

苯并噻吩与二苯并噻吩脱硫酶功能相关性研究

李珊珊¹, 李国强², 马挺^{1*}, 梁凤来¹, 刘如林¹

(1. 南开大学生命科学学院, 分子微生物与技术教育部重点实验室, 天津 300071; 2. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071)

摘要: 苯并噻吩(BT)专一性降解菌株 *Gordonia* sp. C-6 的脱硫途径类似于二苯并噻吩(DBT)的“4S”脱硫途径, 能以 BT 为唯一硫源生长, 但不能以 DBT 为唯一硫源生长. 目前, 还没有 BT 专一性脱硫基因的相关报道. 本研究将 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 中 DBT 脱硫途径的相关基因 *dszA*、*dszB*、*dszC* 和 *dszABC* 分别转入 *Gordonia* sp. C-6 中构建工程菌株 *Gordonia* sp. CRA、*Gordonia* sp. CRB、*Gordonia* sp. CRC 和 *Gordonia* sp. CRABC; 其 DBT 相关脱硫酶活性(以 DCW 计)分别为 $76.8 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ 、 $51.6 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ 和 $62.4 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$, 比原始菌株 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 的 $35.2 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ 、 $21.3 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ 和 $25.5 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ 提高了 1.5 倍左右. 其中 *Gordonia* sp. CRA 和 *Gordonia* sp. CRB 在以 DBT 为唯一硫源的培养基中几乎不生长, 无法降解 DBT; 而 *Gordonia* sp. CRC 同表达完整 DBT 脱硫酶的 *Gordonia* sp. CRABC 一样, 在以 DBT 为唯一硫源的培养基中生长良好, 亦能降解大部分 DBT(84%). 这表明催化 BT 和 DBT 前两步脱硫反应的 BT 单加氧酶和 DBT 单加氧酶是负责底物识别的关键酶, 催化 BT 和 DBT 后两步脱硫反应的酶功能相似, 通过比较这 2 种单加氧酶的氨基酸序列差异, 即可预测其作用的活性位点.

关键词: 生物脱硫; *dszABC*; 二苯并噻吩; 苯并噻吩

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3166-06

Functional Correlation of Dibenzothiophene and Benzothiophene Desulfurization Enzymes

LI Shan-shan¹, LI Guo-qiang², MA Ting¹, LIANG Feng-lai¹, LIU Ru-lin¹

(1. Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. College of Environmental Sciences and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: *Gordonia* sp. C-6 can desulfurize benzothiophene (BT) as the pathway similar to the “4S” pathway of dibenzothiophene (DBT)-desulfurizing, but the strain can not grow with DBT as the sole sulfur source. At current, there were not related reports on BT-desulfurizing genes at home or abroad. The DBT-desulfurizing genes of *Rhodococcus erythropolis* DS-3, *dszA*, *dszB*, *dszC* and *dszABC* were introduced into *Gordonia* sp. C-6 respectively using a *Rhodococcus-E. coli* shuttle vector, to construct new recombinant strains *Gordonia* sp. CRA, *Gordonia* sp. CRB, *Gordonia* sp. CRC and *Gordonia* sp. CRABC, the enzyme activities of which was respectively $76.8 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$, $51.6 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ and $62.4 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$, increasing by 1.5 times compared with $35.2 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$, $21.3 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ and $25.5 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ of wild strain *Rhodococcus erythropolis* DS-3. Of the recombinant strains, only recombinant strains *Gordonia* sp. CRC with *DszC* and *Gordonia* sp. CRABC with *DszABC* exhibit significant growth with DBT as the sole sulfur source, *Gordonia* sp. CRA with *DszA* and *Gordonia* sp. CRB with *DszB* could not live with DBT as the sole sulfur source. The results show that, DBT monooxygenase and BT monooxygenase, catalyzed the first two steps of DBT and BT oxidation, respectively, are the key enzymes responsible for substrate-recognition, however, the enzymes catalyzed the last two steps have the similar substrate specificity. The active sites of the two monooxygenase could be predicted by comparing with the sequence differences of their amino acids.

