

# 生物脱硫的研究新进展\*

黄彦君<sup>1</sup> 浦跃武<sup>1</sup> 叶代启<sup>2</sup> 梁世中<sup>1</sup>

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)<sup>1</sup>

(华南理工大学造纸与环境工程学院 广州 510640)<sup>2</sup>

**摘要:**化石燃料的脱硫形势日益严峻。生物技术为脱有机硫提供了一条经济有效的可行之路。阐述了近几年生物脱硫在许多方面的重大进展,主要包括:新菌种的分离,生物脱硫机制的研究,应用直接进化技术提高酶的催化效率,新型反应器的设计及有价值的化学副产品的生产等。

**关键词:**生物脱硫(BDS),二苯并噻吩(DBT),有机硫

**中图分类号:**Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2003)02-0089-04

硫广泛存在于化石燃料中,其中有70%是以杂环化合物形式存在,包括苯并噻吩、二苯并噻吩(DBT)及其他噻吩<sup>[1]</sup>。化石燃料燃烧后,硫就以各种形式排入大气,最主要的是SO<sub>2</sub>。它不仅腐蚀设备,而且对空气造成严重污染,甚至形成酸雨。因此,为了保护环境,各个国家相继制定实施了SO<sub>2</sub>的排放标准或机车燃料(如柴油、汽油等)的硫含量标准。据估计,今后10年内,30%的石油需要脱硫<sup>[2]</sup>。

传统的加氢脱硫方法(HDS)难以有效除去有机硫,如DBT及其衍生物,而且成本高,操作困难。因此,HDS已经渐渐难以满足日益严格的脱硫要求。而生物脱硫不仅可以有效脱去有机硫,还保留了燃料的燃烧热值,而且操作简单,成本低,产生的温室气体少。故生物脱硫被认为可以有效补充HDS甚至取代HDS<sup>[3]</sup>。

## 1 脱硫新菌种的分离

DBT是公认的脱有机硫模式化合物,据此分离出来的菌种可有效脱有机硫,且不破坏C-C结构从而保留了燃料的热值。迄今为止,已分离出的菌种包括:假单胞菌(*Pseudomonas* sp.),红球菌(*Rhodococcus* sp.),棒杆菌(*Corynebacterium* sp.),短杆菌(*Brevibacterium* sp.),戈登氏菌(*Gordona* sp.),诺卡氏菌(*Nocardia* sp.)。其中,1989年美国天然气研究所分离得到的*Rhodococcus rhodochrous* IGTS8是研究最多的菌种<sup>[2,4]</sup>。

1998年,Je Hwan Chang等人分离得到戈登氏菌*Gordina* sp. CYKS1<sup>[5]</sup>。除了DBT,该菌株还可以分解20种其他有机硫化物,包括硫醇、亚硫酸盐及噻吩等。实验证明该菌株可以脱去柴油中60%硫(0.15%到0.06%W/W)及汽油中15%硫。不久后,他们又分离出另一株菌诺卡氏菌*Nocardia* sp. CYKS2,同样具有较强的脱有机硫能力<sup>[6]</sup>。

2000年,S. Maghsoudi等人从石油样品中分离得到一株脱硫棒杆菌*Corynebacterium* sp. P32C1<sup>[6]</sup>。该菌株在发酵罐中培养27h就可以将0.25mol/L DBT全部转化成2-HBP。对数生长期后期的休止细胞可在30min内完全转化0.5mol/L DBT,最大的HBP比生产速率达到37mmol/KgDCW·h。与IGTS8相比,P32C1具有更强的脱硫能力。

\*广州市计委科技攻关资助项目

收稿日期:2002-01-28,修回日期:2002-04-25

## 2 脱硫代谢工程

在过去10年中,特别是近年来,杂环硫化物的代谢机制是生物脱硫的研究重点,尤其是利用 *Rhodococcus* 或其他相近菌种进行 DBT 脱硫。研究表明, *Rhodococcus* 特别适合于碳氢化合物的代谢。Folsom 等人在 DBT 及其衍生物的代谢机制方面做了大量的工作<sup>[7]</sup>。C<sub>x</sub>-DBT 的代谢过程中相关的酶或多或少具有对底物的优先选择性。一般说来, DBT 及 C<sub>1</sub>-DBT (苯环上某个位点甲基化) 总是最先受到攻击,其次是更高级的烷基化脂肪烃。甲基的位置还会影响反应的速率。大多数情况下,接近 S 原子的烷基化将导致代谢速率的降低。但在最近的一项专利中, *Sphingomonas* 菌株中的酶却有与此相反的性质<sup>[8]</sup>。这种可变性则被应用到直接进化技术 (direct evolution techniques) 中。

