微生物学报 22 (3): 269—275, 1982
Acta Microbiologica Sinica

菌株 H255 原油发酵液乳化物质的分析*

王修垣 田新玉 宋沛然
刘秀芳 崔文华 王先极
(中国科学院微生物研究所,北京)

从兰州炼油厂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、能发酵原油形成稳定乳化液的杆菌菌株 H255。该菌 DNA 的 G+C 含量在 SSC 系统中为 60.0mol%。经鉴定,其细胞形态、培养特征和生理生化特性基本上与喜甘氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glycinophilum*)一致,可视为同一种。

用华东 122 阳离子交换树脂 [H^+] 从原油发酵液中提取出一种溶于水的棕褐色乳化物质 0.15—0.24g/l。其红外图谱与西德 Grunau 化工厂的一种蛋白浓缩物乳化剂和已知的几种肽脂乳化剂相似,但不含脂肪酸。也不含糖类。用纸层析法测出,其氨基酸组份为:亮氨酸、丝氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸和赖氨酸。

表面活性剂用途很广,尤其是在石油工业中。早在四十年代,ZoBell[1-3] 就提出,微生物产生表面活性剂是微生物用于提高二次采油的主要机制之一。La Rivier[4] 的工作表明,降低表面张力是硫酸盐还原菌脱油的重要因子。updegraff 和 Wren[5] 对此持否定态度。捷克 Dostalek 和 Spurny[6] 根据试验室的结果,把 *Desulfovibrio* 和 *Pseudomonas* 同糖密一道加到油层中,观察到原油产量提高。他们认为,这可能是由于细菌产生表面活性物质,改变了岩石-油-水系统的界面张力所致。但上述作者们均未提取出微生物产生的表面活性物质。

六十年代以来,随着石油发酵工业的发展,微生物对烃类乳化机制的研究引起了注意[7-9],并提取了几种表面活性剂[10-15]。用微生物生产生物表面活性剂将为发酵工业提供一类新的产品。

本文报道一株发酵原油形成稳定乳化液的菌株 H255 的分类鉴定及其乳化剂的提取和分析的结果。

材料和方法

(一) 菌株及其鉴定

菌株 H255 分离自兰州炼油厂的油污土样。鉴定方法按《一般细菌常用鉴定方法》[16]进行。

(二) 培养基和培养条件

原油发酵的培养基成分为 (g/l): KH_2PO_4 3.4, Na_2HPO_4 1.5, $(NH_4)_2SO_4$ 4.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.7, 酵母膏 0.01, 自来水 1l, 胜利油田永安镇或营四井原油 8% (w/v), pH 7.0—7.2。500ml 三角瓶装 100ml 培养基,8 磅 30 分钟灭菌。

培养物置 200 转/分旋转式摇床上培养四天,温度 28—30℃。

(三) 发酵液中乳化物质的提取

发酵液经 10,000 转/分离心和滤纸过滤,除去乳化液中的小油滴和细胞。取一定量的滤液,以 2—3ml/分的速度通过华东 122 弱酸型 (H^+)

本文于 1980 年 10 月 13 日收到。

* 在工作中承张树政教授提供宝贵意见,粘度测定在胜利油田地质处进行,红外光谱分析承石油部石油化工研究院协助,电镜照片由本所技术室电镜组拍摄,一并致谢。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

阳离子交换树脂(酚醛树脂)装填的交换柱，然后用蒸馏水冲洗至清，再用 50% 乙醇(用量为树脂容量的6—7倍)洗脱并收集之。洗脱液在 60℃ 水浴中浓缩至干，称恒重并计算单位体积发酵液的乳化剂产量。

(四) 粘度的测定

发酵液粘度的测定用逆流式粘度计在 35℃ 下定期测定，检查原油发酵液的乳化稳定性。

(五) 分析方法

乳化剂糖份的测定用蒽酮法；脂肪酸和氨基酸组份的测定用纸层析法；氮含量的测定用凯氏定氮法；红外光谱分析用 uR-10 红外光谱仪进行。

结 果

一、菌株的鉴定

菌株 H255 分离自兰州炼油厂油污土样。其细胞形态、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，细胞为杆状，无分枝，有的稍弯曲，少单个、多成对或多个相联，或 V 形排列；24 小时，细胞大小为 0.5—0.7×1.4—4.4μm；细胞折断分裂，但不同时分裂；至 72 小时后，类球状、短杆和杆状细胞同时存在，也可见到膨大细胞(图 1)。用美兰染色证实有异染质粒。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：菌落灰白-微粉，圆形，稍隆起，边缘整齐，不透明，表面光滑、润泽，生长一周，直径 0.6—0.7cm。

