

## 由原油及其制品生产细菌胞外多糖的研究

### II. 黄橙色棒状杆菌由原油产生的胞外多糖\*

王修垣 俞南雄 刘秀芳

田新玉 崔文华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从胜利油田的油污土样中分离出一株革兰氏阳性、无芽孢、不分枝、不运动、不抗酸、能从原油产生胞外多糖的杆菌 D 9004。生长 12—24 小时, 细胞  $0.5—0.6 \times 1.5—3.5 \mu\text{m}$ , 到 48 小时, 成为类球状和短杆。在营养琼脂平板上, 菌落圆形, 隆起, 桔红色, 表面光滑、润泽, 边缘整齐。该菌不还原硝酸盐, 石蕊牛奶中产碱, 产生硫化氢, 脲酶和过氧化氢酶阳性。从葡萄糖、果糖和蔗糖氧化产酸。不液化明胶。在 SSC 系统中, DNA 解链温度( $T_m$  值)为  $94.35 \pm 0.59^\circ\text{C}$ , G + C 含量为  $61.1 \pm 1.44$  克分子%。上述特征与黄橙色棒状杆菌 (*Corynebacterium flavo-aurantiacum*) 基本一致。

该菌以原油为碳源、摇瓶培养 5—6 天, 发酵液粘度在  $35^\circ\text{C}$  下为 26cSt 左右, 总糖含量约 3.5 g/l。提纯的多糖经凝胶电泳和超离心分析证明为均一的。其沉降系数、特性粘度、偏比容、分子量和旋光度分别为 6.28S, 0.46dl/g, 0.67ml/g, 275, 000 和  $\alpha_D^{25} + 18$ 。用纸层析法检出, 该多糖与已报道的其它胞外多糖不同, 由 D-甘露糖、D-半乳糖(克分子比为 2:1)和丙酮酸所组成。其红外光谱与其它多糖的相似。

关于棒状杆菌属的菌株形成胞外多糖的能力已引起注意<sup>[1-10]</sup>。本文报道了一株由原油产生胞外多糖的细菌 D 9004 的分类鉴定, 及其多糖的一些理化性质的研究结果。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌株的分离、筛选和鉴定方法

菌株分离用的油污土样和水样采自胜利油田。方法与我们前一报告相同<sup>[11]</sup>。

#### (二) 培养基和培养条件

多糖发酵的培养基成份为 (g/l):  $\text{NaNO}_3$  2.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.06,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.03,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $15 \times 10^{-6}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $60 \times 10^{-6}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $150 \times 10^{-6}$ , 玉米浆 0.5, 原油 200, 自然

pH, 500 ml 三角瓶装 100 ml 培养基, 8 磅 30 分钟灭菌。

培养物置 200 转/分旋转式摇床上  $30—33^\circ\text{C}$  培养 5—6 天, 用于多糖的提取。

#### (三) 多糖的提纯

按图 1 所示的程序进行。

#### (四) 色谱分离

多糖样品的离子交换层析用 DEAE-纤维素装柱, 磷酸盐缓冲液 (pH 6) 平衡,  $0.05—0.5\text{ M}$  NaCl 梯度溶液洗提。Sephadex G-200 用  $0.2\text{ M}$  NaCl 平衡后进行凝胶过滤。

本文于 1980 年 8 月 13 日收到。

\* 参加分离和筛选工作的还有华东石油学院常谦、宋军和胜利油田微生物协作组的同志, 气相色谱分析在中国科学院化学研究所王维通同志协助下进行, 电镜照片为本所技术室电镜组拍摄, 一并致谢。

