

生物破乳菌 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 氮源利用特性

黄翔峰^{1,2}, 倪晓静^{1,2}, 刘佳^{1,2}, 陆丽君^{1,2}

(1. 同济大学环境科学与工程学院, 上海 200092; 2. 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 以六种氨基酸及硝酸铵为氮源培养胞壁结合型生物破乳剂产生菌 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1, 进而分析菌体对谷氨酸和硝酸铵的利用过程, 并建立菌体的生长及氮源利用模型。结果表明: 氮源种类和投量是影响菌体产量和性能的重要因素; 菌体对氮源的利用顺序依次为有机氮、氨态氮、硝态氮; 谷氨酸为氮源时对生物破乳菌产量的促进效果最佳, 相比于硝酸铵为氮源时, 菌体最大比增长速率和产率系数更高, 用于菌体代谢供能的氮源消耗量更低。

关键词: *Alcaligenes* sp.; 氨基酸; 氮源; 生物破乳菌

中图分类号: Q939.97; TQ423

文献标志码: A

Characteristics of Nitrogen Source Utilization for Biodemulsifying Strain of *Alcaligenes* sp. S-XJ-1

HUANG Xiangfeng^{1,2}, NI Xiaojing^{1,2}, LIU Jia^{1,2}, LU Lijun^{1,2}

(1. College of Environmental Science & Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Six amino acids and ammonium nitrate were tested to study the effects of nitrogen source on the growth of cell-bound biodemulsifying strain of *Alcaligenes* sp. S-XJ-1. And then the utilization process of nitrogen source was studied when glutamic and ammonium nitrate was separately used as nitrogen source. The growth model and nitrogen utilization model of S-XJ-1 were built up as well. The results show that S-XJ-1 prefers to use organic nitrogen when organic nitrogen and ammonium nitrogen coexist in the substrate, and ammonium nitrogen is preferred rather than nitrate nitrogen. Also, the yield and property of biodemulsifying bacteria were significantly affected by the variety of nitrogen source, and glutamic is testified to be the best nitrogen source for S-XJ-1

among the six amino acids. When glutamic is used as nitrogen source, S-XJ-1 exhibits a higher maximum specific microbial incremental rate and utilization ratio of nitrogen source, but a lower energy cost.

Key words: *Alcaligenes* sp.; amino acid; nitrogen source; demulsifying strain

生物表面活性剂种类繁多, 从其功能来看生物破乳剂是其中重要的一类物质。生物破乳剂主要通过微生物代谢过程或代谢产物实现乳状液的破乳, 除了具有低毒、环境友好等特点之外, 还对环境温度、pH、盐度的变化有着良好的适应性, 在石油工业和环境领域中的应用前景广阔^[1-3]。通过优化培养基的组分及配比、改善培养环境、投加金属离子^[4-6]等方式来提高生物表面活性剂的产量和效能, 是近年来研究的热点之一, 其中培养基组成及配比的优化是生物表面活性剂增产、增效研究中最主要的一个方面。现阶段研究表明, 作为培养基中重要组分之一的氮源, 对生物表面活性剂的合成有着较大的影响。

用于生物表面活性剂合成的氮源分为无机氮源和有机氮源两类, 其中无机氮源主要包括硝态氮和氨态氮。对于无机氮源的研究主要有氮源种类、投量和投加方式的优化以及氮源利用过程^[7-8]对生物表面活性剂合成的影响。尿素、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、豆粉^[9]等是用于培养基优化的最常用的有机氮源。然而, 目前对于有机氮源的研究还仅限于氮源种类及投量的优化^[10], 对于氮源的利用过程未见研究, 这主要是由于此类有机氮源的成分过于复杂。氨基酸是牛肉膏、蛋白胨、酵母浸出汁的重要成分, 也是尿素合成的前体物质, 以氨基酸为氮源培养生物表面活性剂产生菌以及监测培养过程中氮源的利用转化过程, 对于揭示有机氮源促进生物表面活性剂合

收稿日期: 2012-08-02

基金项目: 国家自然科学基金(51108333, 50908166); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-10-0629); 中央高校基本科研业务费专项资金

