

## 摘要

石油是当今世界的主要能源之一，全球每天约消耗 1000 多万吨的原油，这些燃料油燃烧后产生的  $\text{SO}_2$  是形成酸雾、酸雨等环境污染的重要原因。低含硫矿物燃料的稀缺、高品质清洁燃料油的需求和日益严格的控制标准迫切需要开发燃烧前深度脱硫技术。加氢技术是目前的主要脱硫法，然而其在操作成本和深度脱硫方面的不足制约着脱硫技术的发展。生物脱硫具有反应条件温和、专一性强、不影响油品热值等优点，已成为加氢脱硫工艺较好的补充，随着世界范围内对油品含硫标准的日益严格，作为深度脱硫技术的生物脱硫受到越来越多的关注。

本研究利用实验室自主分离的脱硫菌株分支杆菌 ZD-19，以促进生物脱硫的工业应用为目标进行研究。课题前期研究证明 ZD-19 可以沿 4S 途径降解二苯并噻吩 (DBT) 和 4,6 二甲基二苯并噻吩 (4,6DMDBT)，并且具有较高的去除效率。为了进一步考察 ZD-19 的脱硫底物范围，本论文就 ZD-19 对 4 甲基二苯并噻吩 (4MDBT) 的脱硫特性进行了研究，结果表明 ZD-19 也能专一性的切断 4MDBT 的 C-S 键，且由于 4MDBT 独特的不对称结构，代谢过程中羟基取代位置发生变化，所得产物为两个同分异构体：4 甲基 2 苯基苯酚和 2 羟基 3 甲基联苯。研究还证实 ZD-19 并不能有效降解苯并噻吩 (BT)。本部分实验表明 ZD-19 是一株对 DBT 及其衍生物有较高去除效率的优势菌种。

微生物能够在油相中作用是 BDS 应用于实际油品脱硫的关键。摇瓶实验中，ZD-19 在油水两相体系中具有较高的脱硫活性，反应 10h， $1\text{mmol/L}$  DBT 的降解效率达到 78.5%；其最佳脱硫活性是水相中的 2 倍，且两相体系促进了传质，提高了细胞的利用效率，较高菌液浓度时没有出现抑制现象，具有比水相实验较高的脱硫活性。与摇床实验比较，气升式反应器独特的流体力学特征更加利于两相混合和传质，在生长细胞脱硫和休止细胞脱硫实验中都表现出明显的优势。反应器内 ZD-19 达到指数生长后期时细胞最大比生长速率和细胞浓度为  $0.15\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$  和  $8.1\text{g}/\text{L}$ ，分别是摇床实验 1.4 倍和 2.3 倍。ZD-19 在油水两相实验中表现出较高的脱硫活性，具有应用于油品脱硫的潜力。

目前 BDS 研究还局限于摇瓶实验，生物脱硫反应器的设计与研究具有重要意义。本研究在自行设计的气升式反应器中生物降解正十六烷中的 DBT，对气升式反应器的基本工艺参数进行优化。在实验所选的条件下，最佳表观速率为  $11.8\text{cm}/\text{s}$ 。表观速率达到  $13.0\text{cm}/\text{s}$  时，出现轻微柱塞流现象，液滴直径增大，传

质效果开始降低。反应器中 ZD-19 休止细胞在生长介质（培养基）和非生长介质（磷酸缓冲溶液）中具有几乎相同的脱硫活性；过低的菌液浓度下不仅两相界面小，传质速率低，也使 DBT 对细胞的毒性作用明显，脱硫效率很差，实验条件下 10-40g/L 的菌液浓度都具有较好的比脱硫速率；增加 DBT 初始浓度，脱硫量略有增加，直至高 DBT 的致毒作用使菌液脱硫活性降低，此时传质速率较高，体系属于反应控制。

在气升式反应器内，立足于考察 ZD-19 在模拟燃料油体系中的脱硫特性，实验以柴油中含量较多的有机硫化物 DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 为模型化合物，设计了单一底物和混合底物实验。单底物脱硫实验表明，ZD-19 对 DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 的脱硫能力为  $DBT \approx 4MDBT > 4,6DMDBT$ 。4MDBT 的高脱硫效率和对细胞的低毒性，使得混合体系下的总硫去除率更高；双底物脱硫实验和混合脱硫实验共同表明，ZD-19 对多种有机硫共存时的脱硫效果良好，具有应用于实际油品脱硫的潜力，有很广的应用前景。

关键词：生物脱硫，气升式反应器，模拟燃料油，分支杆菌，二苯并噻吩及其烷基取代物

## Abstract

About ten million tons of crude oil was consumed every day, resulting in the emission of sulfur-oxides to the atmosphere, which is a main cause of serious environmental problems such as acid rain. High sulfur contents of the crude oil reserves, the need for fuels ultra-low in sulfur and continued stringent regulations call for deep desulfurization technologies. Hydrodesulfurization (HDS) is the dominating method to desulfurize oil, but its defect of high operation cost and deep desulfurization limited the development of desulfurization technology. Biodesulfurization (BDS) which can selectively desulfurize the most recalcitrant sulfur compounds from oil under mild conditions, remaining the combustion value of the fuels, support HDS very well. As stricter standard of sulfur content in oil appears, BDS gains more attention.

*Mycobacterium* sp. ZD-19 can metabolize dibenzothiophene(DBT) and 4,6dimethyldibenzothiophene(4,6DMDBT) through a sulfur-specific pathway. The biodesulfurization of 4methyl-dibenzothiophene(4MDBT) by ZD-19 was also investigated in this thesis. The results showed that ZD-19 can also desulfurize 4MDBT through a sulfur-specific pathway. The metabolic pathway for biodesulfurization of 4MDBT was studied, and the final product of 4MDBT biodesulfurization was determined by GC-MS, which were identified as two isomers: 4-methyl-2phenylphenol and 2-hydroxy-3-methyl-biphenyl.

Secondly, biodesulfurization by resting cells of ZD-19 was investigated of biphasic system in shake flasks scale. The results indicated that, ZD-19 in oil-aqueous system had twice the desulfurization activity of aqueous phase, because inhibitions effects by product accumulation in aqueous media were not so clear in biphasic condition as 2-hydroxybiphenyl (HBP) oil-water partition coefficient is very high; and mass transfer limitation was partially eliminated. In contrast to shake flasks, biodesulfurization in a self-designed airlift bioreactor(ALR) can achieve higher desulfurization rate; the maximum specific growth rate and the highest cell concentration at the late exponential growth phase in the reactor were 0.15g/(L · h) and 8.1g/L, which were 1.4 and 2.3 times that of shake flasks respectively. The results showed ALR's great potential for the commercial use of biodesulfurization to remove sulfur from fuel oil.

Biodesulfurization of DBT in oil-aqueous system was carried out in the ALR. The optimal gas velocity was 11.8cm/s. Slight plug-flow was formed when the gas velocity

achieved 13.0cm/s, and the oil droplet diameter and the interface area decreased consequently, which were the main causes of the decreased desulfurization rate. The biodesulfurization of resting cells of ZD-19 could be proceed in the non-growth media (phosphate buffer) as efficiently as in the growth medium (BSM). The desulfurization rate increased with the increasing of DBT concentration as well, while high DBT concentration would inhibit the activity with an optimal of 3 mmol·L<sup>-1</sup>. The results suggested that under high concentration of DBT and optimal gas velocity, the mass transfer rate was much higher compared to DBT conversion rates, when the microbial desulfurization rate was the overall rate-limiting process step.

Lastly, The desulfurization ability of *Mycobacterium* sp. ZD-19 for DBT and alkylated dibenzothiophenes (Cx-DBTs) was studied of stimulant fuel oil system in the ALR. The desulfurization of DBT, 4MDBT or 4,6-dimethyldibezothiophene ( 4, 6-DMDBT) as a sole substrate, and the mixture of two or three of them as sulfur substrate were investigated respectively. The results suggested that this strain could efficiently desulfurize DBT and Cx-DBTs, their activity was: DBT ≈ 4MDBT>4,6DMDBT. The degradation rate of total sulfur related to the composition and structure of sulfur substrates. The total sulfur remove percentage when DBT and 4MDBT were mixed was larger than any other cases, which attributed to the high desulfurization rate of 4MDBT and its little negative effect on cells activities.

Biodesulfurization of DBT derivatives such as 4-MDBT and 4,6-DMDBT demonstrated *Mycobacterium* sp. ZD-19's ability to attack a wide range of sulfur compounds present in diesel oil. The activity of the strain shows its possibility of the commercial use for decreasing the sulfur content of diesel fuels.

**Keywords:** biodesulfurization; airlift reactor; simulated fuel oil; *Mycobacterium* sp.; dibenzothiophene(DBT) ; alkylated dibenzothiophenes(Cx-DBTs)

# 浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：张文娟 签字日期：2008年6月11日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：张文娟

导师签名：李伟

签字日期：2008年6月11日

签字日期：2008年6月11日

## 致谢

今年的初夏异常的清凉，让狂躁的毕业进行曲变得意外的沉着冷静，2008 给了我们太多的意料之外。在这样的日子里毕业，心存着更多的感激。

首先要感谢恩师李伟教授，在两年的研究生学习生活中，李伟老师诲人不倦，帮助我认识学术理解学术，他严谨的治学态度、渊博的知识和踏实的工作作风成为我今后学习的榜样。老师不仅在学习和工作中给予我悉心的指导和切实的帮助，而且在生活中也给予了我热情的关心和支持，使我能够顺利完成学业。在此对李伟老师的教诲、宽容和仁爱，表示最由衷的感谢！

感谢本课题组的陈晗师姐，不遗余力的帮我一起解决课题研究中遇到的问题；感谢张士汉师兄、邵科师姐、蔡郁蓓师姐等在实验工作中给我提出了许多宝贵的建议；感谢实验室的各位同门，感谢姜锦林、蔡灵琳、糜徐红、高琳、李航等各位兄弟姐妹，在平时工作和生活中的诸多支持与帮助；感谢曾经在这儿做毕业设计的张丽娜的辛勤工作。

感谢环工所其他实验室的同学，感谢各位同班同学、寝室姐妹，谢谢你们两年的相伴学习与帮助。

感谢杨劲秋，谢谢你一直以来的支持和鼓励。

对参加本论文答辩、评阅和对本论文提出宝贵意见的所有专家和同仁表示衷心的感谢！

最后的感谢送给我的家人，感谢哥哥的关心和支持，感谢我最可爱的父母，是你们让我的世界充满温暖和力量，谢谢！

张文娟

2008年5月于浙大玉泉

## 第1章 绪论

石油是当今世界的主要能源之一，全球每天约消耗1000多万吨的原油。在石油中，继碳和氢之后，硫是含量最为丰富的元素之一，石油燃烧过程中产生的 $\text{SO}_2$ 也是形成酸雾、酸雨等环境污染的重要因素。近年来，随着低硫石油的持续开发和不断消耗，高硫石油在石油开采中所占的比例越来越高。

2006年1月1日起，加拿大和美国都开始执行新的硫含量标准，车用柴油和汽油硫含量标准分别从500mg/kg和350mg/kg降低到15mg/kg和30mg/kg。美国计划2010年柴油硫含量不超过10mg/kg。为达到日益严格的环保要求，生产高品质清洁燃料油，开发燃烧前深度脱硫技术势在必行。

我国是最主要的石油消耗大国之一。随着经济的发展和可持续发展战略的实施，大力推行清洁生产技术。我国已颁布一系列环保法规，2007年我国全面推行汽油“国III”标准（150mg/kg），北京地区今年起实行“国IV”标准（50mg/kg）。虽然这一标准与世界先进水平还有较大差距，但比及以前的标准限制更加严格，这也表明了国家大力加强大气污染治理的决心。因此，研究开发高效、低成本的燃料脱硫技术。将对我国的环境保护和可持续发展战略产生积极而深远的影响。

我们日常所用的燃料油中的硫主要来自所加工的原油，而各类原油具有不同浓度水平的含硫化合物。不同来源的燃料油中硫含量相差很大，其重量百分比大约在0.03%-10%的范围内变化。原油中的含硫化合物大致可分为无机硫和有机硫。无机硫主要由溶解或悬浮在油中的元素硫、硫化氢、硫化物和硫铁矿等组成；而占含硫量的大部分的是石油中大约有200种左右之多的有机硫，这些有机硫由各种硫醇、硫醚和噻吩及其衍生物组成。

传统的工业脱硫方法可有效地脱除无机硫和简单的有机硫化物，而对于稠环噻吩类含硫化合物，如二苯并噻吩(Dibenzothiophene, DBT)，特别是烷基取代DBT衍生物，HDS技术更难以脱除。而DBT及其DBT衍生物又是石油高沸点馏分的主要含硫成分。因此，低硫及超低硫油品的生产要求使得HDS过程反应条件越来越苛刻，设备和操作费用急剧增高。并且现有的反应器不能满足使用要求，需要进行设备的更新。因此，迫切需要寻找一种能从石油或石油产品中脱除硫却又不造成石油燃烧值降低并经济可行的脱硫新工艺。

生物脱硫 (Biosulfurization, BDS) 技术能选择性的脱除加氢脱硫

(Hydrodesulfurization, HDS) 技术难以脱除的含硫稠环类化合物, 又具有反应条件温和、设备投资操作费用低等优点, 从能源和环保两方面综合考虑, 微生物催化脱硫是实现超低硫石油产品生产的最有效技术之一。



## 第2章 文献综述

硫以各种形式存在于煤和燃油中，石油中的总含硫量在 0.03~7.89%。目前，世界范围内的原油的开采都面临着普遍的问题，即低硫原油（含硫量<1%）越来越少，高硫原油（含硫量>1%）在原油开采中占的比重越来越大，原油中的含硫量不断增加，原油的日产量也随着人们生活对其的依赖程度的增大而激增，现在已经达到 8000 万桶/天（约合 1000 万吨），而且随着世界经济的向前发展，这种趋势必将继续延伸下去，所以对大气污染的治理不得不面对这一严酷的现实。含硫的煤和燃油进行脱硫是从根本上治理空气中二氧化硫污染的必要且有效的方法，正是在此大环境下，脱硫这项技术体现出日益非凡的意义。

生物催化脱硫技术（BDS）是在温和的条件下，利用适宜的细菌或酶代谢过程选择性催化的脱硫反应，释放出硫而将烃类保存下来的过程。细菌的生存是以硫而不是碳为能源。在生化反应过程中，细菌或酶可以再生或自身补充。生物脱硫反应的选择性高，可在常温常压不需要氢气的条件下进行，其设备投资比催化氢化脱硫低 50%，操作费用降低 15%，能有效地除去催化加氢脱硫难以除去的芳香含硫杂环有机物。生物脱硫是 21 世纪很有发展前途的脱硫技术之一。

### 2.1 燃料油中的硫及其危害

#### 2.1.1 燃料油中的硫

原油中除了碳和氢之外，硫是含量最为丰富的元素之一<sup>[1]</sup>，原油的总含硫量在 0.03%~7.89%之间，除单质硫、硫化氢和黄铁矿等，还有硫醇、噻吩类及更复杂的含硫有机化合物约 200 种，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) 及其取代物<sup>[2]</sup>。石油中典型的几种含硫化合物的结构见图 2-1。这些含硫化合物都具有较高的沸点（高于 200℃），而难以在原油精炼过程中去除<sup>[3]</sup>，它们不同程度地分布于各馏分油中<sup>[4]</sup>，在流化床催化裂化汽油中，噻吩和各种取代噻吩是主要的含硫化合物，其中苯并噻吩

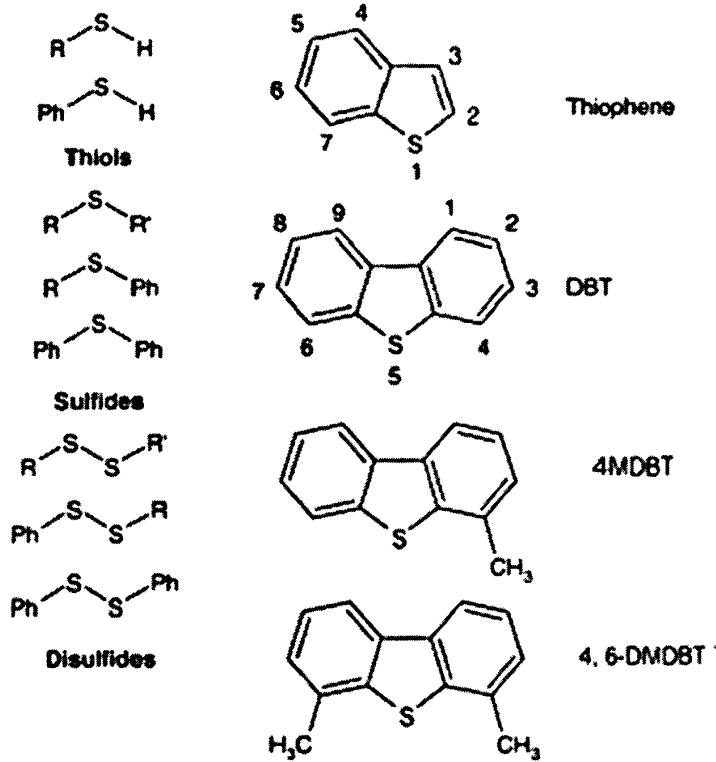


图2.1 原油中主要有有机硫的类型<sup>[2]</sup>  
 Fig. 2.1 Typical organic sulfur compounds in crude oils

(Benzothiophene, BT) 占 30%。催化柴油馏分中的含硫化合物主要是 BT 和 Dibenzothiophene(DBT)及各种烷基取代物。无机硫化物及沸点较低的含硫有机物很容易脱去，而随着噻吩类含硫化合物的环数的增加，多环噻吩因空间位阻效应使加氢脱硫催化剂反应活性迅速降低<sup>[5]</sup>。因此，二苯并噻吩(DBT)及其衍生物作为典型的难脱除有机硫的代表物，常被用作模型化合物评价脱硫效果。

### 2.1.2 燃料油中硫的危害

含硫化石燃料在燃烧过程中释放出硫氧化物，其中SO<sub>2</sub>在低层大气中生成，是最主要的硫氧化物，可引发一系列环境污染问题<sup>[6]</sup>。

(1) 对人类健康的危害：二氧化硫年平均浓度二级标准值为0.06 mg/m<sup>3</sup>，是人群在环境中长期暴露不受危害的基本要求；日平均浓度三级标准值为0.25 mg/m<sup>3</sup>，是人群在环境中短期暴露不受急性健康损害的最低要求。SO<sub>2</sub>反应生成的平均直径约为2.5μm的硫酸盐颗粒，可通过呼吸道进入人体肺部。SO<sub>2</sub>和硫酸盐颗粒都会

引发呼吸道等疾病,危害人体健康<sup>[7]</sup>。

(2)对生态环境的危害:硫燃烧后生成的 $\text{SO}_2$ 极易与大气中的水蒸气反应生成硫酸或亚硫酸,进一步形成酸雨酸雾等恶劣天气,严重影响生态环境和人们的日常生活。酸雨沉降地面后,破坏土壤环境,威胁植物生长;并可降低湖水pH值和缓冲容量,危害水生生物的生命等<sup>[8]</sup>。

(3)对设备设施的危害: $\text{SO}_x$ 与水共存时呈酸性,会严重腐蚀管道,泵和精炼设备等,并可破坏历史建筑物。

此外,新型发动机都配备了 $\text{NO}_x$ 等气体污染物的催化处理装置,而硫酸盐具有热稳定性,可与催化剂的活性中心结合,从而降低催化剂对 $\text{NO}_x$ 等气体污染物的处理效率<sup>[9]</sup>。因此,汽车尾气排污程度与燃料质量的好坏密切相关,降低车用燃料油中硫含量对于提高机动车尾气排放质量,从而保护环境具有十分重要的意义。