## 3 分子生物学及酶学研究

关于 *Rhodococcus* sp. 菌种特别是 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 的遗传学特性已有大量报道。与 DBT 代谢过程相关的最主要的基因 (命名为 *sox* 和 *dsz*) 已经被克隆、测序并做了相当彻底的研究<sup>[9]</sup>。虽然 *sox* 基因最先被应用,但 *sox* 中含有许多与 DBT 代谢无关的基因。为了避免这些无关基因的干扰, *dsz* 基因已经被普遍接受和应用。*dszA*、*dszB* 和 *dszC* 基因位于一个长为 4kb 的操纵子中<sup>[10]</sup>。增强子的性能受到含硫氨基酸的影响<sup>[11]</sup>。这一结果与抑制机制相符。酶活力受 DBT 诱导这一说法至今未被证实。

关于脱硫基因所编码的酶也有许多报道。Youshikazu Izumi 等人做了大量工作从红球菌 *R. erythropilis* D-1 中分离纯化 DBT 单加氧酶 (*dszC*) 及 DBTO<sub>2</sub> 单加氧酶 (*dszA*), 并结晶鉴定<sup>[12]</sup>。同时,他们发现一株不能降解 DBT 的细菌 *Paenibacillus polyxya* A-1 有更强的脱硫过程必需的 NADH: FMN 氧化还原酶 (由 *dszD* 编码) 并将其分离出来。他们认为, *Paenibacillus polyxya* A-1 是很有应用前景的。

此外,科学家们为构建适于工业生产的优良菌株也做了大量工作。1999 年,将脱硫基因导入假单胞菌在美国首先获得专利<sup>[13]</sup>。另一项专利也已产生:将四羟酮醇还原酶 (flavin reductase) 基因重组到人工合成的操纵子中,使之集合所有 BDS 所需的基因共同转录并得到一段 RNA 序列。

这一方面的研究中,最重要的成果是直接进化技术的成功应用。Coco WM 等人报道,将来自不同菌种的脱硫基因经过“基因混和”(gene shuffling) 获得一种新基因,该基因活力更高,底物特异性更广泛<sup>[11]</sup>。这一结果说明,直接进化技术也是一种获得新杂交酶的方法。

## 4 传质过程的研究

影响到微生物脱硫效率的一个关键因素是细胞对 DBT 等有机硫的吸收能力。它与细胞和有机相之间的接触情况或烃类在液相中的可溶性有关。

Setti L 等人<sup>[14]</sup>将 DBT 溶解在正烷烃 (正十二烷、正十六烷) 和难分解的溶剂 (2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-七甲基壬烷和正二辛基邻苯二甲酸) 中,并研究好氧假单胞菌的 DBT 降解情况。结果发现,与脱硫效率密切相关的因素有 3 个: (1) 微生物对碳氢化合物的依附情况, (2) 物质的扩散, (3) 辅助吸收机制。特别指出的是,他们还发现菌

体对有机相的依附增强时, DBT的降解速率也增加<sup>[15]</sup>。这一结果表明 DBT 依附发生在有机相和无机相的界面。

Daniel J Monticello 等人做了大量关于 *Rhodococcus* 的传质研究。他们发现, *Rhodococcus* 对高度疏水的  $C_x$ -DBT 的传递远比假单胞菌简单容易<sup>[11]</sup>。他们将这一现象归因于 *Rhodococcus* 细胞的疏水性。例如, 在油-水-细胞悬浮液中, 细胞停留在油水交界处, 但水相十分澄清 (证明没有细胞存在水相中)。因此, *Rhodococcus* 可以直接在油中传递疏水的  $C_x$ -DBT, 而假单胞菌只能在水相中传递。这个观点对于了解石油脱硫的速度与程度的制约因素非常重要。

## 5 脱硫工艺研究

尽管使用纯酶作为催化剂可以避免产生不必要的甚至有害的副产物, 但酶的分离纯化费用高, 而且酶催化脱硫反应需要 FMN 等辅助因子, 这些辅助因子在反应结束后难以回收再生。利用完整细胞催化脱硫就可以解决辅助因子的再生问题。此外, 固定化可以实现生物催化剂的重复使用, 减少染菌几率, 改善油水比例, 从而降低成本并提高脱硫效率。因此, 固定化细胞脱硫被认为是最有前景的脱硫方法<sup>[14]</sup>。