第一作者: 黄翔峰(1974—), 男, 教授, 博士生导师, 工学博士, 主要研究方向为水体污染控制与环境微生物。E-mail: hxf@tongji.edu.cn

通讯作者: 陆丽君(1982—), 女, 讲师, 硕士, 主要研究方向为水体污染控制与环境微生物。E-mail: lulijun@tongji.edu.cn

成的机理和扩展其他廉价有机氮源应用于生物表面活性剂合成的途径有着重要的意义。

本文以石油污染土壤中筛得的一株胞壁结合型生物破乳菌 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 为研究对象,研究氨基酸对胞壁结合型生物破乳菌产量和性能的影响,并通过对比谷氨酸和硝酸铵两种氮源培养条件下培养基中氮源利用和转化过程的监测,以及菌体动力学模型和底物利用模型的建立,分析菌体对氮源的利用特性和谷氨酸培养促进胞壁结合型生物破乳菌生长的原因。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养基

菌种: *Alcaligenes* sp. S-XJ-1, 筛自新疆克拉玛依油田受石油污染土壤, 菌株的筛选、鉴定见文献[11]。

种子培养基组分见文献[11]。

基础培养基: K_2HPO_4 , $4.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; KH_2PO_4 , $6.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $0.2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; EDTA, $1.4\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 质量分数为 2.5% 的 NaCl, 待组分完全溶解后, 调节 pH 值至 9.0, 并加入体积分数为 4% 的液体石蜡。

硝酸铵培养基: 在基础培养基中分别加入不同浓度的 NH_4NO_3 , 氮元素浓度为 $0.05, 0.10\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其余培养基组分及投加量不变, 待组分完全溶解后, 调节 pH 值至 9.0。

氨基酸培养基: 在基础培养基中分别添加不同种类的氨基酸, 氮元素浓度为 $0.05, 0.10\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其余培养基组分及投加量不变, 待组分完全溶解后, 调节 pH 值至 9.0。所选氨基酸种类为: 谷氨酸(Glu)、丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、天门冬氨酸(Asp)、缬氨酸(Val)、丝氨酸(Ser)。

1.2 菌种培养

以 250 mL 摇瓶分装 100 mL 培养基, $120\text{ }^\circ\text{C}$ 高压蒸气灭菌 20 min ($1 \times 10^5\text{ Pa}$), 冷却至室温后, 向硝酸铵培养基/氨基酸培养基中接入体积分数为 10% 的种子培养液, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $130\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下摇床恒温培养 7 d。

1.3 生物破乳菌产量测定

100 mL 全培养液经分液漏斗静置分层后, 得到富含菌体的上层石蜡相与下层无菌培养液, 将石蜡相在 $12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 10 min 得到菌

体, 以正己烷洗去附着于菌体表面的残余石蜡后, 再在 $12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 10 min, 将离心所得物冷冻干燥 24 h, 得菌体干粉, 称重后计算生物破乳菌产量, 以 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 计。

1.4 破乳性能测定

将菌体干粉加蒸馏水配成浓度为 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的菌悬液用于破乳实验, 采用的模型乳状液为 W/O 型, 具体配制方法参照文献[12]。破乳实验采用瓶试法[13]: 在 20 mL 具塞刻度试管内加入 18 mL 乳状液和 2 mL 破乳菌溶液, 手摇 120 次, 置于 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中, 定时读取脱出油和脱出水的体积, 计算破乳 24 h 破乳率、脱水率及脱油率, 综合表达菌体破乳性能。具体计算公式如下:

$$\begin{aligned} \text{破乳率} &= \left(1 - \frac{\text{剩余乳状液体积}}{\text{乳状液体积} + \text{菌悬液投加体积}}\right) \times 100\% \\ \text{脱水率} &= \frac{\text{脱出水的体积}}{\text{乳状液中水的体积} + \text{菌悬液投加体积}} \times 100\% \\ \text{脱油率} &= \frac{\text{脱出油的体积}}{\text{乳状液中油的体积}} \times 100\% \end{aligned}$$

1.5 不同形态氮含量测定

清液中氨基酸含量测定: 采用异硫氰酸苯酯衍生化-HPLC 法测定 (Agilent 1200), 所用色谱柱为 Kromasil C18 柱 ($4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$), 衍生方法及样品测试条件详见文献[14]。

清液中氨氮、硝态氮、亚硝态氮含量测定: 分别采用蒸馏法[15]、紫外分光光度法[15]、N-(1-萘基)-乙二胺光度法[15]测定。

以上氮含量统一以 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 计。

1.6 分析方法

依据 Logistic 方程和 Luedeking-Piret 方程建立 S-XJ-1 菌的生长及氮源利用模型, 以 Origin 8.0 软件拟合动力学曲线。

2 结果与讨论

2.1 不同氮源种类对生物破乳菌 S-XJ-1 的影响

六种氨基酸和硝酸铵在不同投加量下所得的生物破乳菌产量如图 1 所示。由图 1 可见, 培养基中氮元素浓度为 $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 谷氨酸(Glu)、精氨酸(Arg)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)均可促进生物破乳菌产量的提高, 其中谷氨酸(Glu)培养效果最佳, 所得菌体产量为 $3.218\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 是硝酸铵培养基的 2.5 倍。提高培养基中氮元素浓度至 $0.10\text{ mol} \cdot$

L^{-1} 时,不同氨基酸对生物破乳菌产量的促进作用发生明显变化,丝氨酸(Ser)培养条件下,生物破乳菌产量较硝酸铵培养基提高了43%。不同氨基酸培养效果的差异性在其他研究中也有体现:Lotfabad等^[10]在培养基中分别加入 $12\text{ g} \cdot L^{-1}$ 四种不同氨基酸培养 *Pseudomonas aeruginosa* MR01 时发现,仅亮氨酸可促进生物表面活性剂产量的增加。

将 $0.05\text{ mol} \cdot L^{-1}$ 氮元素浓度培养条件下,不同氮源培养所得的生物破乳菌菌体配成 $10\text{ g} \cdot L^{-1}$ 菌悬液进行破乳实验,结果如图2所示。不同种类氨基酸培养所得菌体对W/O型模型乳状液的24 h破乳率基本保持在80%左右。谷氨酸(Glu)、缬氨酸(Val)培养所得菌体对模型乳状液的水、油相脱出率略高于硝酸铵培养所得菌体,丙氨酸(Ala)培养时,菌体对模型乳状液的油相脱出率提高。不同种类的氨基酸影响S-XJ-1菌破乳性能的原因可能与氨基酸的自身性质有关。不同氨基酸的亲疏水性不同,菌体在利用氨基酸进行物质合成时,其表面性质发生变化,而菌体细胞的某些表面性质又与破乳性能相关^[16],因而导致了一些氨基酸培养条件下生物破乳菌对模型乳状液脱水性能的提高,或者脱油性能的

改善。六种氨基酸中谷氨酸为氮源时生物破乳菌产量最高,且破乳性能稳定,因此下文以有机氮源谷氨酸与无机氮源硝酸铵为研究对象,重点分析两者在生物破乳菌产量、氮素转化及生物破乳菌动力学方面的差异。

2.2 不同氮元素浓度谷氨酸和硝酸铵对生物破乳菌S-XJ-1的影响

不同氮元素浓度的谷氨酸和硝酸铵培养基所得的菌体产量如图3所示。由图3可见,硝酸铵培养条件下,生物破乳菌产量随着氮元素浓度的增加而增加;谷氨酸作氮源时,生物破乳菌产量呈现先增加后降低的趋势。在 $0 \sim 0.07\text{ mol} \cdot L^{-1}$ 范围内,等氮浓度培养条件下,谷氨酸作氮源更有利于生物破乳菌的合成。谷氨酸培养条件下,培养基中的氮元素浓度为 $0.03\text{ mol} \cdot L^{-1}$ 时,生物破乳菌产量最高,为 $3.549\text{ g} \cdot L^{-1}$,在较高氮元素浓度($0.10\text{ mol} \cdot L^{-1}$)培养条件下,菌体的生长受到明显抑制,生物破乳菌产量仅为最高产量的10%。氨基酸浓度过高对菌体物质合成的抑制作用在其他研究中也有体现:Sandrin等^[17]以 $5\text{ g} \cdot L^{-1}$ 不同种类的氨基酸作氮源培养 *Bacillus subtilis* S499 时发现,仅丙氨酸、谷氨酸和缬氨酸可以促进生物表面活性剂产量的增加。

