

## 一株红球菌脱硫菌株脱硫特性的研究

马翠卿<sup>a</sup> 佟明友<sup>b</sup> 于 波<sup>a</sup> 曾义勇<sup>a</sup> 方向晨<sup>b</sup> 冯进辉<sup>a</sup>  
张 全<sup>b</sup> 李福利<sup>a</sup> 许 平<sup>\*, a\*</sup>

(<sup>a</sup> 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(<sup>b</sup> 中国石油化工股份有限公司抚顺石油化工研究院 抚顺 113001)

**摘要** 从炼油厂污水排放口取得的土样中筛选到一株能降解二苯并噻吩(DBT)的菌株,用 GC/MS 方法,证明其降解 DBT 走硫专一脱除途径,即“4S 途径”。该菌株被命名为 SDUZAWQ,用微生物生理生化实验及 16S rDNA 序列分析初步鉴定为红球菌属(*Rhodococcus* sp.)。实验结果表明,红球菌 SDUZAWQ 可有效降解苯并噻吩(BT)和 DBT 及其甲基衍生物。在 2 d 内,BT 与 DBT 可同时完全降解,0.5 mmol L<sup>-1</sup> 的 BT 在 1 d 内可降解掉 86%,降解速度高于 DBT 的降解。5-MBT 的降解率也高于 4,6-DMDBT 和 4-MDBT。4-MDBT 较 4,6-DMDBT 更难降解,在 2 d 内,红球菌 SDUZAWQ 可降解 62% 的 4,6-DMDBT,而相同条件下,4-MDBT 仅能被降解 36%。

**关键词** 二苯并噻吩(DBT),苯并噻吩(BT),脱有机硫,代谢途径

## Biodesulfurization of Organic Sulfur by a Newly Isolated *Rhodococcus* sp. Strain SDUZAWQ

MA, Cui-Qing<sup>a</sup> TONG, Ming-You<sup>b</sup> YU, Bo<sup>a</sup> ZENG, Yi-Yong<sup>a</sup> FANG, Xiang-Chen<sup>b</sup>  
FENG, Jin-Hui<sup>a</sup> ZHANG, Quan<sup>b</sup> LI, Fu-Li<sup>a</sup> XU, Ping<sup>\*, a\*</sup>

(<sup>a</sup> State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

(<sup>b</sup> Fushun Research Institute of Petroleum and Petrochemicals, SINOPEC, Fushun 113001)

**Abstract** A strain named SDUZAWQ was isolated from soil contaminated by waste water of a refinery. Using GC/MS method, the strain was determined to biodesulfurize dibenzothiophene (DBT) via a sulfur-specific pathway, as so-called “4S pathway”. This culture was identified as *Rhodococcus* sp. based on a partial 16S rDNA gene sequence and physiological and biochemical methods. *Rhodococcus* sp. SDUZAWQ can effectively desulfurize benzo[*b*]thiophene (BT), DBT and their derivatives. In two days, BT and DBT were degraded completely and 86% of BT was desulfurized in 24 h with the degrading rate being higher than that of DBT. The rate of 5-methyl-benzo[*b*]thiophene (5-MBT) was also higher than those of DBT derivatives, 4,6-dimethyldibenzothiophene (4,6-DMDBT) and 4-methyldibenzothiophene (4-MDBT). The degradation of 4-MDBT was more refractory than that of 4,6-DMDBT. In 48 h, 62% of 4,6-DMDBT was degraded, but only 36% of 4-MDBT was desulfurized under the same conditions.

**Keywords** dibenzothiophene, benzo[*b*]thiophene, biodesulfurization, metabolic pathway

化石燃料煤和石油中所含有的有机硫和无机硫是环境的重要污染源,这些硫化物燃烧时排放出大量的二氧化硫等毒性气体,由此造成大面积酸雨会严重污染大气和水源,破

坏生态平衡,危害人类生存。多年的持续开发使得现存含硫量低的化石燃料越来越少。随着能源危机的逐步加剧,高硫化石燃料的开采成为必然。而高硫化石燃料必须预先经过脱

\* E-mail: pingxu@sdu.edu.cn

Received December 8, 2003; revised April 5, 2004; accepted June 7, 2004.

