对 pMMO 及甲烷氧化菌的认识和利用的速度。

2.2 MMO 的调控

原始菌中, MMO 的表达受 Cu^{2+}浓度的调控, 当低 Cu^{2+}浓度(<0.8 μmol/L)时, sMMO 表达; 在高 Cu^{2+}浓度(~4 μmol/L)时, sMMO 的表达关闭, pMMO 表达。高 Cu^{2+}浓度会导致 sMMO 的 mRNA 减少, 这说明 sMMO 的转录受 Cu^{2+}抑制。相反, pMMO 的 mRNA 会随着铜离子浓度的增加而增加。这些数据表明有与 Cu^{2+}结合的抑制蛋白或激活蛋白存在于 MMO 的表达过程中。这些蛋白虽然没有被证实, 但与 sMMO 调控有关的新的基因目前已被发现。在 *M. capsulatus* (Bath)中存在一个与 *groEL* 相似的分子伴侣基因(*mmoG*), 一个σ^N启动的转录激活基因(*mmoR*), 和一个由 *mmoQ* 和 *mmoS* 传感器构成的调控系统, 位于 sMMO 操纵子的下游[39]。sMMO 的调控方式可以解释为, 一个对铜离子敏感的传感器将信号发送给 MmoS, MmoS 通过磷酸化作用再将信号传递给 MmoQ, MmoQ 与 *mmoXYBZDC* 的表达抑制剂 MmoR 反应。而 MmoG 可能对 sMMO 的聚合或 MmoR 的折叠进行作用。

与 sMMO 表达调控的情况相比, pMMO 的表达调控机理至今了解的非常有限。Gilbert 等人[40]发现 3 个 pMMO 的结构基因的转录是从 *pmoC* 上游的唯一一个σ^{70}启动子开始的。转录不受σ^N或 *mmoR* 的调控, 因为没有编码此两种蛋白基因的甲烷氧化菌仍可在高铜离子状态下生长。而两个 *pmoCAB* 拷贝的表达受铜离子水平的调控。在铜离子浓度为 5 μmol/L 时, *pmoCAB* 的第 2 个拷贝表达占主要地位, 而当浓度为 50 μmol/L 时, 两个 *pmoCAB* 的拷贝均同等程度的表达。

Cu^{2+}既是调控 sMMO 或 pMMO 表达的开关元件, 又是合成 pMMO 所必须的金属元素。但是在自然环境中, 低 Cu^{2+}浓度的情况下却仍有大量的 pMMO 存在, 人们发现这是由于在特定的情况下甲烷氧化菌可以产生一种叫 methanobactin 的荧光色素肽, 推测[41]它可以通过三种方式对 pMMO 的表达起到促进作用: (1)作为促进 Cu^{2+}进出细胞的传递体, 帮助 pMMO 合成; (2)可以帮助细胞从环境中富集微量的 Cu^{2+}, 提高甲烷氧化菌周边 Cu^{2+}的浓度; (3)保护甲烷氧化菌受到高浓度 Cu^{2+}的毒害。

3 甲烷氧化菌及 MMO 的基因工程研究

3.1 甲烷氧化菌的基因工程改造

甲烷氧化菌能够利用甲烷来进行自身的生长代谢, 人们长期以来一直期望使用甲烷氧化菌来生产高附加值的化工产品。目前的主要思路有 2 类, 一是通过基因突变等手段, 对甲烷氧化菌编码 MMO 等蛋白的基因进行改造; 二是通过代谢工程的手段, 向甲烷氧化菌内部引入外源基因, 以表达生产蛋白等生物产品。

为了满足不同工业催化的需要, 如何提高 MMO 的活性, 改变 MMO 的底物范围, 提高其对金属离子的耐受性等问题成为关键, 而这些问题的解决首先需要深入的理解甲烷氧化菌 MMO 的结构和功能, 于是人们尝试着用定点突变的技术来研究该酶。1995 年, Martin 等人[42]通过“marker-exchange-mutagenesis”的方法将卡那霉素基因插入到 sMMO 的羟化酶基因上, 得到了一株只能依赖 pMMO 基因表达生存而不能表达 sMMO 基因的甲烷氧化菌的突变体。首先建立起了在甲烷氧化菌内部进行基因工

