

红串红球菌 USTB-03 对 4,6-二甲基二苯并噻吩的脱硫研究

Biodesulfurization of 4,6-dimethyl Dibenzothiophene by *Rhodococcus Erythropolis* USTB-03

魏玉霞/WEI Yu-xia^{1,2}, 闫海/YAN Hai¹, 肖宝清/XIAO Bao-qing², 李迎霞/LI Ying-xia¹, 吕乐/Lü Le¹

1. 北京科技大学应用科学学院生物科学与技术系, 北京 100083

2. 北京科技大学土木与环境工程学院环境工程系, 北京 100083

1. Department of Biological Science and Technology, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

2. Department of Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

[摘要] 分离出 1 株能够对 4,6-二甲基二苯并噻吩(4,6-DMDBT)进行高效脱硫的微生物菌种,经中国科学院微生物研究所鉴定为红串红球菌 USTB-03。研究表明,与甘油和乙醇相比,葡萄糖是促进红串红球菌 USTB-03 生长和提高其脱硫比活性的最好碳源,最高脱硫比活性可达 298.1 mmol 4,6-DMDBT/(kg·h)。在初始 pH 从 4.0 到 9.0 范围内,pH 7.0 可以使红串红球菌 USTB-03 保持最大的脱硫比活性。进一步研究显示,红串红球菌 USTB-03 对 4,6-DMDBT 脱硫后的最终代谢产物是 3,3-二甲基-2-羟基联苯(2-HDMBP),只有 C-S 键被切断,而 C-C 键未受到破坏。该脱硫途径类似于二苯并噻吩(DBT)特异性脱硫的途径。

[关键词] 红串红球菌 USTB-03, 4,6-二甲基二苯并噻吩, 脱硫活性, 脱硫途径

[中图分类号] Q914.82

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2005)11-0010-04

Abstract: A bacterial strain that has a strong ability in the biodesulfurization of 4,6-dimethyl dibenzothiophene (4,6-DMDBT) was isolated and identified as *Rhodococcus erythropolis* USTB-03 by Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Compared with glycerol and ethanol tested, glucose was found to be a promising sole carbon source for both the growth and the biodesulfurization activity of *R. erythropolis* USTB-03, and the maximum specific activity of 4,6-DMDBT biodesulfurization was 298.1 mmol 4,6-DMDBT/(kg·h). It showed that the

收稿日期: 2005-09-10

基金项目: 国家自然科学基金(20377047)

作者简介: 魏玉霞,女,北京科技大学应用科学学院生物科学与技术系,硕士生,主要从事微生物脱硫研究;E-mail:anniewyx@163.com

闫海(通讯作者),男,北京科技大学应用科学院生物科学与技术系,教授,主要从事环境生物学的研究;

E-mail:haiyan@sas.ustb.edu.cn

降到最低的程度。因此,对每一作战平台的传感器必须看作为一个“网络传感器”,其综合技术涉及到多信息源信息融合处理技术。

3.5 信息互补

不同的影像传感器由于其观测功能的片面性,不能全面地反映目标的整体信息。将不同类型或不同时相的传感器数据进行针对性融合,可以实现信息互补。并且,将侦察监视技术获取的目标信息与其它传感器获取的信息进行融合,可以对重点目标进行识别、跟踪、定位,为全天时、大区域、远距离的预警监视、情报侦察提供完善的测绘保障,从而有效地提高战场的透明度和武器的命中精度。

3.6 提高战场态势感知能力

来自战区作战系统的探测、识别和定位数据经过相关性分析和数据融合处理后,可生成战场战术图像。通过增加相关的历史数据,以及特定战场环境和战术态势下的相关知识,指挥员可以增强对战场态势的感知能力,并根据对己方的武器攻击能力和作战风险的评估,快速确定作战对策。

4 结论

信息融合处理作为一种特殊技术手段已渗透到各军事部门和作战领域,贯穿于战争的全过程,深刻地影响着战争的进程和结局。加强空间信息系统多源信息融合

处理技术研究,将为增强未来高技术条件下网络中心战的战场情报保障能力和武器系统作战能力提供有力的技术支撑,为战略层、战役层、战术层指挥机构快速准确地做出决策提供可靠依据。