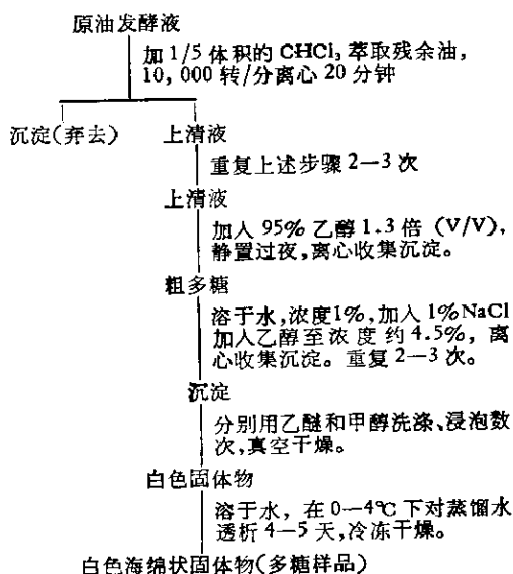


图 1 D9004 多糖的提纯程序

Fig. 1 Purification of polysaccharide D9004

多糖的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳, 用 pH 8.9 的 tris-甘氨酸缓冲液进行<sup>[12]</sup>。电泳毕, 凝胶中的多糖用含 10% 乙酸的甲醇溶液固定, 用 1% Alcian blue (溶于 0.01 N HCl 中) 染色, 多余的染料用 0.01 N HCl 洗去。蛋白质的检验: 将电泳后的凝胶在 12.5% 的三氯乙酸中固定 30 分钟, 在含 0.05% 考马斯亮蓝 R-250 及 12.5% 三氯乙酸溶液中浸染 30 分钟后, 再浸于 12.5% 三氯乙酸中。

#### (五) 分析方法

粘度的测定用奥氏毛细管粘度计进行。总糖用蒽酮<sup>[13]</sup>法测定。

超离心分析使用 OMEGA-II 型分析离心机, 转速 58,000 转/分, 温度 20℃。偏比容用比重瓶测定。分子量按 Scheraga 和 Mandelkern<sup>[14]</sup>的方法计算:

$$M = 4,690 \times [s_{0,w}']^{3/2} \cdot [\eta]^{1/2} / (1 - \bar{v}\rho)^{3/2}$$

式中,  $M$  = 分子量,  $\bar{v}$  = 偏比容,  $\rho$  = 溶剂密度,  $[s_{0,w}']$  = 外推至零浓度时的  $S$  值,  $[\eta]$  = 特性粘度。

红外光谱分析用 UR-10 红外光谱仪, KBr 压片。旋光度用 WYG-6 自动旋光仪测定。

多糖的单糖组份用纸层析法和气相色谱法检验。取 10mg 多糖溶于 0.5ml 水中, 加入 0.5ml 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 封管于沸水浴上水解 5 小时, 离心、加水

0.5ml。把活化的 Amberlite IRA-410(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>型)树脂加到上清液中至 pH 7, 直接用于在 Whatman No. 1 滤纸上点样检验单糖组份。展开液为: (1) 可力丁(水饱和); (2) 正丁醇:乙酸:水 (4:1:5, V/V); (3) 正丁醇:吡啶:水 (6:4:3, V/V)。显色剂为邻苯二甲酸氢苯胺<sup>[15]</sup>或碱性硝酸银<sup>[16]</sup>。

单糖组份的气相色谱分析, 在多糖经 2N HCl 水解 6 小时后, 经乙酰化处理, 用上海分析仪器厂的 103 型气相色谱进行。

纸层析法检验有机酸的展开液为: (1) 正丙醇:氨水:水 (6:2:2); (2) 正丁醇:甲酸 (95:5), 水饱和。显色剂为 0.1% 溴甲酚绿。

## 结 果

### 一、菌株的鉴定

从胜利油田 100 多个油污土样和水样中分离出 700 多株菌, 经筛选得到一株以原油为碳源合成胞外多糖的菌株 D 9004。该菌的细胞形态、培养特征和生理生化特性如下。

#### (一) 细胞形态

该菌在营养琼脂斜面上培养 12—24 小时, 细胞杆状—棒状, 有的稍弯曲, 两端钝圆, 单个、成对或 V 形排列, 无分枝, 大小为 0.5—0.6 × 1.5—3.5 μm。细胞折断分裂, 但不同时分裂, 48 小时成为类球状和短杆 (图版 I-1—3)。用美蓝染色法证实有异染质粒。丹宁酸-结晶紫染色证实细胞中有横隔。该菌无鞭毛, 不运动, 不形成芽孢。革兰氏染色阳性, 无变化。抗酸染色负反应。

#### (二) 培养特征

营养琼脂平板: 菌落桔红, 圆形, 隆起, 边缘整齐, 不透明, 表面光滑、润泽, 96—144 小时, 直径 3—5mm。

在营养琼脂斜面, 土豆汁琼脂斜面, 天门冬素琼脂斜面, 以液体石蜡为碳源的合成琼脂斜面和马铃薯块上, 菌苔均为线形, 中度生长, 边缘整齐, 表面光滑、润泽, 桔红

