

Paweł Maślakiewicz, Janusz Steczko
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN
Kraków

Monooksygenaza metanowa – występowanie, właściwości oraz perspektywy wykorzystania w procesach biotechnologicznych

1. Wprowadzenie

Bakterie wykorzystujące metan jako źródło węgla i energii występują powszechnie w przyrodzie, jako naturalna mikroflora wody i gleby. Mimo że istnienie ich stwierdzono już dość dawno (1), dopiero w 1970 r. Whittenbury i wsp. (2) wyizolowali po raz pierwszy czyste kultury bakterii metanotroficznych i sklasyfikowali je w oparciu o różnice w morfologii, typie wytwarzanych przetrwalników oraz rodzaju błon wewnątrzkomórkowych. W świetle prowadzonych badań okazało się, że bakterie te mogą metabolizować również pochodne metanu oraz związki bardziej złożone, nie posiadające wiązań międzywęglowych (np. mrówczan metylowy). W 1974 r. Patt i wsp. (3), a następnie Patel i wsp. (4) wyizolowali szczepy bakterii metanotroficznych asymilujące wyższe węglowodory oraz ich pochodne. Pierwszą grupę metanotrofów nazwano obligatoryjnymi, natomiast drugą – fakultatywnymi.

Leadbetter i Foster (5), a później Higgins i Quayle (6) stwierdzili, że enzymem odpowiedzialnym za utlenianie metanu przez bakterie metanotroficzne jest monooksygenaza metanowa. Badania specyficzności substratowej i aktywności MMO, prowadzone w zawiesinie komórek bakterii, wykazały, że enzym ten może katalizować reakcje utlenienia alkanów, alkenów, węglowodorów aromatycznych alicyklicznych i heterocyklicznych związków organicznych, alkoholi, fenoli oraz eterów (6,7,8). W tab. 1 zestawiono niektóre substraty i produkty reakcji katalizowanych przez zawiesinę komórek bakterii metanotroficznych na przykładzie obligatoryjnego szczepu *Methylosinus trichosporium* OB3b.

Dane te wskazują, że większość uzyskanych produktów powstaje w wyniku reakcji jednoetapowych. Jednak w niektórych przypadkach, oprócz monooksygenazy metanowej, w reakcji biorą udział inne enzymy zawarte w komórkach bakteryjnych. Na przykład etylobenzen ulega konwersji do fenyloetanolu 2 i p-hydroksy-etylobenzenu

przy udziale MMO, natomiast tworzenie kwasu fenylooctowego jest prawdopodobnie wynikiem następczego działania dehydrogenazy metanolowej lub formaldehydowej na otrzymany wcześniej fenetol.

Tabela 1

Związki powstałe w wyniku utleniania odpowiednich substratów przez zawiesinę *Methylosinus trichosporium* OB3b (9)

Substrat	Produkty
amoniak	hydroksyloamina
butadien	3,4-epoksy-1-buten
m-krezol	m- i p-hydroksy-benzaldehyd
etan	aldehyd octowy, kwas octowy, aceton
fenol	o- i p-dihydroksy-benzen
propylen	tlenek propylenu
pirydyna	N-tlenek pirydyny
benzen	fenol
buten-2	2,3-epoksybutan
o-krezol	5-metylo-1,3-fenylodiol
cykloheksanol	3-hydroksycykloheksanon
etylobenzen	kwas benzoesowy, kwas fenylooctowy, p-hydroksy-etylobenzen, fenylotanol 2
n-dekan	N. I.

2. Regulacja aktywności MMO na poziomie komórkowym

Aktywność MMO w zawieszynie komórek można modyfikować zmieniając źródło węgla i energii oraz skład pożywki.

U czterech badanych szczepów metanotrofów obligatoryjnych stwierdzono maksymalną aktywność enzymu przy wzroście bakterii na metanie (2). Obecność innych związków organicznych (metanolu, etanu, etanolu) w pożywce podczas hodowli powodowała znaczny spadek aktywności MMO. Bakterie rosnące na metanolu jako jedynym źródle węgla i energii przejawiały całkowity (4,8,10) lub częściowy (11) zanik zdolności komórek do utleniania metanu zarówno w przypadku metanotrofów obligatoryjnych jak i fakultatywnych.

Aktywność MMO przy stałym źródle węgla i energii na poziomie komórkowym u metanotrofów obligatoryjnych można modyfikować przez zmianę składu mineralnego pożywki. Znaczny wzrost szybkości utleniania metanu i innych substratów przez komórki *Methylococcus capsulatus* (Bath) rosnące na 1,0% metanolu stwierdzono

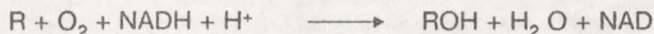
przy dużym stężeniu jonów Cu^{+2} (1,2-2,0 mg/l) w pożywce (12). Jest to prawdopodobnie związane z komórkową lokalizacją enzymu.