## 2.2 燃料油脱硫技术

目前解决硫氧化物污染问题的方法主要有燃烧前脱硫和燃烧后脱硫,燃烧后脱硫也即烟气脱硫(FGD)是目前应用最广泛、效率最高的脱硫技术,也是控制二氧化硫排放的主要手段。但是FGD处理产物具有很强的腐蚀性,运行费用昂贵,应用范围也有限。相对而言,燃料油燃烧前脱硫可以从根源上解决硫氧化物污染问题,不受燃烧过程的影响,显示出一定优势<sup>[10]</sup>。目前,有关燃料油脱硫的技术主要有以下几种:

### 2.2.1 催化加氢脱硫

加氢脱硫(HDS)是比较成熟的馏分油脱硫技术。HDS是在高温、高压、氢环境和金属催化剂的条件下,通过催化过程将有机硫转化成 $\text{H}_2\text{S}$ 气体的脱硫反应。一般操作温度在 $290\sim 455^\circ\text{C}$ ,压力在 $6\sim 20\text{MPa}$ 之间<sup>[11]</sup>。该法可高效地脱除无机硫和简单的有机硫化物,硫化物的脱除率达到 $40\sim 60\%$ 。但是设备和操作费用高昂。另外,要通过HDS技术将油品中的含硫量降到 $500\text{mg/kg}$ 以下也是很困难的,因为 $500\text{mg/kg}$ 以下的硫化物主要是硫的噻吩类化合物,在加氢脱硫过程中去除这类化合物需要更高的压力和温度,从而消耗更多能量和资金<sup>[12]</sup>,据估计,利用HDS将硫含量从500降低到 $200\text{mg/kg}$ 大致需要1美分/加仑,则将硫含量从200降低到 $50\text{mg/kg}$ 需要多4倍的费用<sup>[13]</sup>。此外,二苯并噻吩衍生物如4甲基二苯并噻吩和4,6二甲基二苯并噻吩根本无法在HDS中脱除。由此可见,传统的HDS技术已经无法满足日益严格的环保标准。

### 2.2.2 生物脱硫

生物脱硫法(Biodesulfurization, BDS), 又称生物催化剂脱硫, 是一种在常温、常压条件下, 利用微生物专一脱除杂环化合物中有机硫的一种新技术。脱硫细菌中的酶有选择地氧化硫原子进而切断C-S键, 而含硫化合物其烃类母体的骨架并不受到影响, 并不影响烃的燃烧热值。

与传统的加氢脱硫(HDS) 相比BDS具有几个优势。第一,BDS针对HDS 中难以除去的噻吩类硫化物, 可以生产高质的低硫油品, 以满足环保要求。第二, BDS在常温、常压即可进行反应, 且不需要氢, 从而大大降低操作费用。据测算, BDS的设备投资仅为HDS的50%, 操作费用将减少10-20%<sup>[13]</sup>。第三,BDS是选择性催化

表2.1加氢脱硫与生物脱硫技术特点对比<sup>[14]</sup>

Fig2.1 The comparison of the character of HDS and BDS

	加氢脱硫	生物脱硫
投资及成本	昂贵	低廉
操作条件	剧烈	温和
温室气体的排放	大量	少量
有机含硫化合物的去除	基本无效	有效
底物限制	无	低硫浓度
脱金属脱氮作用	具备	不具备

的脱硫反应, 释放出硫而将烃类保存下来, 减少二氧化碳的生成量, 且不损失燃料油的热值。另外, 与HDS 催化剂相比生物催化剂不易发生重金属中毒。因此要将硫含量降低到很低水平, BDS 是极有前途的脱硫技术。表2.1列出了生物脱硫与目前作为主导脱硫技术的加氢脱硫的特点对比, 进一步分析了生物脱硫技术潜在的巨大优势。

### 2.3 生物脱硫的研究进展

从上世纪30年代第一篇有关硫还原菌的报道, 生物催化脱硫技术经过了近八十年的研究探索, 取得了很多成果。关于BDS的研究热点和研究难点主要集中在以下几个方面: (1) 脱硫微生物的筛选: 包括选育高效、专一脱硫的生物体; 通过DNA技术, 产生高专一性、高活性的生物催化剂等; (2) 微生物催化脱硫的代谢机理及优化, 包含代谢途径的阐明、代谢过程中所涉及的酶及基因的分离纯化和鉴定; (3) 微生物脱硫动力学的研究; (4) 微生物脱硫反应器的设计及工业化应用, 如油水混合技术、乳化液分离技术及副产品的处理等。生物催化脱硫技术的

研究正是围绕这几方面展开的。

硫元素约占细菌干重的 0.5-1%，人们正是基于此试图寻找能够以有机硫化化合物为硫源的微生物，以达到用微生物的方法降低燃料油含硫量的目的。生物脱硫的研究始于上世纪 30 年代，1948 年在美国发表了第一个生物脱硫技术专利。早期是把原油在通气条件下与水相中的细菌接触，使油中有机硫化化合物转化为水溶性无机硫化物，从而选择性地对烃类的脱硫。该阶段的研究主要集中于筛选脱硫菌株，但此时菌种的代谢多延 kodama 途径，损失了石油的热值，未能取得工业应用价值。70 年代，研究发现的脱硫菌株越来越多，人们也对各种菌种的代谢途径进行了考察，提出了各种假说。80 年代，生物技术的飞跃发展，给 BDS 技术的研究带来了新的生机。20 世纪 90 年代，生物脱硫才取得重大进展。美国气体技术研究院(IGT)分离得到一株具有选择脱硫活性的菌株，命名为 IGTS8，它以柴油中普遍存在且无法为 HDS 降解的二苯并噻吩(DBT)为作用底物，将其中的硫转化为无机的  $SO_4^{2-}$  离子，这一代谢途径正是专一性的 4S 途径。这一发现也成就了生物脱硫的飞跃发展。此后，人们以石油中含量较多的有机含硫杂环化合物二苯并噻吩(DBT)为模式化合物<sup>[15]</sup>进行研究，筛选出一批具有专一性脱硫特性的菌种，如 *Rhodococcus strains*，并阐明了 BDS 的三种主要代谢机理。此后，基因工程技术的发展又将简单的寻找脱硫微生物的工作提高到利用 DNA 重组技术克隆高效、专一脱硫的微生物，或通过有效的分离技术纯化高活性脱硫酶。1999 年，发表了第一个关于脱硫酶基因重组的专利，该研究成功将脱硫基因转移到 *Pseudomonas* 的 DNA 上使之具有脱硫能力。遗传学家利用分子生物学技术，分离和表达了基因脱硫活性的特定酶的编码基因，通过对脱硫微生物进行质粒接合和转化，获得了转化子突变株，再通过常规培养，生产出了工业规模的生物催化剂，从而使 BDS 技术有了突破性进展。近几年，随着 BDS 技术的不断成熟，有关生物脱硫反应器、脱硫工艺、副产品回收以及分离技术等的研究不断增加，新的进展包括利用多级气升式反应器解决低浓度下的传质效率问题，开发连续可再生型的反应工艺，以提高生物催化剂的活性和利用效率，减少设备投资。BDS 需要与分子生物学和生物工程相结合，并在现有脱硫技术的基础上，向实现规模化工业应用不断迈进。

## 2.4 “4S”代谢途径

目前，生物脱硫是世界性的研究热点，也已有大量具有较高应用价值的菌株被分离出来，如最典型的红球菌属<sup>[16-18]</sup>，戈登氏菌属<sup>[19,20]</sup>，棒状菌属<sup>[21,22]</sup>，单胞

菌属<sup>[23,24]</sup>, 分支杆菌属<sup>[25,26]</sup>等。有关这些菌种代谢途径的分子生物学研究也日益深入。

HDS技术无法去除的有机硫主要是稠环噻吩类含硫化合物, 其中DBT及其DBT衍生物又是石油高沸点馏分如柴油的主要含硫成分, 它们也是稠环噻吩类含硫化合物中最难脱除的有机硫化合物。在生物脱硫的中, DBT及其烷基取代物作为典型的难脱除有机物的代表, 常被用作模型化合物来进行研究。有关脱硫微生物降解DBT的代谢途径的研究也已经取得了很多成果。截至目前, 已探明的代谢途径主要还原途径、Kadama氧化途径、4S氧化途径等。

还原过程与HDS过程很相似, 还原菌种在厌氧条件下, 脱除有机硫化合物中的硫, 并生成硫化氢气体; ZoBell于上世纪50年代首次提出了用厌氧菌进行生物脱硫的方法<sup>[27]</sup>。但是, 细菌反应不易控制, 此项技术在以后的几十年中一直没有体现出较大的应用价值。假单胞菌(如*Pseudomonas*)<sup>[28]</sup>, 拜叶林克氏菌(*Beijerinckia*)<sup>[29]</sup>及不动杆菌(*Acinerobacter*)等对DBT的降解延Kadama氧化途径, Kodama代谢路径是在非硫选择性生物催化剂的作用下, 剪断苯环上的C-C键, 将DBT代谢成可溶入水的3-羟基苯并噻吩-2-甲醛。由于整个含硫化合物转入水相, 油中含硫百分比并没有减低多少, 反而降低了有价值烃的热值, 工业化应用价值小。1989年, Kilbane<sup>[30]</sup>提出了专一性脱硫, 保持含硫杂环化合物碳架芳香结构不变的4S途径(sulphoxide/sulphone/sulphonate/sulphate)。研究中的红球菌*Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (ATCC53968), 它能够专一性切断二苯并噻吩的C-S键, 生成硫酸根和2-HBP, 含硫化合物脱去硫原子后仍留在油相中, 不损失油的热值, 在微生物脱有机硫方面具有广阔的应用前景, 迅速成为研究的热点之一。

延4S代谢途径的细胞DNA有四个重要基团(DszA、DszB、DszC、DszD), 它们参与编码生成代谢过程所需要的各种酶。二苯并噻吩单加氧酶在DszC的编码下生成, DBT首先在单加氧酶的催化作用下氧化为DBT亚砷(DBTO), DBTO在同种酶的作用下氧化为DBT砷(DBTO<sub>2</sub>), 在DszA的编码下细胞合成了DBTO<sub>2</sub>单加氧酶, 使DBTO<sub>2</sub>氧化成羟苯基磺酸盐(HPBS), 最后在DszB的作用下合成HPBS脱硫酶使之脱去硫, 得到邻苯基苯酚(HPB)和亚硫酸根<sup>[31]</sup>, 具体过程如图2.2所示。DszA和DszC酶的催化作用需要在NADPH-FMN氧化还原辅酶的共作用下才能完成, 并通过DszD酶来活化和提高催化活性<sup>[32]</sup>。DszA酶的催化反应速率比DszC酶快5~10倍, 最后一步DszB酶的催化反应最慢, 是该脱硫过程的限速步骤<sup>[33]</sup>。通过4S途径脱硫的菌体细胞大部分以2'-羟基联苯基-2-亚磺酸盐(HBPSi)作为中间产物, 终产物为2-HBP。

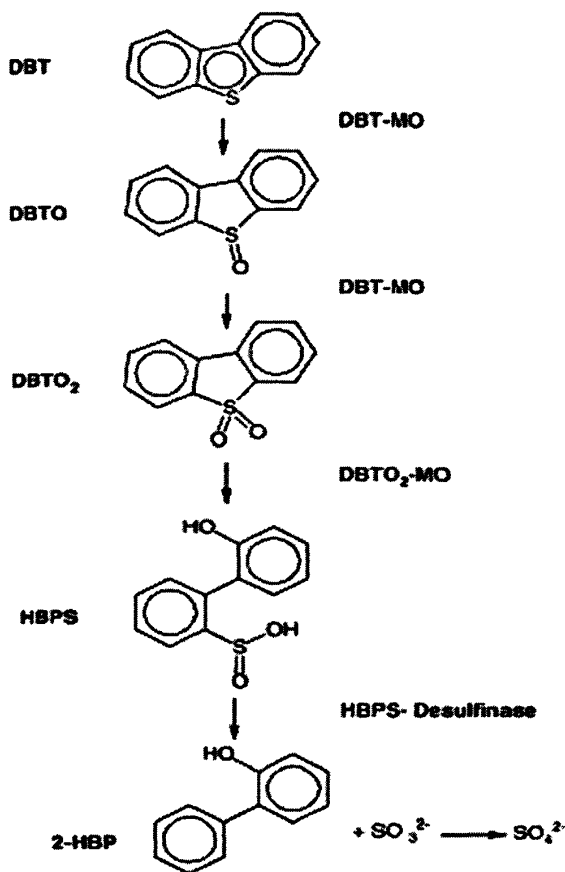


图2.2 DBT脱硫的“4S途径” [31]

Fig. 2.2 4S-pathway for biodesulfurization of DBT

也有报道部分菌株<sup>[34]</sup>处于对数生长期时以2,2'-二羟基联苯（2,2'-DHBP）为终产物。也有菌株可以将2-HBP进一步甲氧基化转化成2-甲氧基联苯，形成延伸的“4SM”途径<sup>[25,35]</sup>。

## 2.5 生化反应器的设计

目前，生物脱硫在脱硫途径、微生物活性等基础研究方面取得一定进展，但对于反应器的研究相对较少。生化反应器是脱硫工艺中的重要组成部分，在反应过程参数确定过后，只能通过优化反应器的结构和参数来进一步提高脱硫效率，传质过程的好坏对脱硫的效果有直接影响。要使生物脱硫技术得以在工业应用中扩大，必须设计适用于生物反应过程的反应器。目前应用于生物过程的反应器主要有搅拌釜反应器、气升式反应器、流化床反应器、固定床反应器和膜反应器，

这些反应器各有优缺点<sup>[36,37]</sup>。

### 2.5.1 搅拌式反应器

机械搅拌罐反应器操作简单,应用于许多工艺过程及批式反应研究。它依靠外部输入能量实现反应器内部反应体系的混合,其能耗与反应过程的油水比、油的粘度、油的密度、反应器处理能力、搅拌转速等有关。一般的搅拌式反应器能产生直径为 100~200  $\mu\text{m}$  的液滴,能耗为 1~6W/L。搅拌式反应器的缺点在于内部没有催化剂再生和乳化液破乳的空间,而且平均体积反应速率低,传质效果不理想,因此一般选择搅拌式反应器的处理工艺都采用分级反应器设计代替单级搅拌釜反应器,增加生物催化剂浓度和油水比,提高处理效率。为改善传质效果,Dounias 设计出一种“静态混合器”<sup>[38]</sup>,将油水两相通入可以回流的螺旋蛇形管,使其在管内产生漩涡,达到混合的目的。这种设计用泵代替搅拌作为传动设备,产生直径为 10  $\mu\text{m}$  左右的液滴所需的流体速度须大于 4m/s,由此可以看出此方案虽然改善了传质,但没有降低能耗。Tsouris<sup>[39]</sup>将改进后的 EPC 用于脱硫研究,脱硫速率达到 1.0~5.0mg<sub>2</sub>-HBP/g(DCW)/h。乳化液相接触器应用的限制因素在于生物催化剂的活性不高,若采用固定化细胞等方法弥补这方面的不足,这种反应器的应用前景是非常光明的。

Yang Jianzhong 等<sup>[40]</sup>针对柴油考察了油水两相中 *Rhodococcus. globerulus* DAQ3 的生物脱硫特性,在自制搅拌式反应器中进行细胞生长和生物脱硫的连续反应,该研究所用反应器将搅拌浆安装在下部(如图 2.3),低转速下对上次油相的扰动较小,实现下层菌液培养和上层生物降解的同步进行。体系下 250ml 的柴油在 5d 时间内脱除了 1500ppm 的硫,具有较好的应用价值。



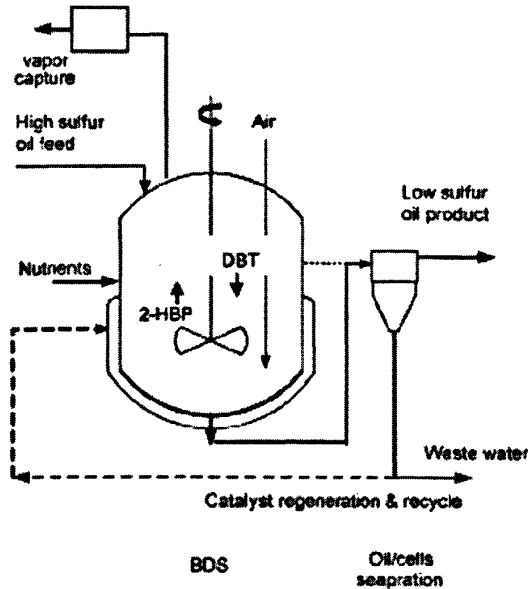


图 2.3 搅拌式反应器的典型应用<sup>[40]</sup>  
Fig2.3 A Stirred-tank bioreactor

### 2.5.2 气升式反应器

气升式反应器(ALR)是用于气-液两相或气-液-固三相的接触反应装置，它通过压缩空气膨胀提供能量，依靠含气泡液体与纯液体密度差造成的升力使液体沿特定的流道循环流动，属气力搅拌反应器，主要包括内循环式和外循环式两种类型。ALR 的突出优点在于两方面，一是传质速率高，二是没有内搅拌，消除剪切力对生物催化剂的影响<sup>[41]</sup>。

Mehrnia M R 等人<sup>[42]</sup>研究了气升式反应器顶部构造和导流管高度对微乳液系统混合传质特性的影响，提出增加导流管高度可以增加混合时间( $t_m$ )及体积氧传递系数( $KLa$ )，而增加反应器顶端直径和导流管上方液面高度会导致  $KLa$  下降，但对整体影响轻微。Mehrnia, M.R. 还建立了混合时间与氧传递系数之间的关系，并在后续的研究中<sup>[43,44]</sup>加以验证，提出了模型描述气含率、液体流速、混合时间、体积氧传递系数与通气速率、反应器几何构型及导流管内液位水平的函数关系。Lee <sup>[45]</sup>等利用固定化的 *Gordonia nitida* CYKS1 在气升式反应器(图 2.4)中进行了柴油生物脱硫的研究，对油水比、碳源浓度等基本条件参数进行了研究，对气升式反应器及细胞固定化的在生物脱硫领域的应用前景进行了肯定。

Markos J<sup>[46-49]</sup>等人对气升式反应器在生物工程方面的应用做了大量研究，对气含率，气液循环速率，氧的传质系数等进行了考察，建立其一系列理论或经验

预测模型，并建立了微生物在气升式反应器中的生长模型。

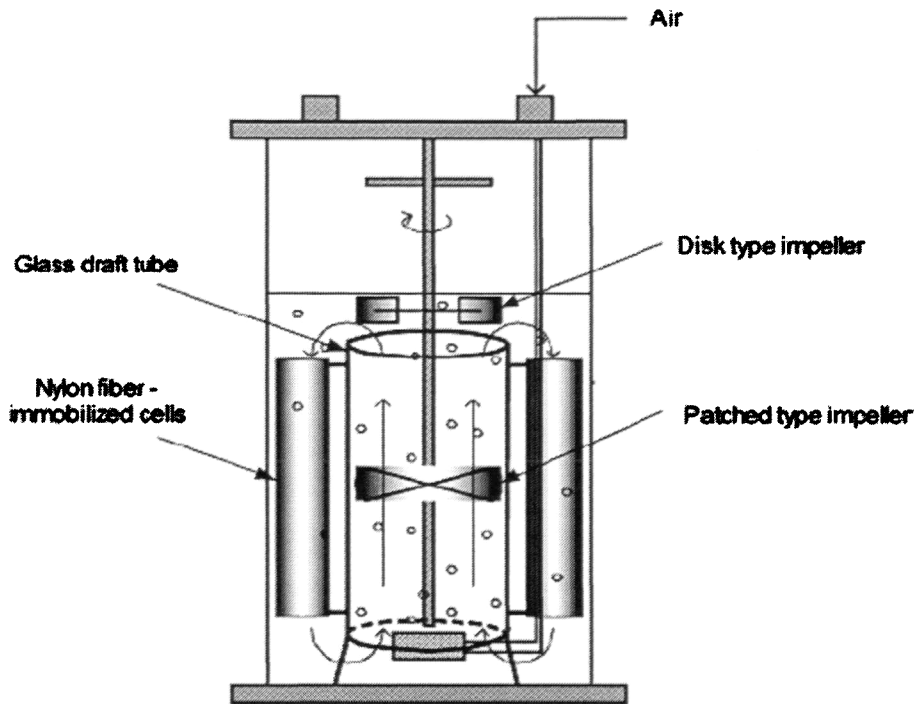


图 2.4 气升式反应器的典型应用<sup>[45]</sup>

Fig. 2.4 An Airlift bioreactor

## 2.6 油品生物脱硫研究

目前生物脱硫研究很大程度上还依赖于水相实验，这距离生物技术在石油脱硫中的实际应用还存在很大距离。因此在筛选培育优势菌种后，我们还需要在油水两相中考察生物脱硫的应用前景。已报道有关石油生物脱硫的文献较少，上世纪 80 年代，Fedorak and Westlake<sup>[50,51]</sup>最早利用混合菌种来降解原油中的杂环有机硫化合物，也有研究利用假单胞菌<sup>[52,53]</sup>进行了重油的生物脱硫，应用最广的红球菌 *Rhodococcus* sp. IGTS8 也在原油中进行了考察<sup>[54]</sup>，但是没有明确总硫的去除率。