Key words: biodesulfurization; *dszABC*; dibenzothiophene; benzothiophene

世界范围对石油产品的需求越来越大, 环保条例对石油产品中硫含量的要求日益严格, 而全球低硫油的贮量却逐年下降, 这些因素都对石油精炼技术提出了更高的要求, 人们不得不面临有效脱除高硫油中硫元素的严峻课题^[1,2]. 柴油中含有各种有机硫化物, 包括二苯并噻吩(DBT)、苯并噻吩(BT)及其衍生物, 还有硫醇类、硫醚类和其他噻吩化合物, 其中 DBT 和 BT 用传统的物理化学脱硫方法很难去除^[3~5].

目前, 从自然界分离到的野生型菌株大都只能专一性降解 DBT 或 BT. 生物脱硫的研究主要以 DBT 为模式化合物^[6,7]. 已报道的 DBT 类杂环化合物脱硫菌株包括十几个属的上百种微生物^[8~10]. 相对来

收稿日期: 2007-11-07; 修订日期: 2008-01-03

基金项目: 天津市应用基础研究计划项目(07ZDJCZD03200); 中国博士后科学基金项目(20060400689)

作者简介: 李珊珊(1983~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为资源细菌及工程, E-mail: skyshanshan@mail.nankai.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: tingma@nankai.edu.cn

说,对 BT 的降解机制及基因的研究甚少.已报道的 BT 类杂环化合物脱硫菌株主要有: *Gordonia desulfuricans* strain 213E^[11]、*Rhodococcus* sp. strain T09^[12]、*Pseudomonas* sp. strains W1^[13]、*Sinorhizobium* sp. KT55^[14].也有极少数菌株能同时降解 DBT 和 BT 类杂环化合物,如: *Microbacterium* strain ZD-M2^[15]、*Gordonia alkanivorans* 1B^[16]、*Mycobacterium phlei* WU-0103^[17],但和专一性降解 BT 或 DBT 的菌株相比它们的脱硫活性比较低. Gilbert 等^[11]利用 GC-MS 测定了 *Gordonia desulfuricans* strain 213E 降解 BT 的代谢产物,结果表明其代谢 BT 的途径类似于 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 代谢 DBT 的“4S”途径,说明 BT 脱硫酶和 DBT 脱硫酶的功能可能存在一定的相似性.另外,有些菌株能够同时降解 BT 和 DBT 也说明了 BT 脱硫酶和 DBT 脱硫酶的功能可能存在一定的相似性.

本研究将 DBT 降解菌 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 的脱硫基因 *dszA*、*dszB*、*dszC* 分别转入 BT 降解菌 *Gordonia* sp. C-6 中,构建重组菌株,分别检测其在 DBT 和 BT 中的生长及脱硫情况,以鉴定其脱硫酶功能的相关性,以期为 BT 专一性脱硫基因的识别、BT 脱硫酶的功能鉴定和工程菌株的构建奠定基础.

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

红球菌 *Rhodococcus erythropolis* DS-3,能够专一性降解 DBT 及其衍生物,其脱硫机制和脱硫基因已研究清楚^[18~20],本实验室保存有 1 株.

戈登氏菌 *Gordonia* sp. C-6,能够专一性降解 BT 及其衍生物,GC-MS 表明其降解 BT 的途径与 *Gordonia desulfuricans* strain 213E 相似^[21].

本研究中用到的其它菌株和质粒见表 1.

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

项目	菌株和质粒		特征	来源
菌株	<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44</i> △ <i>lacU169</i> (Φ80 <i>lacZ</i> △ <i>M15</i>) <i>hdsT17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>		大连宝生物
	<i>Gordonia</i> sp. CRA	<i>Gordonia</i> sp. C-6 with pRA		本研究
	<i>Gordonia</i> sp. CRB	<i>Gordonia</i> sp. C-6 with pRB		本研究
	<i>Gordonia</i> sp. CRC	<i>Gordonia</i> sp. C-6 with pRC		本研究
	<i>Gordonia</i> sp. CRABC	<i>Gordonia</i> sp. C-6 with pRABC		本研究
质粒	pRHK1	<i>Rhodococcus-E. coli</i> shuttle vector, Kan ^r , arabinose promoter, p15A <i>ori</i>		[22]
	pRA	pRHK1 containing <i>dszA</i> from <i>Rhodococcus erythropolis</i> DS-3		本研究
	pRB	pRHK1 containing <i>dszB</i> from <i>Rhodococcus erythropolis</i> DS-3		本研究
	pRC	pRHK1 containing <i>dszC</i> from <i>Rhodococcus erythropolis</i> DS-3		本研究
	pRABC	pRHK1 containing <i>dszABC</i> from <i>Rhodococcus erythropolis</i> DS-3		本研究

