

生物分子机器——甲烷单加氧酶的研究进展

陆吉学¹, 王世珍^{1,2}, 方柏山^{1,2}

1 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005

2 厦门市合成生物技术重点实验室, 福建 厦门 361005

陆吉学, 王世珍, 方柏山. 生物分子机器——甲烷单加氧酶的研究进展. 生物工程学报, 2015, 31(7): 1015–1023.

Lu JX, Wang SZ, Fang BS. Advances in biomolecular machine: methane monooxygenases. Chin J Biotech, 2015, 31(7): 1015–1023.

摘要: 甲烷氧化菌中的甲烷单加氧酶能够在生理条件下选择性地以甲烷和氧气为底物生成甲醇, 麻省理工学院的 Lippard 教授称它为“神奇的生物分子机器”。本文重点对生物分子机器甲烷单加氧酶的结构、编码基因及调控机制、催化反应机理等进行了综述, 此外也简要介绍了甲烷单加氧酶的产生菌甲烷氧化菌的研究历史及分类。生物分子机器甲烷单加氧酶可催化甲烷氧化成甲醇, 不仅为甲醇的生产提供了一种新颖的生产方法, 而且对生物分子机器的设计也有借鉴意义。

关键词: 甲烷单加氧酶, 生物分子机器, 甲烷氧化菌, 机理, 甲烷

Advances in biomolecular machine: methane monooxygenases

Jixue Lu¹, Shizhen Wang^{1,2}, and Baishan Fang^{1,2}

1 Department of Chemical and Biochemical Engineering, University of Xiamen, Xiamen 361005, Fujian, China

2 Xiamen Key Laboratory of Synthetic Biotechnology, Xiamen 361005, Fujian, China

Abstract: Methane monooxygenases (MMO), regarded as “an amazing biomolecular machine”, catalyze the oxidation of methane to methanol under aerobic conditions. MMO catalyze the oxidation of methane elaborately, which is a novel way to catalyze methane to methanol. Furthermore, MMO can inspire the biomolecular machine design. In this review, we introduced MMO including structure, gene and catalytic mechanism. The history and the taxonomy of MMO were also

Received: October 28, 2014; **Accepted:** January 19, 2015

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 21336009, 41176111, 41306124), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2013121029).

Corresponding author: Baishan Fang. Tel: +86-592-2185869; E-mail: fbs@xmu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 21336009, 41176111, 41306124), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. 2013121029) 资助。

introduced.

Keywords: methane monooxygenases, biomolecular machine, methanotrophs, mechanism, methane

1959年,第29届美国物理学会年会上美国著名物理学家理查德·费曼(Richard Feynman)演讲中首次提出人工分子机器的概念^[1]。分子机器被定义为一种纳米水平的装置,它可以把化学能、电能和光能转化成机械能,人体则可以看成纳米分子机器的集合体^[2]。而生物分子机器(Biological molecular machine)被定义为能够利用ATP水解释放的化学能转变为机械能的蛋白质分子^[1]。这种对生物分子机器的定义比较狭窄,实际上Balzani等认为分子机器可定义为把一些分散的分子聚集到一起,在外部驱动力的作用下,它的组成部分有相对位置的变化,表现出类似于机械一样的运动的分子^[2]。生物催化涉及到的小分子底物反应,通常由自然界中大分子的蛋白和蛋白复合物来催化完成^[3]。甲烷单加氧酶是一种复杂的大分子蛋白复合物,它在催化甲烷生成甲醇的过程中伴随着外部驱动力化学能的输入,促使甲烷单加氧酶亚基之间或亚基中的氨基酸侧链之间发生相对运动^[3],Lippard教授把甲烷单加氧酶称为神奇的生物分子机器^[4]。

生物分子机器甲烷单加氧酶(Methanomonooxygenases, MMO)来自于甲烷氧化菌(Methanotrophs)。这些细菌是甲基营养型革兰氏阴性菌,特点是能以甲烷为唯一碳源和能源进行生长繁殖,甲烷氧化菌可用于生产虾青素、单细胞蛋白、聚β-羟基丁酸等附加值高的产品;此外由于甲烷氧化菌特有的甲烷单加氧酶底物谱较广使得甲烷氧化菌在重金属、有机物污染的生物修复方面具有潜在的应用价值^[5],如甲烷单加

