

红球菌 DS-3 脱除二苯并噻吩中有机硫的性能初探

马 挺 刘 健 佟明友 张心平 刘如林

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘 要:从孤岛油田分离到一株红球菌(*Rhodococcus* sp.)DS-3,能专一地切断二苯并噻吩(DBT)中的 C—S 键,沿 4S 途径代谢,生成二羟联苯。实验证明,以 2% 的接种量脱除 50 μ g/mL DBT 底物中的硫效果最佳。在此条件下,适宜菌株生长和脱硫的碳源为葡萄糖,氮源为硝酸铵,初始 pH 为 8.2,生长温度为 30 $^{\circ}$ C,15mmol/L 的硫酸根离子能使其丧失脱硫能力。在上述适宜条件下,培养 72 h 后 DBT 中 34.04% 的硫被脱除。

关键词:红球菌,生物脱硫,二苯并噻吩(DBT)

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)06-0726-06

柴油等燃料油中的硫在燃烧时放出 SO₂,致使空气污染,进而形成酸雨,所以严格限制燃料油中的硫含量已成为当务之急,燃料油低硫化将是我国油品质量发展的重要趋势^[1,2]。二苯并噻吩(Dibenzothiophene, DBT)是一种具有综合多芳香环结构的含硫杂环化合物,其中五元噻吩环的两侧接有两个六元苯环,这类物质在环境中很难被生物降解。目前工业上主要采用的加氢脱硫法(HDS)虽能有效地脱除油中的无机硫和部分有机硫,但对油中 DBT 的硫却显得效率极低。因此,仅靠 HDS 很难满足日益严格的超低硫燃料油的生产要求^[3]。

生物脱硫(BDS)是利用细菌产生的酶选择性地对硫进行氧化,断裂 C—S 键,将其分解成可溶于水的物质,然后再从油品中分离出来。其研究通常以 DBT 作为模型化合物。由于 BDS 的高度专一性和高效率,并且可在常温常压下操作,因此已受到广泛关注^[4,5]。

从孤岛油田的高含硫油泥中分离到一株红球菌(*Rhodococcus* sp.)DS-3,它能将 DBT 中 C—S 键上的硫脱除,而不破坏 C—C 键(俗称 4S 途径),为生物脱硫的发展奠定了基础。本文报道了对该菌株的代谢途径分析,同时还研究了影响 DBT 脱硫的若干因素。

1 材料和方法

1.1 菌种

红球菌(*Rhodococcus* sp.)DS-3 菌株由孤岛油田油泥中分离并保藏。

1.2 培养基及培养方法

1.2.1 基础培养基(BSM):按文献[6]配制。

1.2.2 DBT 培养基:1mg/mL DBT 乙醇溶液过滤灭菌,用前加入到灭菌的 BSM 中。

1.2.3 培养方法:将新鲜的液体菌种接到装有 50mL 培养基的 250mL 三角瓶中,30 $^{\circ}$ C,250r/min 旋转摇床培养。

作者简介:马 挺(1977-)男,天津市人,南开大学微生物学系博士研究生,主要从事分子微生物方面的研究。

收稿日期:2001-11-07,修回日期:2002-03-04

1.3 试剂

DBT 2-羟基联苯(2-HBP),二苯并噻吩砜(DBTO₂),Gibb's 试剂均购于百灵威公司。

1.4 DBT 代谢氧化产物的收集及薄层层析^[7]

将液体菌种以 2% 加入含 DBT 的 BSM 摇瓶中,于 30℃ 200r/min 培养不同时间,加入定量的正己烷充分抽提,减压蒸馏浓缩至 1~2mL。取高效硅胶板(GF254),用前在 60℃ 活化 3 h。用定量毛细管(μL)将不同培养时间的氧化产物各取 3μL 点到硅胶板上,标样为:DBT, DBTO₂, 2-HBP。一次展层剂为环己烷:二氯甲烷(8:1),二次展层剂为环己烷:氯仿(5:3),于 VDSImagemaster 凝胶成像系统 365nm 下照像并分析。

1.5 DBT 代谢氧化产物的定量分析

取经抽提的氧化产物,用 Waters 600 HPLC 进行定量分析。

1.6 菌体生长量及 DBT 降解量的测定

培养液菌体浓度以 OD₆₀₀ 值来表示。2-HBP 生成量以离心后培养液与 Gibb's 试剂反应后在 610nm 下的 OD 值计算。DBT 的降解量以其残留量表示,不同时间的产物用正己烷充分抽提,HPLC 法定量。以 2-HBP 生成量作为衡量菌株脱硫能力的主要指标。菌体浓度受脱硫副产物硫酸根的影响较大,作为辅助参考指标为宜。