Li Fuli<sup>[55]</sup>等做了大量生物脱硫技术的应用研究，在加氢柴油、汽油中进行了考察。利用嗜热菌<sup>[56]</sup>*Mycobacterium goodii* X7B，在正十四烷模拟石油和辽宁原油中考察生物脱硫的特性。结果显示，在正十四烷模拟油相中，200ppm的初始DBT在反应24h后降低到2ppm，去除率达到99%；在原油中，经过72h的处理，总硫量从3600ppm降低到1478ppm，达到59%的去除率。

Maghsoudi S<sup>[57]</sup>等首先在含DBT的正十六烷模拟油相中进行了生物脱硫的研究, 考察了适合*Rhodococcus* sp. P32C1休止细胞进行脱硫反应的基础条件, 并在此基础上, 进行了两种柴油的生物脱硫实验: 加氢柴油初始硫含量303ppm, 经过生物脱硫可去除48.5%; 未加氢处理初始硫含量1000ppm的柴油, 最终去除率为23.4%。

Shan G<sup>[58]</sup>等将*R. erythropolis* IGTS8中的脱硫基因重组到分子上, 得到具有较高脱硫效果的脱硫菌株*Pseudomonas* strains, 利用该脱硫菌进行了柴油脱硫实验, 研究在摇瓶中将菌液和柴油直接混合进行反应, 在反应前4小时具有较高的脱硫活性, 约为 $0.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 并在发酵罐中将500ml柴油从 $591 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 降低到 $313 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 。

Luo M.F<sup>[59]</sup>等在十二烷模拟油相中考察了*Pseudomonas delafieldii* R-8的脱硫特性, 该菌同时可以降解4,6DMDBT, 该研究结果指出, 体系下DBT和4,6DMDBT的最大脱硫活性可分别达到11.4 和 $9.4 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 且两相中的脱硫活性远高于水相反应。

随着生物脱硫技术的不断发展成熟, 有关油品生物脱硫的应用性研究也逐渐增多<sup>[60,61]</sup>。其中主要涉及两个方面: 第一, 以含DBT的烷烃为模拟燃料油进行的研究; 第二, 直接用汽油或柴油为生物脱硫对象进行的研究。由于测试方法、菌种脱硫活性等限制因素, 目前为止, 较少的研究机构对于多种有机硫化物在模拟油相中的脱硫特性进行研究, 关于有机硫混合时的生物脱硫特性还不清晰。

## 2.7 生物脱硫的动力学研究

燃料油的生物催化脱硫是一个复杂的多相反应, 底物在水中的溶解度极小, 底物的降解速率不仅受生化反应限制还受传质限制, 其传质过程包含底物和产物在有机相、水相及微生物细胞的扩散和传递; 还涉及到氧气在液相和微生物细胞中扩散和传递。要实现工业化应用, 需要进一步提高生物催化脱硫反应速率。传质是影响脱硫效率的重要因素, 下图2.5较为详细的描述了脱硫过程中主要涉及的物质传递过程。要更深入地了解生物脱硫的机理必须对脱硫速度、反应程度、过程控制进行研究。

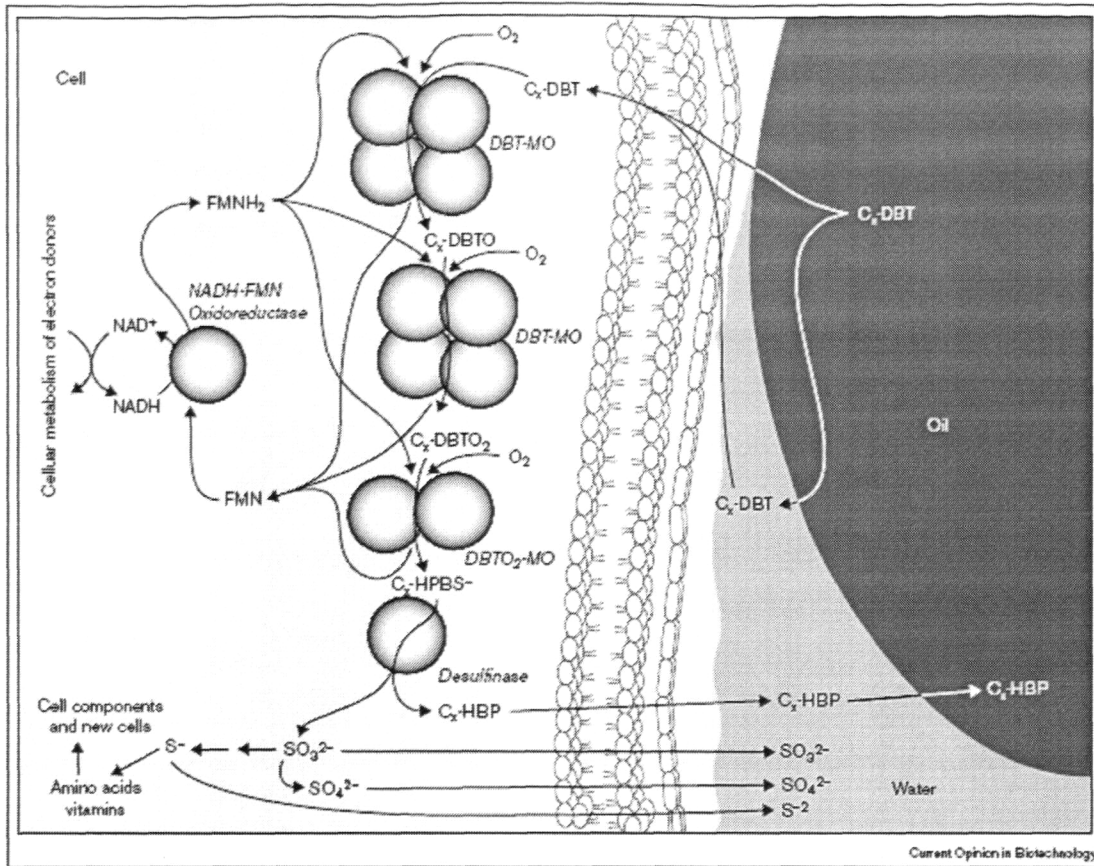


图2.5 生物脱硫的主要步骤<sup>[1]</sup>

Fig 2.5 A diagram of some of the steps in the desulfurization of oil

Carolina H.<sup>[62,63]</sup> 等对红球菌的生长动力学和细胞生长过程中DBT的降解特性进行了研究，考察了温度（26-36℃）、pH及溶解氧对细胞生长的影响。确定了体系下的最适温度为30 °C，最适pH 6.5，最佳溶解氧饱和度为 10%。研究建立的细胞的生长模型，确定了 $\mu$  and  $C_X^{max}$ ；该研究引入参数 $D_{BDs}$ 来表达生物脱硫的效果，并建立了细胞生长过程中DBT的降解动力学模型。

Marcelis等<sup>[64]</sup>建立了一个数学模型预测在搅拌式反应器中，20-60℃，各种复合烃化合物和模型溶剂，有机相体积含量为15—25%时，DBT从有机相到两相界面的传质速率。结果显示，有机相的粘度对传质速率有很大的影响，而密度和表面张力所起的作用不大；DBT从有机相到两相界面的传质速率至少是实验所得DBT生物转化速率的 $10-10^4$ 倍；同时指出，由于主要的传质阻力来自油/水界面到菌体的传质，因此需要尽量增大油水界面以提高菌体和有机相的接触面积。总的来说，微生物的脱硫速率是整个脱硫过程的控制步骤。

Rashtchi M.<sup>[65]</sup>分析了strain RIPI-22休止细胞在水相及在油水两相中的生物脱

硫特性,结果显示在正十六烷模拟油相中strain RIPI-22休止细胞在7h时达到最佳的脱硫活性,且研究发现相对pH,油水两相比是影响脱硫效率的重要因素。研究同时发现strain RIPI-22休止细胞具有亲油疏水性,可以直接降解油相中的DBT。这也与本课题组前期对ZD-M2的研究有类似之处。与Luo M.F<sup>[59]</sup>的研究类似,该研究也还建立了米门方程 $\frac{ds}{dt} = \frac{V_{\max}S}{k_m + S}$ 对DBT的降解动力学进行分析,确定了 $V_{\max}$ 和

$k_m$ 。

在气升式反应器中,Boltes K<sup>[66]</sup>对气液传质进行了动力学的分析。油相(十二烷)体积分率在0到1的范围内时,改变通气量,对氧气的体积传质系数进行了考察,建立了预测 $K_La$ 的流体力学模型。模型建立在能量守恒和流体力学基础上,其中能量守恒方程考虑了表面能量耗散的影响,并利用了Higbie渗透模型和Kolmogoroff各向同性理论,建立了氧传递系数与相关参数的关联式,指出表面张力和液体粘度对氧气的传质系数有较大影响;模型预测值与试验结果相吻合,且两者的相对误差不超过20%。

为了提高脱硫过程中物质的传递效率,人们利用表面活性剂的加入来促进两相的混合。Caro A<sup>[67]</sup>等在*Rhodococcus erythropolis* IGTS8的脱硫过程中加入 $\beta$ 环糊精作为表面活性剂。结果发现表面活性剂的加入可以促进DBT在油水两相的传递,提高细胞利用率,并且避免了2-HBP的聚集,减弱其对细胞的毒性作用。但是这种作用在高的细胞浓度下则失去效力,此时油水界面吸附的细胞达到饱和,DBT的扩散系数不再随油水界面的增大而增加。该研究进一步建立了底物降解和产物生成的Haldane动力学模型。

此外,酶学及基因组的研究为后续基因工程改良菌株的工作奠定了基础,优化后的菌株提高了对底物的耐受性和专一性,加快了反应速度;更易实现与油相的分离,从根本上提高工艺效率,如*Pseudomonas aeruginosa* EGSOX,将IGTS8对DBT18%的转化率提升至95%。通过酶学研究,实验人员建立了经典的“4S”代谢途径,针对限速步骤进行优化和改进,提高脱硫工艺的效率,同时借助对代谢酶系的调控,造成中间代谢产物累积,使得脱硫工艺又成为了某些昂贵产品的生产工艺,提高了经济效益,一举两得,典型的就芳烃亚磺酸盐的生产。

生物脱硫工艺的产物一般由高纯度的油相、含生物催化剂的水相以及油、水、生物催化剂共存的乳化液三项组成,乳化液的分离许久以来一直是生物脱硫工艺的一个瓶颈,特别是在目前追求高脱硫效率的情况下,脱硫反应都是在高催化剂浓度和高油水比条件下运行,更增加了乳化液分离的难度,即使是在目前应用在

工艺上的三相离心机,也不能达到很好的分离效果。

## 2.8 生物脱硫存在问题

近几年来,生物脱硫技术日益成熟,但生物脱硫在整个脱硫领域位置还是作为加氢脱硫工艺的补充,由于生物脱硫技术从研发到实际应用有种种的制约因素,到实现独立脱硫的目标还有很长的路要走。制约生物脱硫技术发展的主要方面表现在:

(1)生物细胞只能在水相中存活,在油相中难以保持长时间的活性。而燃油中的复杂成分给生物体的存活带来极大挑战,微生物在燃料油中的耐受性成为最主要的制约因素之一,需要经过基因工程或诱变技术等手段的改造。

(2)微生物是通过其自身代谢的酶系进行脱硫,微生物的这种降解专一性另一方面却限制了它的脱硫范围,无法满足成分复杂的燃料油需求。

(3)目前生物脱硫反应器的研究还不够成熟,具有实际应用潜力的工程工艺流程还未发现。生物脱硫反应需要较长的反应时间,且脱硫效率不够高,对于大量燃油的脱硫处理是不利的。

(4)生物脱硫后形成油、水和生物催化剂混合组成的乳化液,分离起来较为困难,处理不当会造成大量油品的损失和二次污染。

## 2.9 本论文的研究内容

本实验室以二苯并噻吩(DBT)为唯一硫源分离培养出具有专一性氧化脱硫能力的菌株——分枝杆菌 ZD-19。经过前人大量的研究证明,ZD-19 可以以多种有机硫化物为脱硫底物,且具有良好的脱硫活性。本文从推进生物脱硫的工程应用出发,针对石油中含量较多且最难脱除的三种有机硫化物:DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT,对其脱硫特性进行深入考察;并在气升式反应器中进行了模拟燃料油脱硫性能的研究。具体包括:

1、对ZD-19的脱硫能力和脱硫底物范围进一步考察,研究ZD-19对4MDBT的脱硫特性,利用GC和GC-MS等技术分析其代谢产物,推断其代谢途径。

2、通过摇床实验和反应器实验的对比研究,考察 ZD-19 在油相中的脱硫活性,了解其应用于油品脱硫的可行性;并且明确气升式反应器在生物脱硫方面的优势,对其促进传质反应的特性进行考证。

3、对气升式反应器的基本操作参数进行优化,考察体系下最适合的表现气速、菌液浓度和 DBT 浓度等,为下一步模拟燃料油的研究奠定基础。

4、目前生物脱硫在油相中的研究有两种主要形式：一、以含 DBT 的烷烃为模拟油相；二、以实际油品为油相。而对于油品中主要有机硫化物如 DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 等的作用机理研究较少，本论文以休止细胞作为生物催化剂，选用正十六烷为模拟油相，考察了 DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 在模拟柴油体系中的脱硫特性。

## 第3章 材料与方法

### 3.1 仪器与试剂

仪器：9790 气相色谱仪（浙江温岭），2010 双通道色谱工作站，可见分光光度仪（上海校光技术有限公司），超净工作台（苏净集团安泰公司），DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱（上海精宏实验设备有限公司），恒温摇床（江苏太仓 THZ-C 型），LD5-2A 低速离心机（北京医用离心机厂）。

试剂：二苯并噻吩(DBT)：纯度 99%，2-羟基联苯(2-HBP)：纯度 99%，苯并噻吩(BT)：纯度 99%，4,6-二甲基二苯并噻吩(4,6DMDBT)：纯度 95%，4-甲基二苯并噻吩(4MDBT)，纯度 99%，购自 Fine Chemicals 公司；正十六烷和乙酸乙酯为色谱纯；其他化学试剂均为分析纯。主要试剂的理化性质见表 3-1。

表 3-1 主要化学试剂的理化性质

Table3-1 Physicochemical property of primary chemical reagent

名称	DBT	2-HBP	4,6DMDBT	BT	4MDBT
CAS 登记号	132-65-0	90-43-7	1207-12-1	11095-43-5	7372-88-5
分子式	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> S	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> S	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> S	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> S
分子量	184	170	212	134	198
熔点	97-100℃	55.5-57.5℃	153-157℃	28-32℃	64℃
沸点	332-333℃	280-284℃	380℃	221-222℃	298℃
其他	溶于醇和多种有机溶剂，不溶于水。	溶于醇，氢氧化钠溶液和多种有机溶剂，不溶于水。	溶于醇和多种有机溶剂，不溶于水。	不溶于水。易溶于醇醚、苯、氯仿、丙酮等有机溶剂。	溶于醇和多种有机溶剂，不溶于水。

### 3.2 脱硫微生物的培养

#### 3.2.1 菌株

ZD-19，实验室自行分离得到，经 16S rDNA 鉴定属于分枝杆菌属 (*Mycobacterium* sp.)。



### 3.2.2 培养基

(1) 无硫无机盐基本培养基 BSM(Basal Salts Medium)组成:  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  5.0 g,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  2.0 g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.2 g,  $NH_4Cl$  2.0 g, 甘油 4g, 微量元素 1 mL, 蒸馏水 1000 mL, 灭菌备用。

微量元素混合液组成 (ml):  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1 mg,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.4 mg,  $ZnCl_2$  0.2 mg,  $CaCl_2$  20 mg,  $H_3BO_3$  0.05 mg,  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  0.2 mg,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  4 mg,  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$  0.1 mg,  $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$  0.8 mg。

(2) 液体选择培养基 BSDM: 灭菌后的 BSM 中加 0.2 mmol/L DBT-乙醇溶液作为唯一硫源。

(3) 固体选择培养基 BSDM 和斜面: 液体选择培养基加 1~2%水洗琼脂, 加热溶解并高压灭菌后搁置斜面。

### 3.2.3 实验用生物菌种制备

分枝杆菌 *Mycobacterium* sp.ZD-19 是本实验室自行分离的, 具有较高脱硫活性的脱硫菌株, 前期研究已经证明 ZD-19 可以沿 4S 途径将 DBT 和 4,6DMDBT 进行降解。

(1) 菌种活化: 将 4 °C 冰箱保存的菌种接种于斜面培养基上, 30 °C 培养 4d。

(2) 摇瓶种子培养: 为保证每批实验的一致性, 先培养摇瓶种子, 统一接种量, 选择 BSDM 作为培养基, 灭菌后, 接种经活化菌种, 置于 30 °C 摇床, 180  $r \cdot min^{-1}$ , 培养 48 小时。

(3) 休止细胞制备: 细胞在以 DBT 为唯一硫源的无机盐基础培养基中培养至对数后期停止培养, 菌悬液离心分离, 用 0.85% 的生理盐水洗涤一次, 将下层菌相浓缩悬浮于 pH 7.0 的 0.1  $mol \cdot L^{-1}$  的磷酸缓冲液中, 置于冰箱中保存。

### 3.2.4 菌种衰退防止和保藏

筛选得到得菌株由于多次使用和移种, 以及环境条件的变化, 经常使其在特定环境中表现出的活性发生变化。从实验的延续性考虑, 应尽量避免菌种的活性衰退。研究中我们主要从以下几个方面防止菌种衰退: 控制传代次数, 减少发生自发回变的几率; 严格控制培养条件和生理环境; 尽量在菌种生长的对数初期使用或移种接代; 在菌种性能尚未衰退前就经常有意识地进行纯种分离和各种性能指标的测定; 积极复壮, 自觉地利用微生物自发正向突变而不断从中选出优良菌种; 采用有效的菌种保藏方法等。对已发生活性衰退的菌种, 则要从衰退的菌群中分离纯化未发生回变的菌落, 再在适合该菌株生长的培养环境中进行复壮培养或重新采用定向诱导的方法使菌株发生正向突变。

因为菌种的各种变异都是在微生物的生长繁殖过程中发生的, 为了防止

菌种的衰变，选择适宜的保藏方法很重要。无论采用哪一种菌种保藏法，首先要挑选典型优良纯种，其次创造一个有利于休眠的环境条件，另外还要考虑方法的通用性与简便性。

本研究中针对菌种的特性，对于菌株的短期保存主要采取了斜面传代保藏法，将接种培养的斜面置于 4℃ 冰箱保存，每隔 1-3 个月时间接种于空白斜面继续保藏。

### 3.3 正十六烷的回收利用

正十六烷经实验反应后，与生物细胞一起形成油水混合的乳化液，在工程应用中人们正是从此乳化液中回收处理后的低硫石油产品。实验中的反应产物 2-HBP 是较易溶解于氢氧化钠溶液的，因此本实验室以氢氧化钠为萃取剂对正十六烷进行回收：