在营养琼脂斜面、马铃薯块和以液体石蜡为碳源的合成琼脂斜面上，菌苔均为线形，中度生长，边缘整齐，表面光滑、润泽，灰白-微粉，无水溶性色素。

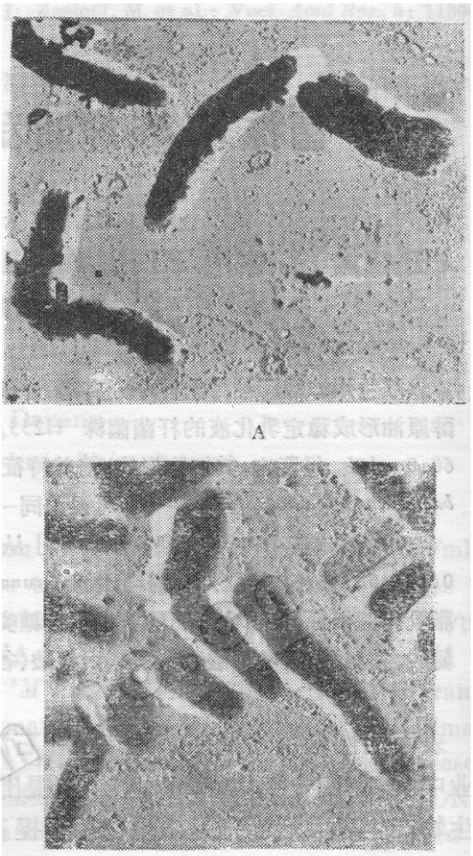


图 1 菌株 H255 的电镜照片
在牛肉汁琼脂斜面上培养：A. 10 小时；B. 96 小时 ×6,000

Fig. 1. Electron Micrograph of *Corynebacterium glycinophilum* H255
Nutrient agar slant: A. 10h, B. 96h. ×6,000

在营养肉汁中，液面上形成灰白-微粉色膜，稍混浊，底部有沉淀。

(三) 生理生化特性

生长温度：28—30℃ 生长最适，37℃ 不生长。在脱脂牛奶中加热至 63℃30 分钟或 72℃15 分钟不存活。

初始生长 pH：pH5.0—9.0 均能生长，7.0—8.0生长最适，pH10 以上不生长。

对氧的要求：好气-微厌气。

该菌不还原硝酸盐为亚硝酸盐，在石蕊牛奶中产碱，不液化明胶，不水解淀粉。接触酶阳性，氧化酶阴性。甲基红和 V. P.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

试验负反应。吲哚不形成，不产氨。纤维素不分解。柠檬酸盐不利用。

在休和利夫森二氏培养基上穿刺培养，该菌不从葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖、菊糖、鼠李糖、乳糖和棉子糖产酸，也不产气。