国家自然科学基金项目 (Nos. 29977011, 30270045)、中国石油化工股份有限公司重点项目 (No. 1010807)、国家十五科技攻关项目 (No. 2001BA707B01) 资助。

硫处理才能进一步使用. 物理的和化学的脱硫方法成本巨大, 而微生物脱硫工艺由于操作压力、温度低, 运转成本少, 具有广阔的前景. 化石燃料中含有的有机硫化物成分复杂, 大部分是杂环化合物, 其中的 C—S 化学共价键十分牢固, 用一般常规的物理和化学方法很难有效地除去有些杂环中的有机硫. 二苯并噻吩 (Dibenzothiophene, 简称 DBT) 是化石燃料中含量高、较难降解的有机硫化物的典型代表<sup>[1]</sup>, 研究者将它作为脱有机硫模式化合物来研究. 目前已经确定的微生物降解 DBT 的途径中, 有些微生物仅打开 C—S 键, 而不打开 C—C 键, 以特有的酶系统仅将硫从杂环中脱下来, 这种不损失燃料热值的硫专一脱除途径在国际上引起了广泛的关注.

近 10 年来国际上对微生物脱有机硫的研究十分活跃, 已经取得了一些重要的研究成果<sup>[2~4]</sup>. 重视该领域的各国研究者, 均首先努力获取自己有价值、具有知识产权的菌种. 本文从筛选菌种开始, 将 DBT 作为模式化合物, 对筛选到的具有优良特性的可用于燃油脱硫的一株菌株进行了有关降解 DBT 代谢途径和脱硫特性研究, 为将该菌株推向实际应用奠定了基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 化学试剂

有机硫化物 DBT、二苯并噻吩砜 (Dibenzothiophene-5,5-dioxide, DBTO<sub>2</sub>), 4,6-二甲基二苯并噻吩 (4,6-Dimethyldibenzothiophene, 4,6-DMDBT), 4-甲基二苯并噻吩 (4-Methyldibenzothiophene, 4-MDBT), 及 2-羟基联苯 (2-Hydroxybiphenyl, 2-HBP) 分别购自 Sigma 公司和 Aldrich 公司. 苯并噻吩 (Benzothiophene, BT) 购自 Acros 公司. 5-甲基苯并噻吩 (5-Methylbenzothiophene, 5-MBT) 购自 Lancaster Synthesis 公司. 这些化合物分别用 *N,N*-二甲基甲酰胺 (*N,N*-Dimethylformamide, DMF) 配制成 50 mmol L<sup>-1</sup> 的贮备液, 其它化学试剂为国产, 分析纯.

### 1.2 培养基

1. 基本无机盐培养基 BSM (Basal Salts Medium): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.44 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.57 g, NH<sub>4</sub>Cl 2 g, MgCl<sub>2</sub> 0.2 g, 甘油 2 g, 微量元素混合液 1 mL, 溶于 1 L 蒸馏水中.

2. 微量元素混合液: CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 4 g, ZnCl<sub>2</sub> 2 g, CaCl<sub>2</sub> 40 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.5 g, NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 2 g; FeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 40 g, AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 8 g, 溶于 1 L 蒸馏水中.

3. 液体选择培养基 BSDM: BSM 加 0.5 mmol L<sup>-1</sup> DBT 或其它有机硫硫化物为硫源; BSSM: BSM 加 0.5 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作无机硫源.

### 1.3 脱硫菌株的筛选

从炼油厂污水排放口等地取得土样, 用 BSSM 浸泡过夜, 于 30 ℃, 200 r/min 振荡培养 48 h. 培养液离心去除土样后离心得菌体, 0.85 % 生理盐水洗涤菌体两次, 悬浮于 pH

7.0 磷酸钾缓冲液中. 将此菌液 1 mL 加入到 BSDM 试管中 30 ℃ 培养 48 h, 转入新鲜的 BSDM 中继续培养 4 d 以上用 BSDM 管作对照, 有明显生长的, 将此管的培养液稀释培养挑出单菌落, 扩大培养, 得到能降解 DBT 的菌株.

### 1.4 16S rDNA 序列分析

以菌株基因组 DNA 为模板, 扩增得到近全长的 16S rDNA. PCR 产物测序后在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 使用 BLASTN 程序进行进一步的分析.

### 1.5 菌株对 DBT, BT 及衍生物等有机硫的降解及测定

为了考察能专一性降解模式化合物 DBT 菌株对其他难降解的杂环化合物中的有机硫的脱除能力, 我们用 BSM 作为基础培养基, 分别加各种有机硫作为唯一硫源, 以不加硫源的培养物作为对照考察菌体的生长情况. 取培养液, 使用 10 % HCl 调节 pH 2 后, 加入等体积乙酸乙酯萃取, 30 ℃ 震荡 30 min, 离心取萃取液经 N<sub>2</sub> 吹干浓缩大约 100 倍后用于检测.