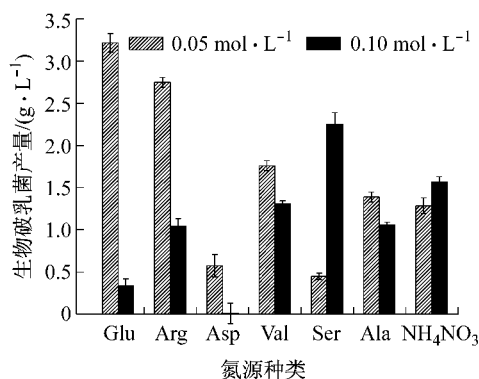


图1 不同氮源种类对生物破乳菌S-XJ-1产量的影响

Fig.1 Effects of nitrogen source on yield of S-XJ-1

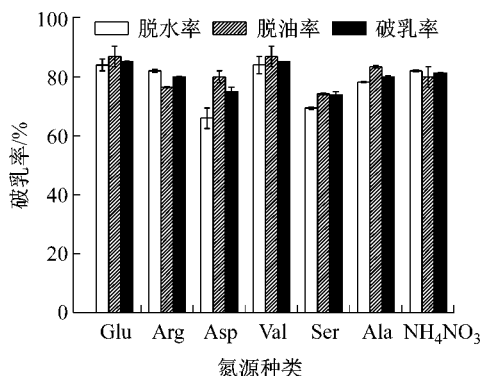


图2 不同氮源种类对生物破乳菌S-XJ-1破乳性能的影响

Fig.2 Effects of nitrogen source on demulsification ratio of S-XJ-1

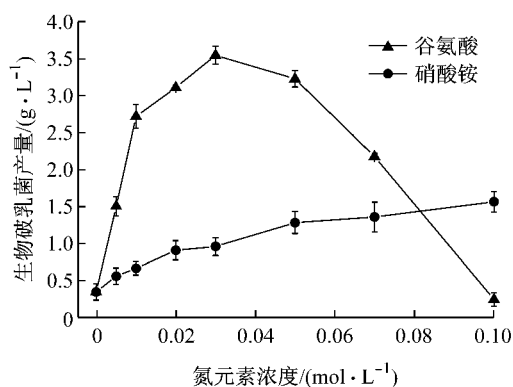


图3 氮元素浓度对生物破乳菌S-XJ-1产量的影响

Fig.3 Effects of nitrogen concentration on yield of S-XJ-1

不同浓度的硝酸铵和谷氨酸对生物破乳菌S-XJ-1破乳性能的影响如图4所示。由图4可知,硝酸铵作氮源时,在 $0 \sim 0.10\text{ mol} \cdot L^{-1}$ 氮元素浓度范围内,菌体破乳性能稳定,24 h的破乳率、脱水率和脱油率分别保持在81%、80%、83%左右。谷氨酸作氮源时,在 $0 \sim 0.07\text{ mol} \cdot L^{-1}$ 氮元素浓度范围内,菌体对模型乳状液的24 h破乳率、脱水率和脱油率分别保持在85%、85%、86%左右,当氮元素浓度增加至 $0.10\text{ mol} \cdot L^{-1}$ 时,菌体的破乳活性受到明显抑

制,24 h 破乳率仅为 33%。*Alcaligenes* sp. S-XJ-1 是一株以微生物细胞破乳为主的胞壁结合型生物破乳菌^[18],在作用于 W/O 型模型乳状液时,主要通过发挥其表面活性、降低油水界面张力和改变油水界面性质,实现乳状液的油水分离^[19]。谷氨酸培养条件下,生物破乳菌破乳性能的改善,可能是由于菌体的表面活性得到增强;过高的谷氨酸浓度对菌体破乳性能的抑制作用,有待于进一步研究。