（四）DNA 中 G＋C 含量的测定

DNA 中 G＋C 克分子百分含量的测定方法见前报[17]。结果表明，H255 DNA 的 G＋C 含量为 60.0mol.%，其增色曲线如图 2。

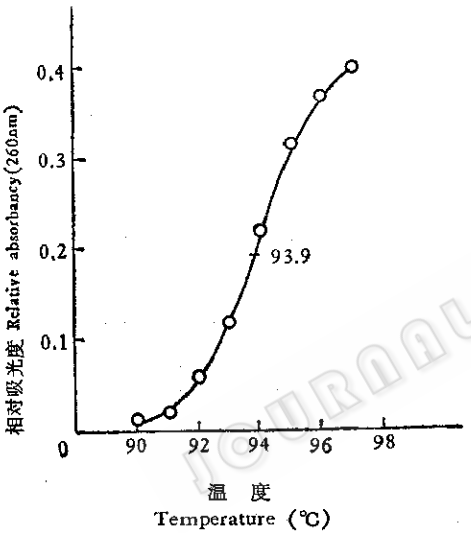


图 2　H255 DNA 的增色曲线

Fig. 2　DNA-hyperchromic curve of strain H255

二、原油发酵液乳化物质的分析

菌株 H255 在以原油为碳源的摇瓶培养中，第一天，培养液浑浊，稍微看出或看不出原油被乳化；第二天，即可看出部分原油乳化成粒度不同的圆球，分散于培养液中，静置片刻，即上浮于表层；第三天，原油由黑褐色变成咖啡色，与培养液混溶的不断增加，但或多或少易于分层；第四天，原油乳化的颗粒变小，混溶良好，长期静置，虽有较大的油滴上浮，但不发生完全破乳现象。取此发酵液置显微镜下检查，可以看到直径 0.5—10μm 的小油滴分散于培养液中，表明此发酵液为水包油型乳化液。

（一）原油发酵液的稳定性

把发酵四天的发酵液在室温下放置两天，待较大油滴上浮后取下部发酵液，分别放到 35℃ 恒温水浴中，定期在相应温度下测定其粘度的变化，结果如图 3。菌株 H255 原油发酵乳化液在 35℃ 下，粘度由开始的 1.42cSt 下降到 124 天的 1.06cSt。但总的看来，粘度下降速度缓慢，表明乳化液比较稳定。当发酵液置 8,000—10,000 转/分下离心 30 分钟并不破乳，也证明了发酵液的稳定性。

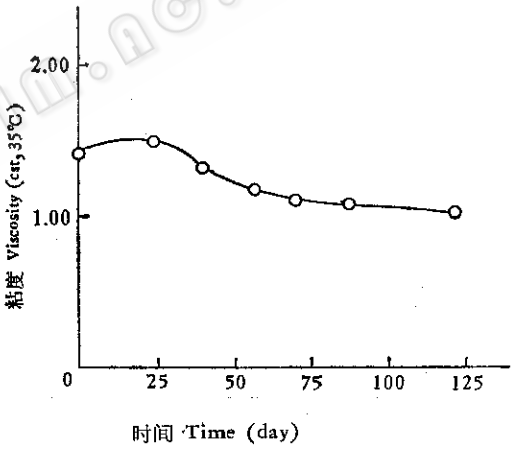


图 3　原油发酵乳化液的粘度与放置时间的关系

Fig. 3　The relationship between viscosity and staying time of fermented emulsion of crude oil

（二）发酵液中乳化物质的提取

既然菌株 H255 原油发酵液乳化比较稳定，就有可能含有较多的乳化物质。取此发酵液分别经过不同类型的离子交换树脂进行乳化物质的提取，以选择比较合适的离子交换剂。我们共用了五种不同型号的树脂（表 1），而以华东 122[H^+] 型树脂得到的产物量较多，产物的乳化性能好，为本研究所采用；其它几种交换剂，或因所得

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

表 1 不同离子交换树脂提取的乳化物质

Table 1 Emulsifier Extracted by Different Ion-Exchange Resins

离子交换剂 Ion exchanger	产量 (g/l) Yield	乳化性能* Emulsifying Ability
717，强碱，阴离子 717, strong base, anion	0.009—0.028	+
409，弱酸，阳离子 409, weak acid, cation	0.007—0.018	+
华东 122[H^+]，弱酸，阳离子 Huadong 122 H^+, weak acid, cation	0.150—0.240	+++
732，强酸，阳离子 732, strong acid, cation	0.009—0.127	
Zerolite G，弱碱，阴离子 Zerolite G, weak base, anion	0.004	+

* +++乳化良好、稳定，+乳化轻微，不稳定。
+++: Emulsifying well and stably
+: Emusifying slightly and unstably

产物量低，或因产物的乳化性能较差，而未被采用。

应当指出，华东 122 树脂并不能把发酵液中的乳化物质完全提取出来，因为发酵液通过交换柱后乳化性能并未完全丧失。在洗提液蒸发浓缩时，放出一种香味，损失了产物中的易挥发组分。用 50% 乙醇洗脱也可能洗脱不完全。

