

基因工程技术在石油生物脱硫中的应用

佟明友^{1*} 方向晨¹ 马 挺² 张 全¹

¹(中国石油化工股份有限公司抚顺石油化工研究院,抚顺 113001)

²(南开大学生命科学学院,天津 300071)

摘 要 介绍了石油生物脱硫技术的发展历程和反应机理。重点对国外基因工程技术在脱硫菌种的改造和构建等方面应用的最新进展进行了综述,并对其发展前景进行了简要分析。

关键词 基因工程,石油,生物脱硫

中图分类号 Q789 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2001)06-0617-04

含硫燃料的燃烧是造成环境污染的原因之一。二氧化硫形成大气中的酸雨,破坏生态平衡;一氧化硫刺激人体呼吸系统,直接危害人体健康。因此,各国对含硫燃料的生产管理要求日趋严格。随着环保意识的增强和高含硫原油的进口,我国对油品质量要求也在不断提高。用传统的加氢脱硫技术(HDS)脱除杂环类分子中的有机硫,例如二苯并噻吩(DBT),会增加燃料的成本,降低其辛烷值;而生物催化脱硫(BDS)却为油品的深度脱硫提供了可能。BDS的优点在于生产过程条件温和,不需要氢气。在美国、日本和欧洲,BDS是人们非常感兴趣的领域^[1]。本文主要介绍基因工程应用于BDS的最新进展。

1 石油 BDS 技术的发展

BDS 的研究可以追溯到半个世纪以前。1950 年第一件石油生物脱硫专利^[2]在美国公布。以后 20 多年的研究主要集中在筛选专一性脱硫微生物^[3,4],这期间形成的专利也不少^[5-10],但都没有工业应用。其主要原因是细菌反应难以控制、脱硫过程需消耗大量的石油、反应效率低以及由于 C-C 键的断裂氧化降低了有价值烃的燃烧值。

80 年代,生物技术的飞跃发展,特别是分子生物学的广泛应用,给 BDS 研究带来了新的生机。人们把生物脱硫的研究重点放在二苯并噻吩(DBT)的微生物降解,对 BDS 的代谢机理也有了进一步的认识。1988 年美国国家气体研究院(IGT)分离出可以选择性脱除 DBT 中硫的玫瑰色红球菌 *Rhodococcus rhodochrous* ATCC53968^[11],并申请了专利^[12-14]。1990 年,美国对 BDS 感兴趣的几个公司联合成立了能源生物系统公司(ENBC),从 IGT 购买生物脱硫的专利技术,并与其它炼油公司合作,专门从事 BDS 技术开发。ENBC 于 1992

年开发的菌株可以直接作用于 C-S 键,既达到脱硫的目的又不损失燃烧值^[15]。该公司 90 年代中期已开始柴油酶法脱硫中试研究。他们预计工业 BDS 装置的投资约为加氢脱硫装置(HDS)的 50%,操作费用会比 HDS 低 10%^[16]。

2 BDS 作用机理

DBT 一直做为 BDS 研究的模型化合物^[17]。70 年代,对 DBT 降解途径提出各种假说,可以概括为两种路线^[18]:一种是 Kodama 等提出的 C-C 键断裂氧化途径^[19],也称破坏性路线,即 DBT 的 C-C 键断裂后形成水溶性含硫化合物从油中脱出。这样脱去的不仅是硫本身,而是整个含硫杂环,降低燃料收率。另一种是 C-S 键断裂氧化的非破坏性路线,称为“4S”代谢途径^[20],或 IGTS8 途径^[21]。其特点是 DBT 中的硫原子被氧化为硫酸盐转入到水相,而其骨架结构则氧化成 2-羟基联苯(2-HBP)留在油相,没有碳的损失,更具有应用价值。