(1) 离心：反应后的油水乳化液于 4800rpm 下离心分离，上层正十六烷转移至分液漏斗中。

(2) 萃取：往分液漏斗中加入与正十六烷等体积的氢氧化钠溶液（4g/L），萃取分离后，将下层水相放出。如此重复 3 次。

(3) 脱色：将去除杂质后的正十六烷转入锥形瓶，并加入一定量的活性炭进行脱色，静置过夜。

(4) 过滤：将脱色后的正十六烷过滤去除活性炭颗粒即可再次使用。

### 3.4 气升式反应器实验装置

生物催化脱硫运用到实际不仅要解决生物催化剂的专一性、稳定性和活性问题，更重要的是生化反应的反应器设计。反应器的设计涉及许多物化因素如：油水比、氧气的传递、油水相分离与扩散、生物催化剂的再生等。结合各反应器的特性，本实验采用气升式反应器。

微生物在反应器中的脱硫性能测试装置如图 3-1 所示。本实验采用内循环气升式反应器，有机玻璃反应器主要由内、外管和夹套组成，内外管呈同心圆设置，升气管内径 30 mm，外管内径 50 mm，壁厚 5mm。反应器工作容积约为 500 mL。气体由气泵产生，经过装有棉花过滤的净化缓冲瓶后，由一气体转子流量计控制流量，从升气管的底部经气体分布器的曝气头鼓气，从反应器的顶部流出。通过气泡液体和纯液体的密度差造成升力，液体沿内管上升，在顶部沿外管下降，沿此流道循环流动。实验间歇操作，液体不连续。水泵把恒温水浴锅内的水泵入反应器的夹套中，循环流动使反应器里反应体系的温度保持不变。

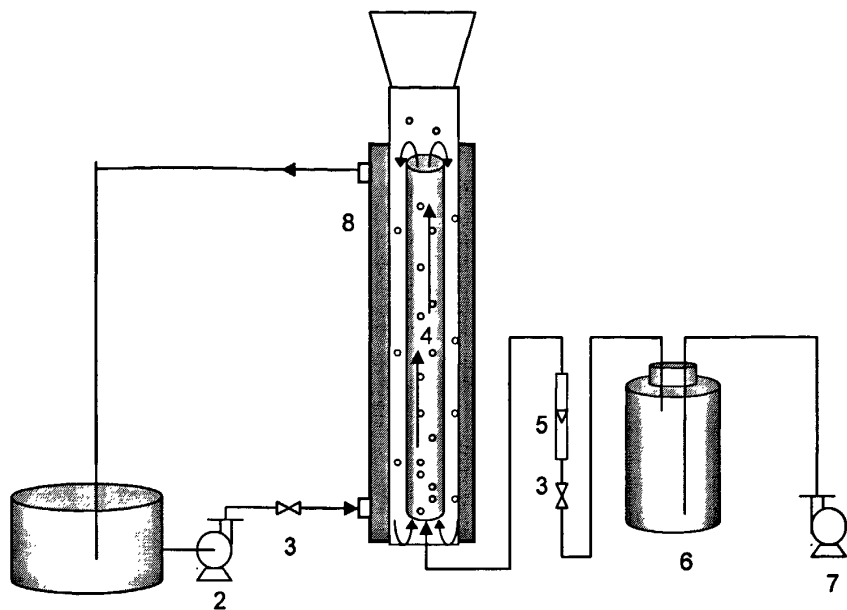


图 3.1 气升式反应器的生物脱硫流程图

Fig.3.1 Flow chart of biodesulfurization in airlift reactor

1. 恒温水浴锅 2. 水泵 3. 阀门 4. 气升式反应器 5. 流量计 6. 空气净化缓冲瓶 7. 气泵 8. 夹套

### 3.5 分析方法

#### 3.5.1 细胞浓度的测定

测定菌液在 620 nm 波长下的吸光度, 通过 620 nm 下的吸光度与细胞干重的线性关系, 得到对应的菌液浓度值 (g/L)。菌液浓度 (Dry cell weight, DCW) 和 OD620 的标准曲线如图 3.2。

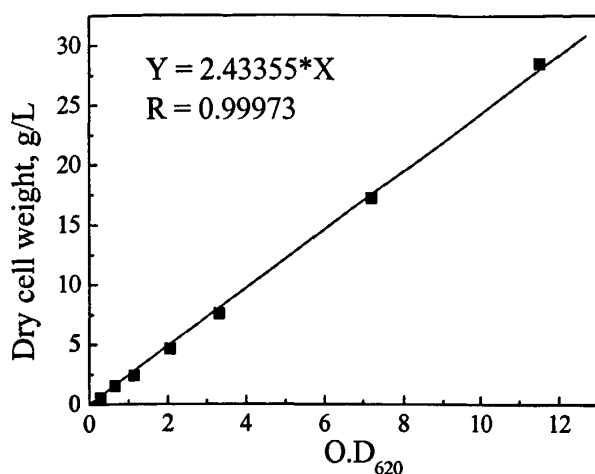


图 3.2 ZD-19 菌液浓度标准曲线

Fig.3.2 Standard curves of cells concentration of ZD-19

### 3.5.2 有机杂环化合物及其产物测定

有机硫化物包括二苯并噻吩、苯并噻吩、4,6-二甲基二苯并噻吩、4-甲基二苯并噻吩, 以及 DBT 脱硫产物 2-羟基联苯。其浓度均以气相色谱分析, 色谱柱型号为 SE-54, 规格为 30 m×0.32 mm×0.33 μm, 由中国科学院兰州化学物理研究所色谱技术研究开发中心制造。

检测器和进样器均设为 280℃, 载气为氮气, 流速为 2.07 mL·min<sup>-1</sup>, 氢气为 FID 检测器燃料气, 流速为 30 ml/min; 空气为助燃气, 流速 300 ml/min。各物质萃取相不同时, 柱箱温度采用不同的控制条件:

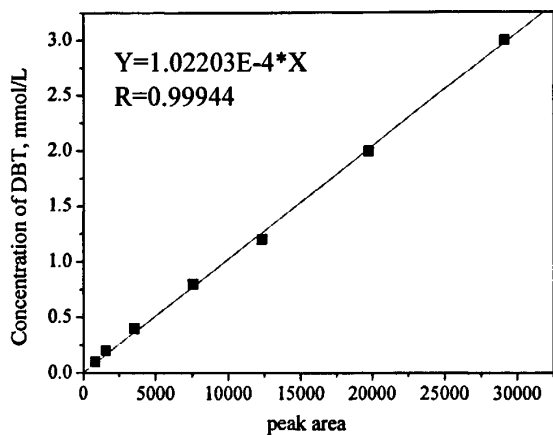
乙酸乙酯或乙醇为萃取相时: 测定 DBT、2-HBP、BT、4,6DMDBT 和 4MDBT 时的柱温和保持时间分别为: 200℃ (15min)、200℃ (15min)、200℃ (10min)、220℃ (15min), 220℃ (15min)。

正十六烷为萃取相时, 柱箱采用程序升温控制, 其中测定 DBT、2-HBP 和 BT 时, 柱温初始温度设为 150℃, 保持 15 min, 然后以 5.0℃/min 升至 200℃, 保持 3 min, 再以 10.0℃/min 升至 270℃, 保持 5 min, 分析时间设为 40 min。DBT 也可与 4,6DMDBT 或 4MDBT 一样在第二种程序升温中分离测定, 即设置柱温初始 200℃, 以 10.0℃/min 升至 250℃, 保持 7 分钟, 分析时间为 12min。标准物质一系列浓度的标准溶液进行 GC 测定, 以测得的峰面积为横坐标, 样品的摩尔浓度或质量浓度为纵坐标作图, 如图 3-3, 进行线性回归, 回归方程见表 3-3。其中 X 为峰面积, Y 为有机含硫化化合物的浓度。

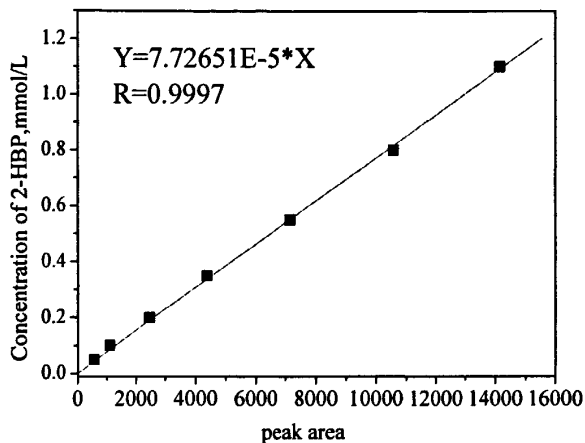
表 3-2 各含硫化合物的线性回归方程和相关系数

Table3-2 Linear regression equations of organic sulfur compounds and correlation coefficient

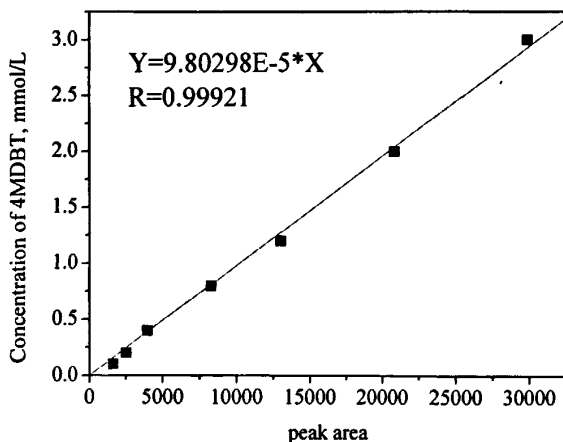
化合物	线性回归公式	相关系数 R	标准偏差 SD	数据点 N
DBT	$Y = 1.02203E-4 * X$	0.9994	0.0379	7
2-HBP	$Y = 7.72651E-5 * X$	0.9997	0.01167	7
BT	$Y = 1.67072E-4 * X$	0.9993	0.02094	6
4,6-DMDBT	$Y = 9.0414E-5 * X$	0.9995	0.04237	7
4MDBT	$Y = 9.80298E-5 * X$	0.9992	0.05654	7



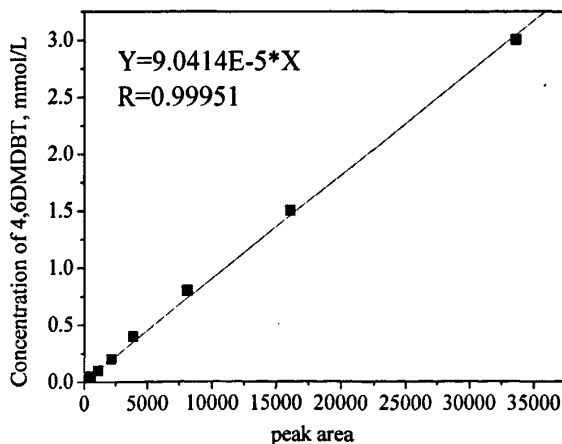
(a) DBT



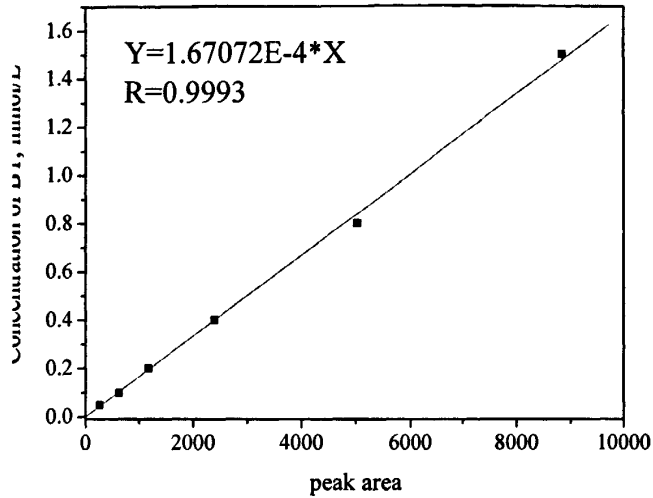
(b) 2-HBP



(c) 4MDBT



(d) 4,6DMDBT



(e) BT

图 3.3 各含硫杂环化合物及产物 2-HBP 的 GC 标准曲线

Fig.3.3 Standard curves of organic sulfur compounds and 2-HBP

(a) DBT (b) 2-HBP (c) 4MDBT (d) 4,6DMDBT (e) BT

### 3.6 微生物脱硫性能实验

本研究的实验主要在反应器中进行，少部分在摇床中进行。具体实验条件见各章节，其中脱硫活性以单位时间一定量的菌体降解 DBT 产生 2-HBP 的量来衡量。

#### 3.6.1 摇瓶中休止细胞脱硫活力测定

水溶液中休止细胞的脱硫活力测定：25 mL 锥形瓶中加入 3ml 休止细胞悬浮液和一定浓度 DBT，置于恒温摇床中 30℃ 反应，间隔一定时间取样，加入 10% 盐酸调  $\text{pH} \leq 2$  后，等量乙酸乙酯萃取，4800  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心分离 10 分钟，萃取相用 GC 分析。

双液相体系中休止细胞脱硫活力的测定：50mL 锥形瓶中加入 5ml 的休止细胞悬浮液和 5ml 的正十六烷，加 DBT 溶液，置于恒温摇床中 30℃ 反应，间隔一定时间取样，4800  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心分离 10 分钟，有机相用 GC 分析。

### 3.6.2 反应器中休止细胞脱硫活力测定

反应器中脱硫活力测定在油水双液相体系中进行：反应器中加入 300ml 休止细胞悬浮液和等体积的正十六烷，加入一定量的 DBT，在 30℃ 恒温水浴下反应，间隔一定时间取样，4800  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心分离 10 分钟，有机相用 GC 分析。（GC 条件见分析方法）

## 第4章 ZD-19 脱硫特性的研究

化石燃料中的硫燃烧排放是引起严重的环境问题酸雨的一个主要原因。随着能源危机的加剧，高硫化石燃料的开采成为必然，而人们对低硫燃料的需求却越来越大，因此，迫切需要发展燃烧前深度脱硫的技术。微生物脱硫技术由于反应条件温和，与加氢技术偶联后工艺成本低，在含硫燃料的精加工方面有着广阔的前景。

石油中含有约 200 多种硫化物，沸点较高的二苯并噻吩 (DBT) 及其衍生物是典型的难脱除有机硫的代表物，它们也是柴油馏分中含量最高最难脱除的几种化合物，常被用作模型化合物评价脱硫效果。

前人研究已经确定了 ZD-19 对 DBT 和 4,6DMDBT 等有机硫的脱硫特性，为了进一步考察菌株 ZD-19 的脱硫底物范围，了解其在水相中的脱硫特性，我们对 ZD-19 降解 4MDBT 的产物进行了分析，并深入考察了 ZD-19 对 BT 的降解特性。然后我们在摇床中进行了两相脱硫实验，并且和反应器的脱硫实验进行了比较，为下一章气升式反应器的研究奠定基础。

### 4.1 4MDBT 代谢途径分析

已有研究成果显示，ZD-19 能够专一性的切断 C-S 键，按照 4S 延伸途径脱除 DBT 和 4,6DMDBT。4MDBT 也是燃料油特别是柴油馏分中含量较高的有机硫化物，它同样是 DBT 的烷基取代物，因此就 ZD-19 对 4MDBT 的脱硫特性也进行了考察。

在 3ml 25g/L 的休止细胞悬浮液中加入 0.5mmol/L 的 4MDBT，30℃下置于摇床中反应 3h 后，用等体积乙酸乙酯萃取，5000rpm 下离心，取上层液体进行分析。反应前后的 GC 谱图如图所示。由图中可以看出，与反应前相比较，反应 3 小时后随着 4MDBT 的减少，GC 谱图中除了 4MDBT 峰、溶剂峰和杂质峰外，还在 6.3min 和 6.5min 左右出现了两个新物质峰，疑为 4MDBT 的降解产物。收集乙酸乙酯相，加入少量无水硫酸镁，静置过夜，脱去残留水分。敞口放置，待一定量乙酸乙酯溶剂挥发后，得到浓缩样品送 GC-MS 检测。

GC 谱图中 6.3min 和 6.5min 左右出现的两个新物质峰，对应 GC-MS 图中 4.31min 和 4.44min 的物质峰。根据质谱图显示，6.5min 的代谢产物为 4 甲基 2 苯基苯酚(或 4 甲基羟基联苯)，表明 ZD-19 也可以延 4S 途径将 4MDBT 的 C-S 断裂，生成相应的羟基取代物。把 6.3min 代谢产物的质谱图与 4 甲基 2 苯基苯酚的标准质谱图对比后，发现两者有很高的匹配度，推测 6.3min 代谢产物应该是 4 甲



基 2 苯基苯酚的同分异构体；再根据 4MDBT 的 C-S 键位置和氧化过程，推断此代谢产物应该是 2 羟基 3 甲基联苯。DBT 和 4, 6DMDBT 的分子都是对称结构，而 4MDBT 的分子结构具有不对称性，因此在氧化过程中，羟基的取代位置会发生变化。有研究者也发现 4MDBT 在生物脱硫过程中可以生成多个代谢产物<sup>[68]</sup>。

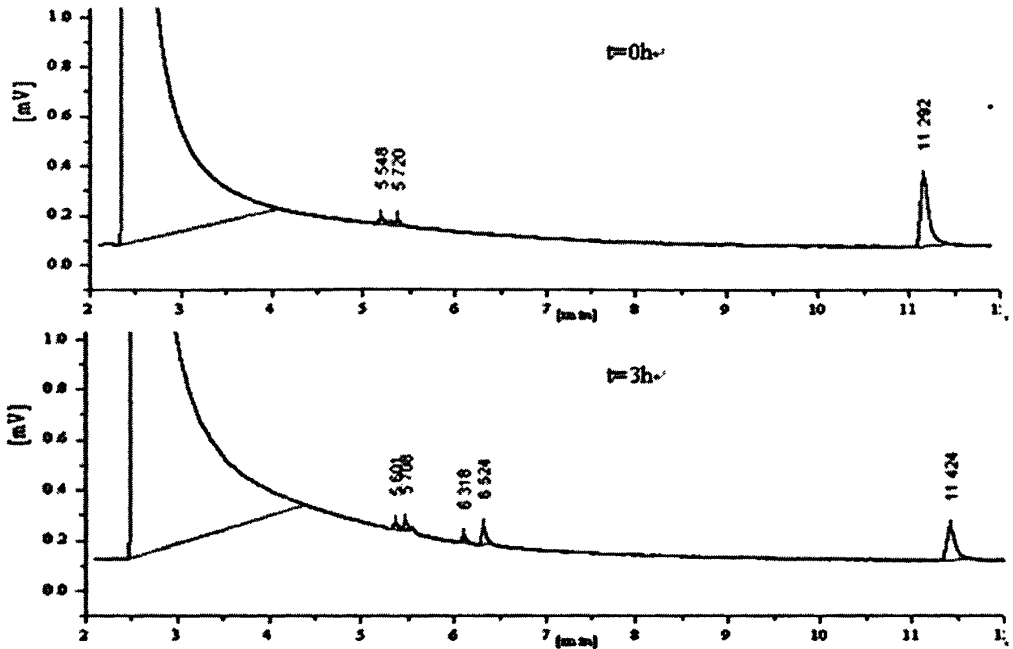


图 4.1 ZD-19 休止细胞脱除 4MDBT，在 0h 和 3h 底物和代谢产物的 GC 图

Fig. 4.1 GC spectra of DBT and its metabolites desulfurized by resting cell of ZD-19 at various reaction times