程改造的方法，该突变体染色体上羟化酶基因由于插入了一个卡那霉素基因盒而失去了功能。随后，Lloyd 等人[43]把携带有完整 sMMO 基因的质粒导入该突变株，获得了高活性表达 sMMO 的菌株。在这一方法的基础上，使得人们可以对 sMMO 进行定点突变，对该酶的酶活和底物作用范围的变化进行了探索[44,45]。随着这种方法的应用，甲烷单加氧酶作用机制和功能会被更加深入的研究和了解，人们就可以在甲烷氧化菌内部对该酶进行改造，进而提高该酶利用甲烷的效率，提高该酶对某些金属离子的耐受性，获得高效表达该酶的且具有应用价值的甲烷氧化菌。

为了以分布广泛且廉价的甲烷为原料，通过代谢工程的手段，对甲烷氧化菌进行改造，阻断代谢支路或引入新的代谢途径，则可以利用甲烷氧化菌为载体来生产高附加值的工业产品。美国杜邦公司在利用甲烷氧化菌生产虾青素的研究方面做了一系列的研究工作，选用甲烷氧化菌 *Methylomonas* sp.16a 作为表达虾青素的宿主菌，选用 *M*.sp.16a 内源的启动子，表达了外源 β-胡萝卜素酮酶基因 *crtW*、β-胡萝卜素羟化酶基因 *crtZ* 和三种不同的血红素基因[46,47]，得到了具有较高选择性的虾青素生产菌株。批式发酵培养实验显示，该菌的初始比生长率能达到 0.26 /h，在生长阶段虾青素的选择性可达到 40%~60%，当该菌生长平稳期时对虾青素的选择性可达到 90%。

3.2　MMO 的外源表达

MMO 虽然可以在常温常压下破坏 C-H 键，氧化甲烷。但是通常的培养条件下甲烷氧化菌生长缓慢[48]，MMO 在甲烷氧化菌内的表达量有限，其浓度和反应速度无法满足工业生物催化的要求。如果能够通过基因工程的手段，在可利用甲烷以外的有机物快速生长的宿主中表达 MMO 并且可以利用基因工程宿主的辅酶再生系统，则可能实现利用异源表达 MMO 的工程菌株进行生物催化，为 MMO 的工业应用提供新的方法。

早在 1992 年时，West 等人就使用 T7 聚合酶表达系统使来自于 *M. capsulatus* Bath 的 sMMO 的调控蛋白 B 和还原酶 C 在大肠杆菌内得到了活性表达，但是羟化酶组分却表达不出活性[49]，这可能是由于大肠杆菌缺乏 sMMO 表达所需要的组装因子造成的。将来自于 *M. trichosporium* OB3b 的 sMMO 在恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* F1)，苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中分别表达，获得了初步成功[50, 51]，但却不能检测出 MMO 催化丙稀生成环氧丙烷的活性。将 sMMO 分别在两株不含 sMMO 的甲烷氧化菌 *Methylomicrobium album* BG8 和 *Methylocystis parvus* OBBP 中成功地进行了异源表达[52]。虽然到目前为止，还没有报道能在大肠杆菌中表达有活性的 sMMO，甚至在甲烷氧化菌中表达也并不容易，但是随着人们对甲烷氧化菌研究的深入，期望在不远的将来 sMMO 的高效表达技术能够获得突破。