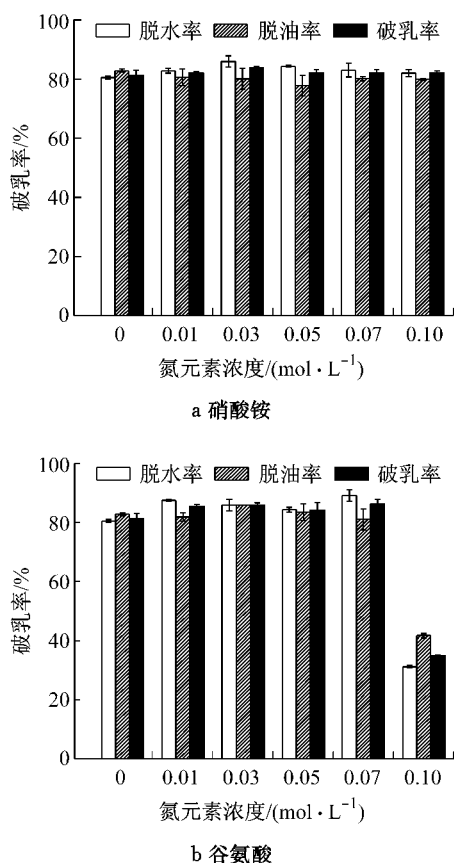


图4 氮元素浓度对生物破乳菌 S-XJ-1 破乳性能的影响

Fig.4 Effects of nitrogen concentration on demulsification ratio of S-XJ-1

2.3 谷氨酸和硝酸铵培养条件下氮素转化情况

分别对谷氨酸和硝酸铵培养条件下培养基中的氮素转化情况进行监测,结果如图5所示。由图可见,两种氮源培养条件下,S-XJ-1 菌对氮源的利用情况差异很大。以硝酸铵作为氮源时(初始氮元素浓度为 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),菌体仅利用氨态氮,硝态氮的质量浓度基本保持恒定,亚硝态氮含量几近为零(见图5a)。以谷氨酸作为氮源时(初始氮元素浓度为 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),在培养周期的1~2 d内,谷氨酸即发生完全的分解/转化,清液中的谷氨酸转化为其他形式的有机氮;在培养周期的2~5 d,处于对数增长期的菌体代谢活动增强,清液中的有机氮浓度大

幅降低,同时在菌体新陈代谢过程中,经脱氨基作用生成的氨态氮浓度逐渐升高。由此可见,在有机氮与氨态氮同时存在的情况下,菌体主要利用有机氮;清液中的硝态氮主要来自于培养初期接入的种子培养液,整个培养周期中硝态氮含量稳定,亚硝态氮几近于零(见图5b)。