氧酶在降解卤代烃过程中起着关键作用^[6];甲烷单加氧酶也能够温和条件下巧妙地催化具有极高键能的甲烷C-H键(104 kcal/mol)氧化生成甲醇^[7];甲烷氧化菌和甲烷单加氧酶的这些特性使甲烷氧化菌和甲烷单加氧酶成为研究的热点^[8]。

1 甲烷单加氧酶产生菌

甲烷氧化菌是生物分子机器甲烷单加氧酶的产生菌。荷兰微生物学家Söhngen于1906年首先发现了一株可以利用甲烷的细菌,后被命名为甲烷芽胞杆菌*Bacillus methanicus*^[9]。Whittenbury等通过对100多株甲烷氧化菌的研究,初步建立了甲烷氧化菌的分类方案,并根据形态学、细胞质内膜等的精细结构、细菌休眠期的形式等把甲烷氧化菌分成甲基弯曲菌属*Methylosinus*、甲基孢囊菌属*Methylocystis*、甲基单胞菌属*Methylomona*、甲基杆菌属*Methylobacte*、甲基球菌属*Methylococcus* 5个属^[10]。这种分类法提供了甲烷氧化菌的分类框架,它与目前被广泛接受的分类法很相似。Bowman等利用16S rRNA系统分析法解决了许多菌种命名的难题^[11]。现在主要根据碳源同化路径、细胞质内膜的显微结构、脂肪酸碳链长度、系统发育、DNA mol% G+C含量和细菌休眠期形式等把甲烷氧化菌分为I型、II型和X型^[11-12]。I型甲烷氧化菌属于变形杆菌纲γ亚纲,此类甲烷氧化菌的特征是:细胞质内的膜贯穿细胞形成多气泡碟片状束;碳的同化路径是磷酸核糖路径;特征性脂肪酸的碳链长度为14C和16C^[11-14]。

II 型甲烷氧化菌属于变形杆菌纲的 α 亚纲,其特征为:细胞质内的膜成对齐的线型排布在细胞的外围;利用丝氨酸路径同化碳源;特征性脂肪酸的碳链长度为 18C^[11-16]。X 型甲烷氧化菌包括 *Methylococcus* 和甲基暖菌属 *Methylocaldum*, 此类甲烷氧化菌兼有 I 型、II 型甲烷氧化菌的特性,甲醛的主要代谢途径是 RuMP 路径且有 Serine 路径,此类型细菌耐热性较强^[13-14]。

2 甲烷单加氧酶生物分子机器

甲烷的 C-H 键能高,性质稳定,工业生产甲烷的条件非常苛刻,反应温度和压力甚至分别高达 900 °C 和 1.1×10^7 Pa^[17]。甲烷氧化菌特有的甲烷单加氧酶则能在温和条件下无污染地实现甲烷到甲醇的转化,并在一系列脱氢酶的作用下生成二氧化碳和水。Lippard 教授曾在 *Nature* 杂志上发表过数篇有关 MMO 研究方面的文章,在他的主页介绍中称 MMO 为“Anamazing biomolecular machine”(神奇的生物分子机器)^[4]。MMO 是甲烷氧化菌的特征酶,可分为 2 种类型:细胞质内可溶性甲烷单加氧酶 (Soluble methane monooxygenase, sMMO) 和膜结合的颗粒状甲烷单加氧酶 (Particulate methane monooxygenase, pMMO), 这 2 类酶都能够催化甲烷生成甲醇, sMMO 可利用的底物范围较广泛可以氧化包括芳香族类的化合物, pMMO 底物专一性较强,只能氧化短碳链化合物^[18]。

2.1 可溶性甲烷单加氧酶

sMMO 底物范围宽,不仅能够氧化甲烷,还可以氧化短链烷烃、烯烃及芳香族化合物^[19]。sMMO 组成复杂,由羟化酶 (MMOH)、蛋白 B (MMOB) 和还原酶 (MMOR) 3 个部分蛋白组