使用 Varian CP3380 气相色谱仪; GCD1800C 气质联用仪, 美国惠普公司. 气相色谱条件: 使用甲基硅酮毛细管柱 (15 m × 0.32 mm), 柱温 200 ℃, 进样器温度 280 ℃, 检测器为 FID, 温度 280 ℃. GC-MS 条件: 色谱柱为 DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, Calif., 50 m × 0.32 mm), 接口温度 250 ℃, 离子源温度 160 ℃, 电离方式 EI, 扫描质量范围: 29 ~ 450 amu.

### 1.6 脱硫活力测定

以单位时间内一定量的菌体降解 DBT 产生 2-HBP 的量来衡量. 取培养液, 离心, 用 pH 7.0 磷酸缓冲液洗涤, 稀释细胞到 1.8 g/L, 加入 0.5 mmol L<sup>-1</sup> 的 DBT, 反应体积为 5 mL, 置于 30 ℃ 水浴恒温振荡器中, 180 r/min 震荡反应 1 h 后, 用 HPLC 测定所产生的 2-HBP 浓度.

Agilent 1100 Series 高压液相仪, 美国安捷伦公司. HPLC 条件: 可变波长紫外检测器 (VWD) 280 nm 检测, 使用 Hypersil ODS 柱子 (填料颗粒 5 μm, 柱长 100 mm, 直径 4.6 μm). 测定条件为: 流动相为 80:20 的甲醇和水, 流速为 0.7 mL min<sup>-1</sup>, 柱子恒温 30 ℃.

### 1.7 油品脱硫实验和总硫含量测定

300 mL 三角瓶装 50 mL 油水混合物 (油水比为 1/9, 水相为 20 mmol L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液, pH 7.0), 于 30 ℃, 180 r/min 的摇床中进行脱硫<sup>[5~8]</sup>. 然后用 WK-2D 型库仑综合分析仪 (江苏江分电分析仪器有限公司) 测定柴油中的总硫含量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 筛选结果

按前述的方法, 筛选得到一株能降解 DBT 的菌株, 命名为 SDUZAWQ. 参照《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》(Ninth Edition, 1994) 对菌株 SDUZAWQ 作了初步鉴定, 结果如下:

1. 形态特征:为革兰氏阳性菌,形态有杆状和弯杆状.营养肉汤培养基中,形成表面膜,培养液保持澄清.在牛肉膏蛋白胨固体培养基上,生长中等,黄油状黄色,菌落平坦,不透明,凸起,有光泽,不产生水溶性色素,边缘整齐.

2. 生理生化特征如表 1 所示.

表 1 SDUZAWQ 菌株的生理生化特征<sup>a</sup>

Table 1 Biochemical and physiological characterization of strain SDUZAWQ

生化特征	结果
葡萄糖氧化产酸	+
葡萄糖氧化发酵	-
运动	-
生长条件	好氧
产气	-
水解淀粉	-
过氧化氢酶	+
硝酸盐还原	+
甲基红	-

<sup>a</sup> + 代表阳性, - 代表阴性.

3. 16S rDNA 鉴定:在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 使用 BLASTN 程序比对,对给出的序列使用 Vector NTI 软件制作进化树,SDUZAWQ 和红球菌位于同一个分支上,所以初步鉴定 SDUZAWQ 为红球菌属.在 Genbank 中的 16S rDNA 序列检索号为 AY077846.

## 2.2 红球菌 SDUZAWQ 降解 DBT 的途径

如图 1 所示,红球菌 SDUZAWQ 培养液经萃取用 GC/MS 的分析,气相色谱图有三个明显的色谱峰.色谱图中 3.697 min 峰的质谱图显示此峰的分子量为 170,各  $m/z$  分别为 170, 141, 115, 89, 77, 63,对照标准的质谱图可以确定为 2-HBP.同样道理,色谱图中 5.35 min 峰的主要的  $m/z$  分别为 184, 152, 139, 92,此峰为 DBT(分子量 184).色谱图中 7.05 min 峰的主要的  $m/z$  分别为:216, 187, 168, 139, 104, 63,此峰为 DBTO<sub>2</sub>(分子量 216).

