

Alcaligenes sp. XJ-T-1 利用废弃油脂生产破乳剂研究

刘佳, 黄翔峰*, 陆丽君, 陈旭远, 杨殿海, 周琪

(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:生物破乳剂是一种应用于油水乳状液分离的新型破乳剂。本研究对筛选得到的1株高效破乳剂产生菌XJ-T-1(鉴定结果为*Alcaligenes* sp.)代谢产生的生物破乳剂进行了理化性质、破乳能力和废弃油脂利用能力分析。采用废弃油脂II为碳源,可提高生物破乳剂产量4.6倍,XJ-T-1在以液体石蜡和废弃油脂培养8 d后该菌能使水的表面张力从72 mN/m下降到32 mN/m, CMC⁻¹分别为10、20;以液体石蜡为碳源培养得到的生物破乳剂在油包水型、水包油型模型乳状液的破乳率分别达到了96%、50%;而以废弃油脂II为碳源培养得到的生物破乳剂的破乳率分别为97.8%、65%;采用煤油脱出率、乳状液脱除率和水脱出率3种评价方式对破乳效果评价发现生物破乳剂最先作用于乳状液的连续相;采用TLC和IR对废弃油脂生产破乳剂得到的破乳剂有效成分进行鉴定,结果为脂肽与石蜡培养产物相同。

关键词:产碱杆菌; 生物破乳剂; 废弃油脂; 脂肽

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3301(2009)06-1779-06

Production of Biotemulsifier by *Alcaligenes* sp. XJ-T-1 with Waste Frying Oil

LIU Jia, HUANG Xiang-feng, LU Li-jun, CHEN Xu-yuan, YANG Dian-hai, ZHOU Qi

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

Abstract:As a new member of demulsifier family, biotemulsifier is applied in oil-water emulsion breaking. A strain, XJ-T-1, was isolated from petroleum-contaminated soil and identified as *Alcaligenes* sp.. Its physicochemical properties, demulsification capability and utilization of waste oil were further investigated. With waste frying oil (WFO) as carbon source, the demulsifier produced by *Alcaligenes* sp. showed high demulsifying capability. Moreover, the production of demulsifier was 4.6 times of that generated with paraffine as the carbon source. The CMC⁻¹ of biotemulsifier produced by paraffine and waste frying oil was achieved at 10 and 20, respectively. The biotemulsifier cultured with paraffine as the carbon source achieved 96% and 50% of emulsion breaking ratio in W/O (water in oil) and O/W (oil in water) model emulsion, while the demulsifier cultured on waste frying oil II as carbon source exhibited 97.8% and 65% demulsification ratio in the two model emulsions correspondingly. From the dynamic change of kerosene breaking ratio, emulsion breaking ratio and water breaking ratio during demulsification process, it was found that this biotemulsifier reacted with the continuous phase of the emulsion prior to its reaction with the dispersed phase. It was identified the valid part of biotemulsifier produced by WFO II was lipopeptide by TLC and IR.

Key words:*Alcaligenes* sp.; biotemulsifier; waste frying oil; lipopeptide

原油乳状液的破乳是实现油水分离、降低含水率和减轻管线腐蚀的重要过程,乳状液的主要存在形式为油包水型(W/O, water in oil)和水包油型(O/W, oil in water)2种。生物破乳剂是近年发展起来的一种新型破乳剂,由微生物代谢作用产生的一类具有亲水、亲油基团的表面活性物质。与化学破乳剂相比,生物破乳剂具有结构更为复杂多样、选择性好、低毒和易生物降解等特点^[1,2],可应用于环境保护和石油开采炼制等领域。目前对生物破乳剂的开发已经成为破乳剂研究的重要方向,而高效生物破乳剂产生菌的研究是开发高效生物破乳剂的关键^[3]。以生物破乳剂为代表的生物表面活性剂均存在成本过高的问题,主要原因是培养基中的碳源一般采用疏水性的碳氢化合物如烷烃的混合物等,这类工业品的价格随石油价格而波动,使得生物破乳剂的原料成本较高。廉价碳源的应用是降低生物破乳剂成本

的重要途径之一^[4,5],作为环境领域的污染物废弃油脂用作肥皂、化妆品、生物柴油等生产原料已有报道^[6~9],目前鲜见应用于生产生物破乳剂的报道。

本研究针对前期筛选得到的1株高效破乳剂产生菌,以废弃油脂为碳源进行培养,并对优选后的废弃油脂生产的生物破乳剂的破乳效果进行了分析。

1 材料与方法

1.1 菌株 XJ-T-1

XJ-T-1为从克拉玛依油田采油井边上长期受石油污染的含油土壤筛选得到,具体筛选过程及所用培

收稿日期:2008-07-12;修订日期:2008-11-15

基金项目:上海市科委基金项目(051258038);上海市科委登山行动计划项目(06DZ22007)