成。其中 MMOH 分子量为 251 kDa,以 α 、 β 、 γ 三个亚基构成的二聚体 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 形式存在。羟化酶的 α 亚基具有 μ -氧桥双铁活性中心。蛋白 B 分子量为 16 kDa,可以调解 sMMO 的催化反应,它在 MMOH 的双铁活性中心催化底物羟化时具有耦合电子的作用;MMOR 分子量为 39 kDa,含有双铁-双硫[2Fe-2S]簇和一个辅酶 FAD,此部分酶具有还原作用,还原力的来源由 NAD(P)H 提供^[3,17]。

sMMO 的基因簇大小为 5.5 kb,其排列顺序是 *mmoXYBZDC*, 它们分别编码羟化酶的 α 亚基、羟化酶的 β 亚基、调控蛋白 B、羟化酶的 γ 亚基、MMOD 蛋白和还原酶 C^[19-20]。D 基因又称 *orfY* 基因,它编码未知功能的 MMOD 蛋白, Lippard 等发现 MMOD 蛋白可以紧密地结合于 sMMO 上,可能起着传感器的作用,从而调节 sMMO 的酶活性^[21]。Csaki 等通过研究荚膜甲基球菌 *Methylococcus capsulatus* (Bath) sMMO 基因,发现 sMMO 的转录依赖位于 *mmoX* 基因区的 5'位置的 σ^N 启动子,相对 pMMO 基因来说, sMMO 基因的表达需要在低浓度铜离子条件,其机理不能简单地认为是受铜离子浓度的影响,可能是 *mmoX* 基因的启动子需要铜离子作为激活剂^[22]。实际上关于 sMMO 的调控存在 2 种假设 (图 1): 负控调节假设,游离态抑制剂 R 具有抑制作用,但在低 Cu^{2+} 条件下,可结合 Cu^{2+} 的调控子 (CBR) 不能结合 Cu^{2+} ,因此不能与抑制剂 R 结合,不能形成 Cu-CBR-A 复合物, R 起抑制作用, *mmoXYBZDC* 的转录受到抑制;正控调节假设,游离态激活剂 A 具有激活作用,但在高浓度 Cu^{2+} 条件下, CBR 结合 Cu^{2+} ,并与 A 形成 Cu-CBR-A 复合物, A 没有激活作用, *mmoXYBZDC* 不能转录^[17,23]。

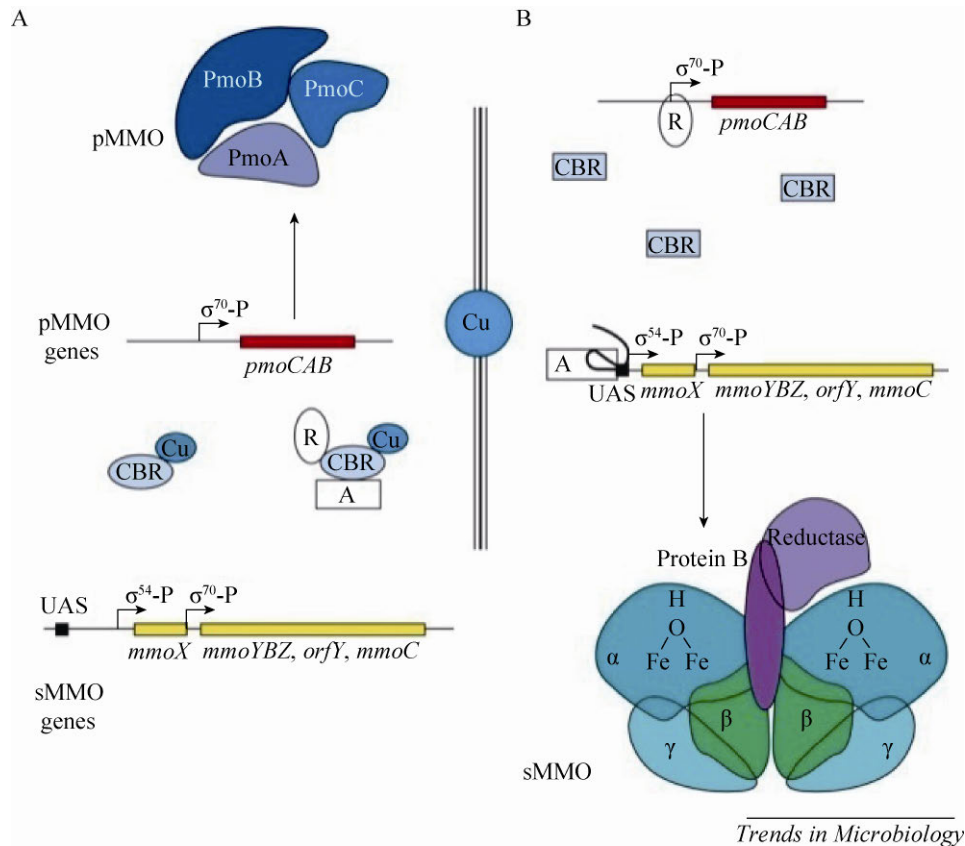


图1 *Methylosinus trichosporium* OB3b 中 pMMO 和 sMMO 的调控模型^[23]