2 结果和讨论

2.1 DBT 代谢途径分析

2.1.1 薄层层析 不同培养时间(0h,40h,80h,120h)产物抽提液的薄层层析图谱(图 1)。可以看出,在培养过程中,DBT 的浓度(即显色的深浅)有明显变化,80h 和 120h 的 DBT 斑点色度明显低于 40h,同时有 2-HBP 和 DBTO₂ 斑点出现。这意味着 DS₃ 菌株降解 DBT 走了一个特异的有机硫化物氧化途径,即 4S 途径^[8](图 2)。

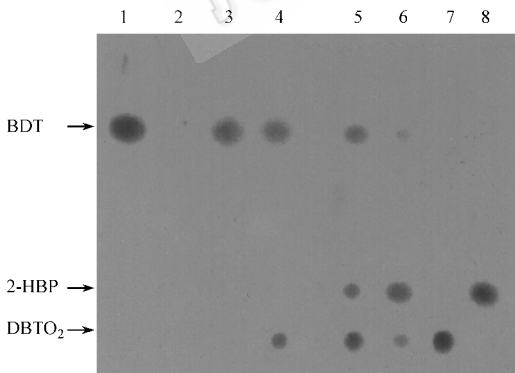


图 1 不同发酵时间 DBT 发酵抽提液的薄层层析图

Fig.1 TLC of fermentation extracts in different incubation times
1. DBT 2. CK 3. 0h 4. 40h 5. 80h 6. 120h 7. DBTO₂ 8. 2-HBP.

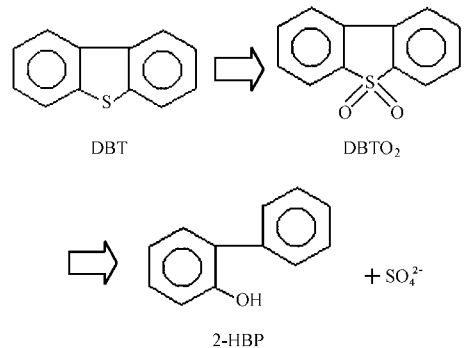


图 2 DS-3 菌株代谢 DBT 基本途径示意图

Fig.2 The metabolism pathway of DBT by DS-3

2.1.2 HPLC 分析 24 h 的培养液成分分析见图 3,不同时间培养液中 DBT 和 2-HBP 含量见表 1。色谱分析表明,24h 培养液中同时含有剩余的 DBT 及新生成的 2-HBP,但从表 1

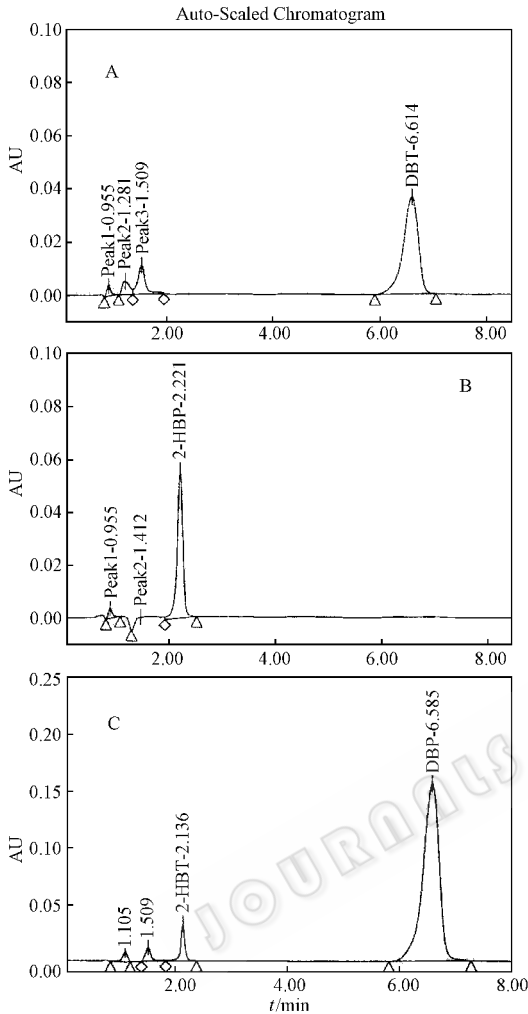


图3 高效液相色谱测定发酵液中的成分谱图

Fig.3 Determination of the culture broth by HPLC analysis

A. Standard sample of DBT ;B. Standard sample of 2-HBP ;C. Sample after 24h.

表2 不同初始 DBT 浓度培养 96h 后脱硫及细菌生长情况

Table 2 Desulfurization ability and the strain growth under different DBT concentration

DBT concentration($\mu\text{g/mL}$)	1	2	5	10	50	100
Cell concentration/ OD_{600}	0.099	0.275	0.628	1.242	2.830	2.507
2-HBP production/ OD_{610}	0.061	0.070	0.241	0.655	2.649	2.641

可以看出,随着培养时间的延长, DBT 含量逐渐降低, 2-HBP 不断增加, 且二者的消长呈现一定的比例, 72h 后有 34.04% 的 DBT 被转化, 表明菌株已将 DBT 氧化为 2-HBP, 从而特异性地脱除 DBT 中的有机硫。

表1 高效液相色谱法测定不同时间发酵液中 DBT 和 2-HBP 的含量

Table 1 Determination of the contains of the DBT and 2-HBP in the culture broth by HPLC analysis

Fermented time/h	Remainder of DBT($\mu\text{g/mL}$)	Production of 2-HBP($\mu\text{g/mL}$)	The ratio of desulfurization/%
0	50.00	0	0
24	45.61	1.94	8.78
48	39.41	8.23	21.18
72	32.98	13.87	34.04

The ratio of desulfurization is computed with the reductor of DBT

2.2 不同因素对菌株降解 DBT 的影响

2.2.1 不同 DBT 浓度的影响

接种量 2%, 同时在 BSM 中分别加入不同浓度的 DBT 培养 96h, 实验结果见表 2。表明 DBT 浓度对菌体生长和脱硫能力有直接影响, DBT 量越大, 脱硫效率越低。当 DBT 浓度大于 $50\mu\text{g/mL}$ 后, 2-HBP 的生成量基本不再增加, 菌体的最终浓度反而下降, 说明一定量的菌体只能脱除一定量的 DBT, 而且 DBT 浓度过大不利于菌体的生长。综合来看, 在接种量 2% 条件下, $50\mu\text{g/mL}$ 的 DBT 浓度最佳。

2.2.2 不同碳源的影响

以 BSM 培养基为基础培养基, 以 DBT 为唯一硫源, 考察了一定浓度的不同碳源对 DS-3 菌株生长和脱硫的影响。经过 5 天培养, 测定最终菌体浓度及生成 2-HBP 的量, 以确定适宜碳源。结果如图 4 所示, 可以看出, 该菌能利用甘油、葡萄

糖、蔗糖、乙醇和乙酸钠为碳源进行生长繁殖并脱硫。从菌体生长和 2-HBP 生成量均高角度考查,葡萄糖为最适碳源。乙醇能大大提高菌株的脱硫活性,但菌体的生长一般,这可能是由于乙醇可溶解 DBT,大大增加了菌体与 DBT 的接触几率,且乙醇能促进脱硫酶的调节^[9]。

2.2.3 不同氮源的影响:以 DBT 为唯一硫源,选取 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、 KNO_3 、牛肉膏和蛋白胨作为不同氮源进行实验,结果见图 5。表明有机氮源试验组中的 2-HBP 生成量极低,推测有机氮源中含有干扰细菌脱硫的含硫氨基酸^[10]。无机氮源不但能使菌体良好生长,而且其 2-HBP 生成量也极显著,该试验中 NH_4NO_3 是较好的氮源。

2.2.4 含硫化合物的影响:一般代谢途径的终产物会对底物的代谢产生抑制作用,硫酸根对 DBT 的代谢也不例外^[10]。对硫酸根的抑制作用进行了测试,结果如图 6 所示。可以看出,硫酸根对 DS-3 菌株的脱硫能力有明显抑制作用。随着硫酸根浓度的增加,2-HBP 生成量显著降低,当硫酸根浓度大于 15mol/L 时,2-HBP 生成量几乎降为零。这意味着在菌株 DS-3 脱硫过程中,应采取加入 Ca^{2+} 等方法将脱硫过程的副产物硫酸根从反应体系中及时除去。

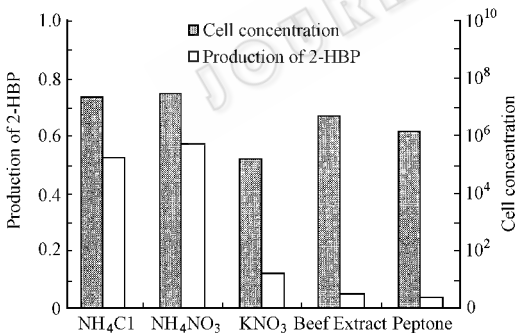


图 5 不同氮源对菌株生长和脱硫能力的影响

Fig. 5 Effects of different nitrogen sources on the growth of the strain and desulfurization of DBT