（三）乳化物质性能的测定

用华东 122 离子交换树脂从发酵液中提取的乳化物质为棕褐色固体，溶于水。将此产物配成 0.1% 水溶液，取 10ml 装入刻度试管，分别加入苯或轻柴油 1ml，用力摇动 1 分钟，定时观察乳化液水相、油相和乳化相体积的变化（表 2）。结果表明，得到的产物对苯和轻柴油有乳化能力，在 30 分钟内，水相、乳化相和油相的体积变化相当小，乳化液基本上是稳定的。

（四）乳化物质的分析

得到的产物不水解，在新华滤纸上点样，茚三酮-丙酮酸斑点显色负反应。凯氏定氮法测得含氮量为 4%。蒽酮法测总糖负反应。

表 2 H255 菌株乳化物质的乳化性能*

Table 2 Emulsifying Ability of the Emulsifier Extracted from Crude Oil Fermented Fluid by the Strain H255

被乳化的物质 Emulsified material	乳化时间(分) Emulsified time (min)	水相 (ml) Aqueous phase	乳化相 (ml) Emulsifying phase	油相 (ml) Oil phase
苯 Benzene	10	0—9.2	9.2—10.6	10.6 以上泡沫 Foaming above 10.6
	20	0—9.3	9.3—10.5	10.5 以上泡沫 Foaming above 10.5
	30	0—9.4	9.4—10.5	同上 ditto
轻柴油 Light Diesel oil	10	0—9.6	9.6—10.8	10.8 以上泡沫 Foaming above 10.8
	20	0—9.6	9.6—10.8	同上
	30	0—9.6	9.6—10.8	ditto

* pH = 8.0

1. 红外光谱分析

由 KBr 压片得到的红外图谱（图 4）表现出肽键的存在，与萨德勒红外标准图

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

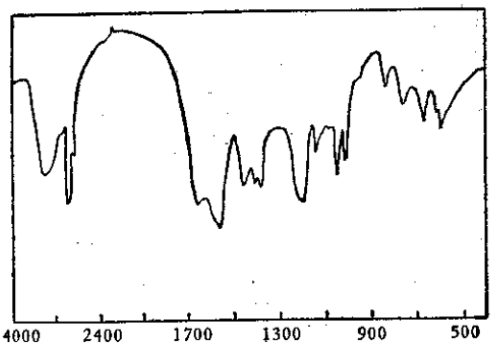


图 4　菌株 H255 乳化剂的红外谱图
Fig. 4　IR spectrum of emulsifier H255

图 5　菌株 H255 乳化剂的氨基酸组份的纸层析图谱双向展开。展开剂：(1) 正丁醇：80 %甲酸：水 (15:3:2)，8 小时；(2) 正丁醇：吡啶：60% 乙醇：水 (5:1:1:1)，6 小时。25℃，用 0.5% 茚三酮-丙酮溶液检测。

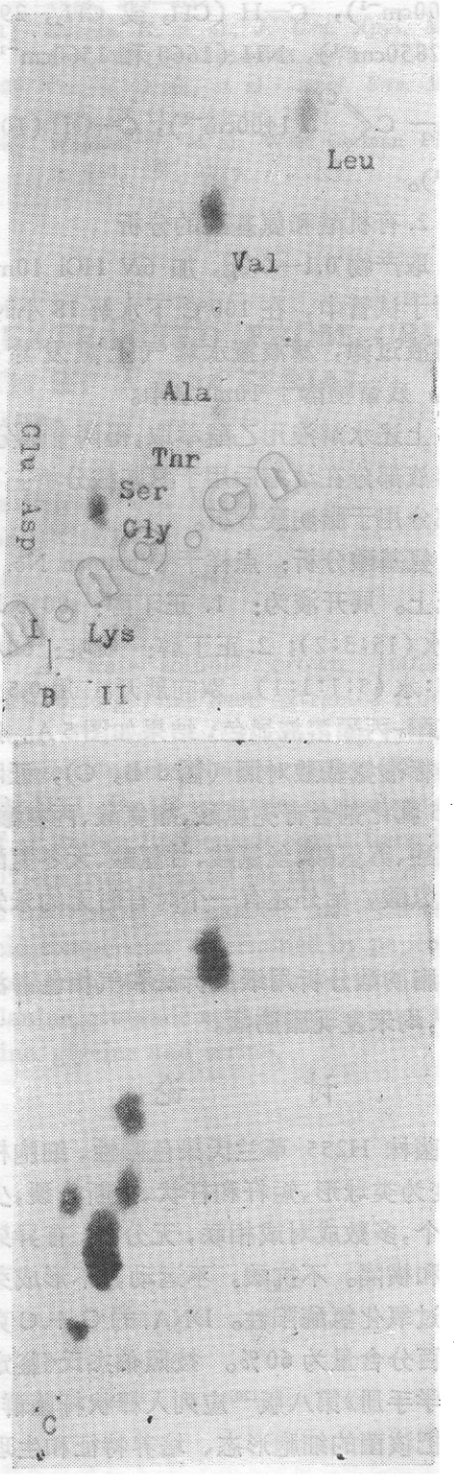
Fig. 5. Two-dimensional Paper Chromatographic Analysis of Amino acid Components of Emulsifier H255