pMMO 是存在于甲烷氧化菌细胞膜上的甲烷单加氧酶，几乎所有的甲烷氧化菌都含有 pMMO 基因，相对于 sMMO 而言，它的表达不会受环境中的 Cu^{2+} 抑制，更适合于工业应用，如果能异源表达高活性的 pMMO，将具有重要的意义。近年来，膜蛋白的异源表达技术研究成为生物技术领域的热点课题，研究建立 pMMO 的表达技术具有重要的意义。pMMO 基因由 *pmoCAB* 组成，但是这些 *pmo* 基因簇只能通过重叠 DNA 片段来克隆，这是因为部分 *pmo* 基因对大肠杆菌宿主的毒性造成的[40,41]，在大肠杆菌中表达 pMMO 基因时，无法获得有活性表达的转化子[5]。本实验室从 *M. trichosporium* OB3b 染色体中扩增得到 *pmoCAB*，构建了利用红球菌脱硫基因启动子调控 *pmoCAB* 的新型表达质粒，并导入红球菌，利用乙烷作为唯一碳源，筛选得到了表达颗粒性甲烷单加氧酶的重组菌株[53]。荧光原位杂交验证了重组菌中 *pmoCAB* 基因被成功地转录，摇瓶培养实验发现，重组菌具有 pMMO 活性。虽然重组菌 pMMO 的活性远低于原始甲烷氧化菌，但首次实现了 pMMO 蛋白异源表达的结果暗示通过进一步的优化宿主和表达载体，有望突破 pMMO 的异源高效表达的技术瓶颈。

随着 DNA 测序技术和生物信息学的发展，大量的微生物的基因图谱绘制完成，其中 I 型甲烷氧化菌的典型菌株 *M. capsulatus* (Bath)的基因组测序也已经完成[54]，II 型甲烷氧化菌的典型菌种 *M. trichosporium* OB3b 的全基因组测序工作目前也正在进行，这些基因信息将有助于我们更好的了解与利用甲烷氧化菌及 MMO。

4 展望

甲烷氧化菌和 MMO 作为重要的多功能微生物催化剂, 应用潜力巨大, 受到众多研究机构的关注[55]。但是在应用过程中还存在一些亟待解决的问题。首先, 目前的甲烷氧化菌细胞生长速度慢、细胞密度低、发酵周期长, 导致其在工业应用中不能满足大规模生产的需要, 其主要原因是由于甲烷氧化菌生长所需底物甲烷和氧气均为气体, 且两者在水中溶解度很低, 严重限制了细胞利用底物的速度; 其次, 在利用 MMO 进行生物催化的过程中, 酶活性受 Cu^{2+}浓度的影响并不稳定, 且有活性的 MMO 难于纯化; 再次, 催化氧化过程需要还原性辅酶的参与, 辅酶再生问题也是制约其应用的因素; 最后, 已有的甲烷氧化菌种类有限, 不足以满足工业生物催化的需要。根据甲烷氧化菌和 MMO 的特性, 应该从两方面考虑其在工业上的应用而进行深入研究, 一方面是利用其转化甲烷, 生产大宗化学品; 另一方面是利用其生产高附加值的精细化学品, 如手性脂肪醇、环氧烷烃等。对于其应用方面的研究应该从以下几方面着手:

(1)提高甲烷氧化菌的生长速度、细胞量及 MMO 的表达量, 以期用于大宗化学品的生产。对甲烷氧化菌进行基因工程和代谢工程改造。强化 MMO 基因的表达, 促进更多的 MMO 蛋白产生; 强化氧气、甲烷传递速率, 提高甲烷氧化菌的生长速度; 在常用的基因工程菌中异源过量表达 MMO 蛋白, 利用宿主生长的优势和辅酶再生系统, 获得大量高活性的 MMO 蛋白, 用于生物催化过程。

(2)建立对甲烷氧化菌或 MMO 进行改造的方法和技术平台, 用以生产高附加值的化学品。利用代谢工程技术, 在甲烷氧化菌胞内重构或强化高附加值化学品的生产途径, 以廉价的甲烷为原料生产精细化学品; 对 MMO 进行定点突变, 以提高酶活性或改变 MMO 的底物范围从而生产高附加值的化学品; 从自然界中, 特别是极端条件下, 发现新的甲烷氧化菌种和 MMO 基因, 以满足有机相催化、高温催化等特殊的催化反应条件。

REFERENCES

[1] Cicerone RJ, Oremland RS. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Glob Biogeochem Cy*, 1998, **2**: 299–327.