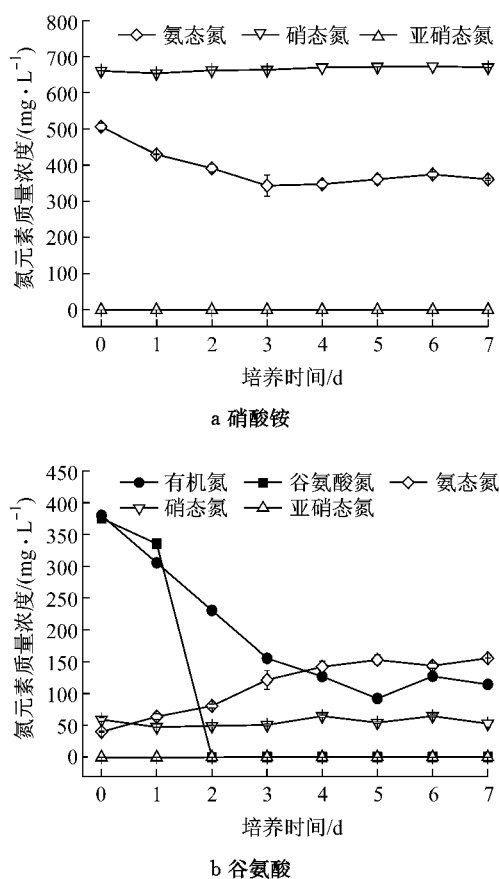


图5 培养周期中氮素利用特性

Fig.5 Characteristics of nitrogen utilization during the cultivation cycle

菌体对氮的利用途径与谷氨酸和谷氨酰胺密切相关,培养基中的氮一方面可在谷氨酸脱氢酶的催化下,还原 α -酮戊二酸,氨化为谷氨酸为菌体利用,另一方面在谷氨酰胺合成酶的作用下与谷氨酸结合,成为谷氨酰胺形式的有机氮为菌体利用。此外,谷氨酰胺与谷氨酸还可在谷氨酰胺合成酶和谷氨酰胺合成酶的催化作用下相互转化^[20]。谷氨酸作氮源条件下,菌体可以经过主动运输作用吸收谷氨酸,并将其直接用于精氨酸、嘧啶等含氮物质的合成^[21],提高了菌体细胞的合成速率。同时,谷氨酸还可与菌体新陈代谢过程中经脱氨基作用生成的一部分氨结合,成为谷氨酰胺为菌体利用,提高了菌体对氮源的利用率。因此,以谷氨酸作氮源,促进了生物破乳菌产量的提高。

2.4 谷氨酸和硝酸铵培养条件下生物破乳菌动力学研究

在菌体的动力学研究中发现, Logistic^[22] 和 Luedeking-Piret 方程^[23] 可以很好地反映发酵过程中微生物的生长和底物利用情况. 本文分别以 Logistic 方程和 Luedeking-Piret 方程建立 S-XJ-1 菌的生长动力学模型和培养液中总氮的消耗模型, 两者的方程形式如下:

$$dM_X = \mu_m \left(1 - \frac{M_X}{M_{X,\max}}\right) M_X \quad (1)$$

$$-\frac{dS_X}{dt} = \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dM_X}{dM_t} + K_e M_X \quad (2)$$

对式(1)积分得

$$M_X(t) = \frac{M_{X,0} \exp(\mu_m t)}{1 - \{M_{X,0}/M_{X,\max} [1 - \exp(\mu_m t)]\}} \quad (3)$$

将式(3)带入式(2), 积分得

$$S(t) = S_0 - \frac{1}{Y_{P/S}} [M_X(t) - M_{X,0}] - K_e \frac{M_{X,\max}}{\mu_m} \ln \left\{ 1 - \frac{M_{X,0}}{M_{X,\max}} [1 - \exp(\mu_m t)] \right\} \quad (4)$$

式中: μ_m 为 S-XJ-1 菌最大比增长速率, h^{-1} ; $M_{X,0}$ 为 S-XJ-1 菌初始质量浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; $M_{X,\max}$ 为 S-XJ-1 菌最大质量浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; t 为时间, d ; S_X 为培养基中氮元素质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; S_0 为培养基中初始氮元素质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $Y_{P/S}$ 为消耗 1 g 基质所得的菌体量, g ; M_X 为 S-XJ-1 菌质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; K_e 为细胞维持系数.

以式(3)和(4)为自定义函数, 用 Origin 8.0 软件进行非线性拟合, 模型和实验数据拟合良好, 相关系数、拟合曲线及模型参数如图 6, 7 和表 1 所示.

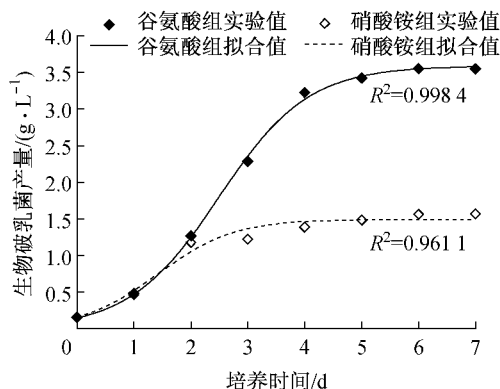


图 6 不同氮源培养条件下 S-XJ-1 菌生长模型

Fig. 6 Comparison of growth model of S-XJ-1 cultivated by different nitrogen sources