色,不形成水溶性色素。马铃薯块不变色。

在营养肉汁中,沿管壁成环,液面上形成桔红色膜,摇之即呈絮状物下沉于管底。

### (三) 生理生化特性

生长温度: 在 10℃ 生长微弱, 28—32℃ 生长最适, 37℃ 可生长, 42℃ 不生长。在脱脂牛奶中加热至 72℃ 15 分钟不生长。

初始生长 pH: pH 5—10 均可生长, 7.0—8.0 生长最适, 9.0 以上生长延迟。

对氧的要求: 好气-微厌气。

该菌不还原硝酸盐,不产氨,不水解淀粉,不液化明胶,在石蕊牛奶中产碱。吡啶不形成。甲基红试验阴性。不分解纤维素。不产生乙酰甲基甲醇。形成硫化氢。脲酶试验弱阳性。过氧化氢酶阳性,氧化酶阴性。

该菌不利用丙二酸盐、柠檬酸盐和葡萄糖酸盐。

在休和利夫森二氏培养基上穿刺接种,该菌氧化葡萄糖和蔗糖产酸,但不从乳糖、半乳糖、菊糖、棉子糖、鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、麦芽糖、糊精、甘油、甘露醇、卫矛醇产酸,均不产气。

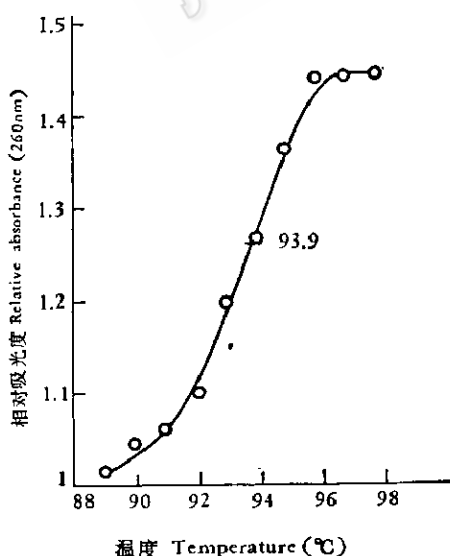


图 2 D9004 的 DNA 增色曲线

Fig. 2 DNA-hyperchromic curve of strain D9004

在杜氏小管的合成培养基中,该菌由葡萄糖、蔗糖和果糖产酸、不产气;由半乳糖、乳糖、阿拉伯糖、甘露醇、甘油、木糖、麦芽糖、卫矛醇和糊精不产酸和气。

### (四) DNA 中 G-C 含量的测定

DNA 中 G-C 克分子百分含量的测定是用紫外分光光度计测定解链温度( $T_m$ 值)的方法,在 SSC 系统中、于自由蒸发条件下<sup>[17]</sup>进行的,并校正了热膨胀的影响<sup>[18]</sup>。测定四次,得到菌株 D9004 DNA 的  $T_m$  值为  $94.35 \pm 0.59$ , G + C 含量为  $61.1 \pm 1.44$  克分子%。该菌 DNA 的增色曲线如图 2。

## 二、多糖的理化性质

### (一) 粘质多糖的形成

该菌在以原油为碳源的摇瓶培养初期,把原油乳化成粒度不一的油滴,悬浮于培养液中。随着培养期的延长,乳化程度增强,30 小时后,培养液变稠,5—6 天,粘度达 26 cSt (35℃) 左右,总糖含量达 3.5g/l (图 3),表明该菌具有利用原油合成粘质胞外多糖的能力。

### (二) 多糖的提纯

D9004 多糖的提纯按图 1 所示的程序进行,产物为白色海绵状固体物。在提纯过程中看到,在逐渐加入乙醇时,多糖水溶液成为凝胶状;只有在多糖溶液中含有适量的无机盐,如 NaCl 或 KCl 时,加入乙醇才能使之沉淀。这可能是由于加入的无机离子中和了多糖分子中的电荷,从而降低了  $\zeta$  电位之故。

