

Alcaligenes sp. S-XJ-1 利用废弃柴油合成生物破乳剂的研究

杨娜¹, 冯贵颖², 陆丽君^{3*}, 刘佳³, 黄翔峰³

(1. 西北农林科技大学资源环境学院, 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学理学院, 杨凌 712100; 3. 同济大学环境科学与工程学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要:生物破乳剂是一种用于油水分离的新型破乳剂. 采用废弃柴油培养生物破乳剂产生菌 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1, 培养 7 d, 菌株干重最高可达 2.0 g/L, 10 g/L 的菌株细胞悬液能够将水表面张力从 72.0 mN/m 降低到 29.7 mN/m. 生物破乳剂产量为 0.3 g/L, 其 CMC 为 150 mg/L, 表面活性优于化学表面活性剂 SDS, 且对 W/O 模型乳状液的破乳效果在 70% 以上. 废弃柴油 GC-MS 测试结果表明, S-XJ-1 菌株能够利用废弃柴油中的 C14 ~ C20 正构烷烃, 且 C20 正构烷烃几乎被完全利用, 其利用率高达 99%. S-XJ-1 菌株对不同碳链长度正构烷烃复配碳源的利用率及破乳性能随着碳链长度的延长而逐渐增加. 与其他正构烷烃复配碳源相比, S-XJ-1 菌株对 C20 正构烷烃利用率最高, 合成破乳剂的性能最好, 且与废弃柴油研究结果最为接近. TLC 和 FTIR 分析表明 S-XJ-1 菌株利用废弃柴油合成的生物破乳剂为脂肽类物质.

关键词: *Alcaligenes* sp.; 废弃柴油; 生物破乳剂; 脂肽; 烷烃

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)09-2171-07

Production of Biodemulsifier by *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 Using Waste Diesel Oil

YANG Na¹, FENG Gui-ying², LU Li-jun³, LIU Jia³, HUANG Xiang-feng³

(1. College of Resource and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; 2. College of Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; 3. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Biodemulsifier is a new type of demulsifiers for breaking oil-water emulsion. One demulsifier-producing strain, *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 could grow on waste diesel oil (WDO), dry weight of the strain was up to 2.0 g/L after being cultivated for 7 d, 10 g/L S-XJ-1 cell suspension reduced surface tension of water from 72.0 mN/m to 29.7 mN/m. Biodemulsifier produced by S-XJ-1 was 0.3 g/L, its critical micelle concentration (CMC) was 150 mg/L, showing a better surface activity than chemical surfactant SDS. Furthermore, it showed an demulsifying efficiency over 70% for W/O model emulsion. It was indicated S-XJ-1 could utilize C14-C20 *n*-alkanes composing waste diesel oil by GC-MS, C20 *n*-alkane was almost completely consumed by S-XJ-1 with utilization ratio of 99%. In addition, *n*-alkanes utilization ratio and demulsifying capability increased when length of carbon chain increased. Both utilization ratio and demulsifying capability of biodemulsifier produced by S-XJ-1 using C20 *n*-alkane as the carbon source were superior to other *n*-alkanes, and similar to waste diesel oil. It was identified the biodemulsifier produced by S-XJ-1 using waste diesel oil was lipopeptide by TLC and FTIR.

Key words: *Alcaligenes* sp.; waste diesel oil (WDO); biodemulsifier; lipopeptide; alkane

生物表面活性剂是微生物生长代谢过程中产生的一类具有亲水、亲油基团的表面活性物质^[1]. 生物破乳剂是生物表面活性剂的一种, 其破乳作用主要是通过通过与乳状液两相界面上的乳化剂进行竞争, 使得乳状液不稳定而实现. 与目前常用的化学破乳剂相比, 生物破乳剂具有高效率、低毒性、可降解、环境友好等特点^[2], 在环境保护、石油工业、农业等领域具有极为广阔的应用前景^[3]. 目前, 国内外研究者大多采用液体石蜡、正构烷烃、原油等为碳源合成表面活性剂^[4~9]. 而考察不同碳链长度的烷烃在合成表面活性剂方面差异性的研究极少, 针对生物破

乳剂的研究更鲜有报道. 此外, 包括生物破乳剂在内的生物表面活性剂存在成本过高的问题^[4], 以传统碳源液体石蜡为代表的混合烷烃价格较高, 限制了生物破乳剂的规模化生产, 因此寻找廉价易得的碳源代替液体石蜡是实现生物破乳剂工业化生产的必经之路. 前期研究将废弃食用油脂用于合成生物破

收稿日期: 2009-12-28; 修订日期: 2010-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50908166); 上海市科委登山行动计划项目 (06DZ22007); 新疆维吾尔自治区科技支疆项目 (200891115)

作者简介: 杨娜 (1985 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物工程, E-mail: biduoduo@sina.com