Je Hwan Chang 等人用硅藻土固定 CYKS1 和 CYKS2 菌株, 并研究其催化脱硫的能力<sup>[3]</sup>。固定化细胞重复培养 7~8 批, 每批时间为 24h。用 CYKS1 处理标准油 (含有 DBT 的十六烷) 时, 第一批培养可脱去 4.0mmol/L DBT (0.13g 硫/L), 最后一批可脱硫 0.25g/L。平均脱硫速率由第一批的 0.24mg/L·h 上升到最后一批的 0.48mg/L·h。用 CYKS2 催化脱硫时, 重复培养后脱硫速率并无明显变化。如果固定化细胞在 4℃ 的 1mol/L 磷酸缓冲溶液 (pH7.0) 中保存 10d 后, 脱硫活力大约降至初始值的 50%~70%。

Setti 等人<sup>[14]</sup>选择一些亲水性的天然物质作为吸附剂来固定化细胞, 从而消除碳氢化合物吸收机制的制约。这种方法特别适用于水也参与到 DBT 降解反应的脱硫过程。同时, 他们也设计了一个固定化细胞生物反应器。与常用的连续搅拌槽生物反应器相比, 该反应器具有许多优点适于工业生产: 可实现催化剂回收, 油水体积比提高到 90% (连续搅拌槽只有 30%~50%), 反应后可以处理反应溶液, 易于从油中分离催化剂, 不易染菌。

此外, 关于脱硫工艺的新概念包括使用多层气升式发酵罐来克服低硫浓度下的低反应速率并减少混和成本、连续培养以及在反应系统中生物催化剂的再生。

## 6 生物脱硫派生产品的开发

有研究表明, 对塑料合成来说, 石油将是最为经济的复杂单体的来源。应用生物技术由石油生产生物石化产品是生物脱硫的另一种很有前景的应用。在生物脱硫最后一步反应前中止反应, 可以生产大量  $C_x$ -HPBS。  $C_x$ -HPBS 具有水溶性质, 而其烷基化产物是有效的表面活性剂<sup>[11]</sup>。因此, 可以利用剔除了 *dszB* 基因的菌株来生产大量的  $C_x$ -HPBS 作为生物脱硫的副产物, 或者选择价廉的高含硫量的石油专门生产  $C_x$ -HPBS。这项技术成本低而产物价值较高, 所以 BDS 的第一个工业应用很可能是利用低价油品生产表面活性剂。

近几年来,生物脱硫领域取得了巨大的进展,生物脱硫技术日益成熟。但这项技术的工业化,不论是柴油或其他机车燃料的脱硫,还是生产 HBPS 为基础的表面活性剂,都需要对一些尚有争议的问题有更深更透彻的理解,这些问题包括:通过控制操作条件改善传质状况,通过直接进化技术改进酶的性质。十分明显, BDS 的成功应用要求充分结合分子生物学、直接进化技术、代谢机制研究、生物技术及现有精炼操作方法等。为了使生物脱硫技术尽早实现工业化,生物脱硫的研究有待进一步深入。

### 参 考 文 献

- [1] Finnerty W R, Robinson M. *Biotechnol Bioeng Symp*, 1986, **16**: 205 ~ 221.
- [2] Marcela A, Raunel T, Veronica H, *et al.* *Fuel Processing Technology*, 1998, **57**: 101 ~ 111.
- [3] Je H C, Yong K C, Hee W R, *et al.* *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **182**: 30 ~ 312.
- [4] Sung K R, Je H C, Yong K C, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 2327 ~ 2331.
- [5] Folsom B R, Sejoche D R, Digrazia P M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 4967 ~ 4972.
- [6] Maghsoudi S, Kheirloomom A, Vossoughi M, *et al.* *Biochemical Engineering Journal*, 2000, **5**: 11 ~ 16.
- [7] Darzins A, Mrachko G. A *Sphingomonas* biodesulfurization catalyst. US Patent, 2000, 6133061.
- [8] Ohshiro T, Izumi Y. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, **63**: 1 ~ 9.
- [9] Darzins A, Xi L, Childs J, *DSZ* gene expression in *Pseudomonas* hosts. US Patent, 1999, No 5952208.
- [10] Izumi Y, Ohshiro T. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 223 ~ 226.
- [11] Setti L, Labzarabu G, Pifferi P G. *Pro Biochem*, 1995, **30**: 721.
- [12] Izumi Y, Ogsuri T. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, **11**: 1061 ~ 1064.
- [13] Daniel J M. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, **11**: 540 ~ 546.
- [14] W M J, De F. *Proc Biochem*, 1995, **31**: 711.
- [15] Setti L, Lanzarini G, Pifferi P G. *Fuel Processing Technology*, 1997, **52**: 145 ~ 153.