1.2 培养基及试剂

BSM 及 LB 培养基见文献[23]. DBT、BT 和 2-HBP购自 ACOROS 公司,各种限制性内切酶、T4 连接酶、PCR 所用的高保真 *Taq* 酶、dNTPs、X-gal 及 IPTG 均购自 Takara 公司,其余试剂均为国产分析纯.

1.3 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 基因组的提取及基因扩增

红球菌 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 基因组 DNA 的提取参照文献[24].依据 GenBank 中已报道的 DBT 脱硫酶 *dszABC* 基因开放阅读框序列的两端保守序列,设计引物,见表 2. PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 2 min(*dszA*、*dszB* 和 *dszC*)或 4 min(*dszABC*), 30 个循环; 72℃ 10 min, 4℃

终止. PCR 产物由北京三博公司测序.并提交 GenBank 进行 DNA 序列比对.

表 2 *dszABC* 各基因的引物
Table 2 Primers of each *dszABC* genes

基因	引物	序列
<i>dszA</i>	A1	5'-GGAC GAATTC(<i>EcoR</i> I)GCGATGACTCAACAA-3'
	A2	5'-CGGATGGCGC TCTAGA(<i>Xba</i> I)GCTCTGA-3'
<i>dszB</i>	B1	5'-GCGC GAATTC(<i>EcoR</i> I)CAACTGCAAGGACAACC-3'
	B2	5'-GCGGCG TCTAGA(<i>Xba</i> I)GCTCGAACGTG-3'
<i>dszC</i>	C1	5'-CAGCCGAATTC(<i>EcoR</i> I)ACCACCGATAGGAAC-3'
	C2	5'-TCAGCGCTCTAGA(<i>Xba</i> I)GCCTCAGGAGG-3'

1.4 *Gordonia* sp. C-6 感受态的制备及电转化

Gordonia sp. C-6 感受态的制备方法参照红球菌^[25].

电转化方法:在冰上将 60 μL 感受态细胞与 1 μL 质粒(浓度 100 ~ 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$),以不加质粒的感受态细胞作阴性对照;将混合好的感受态细胞与质粒转移至预冷的电转化杯中;冰上放置 1 ~ 5 min;用 1.95 kV/mm 的电压(1 mm electrode gap 转化杯)电击 1 次(仪器 BioRad, MicroPulser TM);立即用 600 μL SOC 培养基将电转杯中的细胞吹洗出来,转入无菌的 1.5 mL 离心管,30℃,100 ~ 130 r/min,恢复培养 3 h;将培养液铺在含有相应抗生素 LB 的平板上,正置 2 h 后倒置培养;挑选单菌落,提取质粒,进行电泳和 PCR 鉴定.

1.5 脱硫酶活性测定

在 1 mL 25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液体系(pH 7.0)中加入 100 mmol/L NaCl,0.5 mmol/L DTT,1.0 mmol/L 硫源(DBT,或 DBTO₂,或 BT),0.02% Triton X-100,0.01 mmol/L FMN,3 mmol/L NADH,50 mmol/L 葡萄糖,0.5 U 葡萄糖脱水酶,适量粗酶液,不同时间取 0.1 mL,等体积乙酸乙酯抽提,取有机相进行 HPLC 检测,并定量测定相应的产物含量.