3 C-S 键断裂氧化关键酶系的研究

美国能源生物系统公司(ENBC)对脱硫过程的 C-S 键断裂机理进行了深入研究^[22]。他们用 IGTS8 证明了 C-S 键断裂氧化是由多种酶顺序催化完成的^[23,24],代谢途径见图 1^[25]。C-S 键断裂氧化涉及到四个关键酶,分别标记为 DszA、B、C、D。第一个作用的 DszC 是单氧化酶,它催化 DBT 氧化为二苯并噻吩亚砷,再进一步氧化为砷。后者在砷单氧化酶(DszA)催化下,使砷的第一个 C-S 键断裂,形成中间体;再经脱硫酶(DszB)催化,使第二个 C-S 键断裂,硫被释放出来。DBT 脱硫后形成 2-HBP,仍然留在油相。DszD 是氧化还原酶,它分别为 DszC 和 DszA 提供必须的还原态黄素(FMNH₂)。

收稿日期:2001-04-11,修回日期:2001-08-30。

基金项目:中国石油化工股份有限公司资助课题。

* 通讯作者。 Tel:86-413-6427881 ~ 412; Fax:86-413-6429551; E-mail:TONGMY@frpp.com.cn

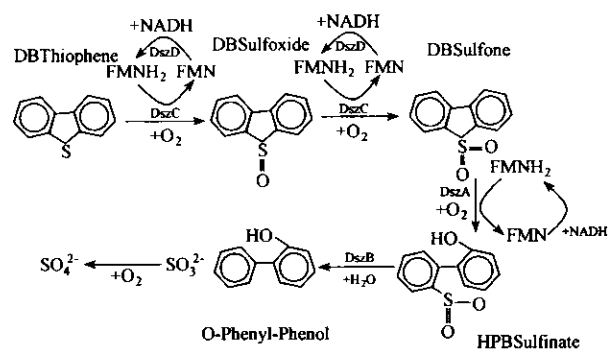


图 1 催化 C-S 键断裂的关键酶系

Fig.1 The key enzymes used to catalyze break C-S bonds

近年来,C-S 键断裂氧化过程已经在其它脱硫微生物中得到证实^[26,27]。日本石油产业活性化中心介绍了近年来生物脱硫技术在分子生物水平方面的进展^[28]。目前已知对应基因的脱硫酶有 2 类、8 种,其性质和编码基因见表 1。

表 1 与脱硫有关的酶性质

Table 1 The character of the enzymes related to BDS

Enzyme	MW	Structure	Kcat (L/min)	Gene/bp
DszA	51.00	2 polymer	60	1,359
DszB	39.00	Monomer	2	1,059
DszC	45.00	6 polymer	10 ~ 12	1,251
DszD	25.00	1 ~ 2 polymer	ND	577
TdsA	48.00	2 polymer	ND	1,362
TdsB	39.00	Monomer	ND	1,059
TdsC	45.00	4 polymer	ND	1,242
TdsD	25.00	2 polymer	ND	600

4 基因工程在 BDS 技术中的应用

虽已筛选出许多能使 C-S 键断裂的专一性菌株^[29-33],但它们的脱硫能力有限。利用基因操作对目的菌株进行代谢调控或构建工程菌可以满足脱硫工艺的要求。

4.1 建立脱硫菌株 DNA 文库及其有效载体的构建

美国 ENBC 的专利描述了分离脱硫基因的方法,过程如图 2^[34]所示。第一步,使具有脱硫酶活性(Dsz+ 或 CS+)的 *R. rhodochrous* 菌株 IGTS8 发生突变,成为没有脱硫活性(Dsz- 或 CS-)的突变株。而另一没突变的 IGTS8 菌株则正常培养;第二步,从正常培养的培养物中提取 DNA,用酶切或机械剪切的方法使这些提取出的 DNA 成为一定大小的片段,构建成为含有 IGTS8 全部基因的 DNA 文库;第三步,以没有脱硫活性(Dsz- 或 CS-)的突变株为寄主,pRR-6 质粒为载体分别转化 DNA 文库中不同大小的 DNA 片段,得到不同的转化子,含有脱硫活性(Dsz+ 或 CS+)的转化子相应的 DNA 片段就是与脱硫有关的基因。然后把得到的这些有关基因进行克隆与纯化,即可用于其它研究。

