

# 假单胞菌 L-11 产生生物表面活性剂发酵条件的优化

李清心 康从宝 王 浩 张长铠

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘 要:** 确定了假单胞菌 L-11 用葡萄糖为底物产生生物表面活性剂的最适发酵培养基组成和发酵条件。在 1L 的发酵罐中, L-11 的发酵液 (10%) 与原油的界面张力可以达到  $5.3 \times 10^{-3} \text{ mN/m}$ 。该产品可以用于微生物提高原油采收率的实验研究。对其放大工艺也进行了初步的研究。

**关键词:** 假单胞菌, 生物表面活性剂, 界面张力

**中图分类号:** Q939. 9    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0021-05

## OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR FERMENTATION OF BIOSURFACTANT PRODUCED BY *PSEUDOMONAS* SP. L-11

LI Qing-Xin KANG Cong-Bao WANG Hao ZHANG Chang-Kai

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract:** A strain of *Pseudomonas* sp. L-11 could produce biosurfactants by use of glucose as substrate. The fermentation conditions in shaking flask and 1L fermentor were investigated. The optimal medium and the fermentation technology were demonstrated. In 1L fermentor, the interfacial tension between the diluent of L-11 (10%) and crude oil is  $5.3 \times 10^{-3} \text{ mN/m}$ , which is fit for microbial enhanced oil recovery. The scale-up technology of L-11 was also studied.

**Key words:** *Pseudomonas*, Biosurfactants, Interfacial Tension

收稿日期: 2000-12-28, 修回日期: 2001-02-27

在二次采油后, 仍有大约 40% 的原油滞留于地下, 有待于用新技术进一步开采<sup>[1]</sup>。用微生物进行 3 次采油经过半个多世纪的研究和试验, 证明其在应用上是可行的<sup>[2]</sup>。

生物表面活性剂是微生物在生长过程中产生的能够降低油与岩石的亲合力、促进油水乳化的一类两亲性物质, 包括脂肪酸、糖脂、胞外蛋白、微生物菌体本身等<sup>[3,4]</sup>。生物表面活性剂在微生物采油中有很好的应用前景, 既可通过驱油作用使原油增产, 也可以作为防蜡剂防止蜡的凝结, 减少洗井次数, 延长采油周期。

原油从岩砂表面脱落、随水运移到地层毛细管喉道时, 原油滴会发生变形, 产生附加压力。其附加压力可通过 Laplace 方程算得:  $\Delta P = P_1 - P_2 = 2\delta (1/R_1 - 1/R_2)$ 。式中:  $\delta$  为油水界面张力,  $R_1$  为毛细管喉道细端半径,  $R_2$  为毛细管粗端半径。由公式可以看出,  $\Delta P$  越小即  $\delta$  越小, 原油滴就越容易变形, 越容易穿过毛细管道而被水运走, 从而提高水的运移效率, 提高原油采收率。所以, 在进行生物表面活性剂的效果评价时, 我们以生物表面活性剂的油水界面张力 (IFT) 的大小来衡量<sup>[5]</sup>。

我们筛选到一株能产生生物表面活性剂的菌株 L-11, 对其产生物表面活性剂的发酵条件进行了优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种来源: 分离于大庆油田油层水中的假单胞菌 L-11 (*Pseudomonas* sp. L-11)。

1.1.2 种子培养基: 葡萄糖 10g, 牛肉膏 2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.005g, pH7.2, 定容至 1L。

1.1.3 发酵培养基: 葡萄糖 20g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.005g, pH7.2, 定容至 1L。

1.1.4 实验仪器: 美国产 TEXAS-500 界面张力仪, 日本产 UV-240 紫外可见分光光度计, 培养箱, 1L 自控发酵罐, 上海产 pH 计, 100L 发酵罐。

### 1.2 方法

1.2.1 生物表面活性剂的检测: 将发酵液用 8 层纱布过滤, 再用蒸馏水稀释 10 倍, 用美国 TEXAS-500 型界面张力仪测发酵液稀释液与原油之间的 IFT 值。

1.2.2 葡萄糖的测定: 按文献 [6] 所述方法测定, 发酵液 pH 值的测定, 用 pH 计测定。

1.2.3 菌体浓度的测定<sup>[7]</sup>: 取一定量培养液经 6,000r/min 离心 20min 后, 用蒸馏水洗涤 2 次, 加等量蒸馏水制成菌悬液, 再将其稀释 100 倍。用分光光度计于 660nm 处测定稀释液的 OD 值, 作标准曲线, 依此测得发酵液中菌体浓度。

1.2.4 培养条件: 500mL 三角瓶中装入 200mL 发酵培养基, 于 30℃ 180r/min 摇床上培养。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵培养基的确定

在发酵过程中, 培养基的选择是一个很关键的因素。合适的培养基既会使发酵液有较低的 IFT, 又可缩短发酵周期, 从而降低生产成本。

2.1.1 碳源: 发酵培养基中选用不同的糖类做为碳源, 浓度为 30g/L。在不同碳源的培养基中, L-11 发酵液的油水界面张力有明显的差别, 结果见表 1。用葡萄糖作为碳源