* 通讯联系人, E-mail: lulijun@tongji.edu.cn

乳剂,后期烷烃类廉价碳源预试验发现,废弃柴油也具有作为合成生物破乳剂原料的潜在可能性.废弃柴油主要来源于机器维修行业及工业生产行业,用于清理油库、油船,清洗机器零件等,在工作操作中混杂了少量机油等废弃油,使得碳链延长至 C20 以上,多次使用后甚至含有芳香类环烃,本研究所用的废弃柴油尚未利用到此程度,主要含有 C14 ~ C20 烷烃.废弃柴油排放量较大,每年仅修理行业产生的废弃柴油就高达 15 万 t,这些废弃柴油大多被排放到海水里,引起水体污染、生态失衡,甚至危害人体健康.采用废弃柴油代替液体石蜡合成生物破乳剂不仅能有效降低生物破乳剂的生产成本,还能解决废油危害问题,具有重要的环境效益和经济效益.目前尚未见到废弃柴油用于生物破乳剂合成的研究.

本研究以废弃柴油为碳源培养 S-XJ-1 菌株,考察不同培养时间下细胞生长、破乳剂产量、表面特性、破乳性能及碳源利用情况的差异,并进一步探讨了废弃柴油中不同碳链长度的烷烃组分对破乳性能、碳源利用率的影响.

1 材料与方法

1.1 菌株

在前期菌株筛选过程中,从新疆克拉玛依油田长期受石油污染的土壤中筛选出 1 株生物破乳剂产生菌,本室保藏,编号为 S-XJ-1,经 16S rRNA 基因序列分析和生理生化试验鉴定为 *Alcaligenes* sp.^[10].菌株的具体筛选方法和所用培养基参见文献[11].

1.2 菌株生长及生物破乳剂的表面性质

1.2.1 菌株培养及碳源

将斜面上的 S-XJ-1 菌株活化接种至营养肉汤培养基富集培养,将培养 3 d 得到的培养液以 10% 接菌量接种到「 源培养基内,置于恒温摇床中 130 r/min,37℃ 培养 10 d.除碳源外,培养基中其他成分用量参见文献[11],以不接菌的培养基作为空白对照.

碳源包括废弃柴油:车辆修理厂清洗车辆零件后的废弃柴油(WDO),呈红褐色黏稠流态,主要含 C14 ~ C20 烷烃,投加量为 4%;不同碳数正构烷烃复配碳源:分别采用 C14、C16、C18、C20 正构烷烃与废弃柴油复配.前期研究发现,常温下 C20 正构烷烃呈固态,单独投加 C20 正构烷烃为碳源时会发生结块现象,为便于菌株正常利用,将 C20 正构烷烃溶解于等体积废弃柴油后投加,结块现象消失.为平衡实验条件,将其他正构烷烃也用相同方法处理,即

每 100 mL 培养基中添加 2% 正构烷烃和 2% 废弃柴油,碳源投加总量为 4%.

1.2.2 生物量

生物量采用干重法表达.将培养结束后的全培养液在 12 000 r/min,4℃ 下离心 15 min,用正庚烷清洗 2 次去除黏附在菌株细胞表面的残余碳源后,采用冷冻干燥机(scientz-25,中国宁波新芝公司)于 -50℃ 冷冻干燥 24 h,称重.

1.2.3 表面张力

按照 1.2.2 节的方法收集不同培养时间下的离心菌株细胞,悬浮在适量蒸馏水中,配置成 10 g/L 菌株细胞悬液,采用铂金拉环法^[12,13](DT-102,中国淄博华坤电子仪器有限公司)测定其表面张力.

1.2.4 CMC⁻¹

临界胶束浓度(CMC)是指形成一定形状的胶团所需表面活性物质的最低浓度,是表面活性剂的一个重要特征.而 CMC⁻¹是指将含表面活性剂的溶液不断稀释,表面张力突然上升时的稀释倍数.对于某些种类和浓度尚不十分明确的生物表面活性剂,可以采用 CMC⁻¹来表示其活性^[14~16].CMC⁻¹测定按照文献[14]使用的方法,即按 1.2.2 节制得的菌株细胞干粉加蒸馏水配制成 20 g/L 的干粉悬液,然后经蒸馏水逐级稀释并测定其表面张力,直至表面张力近于水的表面张力(72.0 mN/m),记录数据并绘制成曲线,表面张力急剧上升时的稀释倍数即为 CMC⁻¹.

1.3 破乳试验

1.3.1 乳状液制备

本试验主要以生物破乳剂在 W/O 型模型乳状液中的破乳效果来评价其破乳性能.模型乳状液以煤油和水为主要材料^[17],添加适量乳化剂后,经高速剪切搅拌而成,具体配制方法如下.

在 250 mL 的烧杯中,加入 80 mL 溶有 1.91% Span 80 和 0.925% Tween 80 的煤油溶液,然后加入 120 mL 蒸馏水,用高速搅拌乳化机(WL-500CY,上海威宇公司)于 10 000 r/min 搅拌 3.5 min,采用油红显色法乳状液整体显红色,由此验证配制的乳状液为 W/O 型模型乳状液^[18].水浴 35℃ 静置 24 h 后乳状液脱除率 <8%.