Fig. 1 Model for the reciprocal regulation of the genes encoding pMMO and sMMO in *Methylosinus trichosporium* OB3b^[23]. (A) High copper-to-biomass ratio. (B) Low copper-to-biomass ratio.

sMMO催化甲烷氧化的过程如图2所示。sMMO在静息态 H^{ox} 时，羟化酶MMOH的双铁中心以 Fe_2^{III} 形式存在，在此状态下不能键合氧气分子，在还原酶MMOR和蛋白B的存在下，通过NAD(P)H，提供2个电子使之变成还原态 H^{red} 才能与 O_2 结合，形成O中间态，然后转变成 P^* 中间态，并迅速地衰变为Q态，双铁中心以 Fe_2^{IV} 形式存在，在此状态下参与 CH_4 的氧化^[3,24-27]。甲烷氧化时关于C-H键的断裂机制有3种假设：C-H键均裂，形成自由基；C-H键异裂，生成碳负离子中间体，碳负离子为了保持稳定，它需要结

合到双铁中心的一个铁原子上；C-H键断裂是 CH_4 和Fe-O通过协同反应的断裂机理断裂^[17]。至今难以确切判定这三种假设中哪个是C-H键断裂的机理，也有可能是多种键断裂方式并存。Huang等通过密度泛函理论 (Density functional theory) 进行sMMO羟基化甲烷反应机理的研究，并建立了5个双铁模型催化反应机理，发现4个协同的双铁模型是甲烷羟基化反应最有效的模型，此模型涉及到自由基和非自由基中间体反应机理^[28]。Lippard等研究了MMOB在sMMO催化甲烷氧化的作用机制，揭示了

MMOB 的调控原理：MMOB 通过其 Asp36-Leu129 氨基酸残基，锚定在 2 个 MMOH 的由 $\alpha_2\beta_2$ 形成的峡谷区，MMOB 的长 N-末端尾巴链接在 MMOH 的 α 亚基上，形成 MMOH-MMOB 复合体，MMOB 的 Tyr8 和 Ser111 氨基酸残基在空间上诱导 MMOH 的 E α -螺旋的侧链移近双铁活性中心，引起了 MMOH 构象的改变，因此可以控制质子、甲烷和氧气接近活性位点^[3,27]。MMO 这种精巧细致的多亚基协同催化机制，给我们对体内外生物分子机器的构建提供了重要的借鉴意义。

2.2 颗粒性甲烷单加氧酶

颗粒性甲烷单加氧酶 (pMMO) 是一种含铜原子的膜结合蛋白^[29-30]。pMMO 除了能氧化甲烷外，还可以氧化 C_2-C_5 的 C-2 位置的 C-H 键生成相应的醇或氧化相应的烯烃生成环氧乙烷^[31]。pMMO 存在于绝大多数甲烷氧化菌中，其编码基因在高铜离子浓度下转录。关于 pMMO 的首次报道是在 20 世纪 70 年代中期，

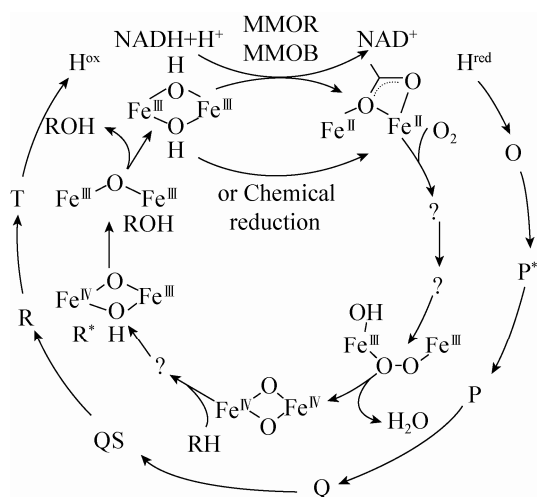


图 2 MMOH 催化底物氧化的循环过程示意图^[19]
Fig. 2 Reaction cycle intermediates of MMOH^[19].