综合许多文献已经报道的研究结果<sup>[9-13]</sup>,微生物对有机硫 DBT 专一性代谢可能存在的途径如图 2 所示,上述色质联用结果说明在生长条件下,途径 DBT → DBTO → DBTO<sub>2</sub> → HBPSi → 2-HBP 是存在的.DBTO<sub>2</sub> 在色谱图中的峰很明显,说明假想的代谢中间物的存在并部分证实了所谓的“4S”代谢途径.

## 2.3 2-HBP 为降解 DBT 的最终产物

2-HBP 是否为红球菌 SDUZAWQ 降解 DBT 的最终产物,2-HBP 能否作为潜在的碳源,通过下列实验证明.在以 2-HBP 为唯一碳源的 BSM 加上 1 mmol L<sup>-1</sup> 的硫酸钠培养基上培养,间隔一定时间取样,测浊度,如图 3 所示.

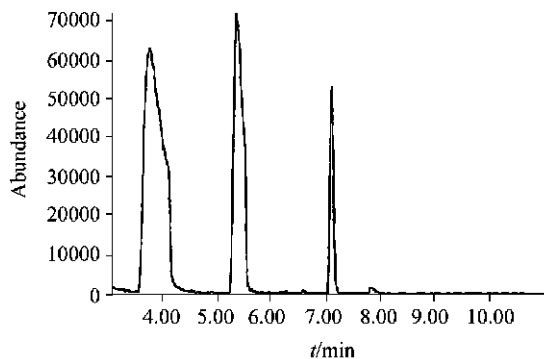


图 1 SDUZAWQ 培养液的色谱图

Figure 1 Profile of chromatography of SDUZAWQ's cultivation extraction

从图 3 可以看出,以 2-HBP 为唯一碳源培养基上菌株不生长,而加了 0.2% 甘油才生长,说明 2-HBP 不能成为潜在的碳源,2-HBP 是该菌株降解 DBT 的终产物.另外,即使加了甘油,菌体生长也不好( $A_{620\text{ nm}}$  仅 2.5),这是因为 2-HBP 对菌体生长有抑制作用,这与 Ohshiro 等<sup>[14]</sup>在红平红球菌(*R. erythropolis*) D-1 中所发现的现象一致.

## 2.4 红球菌 SDUZAWQ 对 DBT 类似物等有机硫的降解

燃油中的有机硫主要为噻吩类.除设备和操作成本较大以外,HDS 工艺对噻吩类有机硫的专一性脱除有一定难度,对侧链为甲基-(Methyl-)、烷基基-(Alkyl-)的噻吩类和苯并噻吩类有机硫脱除难度较大<sup>[4,5,14-16]</sup>.生物脱有机硫(Biodesulfurization, BDS)有 HDS 无可比拟的优势主要在于其专一性的脱有机硫能力.据报道,采用 BDS 可使油品硫含量最终指标低于 HDS 工艺 10 倍,如从 HDS 的 0.1% 降至 BDS 的 0.01% 的硫含量<sup>[6,17,18]</sup>.本研究为了考察所筛选到的专一性脱有机硫红球菌 SDUZAWQ 脱除有代表性的噻吩类有机硫能力,用模式化合物 DBT 作对照,同时进行了几种能收集到较难降解的有机硫化合物为唯一硫源的生长体系脱硫实验.

至今,已有许多主要为红球菌等微生物被发现具有专一性脱硫功能,但只有较少的报道涉及到 BT 的降解<sup>[19-21]</sup>,涉及到能同时降解 BT 与 DBT 的微生物更少见报道<sup>[17,22,23]</sup>.从图 4 可见,在 2 d 内,BT 与 DBT 可同时完全降解,0.5 mmol L<sup>-1</sup> 的 BT 在 1 d 内可降解掉 86%,降解速度高于 DBT 的降解.5-MBT 的降解率情况也高于 4,6-DMDBT 和 4-MDBT.4-MDBT 的降解较困难,要差于 4,6-DMDBT 的降解,在 2 d 内,红球菌 SDUZAWQ 可降解 62% 的 4,6-DMDBT,而相同条件下,4-MDBT 仅能被降解 36%.与文献报道不同的是,Tanaka 等<sup>[22]</sup>曾报道,*Rhodococcus* sp. KI462 在 1 d 可降解 0.1 mmol L<sup>-1</sup> 的 BT 的 40%,在 4 d 后,能大约降解掉 70% 的 BT,1-MDBT 和 4-MDBT 的降解率情况要高于 5-MBT 和 7-MT.这些结果说明,红球菌 SDUZAWQ 所含脱硫酶专一性可能与已报道的红球菌 *Rhodococcus* sp. KI462 和 *R. erythropolis* IGTS8 等脱硫微生物不一样.