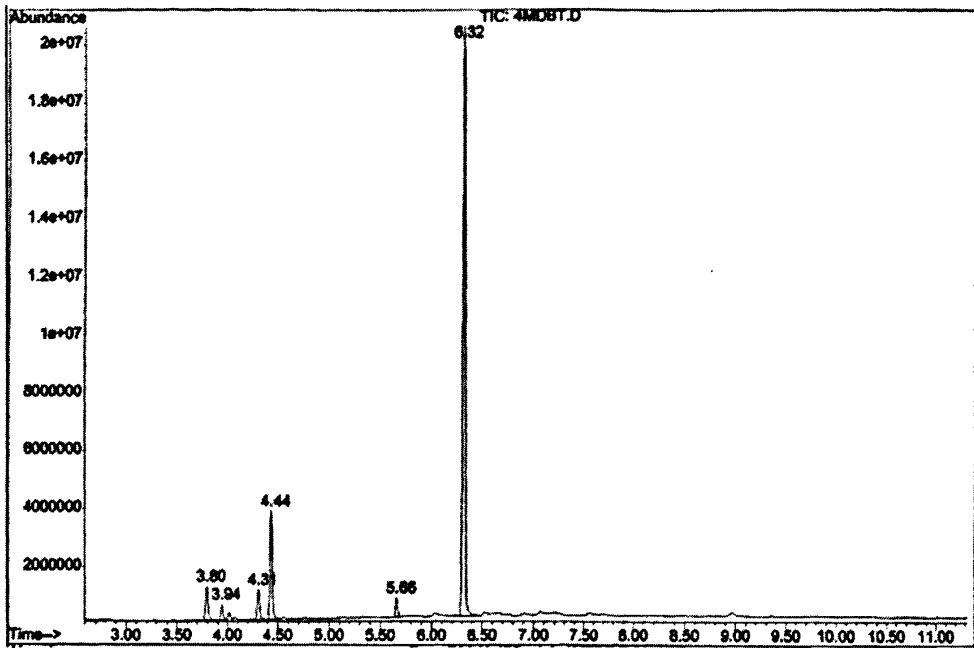


图 4.2 ZD-19 降解 4MDBT 的 GC-MS 气相色谱图

Fig4.2 GC spectra of 4MDBT and its metabolites by *Mycobacterium* sp. ZD-19

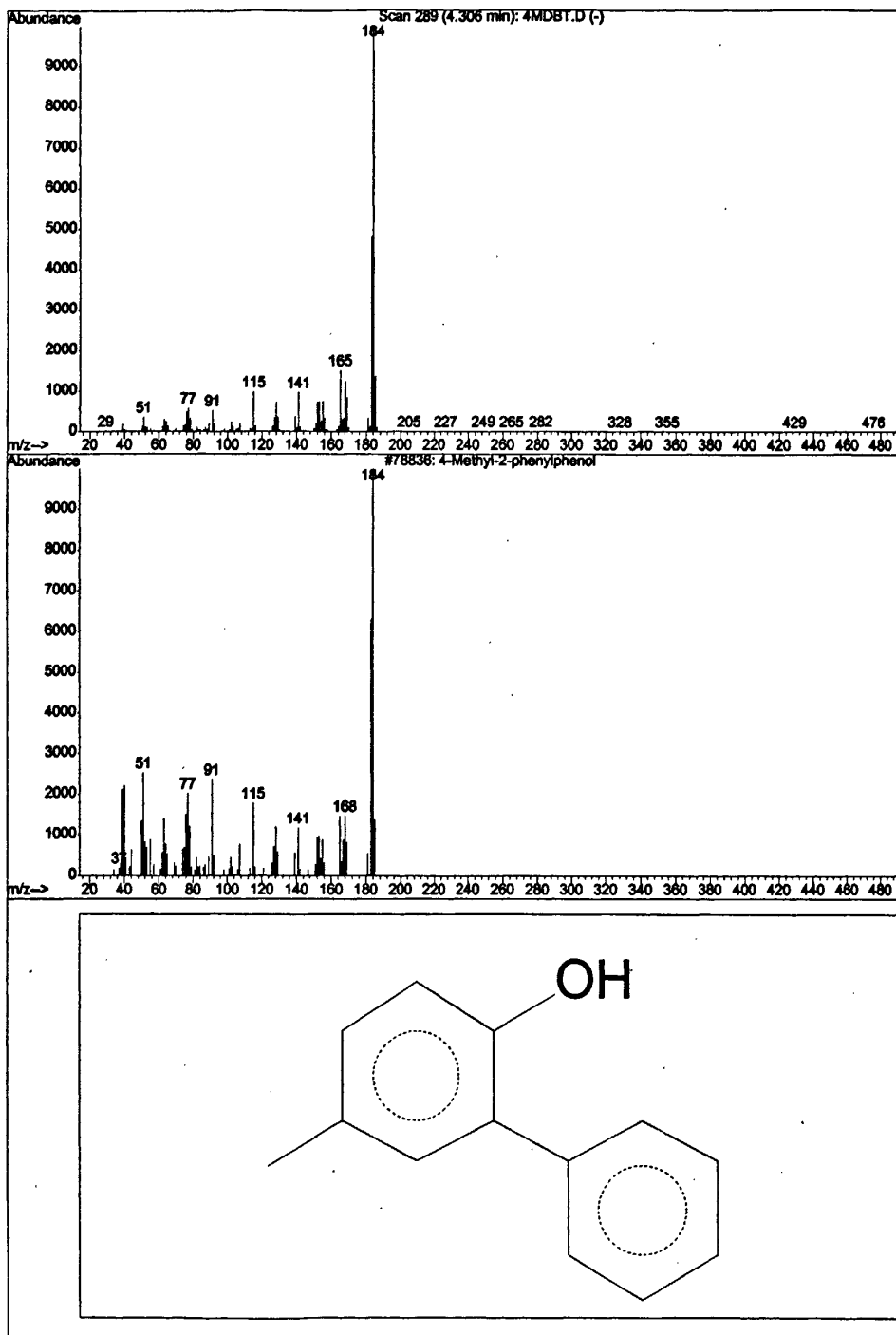


图 4.3 ZD-19 降解 DBT 气相谱图中 4.31 min 产物质谱图与标准图谱的对照  
 Fig. 4.3 GC-MS spectra, with retention time at 4.31 min, was shown to be 4-Methyl-2-phenylphenol its standard spectra.

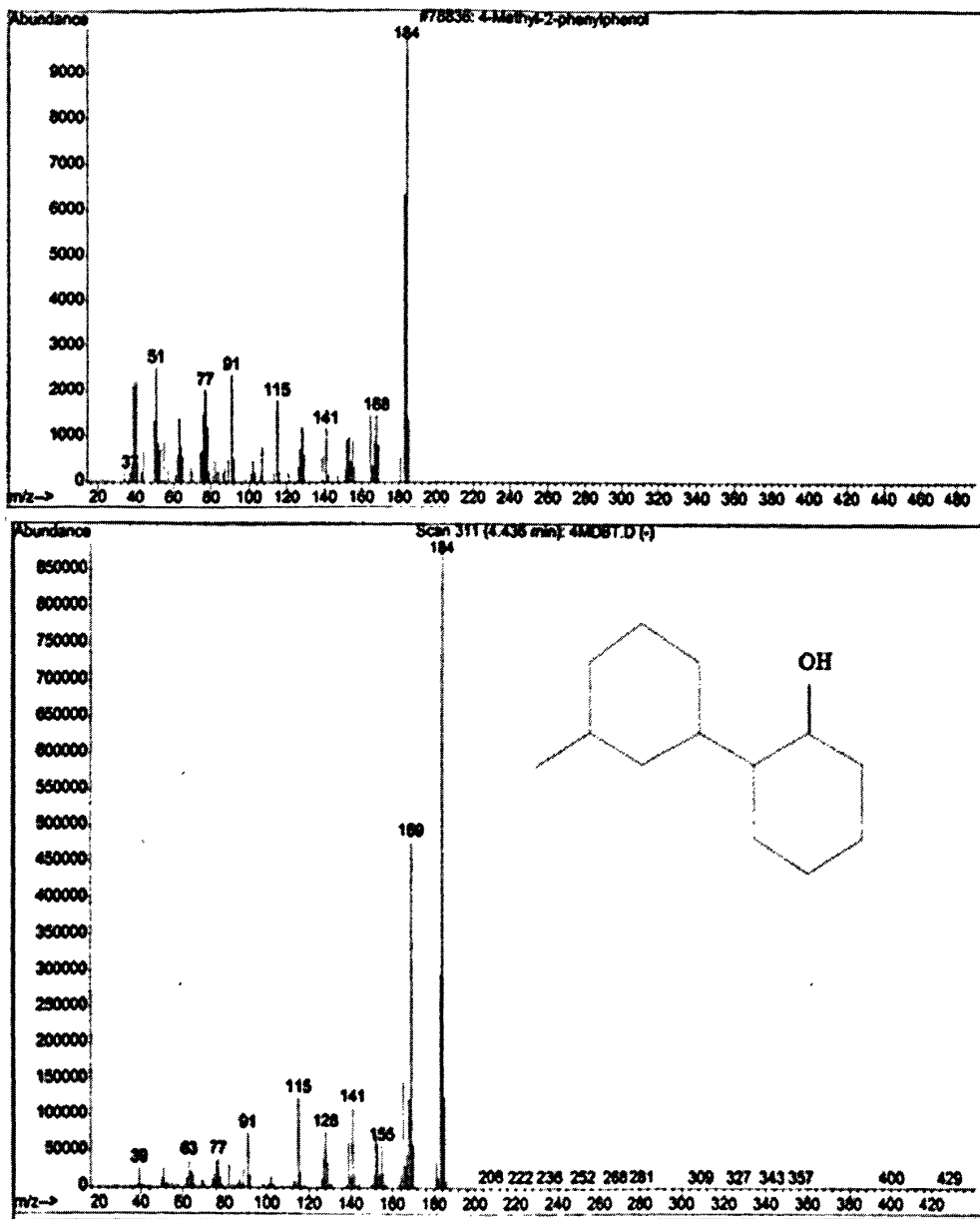


图 4.4 ZD-19 降解 4MDBT 气相色谱图中 4.44min 产物质谱图

Fig. 4.4 GC-MS spectra, with retention time at 4.44 min and standard spectra of 4-Methyl-2-phenylphenol.

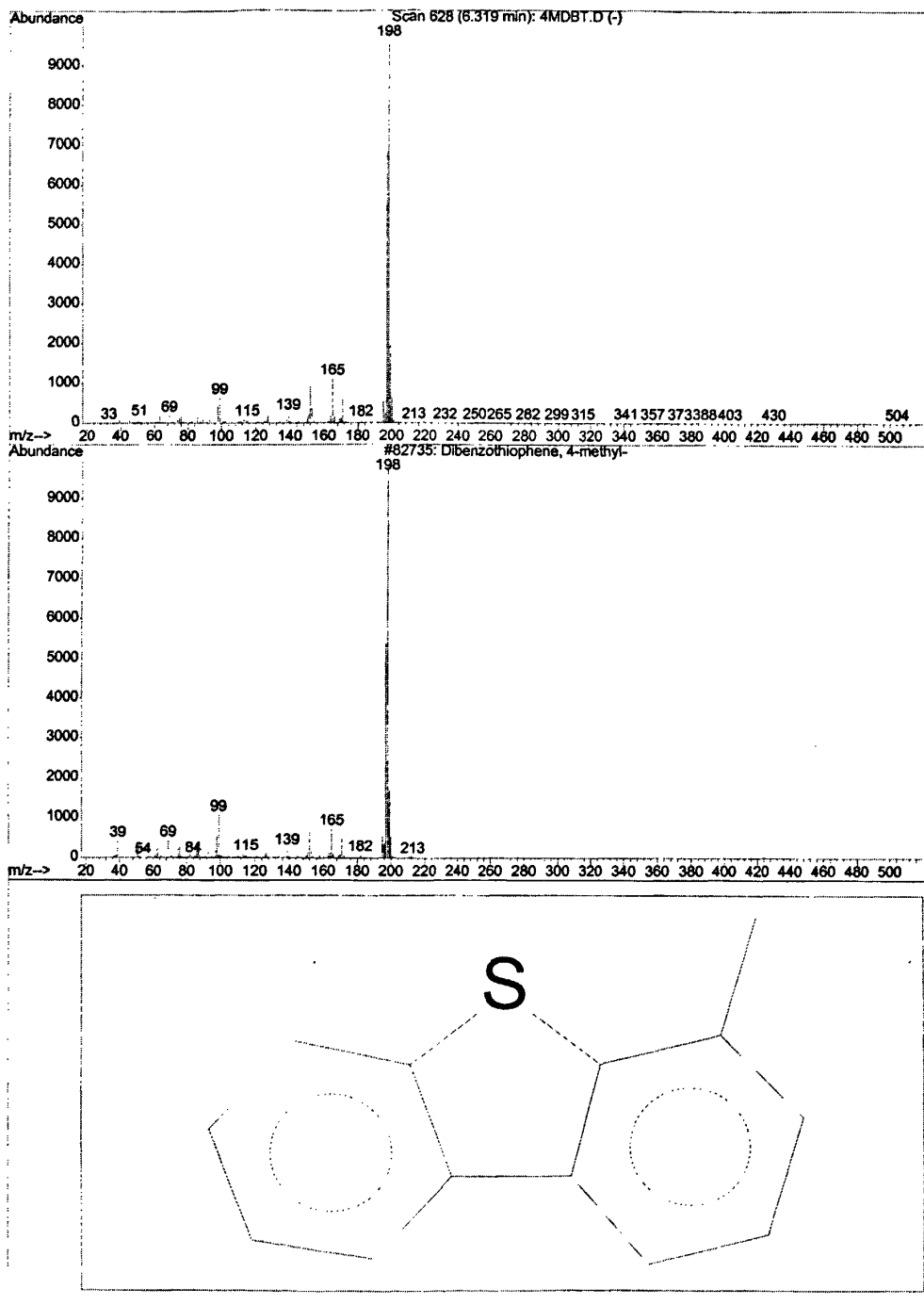


图 4.5 ZD-19 降解 4MDBT 气相谱图中 6.32min 底物 4MDBT 质谱图与标准图谱的对照  
 Fig. 4.5 GC-MS spectra, with retention time at 6.32 min, were shown to be 4MDBT and its standard spectra.

## 4.2 苯并噻吩的脱硫特性

前期实验认为 ZD-19 对苯并噻吩也具有较好的脱除性能, 本研究对此加以考察。实验在摇床中对苯并噻吩(BT)的脱硫活性进行考察, 同时设计了挥发性实验做对比。

水相实验: 3ml 10.2g/L 的休止细胞菌液加入 0.5mmol/L 的 BT, 酸化萃取离心后 GC 测定 BT 初始浓度, 作为反应 0h 的样品; 在 3ml10.2g/L 的休止细胞菌液加入 0.5mmol/L 的 BT, 置于 30℃摇床中反应 5 小时, 同时在 3ml 磷酸缓冲液(PHB)中加入等量的 BT, 在没有微生物的情况下, 置于摇床中挥发 5h。

两相实验: 5ml 10.2g/L 的休止细胞菌液加入等体积含 0.5 mmol/LBT 的正十六烷, 离心后测定 BT 初始浓度; 在 5ml10.2g/L 的休止细胞菌液加入等体积的含 0.5 mmol/LBT 的正十六烷, 置于 30℃摇床中反应 5 小时, 同时在 5ml 磷酸缓冲液(PHB)中也加入等体积含 0.5 mmol/LBT 的正十六烷, 同样条件下挥发 5h, 离心后测定。每组重复 3 次, 结果如下表:

表 4.1 ZD-19 对苯并噻吩的降解特性

Fig.4.1 Biodesulfurization of BT by ZD-19

	水相实验(mmol/L)				两相实验(mmol/L)			
	1	2	3	平均值	1	2	2	平均值
生化反应 0h	0.56	0.58	0.60	0.58	0.55	0.57	0.53	0.55
生化反应 5h	0.028	0.021	0.020	0.023	0.55	0.55	0.54	0.55
挥发 5h	0.040	0.043	0.050	0.045	0.53	0.56	0.53	0.54

结果显示, 在两相实验中BT在摇床中反应5h后基本不发生减少; 而在水相实验中, 反应5h后BT发生明显减少, 同时没有发生生化反应的PHB中的BT也大量减少, 减少幅度与前者相当。因此, 实验推断ZD-19并不能降解苯并噻吩, 这也解释前期研究中无法检测到BT代谢产物的现象, 同类实验也没有对生成物进行检测<sup>[79]</sup>。苯并噻吩具有较高的饱和蒸气压, 也有报道指出BT较易挥发<sup>[69]</sup>。所以前期关于ZD-19降解BT的研究忽略了挥发性的影响。ZD-19并不能降解苯并噻吩, 而是对于二苯并噻吩及其取代物具有专一性的菌种。

## 4.3 油水两相中 ZD-19 的脱硫活性

本论文大部分实验都是在油水两相中进行的, 且两相实验中细胞的脱硫活性和有机硫的初始浓度较之前提高, 原先的脱硫活性曲线不再适合解释新条件下

的细胞脱硫活力。因此，实验设计考察了新条件下的脱硫活性曲线。结果如下图 4.6 所示：

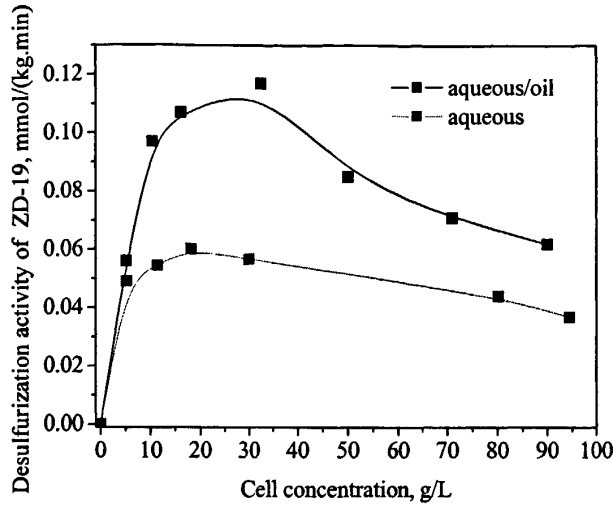


图 4.6 不同休止细胞浓度下的脱硫活性  
 Fig.4.6 Desulfurization activity of resting cells in oil phase  
 30°C, C<sub>0DBT</sub>=1mmol/L

结果显示，在水相和油水两相介质中，随着细胞浓度的增加，反应生成的 2-HBP 持续增加，但是脱硫活性(以产物 2-HBP 单位菌体量的生成速率表示)并不随着细胞浓度的增加而持续增长。在水相中最适菌液浓度出现在 10-20g/L 之间，此时脱硫活性最大值为 0.061mmol/(kg.min)，此后再增加细胞浓度脱硫活性不发生升高，反而出现下降趋势。在油水两相中，细胞浓度达到 30 g/L 时，2-HBP 的最佳脱硫活性是水相中的 2 倍，随后细胞浓度增加脱硫活性也出现下降趋势，但是在 10-40g/L 的浓度范围内细胞都具有较高的脱硫活性。低浓度的菌悬液，因为细胞量少，同时 DBT 在水中的溶解度低，细胞与底物的接触效率降低；在油相中，低浓度的细胞与有机相的接触面积减少，同样降低了与油相中 DBT 的接触效率，因而低浓度的休止细胞表现出较差的比脱硫活力；当菌液浓度升高时，细胞与底物以及两相间的接触效率都提高了，脱硫活性也快速上升，但是当菌液浓度过高时，脱硫活力反而下降。可能是因为高浓度的菌液不利于传质，特别时 DBT 降解过程中必需的 O<sub>2</sub> 的传递。因此，在水相系统中，从菌体充分利用的角度考虑，最佳细胞浓度应当选择在 10-20 g/L 左右。

同时由图 4.6 也知，在相同条件下，油水两相的脱硫速率明显大于水相，这说明正十六烷的存在能促进菌株对 DBT 的脱硫活性。这可以从两方面解释：一是因为产物 2-HBP 极易溶于油相，当 DBT 与细胞反应生成 2-HBP 时，水相中的