1.3.2 破乳试验

破乳试验采用石油行业标准《原油破乳剂使用性能检测方法(瓶试法)》(SY/T 5281-2000)进行.将不同培养时间下离心得到的菌株细胞用蒸馏水配制成 10 g/L 菌株细胞悬液,然后在 20 mL 具塞刻度试管内加入 18 mL 乳状液和 2 mL 菌株细胞悬液,手摇 120

下使其混和均匀,此时菌株细胞悬液在乳状液体系中的浓度为1 000 mg/L,置于 35℃ 水浴锅内,观察 24 h 内乳状液的变化.每次试验采用 3 个平行样.

模型乳状液破乳效率采用乳状液脱除率、水脱出率和煤油脱出率综合表达,其计算方法如下.

乳状液脱除率 =

$$1 - \frac{\text{剩余乳状液体积}}{\text{乳状液体积} + \text{破乳剂投加体积}} \times 100\%$$

水脱出率 =

$$\frac{\text{脱出水的体积}}{\text{乳状液中水的体积} + \text{破乳剂投加体积}} \times 100\%$$

$$\text{煤油脱出率} = \frac{\text{上层油脱出体积}}{\text{乳状液中煤油体积}} \times 100\%$$

1.4 碳源利用情况

1.4.1 碳源利用率

碳源利用率的测定采用 Kwapisz 等^[19]所用的重量法,并将其改良.培养结束后,将全培养液于 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min 以去除菌株细胞,用 20 mL 正庚烷萃取离心清液 2 次,合并萃取液,减压旋转蒸发去除溶剂,氮吹后称重.以未接种的培养基为空白,空白培养基中油量的减少被认为是物理化学消耗量.

$$\begin{aligned} \text{碳源利用率} = & \left[\frac{\text{空白组起始油量} - \text{起始油量}}{\text{空白组物理化学消耗量} - \text{实验组残余油量}} \right] \\ & \times 100\% \end{aligned}$$

1.4.2 菌株利用前后烷烃组分差异分析

将 S-XJ-1 菌株在废弃柴油中培养 10 d 后,按 1.4.1 节的方法得到残余碳源,然后与空白组对照,采用 HP-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 色谱柱 (美国 Thermo Focus DSQ 气相色谱-质谱联用仪) 分析 S-XJ-1 菌株利用前后废弃柴油中烷烃组分的差异.气相色谱质谱联用仪分析条件为:起始温度 70℃,保持 2 min;进样口温度 250℃;程序升温 15℃/min,终温 300℃,保持 10 min;进样量为 0.5 μL,分流进样,分流比 50:1;载气为 He,流速 1 mL/min;溶剂为色谱纯正庚烷,内标为 C12 烷烃;EI 电离,电离能量 70 eV,离子源温度 250℃;NIST 质谱标准库.

1.5 生物破乳剂成分分析

将废弃柴油培养后的 S-XJ-1 菌株按照 1.2.2 节的方法制成干粉,准确称量 2.0 g 干粉,采用 50

mL 二氯甲烷萃取后过滤,将得到的干粉室温干燥,再加入 50 mL 蒸馏水置于磁力搅拌器上浸提 6 h,然后将混合物于 12 000 r/min,室温下离心 10 min,取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤去除残余菌株细胞粉末后即得破乳剂溶液,旋转蒸发去除大部分水后,再经冷冻干燥除去残余的微量水分,得到的淡黄色粉末即为初步提纯后的生物破乳剂,称重.

将生物破乳剂用适量蒸馏水溶解制备成 5 g/L 的破乳剂溶液,采用薄层色谱法 (TLC) 分析生物破乳剂成分. TLC 展开剂选用甲醇/氯仿/乙酸/水 (14:6:2:1, 体积比),点样量为 5 μL.显色剂为 5% 茚三酮丙酮溶液和蒽酮硫酸溶液,分别检验脂肽、糖或糖脂类物质.显色条件为 105℃, 10 ~ 15 min 显色.

采用傅里叶红外光谱法 (FTIR) 分析生物破乳剂成分.取 1 ~ 2 mg 提纯后的生物破乳剂,将其与 200 mg 干燥后的纯 KBr 研磨均匀.将研磨均匀的混合粉末在磨具中铺平,用 $5 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ Pa 的压力在油压机上压片 30 s,使压好的样品放入 Nexus470 智能型傅里叶变换红外光谱仪的检测器中扫描;光谱分辨率和波数分别设为 4 cm^{-1} 和 0.01 cm^{-1} ;以纯 KBr 压片为空白背景.