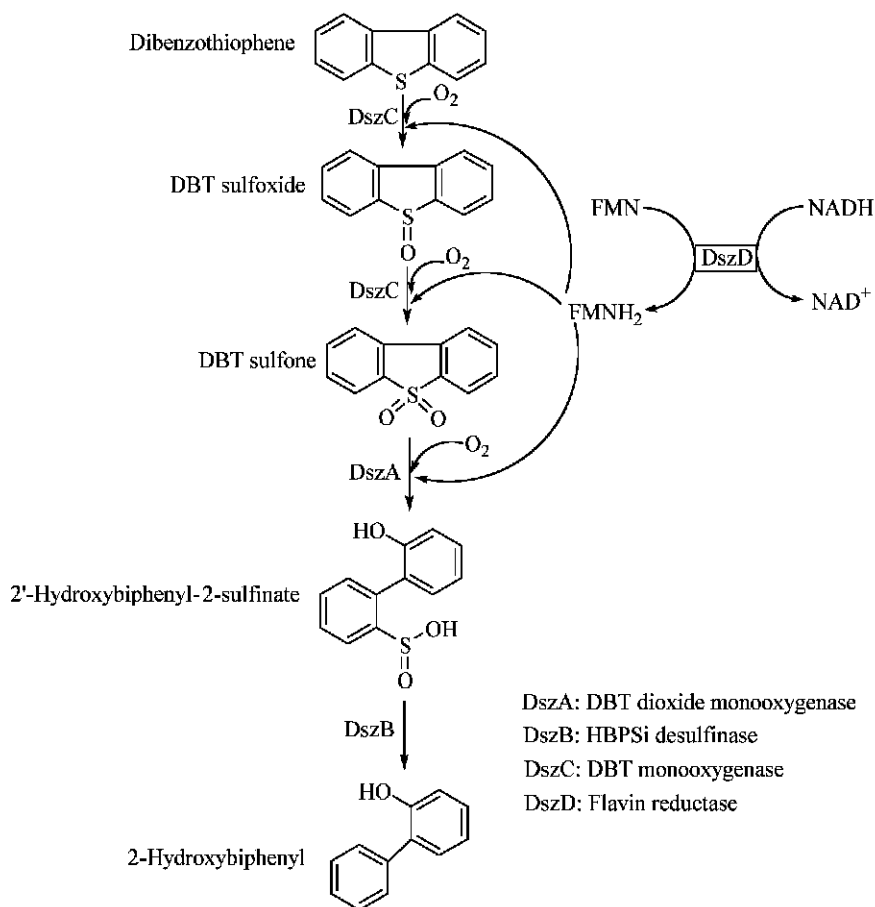


图2 微生物可能的 DBT 专一性代谢途径

Figure 2 Proposed sulfur-specific microbial metabolism pathway of DBT

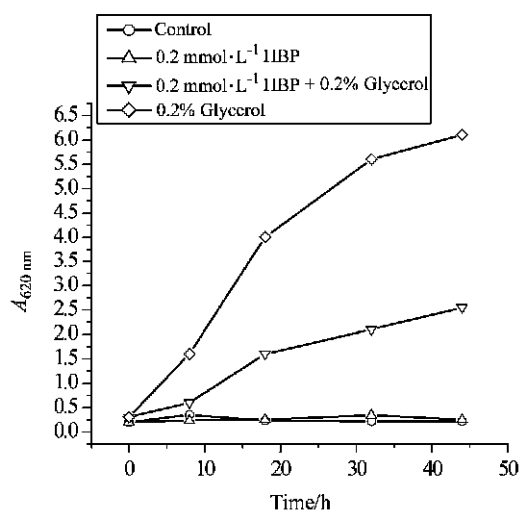


图3 红球菌 SDUZAWQ 在不同碳源培养基上生长情况

Control 为无碳源的 BSM 加 1 mmol L<sup>-1</sup> 硫酸钠的培养基Figure 3 Growth of *Rhodococcus* sp. SDUZAWQ cultivated on various carbon sources1 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added in non-carbon source BSM medium as control

## 2.5 无机硫对红球菌 SDUZAWQ 脱硫活力的影响

先前的初步研究结果发现红球菌 SDUZAWQ 对无机硫源不大敏感,为了进一步验证这一特点,我们进行了以下实验.在同样的培养条件,加入相同 0.2 mmol L<sup>-1</sup> 的 DBT 和不同浓度的 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,培养 40 h 后收集,测定细胞的脱硫活力.

