

利用休止细胞法选择性脱除燃料油中有机硫

佟明友^{1,2}, 马挺¹, 张全², 梁凤来¹, 刘如林^{1*}

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 中国石化总公司抚顺石油化工研究院, 抚顺 113001)

摘要:红球菌(*Rhodococcus* sp.) FS-1 菌株能通过专一性断裂 C—S 键的途径脱除二苯并噻吩(DBT)中的有机硫作为自身生长需要的硫源,从而降低油品中的硫含量.本文利用该菌的休止细胞对 DBT 和柴油的脱硫活力进行了研究.结果表明,该菌株对 DBT 及柴油中的有机硫均有良好的选择性脱除作用.DBT 浓度为 0.5 ~ 1.0 mmol/L,油水比例为 1:5 时,脱硫效果最佳.采用二次脱硫法可使柴油脱硫率达 85% 以上,证明 FS-1 能有效脱除柴油中的有机硫.烃质组分的气相色谱分析表明,FS-1 作用前后的柴油烃类组分基本没有改变,说明该菌的脱硫作用是特异性针对硫原子的,不会破坏柴油的有效成分.

关键词:红球菌 FS-1; 休止细胞; 生物脱硫; 二苯并噻吩

中图分类号: X701.3, Q93 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)01-0024-04

Selectively Desulfurizing Organic Sulfur of Diesel Oil by Resting Cells

TONG Ming-you^{1,2}, MA Ting¹, ZHANG Quan², LIANG Feng-lai¹, LIU Ru-lin¹

(1. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Fushun Research Institute of Petroleum and Petrochemicals, SINOPEC, Fushun 130001, China)

Abstract: *Rhodococcus* sp. FS-1, which can specially break the C—S bond of dibenzothiophene (DBT) and convert DBT into 2-hydrobenzophene by “4S” pathway, is used to decrease the sulfur content in diesel oil. This research focuses on the diesel oil desulfurization using resting cells of *Rhodococcus* sp. FS-1. The research result indicate that the desulfurization activity of the resting cells of *Rhodococcus* sp. FS-1 was strongly high. When the concentration of DBT was 0.5 ~ 1.0 mmol/L and the ratio of oil/water was 1:5, the effect of desulfurization was highest. The desulfurization rate was over 85% when desulfurizing the diesel oil twice. GC analysis proves that this process did not break the carbon-carbon backbone. The calorific value of diesel oil is reserved.

Key words: *Rhodococcus* sp. FS-1; resting cells; biodesulfurization; dibenzothiophene (DBT)

使用高含硫的燃料油是造成环境污染的重要因素,它燃烧生成的 SO_2 极易与大气中的水蒸气化合成 H_2SO_3 和 H_2SO_4 蒸汽,与水蒸汽生成硫酸雾,继而形成酸雨;含硫的烟气对人体和动植物都有很大的害处,给生态系统和人们的生活带来诸多不利因素.随着人们环保意识的不断增强,脱硫技术已经成为人们关注的热点^[1].

燃料油的生物脱硫(Biodesulfurization, BDS)技术是利用微生物的生长代谢脱除燃料油中硫元素的方法,通常在常温常压下操作,投资成本和操作费用比传统的加氢脱硫法(Hydrodesulfurization, HDS)低.该技术在美国和日本开发较早^[2].近年来,我国 BDS 研究也取得了初步进展^[3~5].

二苯并噻吩(Dibenzothiophene, DBT)是石油馏分中相对含量高、难降解的典型有机杂环硫化物,因此常被作为 HDS 和 BDS 的模型化合物来研究^[6].红球菌能通过“4S”途径选择性地脱除 DBT 中的有机硫,而其骨架结构则被氧化成 2-羟基联苯(2-Hydrodibenthiothiophene, 2-HBP)留在油相,不会造成油品热值的损失.因此,选育具有“4S”途径的菌株具

有应用前景^[7].