2 结果与讨论

2.1 废弃柴油为碳源时菌株生长及破乳剂表面性质

将 S-XJ-1 菌株在废弃柴油培养基中培养 10 d,测定不同培养时间下的生物量及菌株细胞悬液表面性质,结果见图 1.从中可知,培养 5 ~ 10 d, 10 g/L S-XJ-1 菌株细胞悬液能够将水的表面张力从 72.0 mN/m 降低到 30.0 mN/m 左右,说明 S-XJ-1 菌株能够利用废弃柴油合成生物破乳剂.观察表面张力及生物量随培养时间的变化趋势发现, S-XJ-1 菌株降低水表面张力的能力和生物量随着培养时间延长而逐渐增加,直至培养 7 d 时生物量最大为 2.0 g/L,此时表面张力也降到最低,为 29.7 mN/m,此后进入衰亡期 (8 ~ 10 d),表面张力略有升高,这可能是因为此时菌株细胞开始有逐渐衰亡、自溶的趋势,胞壁上结合的破乳剂开始脱落,导致其表面活性略有下降.综上可知, S-XJ-1 菌株合成生物破乳剂的过程与菌株生长过程相关,此与 Thavasi 等^[20]的研究一致.

图 2 为 S-XJ-1 菌株利用废弃柴油合成的生物

破乳剂的 CMC^{-1} . 从中可知, 当 S-XJ-1 菌株合成的破乳剂的表面张力达到 34.7 mN/m 时, 破乳剂相对浓度为 0.05 , 即 20 g/L S-XJ-1 菌株干粉悬液稀释了 20 倍的破乳剂时仍能达到最低表面张力, 此时生物破乳剂浓度为 150 mg/L ; 此浓度明显低于化学表面活性剂 SDS 的 CMC (2100 mg/L)^[21], 可见 S-XJ-1 菌株以废弃柴油合成的生物破乳剂具有较好的表面活性.

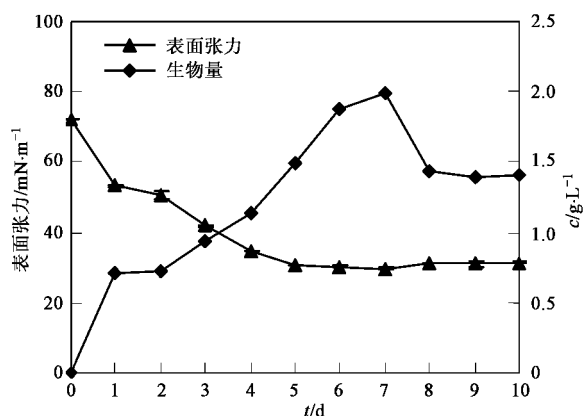


图1 废弃柴油培养下 S-XJ-1 菌株生物量及菌株细胞悬液表面张力

Fig. 1 S-XJ-1 biomass and surface tension of cell suspension using WDO as the carbon source

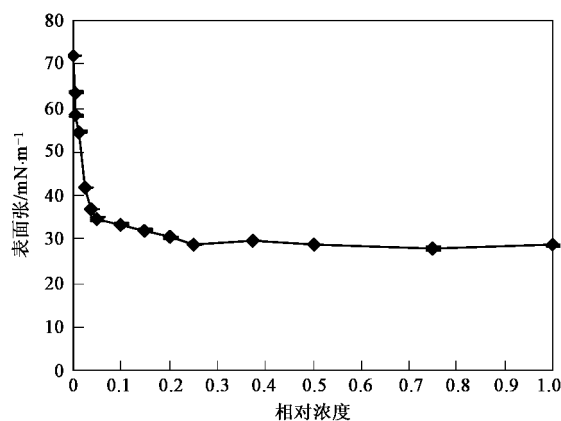


图2 S-XJ-1 菌株利用废弃柴油合成的生物破乳剂的 CMC^{-1}

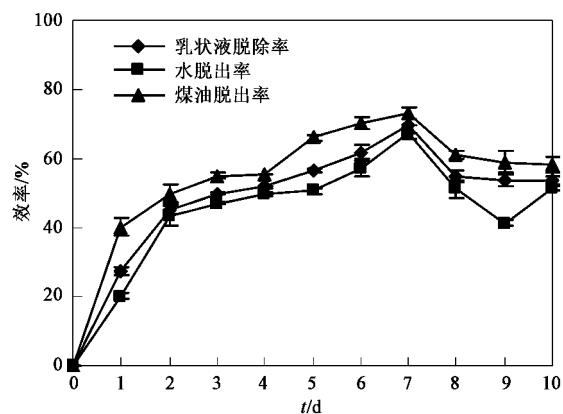
Fig. 2 CMC^{-1} value of biodemulsifier produced by S-XJ-1 using WDO as the carbon source