时, IFT 值最小。

**2.1.2 氮源:** 发酵培养基中, 以 30g/L 的葡萄糖为碳源, 选用不同的氮源, 浓度为 0.3%。接种后, 每隔 2h 取样, 检测发酵液与油之间的界面张力, 结果见表 2。以蛋白胨作为氮源时, 油水界面张力值最低, 而且能缩短 L-11 的发酵周期。

表 1 不同碳源对 IFT 的影响

| 碳源  | IFT (mN/m)           | 发酵周期 (h) |
|-----|----------------------|----------|
| 葡萄糖 | $1.6 \times 10^{-2}$ | 36       |
| 蔗糖  | $5.6 \times 10^{-2}$ | 40       |
| 淀粉  | $8.9 \times 10^{-2}$ | 46       |
| 玉米浆 | $3.0 \times 10^{-2}$ | 38       |
| 麸皮  | $3.6 \times 10^{-2}$ | 36       |

表 2 不同氮源对 IFT 的影响

| 氮源                              | IFT (mN/m)           | 发酵周期 (h) |
|---------------------------------|----------------------|----------|
| 牛肉膏                             | $2.5 \times 10^{-2}$ | 38       |
| 蛋白胨                             | $1.0 \times 10^{-2}$ | 34       |
| NH <sub>4</sub> Cl              | $6.0 \times 10^{-2}$ | 40       |
| 硫酸铵                             | $1.6 \times 10^{-2}$ | 36       |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | $5.2 \times 10^{-2}$ | 42       |
| 尿素                              | $4.5 \times 10^{-2}$ | 48       |

**2.1.3 初始 pH:** 发酵培养基以 3% 葡萄糖为碳源, 0.3% 蛋白胨为氮源。灭菌后, 用灭菌的 NaOH 和 HCl 将发酵液的初始 pH 分别调为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。接种培养后, 每隔 2h 取样, 测 IFT 值。结果发现, 以初始 pH 为 7.0 时 IFT 值最小, 但 pH 的变化不影响发酵周期。

**2.1.4 各组分的优化:** 用正交试验法确定了培养基中各组分的比例: 葡萄糖 50g, 蛋白胨 6g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, MgSO<sub>4</sub> 0.5g, CaCl<sub>2</sub> 0.005g, pH7.0, 定容至 1L。培养温度为 30℃。

2.2 在 1L 发酵罐中发酵时主要参数的变化

在用 L-11 生产生物表面活性剂时监测各种参数, 如 pH、菌体浓度、残糖浓度及发酵液的 IFT 值, 作为以后研究补料和供氧控制的基础。我们先在 1L 发酵罐中做了如下实验: 计料体积为 0.6, 装液量为 0.4。灭菌后, 用灭菌的 NaOH 将 pH 调至 7.0。接种量为 10%, 培养温度为 30℃, 通气量为 0.2m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>/h, 搅拌转速 200r/mim。在接种培养 12h 后, 开始取样测 IFT 值, 图 1 和图 2 是以上参数的变化曲线。从图 1 中可以看出, 溶氧对 IFT 的影响不大, 因为从 IFT 最小到开始增大时, DO 变化不大。但从图 2 可以看出, 随着 pH 值的下降 IFT 值逐渐变小, 在 pH 值为 4.2 时, IFT 达到最小值, 为  $9.2 \times 10^{-3}$  mN/m。因此, 在 pH 值降至 4.2 时补入 NaOH, 维持发酵液的 pH 在 4.2, 希望能使 IFT 值继续减小。

2.3 用 NaOH 调节 pH 时, 发酵液中各参数的变化

从图 3 可以看出, pH 的稳定使 IFT 有了一定的好转, 但随着葡萄糖浓度的降低, 又使 IFT 值有所回升。这可能是发酵液维持了稳定的 pH 后, 葡萄糖的消耗加快, 发酵液中葡萄糖的浓度过低, 影响了生物表面活性物质的积累。所以, 我们采用在调节 pH 值的同时补入葡萄糖, 以维持葡萄糖浓度在 0.6% 左右。