生长细胞受到外界化学或物理作用后会相应地发生变化,如基因表达、蛋白稳定性的变化等^[8].因此,当外界环境影响生长细胞体内的一些正常生化反应时,采用休止细胞(Resting Cells)可以避免这种影响.休止细胞反应是利用微生物自身生长代谢产物或诱导产酶的特点将微生物培养到对数生长末期,分离菌体并以一定的浓度悬于生理缓冲液中,此时微生物已经基本停止生长代谢,但保持酶的活性.休止细胞的主要优点是反应专一性强,可以提高底物转化率,不易染杂菌,可以减少产物对菌体生长及酶合成的抑制,是提高生物脱硫效率的途径之一^[9].目前 BDS 研究中休止细胞脱硫法应用得非常广泛,国外有很多利用野生菌株和基因工程菌株的休止细胞进行脱硫的报道^[10~12].

收稿日期: 2004-02-17; 修订日期: 2004-05-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20374032); 中石化股份有限公司资助课题.

作者简介: 佟明友(1955~),男,辽宁抚顺人,抚顺石油化工研究院高级工程师,南开大学微生物学系在职博士研究生,主要从事资源细菌及生物工程方面的研究.

* 通讯联系人(Tel: 022-23505967, E-mail: meor@nankai.edu.cn)

本文对休止细胞法柴油脱硫反应进行了深入的探索研究,旨在为柴油深度脱硫的工业化进程奠定基础.

1 材料和方法

1.1 菌种

红球菌(*Rhodococcus* sp. FS-1)由抚顺石油化工研究院从孤岛油田的油浸土样中分离.

1.2 基本培养基(BSM)^[13]

每 L 蒸馏水中含有 20.0g 葡萄糖,2.0g NH_4Cl , 6.3g KH_2PO_4 , 8.0g K_2HPO_4 , 0.2g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.0mL 微量元素溶液和 1.0mL 维生素溶液, 0.25 mmol/L DBT, pH7.0 ~ 7.2. 金属盐母液配制: 0.5g/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.5g/L ZnCl_2 , 0.5 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1g/L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05g/L CuCl_2 , 0.05g/L $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 120 mmol/L HCl . 维生素母液配制: 400 mg 泛酸钙, 200 mg 肌醇, 400 mg 烟酸, 400 mg 盐酸吡哆醇, 200 mg 对氨基甲苯, 0.5 mg VB_{12} .

1.3 休止细胞的制备^[9]

将 *Rhodococcus* sp. FS-1 菌株接入 LB 培养基中 30℃ 培养至对数末期, 4000r/min 离心收集细胞, 用生理盐水洗 2 次, 沉淀悬浮于 pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液中, 加入少量葡萄糖, 制成菌悬液, 使菌浓约为 $2 \sim 5 \times 10^9 \text{ cell/mL}$.

1.4 脱硫实验

将上述菌悬液分装 50 mL/500 mL 摇瓶, 分别加入一定比例的模型化合物 DBT 或精制柴油, 30℃ 振荡培养, 不同时间取样检测脱硫效果.

1.5 脱硫活力的测定

DBT 的 C-S 键被微生物降解后, 终产物是 2-HBP. Gibb's 试剂与 2-HBP 反应生成蓝色络合物, 通过比色确定 2-HBP 的相对含量可确定微生物的脱硫能力^[14]. 柴油的总硫含量用 WK-2D 微库仑仪测定.

1.6 脱硫产物的测定方法

为了确定 FS-1 菌株脱除 DBT 中有机硫的专一性, 对 DBT 及其代谢产物进行了气相色谱-质谱联用分析. 将 FS-1 菌株接入含有 1.0 mmol/L DBT 的 BSM 培养基, 培养 48h, 利用乙酸乙酯萃取培养液, 萃取液取 2 μL 用 PE Autosystem GC/Q-Mass 910 气相色谱-质谱联用仪分析. 以 GC-FID 检测器检测脱硫前后的烃组份变化. 水相用 UV-4000 紫外分析仪在 OD_{600} 测定菌体浓度, 用铬酸钡沉淀法测定 SO_4^{2-}

的含量^[15], 用 HANNA 酸度计测定 pH 值.

2 结果与分析

2.1 菌株对模型化合物 DBT 的代谢途径

结果见图 1. 从图 1 可知, DBT 经过 FS-1 菌株作用后, 部分被转化成 2-HBP, 这与“4S”途径的最终产物一致, 说明该菌株通过 C-S 键断裂方式降解 DBT.