Solvent: (1) n-butanol: 80% formic acid: water (15:3:2, W/W), 8h. (2) n-butanol: pyridine: 60% ethanol: Water (5:1:1:1, W/W, 6h. 25℃, detected with 0.5% ninhydrin-acetone solution.

A. 样品 Sample B. 标准 Standard

C. 样品+标准 Sample+Standard

谱 C1743 Lamepon 4BC（西德 Grunau 化工厂的乳化剂，一种蛋白浓缩物）以及已报道的几种微生物产生的乳化剂（肽



© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

脂)[11,18,19,22]的红外图谱相似。从图中可以看到有几个明显的吸收峰。这可能是由于产物中存在着下列基团[18]: OH, NH ($3400cm^{-1}$), C—H (CH_3 或 CH_2, 2940 和 $2850cm^{-1}$), NH (1660 和 $1560cm^{-1}$), $CH_3-C\langle^{O}$ ($1400cm^{-1}$), C—OH (1050 cm^{-1})。

2. 有机酸和氨基酸的分析

取产物 0.1—0.2g, 加 6*N* HCl 10ml, 密封于试管中, 在 100℃ 下水解 18 小时, 水解液过滤, 滤液置水蒸气上蒸发除去 HCl。残留物溶于 10ml 水中。

上述水解液用乙醚萃取,得两个部分: 水溶液部分在浓缩后用于氨基酸分析。乙醚部分用于脂肪酸分析。

氨基酸分析: 点样于 Whatman No. 1 滤纸上。展开液为: 1. 正丁醇: 80% 甲酸:水 (15:3:2); 2. 正丁醇: 吡啶: 60% 乙醇:水 (5:1:1:1), 双向展开。用 0.5% 茚三酮-丙酮溶液显色, 结果如图 5 A。通过与标准氨基酸对照 (图 5 B, C), 证明 H255 乳化剂含有亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、丝氨酸、甘氨酸、天冬氨酸和赖氨酸, 另外还有一个时有时无的未知斑点。

脂肪酸分析用纸层析法和气相色谱法进行,均未发现脂肪酸。

讨 论

菌株 H255 革兰氏染色阳性, 细胞杆状,变为类球形、短杆和杆状,折断分裂,少数单个,多数成对或相联, 无分枝, 有异染质粒和横隔。不抗酸, 不运动, 不形成芽孢。过氧化氢酶阳性。DNA 的 G + C 克分子百分含量为 60%。按照伯杰氏《鉴定细菌学手册》第八版[20]应列入棒状杆菌群。

把该菌的细胞形态、培养特征和生理生化特性与《手册》所列各种逐一进行比较,均有明显区别。在与已有记载但未列入《手册》的各个种进行比较时发现, H255 的绝大部分特征与 Kubata[21] 等所描述的喜甘氨酸棒杆菌是一致的, 只是后者能在 6% 甘氨酸的培养基中生长并从葡萄糖弱氧化产酸与 H255 不同。尽管如此, 我们认为可以把它们视为同一种。

至今, 微生物乳化剂的产生与利用烃类的能力密切地联系在一起。已报道的乳化剂包括糖脂[10,15]、肽脂[11,18,19,22]、磷酸脂[13]和中性脂[14]。菌株 H255 的产物既不含糖, 也不含脂肪酸, 而是一种由 9 种氨基酸组成的多肽, 其氨基酸组份也与已知的肽脂乳化剂的不同。鉴于微生物发酵原油产生乳化物质提高二次采油的研究已进入现场试验阶段[23], 这方面的研究应引起足够的注意。

参 考 文 献

[1] Zobell, C. E.: U. S. Patent, 2413278, 1946.