1.6 菌株脱硫活性测定

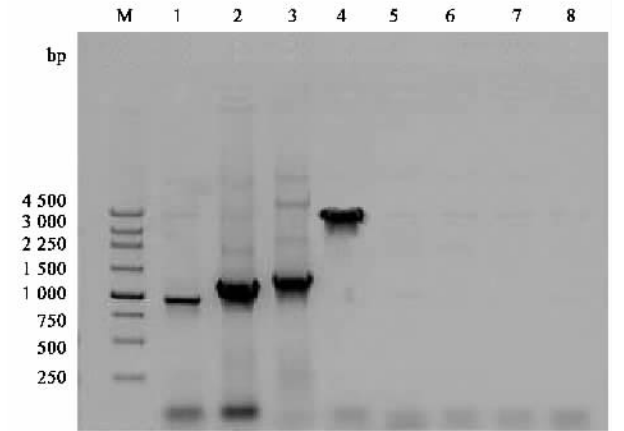
将各工程菌及野生型 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 和 *Gordonia* sp. C-6 分别接种于以 DBT 为唯一硫源的 BSM 培养基中,37℃ 恒温摇床(200 r/min)培养 5 d 后,取 1 mL 培养基,用等体积乙酸乙酯抽提,取有机相进行 HPLC(Agilent HP1100)检测,并定量测定 2-HBP 含量.色谱柱: Eclipse XDB-C18,5 μm ,4.6 $\times$ 150 mm;流动相: 甲醇/水 = 80/20;流速: 1.0 mL/min;检测波长:245 nm.

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建

Rhodococcus-E. coli 穿梭载体 pRHK1 由一个源于 *Rhodococcus rhodochrous* IFO 3338 的隐蔽性质粒 pRC4 和一个源于 *E. coli* 带有卡那霉素抗性基因的质粒 pHSG298 组成,用于在 *Gordonia* sp. C-6 中表达 DBT 降解的相关基因.DBT 脱硫酶基因 *dszA*、*dszB*、*dszC* 和 *dszABC* 的 PCR 产物经回收纯化、*Xba* I 和 *EcoR* I 双酶切、再回收纯化后与经相同酶切的 pRHK1 相连接,构建表达载体 pRA、pRB、pRC 和 pRABC.转化 *E. coli* DH5 α 后在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性转化子,获得克隆菌株 *E. coli* DH5 α -pRA、*E. coli* DH5 α -pRB、*E. coli* DH5 α -pRC 和 *E. coli* DH5 α -pRABC,提取质粒 pRA、pRB、pRC 和 pRABC 进行 PCR 鉴定(见图 1).结果表明在穿梭载

体 pRHK1 中插入的外源片段大小与目的片段相符,测序结果证明目的序列 *dszA*、*dszB*、*dszC* 和 *dszABC* 已正确插入到表达载体 pRHK1 上.



M 为 250 bp DNA ladder marker; 1 为 *dszA*; 2 为 *dszB*; 3 为 *dszC*; 4 为 *dszABC*; 5 ~ 8 为 1 ~ 4 的空白对照
图 1 质粒 pRA、pRB、pRC 和 pRABC 的 PCR 鉴定
Fig.1 Verification of plasmids pRA, pRB, pRC and pRABC by PCR

2.2 工程菌株的构建

分别用重组质粒 pRA、pRB、pRC 和 pRABC 转化戈登氏菌 *Gordonia* sp. C-6 感受态细胞,在含有卡那霉素 LB 平板上筛选阳性转化子.获得工程菌 *Gordonia* sp. CRA、*Gordonia* sp. CRB、*Gordonia* sp. CRC 和 *Gordonia* sp. CRABC.提取 4 株工程菌的质粒进行 PCR 鉴定(图略).结果表明,重组质粒 pRA、pRB、pRC 和 pRABC 被成功的转入 *Gordonia* sp. C-6 菌株中.