3. Rozmieszczenie MMO wewnątrz komórek bakteryjnych

Wirowanie różnicowe ekstraktu otrzymanego przez rozbitcie komórek bakteryjnych umożliwiło wyodrębnienie dwóch form MMO: nierozpuszczalnej - związanej z błonami, a więc zawartej w osadzie, oraz rozpuszczalnej zlokalizowanej w supernatancie (7,13,14). Różnice aktywności całkowitej, obserwowane na poziomie komórkowym w zależności od warunków hodowli, są spowodowane możliwością występowania jednej lub drugiej formy enzymu (15,16,17). Badania prowadzone na szczepach *Methylococcus capsulatus* (Bath) i *Methylosinus trichosporium* OB3b wykazały, że przy wysokim stężeniu jonów Cu^{+2} aktywność MMO obserwowana jest we frakcji nierozpuszczalnej, podczas gdy przy niskim stężeniu lub nieobecności jonów miedziowych aktywność wykazuje głównie frakcja rozpuszczalna ekstraktu komórkowego (16,17,18).

4. Charakterystyka formy rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej MMO

Reakcję utleniania węglowodorów przez MMO można opisać następującym równaniem (13):



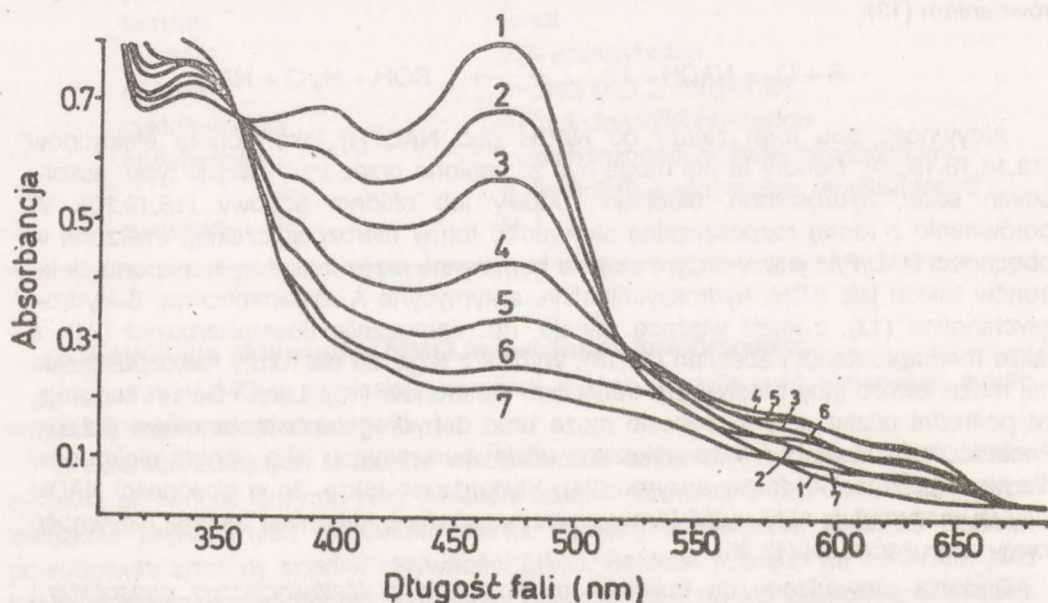
Aktywność obu form zależy od NADH (lub NADPH) jako donora elektronów (13,14,18,19,20). Donory te nie mogą być zastąpione przez inne związki typu: askorbinian sodu, hydrochinon, ditionian sodowy lub chloryn sodowy (15,19,20). W porównaniu z formą rozpuszczalną aktywność formy nierozpuszczalnej, mierzona w obecności NAD/P/H jest w dużym stopniu hamowana przez inhibitory transportu elektronów takich jak: KCN, hydroksychinolina, antymycyna A, o-fenantrolina, 8-hydroksychinolina (13), związki wiążące metale, np. tiomocznik, tiosemikarbazyd (21), a także merkaptoetanol i acetylen (15,18). Wynika z tego, że dla formy nierozpuszczalnej może istnieć inny mechanizm transportu elektronów (15). Leak i Dalton sugerują, że pośredni udział w tym procesie może brać dehydrogenaza metanolowa (22,23). Ponadto w badaniach *in vitro* wykazano udział bursztynianu jako donora elektronów dla nierozpuszczalnej formy enzymu (24). Stwierdzono także, że w obecności NADH jony Cu^{+2} stymulują aktywność formy nierozpuszczalnej, natomiast hamują aktywność formy rozpuszczalnej (12,25).

Badania prowadzone na frakcjach otrzymanych z *Methylococcus capsulatus* i *Methylosinus trichosporium* OB3b pozwoliły określić różnice w specyficzności substratowej obu form MMO (13,17). Wykazano, że forma nierozpuszczalna nie może utleniać alkanów o długości łańcucha powyżej C_5 (19,26) oraz cykloheksanu i węglowodorów aromatycznych (17), podczas gdy w przypadku formy rozpuszczalnej ograniczenie takie nie istnieje (6,20). Badając reakcję utleniania alkenów przez obie formy MMO z *Methylococcus capsulatus* (Bath) stwierdzono, że forma nierozpuszczalna tworzy z większą wydajnością epoksyzwiązki niż odpowiednie alkohole (27).