[2] Liu YJ, Liu J. Summarization of the methanol synthesis gas production processes by natural gas. *Chem Ind Times*, 2007, **21**(5): 64–67.
刘一静, 刘瑾. 天然气制甲醇合成气工艺及进展. 化工时刊, 2007, **21**(5): 64–67.

[3] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic bacteria. *Microbiol Res,* 1996, **60**(2): 439–471.

[4] Murrell JC, Gilbert B, McDonald IR. Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Arch Microbiol,* 2000, **173**(5-6): 325–332.

[5] Murrell JC, McDonald IR, Gilbert B. Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions. *Trends Microbiol,* 2000, **8**(5): 221–225.

[6] Kopp DA, Lippard SJ. Soluble methane monooxygenase: activation of dioxygen and methane. *Currt Opin Chem Biol,* 2002, **6**(5): 568–576.

[7] Lieberman RL, Rosenzweig AC. Biological methane oxidation: Regulation, biochemistry, and active site structure of particulate methane monooxygenase. *Crit Rev Biochem Mol,* 2004, **39**(3): 147–164.

[8] Liang Z, Shi Y, Yue J. Advances in the research of methanotroph. *Chin J Ecol*, 2004, **23**(5): 198–205.
梁战备, 史奕, 岳进. 甲烷氧化菌研究进展. 生态学杂志, 2004, **23**(5): 198–205

[9] Dalton H. The Leeuwenhoek Lecture 2000-The natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria. *Philos T R Soc B*, 2005, **360**(1458): 1207–1222.

[10] Hakemian AS, Rosenzweig AC. The biochemistry of methane oxidation. *Annu Rev Biochem,* 2007, **76**: 223–241.

[11] Stoecker K, Bendinger B, Schoning B, *et al*. Cohn's Crenothrix is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(7): 2363–2367.

[12] Vigliotta G, Nutricati E, Carata E, *et al*. Clonothrix fusca Roze 1896, a filamentous, sheathed, methanotrophic gamma-proteobacterium. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(11): 3556–3565.

[13] Pol A, Heijmans K, Harhangi HR, *et al*. Methanotrophy below pH1 by a new *Verrucomicrobia* species. *Nature*, 2007, **450**(7171): 874–U817.

[14] Dunfield PF, Yuryev A, Senin P, *et al*. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. *Nature,* 2007, **450**(7171): 879–U818.

[15] Islam T, Jensen S, Reigstad LJ, *et al*. Methane oxidation at 55 degrees C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(1): 300–304.

[16] IPCC. Special Report on Emissions Scenarios. Cambridge UK: Cambridge University Press, 2000.

[17] Han B, Chen Y, Abell G, *et al*. Diversity and activity of methanotrophs in an alkaline Chinese coal mine soil.

FEMS Microbiol Ecol, in Revision (2008).

[18] Whittenbury R, Phillips KC. Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria. *J Gen Microbial*, 1970, **61**: 205–218.

[19] Malashenko YR, Romanovskaya VA, Bogachenko VN, *et al*. Thermophilic and thermotolerant methane assimilating bacteria. *Mikrobiologiya* (English translation) 1975, **44**: 855–862.

[20] Bodrossy L, Holmes EM, Holmes AJ, *et al*. Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum gen*. nov. *Arch Microbiol,* 1997, **168**(6): 493–503.

[21] Bodrossy L, Murrell JC, Dalton H, *et al*. Heat-tolerant methanotrophic bacteria from the hot-water effluent of a natural-gas field. *Appl Environ Microbiol,* 1995, **61**(10): 3549–3555.