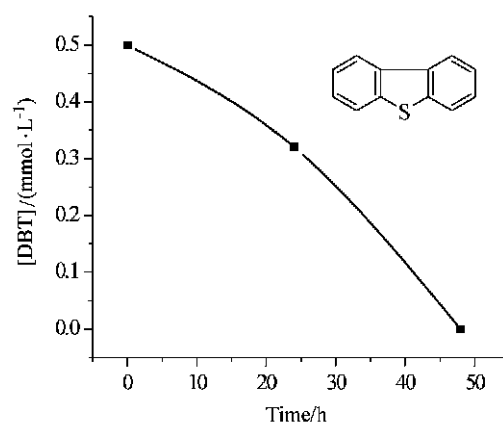


图4a 二苯并噻吩降解结果

Figure 4a Biodegradation of DBT

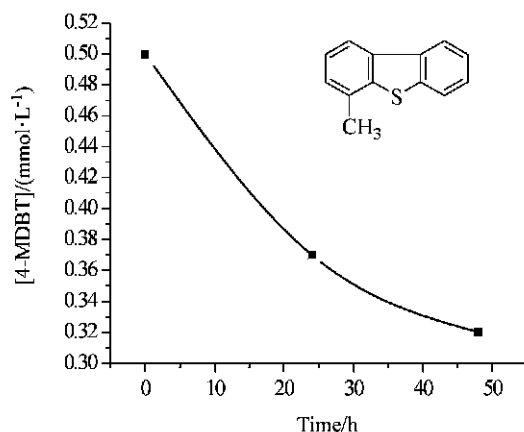


图 4b 4-甲基二苯并噻吩降解结果

Figure 4b Biodegradation of 4-MDBT

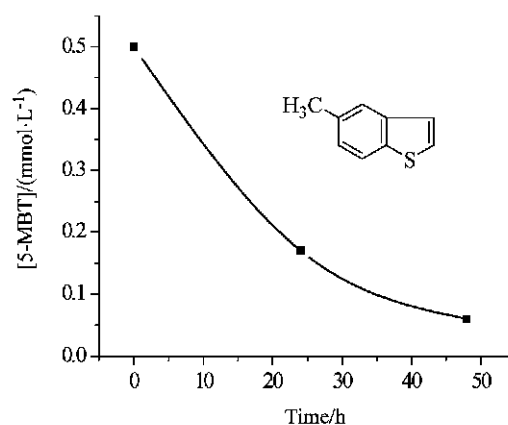


图 4e 5-甲基二苯并噻吩降解结果

Figure 4e Biodegradation of 5-MBT

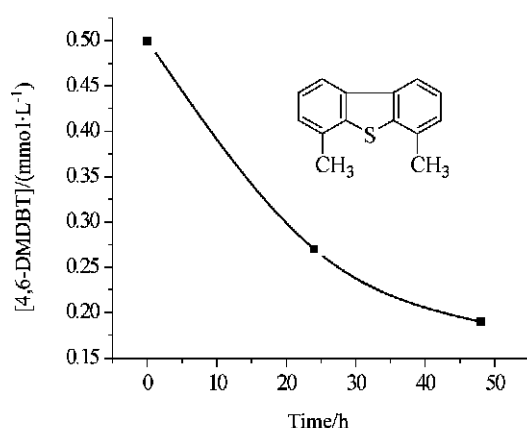


图 4c 4,6-二甲基二苯并噻吩降解结果

Figure 4c Biodegradation of 4,6-DMDBT

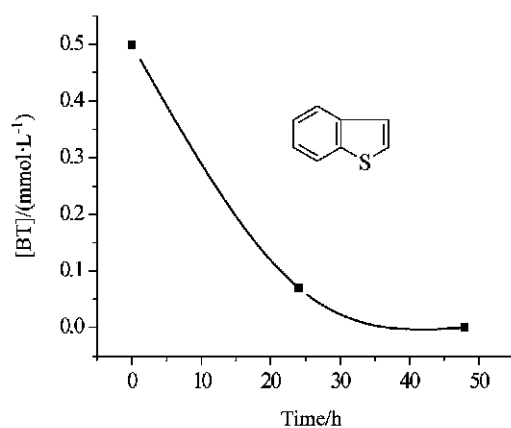
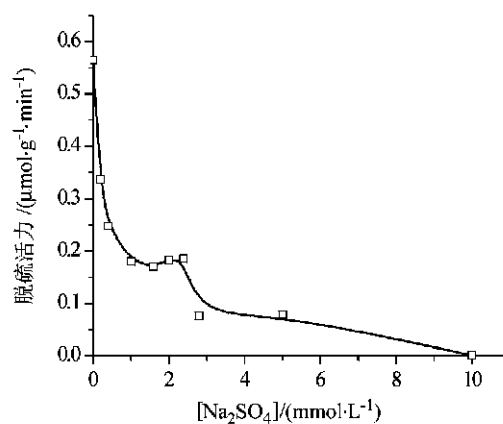


图 4d 苯并噻吩降解结果

Figure 4d Biodegradation of BT

如图 6 所示,虽然随着无机硫酸盐浓度的增大,红球菌 SDUZAWQ 的脱硫活力下降,但在硫酸盐在较大浓度  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  以后,细胞仍具脱硫活力.这一现象表明,硫酸盐的存在虽然会阻遏红球菌 SDUZAWQ 脱硫酶系活力,但与文献报道不同的是,在较大的无机硫浓度范围内,未完全阻遏酶的产生. Ohshiro 等<sup>[14]</sup>指出培养基中含  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  硫酸钠,完全阻遏酶的产生; Rhee 等<sup>[18]</sup>报道当硫酸盐加到培养基中后, DBT 即不被降解表明硫酸盐完全阻遏降解 DBT 酶产生; Omori 等<sup>[24]</sup>和 Wang & Krawiec<sup>[25]</sup>在研究中也发现类似的结果.但 Reichmuth 等<sup>[26]</sup>指出,至今人们仍未纯化出任何相应的作用于脱硫酶基因 *dsz* 调控位点上的阻遏或激活蛋白.红球菌 SDUZAWQ 这一对硫酸盐不敏感的特点,较适合于石油生物脱硫的实际应用.