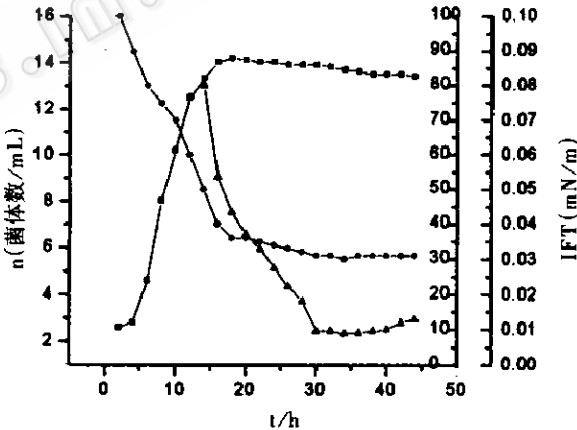


图 1 发酵过程中 DO 的变化  
—■—ln(细菌数/mL), —▲—IFT(mN/m), —●—DO

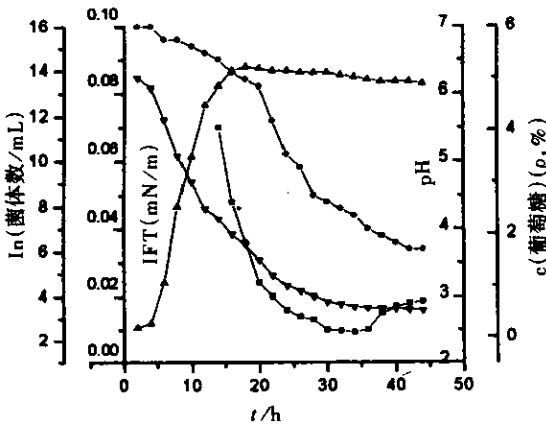


图2 发酵过程中其它参数的变化

—△—葡萄糖浓度, —■—IFT(mN/m),  
—▲—ln(细菌数/mL), —●—pH

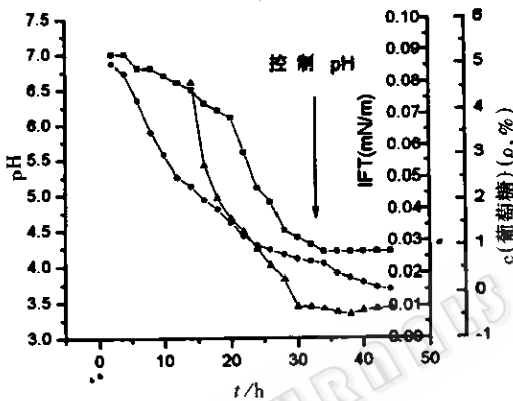


图3 调节 pH 时各参数的变化

—●—葡萄糖浓度, —▲—IFT(mN/m), —■—pH

## 2.4 补入葡萄糖和调节发酵液 pH 后的 IFT 变化

在这种情况下得到的实验结果见图 4。发酵液的 IFT 值可以达到  $5.3 \times 10^{-3}$  mN/m。虽然发酵周期有所延长,但发酵的 IFT 值却有所下降。这样得到的发酵液可以作为微生物采油中的驱油剂或是油田中的防蜡剂。

## 2.5 大罐发酵实验

采用以上实验得到的发酵工艺,以单位体积的通气量不变在 100L 罐中进行了放大<sup>[8]</sup>。实验结果达到了 1L 罐的发酵水平,证明该发酵工艺是符合实际生产应用的。

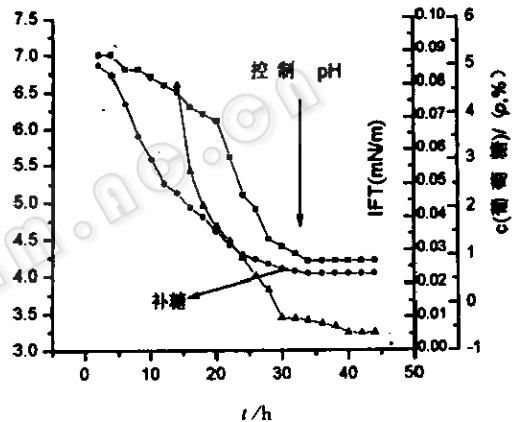


图4 补糖和调节 pH 后 IFT 的变化曲线

—●—葡萄糖浓度, —▲—IFT(mN/m), —■—pH

## 3 结论

用补料和控制发酵液 pH 的方法,使 L-11 发酵液的 IFT 值符合油田应用的标准。若将其应用于微生物提高原油采收率的矿场试验中,将会取得很好的效果。但是还存在尚需解决的问题:一是在放大培养时,如果选用更大容量的发酵罐,还应考虑其它的放大原则<sup>[9]</sup>;二是 L-11 产生的是何种类型的生物表面活性剂,还有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] 金静芷,王修垣,秦同洛译.微生物提高石油采收率.北京:石油工业出版社,1995,1~7.
- [2] 李虞庚,冯世功编译.石油微生物学.上海:上海交通大学出版社,1991,364~435.
- [3] 方云,夏咏梅编译.生物表面活性剂.北京:中国轻工出版社,1990,3~6.
- [4] Banat I M, Makkon R S, Cameotra S S. Appl Microbiol Biotechnol. 2000, 53 (5): 495~508.
- [5] 康万利,董喜贵.三次采油化学原理.北京:化学工业出版社,1997,7: 66.
- [6] 刘勇,张长锐,曹光宇,等.工业微生物,2000,30 (2): 26~29.
- [7] 李强,陈惠晴,曹竹安.微生物学通报,1997,24 (6): 376~378.
- [8] 俞俊棠,唐孝宣主编.生物工艺学.上海:华东化工出版社,1994,133~134.
- [9] 杨丽,王莲芬.微生物学通报,2000,27 (5): 356~360.