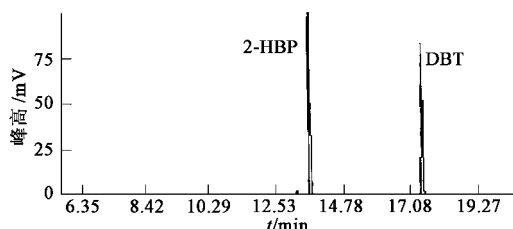


图 1 FS-1 对 DBT 代谢产物分析图谱

Fig. 1 Analysis of metabolism of DBT

2.2 不同初始 DBT 浓度对休止细胞脱硫的影响

实验结果见图 2. 图 2 表明, 当初始 DBT 浓度为 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时, 菌体的脱硫活力较高. 当 DBT 浓度为 1.5 mmol/L 时, 菌体的脱硫活力明显下降. DBT 浓度达到 2.0 mmol/L 时, 培养 60h 的脱硫活力只有 0.5 mmol/L DBT 时的 1/5, 说明底物对菌体的脱硫活性具有抑制作用.

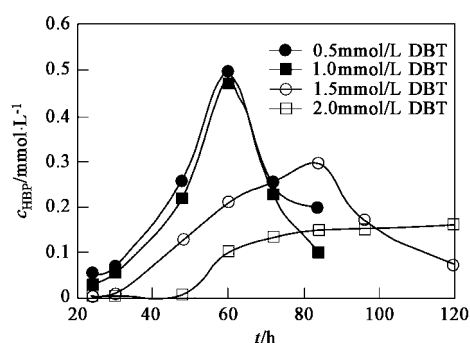


图 2 不同 DBT 浓度对 2-HBP 产生的影响

Fig. 2 Production effect of 2-HBP by different concentration of DBT

2.3 FS-1 在模拟柴油中的生长动态

图 3 是红球菌 FS-1 在柴油培养基中的发酵动态曲线. 可以看出, 9 ~ 24h 为菌体快速生长期, 也是 DBT 迅速消耗的时期. 此期间菌体生长并产生大量脱硫酶, 使菌体利用分解的有机硫源快速生长. 进入平衡期后脱硫率也趋于平缓, 0.27 mmol/L DBT 最终几乎全部转化为 2-HBP 和 SO_4^{2-} . 由于 FS-1 正常

生长只需要 0.27 mmol/L 即约 120 mg/L 左右的硫,再加上柴油对菌体的损害,所以利用菌体生长需要的硫来计算其最多可以脱除不足 100 mg/L,远不能达到工业脱硫的标准,因此有必要采取休止细胞重复脱硫的方法.

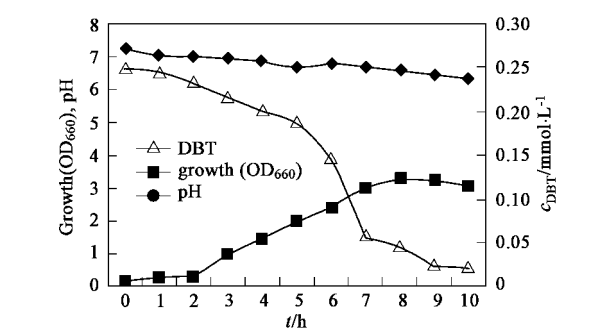


图 3 FS-1 在模拟柴油中的生长动态曲线

Fig.3 Time course of DBT degradation by growing cells of *Rhodococcus* sp. FS-1

2.4 油水比例的选择

生物脱硫作为微生物的酶反应需要在水相中进行.要处理的柴油与细胞悬液(水相)的比例决定着 BDS 技术的经济性.分别按 1:3、1:5 和 1:10 的油水比例进行脱硫比较,并分别培养 12h、24h、36h、48h 后,分离柴油测定其总含硫量.结果见表 1(未处理前柴油含硫总量为 224 mg/L).结果表明,油水比为 1:3 时,由于柴油比例过高而影响了反应的传质过程,所以脱硫率不高.柴油与细胞悬液比例为 1:5 或 1:10 时,脱硫活性差别不大,但二者均高于前者.从经济性考虑,油水比例以 1:5 为好.表 1 还表明,休止细胞转化的前 12h,脱硫效果明显;12h 之后,硫含量降低幅度不大.因此因选用 12h 为一周期进行短时期内的循环脱硫法.