[22] Bodrossy L, Kovacs KL, McDonald IR, *et al*. A novel thermophilic methane-oxidising gamma-*Proteobacterium*. *Fems Microbiol Lett,* 1999, **170**(2): 335–341.

[23] Omelchenko MV, Vasileva LV, Zavarzin GA, *et al*. A novel psychrophilic methanotroph of the genus *Methylobacter*. *Microbiology,* 1996, **65**(3): 339–343.

[24] Kalyuzhnaya MG, Khmelenina VN, Kotelnikova S, *et al*. *Methylomonas scandinavica* sp nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden. *Syst Appl Microbiol,* 1999, **22**(4): 565–572.

[25] Wartiainen I, Hestnes AG, McDonald IR, *et al*. *Methylocystis rosea* sp nov., a novel methanotrophic bacterium from Arctic wetland soil, Svalbard, Norway (78 degrees N). *Int J Syst Evol Micr,* 2006, **56**: 541–547.

[26] Dedysh SN, Liesack W, Khmelenina VN, *et al*. *Methylocella palustris* gen. nov., sp nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bags, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *Int J Syst Evol Micr*, 2000, **50**: 955–969.

[27] Dedysh SN, Khmelenina VN, Suzina NE, *et al*. *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog. *Int J Syst Evol Micr,* **52**: 251–261.

[28] Sieburth JM, Johnson PW, Eberhardt MA, *et al*. The first methane-oxidizing bacterium from the upper mixed layer of the deep ocean *Methylomonas pelagica* sp. nov. *Curr Microbiol*, 1987, **14**: 285–293

[29] Kalyuzhnaya MG, Khmelenina VN, Suzina NE, *et al*. New methanotrophic isolates from soda lakes of the southern Transbaikal region. *Microbiology*, 1999, **68**(5): 592–600.

[30] Khmelenina VN, Kalyuzhnaya MG, Starostina NG, *et al*. Isolation and characterization of halotolerant alkaliphilic methanotrophic bacteria from Tuva soda lakes. *Curr Microbiol,* 1997, **35**(5): 257–261.

[31] Kaluzhnaya M, Khmelenina V, Eshinimaev B, *et al*. Taxonomic characterization of new alkaliphilic and alkalitolerant methanotrophs from soda lakes of the Southeastern Transbaikal region and description of *Methylomicrobium buryatense* sp.nov. *Syst Appl Microbiol,* 2001, **24**(2): 166–176.

[32] Sorokin DY, Jones BE, Kuenen JG. An obligate methylotrophic, methane-oxidizing *Methylomicrobium* species from a highly alkaline environment. *Extremophiles,* 2000, **4**(3): 145–155.

[33] McDonald IR, Bodrossy L, Chen Y, *et al*. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. *Appl Environ Microbiol,* 2008, **74**(5): 1305–1315.

[34] Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ, *et al*. Crystal structure of a bacterial non-haem iron hydroxylase that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature,* 1993, **366**: 537–543.

[35] Whittington DA, Sazinsky MH, Lippard SJ. X-ray crystal structure of alcohol products bound at the active site of soluble methane monooxygenase hydroxylase. *J Am Chem Soc,* 2001, **123**(8): 1794–1795.

[36] Chang SL, Wallar BJ, Lipscomb JD, *et al*. Residues in *Methylosinus trichosporium* OB3b methane monooxygenase component B involved in molecular interactions with reduced- and oxidized-hydroxylase component: A role for the N-terminus. *Biochemistry,* 2001, **40**(32): 9539–9551.

[37] Lieberman RL, Rosenzweig AC. Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature,* 2005, **434**(7030): 177–182.

[38] Kitmitto A, Myronova N, Basu P, *et al*. Characterization and structural analysis of an active particulate methane monooxygenase trimer from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochemistry,* 2005, **44**(33): 10954–10965.

[39] Stafford GP, Scanlan J, McDonald IR, *et al*. rpoN, mmoR and mmoG, genes involved in regulating the expression of soluble methane monooxygenase in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microbiology-Sgm,* 2003, **149**: 1771–1784.