结果表明, 两种氮源培养条件下, 菌体的生长及底物利用情况差异较大. 谷氨酸培养条件下, S-XJ-1

菌的最大比增长速率 μ_m 是硝酸铵培养条件下的 1.1 倍; 在消耗等量氮源条件下, 谷氨酸培养所得破乳菌产量远高于硝酸铵培养, $Y_{P/S}$ 值为后者的 2.1 倍. K_e 值反映了用于供给细胞新陈代谢所需能量的氮源消耗情况, 谷氨酸培养条件下, 用于菌体代谢供能的氮源消耗量约为硝酸铵培养的 84%.

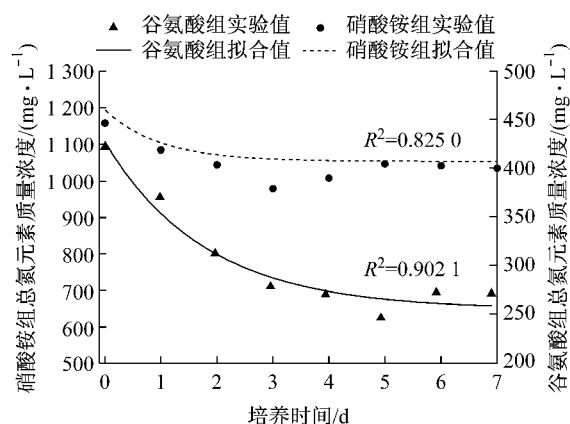


图 7 不同氮源培养条件下 S-XJ-1 氮源利用模型

Fig. 7 Comparison of nitrogen utilization model of S-XJ-1 cultivated by different nitrogen sources

表 1 不同氮源培养下模型参数对比

Tab. 1 Comparison of the obtained model parameters for the demulsifying strain cultivated by different nitrogen sources

氮源	μ_m	$Y_{P/S}$	K_e
Glu	1.376	0.023 6	2.646
NH_4NO_3	1.256	0.011 5	3.146

谷氨酸是合成精氨酸、嘧啶等含氮物质的前体, 可直接用于菌体所需的氨基酸等含氮物质的合成, 以谷氨酸作氮源, 提升了氮源利用效率的同时, 也节省了一部分能量的消耗, 因此, 相比硝酸铵培养, 谷氨酸培养条件下 $Y_{P/S}$ 值更高, K_e 值更低. 此外, 谷氨酸在菌体细胞内氨的同化过程中也起着重要的作用, 谷氨酸作氮源有利于菌体对氨的吸收利用, 这也是提高菌体生长速率的重要原因. 由此可见, 与硝酸铵相比, 以谷氨酸作为氮源对生物破乳菌进行培养, 菌体的生长速率更快, 对氮源的利用率更高, 更适合破乳菌 S-XJ-1 的生长.

3 结论

(1) 氨基酸的种类和投加量是影响生物破乳菌 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 产量和性能的重要因素, 在 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氮元素浓度下, 谷氨酸、精氨酸、缬氨酸、丙氨酸均可促进生物破乳菌的生长, 其中谷氨

酸培养效果最佳。

(2) $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸铵氮培养条件下, 菌体首先利用氨态氮; 以 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸氮作氮源时, 在培养周期的第二天即发生完全的转化/分解, 成为其他形式的有机氮为菌体利用, 在有机氮与氨态氮同时存在的条件下, 菌体优先利用有机氮。

(3) 谷氨酸培养条件下, 生物破乳菌 S-XJ-1 的最大比增长速率是硝酸铵培养的 1.1 倍, 在消耗等量氮元素浓度条件下, 所得菌体产量更高的同时, 用于菌体代谢供能的氮源消耗量更低。

参考文献:

- [1] Banat I M, Rahman P K S M, Rahman T J. Bioremediation of hydrocarbon pollution using biosurfactant producing oil degrading bacteria[J]. *Water Studies*, 2002, 11(9): 221.
- [2] Flasz A, Rocha C A, Mosquera B, et al. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produces by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925[J]. *Medical Science Research*, 1998, 26(3): 181.
- [3] Oberbremer A, Müller-Hurtig R, Wagner F. Effect of addition of microbial surfactant on hydrocarbon degradation in soil population in a stirred reactor[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990, 32(4): 485.
- [4] Roldán-Carrillo T, Martínez-García X, Zapata-PeNasco I, et al. Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 86(2): 384.
- [5] Pruthi V, Cameotra S S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactant by *Pseudomonas putida*—a gujarat oil field isolate [J]. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2003, 6(1): 66.
- [6] Wei Y H, Lai C C, Chang J S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332[J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42(1): 40.
- [7] Ilroi MO, Amobi C J, Odocha A C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* sp. isolated from a tropical environment[J]. *Chemosphere*, 2005, 61(7): 985.
- [8] Benincasa M, Contiero J, Manresa M A, et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source [J]. *Journal of Food Engineering*, 2002, 54(4): 283.
- [9] Makkar R S, Cameotra S S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C [J]. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2002, 5(1): 11.
- [10] Lotfabad T B, Shourian M, Roostaazad R. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 69(2): 183.
- [11] Huang X F, Liu J, Lu L J, et al. Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp. [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(3): 1358.
- [12] Nadarajah N, Singh A, Ward O P. De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37(10): 1135.
- [13] Juliana A, David G C, Kenneth I, et al. Investigation of potential biosurfactant production among phytopathogenic corynebacteria and related soil microbes[J]. *Current Microbiology*, 1981, 6(3): 145.
- [14] 胡建鸿, 邱利炎, 王成润, 等. 柱前反相高效液相色谱法同时测定氨基酸保健饮品中 16 种氨基酸的含量[J]. *食品科技*, 2008, 193(10): 211.
HU Jianhong, QIU Liyan, WANG Chengrun, et al. Simultaneous determination of 16 amino acids in a kind of diastolic drinks by RP-HPLC with precolumn derivatization[J]. *Food Science and Technology*, 2008, 193(10): 211.
- [15] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
Editorial Board of Monitoring Method of Water and Wastewater of State Environment Protection Administration. Monitoring method of water and wastewater [M]. 4th ed. Beijing: China Environment Science Press, 2002.
- [16] William L C, David G C, James E Z, et al. Characterization of nocardia amarae as a potent biological coalescing agent of water-oil emulsions [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1982, 42(2): 362.
- [17] Sandrin C, Peypoux F, Michel G. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1990, 12(4): 370.
- [18] 黄翔峰, 闻岳, 杨葆华, 等. 破乳菌种 TR-1 的筛选与破乳性能实验研究[J]. *油田化学*, 2006, 23(2): 136.
HUANG Xiangfeng, WEN Yue, YANG Biaohua, et al. Screening and demulsification capability research of TR-1 [J]. *Oilfield Chemistry*, 2006, 23(2): 136.
- [19] 刘佳, 黄翔峰, 陆丽君, 等. *Alcaligenes* sp. XJ-T-1 利用废弃油脂生产破乳剂研究[J]. *环境科学*, 2009, 30(6): 1779.
LIU Jia, HUANG Xiangfeng, LU Lijun, et al. Production of Biodemulsifier by *Alcaligenes* sp. XJ-T-1 with waste frying oil [J]. *Environmental Science*, 2009, 30(6): 1779.
- [20] Harper C, Hayward D, Wiid I, et al. Regulation of nitrogen metabolism in mycobacterium tuberculosis: a comparison with mechanisms in corynebacterium glutamicum and streptomyces coelicolor[J]. *IUBMB Life*, 2008, 60(10): 643.
- [21] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长发. 生物化学 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002.
WANG Jingyan, ZHU Shenggeng, XU Changfa. *Biochemistry* [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2002.
- [22] Mulchandani A, Luong J H, Leduy A. Batch kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, 32(5): 639.
- [23] Elibol M, Mavituna F. A kinetic model for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* [J]. *Process Biochemistry*, 1999, 34(6/7): 625.