参考文献(References)

- [1] 权太范.信息融合,神经网络-模糊推理理论与应用[M].北京:国防工业出版社,2002
- [2] 何友,王国宏,陆大金,彭应宁.多传感器信息融合及应用[M].北京:电子工业出版社,2000
- [3] 李荣常,程建,郑连清.空天一体信息作战[M].北京:军事科学出版社,2003
- [4] 王正德.解读网络中心战[M].北京:国防工业出版社,2004

(责任编辑 王宏章)

highest biodesulfurization activity of *R. erythropolis* USTB-03 was found at initial pH 7.0 in range from 4.0 to 9.0. *R. erythropolis* USTB-03 can selectively remove sulfur in the 4,6-DMDBT, and the dead-end product of 4, 6-DMDBT biodesulfurization was confirmed as 2-hydroxy-3, 3'-dimethyl biphenyl (2-HDMBP), only the bond of C-S rather than C-C was cleaved, which is similar to the sulfur specific biodesulfurization pathway of dibenzothiophene.

Key Words: *Rhodococcus Erythropolis* USTB-03, 4,6-dimethyl dibenzothiophene, biodesulfurization activity, biodesulfurization pathway

CLC Number: Q914.82

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2005)11-0010-04

1 引言

化石燃料燃烧后硫氧化物的排放是形成酸雨、酸雾的主要原因^[1,2]。随着燃料如汽油和柴油用量的不断增加,由此造成的环境污染问题也日趋严重。为此,发达国家已制定出石油产品硫含量的严格标准,如美国、日本等国家规定柴油中的硫含量要低于 50 ppm,并且有望在 2008 年达到 10 ppm 以下。我国也对汽柴油中的硫含量进行了严格的限制,如规定汽油、柴油中硫含量在 2007 年分别要达到 150 ppm 和 350 ppm 以下,并预计在 2010 年均达到 50 ppm 以下,所以采用新技术进一步降低燃料油中的硫含量已成为我国石油工业面临的一个亟待解决的主要课题。

加氢脱硫是目前普遍采用的脱硫方法,不仅需要高温高压的苛刻条件,而且需要价格昂贵的催化剂。虽然加氢脱硫方法对石油中的硫醇类有一定的脱硫能力,但对以二苯并噻吩(DBT)和 4, 6-二甲基二苯并噻吩(4, 6-DMDBT)为代表的杂环类有机硫化物脱硫效果并不明显^[3,4]。自 20 世纪 80 年代,人们发现某些微生物能够对 DBT 进行特异性脱硫以来,生物脱硫法因具有操作条件温和、专一性强、投资小、能耗低、基本无环境污染等优点而成为石油生物脱硫的一个热点,尤其重要的是它可以专一脱除杂环类有机硫化物中的硫,而不破坏 C-C 键,使含硫化物脱硫前后的热值基本不变,因此具有广阔的应用前景。

DBT 和 4, 6-DMDBT 是石油和煤炭中杂环类有机硫化物的典型代表,4, 6-DMDBT 的 4,6 位的 2 个甲基在加氢脱硫过程中存在“端基吸附”的空间位阻,其加氢脱硫的效率要明显低于 DBT,被认为是最难脱硫的有机硫化物之一^[5,6]。因此 4, 6-DMDBT 的生物脱硫研究对完成燃油深度脱硫具有重大意义。目前,国内外的生物脱硫主要以 DBT 为模型化合物,而以 4, 6-DMDBT 为模型化合物的生物脱硫研究比较少,尤其是在脱硫活性调节方面还未见有报道。本研究组在对 DBT 生物脱硫进行一系列研究的基础上^[7,9],分别研究了红串红球菌 USTB-03 对 4, 6-DMDBT 的脱硫活性调节和脱硫途径,在生物脱硫的基础研究和应用方面都具有重要价值。