相对 sMMO 来说 pMMO 底物范围窄，只能氧化碳链长度小于 5C 的烷烃和烯烃，关于它的研究相对较少，原因是 pMMO 酶活性比较低且暴露在空气中极不稳定^[17,23]。pMMO 由羟化酶 (pMMOH) 和还原酶 (pMMOR) 2 部分组成，羟化酶含有 3 个亚基分别为 α (PmoB)、 β (PmoA) 和 γ (PmoC)，3 个亚基的分子量分别为 45、27 和 23 kDa。pMMOR 由分子量分别为 63 和 8 kDa 的蛋白构成，pMMO 以三聚体 ($\alpha\beta\gamma$)₃ 形式存在^[23,32]。pMMO 的活性中心已经证实包含金属元素，一般认为 pMMO 含有 2 个金属位点：一个是位于 PmoB 亚基的双铜中心，一个是位于 PmoC 亚基的可变金属位点中心^[33]，但是人们对于金属元素的种类 (Cu, Fe, Zn) 和数目存在很大的争议^[17,19,34]。Bollinger 等综述了 pMMO 中可能存在的金属种类和数目，从 pMMO 的晶体结构分析，活性中心的金属元素可能存在于 PmoA 亚基的三铜簇，或是存在于 PmoC 亚基的双铁簇，或是存在于 PmoB 亚基的三铜簇^[35]。

pMMO 酶的编码基因是 *pmoCAB*，对应编码 pMMO 的 γ 、 β 和 α 亚基，此操纵子的转录需要 σ^{70} 作为启动子^[23]。研究者已经完成 2 种不同类型的甲烷氧化菌 *M. capsulatus* (Bath) 和 *M. trichosporium* (OB3b) 的 pMMO 基因测序，其相似度 >99%^[23,36]。MMO 的表达都受铜离子浓度的影响，铜离子的浓度不仅决定了 sMMO 或 pMMO 基因是否表达，而且对 2 种不同类型的甲烷单加氧酶的表达量也具有影响^[37]。相对于 sMMO 而言，pMMO 的表达需要在较高铜离子浓度的条件。调控机理示意图如图 1 所示，关于 pMMO 转录调控有 2 个假说：负控调节假说，游离态抑制剂 R 具有抑制活性，但低 Cu^{2+} 浓度条件下，CBR 不能结合 Cu^{2+} ，因此不能与抑制剂 R 结合，不能

形成Cu-CBR-R复合物, R结合到 $pmoCAB$ 上游的操纵基因区, $pmoCAB$ 的转录受到抑制; 正控调节假设, 激活剂在形成Cu-CBR-A复合物时具有激活作用, 高 Cu^{2+} 浓度下, 激活剂A与Cu-CBR结合后, 形成Cu-CBR-A复合物, 具有激活作用, $pmoCAB$ 可以转录^[17,23]。

研究者们认为pMMO的活性位点位于 $pmoB$ 亚基的可溶性N末端区域^[38]。关于pMMO的催化反应机理, 一些学者提出了自己的观点。Wang等通过比较pMMO和重组的 $pmoB$ 亚基与氧化剂 O_2 或 H_2O_2 的催化反应, 通过谱峰分析等证明pMMO的氧气结合位点在 $pmoB$ 的可溶部分的双铜离子中心^[39]。Li等认为pMMO催化的甲烷羟基化反应是自由基重排反应, 活性中心在双铜离子中心, C-H键的断裂是速度限制步骤, 然而Li等、Shiota等认为在双铜离子中心附近的苏氨酸残基提供一个氢原子配位过氧化二铜, 形成一个氧化和一个羟基化的铜, 从而羟基化甲烷^[40-41]。Sirajuddin等对pMMO晶体结构衍射分析, 在分辨率为2.6Å条件下发现pMMO结构中很可能存在2个 Zn^{2+} 抑制位点, 一个在 $pmoC$ 亚基中, 另一个在 $pmoC$ 亚基的胞质侧, 他们的研究表明 Zn^{2+} 可能通过抑制质子的传递来抑制pMMO活性^[42]。pMMO催化甲烷生成甲醇的反应机理争议较大, 原因可能是一方面由于pMMO暴露在空气中极不稳定给研究带来困难, 另一方面由于pMMO结构比较复杂。