2.2 废弃柴油为碳源时生物破乳剂的破乳性能及碳源利用分析

以废弃柴油为碳源培养 S-XJ-1 菌株, 考察不同培养时间下得到的菌株细胞悬液在 W/O 模型乳状液的破乳性能, 结果如图 3 所示. 从中可知, 随着培

养时间的延长, S-XJ-1 菌株合成的破乳剂对 W/O 模型乳状液的乳状液脱除率、水脱出率、煤油脱出率均逐渐增加, 培养 7 d 时达到最大, 分别为 70.0% 、 67.7% 、 73.4% , 明显优于 HWS-1501 化学破乳剂的破乳效果 (依次为 9.1% 、 0.0% 、 25.5%). 此后进入衰亡期, 乳状液脱除率有所降低, 可能是由于此时的碳源量较少, 胞壁结合型的破乳剂被菌株细胞二次代谢, 同时菌株细胞开始衰老导致胞壁黏合的破乳剂进一步脱落, 从而降低了破乳剂的活性和产量. 刘佳等^[1]以废弃食用油脂合成生物破乳剂, 其破乳率能达到 90% 以上, 略高于本研究结果. 分析其原因, 主要是由于模型乳状液的配制方法不同, 前期研究 2 种乳状液稳定性发现, 前者研究所用 W/O 空白乳状液静置 48 h 乳状液脱除率为 23% , 而本研究采用的 W/O 乳状液静置 48 h 破乳率为 17% , 说明本研究所用 W/O 乳状液的稳定性优于刘佳等所用的乳状液. 其次, 废弃食用油脂主要由不饱和脂肪酸及脂肪酸酯组成, 而废弃柴油主要由正构烷烃组成, 据 Tuleva^[12]、Cavalero^[22] 和 Ogawa^[23] 等的研究表明, 碳源与其合成产物的性能及结构有一定关系, 由此可知 S-XJ-1 菌株利用 2 种不同碳源合成的破乳剂在性能上也存在差异.

对比图 1 和图 3 发现, 破乳性能随培养时间变化趋势与菌株生长曲线一致, 可见 S-XJ-1 菌株合成的生物破乳剂的破乳活性与菌株生长过程密切相关, 这可能是因为这种胞壁型破乳活性物质的含量及活性受菌株生长情况影响较大, 导致生物破乳剂的破乳活性与菌株生长过程有一定的相似性. 此与破乳剂产量及其表面性质相吻合. 总之, 采用废弃柴



空白乳状液 24 h 脱除率 $< 8\%$

图3 S-XJ-1 菌株利用废弃柴油合成的生物破乳剂的破乳性能

Fig. 3 Demulsifying capacity of biodemulsifier produced by S-XJ-1 using WDO as the carbon source

油合成生物破乳剂是可行的,采用废弃柴油合成生物破乳剂,大大降低了生物破乳剂的生产成本,并缓解了因废弃柴油排放而引起的环境污染问题。

采用 GC-MS 对试验采用的废弃柴油的烷烃组成进行测试,结果发现:废弃柴油以 C14、C16、C18 和 C20 正构烷烃为主,其中 C20 正构烷烃含量最多,占总组分的 62%。可见,废弃柴油烷烃组分的碳链范围为 C14 ~ C20。图 4 反映了 S-XJ-1 菌株对废弃柴油各烷烃组分的利用情况。从中可知,与利用前相比,S-XJ-1 菌株培养结束时培养基所含的碳源峰面积明显减少,说明此时废弃柴油含量极少,可见 S-XJ-1 菌株能够很好地利用废弃柴油。GC-MS 结果表明,培养 10 d 时 S-XJ-1 菌株对废弃柴油的利用率高达 94.78%。黄磊等^[24]将红平红球菌 T7-2 以柴油为碳源的培养基中培养 7 d,测得柴油利用率为 61.14%,低于本试验结果。Lin 等^[25]采用柴油培养 CC-ESB2 菌株时发现,其对柴油的利用率高达 93%,与本研究的结果相似。此外,观察碳源利用率与烷烃碳链长度之间的关系发现,随着碳链长度的增加,S-XJ-1 菌株对各烷烃的利用率也随之增加,其中 S-XJ-1 菌株对 C20 正构烷烃利用得最为完全,其利用率为 99% 以上,可知与 C14、C16、C18 正构烷烃相比,S-XJ-1 菌株更易利用 C20 正构烷烃。S-XJ-1 菌株对 C14、C16、C18、C20 正构烷烃利用率的差异可能是因为菌株细胞内的烃氧化酶系对不同底物催化效率不同而引起的^[26]。为深入研究菌株对不同碳链长度烷烃的选择性,明确微生物利用烷烃的机制,后续研究采用不同碳链长度的 C14、C16、C18、C20 正构烷烃培养 S-XJ-1 菌株,考察其碳源利用情况及所