[2] Zobell, C. E.: *Oil Gas J.*, **46** (13): 62—65, 1947.

[3] Zobell, C. E.: *World Oil*, **126** (13): 36—47; **127** (1): 35—41, 1947.

[4] La Reviere, J. W. M.: *Antonie van Leeuwnhoeck*, **21**: 1—8; 9—27, 1955.

[5] Updegraff, D. M. and G. B. Wren: *Appl. Microbiol.*, **2**:309—322, 1954.

[6] Dostalek, M. and M. Spurny: *Cesk. Mikrobiol.*, **2**: 300—306; 307—317, 1957.

[7] Heyer, J. and W. Schwartz: Zeitsch. *f. Allg. Mikrobiol.*, **10** (8): 543—563; 565—588, 1970.

[8] Srivastava, S. P. et al.: *J. Appl. Chemistry*, **20** (4): 105—108, 1970.

[9] Mimura, A. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **49** (3): 255—271, 1971.

[10] Hisatsuka, K. I. and T. Nakahara: *Agr. Biol. Chem.*, **35** (5): 689—692, 1971.

[11] Iguchi T. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **33** (11): 1657—1658, 1969.

[12] Gerson, D. F. and J. E. Zajic: *Process Biochem.*, **14** (7): 20—22, 29, 1979.

[13] Beebe, T. L. and W. W. Umbreit. *J.*

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Bacteriol., **108**: 612—614, 1971.
[14] Makula, R. A. et al.: ibid, **121**: 250—258, 1975.
[15] Suzuki, T. et al.: *Agr. Biol. Chem.* **33**: 1619—1627, 1969.
[16] 中国科学院微生物研究所细菌组：《一般细菌常用鉴定方法》，科学出版社，北京，1978.
[17] 王修垣等：微生物学报，**20** (4): 343—348, 1980.
[18] Zajic, J. E. and E. Knetting: *Develop. in Industrial Microbiol.*, **12**: 87—98, 1971.
[19] Arima, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31** (3): 488—494, 1968.
[20] Buchanan, R. E., et al.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins Comp., Baltimore, 1974, 599—632.
[21] Kubata, K. et al., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18** (5): 365—375, 1972.
[22] Cooper, D. G., et al.: *Appl. Env. Microbial.*, **37** (1): 4—10, 1979.
[23] Wagner, F., et al.. West German Patent, 2, 410, 267, 1976.

ANALYSES OF AN EMULSIFIER EXTRACTED FROM CRUDE OIL FERMENTATION BROTH BY A BACTERIAL STRAIN H255

Wang Xiuyuan　Tian Xinyu　Su Peiran　Liu Xiufang
Cui Wenhua　Wang Xianji
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A strain of bacterium H255 producing a stable emulsion during the crude oil fermentation has been isolated from oil-contaminated soil at Lanzhu Refinery. The organism is Gram-positive, non-sporulating, umbranched, non-motile, and non-acid fast rods. The G +C content of DNA determined in SSC-system is 60.0 mol.%. According to its cell morpohology, cultural characteristics, physiological and biochemical properties the bacterium is identified with *Corynebacterium glycinophilum*.

A water-soluble brown emulsifier 0.15—0.24 g/l has been extracted from the crude oil fermentation broth by cation exchange column chromatography (Huadong 122 H^+). Its IR spectrum is similar to that of all known lipopeptide emulsifiers, but it differs from them by the lack of fatty acid. It contains no saccharide too. Its amino-acid components determined by paperchromatography are Leucine, lysine, valine, alanine, glutamic acid, aspartic acid, threonine, glycine and serine.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn