

燃料油的微生物脱氮

李珊珊, 马挺, 李国强, 梁凤来, 刘如林*

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘 要 燃料油中含有一些有机氮化物,其含量虽不如硫化物多,但足以影响油品的颜色和抗氧化安定性,也能在催化裂化等原油精制过程中造成催化剂中毒,缩短催化剂的使用寿命。同时,有机氮化物具致癌、致突变性,在燃料油燃烧过程中转变为氮氧化物,形成酸雨污染环境。传统的加氢脱氮操作复杂,成本高,因此人们日益重视微生物脱氮。综述微生物脱除燃料油中芳香氮化物的机理、调控及唑啉降解基因的分子遗传学研究进展,并对未来的研究方向提出了作者的见解。

关键词: 燃料油; 微生物脱氮; 唑啉; 唑啉双加氧酶(CARDO)

中图分类号: Q939.9 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)06-1023-05

燃料油中含有一些杂环的芳香氮化物,该物质可转变为氮氧化物,进而形成酸雨污染环境,它的存在会影响油品的颜色及抗氧化等性能,也能在原油精炼过程中造成催化剂中毒而降低产量^[1]。传统的加氢脱氮法需在高温高压条件下进行,不仅成本高,不安全,也易改变原油的其它组分^[2,3]。微生物脱氮是微生物利用自身的酶类切除芳香氮化物中的氮元素供其生长繁殖,从而达到脱氮的目的。其特点是在常温常压下进行,能耗小,成本低,不改变燃料油其它组分,可安全生产,已成为当今燃料油精炼行业中的研究热点。本文综述了国内外有关微生物降解芳香氮化物的研究情况,包括微生物脱氮的机理、调控及其应用。

1 燃料油中的芳香氮污染物及其脱除方法

燃料油是不同种类有机分子的混合物,其中也有含硫或氮的杂环芳香烃。燃料油中的含氮化合物主要分两种:碱性氮化物和非碱性氮化物。所谓碱性氮化物是指在冰乙酸溶液中能与高氯酸反应的氮化物,目前已经分离鉴定的碱性氮化物主要是喹啉、喹啉及其衍生物;非碱性氮化物主要包括吡咯、吡啶、唑啉及其烷基衍生物。石油中的总氮量(质量含量)通常在 0.02%~0.8%,其中非碱性类占总氮的 70%~75%。国产油含氮量偏高,通常在 0.1%~0.5%^[1,2,4]。因此,燃料油的脱氮已成为摆在人们面前的一个新的课题。

燃料油中的含氮杂环化合物以唑啉为主。唑啉是一种诱变剂,尽管其本身的毒性不强,但很易变为有致癌活性的衍生物。近年来又发现一些二氮杂苯并唑啉类化合物,也具有明显致癌性,其中 11-氮杂-二苯并(c,i)唑啉及 1-氮杂-二苯并(a,j)唑啉为中强致癌物^[5]。唑啉的燃烧能直接导致氮氧化物的形成,氮氧化物的释放会形成酸雨。而且,唑啉还是一种极强的加氢脱硫抑制剂。因此,唑啉和其它氮化物的去除将显著提高催化裂化的范围和精炼油产量。实验证明,

去除原油中 90% 的氮,可以使汽油产量提高 20%,还能减少设备的腐蚀,降低精炼费用^[1,6]。

目前,去除含氮杂环芳香化合物主要有 4 种方法:酸洗法、加氢法、吸附法和微生物降解法。酸洗法需消耗一定数量的化学品,又遗留了处理酸废液(渣)的问题;加氢法成本高,且会改变石油的其它组分;吸附法虽然脱氮效果好,但操作工艺繁琐,自动化程度低,吸附剂难以再生^[2,3]。因此,芳香氮化物的去除应主要依靠微生物技术来解决。

目前微生物脱氮的研究主要集中于石油中的非碱性氮化物,尤其是唑啉及其烷基衍生物。而碱性氮化物用溶解提取法较易分离^[7]。已有报道以唑啉为唯一氮源的培养基富集的微生物能降解柴油中多种烷基唑啉,形成无毒的水溶性产物^[8]。

2 微生物降解芳香氮化物的生化途径

能降解石油中氮化物的微生物可从烃污染的土壤或水中分离到。从自然界分离的 *Pseudomonas aeruginosa* 能选择性地降解喹啉和甲基喹啉而不损失燃料油的热值^[9,10]。有报道称 *Bacillus*、*Xanthomonas*、*Burkholderia*、*Comamonas*、*Beijerinckia*、*Rhodococcus*、*Serratia*、*Mycobacterium* 和 *Aspergillus* 等属的菌能降解非碱性类氮化物^[11,12],而 *Rhodococcus*、*Nocardia*、*Moraxella* 和 *Desulfobacterium* 等属的菌能降解碱性类氮化物^[13]。细菌对许多氮化物的降解都是通过最初的酶促步骤产生二羟化的中间产物,然后以间位(*meta*-)或者是邻位(*ortho*-)裂解苯环,再进入中心代谢途径——TCA 循环。微生物可通过这种外围途径扩大底物的摄取范围。

2.1 碱性类氮化物的降解

能降解碱性氮化物的主要是 *Pseudomonas*, 也有 *Rhodococcus*、*Nocardia*、*Moraxella* 和 *Desulfobacterium* 等。喹啉、喹啉及其衍生物的降解主要是有氧降解,也有一些是厌氧降

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-22-23505967; E-mail: meor@nankai.edu.cn

作者简介: 李珊珊(1983-),女,吉林省人,硕士研究生。E-mail: shanshan0320@163.com

收稿日期: 2005-12-05; 接受日期: 2006-01-06; 修回日期: 2006-03-21

解。以 *Pseudomonas* 降解喹啉为例(图1), 菌株通常对喹啉进行单羟化, 形成 2-羟喹啉。第二个单加氧酶继续将其变为 2,8-二羟喹啉, 进而变为 8-羟香豆素。然后, 裂解环形成 2,3-二羟苯丙酸, 再进一步降解。其它的喹啉降解途径都经历芳香环的氧化和环的裂解。异喹啉的降解途径至今还不清楚, 但是代谢产物的质谱分析表明 1-氧-1,2-二氢异喹啉是最初的氧化产物^[14,15]。

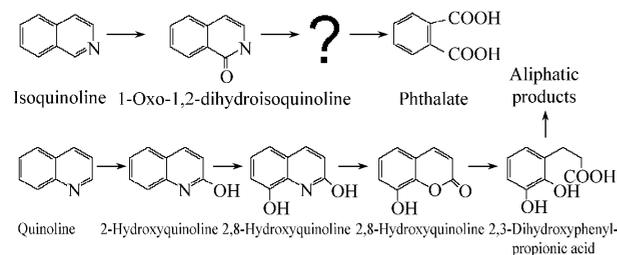


图1 喹啉的降解途径

Fig.1 Pathways for the degradation of quinolines.

2.2 非碱性类氮化物的降解

在非碱性类氮化物中, 吡咯和吲哚很容易被微生物降解, 而咔唑则很难降解。吲哚可由儿茶酚途径降解或直接转变为色氨酸, 也可经龙胆酸盐途径被降解。 *Alcaligenes* 属的一个菌株可由以下途径降解吲哚: 吲哚(indole) - 吲哚酚(indoxyl) - 吲哚满二酮(isatin) - 氨基苯甲酸(anthranilic acid) - 龙胆酸(gentisic acid)^[11]。

虽然咔唑相对难降解, 但有报道已分离到降解咔唑的菌株^[16,17,18]。例如, Salo^[17,19]等分离到的 *Pseudomonas resinovorans* CA10。首先是咔唑双加氧酶(CARDO)催化的转角双氧化(angular dioxygenation)生成 2,3-二羟基-2'-氨基联苯(2'-aminobiphenyl-2,3-diol), 再在环裂解酶 CarB 的催化下以间位裂解方式裂解双醇环, 进一步在水解酶 CarC 作用下水解成 2-羟-2,4-二烯戊酸和氨基苯甲酸, 分别经 CarDEF 和 AntABC 等酶的作用后, 进入 TCA 循环(图2)。最初的转角双氧化很难进行, 这可能就是咔唑难被微生物降解的原因。这种氧化模式不仅针对咔唑, 也发生于咔唑的类似物氧芴(dibenzofuran)的降解中^[20]。

CARDO 是一种复合双加氧酶, 它的底物范围很广, 能催化不同的氧化反应, 如: 转角双氧化、顺式双羟化、单氧化等^[21]。它由末端加氧酶 CarAa(132kDa) 铁氧还蛋白组分 CarAc(13kDa) 和铁氧还蛋白还原酶 CarAd(37kDa) 组成^[22,23]。虽然已知的大多数复合双加氧酶的末端加氧酶组分是由大(α)小(β)两个亚基组成, 但 CARDO 的末端加氧酶组分只有一种蛋白 CarAa, CarAa 与其它复合双加氧酶的末端加氧酶组分的大亚基有 27%~30% 的同源性, 是一种新型的末端加氧酶^[20]。CarAa 是三聚体, 每个单体都有一个^[22,25]簇结合位点和一个 Fe 原子结合位点。CarAc 和 CarAd 是单体, NADH 和 NADPH 都可作为 CarAd 的电子供体, 但 NADH 比 NADPH 活性更高。CarAd 可被 NADH 和 NADPH 还原, CarAc 可被 CarAd 还原, CarAa 可被 CarAc、CarAd 和 NADH 还原^[22,24]。

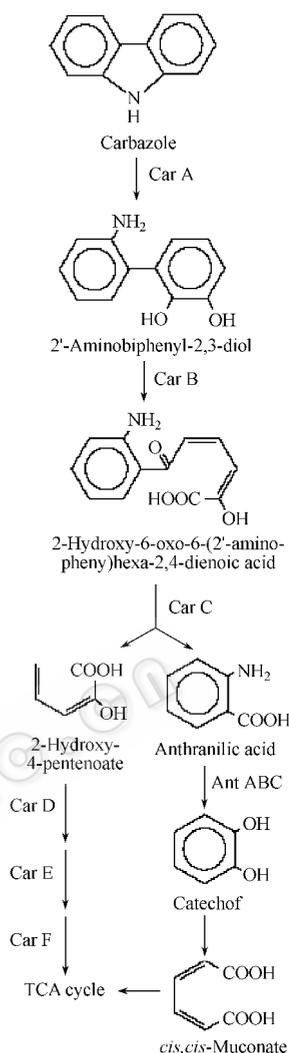


图2 *Pseudomonas resinovorans* CA10 中的咔唑降解途径

Fig.2 The proposed pathways for the degradation of carbazole in *Pseudomonas resinovorans* CA10.

3 咔唑降解基因的分子遗传学研究进展

Sato 等^[19,25]确定和克隆了 *Pseudomonas resinovorans* CA10 中负责咔唑降解的基因。通过应用底物发光类似物 2,3-二羟联苯, 在 *Escherichia coli* 中筛选表达间位环裂解方式酶的基因库, 确定了编码整个咔唑降解途径的基因(图3), 编码上游代谢酶的基因组成 *carAaBaBbCacAd* 基因簇, 两个 *carAa* 基因除一个碱基对不同外, 其余完全相同, 因此 *carAa* 编码的酶有可能是咔唑降解过程的限速酶, 基因重叠能提高这种酶的拷贝数^[24,26]。操纵子的缺失和互补分析显示 *carBa* 和 *carBb* 共同编码间位环裂解酶 CarB^[27]。ORF7 与其它的降解酶没有同源性, 对于咔唑双加氧酶的活性不是必需的^[26]。*carDFE* 基因簇位于 *car* 基因簇下游。另外, CA10 的 *antABC* 基因簇位于 *car* 基因簇的上游 21kb 左右。有趣的是, *antA* 基因的 5' 端部分碱基与 IS5 *car2* 一起由复制型转座转到紧接 *carAa* 基因的上游, 形成融合开放阅读框(ORF)——ORF9 和 IS5 *car1*, 这表明了 *car* 基因和它附近基因有新的遗传结构存

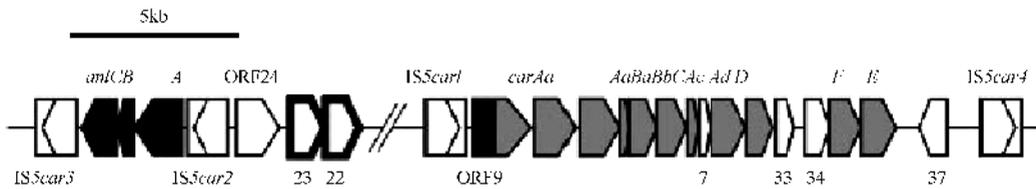


图3 咔唑降解质粒 pCAR1 中 *car* 和 *ant* 基因簇的基因排列

Fig.3 Genetic organization of genes for carbazole degrading on carbazole-degradative plasmid pCAR1. Black and gray pentagons represent the genes and their transcriptional directions of the *ant* and *car* gene clusters, respectively. Pentagons in IS5car1 2 3 4 represent the transposase genes. Unknown ORFs are shown as a white pentagon. The black box located in the 5' region of ORF9 represents the transposed 5' portion of *antA*. ORF22 and ORF23 are represented by pentagons with thick lines.

在。IS5car2 与 IS5car1 只有一个碱基对的差异 (IS5car2 中的 T 在 IS5car1 中被 C 取代)。而 *antA* 基因的 5' 端与 ORF9 的 5' 端相比, ORF9 缺少 *antA* 基因的 5' 端的 163bp 长的 DNA 而且由一个 G 碱基取代了 AT。在被删除的 163bp 长的 DNA 中没有正向重复序列 (DRs) 或反向重复序列 (IRs), 这可能利于其在同源重组或转座中删除。ORF9 的 3' 端与 *ant* 基因没有同源性。CA10 的 *car* 基因和 *ant* 基因都位于咔唑降解质粒 pCAR1 中。pCAR1 的核苷酸序列中, *car* 和 *ant* 基因簇均位于 73kb 的转座子 *Tn4676* 中。此外, 发现 3 个编码调节子的开放阅读框, 其中的 ORF22 和 ORF23 也位于 *Tn4676* 中^[21-26]。

在 *Acinetobacter* sp. ADP1 菌株中, 编码二组分 AntDO 的 *antABC* 基因的表达需要氨基苯甲酸盐的诱导。而在 *Pseudomonas resinovorans* CA10 中, 位于 pCAR1 的 *ant* 基因由 P_{ant} 启动子转录成一单独的 mRNA。ORF23 的产物 (AntR) 对于氨基苯甲酸盐诱导的 P_{ant} 转录是必需的, *carAa* 基因的转录也需要氨基苯甲酸盐的诱导, 这暗示了转座的 P_{ant} 启动了氨基苯甲酸盐诱导的 AntR 调控 *car* 基因的转录^[19-21, 24-26]。

通过对 *carA* 基因产物的底物特异性研究, 构建了携带 *carAa*, *Ac* 和 *Ad*, 只表达 *carA* 编码蛋白的质粒。该工程菌能降解多种芳香化合物, 包括咔唑, N-甲基咔唑, N-乙基咔唑, 二苯咪喃, 二苯并噻吩, 芘, 吩嗪, 吩噻嗪, 氧杂蒽, 联苯, 萘, 菲, 蒽, 荧蒽^[24]。在重组的 CARDO 系统中, 虽然铁氧还蛋白 CarAc 对于电子传递是不可缺少的, 但其它一些还原酶也可取代铁氧还蛋白还原酶 CarAd。这表明 CARDO 可能与其它的氧化还原体系的电子传递有所差别, 在 CarAc 和 CarAa 间有更严格的识别机制^[22]。

4 国内微生物脱氮的研究进展

目前, 国内对微生物降解含氮杂环化合物的研究还处于起步阶段, 总结原因主要有一下几点 (1) 相关机构的重视不够。石油中含有一定量的非烃化合物, 如含硫化物、含氮化合物、含氧化合物等, 其中硫化物的含量较多, 氮化物少于硫化物, 而且所包含的种类也比较少。因此, 相关的人员都致力于燃料油中有机硫化物的脱除, 从而忽略了氮化物, 孰不知氮化物对油品的影响丝毫不亚于硫化物。(2) 对咔唑代谢途径的研究进展缓慢。目前已发现的咔唑降解菌中只有 *Pseudomonas* sp. CA10 的代谢途径较清楚, 其他菌株对咔唑的降解途径均不明。这可能是由于咔唑代谢产物含

量较低, 且大多极性较强, 挥发性差, 沸点高, 使得常用的化合物定性分析方法 (如 GC-MS) 行不通。这严重阻碍了对咔唑代谢途径的研究, 与生物脱硫的研究相比, 至今人们对有机氮代谢途径和机理的认识仍然很少, 使得微生物脱氮技术难以投入实际应用。

已有报道, 李力、于波等筛选到一株金色单胞菌 *Chryseomonas* sp. XLDN429, 在其分解咔唑过程中也发现了终产物邻氨基苯甲酸, 但此微生物的有机氮利用谱与已报道的假单胞菌 *Pseudomonas* sp. CA10 不同。而且, 初步研究结果还发现此菌株具有降解有机硫的特性, 且性状稳定^[5]。目前本实验室已筛选到专一性降解咔唑的 *Pseudomonas* sp. DN-1 菌株, 正在进行脱氮性能的研究。计划构建只保留咔唑降解第一步反应的突变或重组菌株, 避免繁琐的后处理问题和燃烧值的损失。因此, 需要对咔唑降解过程中的酶进一步表征, 并通过遗传操作优化酶系的组成和表达。

5 总论

在目前全球对清洁燃料要求日趋严格的形势下, 微生物脱氮研究将在油品加工领域迅速发展。微生物脱氮可有两种应用: 除氮和降低催化剂中毒。除氮工艺经济与否受部分含氮碳氢化合物损失的影响。目前的咔唑降解途径类似于微生物脱硫中二苯并噻吩 (DBT) 降解的 Kodama 途径^[30], 脱除氮的同时裂解碳骨架, 损失燃烧值, 因此无实用价值。或许我们可以氨基酸的形式回收咔唑氮, 用于诸如色氨酸合成等方面。但是, 人们应该更关注可替代的咔唑降解代谢途径, 如 *Nocardioides* sp. 能释放啉啉中的氮为氨^[9]。类似微生物脱硫中的“4S”途径^[28-29]。我们应该致力于找寻微生物脱氮的“4S”类似途径, 只有这样, 才能构成商业化微生物脱氮的基础。总之, 在碳氢化合物的炼制过程中, 加氢精制仍占主导, 微生物技术并没有被广泛应用。燃料油中氮硫含量的严格限制迫使我们控制含氮硫的杂环芳香化合物含量。已有报道, 脱氮有助于深度脱硫。韩国 SK 公司发现, 加氢脱硫前预脱除石油中的含氮极性化合物能大大改进加氢脱硫效率, 而且可使加氢脱硫的氢耗比常规技术少 10% ~ 20%, 同时延长催化剂寿命。目前已知微生物能选择性地氧化石油中低浓度的含氮和含硫组分, 如果攻克主要的工艺技术难关, 同步生物脱氮和脱硫将在石油精炼中得到大规模的应用。

参 考 文 献

- [1] Michael JB, Philip RG, Robert RR, *et al.* Microbial denitrogenation of fossil fuels. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**(9):390-395.
- [2] 齐江, 张瑾, 戴猷元. 石油产品溶剂脱氮研究进展. *现代化工*, 1999, **1**:9-11.
- [3] 周卫国, 吴旭洲. 煤焦油中萘、菲、喹啉的精制及利用. *煤化工*, 2002, **1**:1-5.
- [4] Jha AM, Bharti MK. Mutagenic profiles cabazole in the male germ cells of Swiss albino mice. *Mutation Res*, 2002, **500**(1):97-101.
- [5] 李力, 于波, 许平. 化石燃料生物脱有机氮研究进展. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**(6):64-67.
- [6] 尚亚卓, 白文玉, 曹祖宾, 等. 轻质油品脱氮工艺技术进展. *抚顺石油学院学报*, 2001, **21**(4):20-24.
- [7] Rhee SK, Lee GM, Yoon JH, *et al.* Anaerobic and aerobic degradation of pyridine by a newly isolated denitrifying bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(7):2578-2585.
- [8] Phillip MF, Donald WSW. Microbial degradation of alkyl carbazoles in norman wells crude oil. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **47**:858-862.
- [9] Rhee SK, Lee KS, Chung JC, *et al.* Degradation of pyridine by *Nocardioideis* sp. OS4 isolated from the oxic zone of spent shale column. *Can J Microbiol*, 1997, **43**:205-209.
- [10] Aislabie J, Bej AK, Hurst H, *et al.* Microbial degradation of quinoline and methylquinolines. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**:345-351.
- [11] Zhang S, Brendon JM, Jan ST, *et al.* Indole-diterpene gene cluster from *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(11):6875-6883.
- [12] Boyd C, Larkin MJ, Reid KA, *et al.* Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(1):151-155.
- [13] Jackie A, Asim KB, Harrell H. Microbial degradation of quinoline and methylquinoline. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **56**(2):345-351.
- [14] John JK II, Rajaram R, Lisa C, *et al.* Selective removal of nitrogen from quinoline and petroleum by *Pseudomonas ayucida* IGTN9m. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(2):688-693.
- [15] Resnick SM, Torok DS, Gibson DT. Oxidation of carbazole to 3-hydroxycarbazole by naphthalene 1,2-dioxygenase and biphenyl 2,3-dioxygenase. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, **113**:297-302.
- [16] Gieg LM, Otter A, Phillip MF. Carbazole degradation by *Pseudomonas* sp. LD2: metabolic characteristics and the identification of some metabolites. *Environ Sc Technol*, 1996, **30**:575-585.
- [17] Ouchiyama N, Zhang Y, Omori T, *et al.* Biodegradation of cabazole by *Pseudomonas* sp. CA06 and CA10. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, **57**(3):455-460.
- [18] Hisatsuka K, Sato M. Microbial transformation of carbazole to anthranilic acid by *Pseudomonas stutzeri*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, **58**(1):213-214.
- [19] Masaaki U, Masatoshi M, Satoshi K. Transcriptional regulation of the *ant* operon, encoding two-component anthranilate 1,2-dioxygenase, on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Journal of Bacteriology*, 2004, **186**(20):6815-6823.
- [20] Bünz VP, Cook AM. Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW1: angular dioxygenation by a three-component enzyme system. *Journal of Bacteriology*, 1993, **175**:6467-6475.
- [21] Hideaki N, Nam JW, Mikiko K. Diverse oxygenations catalyzed by carbazole 1,9a-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain CA10. *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**(10):3105-3113.
- [22] Nam JW, Hideaki N, Haruko N. Purification and characterization of carbazole 1,9a-dioxygenase, a three-component dioxygenase system of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(12):5882-5890.
- [23] Sato S, Naoki O, Toshiaki K. Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. strain CA10: nucleotide sequences of genes and characterization of meta-cleavage enzymes and hydrolase. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(15):4841-4849.
- [24] Sato S, Nam JW, Kano K. Identification and characterization of genes encoding carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(15):4850-4858.
- [25] Kevin GK, Phillip MF. A review of the occurrence, toxicity, and biodegradation of condensed thiophenes found in petroleum. *Can J Microbiol*, 1998, **44**:605-622.
- [26] Hideaki N, Hiroyo S, Kana M. Genetic characterization and evolutionary implications of a car gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. *Journal of Bacteriology*, 2001, **183**(12):3663-3679.
- [27] Phillip RG, Robert RR, Leon M. Purification and characterization of aminobiphenyl-2,3-di-ol 2,2-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. LD2. *Protein Expression and Purification*, 2003, **32**:35-43.
- [28] Kevin AG, Olga SP, Gregory TM. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nature Biotechnology*, 1996, **14**:1705-1709.
- [29] Michimasa K, Masaaki I, Takeshi O. Efficient production of desulfurizing cells with the aid of expert system. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, **5**:143-147.

Microbial denitrogenation of fuel oil

LI Shan-shan , MA Ting , LI Guo-qiang , LIANG Feng-lai , LIU Ru-lin*

(College of Life Sciences , Nankai University , Tianjin 300071 , China)

Abstract :The amount of organic nitrides contained in fuel oil is smaller than the one of organic sulfur compounds , but the existence of them is enough to affect the invariability of oil product greatly , and has a big effect on the color of oil. They also contribute to catalyst poisoning during the refining of crude oil , thus reducing the catalyzing rate of the catalyst and increasing process costs. Further more , some nitrogen organic compounds possess mutagenic and toxic activities. The combustion of these contaminants form nitrogen oxides (NO_x) , releasing of which to the air will cause the formation of acid rain and hence to air pollution. The classical hydroprocessing methods of nitrogen removal are costly and complicated , so the scientists are more and more interested in microbial denitrogenation. The aspects as follows are introduced , including the aromatic nitrogen compounds of fuel oil , the varieties of denitrogenation techincs , the classes of microbial denitrogenation and its biochemical pathways , molecular genetics developments of carbazole-degradative genes , and our opinion of the research direction in the future.

Keywords : Fuel oil ; Microbial denitrogenation ; Carbazole ; Carbazole dioxygenase(CARDO)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-22-23505967 ; E-mail : meor@nankai.edu.cn

Received 5 December 2005/Accepted 16 January 2006/Revised 21 March 2006