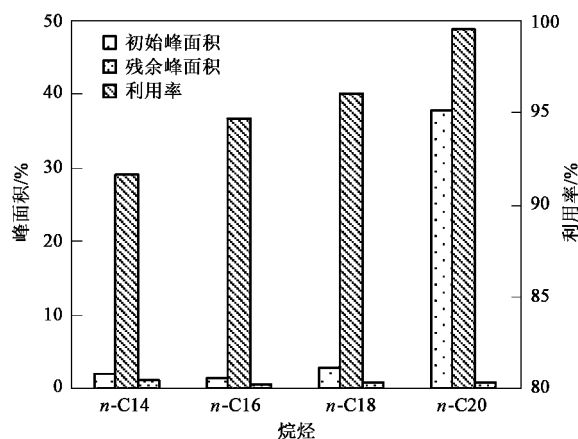


图 4 S-XJ-1 菌株对废弃柴油正构烷烃组分的利用、

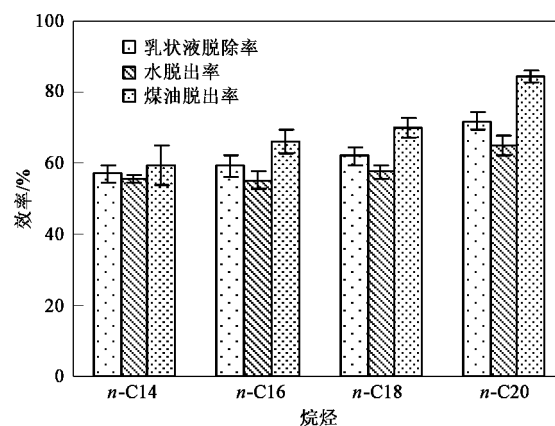
Fig. 4 Utilization difference of *n*-alkanes composing

WDO consumed by S-XJ-1

合成的生物破乳剂的破乳性能。

2.3 以不同碳链长度的正构烷烃为碳源合成破乳剂及其碳源利用分析

将 S-XJ-1 菌株分别在 C14、C16、C18、C20 正构烷烃复配碳源培养基中培养 7 d,考察不同碳链长度正构烷烃培养时菌株合成的生物破乳剂的破乳性能,结果见图 5。从中可知,随着正构烷烃碳链长度的延长,S-XJ-1 菌株合成的破乳剂的破乳效果呈现逐渐增加的趋势,与 C14、C16、C18 正构烷烃复配碳源相比,采用 C20 正构烷烃复配碳源合成的生物破乳剂效果最好,乳状液脱除率、水脱出率、煤油脱出率分别可达 71.8%、64.8%、84.3%,且与 2.2 节中废弃柴油合成生物破乳剂的破乳效果较为接近。由此可知 S-XJ-1 菌株主要利用废弃柴油中的 C20 正构烷烃组分合成生物破乳剂,因而采用 2% C20 正构烷烃与 2% 废弃柴油的复配碳源合成的破乳剂性能优于其他碳链长度烷烃复配碳源合成破乳剂的破乳效果。



空白乳状液 24 h 脱除率 < 8%

图 5 S-XJ-1 菌株利用正构烷烃合成生物破乳剂的破乳性能

Fig. 5 Demulsifying capacity of biodeulsifier produced by S-XJ-1 using *n*-alkanes as the carbon source

图 6 是 S-XJ-1 菌株对不同碳链长度正构烷烃复配碳源的利用情况。由图 6 可知,随烷烃碳链长度的延长,S-XJ-1 菌株对各正构烷烃复配碳源的利用率呈现逐渐增加的趋势,S-XJ-1 菌株对 C20 正构烷烃复配碳源利用得最多,此趋势与 2.2 节中菌株对废弃柴油烷烃组分利用结果相符。部分研究者发现有些菌株对 C16 ~ C30 烷烃的利用能力随着烷烃碳链长度的增加而降低^[26~28];而宋若海等^[29]研究 *P. aeruginosa* Y 菌株和 *P. aeruginosa* S 菌株对

C11、C12、C15、C16 烷烃的利用情况时发现,同一菌株的烷烃利用率随着烷烃链中碳原子数目的增长而增加,由此可见菌株自身性质与其对不同碳链长度烷烃的利用程度有一定关系.此外,观察碳源利用率与破乳性能的关系发现,两者随碳链长度的变化趋势具有一致性,这可能是因为碳源影响菌株对其接触方式^[29],使得菌株对不同碳链长度烷烃的摄取利用机制有所不同,从而影响生物破乳剂合成过程,进一步导致不同碳链长度烷烃合成的生物破乳剂的破乳性能有所差异,并呈现与碳源利用情况相似的变化趋势.菌株对烷烃碳源的接触摄取机制以及烷烃碳链长度对破乳剂破乳性能的影响机制有待进一步研究.