5. Budowa rozpuszczalnej formy MMO

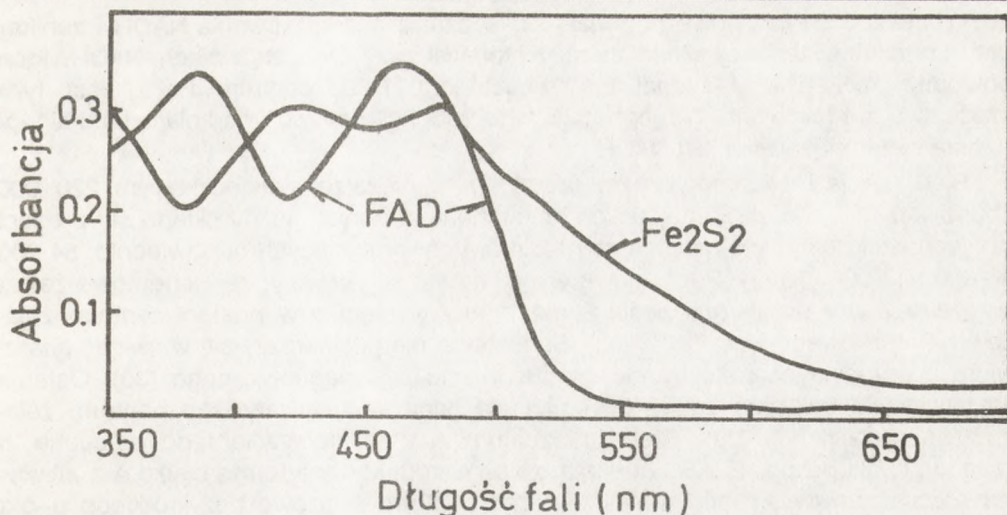
Ze względu na dużą niestabilność formy rozpuszczalnej MMO, większość prac dotycząca specyficzności substratowej i właściwości katalitycznych enzymu prowadzona była na wstępnie oczyszczonej frakcji ekstraktu komórek bakteryjnych (7,28,29). Nieliniowy charakter zależności między aktywnością enzymu a stężeniem białka w ekstrakcie z *Methylococcus capsulatus* (Bath) był pierwszą wskazówką świadczącą o tym, że rozpuszczalna forma MMO jest kompleksem enzymatycznym (28). W toku dalszych badań Dalton i wsp. (27,29,30,31) uzyskali rozdział tego kompleksu na trzy białka: A, B, C, przy czym stwierdzono, że szybka inaktywacja enzymu spowodowana jest głównie denaturacją białka C. Natomiast Patel i wsp. (20,32,33) wyizolowali z *Methylobacterium* CRL-26 dwukomponentowy system rozpuszczalnej MMO, który, jak się wydaje, nie posiada białka B.

Białko C zawiera polipeptyd o masie cząsteczkowej 42 000 (29), niehemowe żelazo oraz cynk. Stwierdzono, że katalizuje ono reakcje redukcji $K_3Fe(CN)_6$, 2,6-dichlorofenol-indofenolu i cytochromu c w obecności NADH jako donora elektronów (32). Widmo absorpcyjne tego białka wykazuje maksima w pasmach 390 i 460 nm, które są charakterystyczne dla układów flawoproteidowych (29,34). Inkubacja białka C z NADH lub ditionianem sodowym powoduje typowy dla redukcji FAD zanik, pasma absorpcji w obszarze 450-470 nm (rys. 1).



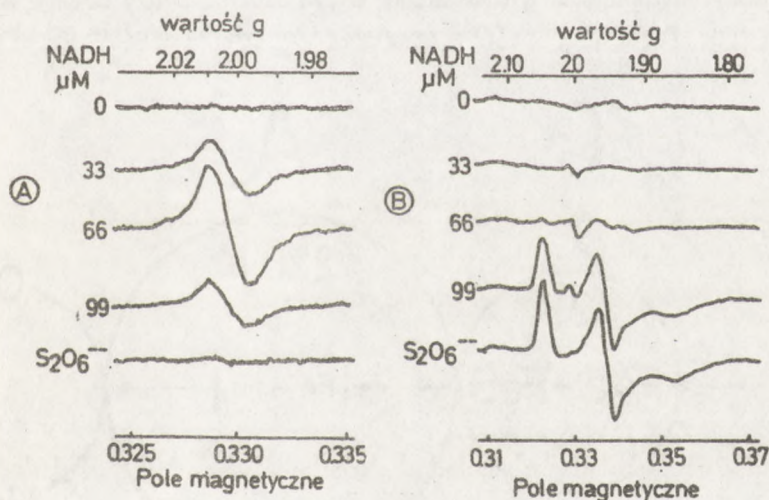
Rys.1. Miareczkowanie białka C monooksygenazy metanowej za pomocą wzrastających ilości NADH /krzywe 1-7/ (36).

Wyniki badań absorpcyjnych i EPR wskazują, że żelazo zawarte w białku występuje w postaci centrum aktywnego Fe_2S_2 (rys. 2).



Rys.2. Analiza centrów redokswych białka C monooxygenazy metanowej (36). Widmo centrum FAD otrzymano dodając do roztworu białka C około 40-krotny nadmiar mersalylu. Różnicowe widmo pomiędzy natywnym białkiem C i poddawanych działaniu mersalylu odpowiada centrum Fe₂S₂.

Kinetyka utleniania NADH oraz wartości potencjałów redoks dla poszczególnych etapów redukcji dinukleotydu flawinoadeninowego i centrum żelazowo-siarczkowego dowodzą, że przenoszenie elektronu z NADH w obrębie białka C odbywa się między semichinonową formą FAD a centrum żelazowo-siarczkowym (35,36). Potwierdzają to również wyniki uzyskane techniką EPR (rys. 3).



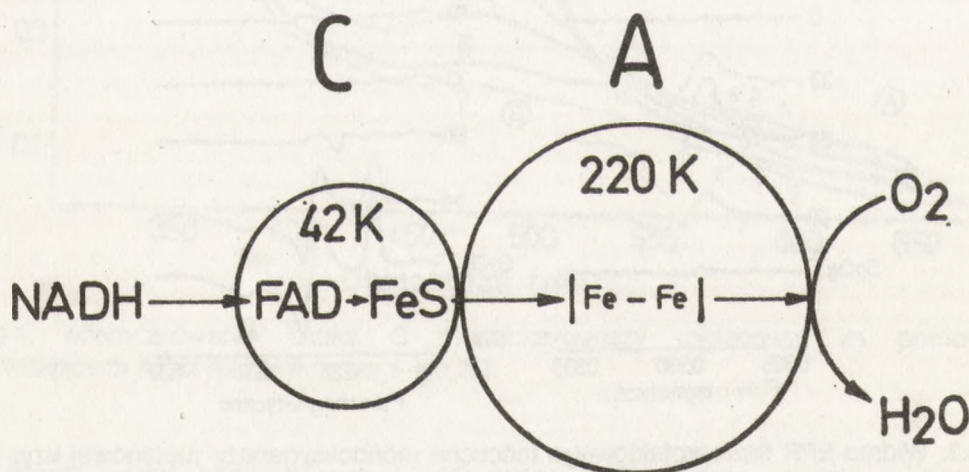
Rys.3. Widma EPR flawoproteidowego łańcucha monooxygenazy metanowej uzyskane podczas miareczkowania NADH (35). Warunki pomiaru spektrofotometrycznego optymalne dla obserwacji: A—wolnych rodników flawinowych, B—centrum Fe₂S₂.

Wolne rodniki flawinowe pojawiają się w czasie miareczkowania NADH i zanikają przy kompletnej redukcji ditionianem. Natomiast przy tych stężeniach NADH, które powodują maksymalny sygnał dla semichinonu FAD, centrum Fe_2S_2 jest tylko częściowo zredukowane. Do jego całkowitej redukcji potrzeba nadmiaru naturalnego donora elektronów jakim jest NADH.

Białko A jest oligomerycznym proteidem o ciężarze cząsteczkowym 220 000, zbudowanym z dwóch identycznych łańcuchów, z których każdy składa się z trzech podjednostek: α , β , γ o masach cząsteczkowych wynoszących odpowiednio: 54 000, 36 000 i 17 000 (30,37). Początkowe wyniki badań sugerowały, że niehemowe żelazo związane z tym białkiem w ilości 2 gatom/mol występuje w postaci centrum żelazowo-siarczkowego typu Fe_2S_2 (38). Sugestie te nie potwierdziły się w świetle analizy widm absorpcyjnych i elektronowego rezonansu paramagnetycznego (30). Ostatnio na podstawie dalszych badań EPR przyjęto istnienie binuklearnego centrum żelazowego w białku A (39). Głębsza strukturalna charakterystyka tego łańcucha za pomocą spektroskopii EXAFS ujawniła, że semizredukowana forma białka A z *Methylococcus capsulatus* (Bath) ma binuklearne centrum żelazowe bez krótkiego μ -oxo mostka, z odległością między atomami Fe równą 3,41 Å (40). Wartość ta jest różna od dystansu 3,05 Å znalezionej między Fe-Fe w utlenionym białku A z *Methylobacterium* CRL-26 (41). Do chwili obecnej nie wyjaśniono czy cynk wykryty w ilości 0,2-0,5 gatom/mol białka A jest specyficznym związany i spełnia określoną funkcję (30). W procesie utleniania katalizowanym przez MMO, białko A jest odpowiedzialne za wiązanie substratu i pełni funkcję właściwej oksygenazy (27,30).

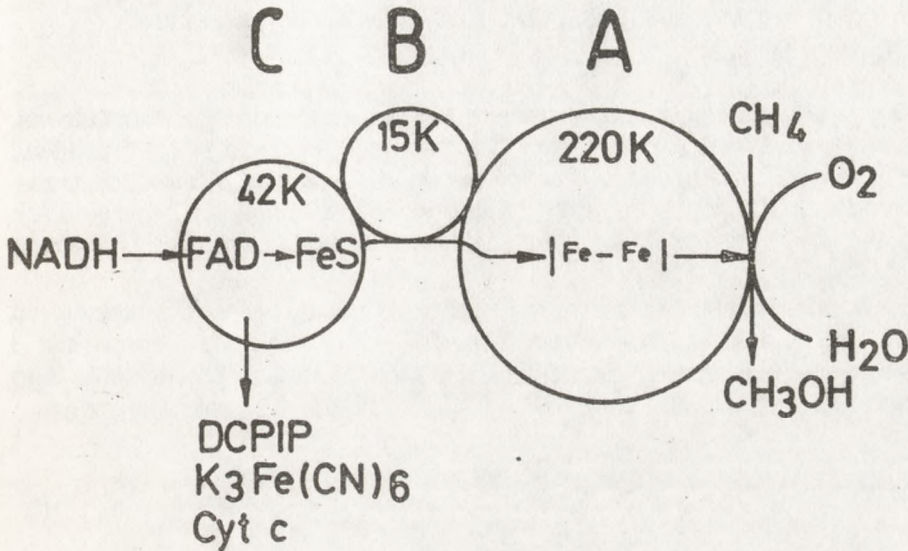
Białko B wyizolowane z rozpuszczalnej formy MMO ma ciężar cząsteczkowy 17 000 i nie posiada grupy prostetycznej (31).

Badając mechanizm reakcji katalizowanej przez monoooksygenazę metanową stwierdzono, że zredukowane białko C może być utlenione przez białko A (38,42). Obecność białka A stymuluje w tym układzie aktywność reduktazy NADH: akceptor (31). Kompleks A-C wykazuje aktywność oksydazy (rys. 4), niezależnie od obecności substratu.



Rys.4. Transport elektronów pomiędzy białkami C i A w rozprężonej monoooksygenazie metanowej (31).

Charakterystyczne jest to, że rozprężona MMO w przeciwieństwie do innych poznanych układów tego typu (43,44,45,46), redukując cząsteczkowy tlen do wody nie tworzy H_2O_2 . Po przyłączeniu białka B, w obecności substratu węglowego, kompleks A-B-C posiada aktywność oksygenazy (rys. 5), tracąc jednocześnie właściwości oksydazy w nieobecności substratu.



Rys.5. Transport elektronów pomiędzy białkami C, B i A w rozpuszczalnej formie monooksygenazy metanowej (27,31).

Steady-state kinetykę reakcji utleniania węglowodorów za pomocą rozpuszczalnej MMO badano na przykładzie propylenu (47). Stwierdzono, że proces ten biegnie kilkuetapowo (rys. 6).

Propylen $k_1 \downarrow k_2$	NADH $k_3 \downarrow k_4$	NAD $k_5 \downarrow k_6$	O ₂ $k_7 \downarrow k_8$	H ₂ O $k_9 \downarrow k_{10}$	tlenek propylenu $k_{11} \downarrow k_{12}$
E	E·Propylen	(E·Propylen·NADH, EH ₂ ·Propylen)	(EH ₂ ·Propylen·O ₂ , E·tlenek propylenu)	(E·tlenek propylenu·H ₂ O)	E

Rys.6. Kolejne etapy przemiany propylenu w tlenek propylenu przy udziale rozpuszczalnej monooksygenazy metanowej (47).

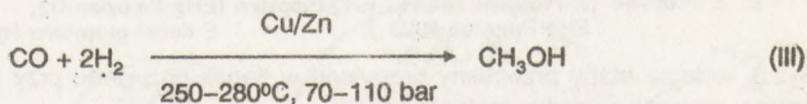
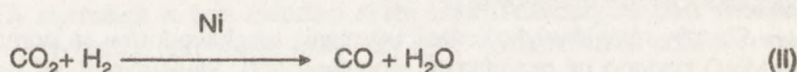
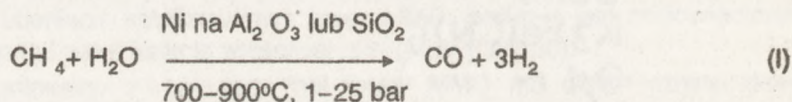
Początkowo enzym wiąże substrat tworząc kompleks (E-S) do którego następnie przyłącza się NADH. W wyniku przeniesienia elektronów i atomów wodoru następuje redukcja enzymu do (EH₂-S) i uwalniany jest NAD. W kolejnym etapie kompleks (EH₂-S) wiąże tlen, tworzy się produkt oraz woda, która jako pierwsza zostaje odłączona. Ostatnim procesem cyklu jest rozpad kompleksu (E-P) na produkt i zregenerowany enzym. Z rozważań tych wynika, że w omawianej reakcji tworzą się co najwyżej trójelementowe kompleksy pośrednie (E-S-NADH, EH₂-S-O₂), nie występują natomiast kompleksy czteroelementowe typu E-S-O₂-NADH.

Na temat nierozpuszczalnej formy MMO pojawiło się kilka prac (7,17,21,24,48), których autorzy postulują zupełnie inną budowę i mechanizm działania tego enzymu w porównaniu z formą rozpuszczalną. Do chwili obecnej nie udało się wyizolować tej formy w stanie czystym, a sprzeczność wyników i hipotez stawianych przez poszczególnych badaczy uniemożliwia ich jednoznaczną interpretację.

6. Wykorzystanie właściwości katalitycznych MMO w procesach biotechnologicznych

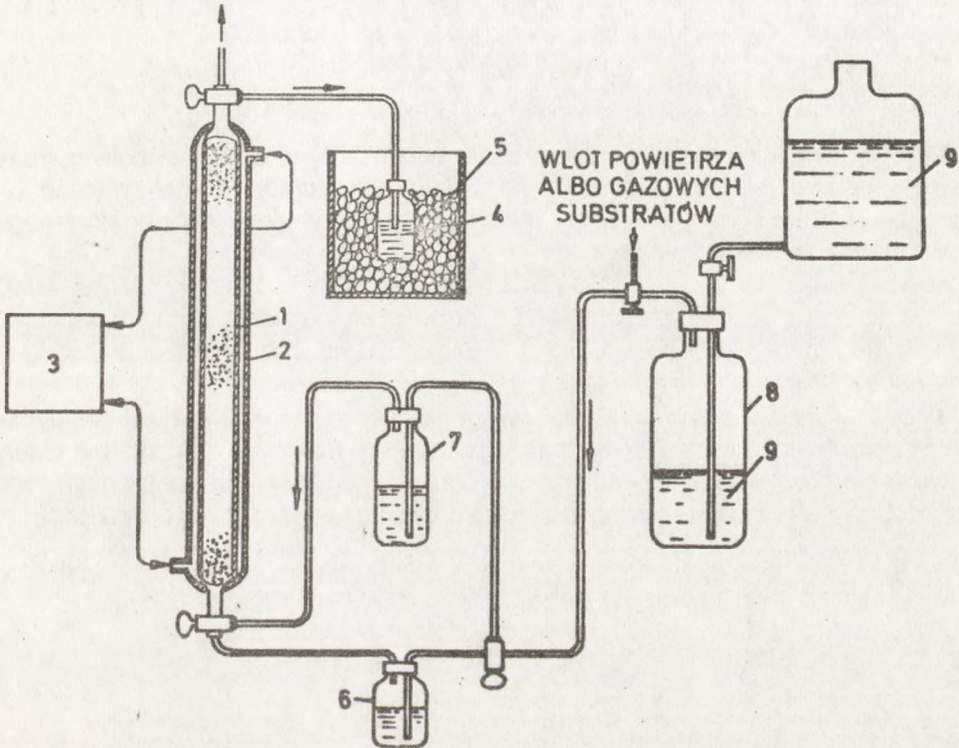
Monooksygenaza metanowa jest enzymem o małej specyficzności substratowej. W wyniku katalizowanych przez nią reakcji powstają m.in. alkohole I- i II- rzędowe, fenole oraz epoksyalkany. Prowadzone są intensywne badania nad możliwością przemysłowej produkcji metanolu, etanolu, tlenku etylenu i fenolu z odpowiednich węglowodorów przy udziale MMO jako katalizatora, co umożliwiłoby znaczne obniżenie kosztów ich wytwarzania.

Przykładowo, otrzymanie chemiczne metanolu z metanu wymaga zastosowania na poszczególnych etapach specyficznych katalizatorów, wysokich temperatur i ciśnień (równania I-III), podczas gdy zastosowanie MMO umożliwia prowadzenie tego procesu jednoetapowo, w temperaturze 37- 45°C i pod ciśnieniem atmosferycznym.



Przemysłowe wykorzystanie czystego enzymu do produkcji metanolu jest obecnie niemożliwe ze względu na duże koszty izolacji MMO, jej małą stabilność oraz konieczność regeneracji NADH za pomocą metod biologicznych lub elektrochemicznych. Stąd też technologia produkcji metanolu opracowana na Uniwersytecie w Warwick opiera się na wykorzystaniu całych komórek bakterii metanotroficznych. Wówczas jednak liczyć się należy z możliwością dalszego przetwarzania produktu przez inne enzymy, np. dehydrogenazę metanolową oraz formaldehydową.

Metanol, podobnie jak inne produkty utlenienia metanu, jest często wykorzystywany w procesach kometabolicznych jako źródło energii dla bakterii metanotroficznych. Rozkładowi tych związków towarzyszy generowanie NADH, który jest niezbędny do utleniania przez MMO właściwego substratu i uzyskania istotnego, z technologicznego punktu widzenia produktu (49,50). Przykładem zastosowania procesów kometabolicznych jest mikrobiologiczne utlenianie propenu w celu przemysłowego otrzymywania tlenku propylenu, związku istotnego w produkcji tworzyw poliuretanowych. W charakterze biokatalizatora wykorzystano tu szczep *Methylosinus* sp. CRL 31 (51). Komórki bakterii immobilizowane na kulkach z porowatego szkła stanowiły wypełnienie reaktora kolumnowego (rys. 7).



Rys.7. Schemat bioreaktora kolumnowego do cyklicznej produkcji tlenku propylenu (51). Wypełnienie bioreaktora stanowiły komórki *Methylosinus* sp. CRL 31 immobilizowane na kulkach szklanych – 1) bioreaktor, 2) płaszcz, 3) urządzenie kontroli temperatury, 4) odbieralnik produktu, 5) lód, 6) woda o temp. o 40 C, 7) metanol dla regeneracji biokatalizatora, 8) mieszalnik gazowych substratów, 9) woda.

Mieszanina gazowa zawierająca propylen była nasycona wodą i tłoczona przez kolumnę reakcyjną, której temperaturę utrzymywano na poziomie 45°C. Wytwarzany w tych warunkach epoksypropan występuje w fazie gazowej (temp. wrzenia 35°C) i jest usuwany ze środowiska reakcji, co zapobiega zatruciu bioreaktora. Po około 12 go-

dzinach pracy katalizator dezaktywuje się wskutek wyczerpania źródła energii i jest częściowo regenerowany oparami metanolu przetwarzanymi przez kolumnę.