### (三) 亲水溶胶和多电解质性质

该多糖在水中膨胀,成为粘稠的溶胶。随着糖浓度的增加,溶胶粘度陡峭上升(图 4),呈现典型的亲水溶胶行为。

当向溶胶中加入溴化十六烷基吡啶,随即产生沉淀,以及多糖分子在电场中移动(盘状凝胶电泳,见图版 I-4),清楚地表

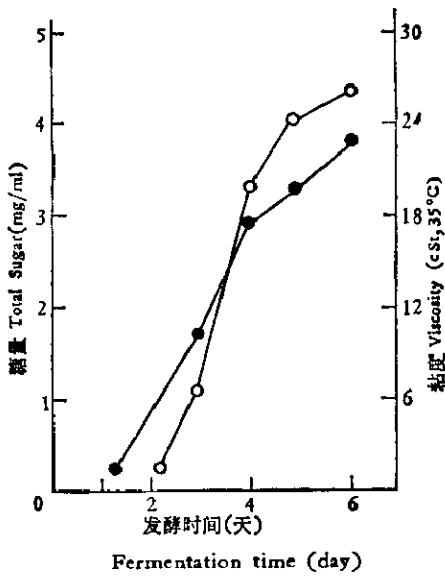
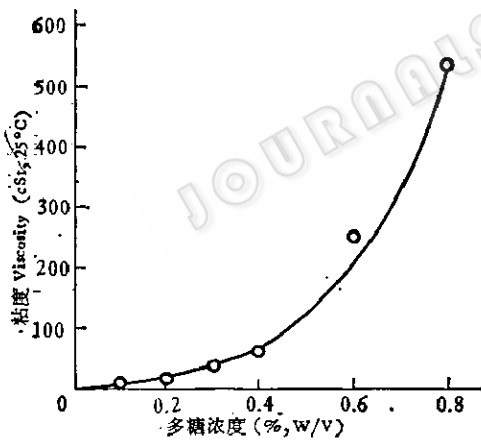


图3 菌株 D9004 在含原油的培养基中摇瓶培养时,多糖的积累和粘度的关系

Fig. 3 The relationship between polysaccharide production and viscosity during fermentation

●—● 糖量 Total Sugar  
○—○ 粘度 Viscosity



Polysaccharide concentration

图4 D9004 多糖的浓度与粘度的关系 (在蒸馏水中)

Fig. 4 The relationship between polysaccharide concentration and viscosity in distilled water

明, D 9004 多糖具有多电解质的性质。

#### (四) 离子交换色谱和凝胶过滤

取 0.25 克多糖溶于 50ml 0.02 M 磷酸缓冲液 (pH 6) 中, 加到 DEAE-纤维素柱

(50 × 3cm) 上, 经 NaCl 梯度液洗提, 获得一个馏份, 经 PCl<sub>5</sub> 吸水、透析和冷冻干燥, 得到多糖 0.12g。此多糖经 Sephadex G200 柱进行凝胶过滤, 显示出一个峰 (图 5)。

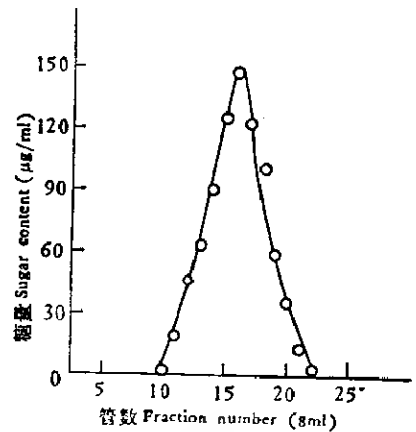


图5 经 DEAE-纤维素柱层析后的多糖在 Sephadex G200 上凝胶过滤。柱 1.9 × 80cm, 用 0.2 N NaCl 平衡, 加 0.4% 多糖液 (在 0.2 N NaCl 中) 3ml, 用 0.2N NaCl 洗提

Fig. 5 Sephadex G200 gel filtration of polysaccharide D9004 after DEAE-cellulose column chromatography

Column: 1.9 × 80cm, equilibrated with 0.2N NaCl, 0.4% polysaccharide in 0.2N NaCl 3ml, eluted with 0.2N NaCl

#### (五) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

电泳毕, 分别检验多糖 (图版 I-4, A 管) 和蛋白质 (图版 I-4, B 管)。A 管显示一个天蓝色的带, 表明该多糖是均一的。B 管不显任何带, 表明该多糖不含蛋白质组份。

#### (六) 超离心分析

用四种不同浓度的多糖溶液进行超离心分析, 均分别显示出一个峰 (图 6)。将所得  $s_{20,w}$  对多糖浓度作图 (图 7), 外推至零, 得沉降系数  $s_{20,w}^0 = 6.28S$ 。