2-HBP 迅速被油相吸收, 减少了产物存在水相造成的对菌体脱硫能力的抑制。二是油相的存在提高 DBT 的溶解度, 据前期研究, 两相系统中, 生物降解主要发生在油水界面, 正十六烷能提高 DBT 在细胞内外的传质速率<sup>[61]</sup>, 进而提高了 DBT 的利用效率。

#### 4.4 反应器和摇床的对比实验

##### 4.4.1 生长细胞的脱硫特性比较

分枝杆菌ZD-19可以在摇床中生长, 30℃下, 以甘油为碳源, 以DBT为硫源, 培养至48小时时达到最佳的生长速率和最高的细胞浓度。本研究也对反应器中的细胞生长特性进行了考察。

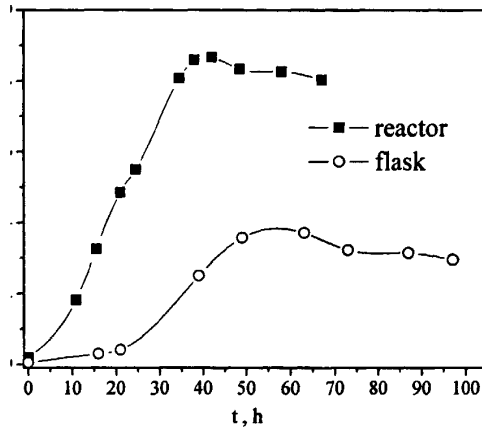


图 4.7 气升式反应器和摇床中 ZD-19 的生长曲线

Fig. 4.7 The time course of ZD-19 growing with DBT as sole sulfur source in reactor or flask

Reactor: 30℃,  $Q=200\text{L/h}$ ,  $C_{\text{ocell}}=0.2\text{g/L}$ ,  $C_{\text{0DBT}}=0.2\text{mmol/L}$

Flask: 30℃,  $C_{\text{ocell}}=0.17\text{g/L}$ ,  $C_{\text{0DBT}}=0.2\text{mmol/L}$

如图4.7对反应器中的细胞生长曲线与摇床实验中的细胞生长曲线进行了比较。在35h左右, 反应器内ZD-19达到指数生长后期, 此时最大比生长速率为  $0.15\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ , 细胞浓度相应达到  $8.1\text{g/L}$ , 分别是摇床实验中48h时最大比生长速率和细胞浓度的1.4倍和2.3倍。近年来, 气升式反应器在各种生化过程及化学反应过程的应用越来越多, 并研究开发性能优良的ALR代替机械搅拌罐或静态培养来培养生物细胞和发酵。气升式反应器独特的流体特性大大提高了液体的混合效果, 不断上升的空气流不仅促进液体混合, 还为细胞生长提供了充足的氧气。一些研究表明<sup>[70,71]</sup>气升式反应器中细菌细胞形成片状颗粒, 体积小, 有利于氧和养



分的传递。因此，相比摇床中的静态培养，气升式反应器内不仅 ZD-19 的生长速度大大提高，细胞生长总量也明显翻倍。反应器更适合实际应用中生物催化剂的批量培养。

#### 4.4.2 休止细胞脱硫特性比较

为了进一步考察气升式反应器在生物脱硫方面的优势，实验设计了反应器与摇床的对比实验。

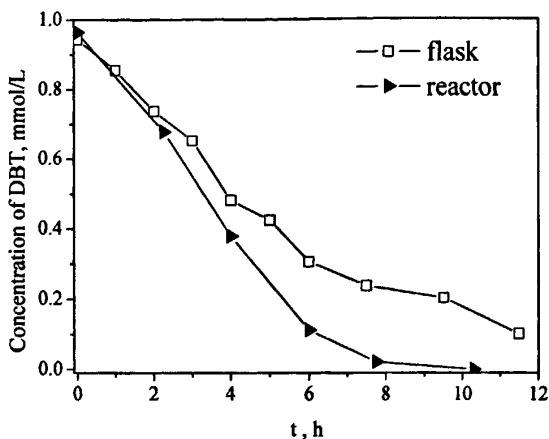


图 4.8 摇床和反应器实验的 DBT 降解曲线比较  
Fig 4.8 Desulfurization of DBT in reactor and in flask

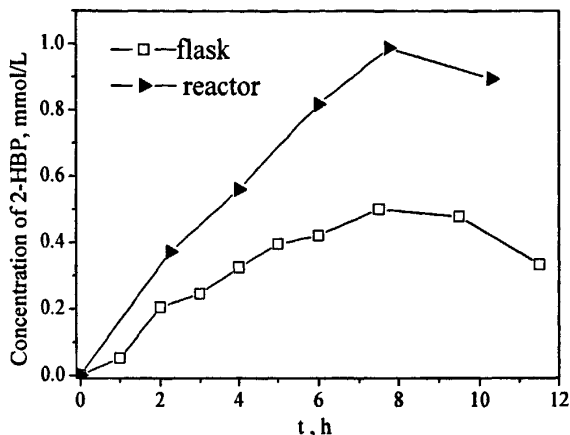


图 4.9 摇床和反应器实验的 2-HBP 生成曲线比较  
Fig 4.9 Production of 2-HBP in reactor and in flask

Reactor: 30°C, Q=300L/h,  $C_{cell}=12\text{g/L}$ ,  $C_{0DBT}=0.97\text{mmol/L}$

Flask: 30°C,  $C_{cell}=12\text{g/L}$ ,  $C_{0DBT}=0.95\text{mmol/L}$

从 DBT 的降解曲线来看，反应器中，0.95mmol/L 的 DBT 反应 10h 基本完全脱除，此时摇床实验中 DBT 的降解效率约为 78.4%。2-HBP 的生成量伴随着 DBT 的降解而不断增加，反应器中 2-HBP 的生成速率较摇床实验也表现出一定优势。在反应器中 2-HBP 的最大生成量与 DBT 的加入量相当，约为 0.98mmol/L，将几乎是摇床实验 2-HBP 最大浓度的 2 倍。这些结果进一步证明了反应器对生物反应的促进作用。

ZD-19 对 DBT 的代谢不同于传统的 4S 途径，它可以将 2-HBP 进一步反应生成 2 甲氧基联苯 (4MBP)，延伸了传统的 4S 途径。这在实验中也有所反映，如图所示，2-HBP 的生成曲线在达到一个最高值后并不保持平衡，而是出现了下降趋势，这正是由于 2-HBP 进一步甲氧基化生成了 2-MBP 而造成的。正是由于 ZD-19 的独特降解途径，实验中 DBT 的降解和 2-HBP 的生成会有不守恒的现象，

这种现象在反应的后期逐渐加强。摇床中这种现象更加明显，如上图 4.8 所示，摇床实验反应至 10h 时 DBT 减少了约 0.8mmol/L，而 2-HBP 的生成量最大只达到 0.5mmol/L，这种差别在其他取样点同样存在。这并不能用 2-MBP 的生成来解释，因为 2-MBP 的生成是在 DBT 基本降解完全或者 2-HBP 达到最大值之后逐渐增多的，实验推测，这一现象可能是细胞对 DBT 的吸附引起的<sup>[72]</sup>，有报道也指出革兰氏阴性菌有更高的亲油性<sup>[73]</sup>，这些因素都会造成 DBT 非生化反应的减少。另外，菌体内的脱硫酶系作用 DBT 时需要一个过程，整个降解遵循“4S”途径，底物无法瞬时转化为产物，从而导致发酵液中累积了大量分析方法无法检出的中间代谢产物<sup>[72]</sup>，这也造成这种“异步”现象的主要原因。而在反应器中吸附作用因为气流的扰动而减弱，并且传质效率的增加提高了菌体活性，加速了脱硫酶的作用，实验结果也显示反应器中 DBT 的减少和 2-HBP 的生成在反应前期基本守恒，当 DBT 降解完全后才出现不守恒的现象。

#### 4.5 本章小结

(1) 考察了 ZD-19 对 4MDBT 和 BT 的脱硫特性，结果表明 ZD-19 也能专一性的切断 4MDBT 的 C-S 键，且由于 4MDBT 独特的不对称结构，代谢过程中羟基取代位置发生变化，所得产物为两个同分异构体：4 甲基 2 苯基苯酚和 3 甲基 2 羟基联苯；实验结果显示 ZD-19 并不能有效去除苯并噻吩。

(2) ZD-19 在油水两相体系中具有较高的脱硫活性，其最佳脱硫活性是水相中的 2 倍，且两相体系促进了传质，提高了细胞的利用效率，较高菌液浓度时还可保持较高的脱硫活性。

(3) 气升式反应器在生长细胞脱硫和休止细胞脱硫实验中都表现出明显的优势。反应器中生长细胞的最大比生长速率和细胞浓度分别是摇床实验 1.4 倍和 2.3 倍；两相体系中，摇床实验也具有较高的脱硫活性，反应 10h，1mmol/LDBT 的降解效率达到 78.5%；气升式反应器具有更高的脱硫速率，反应 10h 时已经基本降解完全。

## 第5章 反应器生物脱硫过程中工艺因素的考察

生物脱硫工艺应该包括强脱硫能力的菌株，并经过摇瓶水平的培养条件探索、反应器水平上放大培养条件和反应条件的探索、反应器的优化设计及连续反应过程的开发等步骤，向实际应用靠近；而这其中反应器中反应条件的摸索是其中的重要环节，如果放大过程失败就无法为后续步骤提供有效数据，从而导致工艺无法实现。

通气量影响表观气速、气含率、气液循环液速以及液滴直径，是影响气液传质传热的关键变量，是决定气升式反应器性能的重要参数；底物浓度、细胞生长介质和细胞浓度又是影响生化反应速率的重要因素，因此实验对气升式反应器在生物脱硫过程中的一些工艺参数进行了考察，明确在多相混合体系中，各因素影响气升式反应器生物脱硫效果的方式。

### 5.1 表观气速对休止细胞脱硫的影响

在反应器中加入 300mL 的正十六烷，300 mL 休止细胞悬浮液，菌液浓度约为 11g/L（相对于水相而言），DBT 初始浓度  $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，改变通气量为 200、260、300、330、360  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  得到相应的表观气速，反应一定时间取样，离心后进气相分析，结果如图 5.1 和 5.2 所示。最好将这些条件标在图标下方。

在反应器的多相体系中，细菌存在于水相，DBT 存在于有机相，通入的气体使液体循环从而带动有机相水相混合，有机相中的 DBT 传递到水相被微生物吸

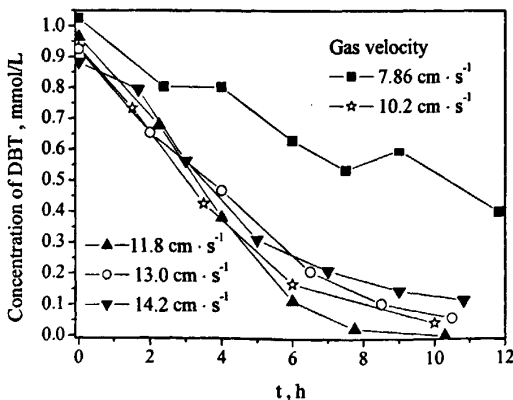


图 5.1 表观气速对 ZD-M2 脱硫的影响

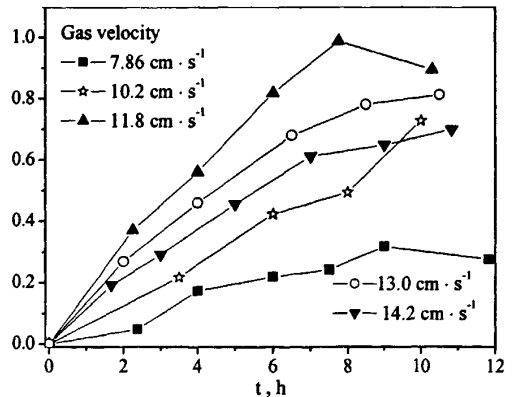


图 5.2 表观气速对 ZD-M2 脱硫的影响

Fig.5.1 Effect of gas velocity on desulfurization by ZD-19

Fig.5.2 Effect of gas velocity on desulfurization by ZD

收降解, 脱除其中的硫。通气量的大小对细菌降解DBT产生直接的影响。较低表观气速条件下上升管中的气泡数量较少, 气泡之间的相互作用小, 并聚程度低, 气含率分布较均匀。随着表观气速的增加, 上升管中的气泡数增加, 气含率增加, 液体循环速度加快, 液体混合更加充分, 氧分子传递速率加快, 生化反应速率相应加快。从图中也可看出, 当通气量从200L/h上升到300L/h, 表观气速从7.86cm/s上升至11.8cm/s的过程中, 反应10h内DBT的降解效率从48%提高到100%。当通气量持续增加, 表观气速达到较大值时, 由于气泡之间的相互作用强烈, 小气泡并聚为大气泡的几率增加<sup>[74]</sup>; 同时, 随着气含率和循环速率不断增加, 反应器内的湍动和涡流加剧, 循环阻力的增加速率逐渐高于气体能量的增加速率。因此, 过高表观气速下, 气泡聚并和循环阻力的增加使得气液接触效率降低, 造成对两相质量传递的反作用, 脱硫效果反而下降。如图所示, 当通气量升至330L/h时, DBT的降解速率和2-HBP的生成速率都低于300L/h。持续增加通气量为360L/h, 此时表观气速高达14.2cm/s, 反应10hDBT的降解效率比300L/h时降低了14.5%。体系下, 通气量为300L/h, 表观气速为11.8cm/s时脱硫效果最好, 此时系统达到了临界表观速率, 当表观速率超过临界表观速率时, 表观速率的增加对气含率产生负面影响<sup>[75,76]</sup>。

从DBT的降解曲线图和2-HBP的生成曲线图也可看出, 与摇床实验类似, 在低表观气速下, DBT的减少和2-HBP的生成也存在较大的不守恒。当表观气速超过11.8cm/s时这种不守恒现象减弱。导致这种现象的原因可能还是细胞吸附作用, 而低表观气速下气流的扰动水平与摇床相当, 不足以干扰细胞的吸附作用, 当气速增加到一定程度, 湍动和涡流的加剧才使得细胞吸附作用减弱。因此, 在进行数据处理时, 2-HBP的生成曲线更适合分析摇床实验和低通气量下的反应器实验, 较高表观气速下的反应器实验, 可以使用DBT的降解曲线或2-HBP的生成曲线来解释。

## 5.2 水相介质的影响

培养基能提供细胞生长的能源而使细胞不断生长更新脱硫, 缓冲溶液职能只能保持细胞活性而不能使之增长。实验分别以生长(无硫培养基BSM)和非生长介质(pH=7.0磷酸缓冲溶液PHB)作为水相, 以正十六烷为有机相的系统中(油水比为1.0), 考察不同水相介质对ZD-19脱硫效率的影响。

图5.3为反应过程中DBT的降解曲线和2-HBP的生成曲线。结果表明, 与之前张英关于微杆菌ZD-M2的考察相似, 分枝杆菌ZD-19在生长介质和非生长介质中

的脱硫效果相近。如图所示，DBT的降解曲线和2-HBP的生成曲线共同表明，以培养基为水相介质时，细胞脱硫能力和以缓冲液为介质时一样在10 h达到最大比脱硫速率，随后随着时间的延长降解速率缓慢。由此可见，在本实验条件下，ZD-19细胞在生长介质和非生长介质中具有几乎相同的脱硫活性。

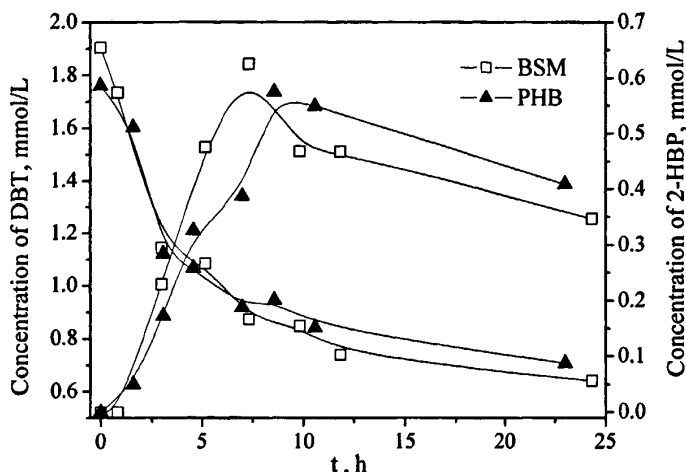


图 5.3 水相反应介质对脱硫的影响

Fig.5.3 Effect of aqueous phase on desulfurization of ZD-19  
30 °C, Q=200L/h,  $C_{cell}=12\text{g/L}$ ,  $C_{0DBT}\approx 1.0\text{ mmol/L}$

### 5.3 休止细胞浓度的影响

保持有机相体积及DBT浓度一定，改变水相中的细胞量，考察初始休止细胞浓度对菌株ZD-M2脱硫活性的影响(油水相体积比为1:1)。水相细胞浓度分别为5.17、11.9、16.8、和20.9  $\text{gDCW}\cdot\text{L}^{-1}$ ，在30 °C水浴条件下，通气量200  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 进行反应。每隔一定时间取样，离心，气相分析。

结果如图5.4所示。从图中可以看出，随着休止细胞浓度的增大，产生的2-HBP量随之增加，菌体浓度20.9  $\text{gDCW}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DBT基本降解完全。

在油水两相体系中进行生物脱硫，无表面活性剂存在时，两相很难混合均匀，从而不利于底物 DBT 从有机相到生物催化剂的传递。但随着反应的进行，微生物本身会产生一些表面活性剂，这些表面活性剂的产生有利于形成微乳液（此现象可从反应过程中观察到）。在菌体浓度过低时，产生的表面活性剂量太少，有机相水相乳化不好，所以脱硫效果不好。水相中氧的饱和浓度一定，浓度过高的菌液抑制了水相中氧的传递，从而降低了菌体的脱硫能力。反应后将反应液离心，低浓度下，发现大部分的细胞悬浮在有机相—水相界面上。然而，在高浓度细胞时，

部份细胞在有机相-水相界面上,大部分在离心管的底部。可能底部的细胞没有和有机相良好接触,传质效果不好导致脱硫效果下降。从这一现象,我们得出脱硫过程可能受相界面的更新率限制,如新的生物催化剂与有机相-水界面接触以获得底物 DBT。

在气升式反应器中,菌液浓度影响固含率的变化,而固含率又跟气含率的大小密切相关。有研究认为反应器生物反应体系中,存在临界颗粒直径和临界固含率<sup>[77]</sup>,当超过临界值时,固含率的增加提高了气泡的聚并机会,气含率反而下降,进而导致脱硫效果下降。体系下 20.9g/L 的菌液还没有超过临界固含率,但是考虑到工程应用的经济合理性,菌液浓度不需过高,只要保证较高的脱硫速率即可。

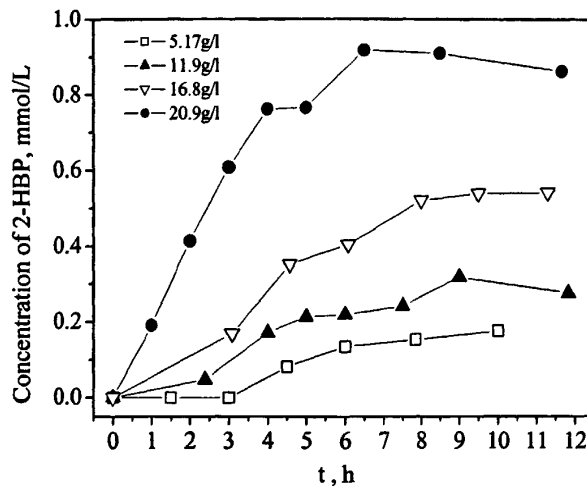


图 5.4 休止细胞浓度对 ZD-19 脱硫特性的影响

Fig.5.4 Effect of cell concentration on desulfurization of ZD-19

30°C, Q=200L/h, C<sub>0DBT</sub>=1mmol/L

#### 5.4 DBT 初始浓度的影响

统一菌液浓度和通气量,改变 DBT 浓度为 0.96、3.16、5.41 mmol·L<sup>-1</sup>,考察 DBT 初始浓度对脱硫效果的影响。结果如图 5.5 所示。

