

休止细胞法脱除模拟燃油中的有机硫



李国强，魏东盛，邓飞



一、实验目的

- (1) 了解休止细胞制备的原理和方法。
- (2) 了解模拟燃油的制备方法。
- (3) 掌握用休止细胞脱除模拟燃油中有机硫的方法。



二、实验原理

休止细胞法发酵是利用微生物自身生长代谢产酶的特点或是诱导产酶的特性将微生物培养到对数生长末期，分离菌体并以一定浓度重悬在生理缓冲液中，利用菌体已经大量产生的酶作用底物的方法，此时微生物已经基本停止生长代谢，但保持有系列酶的活性。休止细胞的主要优点是反应专一性强，可以提高底物转化率，不易污染杂菌，可以减少产物对菌体生长及酶合成的抑制，是提高生物脱硫效率的途径之一。国外已有利用野生菌株和基因工程菌株的休止细胞进行生物脱硫的报道。利用休止细胞进行燃油脱硫，不仅避免了脱硫酶的纯化，而且更易于生物脱硫的工业化。



三、实验材料

➤(1) 实验药品:

Gibb's试剂（2, 6-二氯醌, 4-氯酰亚胺）、DBT、液体石蜡、碳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠。

➤(2) 实验仪器:

记号笔、三角瓶、移液器、摇床、离心机、紫外分光光度计等。



四、实验步骤

1、模拟燃油的制备

准确称取100.0mg DBT，置于100mL容量瓶内用正十六烷定容至100mL，即得含硫量为1000ppm的模拟燃油。

2、休止细胞的制备

在4℃条件下，将实验五中获得的发酵液5000 r/min离心10 min收集菌体。菌体细胞用生理盐水洗两次，并悬浮于0.1mol/L磷酸钠缓冲液中制成菌悬液，使菌浓为 $2 \sim 5 \times 10^9 \text{ cell/mL}$ 。

3、休止细胞脱硫实验

取45mL休止细胞置于500mL摇瓶中，再加入5mL模拟燃油，置于30℃，200r/min的摇床反应。反应12h后用 2N 的盐酸终止反应后检测脱硫效果。



四、实验步骤

4、休止细胞脱硫效果检测

将反应液**1000r/min**离心**10**分钟，使油/水/菌分离。小心吸取**5mL**水相，用**10%**的碳酸钠调**pH 8.0**，按体积比为**100:1**加入**Gibb's**试剂，**30℃**反应**30min**，测定其**610nm**处吸光度，在标准曲线上查其相应的点，读出对应的**2-HBP**浓度或根据拟合的计算式计算出**2-HBP**的浓度。

5、休止细胞脱硫速率及脱硫率计算

根据测得的水相中**2-HBP**的浓度及其在油/水两相中的分配系数计算模拟燃油的脱硫率，计算**12h**内休止细胞的平均脱硫速率。



五、思考题

- 1、与生长细胞脱硫相比，休止细胞脱硫工艺有哪些优点？
- 2、与生长细胞脱硫相比，休止细胞的脱硫率和脱硫速率有什么变化，为什么？