Zastosowanie komórek bakterii metanotroficznych w procesach biokatalitycznych umożliwia syntezę związków, które powstają w wyniku kolejnego działania kilku enzymów. Przykładem procesu tego typu jest otrzymywanie ketonów z odpowiednich alkanów (pośrednio tworzą się alkohole II- rzędowe) przy udziale MMO i dehydrogenazy alkoholowej (52). Opłacalność produkcji ketonów na skalę przemysłową tą metodą uwarunkowana jest głównie kosztami związanymi z oczyszczeniem produktów.

Warto również zwrócić uwagę na możliwość wykorzystania bakterii metanotroficznych do usuwania z odpadów przemysłowych tak szkodliwych związków jak CO i NH₃ oraz do asymilacji CO₂ i regulacji azotu w przyrodzie (53,54,55,56).

7. Uwagi końcowe

Przedstawiony w niniejszym artykule zarys badań dotyczących monooksygenazy metanowej pozwala sądzić, że zarówno MMO jak i całe komórki bakterii metanotroficznych będą coraz szerzej stosowane w różnych gałęziach przemysłu organicznego oraz w ochronie środowiska naturalnego.

Niewykluczone, że w toku dalszych badań nad nierozpuszczalną formą MMO okaże się, iż enzym ten jest bardziej stabilny i może współdziałać z innymi, tańszymi niż NADH donorami elektronów, co umożliwi zastosowanie go na szeroką skalę w postaci immobilizowanej.

Należy również wspomnieć o rozpoczętych pracach z zakresu inżynierii genetycznej dotyczących klonowania genów tego enzymu (57). Poznanie dokładnej struktury łańcuchów białkowych oraz uzyskanie nowych bardziej stabilnych i aktywnych form rozpuszczalnej monooksygenazy metanowej wydaje się sprawą bliskiej przyszłości.

Literatura

1. Leadbetter E. R., Foster J. W., (1958), *Arch. Microbiol.*, 30, 91-118.
2. Whittenbury R., Phillips K. C., Wilkinson J. F., (1970), *J. Gen. Microbiol.*, 61, 205-218.
3. Patt T. E., Cole G. C., Bland J., Hanson R. S., (1974), *J. Bacteriol.*, 120, 955-964.
4. Patel R. N., Hou C. T., Felix A., (1978), *J. Bacteriol.*, 136, 352-358.
5. Leadbetter E. R., Foster J. W., (1959), *Nature (London)*, 184, 1428-1429.
6. Higgins I. J., Quayle J. R., (1970), *Biochem. J.*, 118, 201-208.
7. Colby J., Stirling D. I., Dalton H., (1977), *Biochem J.*, 165, 395-402.
8. Patel R. N., Hou C. T., Laskin A. I., Felix A., Derelanko P., (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 727-733.

9. Higgins I. J., Hammond R. C., Sariaslani F. S., Best D., Davies M. M., Trykorn S. E., Taylor F., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 671-677.
10. Hou C. T., Patel R. N., Laskin A., Barnabe H., (1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 127-134.
11. Takeda K. C., Tezuka S., Fukuoka S., Takahara Y., (1976), *J. Ferment. Technol.*, **54**, 557-562.
12. Prior S. D., Dalton H., (1985), *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 155-163.
13. Ribbons D. W., (1975), *J. Bacteriol.*, **122**, 1351-1363.
14. Stirling D. I., Dalton H., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **96**, 205-212.
15. Scott D., Brennan J., Higgins I. J., (1981), *J. Gen. Microbiol.*, **125**, 63-72.
16. Stanley S. H., Prior S. D., Leak D. J., Dalton H., (1983), *Biotechnol. Lett.*, **5**, 487-492.
17. Burrows K. J., Cornish A., Scott D., Higgins J., (1984), *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 3327-3333.
18. Dalton H., Prior S. D., Leak D. J., Stanley S. H., (1984), 4th Int. Symp. on Microbial Growth on C1 compounds (Ed.) Crawford R. L., Hanson R. S., *Am. Soc. Microbiol.*, Washington DC, 75-82.
19. Stirling D. I., Colby J., Dalton H., (1979), *Biochem. J.*, **177**, 361-364.
20. Patel R. N., Hou C. T., Laskin A. E., Felix A., (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1130-1137.
21. Tonge G. M., Harrison D. E. F., Higgins J., (1977), *Biochem. J.*, **161**, 333-344.
22. Leak D. J., Dalton H., (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 470-476.
23. Leak D. J., Dalton H., (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 477-481.
24. Cornish A., McDonald J., Burrows K. J., King T. S., Scott D., Higgins I. J., (1985), *Biotechnol. Lett.*, **7**, 319-324.
25. Green J., Prior S. D., Dalton H., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **153**, 137-144.
26. Piliashenko-Novohatnii A., Grigorian A. N., Kovalev A. P., Belova B. S., Grozdev R. I., (1979), *Doklady Biochem.*, **245**, 147-150.
27. Dalton H., Leak D. J., (1985), in: *Gas Enzymology* (Ed.) H. Degn et al., D. Reidel Publishing Company, 169-186.
28. Colby J., Dalton H., (1976), *Biochem. J.*, **157**, 495-497.
29. Colby J., Dalton H., (1978), *Biochem. J.*, **171**, 461-468.
30. Woodland M. P., Dalton H., (1984), *Anal. Biochem.*, **139**, 459-462.
31. Green J., Dalton H., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 15 795-15 801.
32. Patel R. N., (1987), *Arch. Biochem. Biophys.*, **252**, 229-236.
33. Patel R. N., (1984), *Proc. 4th Int. Symp. on Microbial Growth on C1 Compounds*, (Ed.) Crawford R. L., Hanson R. S., *Am. Soc. Microbiol. Washington DC*, 83-90.
34. Colby J., Dalton H., (1979), *Biochem. J.*, **177**, 903-908.