表 1 不同油水比的脱硫效果

油水比	不同处理时间的硫含量/ mg·L ⁻¹				
	0h	12h	24h	36h	48h
1:3	224	121.1	116.2	108.6	100.4
1:5	224	66.9	63.9	60.5	56.8
1:10	224	67.3	59.0	56.1	55.1

2.5 休止细胞与生长细胞脱硫效果比较

用红球菌的休止细胞分别对不同规格柴油进行生物脱硫,同时以该菌株的生长细胞脱硫作对照.结果见表 2,可以看出,各种规格的柴油经红球菌脱硫后,硫含量不同程度降低.其中休止细胞的脱硫效果明显优于生长细胞,平均脱硫率比生长细胞高出

10%.

表 2 生物脱硫处理后柴油中的总硫变化

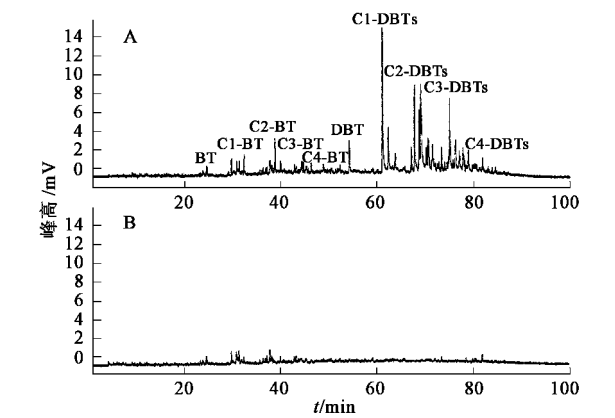
柴油	处理前硫含量 / mg·L ⁻¹	处理后硫含量/ mg·L ⁻¹	
		生长细胞	休止细胞
3 号	224	78.2	52.1
2 号	379	180.6	126.3
1 号	780	316.9	228.8

2.6 休止细胞对柴油的重复脱硫实验

将经过休止细胞脱硫处理后的柴油再用同样的休止细胞处理 1 次,2 次脱硫后的硫含量变化见表 3.结果表明,1 号柴油和 2 号柴油经过 24h 的初次脱硫,脱硫率分别为 70.9%和 64.1%,脱除率较大.对经过初次脱硫的 2 种柴油进行重复脱硫,同样处理 24h,硫含量可再分别脱除 15.9%和 14.0%.1 号柴油经生物处理前后的 GC-SCD 分析见图 3,可以看出,微生物脱除的硫主要是二苯并噻吩类有机硫,尤其是 DBT 及其衍生物,而对苯并噻吩(Benthiophene)衍生物的脱除能力相对较差,生物处理后柴油中的硫组分多是此类物质.因此,要作到深度脱硫,尚需进一步筛选利用硫源范围广的菌株或者采用复合微生物脱硫技术.

表 3 休止细胞的重复脱硫结果

柴油	处理方法	初始硫含量	处理 24h 硫	硫脱除率
		/ mg·L ⁻¹	含量/ mg·L ⁻¹	/ %
1 号	初次脱硫	780.0	226.8	70.9
	重复脱硫	226.8	190.7	15.9
2 号	初次脱硫	379.0	136.2	64.1
	重复脱硫	136.2	117.1	14.0



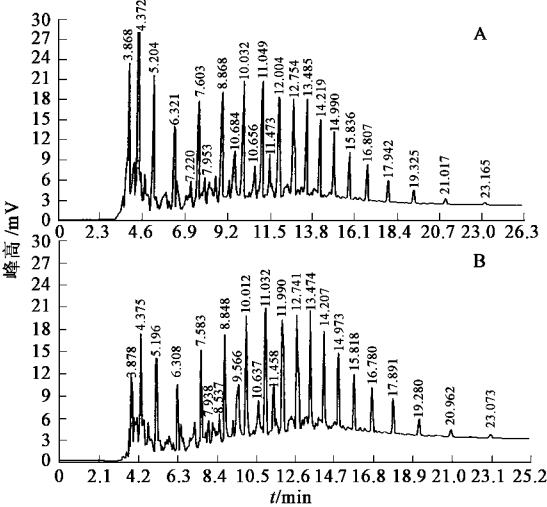
A. Diesel oil sample before biotreated; B. Diesel oil sample after biotreated

图 4 精制柴油重复生物脱硫前后的 GC-SCD 图谱

Fig.4 GC-SCD analysis of organic sulfur in treated and untreated diesel oil by FS-1

2.7 柴油脱硫前后烃质组分的含量变化

如图 5 所示,气相色谱-质谱联用分析确定精制柴油中正构烷烃的位置和含量(本文未给出数据),继而结合单峰面积所占整体比例并无明显改变的事实,可以认定精制柴油的烃质组份经红球菌 FS-1 脱硫前后基本没有改变,作为判断柴油质量标准之一的十六烷值基本保持原水平,说明 FS-1 的脱硫作用是特异性针对硫原子的,不会破坏柴油的有效成分.