图为反应 10h 后不同 DBT 初始浓度下 DBT 的降解量。可以看出, DBT 浓度从 0.96 升高至 3.16 mmol·L<sup>-1</sup> 时, DBT 的总降解量从 0.94 升高至 1.48mmol·L<sup>-1</sup>,降解百分率却呈现下降趋势,从 98% 下降到 47%。此后继续增加 DBT 初始浓度至 5.41 mmol·L<sup>-1</sup>, DBT 的总降解量只有 1.04mmol/L,降解百分比不足 20%。这说明 DBT 对菌体的脱硫能力有抑制作用。当浓度较低时,随着 DBT 浓度的增加,

有机相与水相中的 DBT 浓度差增大,相同条件下的传质速率增大,故促进了 DBT 从有机相到水相的传递,而抑制作用是次要的,从而提高了降解速率。当 DBT 的浓度较高时,对于微生物的脱硫能力来说,传质已经不是控制因素,而抑制作用逐渐变成主要的影响,反而使降解速率降低。

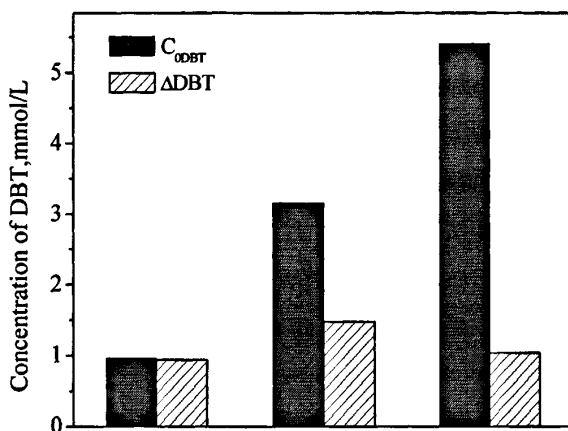


图 5.5 不同 DBT 初始浓度下反应 10h 降解量的变化

Fig.5.5 Effect of concentration of DBT on desulfurization of ZD-19  
30°C, Q=300L/h,  $C_{cell}$ =12g/L

总体上来看,实验条件下 DBT 初始浓度的增加并未高效地提高 DBT 的降解效率。分析认为,最适通气量 300L/h 下,12g/L 的菌液的脱硫活性达到 0.162mmol/(kg·min),是摇床最佳脱硫活性的 1.5 倍,此时单个细胞的脱硫能力由于传质速率的提高得到了充分的发挥,达到最高值。因此,增加细胞数量才能提高脱硫效率,而单纯的增加 DBT 浓度非但无法提高脱硫量,反而使得 DBT 对细胞的毒性作用更加明显,脱硫效率降低。

## 5.5 本章小结

1) 在自行设计的气升式反应器中生物降解正十六烷中的 DBT,发现气升式反应器促进两相混合和传质,比脱硫速率相比摇床明显增大。在实验所选的条件下,最佳表观速率为 11.8cm/s。表观速率达到 13.0cm/s 时,出现轻微柱塞流现象,液滴直径增大,传质效果开始降低。

2) ZD-19 休止细胞在生长介质(培养基)和非生长介质(磷酸缓冲溶液)中具有几乎相同的脱硫活性。

3) 过低的菌液浓度下不仅两相界面小,传质速率低,也使 DBT 对细胞的毒

性作用明显，脱硫效率很差，实验条件下 10-40g/L 的菌液浓度都具有较好的比脱硫速率。

4) 实验条件下，随着 DBT 初始浓度的增加，脱硫量略有增加，直至高 DBT 的致毒作用使菌液脱硫活性降低。此时传质速率较高，体系属于反应控制。



## 第6章 气升式反应器中模拟柴油的脱硫特性

柴油是应用最多的石油馏分之一，其硫含量可达5000 ppm。随着柴油在车用燃料中所占比例的不断增加，降低柴油中的硫含量已成为世界性的趋势，柴油馏分中硫组分主要是苯并噻吩(BT)和二苯并噻吩(DBT)及各种烷基取代物，其中BT较易脱除，DBT及其烷基取代物较难脱除，DBT的各种烷基取代物中又以4甲基二苯并噻吩(4MDBT)和4,6二甲基二苯并噻吩(4,6DMDBT)的脱除难度最大。

现有研究大都以DBT为模型底物分离在水溶液中具有较高脱硫活性的微生物，而实际燃料油生物脱硫是一个存在多种难降解含硫杂环化合物的油-水双液相体系。随着生物脱硫技术的不断发展成熟，有关油品生物脱硫的应用性研究也逐渐增多。其中主要涉及两个方面：第一，以含DBT的烷烃为模拟燃料油进行的研究；第二，直接用汽油或柴油为生物脱硫对象进行的研究。但是由于测试方法、菌种脱硫活性等限制因素，目前为止，较少的研究机构对于多种有机硫化合物在模拟油相中的脱硫特性进行研究，关于有机硫混合时的生物脱硫特性还不清晰。

本研究发现分枝杆菌ZD-19对DBT及其取代物具有很强的脱硫效率，它可以将DBT，4MDBT和4,6DMDBT按照4S途径专一性的去除，是一株具有较广应用前景的菌株。本章节以正十六烷为模拟油相，将DBT，4MDBT和4,6DMDBT以不同方式进行独立或混合实验，考察了DBT，4MDBT和4,6DMDBT在气升式反应器模拟燃料油系统中的脱硫特性。

### 6.1 DBT 及其衍生物的脱硫特性

ZD-19 对 DBT、4MDBT 以及 4,6DMDBT 都具有较高的脱硫活性。本实验在气升式反应器中分别对三种物质在油水两相中的脱硫特性进行了考察，得到如图 6.1 所示的降解曲线。

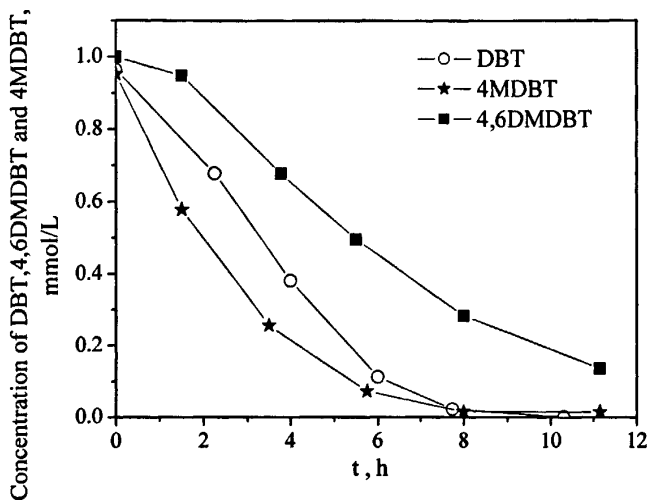


图 6.1 ZD-19 休止细胞对 DBT、4MDBT 和 4,6-DMDBT 单底物的脱硫曲线  
 Fig. 6.1 Courses of desulfurization of DBT、4MDBT and 4, 6-DMDBT by resting cells of ZD-19

30 °C, Q=300L/h,  $C_{\text{cell}}=12\text{g/L}$ ,  $C_{0\text{Cx-DBT}}\approx 1.0\text{ mmol/L}$

结果显示,在油水两相体系中,以 DBT、4MDBT 或 4,6DMDBT 为单一底物进行生物脱硫时,ZD-19 都具有较高的脱硫活性。DBT 在 10h 时已经完全脱除;4MDBT 也显示出很高的脱硫活性,反应至 12h 去除率也达到了 100%;4,6DMDBT 反应至 12h 时也已经脱除了 87.6%,脱硫活性高达  $0.103\text{mmol}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ ,是水相中的 3.5 倍。

分枝杆菌 ZD-19 具有广阔的应用前景,它对于柴油中最难降解的 DBT 烷基取代物都表现出较高的脱硫活性。实验中还发现,4MDBT 的降解效率与 DBT 相当,甚至在反应开始阶段表现出更高的降解速率。这可能与 4MDBT 独特的分子结构和其脱硫代谢途径有关。4MDBT 是三者中唯一具有不对称分子结构的化合物,它的降解产物有两种,这可能是加快其反应的重要原因,有研究也发现 4MDBT 具有较高的脱硫效率<sup>[78]</sup>。但是由于空间位阻的限制,它最终的脱硫效率还是要略低于 DBT。高烷基化的 4,6-DMDBT 具有更大的空间位阻,在水相中很难脱除<sup>[79]</sup>。而正十六烷的溶解作用和气升式反应器的混合作用,大大的提高了传质效率,使得 4,6DMDBT 也具有了较高的去除率。

## 6.2 模拟柴油的脱硫特性

在实际油品如柴油中,有机硫化物是以多种形式共同存在的,因此研究 ZD-19 在有机硫混合物体系中的脱硫特性具有重要的意义。

## 6.2.1 两种含硫化合物共存时的脱硫特性

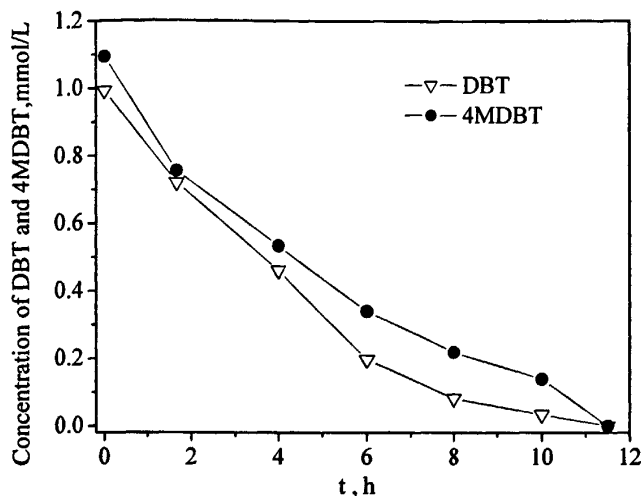


图 6.2 ZD-19 休止细胞对 DBT 和 4MDBT 混合物的脱硫曲线

Fig. 6.2 Courses of desulfurization of mixture of DBT and 4MDBT by resting cells  
 $30^{\circ}\text{C}$ ,  $Q=300\text{L/h}$ ,  $C_{\text{cell}}=12\text{g/L}$ ,  $C_{0\text{C}_x\text{-DBT}}\approx 1.0\text{ mmol/L}$

图 6.2 为 DBT 和 4MDBT 混合时的降解曲线，结果再次表明 ZD-19 在模拟柴油体系中具有较高的脱硫活性，反应 12h 时 DBT 和 4MDBT 的去除率都达到 100%，与两者作为单一底物反应时没有发生下降。同等反应条件下，加入 2mmol/LDBT 时，反应 12 小时后，硫元素去除百分率为 96.0%，比 1mmol/LDBT+1mmol/L4MDBT 体系下的硫元素去除率还要低 4 个百分点。

图 6.3 为 DBT 和 4,6DMDBT 混合时的降解曲线。结果显示，DBT 与 4,6DMDBT 混合反应时，反应 12hDBT 已经完全降解；而 4,6DMDBT 还剩余 0.26mmol/L，比其作为单一底物进行反应时的去除率降低了 18.7%。

从两种有机硫化合物共同存在的脱硫实验中得出，有机硫化合物在混合体系中的脱硫特性，与其在单底物体系中的脱硫特性有重要联系。如果物质单一存在时有良好的去除率（如 4MDBT），说明 ZD-19 对该底物有较强的选择性，则在双底物体系中也能达到与 DBT 相当的脱硫效果。4,6DMDBT 在单一存在时的脱硫速率低于 DBT 或 4MDBT，说明相对于后两者，ZD-19 对 4,6DMDBT 的选择性较差。因此双底物体系中，在脱硫酶的选择过程中，4MDBT 具有与 DBT 相当的竞争力，能够保持单底物时的高去除率；而 4,6DMDBT 在底物竞争中处于劣势，去除率明显下降。

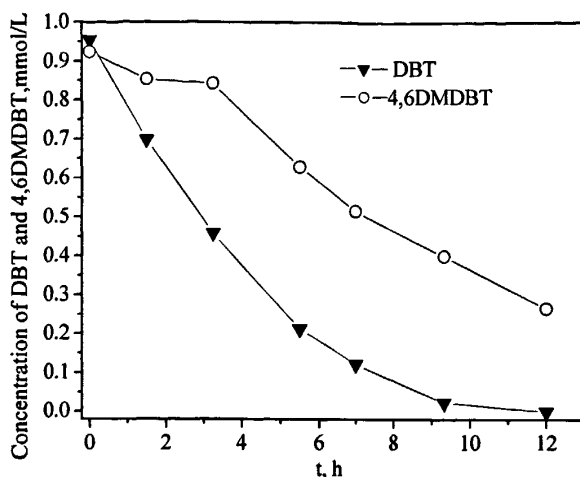


图 6.3 ZD-19 休止细胞对 DBT 和 4,6-DMDBT 混合物的脱硫曲线

Fig. 6.3 Courses of desulfurization of mixture of DBT and 4,6-DMDBT by resting cells  
 $30^{\circ}\text{C}$ ,  $Q=300\text{L/h}$ ,  $C_{\text{cell}}=12\text{g/L}$ ,  $C_{0\text{Cx-DBT}}\approx 1.0\text{ mmol/L}$

### 6.2.2 DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 共存时的脱硫特性

实验进一步对 DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 共同存在时的脱硫特性进行了考察。如图 6.4 所示, 当 DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 都加入  $1\text{mmol/L}$  时, 它们的去除效率比其单底物体系下明显下降, 其中 DBT 和 4MDBT 仍然具有相近的脱硫效率, 反应至  $12\text{h}$  细胞基本失去脱硫活性时, 去除率分别为  $74.0\%$  和  $69.5\%$ ; 4,6DMDBT 的去除率只有  $39.0\%$ , 不足单底物脱硫时的二分之一。此时, 硫元素的初始总量为  $3\text{mmol/L}$ , 反应  $12\text{h}$  硫元素的总去除率约为  $60.3\%$ 。同等反应条件下, 初始有机硫化物为  $3\text{mmol/L}$  的 DBT 时(如图 5.5 所示), 反应  $12\text{h}$  时 DBT 去除了  $47.6\%$ , 比等量初始硫元素总量的混合脱硫体系降低了  $21.1\%$ 。

在混合体系中, DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 的去除率分别为  $74.0\%$ 、 $69.5\%$  和  $39\%$ ; 与双底物体系的分析类似, 混合体系中各有机硫化物的脱硫效果也与其在单底物体系中的相对应。此时, DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 的脱硫能力, 也即三者底物竞争中与脱硫酶的结合能力, 依次为  $\text{DBT}>\text{4MDBT}>\text{4,6DMDBT}$ 。与双底物体系有所不同的是 4MDBT 的脱硫效率开始低于 DBT, 而在双底物体系中和单底物体系中, 4MDBT 都具有与 DBT 相当的脱硫速率, 甚至更高一些。分析认为, 一方面, 随着总硫的增加, 底物或代谢产物对细胞的毒性增加, 细胞活性下降; 第二, ZD-19 的驯化培养是以 DBT 为唯一硫源的, 因此细胞总量有限的情况下, 脱硫酶应该更易于与 DBT 结合<sup>[77]</sup>。

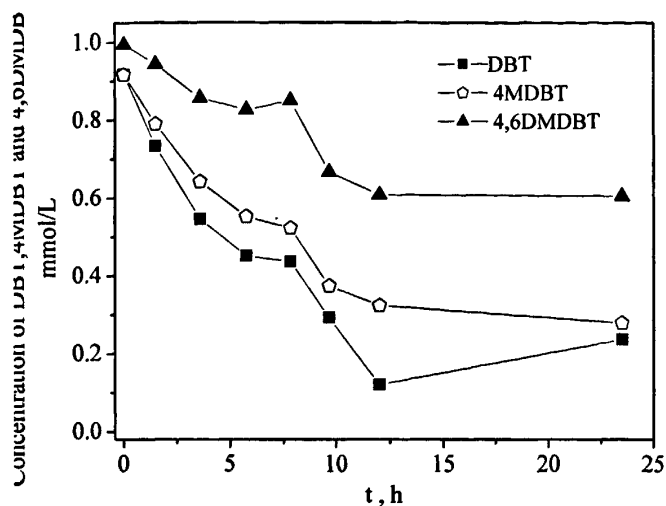


图 6.4 ZD-19 休止细胞对 DBT、4MDBT 和 4,6-DMDBT 混合物的脱硫曲线  
Fig. 6.4 Courses of desulfurization of mixture of DBT、4MDBT and 4,6-DMDBT by resting cells

30°C, Q=300L/h,  $C_{\text{cell}}=12\text{g/L}$ ,  $C_{0\text{C}_x\text{-DBT}}\approx 1.0\text{ mmol/L}$

对气升式反应器模拟燃料油体系中, DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 单一或混合存在的实验结果进行总结, 如下表所示:

表 6.1 ZD-19 休止细胞对不同有机硫化合物的脱硫活性

Table 6.1 Desulfurization activity of various organic sulfur compounds by resting cells

	有机硫组成	初始硫元素总量 (mmol/L)	硫元素去除率(%)
单底物体系比较	DBT	1	100
	4MDBT	1	100
	4,6DMDBT	1	87.6
双底物体系比较	DBT	2	98.0
	DBT+4MDBT(1:1)	2	100
	DBT+4,6DMDBT(1:1)	2	91.8
混合体系比较	DBT	3	47.6
	DBT+4MDBT+4,6DMDBT(1:1:1)	3	60.3

深入分析发现, 在硫元素总量相等的前提下, 单底物 DBT 的去除率要低于混合体系的硫元素去除率。如表 6.1, 3mmol/L 的 DBT 反应 12h 去除了 47.6%, 而混合体系的硫元素去除率达到 60.3%。这可能由两个方面的原因: 第一, 4MDBT

和 4,6DMDBT 对细胞的毒性作用低于 DBT。由图 5.5 也可看出, DBT 初始浓度达到 3mmol/L 时, 其对细胞的毒性作用较为明显, 脱硫效率开始下降。若 4MDBT 和 4,6DMDBT 对细胞的毒性作用低于 DBT, 则可以提高细胞活性, 增大总硫去除率。第二, 4MDBT 具有与 DBT 相当的脱硫效率。实验结果也显示, DBT 和 4,6DMDBT 的双底物体系的总硫去除率为 91.8%, 比同条件下的单底物 DBT 要低 (96.0%), 而 DBT 和 4MDBT 的双底物体系总硫去除率为 100%, 比同条件下的单底物 DBT 还要高出 2 个百分点。有类似研究也指出, 含有 4,6DMDBT 的混合体系的脱硫效果是最差的<sup>[80]</sup>, 而含 4MDBT 的体系才有比单一 DBT 更高的去除率, 这正是由于 ZD-19 对 4MDBT 具有较高的选择性, 在降低了 DBT 毒性作用的同时, 还保证了与脱硫酶的结合效率。

### 6.3 本章小结

本章节针对柴油中含量较高又较难脱除的几种含硫化合物, 在气升式反应器中, 进行了模拟燃料油的脱硫特性研究:

(1) 单底物脱硫实验表明, ZD-19 对 DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 的脱硫能力为  $DBT \approx 4MDBT > 4,6DMDBT$ 。

(2) 双底物脱硫实验和混合脱硫实验共同表明, ZD-19 对多种有机硫共存时的脱硫效果良好, 具有很广的应用前景;

(3) 4MDBT 的高脱硫效率和对细胞的低毒性, 使得混合体系下的总硫去除率更高。

## 第7章 结论与建议

本论文以燃料油中较难去除的几种含硫化合物为研究对象，在气升式反应器中开展了含硫有机模型化合物的生物脱硫机理和应用基础研究。利用已筛选的优势菌种，开展了旨在拓宽菌种脱硫范围和应用前景的研究；研究对有机硫化合物的代谢途径进行了分析，重点在模拟油相中考察了菌种的脱硫特性，并探讨了气升式反应器中微生物脱硫的可行性和模拟柴油的脱硫特性，为生物脱硫的工业化应用提供基础数据和研究思路。