2 材料与方法

2.1 材料

实验菌种是本研究组从遭受含硫石油污染的土壤中分离得到,经中国科学院微生物研究所鉴定为红串红球菌 USTB-03。4,6-DMDBT 和 2-羟基联苯(2HBP)购于日本和光公司,其它所用化学试剂均为分析纯,使用前未经进一步纯化。

2.2 培养基

基础无硫培养基的组成是(g/L):尿素 1.0; KH_2PO_4 1.2; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 7.0; CaCl_2 0.1; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2; NaCl 0.5; EDTA-2Na 0.2; 柠檬酸铁铵 0.02; 葡萄糖 15; 微量元素液 1 mL,此培养基初始 pH 7.2。微量元素液组成(g/L): ZnCl_2 5.0; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.0; CuCl_2 0.5; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5; EDTA-2Na 1.0。在此培养基中添加溶解于乙醇的 4, 6-DMDBT 作为微生物生长的唯一硫源。

2.3 培养条件

红串红球菌 USTB-03 培养于 500 mL 三角瓶中,培养体积为 100 mL。培养基和实验器皿均经 121 °C, 20 min 的高温高压和超

净工作台紫外灯照射 20 min 灭菌后使用。在洁净工作台内接种菌种后,在摇床中进行批量培养,培养条件是温度 30 °C, 摇床转速 200 r/min。实验开始后每天取样并测定 4, 6-DMDBT 浓度等指标。

2.4 测定方法

采用 722 s 可见分光光度计测定在 680 nm 下的光密度(OD_{680})以示红串红球菌 USTB-03 的生长。

4, 6-DMDBT 及其脱硫最终产物 3, 3'-二甲基-2-羟基联苯(2-HDMBP)用等体积正己烷从水相中提取,提取液在高效液相色谱仪上测定。条件是:高压液相色谱仪(岛津 LC-10AT, SPD-M10Avp 二极管阵列检测器),Zorbax SB-C18 (4.6 mm×25 cm) 分离柱,流动相是 90% 的甲醇水溶液,流速为 1 mL/min,进样量 20 μL ,紫外检测波长为 235 nm。根据测定的标准曲线,通过峰面积来计算出 4, 6-DMDBT 的浓度。

4, 6-DMDBT 脱硫最终产物经乙酸乙酯提取后在 GC-MS (岛津 QP2010) 上分析鉴定。分析条件是:采用全扫描模式,扫描范围 35~350 amu,溶剂延迟时间 8.0 min,电子轰击能量 70 eV,离子源温度 200 °C,传输线温度 250 °C,倍增器电压 1.0 kV; DM-1ms 毛细管柱(60 m×0.25 μm ×0.25 mm),程序升温,初温 100 °C,保持 5 min,然后以 10 °C/min 的升温速率至 250 °C,保持 30 min; 氦气为载气,进样量 50 μL 。

2.5 脱硫比活性测定

培养物经离心后去上清,加入一定体积的 100 mM 的磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0),清洗离心细胞 2 次后,配制成一定细胞浓度和初始 4, 6-DMDBT 浓度为 100 mg/L 的反应液。脱硫活性测定反应在摇床内进行。反应条件:温度 30 °C, 转速 200 r/min,反应时间 1 h。反应结束后加入(1.0 % V/V)盐酸中止反应,然后用等体积正己烷提取 4, 6-DMDBT 进行测定。脱硫比活性指标按每 kg 细胞干重每小时去除的 4, 6-DMDBT [mmol 4, 6-DMDBT/(kg·h)]量表示。

3 结果和讨论

3.1 不同碳源对菌种生长和脱硫比活性的效应

图 1 为在 4,6-DMDBT 初始浓度都为 50 mg/L 时,分别以 15 g/L 的葡萄糖、甘油和乙醇作为唯一碳源时红串红球菌 USTB-03 的生长曲线。与甘油和乙醇相比,发现葡萄糖是促进红串红球菌 USTB-03 生长的最好碳源,在 96 h 时 $\text{OD}_{680 \text{ nm}}$ 达到 4.55;而以甘油和乙醇作为唯一碳源的情况下,96 h 时 $\text{OD}_{680 \text{ nm}}$ 分别仅为 2.13 和 1.01。