#### (七) 特性粘度

用四种不同浓度的多糖液在 25°C 下分别测定粘度, 用外推法得到在零浓度时的特性粘度值为 0.46 (图 8)。

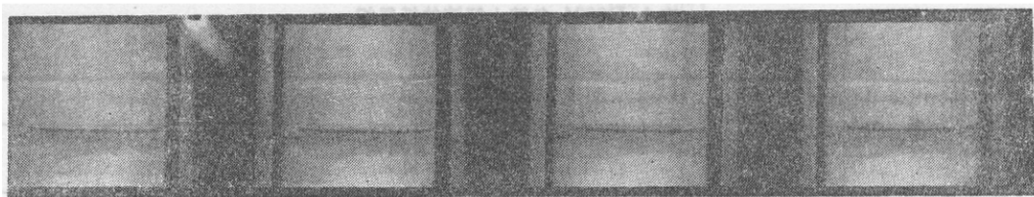
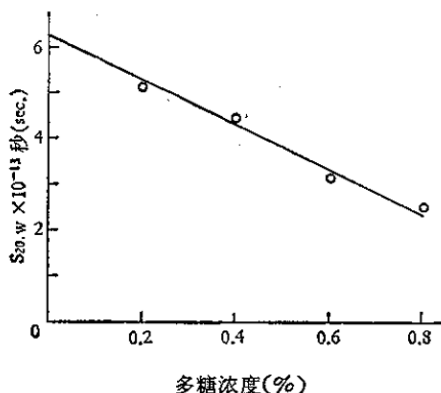


图 6 D9004 多糖的沉降图谱

多糖浓度: 0.6%, 时间间隔: 5 秒, 于 58,000 转/分时拍摄

Fig. 6 Sedimentation patterns of purified polysaccharide D9004

0.6% Polysaccharide, Photograph interval: 5S after reaching 58,000 rpm.

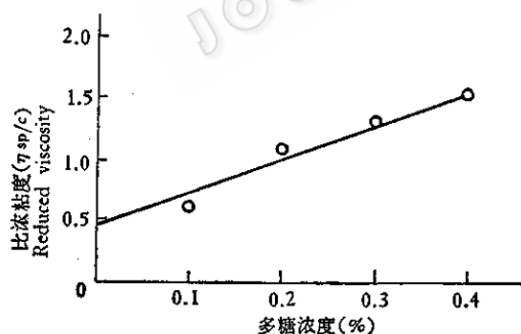


Polysaccharide concentration

图 7 D9004 多糖的沉降系数与浓度的关系

$$s_{20,w}^0 = 6.28S$$

Fig. 7 The dependency of sedimentation coefficient on concentration of polysaccharide D9004



Polysaccharide concentration

图 8 D9004 多糖的比浓粘度与浓度的关系由此得到特性粘度  $[\eta] = 0.46(\text{dl/g})$ Fig. 8 Dependence of reduced viscosity on concentration of polysaccharide D9004  
The intrinsic viscosity  $[\eta] = 0.46(\text{dl/g})$ 

### (八) 偏比容

用比重瓶测定, 结果为  $0.67(\text{ml/g})$ 。

### (九) 旋光度

用旋光仪测定,  $\alpha_D^{25}$  为  $+18$  (浓度 = 0.268% 于水中)。

### (十) 组份分析

单糖组份分析用纸层析法在三种不同的展开液中得到了一致的结果。多糖水解

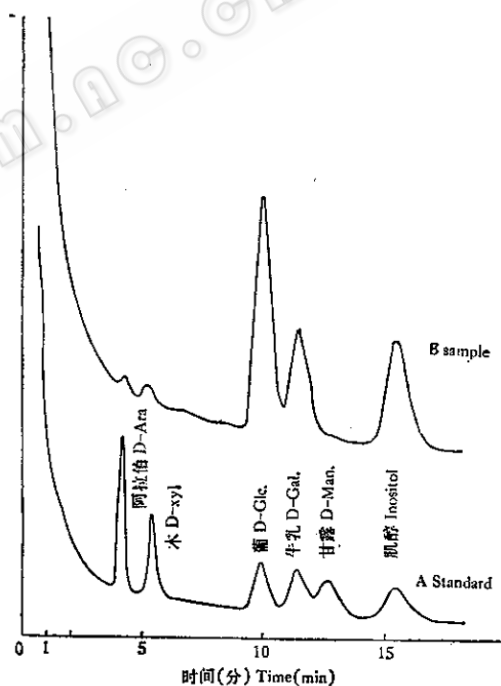


图 9 D9004 多糖的单糖组份的气相色谱

Fig. 9 Gas chromatogram of the monosaccharide constituents of polysaccharide D9004