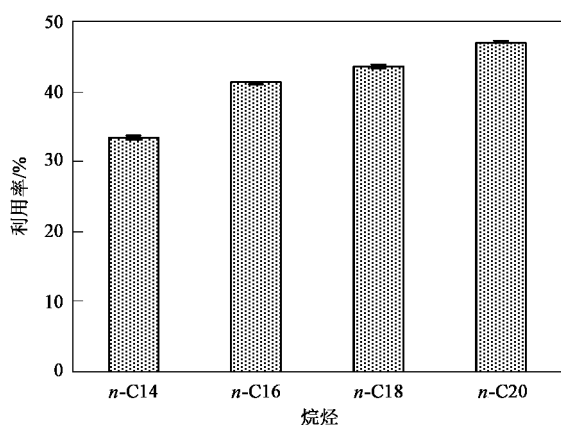


图6 S-XJ-1 菌株对正构烷烃的利用、

Fig. 6 Utilization difference of alkanes consumed by S-XJ-1

2.4 生物破乳剂成分分析

在前期以废弃食用油脂合成生物破乳剂的研究中,采用 TLC 和 FTIR 分析废弃食用油脂合成的生物破乳剂的成分,鉴定为脂肽类物质,其 TLC 显色仅在 R_f 值 0.35 处出现一个紫红色斑点^[1].将 S-XJ-1 菌株以废弃柴油为碳源合成的生物破乳剂进行提纯,其产量为 0.3 g/L,然后采用同样方法分析生物破乳剂成分.将 S-XJ-1 菌株利用废弃柴油合成的生物破乳剂进行薄层展开后,以 5% 茚三酮丙酮溶液显色,见图 7. 从中可知茚三酮丙酮处理后的硅胶板有 4 个深浅不一的紫红色斑点, R_f 值分别为 0.16、0.30、0.42、0.61,表明有 4 种不同游离氨基存在,可能 S-XJ-1 菌株利用废弃柴油合成的这种生物破乳剂是由 4 种脂肽类物质组成的.采用蒽酮试剂检验糖及糖脂,结果不显色,表明该生物破乳剂不含糖脂类物质.此外,前期 2 种碳源合成的生

物破乳剂 TLC 鉴定结果发现,尽管 2 种碳源合成的生物破乳剂均属于脂肽类物质,但薄层展开显色后的斑点个数及 R_f 值均不同,废弃食用油脂主要由 C16、C18 不饱和脂肪酸及脂肪酸酯组成,而废弃柴油是由 C14 ~ C20 正构烷烃构成的,由此可见碳源结构对生物破乳剂的合成有显著影响.

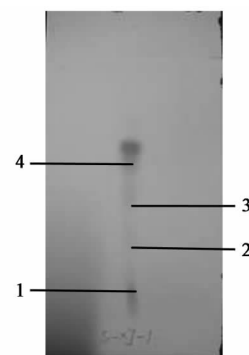


图7 S-XJ-1 菌株利用废弃柴油合成的生物破乳剂 TLC 图

Fig. 7 TLC result of biodemulsifier produced by S-XJ-1 using WDO as the carbon source

对 S-XJ-1 菌株利用废弃柴油合成的生物破乳剂的成分进行了 FTIR 分析,结果表明:2 945 cm^{-1} 、2 880 cm^{-1} 处的特征吸收峰是由脂肪族烷烃碳链上的 C—H 键伸缩振动引起的,1 041 cm^{-1} 是 4 个 CH_2 以上 C—C 骨架的伸缩振动吸收峰,由此可知存在该物质含有脂肪族烷烃的碳链结构.3 595、3 518 和 3 436 cm^{-1} 处的吸收峰是由 N—H 的伸缩振动引起的,3 268 cm^{-1} 、3 203 cm^{-1} 处的吸收峰是由 O—H 的伸缩振动引起的,1 650、1 626 和 1 601 cm^{-1} 为酰胺吸收峰,表明破乳剂含有醇羟基和酰胺结构.综上推测该生物破乳剂是包含有脂肪族碳链的脂肽类物质,此与前期废弃食用油脂研究结果相符.张翠竹等^[30]也曾发现过脂肽类的生物破乳剂.

3 结论

(1) *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 菌株利用废弃柴油合成生物破乳剂是可行的,S-XJ-1 菌株合成生物破乳剂的过程为生长相关型,所合成的生物破乳剂的表面性质优于化学表面活性剂 SDS,对 W/O 模型乳状液的破乳效果优于化学破乳剂,该生物破乳剂经薄层色谱和红外光谱分析为脂肽类物质.