2.3 工程菌株的生长特性分析

将各工程菌的单菌落接种于 5mL 含有卡那霉素的 BSM 培养基中,30℃ 振荡(200 r/min)培养至 D_{630} 至 1.0 左右,将此种子液以 4% 的接种量接种至 100 mL 含有卡那霉素和 DBT 的 BSM 培养基中,30℃ 振荡(200 r/min)培养 5 d.各工程菌的生长和降解 DBT 的情况如图 2 所示.从中可以看出,带有 *dszA* 的 *Gordonia* sp. CRA 和带有 *dszB* 的 *Gordonia* sp. CRB 在以 DBT 为唯一硫源的培养基中几乎不生长,无法降解 DBT;而带有 *dszC* 的 *Gordonia* sp. CRC 同带有完整 *dszABC* 的 *Gordonia* sp. CRABC 一样,在以 DBT 为唯一硫源的培养基中生长良好,亦能降解大部分 DBT.这有可能因为 *dszC* 编码 DBT 单加氧酶,催化 DBT 降解的前两步反应,经 DBT 亚砷生成 DBT 砷,是整个反应的关键酶.并且在抗生素的选择压力下,传代 5 次后 pRA、pRB 和 pRC 能在 *Gordonia* sp.

C-6 中稳定的存在; pRABC 在传代 3 次后逐渐丢失.

将工程菌 *Gordonia* sp. CRC 和 *Gordonia* sp. CRABC 传代 2 次后, 菌液以 4% 的接种量接种至 100mL 含有卡那霉素和 DBT 的 BSM 培养基中 30℃ 振荡(200 r/min)培养, 每隔 2 h 取样测定其在 630 nm 下的吸光度, 绘制出工程菌 *Gordonia* sp. CRC 和 *Gordonia* sp. CRABC 的生长曲线(见图 3). 从图 3 中可以看出, 这 2 株工程菌在以 DBT 为唯一硫源的培养基中生长, 最后达到的菌浓度相仿, 但 *Gordonia* sp. CRABC 生长较快, 在 8 h 左右进入对数生长期, 在 25 h 时菌体的生长就能达到最大量; 而 *Gordonia* sp. CRC 则在 13h 左右才进入对数生长期, 需要 38 h 时才能达到最大生长量.

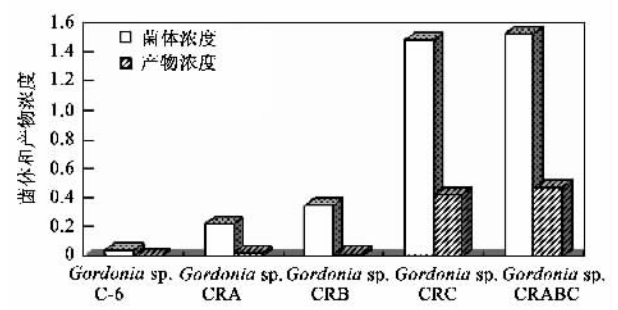


图 2 工程菌及 *Gordonia* sp. C-6 生长细胞对 DBT 降解的分析
Fig.2 Desulfurization of DBT by recombinant strains and *Gordonia* sp. C-6

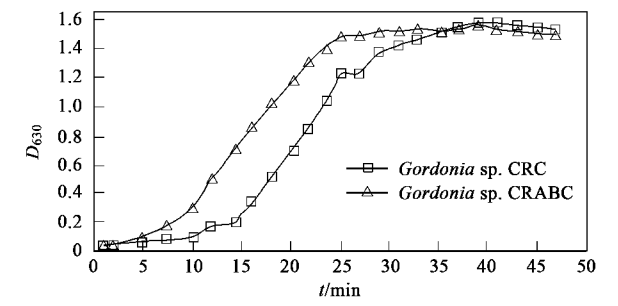


图 3 工程菌在 BSM(DBT)培养基中的生长曲线
Fig.3 Growth curves of recombinant strains in BSM culture medium with DBT as the sole sulfur source

2.4 工程菌株无细胞抽提物酶活性分析

将 *Gordonia* sp. C-6 和 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 及工程菌的单菌落分别接种于 5 mL LB 培养基(工程菌的培养基中加入卡那霉素)中 30℃ 振荡(200 r/min)培养至 D_{630} 为 1.0 左右, 将此种子液以 2% 的接种量接种至 100 mL LB 培养基(工程菌的培养基中加入卡那霉素)中 30℃ 振荡(200 r/min)培养至 D_{630} 为 1.2 左右, 4℃ 5 000 r/min 离心收集菌体, 用

生理盐水洗涤菌体 3 次后将菌体重悬于 1/5 体积的磷酸缓冲液中, 超声波破碎菌体, 测定菌体总蛋白量. 取 500 L 工程菌的无细胞抽提物测定各个工程菌的酶活, 反应时间为 3 h, 测定结果见表 3, 从中可以看出, 工程菌 *Gordonia* sp. CRA、*Gordonia* sp. CRB 和 *Gordonia* sp. CRC 的无细胞抽提物的酶活力(以 DCW 计)分别达到了 $76.8 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ 、 $51.6 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ 和 $62.4 \mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$, 是红球菌 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 的 2.5 倍左右, 且各工程菌株 BT 脱硫酶的活性不受影响.