### 7.1 结论

1. ZD-19 在油水两相体系中具有较高的脱硫活性，其最佳脱硫活性是水相中的 2 倍，且两相体系促进了传质，提高了细胞的利用效率，较高菌液浓度时还可保持较高的脱硫活性。气升式反应器在生长细胞脱硫和休止细胞脱硫实验中都表现出明显的优势。反应器中生长细胞的最大比生长速率和细胞浓度分别是摇床实验 1.4 倍和 2.3 倍；两相体系中，摇床实验也具有较高的脱硫活性，反应 10h，1mmol/LDBT 的降解效率达到 78.5%；气升式反应器具有更高的脱硫速率，反应 10h 时已经基本降解完全。

2. 在自行设计的气升式反应器中生物降解正十六烷中的 DBT，发现气升式反应器促进两相混合和传质，比脱硫速率相比摇床明显增大。在实验所选的条件下，最佳表观速率为 11.8cm/s。表观速率达到 13.0cm/s 时，出现轻微柱塞流现象，液滴直径增大，传质效果开始降低。反应器中 ZD-19 休止细胞在生长介质（培养基）和非生长介质（磷酸缓冲溶液）中具有几乎相同的脱硫活性。过低的菌液浓度下不仅两相界面小，传质速率低，也使 DBT 对细胞的毒性作用明显，脱硫效率很差，实验条件下 10-40g/L 的菌液浓度都具有较好的比脱硫速率。实验条件下，随着 DBT 初始浓度的增加，脱硫量略有增加，直至高 DBT 的致毒作用使菌液脱硫活性降低。此时传质速率较高，体系属于反应控制。

3. 考察了 ZD-19 对 4MDBT 的脱硫特性，结果表明 ZD-19 也能专一性的切断 4MDBT 的 C-S 键，且由于 4MDBT 独特的不对称结构，代谢过程中羟基取代位置发生变化，所得产物为两个同分异构体：4 甲基 2 苯基苯酚和邻甲基苯酚。

4. 单底物脱硫实验表明，ZD-19 对 DBT、4MDBT 和 4,6DMDBT 的脱硫能力为  $DBT \approx 4MDBT > 4,6DMDBT$ 。双底物脱硫实验和混合脱硫实验共同表明，ZD-19

对多种有机硫共存时的脱硫效果良好，具有很广的应用前景；4MDBT 的高脱硫效率和对细胞的低毒性，使得混合体系下的总硫去除率更高。

## 7.2 建议

本文的工作主要是将菌株ZD-19的研究由摇瓶水平上升至反应器水平，由水相研究上升至模拟油相研究，由单一底物研究上升至混合底物研究，为脱硫工艺的进一步开发奠定实验基础。针对实验中出现的问题和本文的研究思路，后续的研究可以围绕以下几方面展开工作：

1. 本菌株的脱硫活性与实际油品所需要的脱硫效率还有很大差距，为进一步提高菌种的脱硫能力，可通过固定化等技术提高菌株对底物的耐受性和持续降解能力，增加其实际应用价值。
2. 本菌种在模拟油品中表现出较高的脱硫活性，可对应用到真实柴油的降解过程，进行深入的研究。
3. 对气升式反应器进行优化。系统研究反应器中脱硫反应动力学和传质特性，以便进一步扩大、优化反应器设计，为反应器的工业化应用奠定基础。



## 参考文献

- [1] Monticello D J. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Current Opinion in Biotechnology*. 2000, 11:540-546
- [2] Kilbane J J. Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. *Current Opinion in Biotechnology*. 2006, 17:305-314
- [3] Parekh B K. Coal desulfurization, high-efficiency preparation methods: by S. Komar Kawatara and Timothy C. Eisele. Taylor and Francis Inc., New York, NY, 360 pp. *International Journal of Coal Geology*, 2003, 55: 71
- [4] Pacheco M A, Lange E A, Pienkos P T, *et al.* Recent advances in biodesulfurization of diesel oil. National Petrochemical & Refiners Association. 1999
- [5] Lee M K, Senius J D, Grossman M J. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered of dibenzothiophene. *Applied Environmental Microbiology*. 1995, 61: 4362-4366
- [6] Soleimani M, Bassi A, Margaritis A. Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels, *Biotechnology Advances* . 2007, 25:570-596
- [7] Atlas R M, Boron D J, Deever W R, *et al.* Method for removing organic sulfur from heterocyclic sulfur containing organic compounds. 2001, 1:986
- [8] Shafi R, Hutchings G. Hydrodesulfurization of hindered dibenzothiophene : an overview. *Catalyst Today*. 2000, 59: 423
- [9] König A, Herding G, Hupfeld B, *et al.* Current tasks and challenges for exhaust after treatment research, a viewpoint from the automotive industry. *Top Catalystr*. 2001, 16/17:23-31
- [10] Reichmuth D S. Metabolic engineering of a dibenzothiophene biodesulfurization operon (PhD thesis). University of California, Berkeley, 2002; 81 pages
- [11] 韩金玉, 吴懿琳, 李毅. 生物脱硫技术的应用研究进展. *化工进展*, 2003, 22 (10): 1072~1075
- [12] 孔 瑛, 赵金生, 侯影飞等. 石油生物催化脱硫的研究进展, *工业微生物*, 2004, 34 (2): 35-40
- [13] Atlas R M, Boron D J, Deever W R, *et al.* Method for removing organic sulfur from heterocyclic sulfur containing organic compounds. 2001, US patent number H1, 986
- [14] Jia X Q, Wen J P, Sun Z P, *et al.* Modeling of DBT biodegradation behaviors by resting cells of *Gordonia* sp. WQ-01 and its mutant in oil-water dispersions. *Chemical Engineering Science*, 2006, 61:1987-2000
- [15] Kilbane J J, John J. Sulfur-specific microbial metabolism of organic compounds. *Resources Conservation and Recycling*. 1990, 3: 69-79
- [16] Ohshiro T, Hirat T, Hashimoto I, *et al.* Characterization of dibenzothiophene desulfurization reaction by whole cells of *Rhodococcus* H-2 in the presence of

- hydrocarbon, *Journal of Fermentation and Bioengineering*.1996, 82: 610–612
- [17] Denis-larose C, Labbe D, Bergeron H, *et al.* Conservation of plasmid-encoded dibenzothiophene desulfurization genes in several *Rhodococcus*, *Applied. Environmental. Microbiology*. 1997,63:2915–2919
- [18] Maghsoudi S, Vossoughi M, Kheirloomoom A, *et al.* Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp strain P32C1. *Biochemical. Engineering Journal*. 2001,8: 151-156
- [19] Sung R, Yong K C. Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated Gordona Strain, CYKS1, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (6) :2327–2331
- [20] Gilbert S C, Morton J, Buchanan S C. Isolation of a unique benzothiophene desulfurizing bacterium, *Gordona* sp. strain 213E(NCIMB40816) and characterization of the desulfurization pathway, *Microbiology*,1998,144:2545–2553
- [21] Maghsoudia S, Kheirloomooma A, Vossoughib M. Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Corynebacterium* sp.strain P32C1, *Biochemical Engineering Journal*,2000,5:11-16
- [22] Wang M D, Li W, Wang D H. The behavior of desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp ZD-1 in aqueous phase, *Energy and environmental-A world of challenges and opportunities*,2003,513-519
- [23] Darzins A, Mrachko G T. *Sphingomonas* biodesulfurization catalyst, US patent No. 6,133,016 (2000)
- [24] Shan G, Xing J, Luo M. Immobilization of *Pseudomonas delafieldii* with magnetic polyvinyl alcohol beads and its application in biodesulfurization, *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 1977–1981
- [25] Li F L, Xu P. Deep desulfurization of hydrodesulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp.X7B, *FEMS Microbiology Letters* , 2003,223:301-307
- [26] Chen H, Zhang W J, Chen J M, Cai Y B, Li W. Desulfurization of various organic sulfur compounds and the mixture of DBT + 4,6-DMDBT by *Mycobacterium* sp. ZD-19. *Bioresource Technology*, 2008, 99( 9):3630-3634
- [27] 张英.微杆菌ZD-M2的分离及其脱硫特性研究.硕士学位论文.2005
- [28] Omori T, Saiki Y, Kasuga K, *et al.* Desulfurization of alkyl and aromatic sulfides and sulfonates by dibenthiothiophene - desulfurizing *Rhodococcus* sp. strain SY1. *Bioscience. Biotech. Biochem.* 1995,59, 1195-1198
- [29] Folsom B R, Schieche D R, Digrazia P M,*et al.* Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophenes from a hydrodesulfurized middle distillate by *Rhodococcus erythropolis* I-19. *Applied. Environmental. Microbiology*.1999, 65:4967-4972
- [30] Kilbane J J. Biodesulfurization:future prospects in coal cleaning, *Proceedings 7th Annual International Pittsburgh Coal Conference*,1990,373-381
- [31] Gray K A, Pogrebinsky O S, Mrachko G T *et al.* Molecular mechanisms of

- biocatalytic desulfurization of fossil fuel. *Biotechnology*.1996, 14(13): 1705-1709
- [32] Gray K A, Squires C H, Monticello D J. US Pat. 5,846,813, 1996
- [33] McFarland B L. Biocatalytic sulfur removal from fuel: applicability for producing low sulfur gasoline. *Critical Reviews in Microbiology*. 1998, 24(2): 99-147
- [34] Ohishiro T, Suzuki K, Izumi Y. Regulation of dibenzothiophene degrading enzyme activity of *Rhodococcus erythropolis* D-1, *Journal of fermentation and bioengineering*, 1996, 81(2): 121-124
- [35] Li W, Zhang Y, Wang M D, *et al.* Bodesulfurization of dibenzothiophene and other organic sulfur compounds by a newly isolated *Microbacterium* strain ZD-M2. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 247(1): 45-50
- [36] Berdugo C. Aqueous-organic phases separation by membrane reactors in biodesulfurization reactions. *Fuel and Energy Abstracts*, 2006, 47 (5): 367
- [37] Kaufman E N, Harkins J B, Rodriguez M, *et al.* Development of an electro-spray bioreactor for crude oil processing. *Fuel Processing Technology*, 1997, 53(1-3): 127-144
- [38] Dounias G A. Economic feasibility of biochemically upgrading heavy crudes, Brookhaven National Laboratory Report, 1995
- [39] Tsouris C, Abhijeet P, Eric B. An electrically driven gas-liquid-liquid contactor for bioreactor and other applications, *Chemical Reserch*, 1999, (38): 1877-1883
- [40] Yang J Z, Hu Y Qi, Zhao D S, *et al.* Marison aTwo-layer continuous-process design for the biodesulfurization of diesel oils under bacterial growth conditions, *Biochemical Engineering*. 2007, 37 : 212-218
- [41] Boltes K, Caro A, Leton P, *et al.* Gas-liquid mass transfer in oil-water emulsions with an airlift bio-reactor, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2008
- [42] Mehrnia M R, Towfighi J, Bonakdarpour B. Influence of top-section design and draft-tube height on the performance of airlift bioreactors containing water-in-oil microemulsion, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004, 79(3): 260-267
- [43] Mehrnia M R, Bonakdarpour B, Towfighi J. Design and operational aspects of airlift bioreactors for petroleum biodesulfurization. *Environmental Progress*, 2004, 23(3): 206-214
- [44] Mehrnia M R, Towfighi J, Bonakdarpour B. Gas hold-up and oxygen transfer in a draft-tube airlift bioreactor with petroleum-based liquids, *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 22(2): 105-110
- [45] Lee I S, Bae H S, Ryu H W, *et al.* Biocatalytic desulfurization of diesel oil in an air-lift reactor with immobilized *Gordonia nitida* CYKS1 Cells. *Biotechnology progress*, 2005, 21: 781-785
- [46] Juras cik M, Blazej M, Annus J, *et al.* Experimental measurements of volumetric mass transfer coefficient by the dynamic pressure-step method in internal loop airlift reactors of different scale. *Chemical Engineering Journal*. 2006, 125: 81-87

- [47] Blazej M, Annus J, Markos J. Using of the dynamic pressure-step method for mass transfer coefficient measurement in the internal loop airlift reactor. *Chemical Papers*. 2003,57:445–450
- [48] Blazej M, Annus J, Markos J. Comparison of gassing-out and pressure-step dynamics methods for  $k_La$  measurement in an airlift reactor with internal loop. *Transactions of I Chem E, Part A: Chemical Engineering Research and Design*. 2004,1375–1382
- [49] Jurascik M, Sikula I, Annus J, *et al.* Modeling of fermentation in an airlift bioreactor, In: *Proceedings of the 32nd Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*. 2005, 224-227
- [50] Fedorak P M, Westlake D W S. Microbial degradation of organic sulfur compounds in Prudhoe Bay crude oil. *Microbiology*. 29: 291–296
- [51] Fedorak P M, Westlake D W S. Degradation of sulfur heterocycles in Prudhoe Bay crude oil by soil enrichments. *Water. Air. Soil Pollution*. 21:225–230
- [52] Setti L, Rossi M, Lanzarini G, *et al.* The effect of *n*-alkanes in the degradation of dibenzothiophene and of organic sulfur compounds in heavy oil by a *Pseudomonas* sp. *Biotechnology. Letters*. 1992,14:515–520
- [53] Setti L, Lanzarini G, Pifferi P G. Dibenzothiophene biodegradation by a *Pseudomonas* sp. in model solutions. *Process. Biochemical*. 1995,30: 721–728
- [54] Kaufman E N, Borole A P, Shong R., *et al.* Sulfur specificity in the bench-scale biological desulfurization of crude oil by *Rhodococcus* IGTS8. *J. Chemical Technology Biotechnology*. 1999, 74:1000–1004
- [55] Li F L, Xu P, Feng J H, *et al.* Microbial desulfurization of gasoline in a *Mycobacterium goodii* X7B immobilized-cell system. *Applied Environmental Microbiology*. 2005,71:276–281
- [56] Li F L, Zhang Z Z, Feng J H, *et al.* Biodesulfurization of DBT in tetradecane and crude oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium goodii* X7B, *Journal of Biotechnology*. 2007,127:222–228
- [57] Maghsoudi S, Vossoughi M, Kheirloomoom A. Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1, *Biochemical Engineering Journal*. 2001, 8 :151–156
- [58] Shan G B, Zhang H Y, Xing J M, *et al.* Biodesulfurization of hydrodesulfurized diesel oil with *Pseudomonas delafieldii* R-8 from high density culture, *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 27:305–309
- [59] Luo M F, Xing J M, Gou Z X, *et al.* Desulfurization of dibenzothiophene by lyophilized cells of *Pseudomonas delafieldii* R-8 in the presence of dodecane, *Biochemical Engineering Journal*, 2003,13:1–6
- [60] Caro A, Boltes K, Leton P, *et al.* Dibenzothiophene biodesulfurization in resting cell conditions by aerobic bacteria, *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 35 :191–197
- [61] Mohebbali G, Ball A S, Rasekh B. *et al.* Biodesulfurization potential of a newly

- isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* RIPI90A, *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40 :578–584
- [62] Del Olmo C H, Alcon A, Santos V, *et al.* Modeling the production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: Influence of media composition, *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37 :157–166
- [63] Del Olmo C H, Santos V E, Alcon A, *et al.* Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: influence of operational conditions, *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 22 :229–237
- [64] Marcelis C L M, Leeuwen M V, Polderman H G, *et al.* Model description of dibenzothiophene mass transfer in oil-water dispersions with respect to biodesulfurization. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 16: 253–264
- [65] Rashtchi M, Mohebbali G H, Akbarnejad M M, *et al.* Analysis of biodesulfurization of model oil system by the bacterium, strain RIPI-22, *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 29: 169–173
- [66] Boltes K, Caro A, Leton, P, *et al.* Gas–liquid mass transfer in oil–water emulsions with an airlift bio-reactor, *Chemical Engineering and Processing*, 2008
- [67] Caro A, Leton P, Garcia-Calvo E, *et al.* Enhancement of dibenzothiophene biodesulfurization using  $\beta$ -cyclodextrins in oil-to-water media, *Fuel*, 2007, 86 :2632–2636
- [68] Rashidi L, Mohebbali G, Towfighi D J, *et al.* Biodesulfurization of dibenzothiophene and its alkylated derivatives through the sulfur-specific pathway by the bacterium RIPI-S81, *African Journal of Biotechnology*, 2006,5 (4): 351-356
- [69] 李建源 周新锐 赵德丰. 苯并噻吩及其衍生物. *化学通报*.2005, 68:1-7
- [70] Chao Y P, Makoto M, Yasusba S, *et al.* *Biotechnology Progress*, 2001, 17:781-785
- [71] Aleksieva P, Peeva L. Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000,26(5): 402-405
- [72] 孙志鹏. 搅拌式反应器中脱硫菌株培养及反应特性研究. 硕士学位论文.2006
- [73] Nikolova P, Ward O P. Whole cell biocatalysis in nonconventional media. *Ind. Microbiol.*1993, 12:76–86
- [74] 王燕, 尹侠, 薛胜伟. 表观气速对气升式环流反应器性能的影响. *化学反应工程与工艺*. 23 (2) :104-108
- [75] 卢刚, 郑平. 气升式内环流反应器流体力学特征探讨. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*.2003,29(2): 188~194
- [76] Zhang T W, Wang J F, Luo Z, *et al.* Multiphase flow characteristics of a novel internal-loop airlift reactor. *Chemical Engineering Journal*.2005,109 (1–3): 115–122
- [77] 吕效平, 王延儒, 时钧. 固体颗粒对强化传递性质的多相气升式反应器流体力学影响. *南京化工大学学报*, 1999, 21,(6): 14~19

- 
- [78] Prince R C, Grossman M J. Substrate Preferences in Biodesulfurization of Diesel Range Fuels by *Rhodococcus* sp. Strain ECRD-1, *Applied and Environmental Microbiology*. 2003,69:5833–5838
- [79] Gunam I B W, Yaku Y, Hirano M, *et al.* Biodesulfurization of Alkylated Forms of Dibenzothiophene and Benzothiophene by *Sphingomonas subarctica*T7b, *Journal of Bioscience and Bioengineering*,2006,101(4):322–327
- [80] Boltes K, Del Aguila R A, Garcia-Calvo E. Biodesulfurization of alkylated forms of dibenzothiophene by *Pseudomonas putida* CECT5279, *Journal of Biotechnology*, 2007, 131(2): 143-144

---

## 作者简介

张文娟，2006年毕业于浙江大学环资学院环境工程系，获学士学位；同年攻读浙江大学环境资源学院环境工程专业硕士研究生学位。攻读硕士研究生期间发表论文如下：

- [1] Chen H, **Zhang W J**, Chen J M, Cai Y B, Li W. Desulfurization of various organic sulfur compounds and the mixture of DBT + 4,6-DMDBT by *Mycobacterium* sp. ZD-19. *Bioresource Technology*, 2008, 99( 9):3630-3634
- [2] Chen H, **Zhang W J**, Cai Y B, Zhang Y, Li W. Elucidation of 2-hydroxybiphenyl effect on dibenzothiophene desulfurization by *Microbacterium* sp. strain ZD-M2 *Bioresource Technology*, 2008
- [3] 张文娟, 陈晗, 陈建孟, 李伟。气升式反应器生物脱硫过程中工艺参数的研究, 高校化学工程学报, 录用 (EI)
- [4] 张文娟, 王妙冬, 陈晗, 李伟。搅拌式反应器生物脱硫过程中 DBT 的传质分析, 第五届环境模拟与污染控制学术研讨会论文集
- [5] 李伟, 陈晗, 张文娟, 蔡郁蓓。一种应用于燃料油中含硫杂环化合物脱硫的分支杆菌及其用途, 发明专利