(2) S-XJ-1 菌株主要利用废弃柴油中的 C20 正构烷烃组分合成生物破乳剂,且对 C14、C16、C18、C20 正构烷烃复配碳源的利用率随着碳数增加而增

加, C20 正构烷烃复配碳源培养下破乳剂破乳效果及碳源利用率最高。

(3) 烷烃碳源的碳链长度对生物破乳剂的性能有一定影响, 此与微生物细胞对碳源的摄取利用机制有关, 菌株对烷烃碳源的接触摄取机制以及烷烃碳链长度对破乳剂破乳性能的影响机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 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): 1779-1784.
- [2] Banat I M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal state of the art (Review) [J]. Acta Biotechnol, 1995, **15**(3): 251-267.
- [3] 肖稳发, 刘锡建, 饶品华, 等. 生物破乳剂的应用研究进展[J]. 应用科技, 2008, **16**(10): 17-19.
- [4] Hao D H, Lin J Q, Song X, et al. Isolation, identification, and performance studies of a novel paraffin-degrading bacterium of *Gordonia amicalis* LH3 [J]. Biotechnol Bioprocess Eng, 2008, **13**(1): 61-68.
- [5] Das M, Das S K, Mukherjee R K. Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on *n*-alkanes and sugars [J]. Bioresour Technol, 1998, **63**(3): 231-235.
- [6] Ilori M O, Amobi C J, Odocha A C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment [J]. Chemosphere, 2005, **61**(7): 985-992.
- [7] Vasileva-Tonkova E, Gesheva V. Biosurfactant production by Antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp. during growth on hydrocarbons [J]. Curr Microbiol, 2007, **54**(2): 136-141.
- [8] Kitamoto D, Ikegami T, Suzuki G T, et al. Microbial conversion of *n*-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma* (*Candida antarctica*) [J]. Biotechnol Lett, 2001, **23**(20): 1709-1714.
- [9] Perfumo A, Banat I M, Canganella F, et al. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, **72**(1): 132-138.
- [10] 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]. Bioresour Technol, 2009, **100**(3): 1358-1365.
- [11] 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): 136-150.
- [12] Tuleva B, Christova N, Cohen R, et al. Isolation and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from a soil strain *Micrococcus luteus* BN56 [J]. Process Biochem, 2009, **44**(2): 135-141.
- [13] Bodour A A, Miller-Maier R M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms [J]. J Microbiol Methods, 1998, **32**(3): 273-280.
- [14] Carrillo P G, Mardaraz C, Pitta-Alvarez S I, et al. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria [J]. World J Microb Biot, 1996, **12**(1): 82-84.
- [15] Zhu Y, Gan J J, Zhang G L, et al. Reuse of waste frying oil for production of rhamnolipids using *Pseudomonas aeruginosa* zju. u1M. [J]. J Zhejiang Univ Sci A, 2007, **8**(9): 1514-1520.
- [16] Raza Z A, Khan M S, Khalid Z M, et al. Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils [J]. Biotechnol Lett, 2006, **28**(20): 1623-1631.
- [17] Nadarajah N, Singh A, Ward O P. De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture [J]. Process Biochem, 2002, **37**(10): 1135-1141.
- [18] Lee J C, Lee K Y. Emulsification using environmental compatible emulsifiers and de-emulsification using DC field and immobilized *Nocardia amarae* [J]. Biotechnol Lett, 2000, **22**(14): 1157-1163.
- [19] Kwapisz E, Wszelaka J, Marchut O, et al. The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by *Gordonia alkanivorans* S7 [J]. Int Biodeterior Biodegrad, 2008, **61**(3): 214-222.
- [20] Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, et al. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, **24**(7): 917-925.
- [21] 陈静, 王学军, 胡俊栋, 等. 表面活性剂对白腐真菌降解多环芳烃的影响 [J]. 环境科学, 2006, **27**(1): 154-159.
- [22] Cavalero D A, Cooper D G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214 [J]. J Biotechnol, 2003, **103**(1): 31-41.
- [23] Ogawa S, Ota Y. Influence of exogenous natural oils on the omega-1 and omega-2 hydroxy fatty acid moiety of sophorose lipid produced by *Candida bombicola* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, **64**(11): 2466-2468.
- [24] 黄磊, 李丹, 谢玉娟, 等. 低温解烃菌 T7-2 分类鉴定及治理海洋石油污染的条件优化 [J]. 南开大学学报 (自然科学版), 2007, **40**(1): 99-103.
- [25] Lin T C, Shen F T, Chang J S, et al. Hydrocarbon degrading potential of bacteria isolated from oil-contaminated soil [J]. J Taiwan Inst Chem Eng, 2009, **40**(5): 580-582.
- [26] Sei K, Sugimoto Y, Mori K, et al. Monitoring of alkane-degrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes [J]. Environ Microbiol, 2003, **5**(6): 517-522.
- [27] 刘晔, 周卫民, 牟伯中, 等. 长链烷烃降解菌的降解特性 [J]. 微生物学杂志, 2005, **26**(5): 14-18.
- [28] Huang L, Ma T, Li D, et al. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis* [J]. Mar Pollut Bull, 2008, **56**(10): 1714-1718.
- [29] 宋若海, 华兆哲, 陈坚. 不同底物和环境条件对两株铜绿假单胞菌接触烷烃方式及降解活性的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2007, **13**(6): 843-847.
- [30] 张翠竹, 张心平, 梁凤来, 等. 一株地衣芽孢杆菌产生的生物破乳剂 [J]. 南开大学学报 (自然科学版), 2000, **33**(4): 41-45, 52.