图 5 不同  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  浓度对红球菌 SDUZAWQ 脱硫活力的影响Figure 5 Effect of different concentration of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  on the biodesulfurization activity

生物脱硫工艺中,脱硫酶系需要诱导,昂贵的诱导剂 DBT 的使用直接影响着脱硫催化剂制备的成本.利用红球菌 SDUZAQ 对无机硫酸盐不敏感的特点,可以采用一定量的无机硫源加上少量的昂贵的诱导剂来制备脱硫催化剂,可以降低生物脱硫成本<sup>[27]</sup>.

## 2.6 混合硫源制备的细胞柴油脱硫

用 DBT 作为唯一硫源制备该菌株的休止细胞,对经过加氢精制处理过的柴油(含硫 0.0205 %)进行过脱硫试验,有机硫实际脱除率达到约 80.0 %<sup>[27]</sup>.为了验证其对硫酸盐不敏感特性在实际油品脱硫中的效果,选择了混合硫源制备细胞来获得低成本的脱硫催化剂方案,对另一经过加氢精制处理过的柴油(含硫 0.0165 %)进行了脱硫试验.细胞用 0.1 mmol L<sup>-1</sup> 的 DBT 和 0.1 mmol L<sup>-1</sup> 的 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 混合硫源培养,将收集后的细胞用 20 mmol L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液洗涤后,配制吸光度为 20 (8.0 g L<sup>-1</sup> 左右)的催化剂用于脱硫.如表 2 所示,24 与 48 h 后的脱硫率分别达到了 68.2 % 和 79.5 %.