3 展望

生物分子机器甲烷单加氧酶, 能够在温和的条件下将甲烷氧化成甲醇, 如果能够有效地抑制甲醇脱氢酶的活性, 如添加氯化铵、EDTA等^[43], 减弱甲烷氧化菌中甲醇的进一步氧化,

则可能实现生物法生产甲醇, 节约工业甲醇合成时的能耗。Furuto等利用甲基弯菌 *Methylosinus trichosporium* OB3b 发酵生产甲醇, 发酵液甲醇的浓度达到6 mmol/L^[44]; 邢新会课题组利用膜反应器进一步将发酵液甲醇的浓度提高到35 mmol/L^[45]。甲烷氧化菌也可用于生产虾青素、单细胞蛋白、聚 β -羟基丁酸等附加值高的产品, 此外由于甲烷单加氧酶底物谱较广使得甲烷氧化菌在重金属、有机物污染的生物修复方面具有潜在的应用价值^[5]。虽然用生物分子机器甲烷单加氧酶氧化甲烷生产甲醇还存在许多难题, 但是我们可能寻找到一些策略来增加甲醇的生产效率。例如找到甲烷单加氧酶的关键基因, 通过构建工程菌高效表达甲烷单加氧酶, 在体内外进行催化反应; 通过生物信息学分析, 定点突变基因, 筛选出高酶活菌株等。生物分子机器甲烷单加氧酶复杂精巧的催化反应机制巧妙地催化甲烷氧化成甲醇, 也体现了具有生物活性的大分子催化剂的复杂和精巧的特点^[3], 这些特性对合成生物学、催化剂或分子生物学中生物分子机器设计具有启发和借鉴意义。一些科学家通过模仿MMO的催化机理设计出具有类似MMO活性位点的人造催化剂如3N配体二铁复合物、铜激活的Fe-ZSM-5、Cu-ZSM-5、 μ -氮二铁酞菁、三铜复合物等, 它们可在较温和的条件下催化烷烃生成醇或降解卤代烃^[7,46-52], 这对于生产甲醇的工艺开发或卤代烃污染物的治理提供了新的方法和思路。

REFERENCES

- [1] Huang TJ, Juluri BK. Biological and biomimetic

- molecular machines. *Nanomedicine*, 2008, 3(1): 107–124.
- [2] Balzani V, Credi A, Raymo FM, et al. Artificial molecular machines. *Angew Chem Int Ed*, 2000, (19): 3349–3391.
- [3] Lee SJ, McCormick MS, Lippard SJ, et al. Control of substrate access to the active site in methane monooxygenase. *Nature*, 2013, 494(21): 380–385.
- [4] MIT Chemistry Directory: Stephen J. Lippard [EB/OL]. [2014-12-31]. <http://chemistry.mit.edu/people/lippard-stephen>.
- [5] Pandey VC, Singh JS, Singh DP, et al. Methanotrophs: promising bacteria for environmental remediation. *Int J Environ Sci Te*, 2014, 11(1): 241–250.
- [6] Xing ZL, Zhang LJ, Zhao TT. Advances in degradation of chlorinated hydrocarbons by obligate and facultative methanotrophs. *Chin J Biotech*, 2014, 30(4): 531–544 (in Chinese).
邢志林, 张丽杰, 赵天涛. 专一营养与兼性甲烷氧化菌降解氯代烃的研究现状、动力学分析及展望. *生物工程学报*, 2014, 30(4): 531–544.
- [7] Chan SI, Lu YJ, Nagababu P, et al. Efficient oxidation of methane to methanol by dioxygen mediated by tricopper clusters. *Angew Chem Int Edit*, 2013, 52(13): 3731–3735.
- [8] Lee JH, Kim TG, Cho KS. Isolation and characterization of a facultative methanotroph degrading malodor-causing volatile sulfur compounds. *J Hazard Mater*, 2012, 235(10): 224–229.
- [9] Theisen AR, Murrell JC. Facultative methanotrophs revisited. *J Bacteriol*, 2005, 187(13): 4303–4305.
- [10] Whittenbury R, Phillips KC, Wilkinson JF. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J Gen Microbiol*, 1970, 61(2): 205–218.
- [11] Bowman J. The methanotrophs—the families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae*. *Prokaryotes*, 2006, 5(1): 266–289.
- [12] Bowman JP, Sly LI, Nichols PD, et al. Revised taxonomy of the methanotrophs—description of *Methylobacter Gen-Nov*, emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the Group-I methanotrophs. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43(4): 735–753.
- [13] Semrau JD, DiSpirito AA, Yoon S. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34(4): 496–531.
- [14] Murrell JC. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology: the Aerobic Methane Oxidizing Bacteria (Methanotrophs)*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010: 1953–1966.
- [15] Park D, Lee J. Biological conversion of methane to methanol. *Korean J Chem Eng*, 2013, 30(5): 977–987.
- [16] Jiang H, Chen Y, Murrell JC, et al. Methanotrophs: multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochem Eng J*, 2010, 49(3): 277–288.
- [17] Dalton H. The leeuwenhoek lecture 2000—the natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria. *Phil Trans R Soc B*, 2005, 360(1458): 1207–1222.
- [18] Xu N, Xin JY, Wang Y, et al. Research advances of methane monooxygenase. *Lett Biotechnol*, 2013, 24(1): 130–133 (in Chinese).
徐宁, 辛嘉英, 王艳, 等. 甲烷单加氧酶的研究进展. *生物技术通讯*, 2013, 24(1): 130–133.
- [19] Trotsenko YA, Murrell JC. Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. *Adv Appl Microbiol*, 2008, 63(1): 183–229.
- [20] Hua SF, Song YY, Li SB, et al. Sequencing analysis of 16S rDNA and soluble methane monooxygenase genes from a methanotroph *Methylosinus trichosporium* IMV 3011. *Ann Microbiol*, 2011, 61(2): 391–396.
- [21] Merckx M, Lippard SJ. Why *OrfY*? characterization of MMOD, a long overlooked component of the

- soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Biol Chem*, 2002, 277(8): 5858–5865.
- [22] Csaki R, Bodrossy L, Kovacs KL, et al. Genes involved in the copper-dependent regulation of soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath): cloning, sequencing and mutational analysis. *Microbiol-SGM*, 2003, 149(7): 1785–1795.
- [23] Murrell JC, McDonald IR, Gilbert B. Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions. *Trends Microbiol*, 2000, 8(5): 221–225.
- [24] Banerjee R, Meier KK, Munck E, et al. Intermediate P* from soluble methane monooxygenase contains a diferrous cluster. *Biochemistry-US*, 2013, 52(25): 4331–4342.
- [25] Tinberg CE, Lippard SJ. Revisiting the Mechanism of Dioxygen Activation in Soluble Methane Monooxygenase from *M. capsulatus* (Bath): Evidence for a Multi-Step, Proton-Dependent Reaction Pathway. *Biochemistry-US*, 2009, 48(51): 12145–12158.
- [26] Gherman BF, Dunietz BD, Lippard SJ, et al. Activation of the C-H bond of methane by intermediate Q of methane monooxygenase: a theoretical study. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(16): 3836–3837.
- [27] Wang WX, Iacob RE, Lippard SJ, et al. Electron transfer control in soluble methane monooxygenase. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(27): 9754–9762.
- [28] Huang SP, Shiota Y, Yoshizawa K. DFT study of the mechanism for methane hydroxylation by soluble methane monooxygenase (sMMO): effects of oxidation state, spin state, and coordination number. *Dalton Trans*, 2013, 42(4): 1011–1123.
- [29] Culpepper MA, Cutsail GE, Rosenzweig AC, et al. Identification of the valence and coordination environment of the particulate methane monooxygenase copper centers by advanced EPR characterization. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(33): 11767–11775.
- [30] Tavormina PL, Ussler W, Orphan VJ, et al. Abundance and distribution of diverse membrane-bound monooxygenase (Cu-MMO) genes within the Costa Rica oxygen minimum zone. *Env Microbiol Rep*, 2013, 5(3): 414–423.
- [31] Chen YS, Luo WI, Chiang CH, et al. Controlled oxidation of aliphatic C-H bonds in metallo-monoxygenases: mechanistic insights derived from studies on deuterated and fluorinated hydrocarbons. *J Inorg Biochem*, 2014, 134(5): 118–133.
- [32] Dispirito A, Gulledege J, Krema C, et al. Trichloroethylene oxidation by the membrane-associated methane monooxygenase in type I, type II and type X methanotrophs. *Biodegradation*, 1991, 2(3): 151–164.
- [33] Liew EF, Tong DC, Holmes AJ, et al. Mutagenesis of the hydrocarbon monooxygenase indicates a metal centre in subunit-C, and not subunit-B, is essential for copper-containing membrane monooxygenase activity. *Microbiol-SGM*, 2014, 160(6): 1267–1277.
- [34] 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.
- [35] Bollinger JM. Biochemistry getting the metal right. *Nature*, 2010, 465(6): 40–41.
- [36] Murrell JC, Gilbert B, McDonald IR. Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Arch Microbiol*, 2000, 173(5): 325–332.
- [37] Ho A, Luke C, Frenzel P, et al. Selective stimulation in a natural community of methane oxidizing bacteria: effects of copper on pmoA transcription and activity. *Soil Biol Biochem*, 2013, 65(10): 211–216.
- [38] Lawton TJ, Ham J, Rosenzweig AC, et al.