转化所用的载体通常来源于 IGTS8 菌株的质粒。这种

质粒都具有红球菌 DNA 复制起始位点(ori)和氯霉素抗性标记(Cm^R),如上文所说的 pRR-6 质粒的结构如图 3 所示。

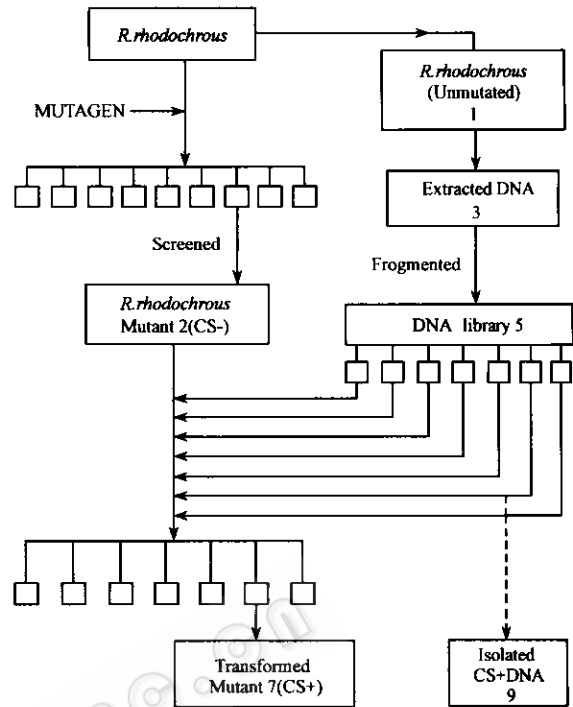


图 2 从 *R. rhodochrous* IGTS8 中分离编码脱硫基因的流程

Fig.2 A stepwise procedure for the isolation of the recombinant DNA from *R. rhodochrous* IGTS8

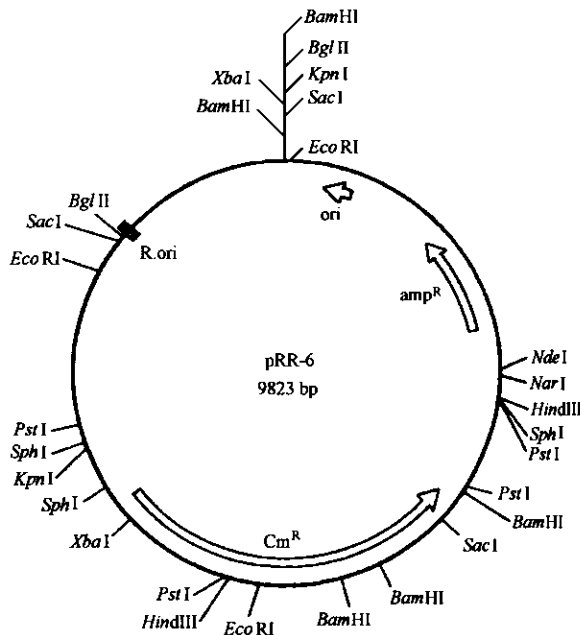


图 3 pRR-6 质粒的结构图谱

Fig.3 A schematic illustration of the *R. rhodochrous* replication competent and chloramphenicol resistant vector pRR-6

4.2 对 BDS 有关基因的认识

部分脱硫基因已被分离和扩增并在新的宿主中表达^[35,36]。Denome 等人对 IGTS8 的研究表明,与 C-S 键断裂有关的 Dsz 系列基因位于一个 100 多 kb 的质粒上。其中,DszA

基因含有 453 个密码子,它编码的磺单氧化酶,分子量为 50kD;DszB 基因含有 365 个密码子,编码的脱硫酶分子量为 40kD;DszC 基因含有 417 个密码子,分子量为 45kD,二苯并噻吩单氧化酶由该基因编码。这些基因的表达受硫酸盐的反馈抑制^[24],后者是脱硫形成的副产物。研究了许多解除这种抑制的方法^[37],包括更换这些基因的启动子^[38]。