A. Untreated diesel oil sample ; B. Batch biodesulfurized diesel oil

图 5 精制柴油脱硫前后烃组分的气相色谱图

Fig. 5 GC-FID analysis of biotreated and unbiotreated diesel oil

3 结论

(1) DBT 经过 FS-1 菌株作用后,部分被转化成 2-HBP,说明该菌株通过 C—S 键断裂方式降解 DBT.

(2) 休止细胞的脱硫效果明显优于生长细胞,平均脱硫率比生长细胞高出 10 %.1 号柴油和 2 号柴油经过 2 次休止细胞重复脱硫率可达 86.8 %和 78.1 %.

(3) 柴油烃质组分的气相色谱分析表明,FS-1 作用前后的柴油烃类组份基本没有改变,说明它的脱硫作用是特异性针对硫原子的,不会破坏柴油的有效成分.

参考文献:

[1] Monticello D J. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates [J]. Curr. Opin. Biotechnol., 2000, 11: 540 ~ 546.

[2] Monticello D J. Biocatalytic desulfurization, the biorefining of petroleum factors [J]. Hydrocarbon Processing, 1994, 73(2): 39 ~ 45.

[3] 马挺, 刘健, 佟明友, 等. 脱硫菌 DS-3 脱除二苯并噻吩中有有机硫的性能初探 [J]. 微生物学报, 2002, 42(6): 726 ~ 731.

[4] 许平, 马翠卿, 李福利, 等. 微生物脱有机硫的催化剂制备和条件 [J]. 科学通报, 2002, 47(4): 275 ~ 279.

[5] 缙仲轩, 罗明芳, 刘会洲, 等. 专一性脱硫菌的分离与鉴定 [J]. 中国科学(B 辑), 2002, 45(5): 521 ~ 530.

[6] Malick K A. Microbial removal of organic sulfur from crude oil and the environment: some new perspectives [J]. Process Biochemistry, 1978, 13: 10 ~ 12.

[7] Monticello D J. Microbial desulfurization of fossil fuels [J]. Annual Review of Microbiology, 1985, 39: 371 ~ 389.

[8] Hyung Joon Cha, Ranjan Srivastava, Vikramn Vakharia, et al. Green Fluorescent Protein as Noninvasive Stress Probe in Resting Escherichia coli [J]. Cells, 1999, 34: 409 ~ 414.

[9] Kilbane J J. Desulfurization of coal: the microbial solution [J]. Trends Biotechnol., 1989, 7(4): 97 ~ 101.

[10] Samir Abbad Andaloussi, Claire Iagnel, Michel Warzywoda, et al. Multi-criteria comparison of resting cell activities of bacterial strains selected for biodesulfurization of petroleum compounds [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(3 ~ 4): 446 ~ 454.

[11] Samiappillai Maxwell, Jian Xu. Selective desulfurization of dibenzothiophene by a soil bacterium: microbial DBT desulphurization [J]. Process Biochemistry, 2000, 35: 551 ~ 556.

[12] Toshimitsu Onaka, Morio Koobayashi, Yoshitaka Ishii, et al. Application of solid-phase extraction to the analysis of isomers generated on biodesulfurization against methylated dibenzothiophenes [J]. J Chromatogr A. 2000, 903: 193 ~ 202.

[13] Grossman M J, Lee M K, Prince R C, et al. Microbial Desulfurization of a Crude Oil Middle Distillate Fraction: Analysis of the Extent of Sulfur Removal and the Effect of Removal on Remaining Sulfur [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(1): 181 ~ 188.

[14] Maghsoni S, Kheirloomoom A, Vossoughi M, et al. Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated Corynebacterium sp. strain P32Cl [J]. Biochemical Engineering Journal, 2000, 5: 11 ~ 16.