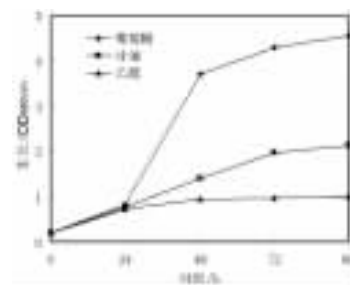


图 1 不同碳源对红串红球菌 USTB-03 生长的效应

图 2 显示了分别以葡萄糖、甘油和乙醇作为唯一碳源时, 红串红球菌 USTB-03 对 4,6-DMDBT 脱硫的动力学过程(a)及最终脱硫产物的生成过程(b)。图 2(a)显示, 以葡萄糖为唯一碳源时, 初始浓度为 50 mg/L 的 4, 6-DMDBT 在 48 h 浓度已经降低到 0; 以甘油作为唯一碳源时, 在 96 h 4, 6-DMDBT 浓度降低为 0; 而以乙醇作为唯一碳源时, 96 h 仍检测到 4, 6-DMDBT 存在。图 2(b)显示, 以葡萄糖为唯一碳源时, 脱硫最终产物的浓度(以峰面积表示)最高, 且在 48 h 已经接近最大值; 以甘油为唯一碳源时, 最终脱硫产物的浓度略低, 但在 96 h 才逐渐升高至最大; 而以乙醇为唯一碳源时, 最终脱硫产物的浓度最低, 其生成速度较慢。

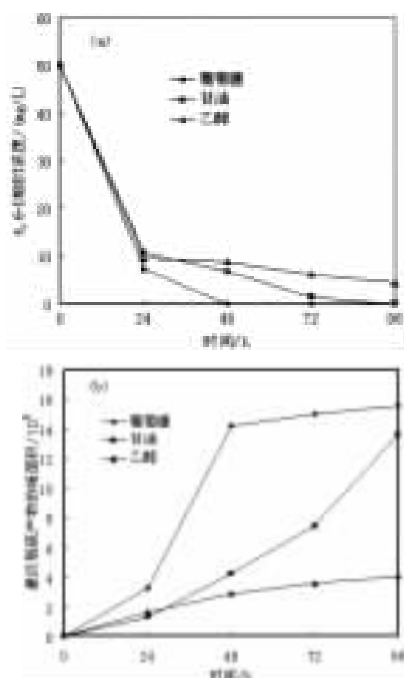


图 2 不同碳源下 4,6-DMDBT 脱硫(a)和最终脱硫产物生成曲线(b)

图 3 显示生长于不同碳源下红串红球菌 USTB-03 对 4, 6-DMDBT 的脱硫比活性。生长于葡萄糖红串红球菌 USTB-03 的脱硫比活性最高, 达到 298.1 mmol 4, 6-DMDBT/(kg·h), 分别为生长于甘油和乙醇为碳源时红串红球菌 USTB03 脱硫比活性的近 2 倍和 3 倍。

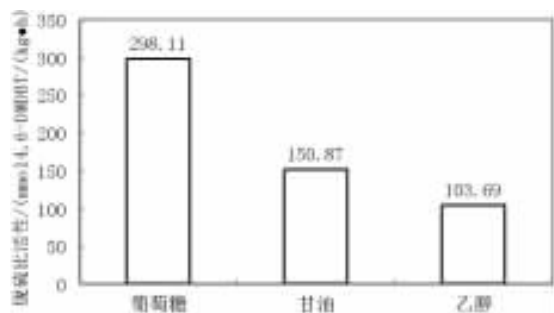


图 3 生长于不同碳源下红串红球菌 USTB-03 对 4,6-DMDBT 的脱硫比活性

因为在 4, 6-DMDBT 生物脱硫过程中, 4, 6-DMDBT 只作为微生物生长的硫源而非碳源, 因此碳源化合物的选择与控制在培养微生物菌种和控制 4, 6-DMDBT 脱硫活性方面有着非常重要的作用。据报道, 在 DBT 特异生物脱硫过程中, 采用可燃性气体传感器控制乙醇浓度为 1.0 g/L 进行发酵培养红串红球菌, 可以