最近,美国 ENBC 的专利^[39]描述了鞘单孢菌(*Sphingomonas* sp. AD109)脱硫酶系的核酸序列。这个“鞘单孢菌 Dsz 序列”包括 3 个开放阅读框,分别记作 ORF-1(442 ~ 1800 bp)、ORF-2(1800 ~ 2096 bp)和 ORF-3(2096 ~ 4141 bp)。这些序列与美国专利 535681 公开的 IGTS8 中相应的编码序列是同源的。

4.3 Dsz 表达载体的构建

近年来,分子生物学新技术用于生物脱硫基因的重组,构建出许多能在特定寄主中高效表达脱硫酶的质粒表达载体。

Piddington 等^[37]以 pRR-6 为质粒载体,用 IGTS8 DNA 文库转化 CS-(或 Dsz)-突变株,对转化子进行抗性筛选后,得到一个 pTOX11 质粒。它是由一个含有 DszA、DszB 和 DszC 脱硫基因的 6.7 kb 插入序列插入到 pRR-6 质粒中形成的。

美国专利^[40]描述了另一个脱硫载体 pEX16 的构建。这个表达载体中 DszABC 基因的转录被一个杂合启动子 P_{tac} 所控制。它能够转化到大肠杆菌寄主中,使脱硫酶在大肠杆菌中表达。另一篇专利^[41]描述了几个可以在假单胞菌寄主中实现 dsz 基因超量表达的重组质粒载体的构建。这些质粒载体都含有 P_c 启动子。例如 pEX1087,在它的序列中 Dsz 基因排列的顺序为 DszCAB,是一个广泛寄主范围的质粒。

4.4 DszD 基因与 DszABC 基因的协同表达

研究表明,增强 DszD 基因的表达可以增加脱硫酶的活动性。David S. Reichmuth 等^[42]构建了两个相容性质粒 pDSR2 和 pDSR3。pDSR3 能使大肠杆菌把 DBT 转化为 2-HBP,而 pDSR2 则产生哈氏弧菌黄素氧化还原酶。当 pDSR2 和 pDSR3 被转化到同一个寄主中协同表达时,DBT 转化率明显增加。

美国专利^[40,41]描述了几种能够同时编码 DszABC 和黄素还原酶(frp)的质粒载体的构建,如 pEX44。这个质粒中除了含有 Tet^r 和 Amp^r 基因以及 Dsz 基因簇之外,还含有一个 frp 基因。它是通过对 pEX16 进行酶切再连接形成的。

4.5 外源 Dsz 基因在特定寄主中的表达

研究发现,Dsz 基因的表达产物在大肠杆菌和假单胞菌等寄主中活性稳定,因此可以把质粒表达载体转化到具有相应启动子的寄主细胞中,以达到减缓硫代谢过程中硫酸盐的反馈抑制作用。如上文提到的具有 tac 启动子的 pTOX1 和 pEX16 质粒表达载体被转化到大肠杆菌细胞之后,被 IPTG 诱导表达脱硫酶。经证实,转化子脱硫活性较天然 IGTS8 菌株有明显提高^[37,40]。

西班牙 M.E. Gallardo^[36]等对重组假单胞菌的生物脱硫做了详尽的研究。他们首先以 pSAD255-32 质粒为基础,构建了 pEOX 系列质粒表达载体 pEOX1、pEOX2、pEOX4。然后

把这些质粒载体引入到没有脱硫活性的恶臭假单胞菌(*P. putida*)和铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)寄主中,得到两个含有异源脱硫基因的工程菌 *P. putida*EGSOX 和 *P. aeruginosa*EGSOX。它们比 IGTS8 菌株在脱硫活性方面具有明显优势,这是 pEOX 系列载体在寄主中超表达的结果。