表 2 混合硫源制备的细胞用于柴油脱硫结果

Table 2 Result of cells biodesulfurization of diesel oil, which cultivated by mixed sulfur sources

取样时间/h	总硫含量/ %	硫脱除率/ %
0	0.0165	0
24	0.00526	68.2
48	0.00339	79.5

## 3 结论

近几年来生物脱硫的研究逐渐成为热点,取得了大量可喜的研究结果,但是研究细菌代谢含 S 杂环分子的过程还远远没有结束,应用于工业生产还有一定困难.近年来随着生物酶化学、遗传学和生物工程等学科的发展,国际上(如美国、欧洲和日本等国家)对生物催化脱硫技术的研究十分活跃,已经取得了一些重要的研究成果.尤其是美国能源生物系统公司在生物脱硫技术的各方面都已经具备了工业化的条件,其应用的前景已经十分明朗.与我国对资源需求的速度不相称的是,我国在生物脱硫方面的工作做得还相对较少,也鲜有重要的结果报道.本文筛选得到了一株对无机硫酸盐不敏感的菌株,能够有效地降解 DBT, BT 及其衍生物,同时能够有效地降解柴油中的有机硫,脱硫率达到 80 %,具有较大的工业应用前景.随着科技的发展进步,我们有理由相信生物脱硫必将克服现有的障碍,并最终走向产业化.

## References

- Monticello, D. J. *Annu. Rev. Microbiol.* **1985**, 39, 371.
- Kilbane II, J. J. *US 5104801*, **1992** [ *Chem. Abstr.* **1992**, 115, 154959 ].
- Ohshiro, T.; Izumi, Y. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1999**, 63, 1.
- McFarland, B. L. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, 2, 257.
- Folsom, B. R.; Schieche, D. R.; Digrazia, P. M.; Werner, J.; Palmer, S. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 4967.
- Grossman, M. J.; Lee, M. K.; Prince, R. C.; Garrett, K. K.; George, G. N.; Pickering, I. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 181.
- Grossman, M. J.; Lee, M. K.; Prince, R. C.; Minak Bernero, V.; George, G. N.; Pickering, I. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 1949.
- Xu, P.; Li, F.-L.; Yu, J.; Ma, C.-Q.; Zhong, J.-J.; Qu, Y.-B.; Blankespoor, H. D. *Chin. Sci. Bull.* **2002**, 47, 365.
- Kertesz, M. A.; Wietek, C. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 57, 460.
- Oldfield, C.; Pogrebinsky, O.; Simmonds, J.; Olson, E. S.; Kulpa, C. F. *Microbiology* **1997**, 143, 2961.
- Constani, M.; Gralt, J.; Bordons, A. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, 10, 510.
- Crawford, D. L.; Gupta, R. K. *Curr. Microbiol.* **1990**, 21, 229.
- Setti, L.; Farinelli, P.; Martino, S. D.; Frassinetti, S.; Lanzarini, G.; Pifferi, P. G. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 52, 111.
- Ohshiro, T.; Suzuki, K.; Izumi, Y. *J. Ferment. Bioeng.* **1996**, 81, 121.
- Monticello, D. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11, 540.
- Kobayashi, M.; Onaka, T.; Ishii, Y.; Konishi, J.; Takaki, M.; Okada, H.; Ohta, Y.; Koizumi, K.; Suzuki, M. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 187, 123.
- Konishi, J.; Onaka, T.; Ishii, T.; Suzuki, T. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 187, 151.
- Rhee, S.-K.; Chang, J.-H.; Chang, Y.-K.; Chang, H.-N. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, 2327.
- Gilbert, S. C.; Morton, J.; Buchanan, S.; Oldfield, C.; McRoberts, A. *Microbiology* **1998**, 144, 2545.
- Matsui, T.; Onaka, T.; Tanaka, Y.; Tezuka, T.; Suzuki, M.; Kurane, R. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2000**, 64, 596.
- Tanaka, Y.; Onaka, T.; Matsui, T.; Maruhashi, K.; Kurane, R. *Curr. Microbiol.* **2001**, 43, 187.
- Tanaka, Y.; Matsui, T.; Konishi, J.; Maruhashi, K.; Kurane, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 59, 325.
- Gou, Z.-X.; Liu, H.-Z.; Luo, M.-F.; Li, S.; Xing, J.-M.; Chen, J.-Y. *Sci. China, Ser. B* **2002**, 45, 521.
- Omori, T.; Saiki, Y.; Kasuga, K.; Kodama, T. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1995**, 59, 1195.
- Wang, P.; Krawiec, S. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 1670.
- Reichmuth, K. S.; Hittle, J. L.; Blanch, H. W.; Keasling, J. D. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 67, 72.
- Xu, P.; Ma, C.-Q.; Li, F.-L.; Tong, M.-Y.; Zeng, Y.-Y.; Wang, S.-N.; Blankespoor, H. D. *Chin. Sci. Bull.* **2002**, 47, 1077.