明显提高菌株的脱硫比活性, 其机理是乙醇能够促进决定脱硫酶 dsz C 和 A 表现出活性关键辅酶 FMNH₂ 的生物合成^[7]。本研究结果(图 1~3)显示, 在批量培养中, 与甘油和乙醇相比, 葡萄糖是促进红串红球菌 USTB-03 生长和提高其脱硫比活性的较好碳源。因为本研究采用批量培养方式, 在采用乙醇作为碳源时无法进行乙醇浓度的恒定控制, 因此与葡萄糖和甘油作为碳源相比, 红串红球菌 USTB-03 的生长和脱硫活性都很低。

脱硫比活性是衡量脱硫微生物菌种脱硫效率的主要指标, 具有高脱硫活性的菌种不仅具有重要的基础研究价值而且具有很好的应用前景。目前国内报道的红球菌 SDUZAWQ 在 48 h 内可降解 62% 的 100 mg/L 的 4, 6-DMDBT^[10], 而我们筛选培养的红串红球菌 USTB-03 在 1 h 内就可降解去除 80 mg/L 的 4, 6-DMDBT, 脱硫比活性达到了 298.1 mmol 4, 6-DMDBT/(kg·h)。目前虽然有 DBT 微生物脱硫比活性的文献, 但在 4,6-DMDBT 生物脱硫比活性方面尚未见有其它相关研究报道。

3.2 不同初始 pH 值对菌种脱硫比活性的效应

培养 96 h 后离心收获生长于葡萄糖的红串红球菌 USTB-03 细胞, 加入不同初始 pH 值的磷酸盐缓冲溶液和 100 mg/L 4, 6-DMDBT 进行反应。图 4 显示了在不同 pH 值条件下红串红球菌 USTB-03 对 4, 6-DMDBT 脱硫比活性指标。结果表明, 在 pH 4.0~7.0 的酸性范围内, 红串红球菌 USTB-03 对 4, 6-DMDBT 的脱硫比活性随 pH 值升高而增大, 在 pH 7.0~9.0 的碱性范围内, 脱硫比活性随 pH 值的升高而降低, pH 值为 7 时脱硫比活性最大, 说明 pH 中性条件可以保持红串红球菌 USTB-03 对 4,6-DMDBT 的最大脱硫比活性。

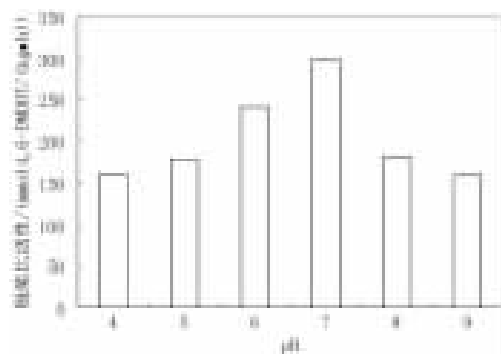


图 4 不同 pH 值对红串红球菌 USTB-03 对 4,6-DMDBT 的脱硫比活性的效应

3.3 红串红球菌 USTB-03 对 4, 6-DMDBT 的生物脱硫途径

图 5(a)为在初始 4, 6-DMDBT 浓度为 50 mg/L 下, 红串红球菌 USTB-03 对 4, 6-DMDBT 脱硫的最终产物的 HPLC 谱图。图 5(b)为 4, 6-DMDBT 脱硫最终产物和 2-羟基联苯(2HBP)在 200~300 nm 内的紫外扫描图谱, 二者的相似系数达 0.987 8, 因此推测该产物可能为与 2HBP 类似的 3, 3-二甲基-2-羟基联苯(2-HDMBP)。为了证实我们的推测, 采用 GC-MS 对脱硫产物进行了进一步鉴定。图 6(a)为样品总离子的出峰图谱, 其中保留时间为 22.6 min 的出峰是 4, 6-DMDBT 脱硫后的最终产物出峰。图 6(b)是脱硫最终产物对应离子流出峰的质谱图, 显示该产物的质荷比(m/z)为 198, 因此确定 4, 6-DMDBT 脱硫最终产物的分子量为 198, 这与 2-HDMBP 的分子量为 198 完全一致, 由此确定 4, 6-DMDBT 脱硫最终产物为 2-HDMBP。