[40] Gilbert B, McDonald IR, Finch R, *et al*. Molecular analysis of the pmo (particulate methane monooxygenase) operons from two type II methanotrophs. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(3): 966–975.

[41] Knapp CW, Fowle DA, Kulczycki E, *et al*. Methane monooxygenase gene expression mediated by methanobactin in the presence of mineral copper sources. *Proc Natl Acad Sci USA,* 2007, **104**(29): 12040–12045.

[42] Martin H, Murrell JC. Methane Monooxygenase Mutants of *Methylosinus-Trichosporium* Constructed by marker-exchange mutagenesis. *Fems Microbiol Lett*, 1995, **127**(3): 243–248.

[43] Lloyd JS, Finch R, Dalton H, *et al*. Homologous expression of soluble methane monooxygenase genes in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microbiol-Sgm*, 1999, **145**: 461–470.

[44] Smith TJ, Slade SE, Burton NP, *et al*. Improved system for protein engineering of the hydroxylase component of soluble methane monooxygenase. *Appl Environ Microbiol,*

2002, **68**(11): 5265−5273.
[45] Borodina E, Nichol T, Dumont MG, *et al*. Mutagenesis of the "Leucine gate" to explore the basis of catalytic versatility in soluble methane monooxygenase. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(20): 6460−6467.
[46] Tao L, Sedkova N, Yao H, *et al*. Expression of bacterial hemoglobin genes to improve astaxanthin production in a methanotrophic bacterium *Methylomonas* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **74**(3): 625−633.
[47] Ye RW, Yao H, Stead K, *et al*. Construction of the astaxanthin biosynthetic pathway in a methanotrophic bacterium *Methylomonas* sp strain 16a. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, **34**(4): 289−299.
[48] Xing XH, Wu H, Luo MF, *et al*. Effects of organic chemicals on growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochem Eng J*, 2006, **31**(2): 113−117.
[49] West CA, Salmond GPC, Dalton H, *et al*. Functional expression in *Escherichia coli* of proteins B and C from soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Gen Microbiol*, 1992, **138**: 1301−1307.
[50] Jahng DJ, Wood TK. Trichloroethylene and Chloroform Degradation by a Recombinant Pseudomonad Expressing Soluble Methane Monooxygenase from *Methylosinus-Trichosporium* Ob3b. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(7): 2473−2482.
[51] Jahng D, Kim CS, Hanson RS, *et al*. Optimization of trichloroethylene degradation using soluble methane monooxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b expressed in recombinant bacteria. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **51**(3): 349−359.
[52] Lloyd JS, De Marco P, Dalton H, *et al*. Heterologous expression of soluble methane monooxygenase genes in methanotrophs containing only particulate methane monooxygenase. *Arch Microbiol*, 1999, **171**(6): 364−370.
[53] Gou ZX, Xing XH, Luo MF, *et al*. Functional expression of the particulate methane monooxygenase gene in recombinant *Rhodococcus erythropolis*. *Fems Microbiol Lett*, 2006, **263**(2): 136−141.
[54] Kelly DP, Anthony C, Murrell JC. Insights into the obligate methanotroph *Methylococcus capsulatus*. *Trends Microbiol*, 2005, **13**(5): 195−198.
[55] Luo MF, Wu H, Wang L, Xing XH. Study on the structure and function of a stable methane oxidizing mixed microbial consortium. *Acta Microbiol Sin*, 2007, **47**(1): 103−109.
罗明芳，吴昊，王磊，邢新会. 含有甲烷氧化菌的混合菌群特性研究. 微生物学报, 2007, **47**(1): 103−109.

2008 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动

《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。

《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。

《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。

《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472/Q, CODEN JXUUAE。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。

欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄
汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401
收信人: 《　　　　　》编辑部; 电话: (010) 64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量
欲知详细信息请查看如下网址: http://journals.im.ac.cn