2.5 工程菌株脱硫活性分析

在 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 降解 DBT 的“4S”途径中, DBT 单加氧酶(DszC)催化连续两步单加氧反应将 DBT 经 DBT 亚砷(DBTO)转化为 DBT 砷(DBTO₂); DBT 砷单加氧酶(DszA)催化 DBTO₂ 转化为 DBT 亚磺酸盐(HBPSi); 最后, DszB 催化水分子亲核攻击亚磺酸的 C—S 键生成 2-HBP. 将 DszA 作用的底物 DBTO₂ 作为硫源, 培养各工程菌, 进一步验证 DszC 对整个脱硫反应的重要性, 结果见表 4. 结果表明, 野生型 *Gordonia* sp. C-6 不能脱除 DBT 中的硫, 但能利用部分 DBTO₂, 生成少量 2-HBP; 表达 DszC 的 *Gordonia* sp. CRC 能降解 DBT; 表达 DszA 的 *Gordonia* sp. CRA 能利用 DBTO₂, 但仍无法生成大量 2-HBP, 若同时加入 *Gordonia* sp. CRB, 则 DBTO₂ 几乎完全被降解为 2-HBP, 这也从另一方面证实了各重组质粒已成功转入 *Gordonia* sp. C-6 中并表达. 降解 BT 的野生型 *Gordonia* sp. C-6 不能利用 DBT 为硫源生长, 表达 DszC 的 *Gordonia* sp. CRC 却长势良好, 且生成大量 2-HBP, 说明 *Gordonia* sp. C-6 中没有同 DszC 一样以 DBT 为底物的酶, 而 DszA, DszB 则与 *Gordonia* sp. C-6 中相应的酶的底物特异性相似, 使其能利用 DBTO₂, 生成 2-HBP.

菌株	DBT 脱硫酶活性 / $\mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$			BT 脱硫活性 / $\mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$
	DszA	DszB	DszC	
<i>Gordonia</i> sp. CRA	76.8	—	—	23.5
<i>Gordonia</i> sp. CRB	—	51.6	—	23.3
<i>Gordonia</i> sp. CRC	—	—	62.4	22.8
<i>Gordonia</i> sp. CRABC	62.4	36.7	48.2	26.4
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DS-3	35.2	21.3	25.5	—
<i>Gordonia</i> sp. C-6	—	—	—	24.1

3 讨论

将 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 的 *dszA*、*dszB*、*dszC* 和 *dszABC* 基因分别转入 BT 降解菌株 *Gordonia* sp. C-6 中,构建了工程菌株 *Gordonia* sp. CRA、*Gordonia* sp. CRB、*Gordonia* sp. CRC 和 *Gordonia* sp. CRABC. 其中, *Gordonia* sp. CRC 和 *Gordonia* sp. CRABC 能以 DBT 为硫源生长,其他菌株无法利用 DBT.这可能是由于 *DszC* 负责识别 DBT,催化 DBT 经 DBTO 生成 DBTO₂,是整个脱硫反应中负责底物识别的关键酶,且与 *Gordonia* sp. C-6 中 BT 降解途径中相应的酶底物特异性不同,后者无法利用 DBT;而 *DszA* 和 *DszB* 与 *Gordonia* sp. C-6 中 BT 降解途径中相应的酶同源性较高,后者能代替前者完成 DBTO₂ 到 2-HBP 的转化.且转入的质粒不影响工程菌株对 BT 中硫的脱除(见表 4).

表 4 各工程菌对不同硫源中硫的脱除情况/mmol·L⁻¹
Table 4 Desulfurization of different organosulfur compounds by recombinant strains/mmol·L⁻¹

菌株	硫源 ¹⁾		
	DBT	DBTO ₂	BT
<i>Gordonia</i> sp. C-6	0	0.12	0.36
<i>Gordonia</i> sp. CRC	0.42	0.38	0.42
<i>Gordonia</i> sp. CRABC	0.46	0.43	0.45
<i>Gordonia</i> sp. CRA	0	0.11	0.34
<i>Gordonia</i> sp. CRA + CRB	0	0.48	0.38

1) 每种硫源的初始浓度均为 0.5 mmol/L,表中为脱硫产物浓度

在 *Gordonia* sp. CRC 细胞中,重组质粒 pRC 在以 DBT 为硫源培养的菌株中稳定存在.10 代后,100% 的存活细胞含有重组质粒,降解 DBT 的活性也没有减少.但 *Gordonia* sp. CRABC 中的重组质粒 pRABC 在 3 代后开始逐渐丢失,至第 6 代时完全丢失,菌株不再能以 DBT 为唯一硫源生长.这可能是由于重组质粒 pRC 的大小为 6.61 kb,而 pRABC 足有 9.06 kb.后者分子量过大,降低了质粒的稳定性,使其更容易丢失.在这方面,对于以后的工业应用,显然 *Gordonia* sp. CRC 比 *Gordonia* sp. CRABC 更具优势.

综上所述,DBT 和 BT 是普通脱硫方法难以去除,且在燃料油中含量较多的有机硫化物.微生物对它们的脱硫途径类似,但负责催化其脱硫前两步反应的 DBT 单加氧酶和 BT 单加氧酶的底物特异性不同,不能互相取代,是整个途径中负责底物识别的关键酶;而负责催化后两步反应的酶功能相似.这些都为以后 BT 专一性脱硫基因的识别、BT 脱硫酶的功

能鉴定和工程菌株的构建奠定了基础.

4 结论

(1) 构建了工程菌株 *Gordonia* sp. CRA、*Gordonia* sp. CRB、*Gordonia* sp. CRC.其 DBT 降解相关酶活性(以 DCW 计)分别为 76.8 μmol·(g·h)⁻¹ (*DszA*)、51.6 μmol·(g·h)⁻¹ (*DszB*) 和 62.4 μmol·(g·h)⁻¹ (*DszC*),比原始菌株 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 的 35.2 μmol·(g·h)⁻¹ (*DszA*)、21.3 μmol·(g·h)⁻¹ (*DszB*)和 25.5 μmol/g DCW/h(*DszC*)提高了 1.5 倍左右.

(2) 表达 *DszC* 的重组菌株 *Gordonia* sp. CRC 能以 DBT 为硫源生长,生成 2-HBP,其降解率为 84% 左右.而 *Gordonia* sp. CRA 和 *Gordonia* sp. CRB 无法在以 DBT 为唯一硫源的培养基中生长.

(3) 原始菌株 *Rhodococcus erythropolis* DS-3 对 DBT 的最大脱硫速率为 24 μmol·(g·h)⁻¹,重组菌株 *Gordonia* sp. CRC 的最大脱硫速率为 18 μmol·(g·h)⁻¹,是原始菌株的 75%.证明催化 BT 和 DBT 前两步脱硫反应的 BT 单加氧酶和 DBT 单加氧酶(*DszC*)是负责底物识别的关键酶,催化 BT 和 DBT 后两步脱硫反应的酶功能相似,具有一定的同源性.

参考文献:

[1] Gray K A, Mrachkoyz G T, Squiresy C H. Bidesulfurization of fossil fuels [J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(3):229-235.

[2] Gupta N, Roychoudhury P K, Deb J K. Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 66: 356-366.

[3] Armstrong S M, Sankey B M, Voordouw G, et al. Evaluation of sulfate reducing bacteria for desulfurizing bitumens or its fractions [J]. Fuel, 1997, 76:223-227.

[4] Atlas R M, Petroleum Microbiology [M]. New York: Macmillan Publishing, 1994.24-128.

[5] Tao F, Yu B, Xu P. Bidesulfurization in Biphasic Systems Containing Organic Solvents [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 27: 4604-4609.

[6] Li G Q, Ma T, Li S S, et al. Improvement of dibenzothiophene desulfurization activity by removing the gene overlap in the *dsz* operon [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(4): 849-854.

[7] Watanabe K, Noda K, Maruhashi K. Desulfurization of light gas oil by a novel recombinant strain from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Biotechnol Lett, 2002, 24: 897-903.

[8] John J, Kilbane I I. Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17: 305-314.

[9] Soleimani M, Bassi A, Margaritis A. Bidesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels [J]. Biotechnology

- Advances, 2007, **25**: 570-596.
- [10] Li G Q, Li S S, Zhang M L, *et al.* Genetic rearrangement strategy for optimizing the dibenzothiophene biodesulfurization pathway in *Rhodococcus erythropolis* [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, **74** (4): 971-976.
- [11] Gilbert S C, Morton J, Buchanan S, *et al.* Isolation of a unique benzothiophene-desulphurizing bacterium, *Gordona* sp. strain 213E (NCIMB 40816), and characterization of the desulphurization pathway [J]. Microbiology, 1998, **144**: 2545-2553.
- [12] Matsui T, Hirasawa K, Konishi J, *et al.* Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophene and alkylated benzothiophene by recombinant *Rhodococcus* sp. strain T09 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **56**: 196-200.
- [13] Kropp K G, Goncalves J A, Andersson J T, *et al.* Microbially mediated formation of benzonaphthothiophenes from benzo [b] thiophenes [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**(10): 3624-3631.
- [14] Tanaka Y, Onaka T, Matsui T, *et al.* Desulfurization of benzothiophene by the gram-negative bacterium, *Sinorhizobium* sp. KT55 [J]. Current Microbiology, 2001, **43**: 187-191.
- [15] Li W, Zhang Y, Wang M D, *et al.* Biodesulfurization of dibenzothiophene and other organic sulfur compounds by a newly isolated *Mycobacterium* strain ZD-M2 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, **247**: 45-50.
- [16] Alves L, Salgueiro R, Rodrigues C, *et al.* Desulfurization of dibenzothiophene, benzothiophene, and other thiophene analogs by a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* strain 1B [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2005, **120**(3): 199-208.
- [17] Yoshitaka I, Shinya K, Toshiki F, *et al.* Thermophilic biodesulfurization of various heterocyclic sulfur compounds and crude straight-run light gas oil fraction by a newly isolated strain *Mycobacterium phlei* WU-0103 [J]. Current Microbiology, 2005, **50**: 63-70.
- [18] Wang P, Krawiec S. Kinetic Analyses of desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* in batch and fed-batch cultures [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, **62** (5): 1670-1675.
- [19] Ohshiro T, Izumi Y. Purification, characterization and crystallization of enzymes for dibenzothiophene desulfurization [J]. Bioseparation, 2000, **9**(3): 185-188.
- [20] Norikazu N, Toshiyuki M, Takashi O, *et al.* A novel enzyme, 2'-hydroxybiphenyl-2-sulfinate desulfinase (DszB), from a dibenzothiophene- desulfurizing bacterium *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1: gene overexpression and enzyme characterization [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, **1598**: 122-130.
- [21] 李国强, 李京浩, 马挺, 等. 苯并噻吩脱硫菌株的筛选及脱硫活性研究 [J]. 环境科学, 2006, 27(6): 1181-1185.
- [22] Hirasawa K, Ishii Y, Kobayashi M, *et al.* Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, **65**: 239-246.
- [23] 马挺, 刘健, 佟明友, 等. 红球菌 DS-3 脱除二苯并噻吩中有机硫的性能初探 [J]. 微生物学报, 2002, **42**(6): 726-731.
- [24] Denome S A, Olson E S, Young K D. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. IGTS8 [J]. Appl Environ Microb, 1993, **59**: 2837-2843.
- [25] Hashimoto Y, Nishiyama M, Yu F, *et al.* Development of a host-vector system in a *Rhodococcus* strain and its use for expression of the cloned nitrile hydratase gene cluster [J]. Gen Microbiol, 1992, **138**: 1003-1010.