5 脱硫基因工程展望

尽管已经构建出许多高效表达脱硫酶的质粒表达载体,并在适当寄主中表达,但由于外源基因在寄主中的稳定性和质粒表达载体超表达时细胞的代谢负荷等一系列困难还有待解决,所以,用于工业生产还有一定困难。但目前的研究结果已展示了 BDS 的应用前景。例如可以通过诱导表达,使细胞生长与质粒表达载体的表达分步实现,减轻寄主细胞的代谢负荷等。随着基因工程的应用,将会有更多更先进的手段用于脱硫基因的研究,脱硫工程菌终将走进市场,使 BDS 技术成为本世纪油品精制的有效途径之一。

美国 ENBC 从 1992 年开始微生物脱硫研究,到 1998 年已花费约 5 000 万美元用于脱硫基因分离、识别、改造和其它工程方面的研究;日本石油能源中心(PCE)1994 年起进行 BDS 研究,他们计划投资 5 000 万美元开发此项技术;欧洲一些国家对 BDS 也持积极态度。

我国石油炼制行业普遍面临深度脱硫问题,加氢脱硫(HDS)技术已经有几十年历史,生物脱硫虽然刚刚起步,但在菌种筛选和基因改良方面已有良好的进展。国内生物技术在石油化工领域的应用有一定的基础,应该通过联合攻关,有计划、有步骤地实现产业化。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Monticello D J. Biocatalytic desulfurization. *Hydrocarbon Processing*, 1994, 73(2): 39 ~ 45
- [2] John Paul Barti *et al.* Sugar and edible siup and process for preparing same from sugar bearing fluids. US 2525761, 1950
- [3] Malik K A. Metabolism of dibenzothiophene by a *Beijerinckia* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 1977, 34(6): 783 ~ 790
- [4] Malik K A. Microbial removal of organic sulphur from crude oil and environment: some new perspectives. *Process Biochem.* 1978, 13(9): 10
- [5] Raymond J Strawinski. Purification of substances by microbial action. US 2574070, 1951
- [6] C E Zobell. Process of removing sulfur from petroleum hydrocarbons and apparatus. US 2641564, 1953
- [7] Kirshenbanm. Bacteriological desulfurization of petroleum. US 2975103, 1961
- [8] Donald O Hitman, Bartlesville *et al.* Treatment of hydrocarbons. US 3069325, 1962
- [9] D W Duncan *et al.* Accelerated microbiological ore extraction process. US 3305353, 1967
- [10] Umezawa, Hamao, Takeuchi, *et al.* Processes for producing physiologically active peptide and its N-acyl derivatives. US 4055468, 1977
- [11] Kibane J J, Bielaga B A. Toward sulfur-free fuels. *CHEMTECH*, 1990, 12: 747
- [12] Kilbane II, John J *et al.*, Mutant microorganisms useful for cleavage of organic C-S bonds. US 5028888, 1991