35. Prince R. C., Patel R. N., (1986), *FEBS Lett.*, 203, 127-130.
36. Lund J., Dalton H., (1985), *Eur. J. Biochem.*, 147, 291-296.
37. Woodland M. P., Dalton H., (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 53-59.
38. Dalton H., (1980), *Adv. Appl. Microbiol.*, 26, 71-87.
39. Woodland P., Patial D. S., Cammack R., Dalton H., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, 873, 237-242.
40. Ericson A., Hedman B., Hodgson K. D., Green J., Dalton H., Bensten J. G., Beer R. H., Lippard S. J., (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2330-2332.
41. Prince R. C., George G. N., Savas J. C., Cramer S. P., Patel R. N., (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, 752, 220-229.
42. Lund J., Woodland M. P., Dalton H., (1985), *Eur. J. Biochem.*, 147, 297-305.
43. Spector T., Massey V., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45, 1219-1226.
44. Otha V., Ribbons D. W., (1970), *FEBS Lett.*, 11, 189-192.
45. White-Stevens R. H., Camin H., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 882-889.
46. Van der Hoevent A., Coon M. J., (1974), *J. Biol. Chem.*, 249, 6302-6310.
47. Green J., Dalton H., (1986), *Biochem. J.*, 236, 155-162.
48. Joergensen L., (1985), *Biochem. J.*, 225, 441-448.
49. Dalton H., Stirling D. I., (1982), *Phil. Trans. R. Lond. B.*, 297, 481-496.
50. Leak C. T., Dalton H., (1983), *J. Gen. Microbiol.*, 129, 3487-3497.
51. Hou C. T., (1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 1-4.
52. Patel R. N., Hou C. T., Laskin A. I., Felis A., Derelanko P., (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 727-733.
53. Murrell J. C., Dalton H., (1983), *J. Gen. Microbiol.*, 129, 1197-1206.
54. Murrell J. C., Dalton H., (1983), *J. Gen. Microbiol.*, 129, 3481-3486.
55. Shishkina V. N., Trotsenko Yu. A., (1986), *Microbiol.*, 55, 377-382.
56. Megraw S. R., Knowles R., (1987), *Biol. Fertil. Soils*, 4, 205-212.
57. Mullens I. A., Dalton H., (1987), *Biotechnol.*, 5, 490-494.


Wykaz stosowanych skrótów: MMO - monooksygenaza metanowa, NAD, NADP, NADH, NADPH - odpowiednio dinukleotyd nikotynamidoadeninowy jego fosforan oraz zredukowane formy, FAD - dinukleotyd flawinoadeninowy, EPR - elektronowy rezonans paramagnetyczny, EXAFS - rozszerzona rentgenowska spektroskopia absorpcyjna struktur subtelných, DCPIP - 2,6-dichlorofenol-indofenol, Cyt c - cytochrom c.

Summary

Methane monooxygenase – subcellular localization, properties and possible biotechnological utilization

In all methylotrophs studies so far, methane is oxidized to methanol by means of a monooxygenase. Two monooxygenase systems have so far been identified, soluble and particulate. The most extensively characterized one is a soluble NADH-dependent system in *Methylococcus capsulatus* (Bath). The enzyme comprises three proteins: A, B, C. Protein A has MW of 220 000 and contains non-heme iron, the reduced form of which may be responsible for binding methane. It contains three types of subunits: alpha, beta and gamma with MW values respectively 54 000, 36 000, 17 000 arranged with the stoichiometry $\alpha_2 \beta_2 \gamma_2$. Subunit B is colourless protein of MW 17 000. The protein B plays a regulatory function; it converts the combination of protein A and C from NADH oxidase activity to monooxygenase activity and makes the electron transfer process dependent on methane or another hydroxylatable substrate. Protein C, MW 42 000, containing FAD as well as sulphur iron cluster, oxidizes NADH using either A and hence methanol or alternatively electron acceptors such as 2,6 dichlorophenol-endo-phenol or cytochrome C as electron acceptor. The whole complex is required for hydroxylation of methane. Some biotechnological aspects using methylotrophs are discussed. Perhaps the most valuable biotransformations catalysed by MMO are in the production of epoxides e.g. propylene oxide from propylene.

Paweł Maślakiewicz, Janusz Steczko,
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN,
ul. Niezapominajek, 30-239 Kraków.



Nowości!

Tytoń odporny na herbicydy

W laboratoriach firmy Rhode-Poulence powstała transgeniczna odmiana tytoniu odporna na herbicydy zawierające bromoksynil. Gen warunkujący tę oporność wydzielono z bakterii glebowych *Klebsiella pneumoniae* i wprowadzono do tytoniu wektorem plazmidowym *Agrobacterium tumefaciens*. Rośliny tytoniu o zmienionym genotypie znoszą dawki bromoksynilu 2 kg/ha.

M.F.