以 DBT 为模型化合物的生物特异脱硫途径和机理显示, 在微生物分泌的 3 种酶和 1 种辅酶 FMNH₂ 催化下, 分 4 步特异性地断裂 C-S 键, DBT 全部转化 2HBP 作为脱硫最终产物, 同时释放溶解于水的亚硫酸。本文以 4, 6-DMDBT 作为目标化合物进行

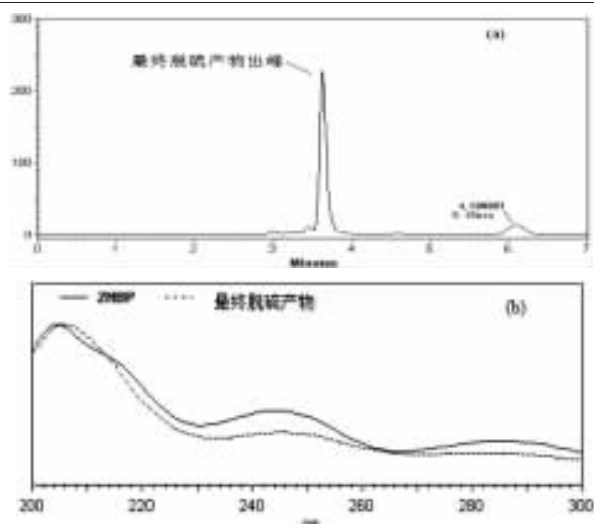


图5 红串红球菌 USTB-03 对 4,6-DMDBT 最终脱硫产物的 HPLC 谱图(a)和 2-羟基联苯(2HBP)和 4,6-DMDBT 最终脱硫产物的紫外吸收扫描谱图(b)

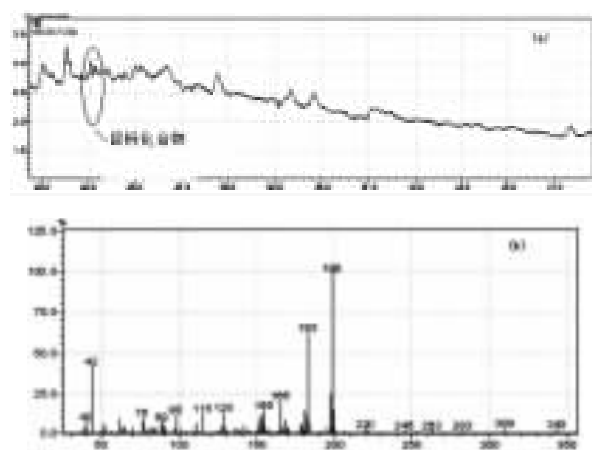


图6 总离子流图(a)和质谱图(b)

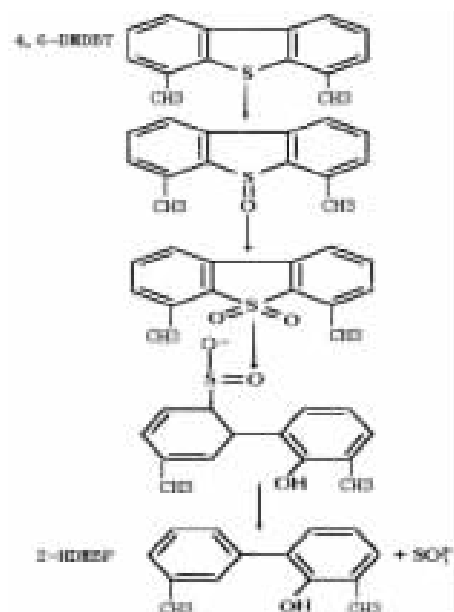


图7 红串红球菌 USTB-03 对 4,6-DMDBT 的生物脱硫途径

生物脱硫,发现最终脱硫产物是 2-HDBP,因此推断出红串红球菌 USTB-03 对 4, 6-DMDBT 的生物脱硫途径(图 7)与 DBT 特异性脱硫的途径类似,也只破坏了 4, 6-DMDBT 中的 C-S 键,而不破坏 C-C 键,因此使 4, 6-DMDBT 脱硫前后的热值基本不受影响,是一种最高效的脱硫方式。此研究结果与国外 Takashi Ohshiro^[11]报道的红串红球菌 H-2(*Rhodococcus erythropolis* H-2)和 PING Xu^[12]报道的分支杆菌(*Mycobacterium* sp. X7B)对 4, 6-DMDBT 生物脱硫途径的研究结果一致。目前关于红串红球菌 USTB-03 脱硫酶和基因的研究工作正在进一步进行之中。

4 结论

1) 与甘油和乙醇相比,葡萄糖是支持红串红球菌 USTB-03 生长和提高其对 4, 6-DMDBT 脱硫比活性的最好碳源,最高脱硫比活性可达 298.1 mmol 4, 6-DMDBT/(kg·h)。

2) 在 pH 值从 4.0 到 9.0 范围内,pH 7.0 可以使红串红球菌 USTB-03 保持最大脱硫比活性。

3) 红串红球菌 USTB-03 对 4, 6-DMDBT 的生物脱硫最终产物为 2-HDBP,该途径只破坏 C-S 键,而不破坏 C-C 键;因此,4, 6-DMDBT 脱硫前后的热值基本不变,具有良好的应用开发前景。

(致谢:本研究同时获北京科技大学 422 高级人才引进基金资助,在此谨表示感谢。)

参考文献(References)

- [1] Kilbane J J. Desulfurization of coal: the microbial solution [J]. *Trends Biotechnol*, 1989, 7: 97~101
- [2] Monticello D J. Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species [J]. *Ann Rev Microbiol*, 1985, 39: 371~389
- [3] 许平,李福利,俞坚,等. 脱硫微生物生产和燃油脱有机硫 [J]. *科学通报*, 2001, 46(18): 1 529~1 533
- [4] 缙仲轩,刘会洲,罗明芳,等. 专一性脱硫菌的分离与鉴定 [J]. *中国科学*, 2002, 32(5): 397~405
- [5] 徐永强,刘晨光. 4,6-二甲基二苯并噻吩在 Co-Mo/ γ - Al_2O_3 上加氢脱硫反应的机理研究[J]. *炼油技术与工程*, 2003, 33(8): 21~26
- [6] Carolina H D, Almudena A, Victoria E S, et al. Modeling the production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: Influence of media composition [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37: 157~166
- [7] Yan Hai, Kishimoto M, Omasa T, et al. Increase in desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 using ethanol feeding [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89(4): 361~366
- [8] 闫海,王子健. 红串红球菌脱硫酶的活性调节 [J]. *化工冶金*, 1999, 20(4): 376~380
- [9] 闫海. 不同硫源对红串红球菌生长和脱硫比活性的效应 [J]. *环境化学*, 2000, 19(3): 333~349
- [10] 马翠卿,佟明友,于波,等. 一株红球菌脱硫菌株脱硫特性的研究[J]. *化学学报*, 2004, 62(19): 1 883~1 888
- [11] Ohshiro Takashi, Hirata Teruki, Izumi Yoshikazu. Desulfurization of dibenzothiophene derivatives by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* H-2 [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 142: 65~70
- [12] Fu Li Li, Ping Xu, Cui Qing Ma, et al. Deep desulfurization of hydrosulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp. X7B [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 223: 301~307

(责任编辑 肖庆山)