- [13] Kilbane II, John J *et al.* Mutant microorganisms useful for cleavage of organic C-S bonds. US 5104801, 1992
- [14] Kilbane John J II, Mutant microorganisms useful for cleavage of organic C-S bonds. EP 0441462A2, 1991
- [15] Inomata M, Sato K *et al.* Engineering firm has designed refinery of the future. *Oil and Gas Journal*, 1997, **95**(17): 56 ~ 64
- [16] Anne K, Rhodas. Enzymes desulfurizing diesel fueling pilot plant tests. *Oil and Gas Journal*, May 15, 1995, **93**(20): 39 ~ 40
- [17] Monticello D J *et al.* Microbial desulfurization of fossil fuels. *Annual Review of Microbiology*, 1985, **39**: 371 ~ 389
- [18] Klein J *et al.* Microbial desulfurization of coal and oil. *Fuel Processing Technology*, 1994, **40**: 297 ~ 310
- [19] Kodama K K *et al.* Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agric Biol Chem*, 1973, **37**: 45
- [20] Kilbane J J. Desulfurization of coal: the microbial solution. *Trends Biotechnol*, 1989, **7**(4): 97 ~ 101
- [21] Denome S A *et al.* Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(9): 2837
- [22] Monticello D J. Riding the fossil fuel biodesulfurization wave. *CHEMTECH*, 1998, **28**(7): 38 ~ 45
- [23] Gray K A *et al.* Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nature Biotechnol*, 1996, **14**(13): 1705 ~ 1709
- [24] Li M Z *et al.* Genetic analysis of the dsz promoter and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *Journal of Bacteriology*, 1996, **178**(22): 6409 ~ 6418
- [25] Pacheco M A *et al.* Recent advances in biodesulfurization(BDS) of diesel fuel. *NPRA paper AM-99-27*. Present at the 1999 NPRA Annual Meeting, San Antonio, TX, March 21 ~ 23, 1999
- [26] Rhee S K *et al.* Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated *Gordonia* Strain, CYKS1. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(6): 2327 ~ 2331
- [27] Chang J H *et al.* Desulfurization of diesel oils by a newly isolated dibenzothiophene-degrading *Nocardia* sp. Strain CYKS2. *Biotechnology Progress*, 1998, **14**(6): 851 ~ 855
- [28] Kenji Maruhashi. The biodesulfurization technology in Japan. *PETROTECH*, 2000, **23**(5): 368 ~ 370
- [29] Omori T *et al.* Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. Strain SY1. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(3): 911 ~ 915
- [30] Purdy R *et al.* Biodesulfurization of organic-sulfur compounds. *Curr Microbiol*, 1993, **27**: 219 ~ 222
- [31] Lzumi Y *et al.* Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(1): 223 ~ 226
- [32] Wang P *et al.* Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strains. *Arch Microbiol*, 1994, **161**: 266 ~ 271
- [33] Konishi J *et al.* Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(8): 3164 ~ 3169
- [34] Rambossek *et al.* Recombinant DNA encoding a desulfurization biocatalyst. US 5356801, 1994
- [35] Denome S A, Oldfield C, Nash L J *et al.* Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Journal of Bacteriology*, 1994, **176**(21): 6707 ~ 6716
- [36] Gallardo M E *et al.* Designing recombinant *Pseudomonas* Strains to enhance biodesulfurization. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(22): 7156 ~ 7160
- [37] Piddington *et al.* Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(2): 468 ~ 475
- [38] Lau P C K *et al.* Biodesulfurization gene expression by promoter replacement in *Rhodococcus* Division of the Fuel Chemistry, 1999, **44**(1): 32 ~ 34
- [39] Darzins *et al.* Sphingomonas biodesulfurization catalyst. US 6133016, 2000
- [40] Squires *et al.* Method of desulfurization of fossil fuel with flavoprotein. US 5985650, 1999
- [41] Darzins *et al.* Dsz gene expression in *Pseudomonas* hosts. US 5952208, 1999
- [42] David S Reichmuth *et al.* Biodesulfurization of dibenzothiophene in *Escherichia coli* is enhanced by expression of a vibrio harveyi oxidoreductase gene. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, **67**(1): 72 ~ 79

The Application of Genetic Engineering to the Petroleum Biodesulfurization

TONG Ming-You^{1*} FANG Xiang-Chen¹ MA Ting² ZHANG Quan¹

¹ (Fushun Research Institute of Petroleum and Petrochemicals, SINOPEC, Fushun 113001, China)

² (Biological Department, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract The developed course and reaction mechanisms of petroleum biodesulfurization were introduced. The recent development of genetic engineering technology, which used in desulfuration strain's construction, reconstruction and other fields, was summarized emphatically. Its current research situation internal and overseas and the developing prospect were simply analyzed, and our research designs were submitted.

Key words genetic engineering, petroleum, biodesulfurization

Received: April 11, 2001

This work was supported by Grant from Sinopec.

* Corresponding author. Tel: 86-413-6427881 ~ 412; Fax: 86-413-6429551; E-mail: TONGMY@frpp.com.cn