- Structural conservation of the B subunit in the ammonia monooxygenase/particulate methane monooxygenase superfamily. *Proteins*, 2014, 82(9): 2263–1167.
- [39] Wang WX, Lippard SJ. Diiron oxidation state control of substrate access to the active site of soluble methane monooxygenase mediated by the regulatory component. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(6): 2244–2247.
- [40] Li CQ, Yang HQ, Hu CW, et al. Hydroxylation mechanism of methane and its derivatives over designed methane monooxygenase model with peroxo dizinc core. *Org Biomol Chem*, 2012, 10(19): 3924–3931.
- [41] Shiota Y, Juhasz G, Yoshizawa K. Role of tyrosine residue in methane activation at the dicopper site of particulate methane monooxygenase: a density functional theory study. *Inorg Chem*, 2013, 52(14): 7907–7917.
- [42] Sirajuddin S, Barupala D, Rosenzweig AC, et al. Effects of zinc on particulate methane monooxygenase activity and structure. *J Biol Chem*, 2014, 289(31): 21782–21794.
- [43] Han JS, Ahn CM, Kim CG, et al. Partial oxidative conversion of methane to methanol through selective inhibition of methanol dehydrogenase in methanotrophic consortium from landfill cover soil. *Appl Biochem Biotech*, 2013, 171(6): 1487–1499.
- [44] Furuto T, Takeguchi M, Okura I. Semicontinuous methanol biosynthesis by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J Mol Catal A-Chem*, 1999, 144(2): 257–261.
- [45] Duan CH, Luo MF, Xing XH. High-rate conversion of methane to methanol by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Bioresour Technol*, 2011, 102(15): 7349–7353.
- [46] Hammond C, Forde MM, Jenkins RL, et al. Direct catalytic conversion of methane to methanol in an aqueous medium by using copper-promoted fe-zsm-5. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51(21): 5129–5133.
- [47] Shan JJ, Huang WX, Li YY, et al. Conversion of methane to methanol with a bent mono (μ -oxo) dinickel anchored on the internal surfaces of micropores. *Langmuir*, 2014, 30(28): 8558–8569.
- [48] Chen PPY, Nagababu P, Chan SI, et al. Development of the tricopper cluster as a catalyst for the efficient conversion of methane into MeOH. *Chemcatchem*, 2014, 6(2): 429–437.
- [49] Sankaralingam M, Palaniandavar M. Diiron(III) complexes of tridentate 3N ligands as functional models for methane monooxygenases: effect of the capping ligand on hydroxylation of alkanes. *Polyhedron*, 2014, 67(1): 171–180.
- [50] Colombari C, Kudrik EV, Sorokin AB, et al. Degradation of chlorinated phenols in water in the presence of H₂O₂ and water-soluble μ -nitrido diiron phthalocyanine. *Catal Today*, 2014, 235(10): 14–19.
- [51] Stoian SA, Xue GQ, Munck E, et al. Spectroscopic and theoretical investigation of a complex with an [O=Fe-IV-O-Fe-IV=O] core related to methane monooxygenase intermediate Q. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(4): 1545–1558.
- [52] Sheppard T, Hamill CD, Thompson JM, et al. A low temperature, isothermal gas-phase system for conversion of methane to methanol over Cu-ZSM-5. *Chem Commun*, 2014, 50(75): 11053–11055.

(本文责编 陈宏宇)