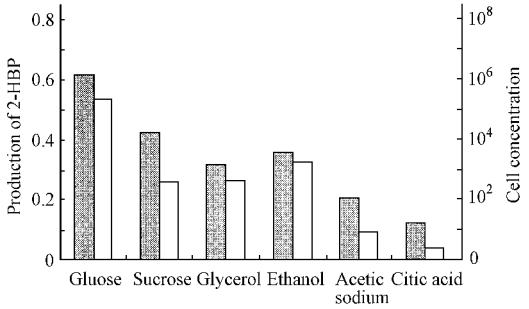


图 4 不同碳源对菌株生长和脱硫能力的影响

Fig. 4 Effects of different carbon sources on the growth of the strain and desulfurization of DBT

■ Cell concentration □ Production of 2-HBP.

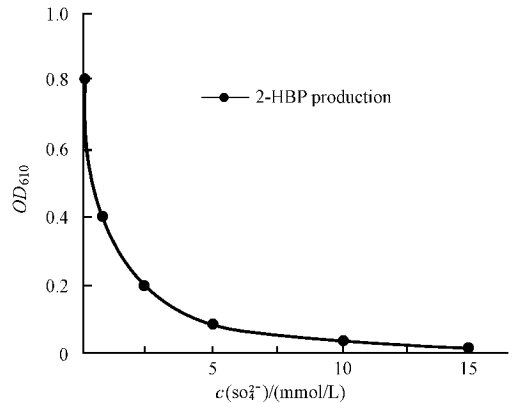


图 6 硫酸根浓度对菌株脱硫的抑制作用

Fig. 6 Inhibition of desulfurization for the strain by SO_4^{2-}

2.2.5 不同接种量的影响:以 DBT 为唯一硫源,不同的接种量培养 96h,实验结果见表 3。由表 3 可见,2% 的接种量最佳,接种量过大会造成菌体生长营养匮乏,并不利于脱硫能力的发挥,过小则会造成脱硫效率太低,不能最大程度地脱除相同量底物中的硫。

表 3 不同初始细胞浓度培养 96h 后脱硫及细菌生长情况

Table 3 Desulfurization ability and the strain growth under different seed volume

The proportion of inoculability/%	0.1	0.5	1	2	5	10
Cell concentration/ OD_{600}	1.415	1.516	1.570	1.595	1.683	1.723
2-HBP production/ OD_{610}	1.365	1.912	2.535	2.821	2.670	2.506

2.2.6 不同初始 pH 值的影响 以 DBT 为唯一硫源 培养 96h, 实验结果见表 4。可见初始 pH 低于 6.2 的酸性环境对 DS-3 菌株的生长有抑制作用。初始 pH 在 7.2~8.6 时 DS-3 的生长和脱硫能力均有大幅度提高, 但是从菌体浓度和 2-HBP 生成量两方面考虑, 初始 pH 为 8.2 时适宜。从表中还可看出, 在培养过程中, 溶液 pH 值均有一定程度的下降, 这可能是由于菌体代谢产酸所致, 因此应通过加入适量 $CaCO_3$ 等方法缓冲 pH 值, 以防止培养基酸化而影响脱硫效果。

表 4 不同初始 pH 培养 96h 后培养液的 pH 及细菌生长、脱硫情况

Table 4 The pH of the culture broth and the strain growth under different initial pH

Initial pH	5.2	6.2	7.2	7.6	8.2	8.6	9.2
Final pH	3.4	3.8	4.7	5.1	5.5	5.9	6.3
Cell concentration/ OD_{600}	0.758	1.672	2.634	2.649	2.656	2.644	2.632
2-HBP production/ OD_{610}	0.585	1.578	2.439	2.441	2.776	2.562	2.359

2.2.7 不同温度的影响 温度是细菌生长的一个重要因素, 因为细胞内各酶系的功能均与温度有着直接关系。由图 7 可见, 在 30℃ 培养得到的菌体浓度最大, 2-HBP 生成量最多, 因此, DS-3 菌株生长和脱硫的适宜温度应为 30℃。

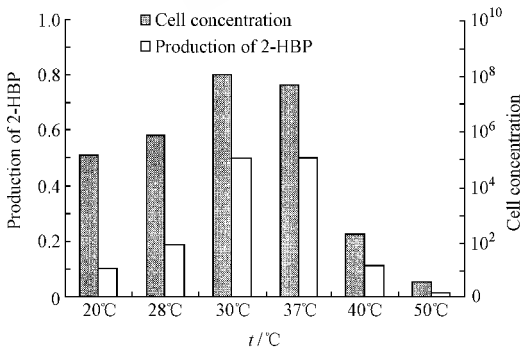


图 7 温度对菌株生长和脱硫的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the growth of the strain and desulfurization of DBT

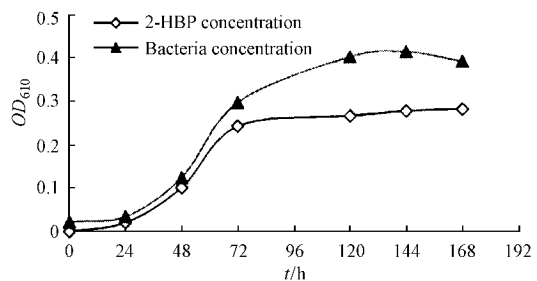


图 8 细菌生长与脱硫的动态曲线

Fig. 8 The course of the strain growth and desulfurization

2.3 菌株生长和 DBT 降解的动态研究

在适宜生长条件下观察了细菌生长与脱硫的动态, 结果如图 8。可以看出, DS-3 菌株

培养 72h 后 2-HBP 的生成量增长明显变缓,但菌体浓度仍继续增长,直到 120h 后才趋于恒定。这可能是因为 72h 后培养液中产生了一定浓度的硫酸根为菌体生长提供硫源,从而抑制菌株的脱硫活性。因此应通过控制发酵终点,或在一定时间后进行分批补料、调整 pH、去除硫酸根等方法促进 2-HBP 的生成。

DBT 脱硫率的提高还可从酶学、发酵工艺控制,以及分子生物学等方面加以改进^[11,12]。可以相信,微生物脱硫技术将在未来环保领域发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Hardegen F J. *CEP* ,1984 **80**(5) :63 ~ 67.
- [2] Beverly L M ,David J B ,William D ,et al . *Cri Rev in Microbiol* ,1998 **24**(2) :99 ~ 147.
- [3] Monticello D J. *Ann Rev Microbiol* ,1985 **39** :371 ~ 389/
- [4] Beverly L M. *Current Opinion in Microbiology* ,1999 **2** :257 ~ 264.
- [5] 廖 健 ,刘伯华 ,姚国欣 . 炼油设计 ,1999 **29**(12) :15 ~ 19.
- [6] John J K ,Kathleen J . *Biotech and Bioeng* ,1992 **40** :1107 ~ 1114.
- [7] Marzona M ,Pessione E ,Martiono S D ,et al . *Fuel Processing Technology* , 1997 **52** :199 ~ 205.
- [8] Oldfield C ,Pogrebinsky O ,Simmonds J ,et al . *Microbioloyg* ,1997 **143** :2961 ~ 2973.
- [9] 闫 海 ,王子健 . 化工冶金 ,1999 **20**(4) :376 ~ 380.
- [10] Takashi O ,Keitaro S ,Yoshikazu I . *Journal of Ferment Bioengineering* ,1996 **81**(2) :121 ~ 124.
- [11] Grossman M J ,Lee M K ,Prince R C ,et al . *Applied Environmental Microbiology* 2001 **67**(4) :1949 ~ 1952.
- [12] Kishimoto M ,Takeshi M ,Omase T ,et al . *Biochemical Engineering Journal* 2000 **5** :143 ~ 147.

Desulfurization of Dibenthioephene by *Rhodococcus* sp. DS-3

Ma Ting Liu Jian Tong Mingyou Zhang Xinping Liu Rulin

(College of life science ,NanKai University ,Tianjin 300071 ,China)

Abstract : A *Rhodococcus* DS-3 ,which screened from GuDao Oil Field ,can specially break the C-S bond of Dibenzothiophene (DBT) and format 2-hydrobenzophene (2-HBP). This is called 4S pathway. Here we use DS-3 seed which volume is 2% ,to act on DBT substrate which concentration is about 50 μ g/mL. With the experiment of the degradation of DBT under the conditions of different factors ,it is identified that the feasible carbon source of the growth and desulfurization of DS-3 is glucose ,the feasible nitrogen source is nitrate ammonium ,the compatible pH is 8.2 ,andthe condign growth temperature is 30 $^{\circ}$ C . DS-3 may lose its ability of desulfurization under the presence of 15mmol/L SO_4^{2-} . DS-3 can conspicuously degraded DBT to 2-HBP ,and the percentage of desulfurization reaches 34.04% in 72 hours .

Key words : *Rhodococcus* sp. , Biodesulfurization , Dibenthioephene