担体 Carrier: Chromosorb. W AW DMCS 60/80

固定液 Fixing solution: ECNSS-M 3%

柱 Column: 2000mm  $\times$  2mm氢焰温度 Hydrogen flame tem.:  $240^\circ\text{C}$ 气化温度 Gasifying tem.:  $350^\circ\text{C}$ 柱床温度 Bed tem.:  $190^\circ\text{C}$

表 1 D9004 多糖水解液的纸层析

Table 1 Paper chromatogram of the acid hydrolysate of polysaccharide D9004

展 开 液 Solvent	<i>R<sub>f</sub></i>			
	D-半乳糖 D-Gal.	D-甘露糖 D-Man.	D9004 多糖 Polysaccharide	
可力丁(水饱和) Collidine, water-saturated	0.40	0.54	0.40	0.54
正丁醇-乙酸-水 n-Butanol-acetic acid-water	0.20	0.24	0.20	0.24

液纸层析所得的两个斑点的  $R_f$  值分别与 D-半乳糖和 D-甘露糖的相吻合(表 1)。典型的纸谱见图版 I-5。

D9004 多糖水解物的气相色谱分析证实(图 9), 其单糖组份与纸层析所得结果相同。根据峰的面积计算含量, 求得甘露糖和半乳糖的克分子比为 2:1。

有机酸组份的纸层析在两种展开液中得到了一致的结果, 均指出, 该多糖含有丙酮酸(图版 I-6), 尚待用其它方法验证。

### (十一) 红外光谱分析

由 KBr 压片得到的红外光谱(图 10)与多糖的红外光谱图相似<sup>[3,11]</sup>。图中显示出几个明显的吸收峰, 表明多糖分子中存在着下列基团:  $-\text{OH}$  ( $3400\text{cm}^{-1}$ ),  $-\text{CH}-$  ( $2940\text{cm}^{-1}$ ), 弯曲的  $-\text{CH}_2-$  ( $1425\text{cm}^{-1}$ ),  $\text{COO}^-$  ( $1610\text{cm}^{-1}$ )。在  $900\text{cm}^{-1}$  附近有一

个峰, 呈现糖的指印区(finger print region), 表明该多糖主要是  $\beta$ -配糖键合的。

## 讨 论

根据 D 9004 菌株的细胞形态、培养特征、生化特性及 DNA 的 G+C 克分子百分含量, 按伯杰氏《鉴定细菌学手册》第八版<sup>[20]</sup>, 它应列入棒状杆菌群, 但与《手册》所列各种均有明显区别。与已有记载但未列入《手册》的各个种进行比较时发现, D9004 的绝大部分特征与 Takayama 等<sup>[21]</sup>所描述的黄橙色棒状杆菌是一致的, 只是后者产生黄橙色色素、弱还原硝酸盐以及氧化糖类产酸的能力与 D9004 不同。尽管如此, 我们认为可以把它们视为同一种。

该菌从原油形成多糖 3.5g/l。提纯的多糖呈现亲水溶胶行为和多电解质性质。经聚丙烯酰胺凝胶电泳和超离心分析证实, 所得样品是均一的。根据 D 9004 多糖的有关物理常数计算得到该多糖的分子量为 275,000。

D9004 多糖的单糖组份经纸层析法和气相色谱分析证明, 由 D-甘露糖和 D-半乳糖所组成, 克分子比为 2:1。它还可能含有丙酮酸。在微生物胞外多糖的研究中, 根据 Sandford<sup>[22]</sup>综述的资料, 尚未报道有这种多糖, 有待进一步研究。

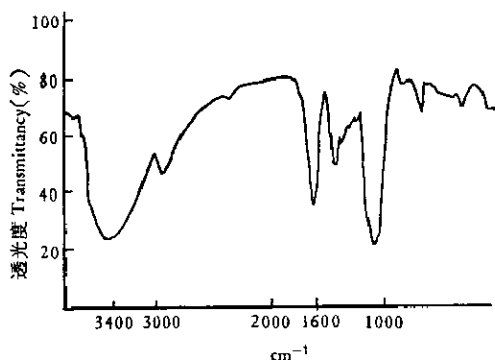


图 10 D9004 多糖的红外光谱

Fig. 10 IR spectrum of polysaccharide D9004

## 参 考 文 献

- [1] Spencer, J. F. T. and P. A. J. Gorin: *Can. J. Microbiol.*, 7(2): 185—188, 1961.
- [2] McNeeley, W. H. and K. S. Kang: *Industrial Gums-Polysaccharides and Their Derivatives*, R. L. Whistler et al. eds., Academic Press, New York, 1973, pp. 437—497.
- [3] Nagahama, T. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 41(1): 9—16, 1977.
- [4] Kanamaru, T. et al.: *ibid*, 33(10): 1521—1522, 1969.
- [5] Yamada, K. and T. Furukawa: *Japanese Patent*, 73/33, 396, 1973.
- [6] Kayowa Hakko Kogy Co., Ltd.: *Fr. Brevet D'invention*, 1,530,165.
- [7] G B Pat. 1,314,992, 1973.
- [8] 中国科学院微生物研究所细菌分类组等: *微生物学报*, 19(4): 341—346, 1979.
- [9] Hagiwara, S., and K. Yamada: *Agr. Biol. Chem.*, 34: 1283, 1970.
- [10] Hagiwara, S. and K. Yamada: *ibid*, 35:

1402, 1971.

- [11] 王修垣等: *微生物学报*, 20(4): 343—348, 1980.
- [12] Corpe, W. A.: *Development in Industrial Microbiology*, Vol. 11, 402, 1969.
- [13] Morris D. L.: *Science*, 107: 254, 1948.
- [14] Scheraga H. A. and L. Mardelkern: *J. Amer. Chem. Soc.*, 75: 179, 1953.
- [15] Partridge S. M.: *Nature*, 164: 443, 1949.
- [16] Trevelyan, W. E., et al.: *Nature*, 166: 444, 1950.
- [17] 周慧玲: *微生物学报*, 18(2): 134—139, 1978.
- [18] 王修垣: *微生物学通报*, 8(2): 85—86, 1981.
- [19] Morikawa, H., et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 38(2): 343—348, 1974.
- [20] Buchanan, R. E., et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Comp., Baltimore, 1974, pp 599—632.
- [21] Takayama, K., et al.: *J. Ferment. Technol.*, 48(11): 669—675, 1971.
- [22] Sandford, P. A.: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 36, 265—313, 1979.

## STUDIES ON MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED FROM CRUDE OIL AND OILPRODUCTS II. EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCED FROM CRUDE OIL BY *CORYNEBACTERIUM FLAVO-AURANTIACUM* D9004

Wang Xiuyuan Yu Nanxiong Liu Xioufang

Tian Xinyu Cui Wenhua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A strain of bacterium D9004 producing extracellular polysaccharides from crude oil as C-source was isolated from oil-contaminated soil at Shengli oil-field. The organism is Gram-positive, non-motile, non-sporulating, not acid fast, and unbranched. The cells growing for 12—24 h are 0.5—0.6 by 1.5—3.5  $\mu\text{m}$ , for 48 h changed into coccoid and short rods. Colonies on nutrient agar plate are circular, raised, edge entire, orange-red, smooth, and moist-glistening. Nitrate is not reduced. Litmus milk is alkalinized. Hydrogen sulfide produced. Gelatine

not liquefied. Urease and catalase: positive. Glucose, fructose, and sucrose are oxidized into acid. The G + C content of DNA determined in SSC-system is  $61.1 \pm 1.44 \text{ mol } \%$ , Tm value is  $94.35 \pm 0.59^\circ\text{C}$ . According to taxonomic studies this strain is identified as *Corynebacterium flavo-aurantiacum*.

The organism produced about 3.5 g/l of polysaccharide after 5—6 days shake culture and the viscosity of the fermented solution was up to 26 cSt. at  $35^\circ\text{C}$ . The polysaccharide preparation purified by ion exchange column chromatography and

gel filtration seems to be homogeneous by ultracentrifugal analysis and polyacrylamid gel electrophoresis. Its sedimentation coefficient, 6.28 S. Intrinsic viscosity, 0.46 dl/g. Partial specific volume, 0.67 ml/g. Molecular weight, 275,000 and

rotation  $\alpha_D^{25} + 18$ . This polysaccharide is composed of D-mannose and D-galactose with molar ratio of 2:1. Pyruvic acid may be also present. Its IR spectrum is similar to that of other polysaccharides.

JOURNALS.IM.AC.CN