作者简介:刘佳(1982~),女,博士研究生,主要研究方向为环境工程微生物。

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

培养基参见文献[10], XJ-T1 通过形态观察、16S rDNA 序列分析和生理生化试验鉴定为 *Alcaligenes* sp. .^[11]

1.2 XJ-T1 培养特性及其产物破乳剂性质

1.2.1 XJ-T1 全培养液

将琼脂平板上的 XJ-T1 菌落接入到营养肉汤培养基富集培养,将培养 3 d 得到的培养液以 10 % 比例接入到 MMSW 无机盐培养基内,碳源分别为 4 % 的液体石蜡或废弃油脂. 培养 8 d 即得到 XJ-T1 的细胞全培养液. MMSW 培养基参加文献[10].

将培养 8 d 的 XJ-T1 全培养液在 10 000 r/min 下离心 10 min, 得到离心获得物, 离心获得物用去离子水清洗 2 次, 将其再悬浮于 pH = 7.0 的磷酸盐缓冲液中, 用于后续试验.

1.2.2 生物量

生物量采用 D_{580} 、干重表达. 将均匀的 XJ-T1 细胞悬浮液稀释 25 倍后采用紫外分光光度计 (UV2100, UNICIM 公司), 在 580 nm 条件下测定即为 D_{580} ; 将 XJ-T1 全培养液在 10 000 r/min 下离心 10 min 得到离心获得物, 离心获得物用去离子水清洗 2 次后, 在 105 °C 烘 24 h 并称量测定干重.

1.2.3 表面张力

全培养液的表面张力 (surface tension, ST) 测定采用铂金拉环法 (Du Nouy ring tensiometer) (DT-102,

淄博华坤电子仪器有限公司, 中国) 检测, 具体操作参见文献[12]. CMC^{-1} 按照文献[13]使用的方法, 测定全培养液在不同稀释倍数下的表面张力, 表面张力上升时的稀释倍数即为 CMC^{-1} .

1.3 乳状液制备及破乳试验

模型乳状液制备方法参照文献[14], 破乳试验采用瓶试法进行^[15], 具体配置和操作过程见文献[16]. 破乳效率计算: 煤油乳状液的破乳效率采用上层煤油脱出率、乳状液脱除率和下层水脱出率综合表达.

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

$$\text{乳状液脱除率} = \left(1 - \frac{\text{剩余乳状液体积}}{\text{乳状液体积} + \text{菌株培养液投加体积}} \right) \times 100 \%$$

$$\text{下层水脱出率} = \frac{\text{底层水脱出体积}}{\text{乳状液中蒸馏水体积} + \text{菌株培养液投加体积}} \times 100 \%$$

1.4 废弃油脂

从餐饮行业收集到 6 种不同来源的废弃油脂 (waste frying oil, WFO), 去除悬浮物后备用, 6 种废弃油脂特性见表 1. 研究过程中, 仅将液体石蜡替换为相同体积的废弃油脂, 在相同条件下操作培养. 将培养后的全培养液进行稀释, 得到与液体石蜡培养的全培养液 D_{580} 值相同, 进行破乳试验.

表 1 6 种废弃油脂特性

Table 1 Features of six waste frying oils

废弃油脂种类	来源	用途	性状	成分
I	豆油	炸菜、肉	黄色, 清亮, 流态	亚油酸为主, 少量饱和脂肪酸
II	猪油	煎饼	土黄, 清亮, 半固态	饱和脂肪酸为主
III	调和油	炸菜、肉	棕褐色, 浑浊, 流态	亚油酸为主, 少量饱和脂肪酸
IV	调和油	煎锅贴	黄色, 清亮, 流态	不饱和脂肪酸为主, 部分饱和脂肪酸
V	豆油	炸鱼	褐色, 浑浊, 流态	亚油酸为主, 少量油酸
VI	豆油	炸鱼丸	褐色, 浑浊, 流态	亚油酸为主, 部分油酸

废弃油脂 GC-MS 分析^[17,18]: 废弃油脂采用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液进行酯化, 得到的脂肪酸甲酯进行 GC-MS (Thermo Focus DSQ) 配以 HP-5MS 柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 测定. 初温: 100 °C, 保持 2 min; 进样口温度 250 °C; 程序升温 20 °C/min 进行, 终温 300 °C, 保持 1 min; 检测器温度 250 °C; 进样量为 1 μL, 分流进样, 进样比 30 : 1; 液体石蜡, 采用正庚烷进行萃取, 得到的溶剂相旋转蒸发与氮吹, 纯化后的烷烃进行 GC-MS 的测定.

1.5 破乳剂有效成分鉴定

对烘干后的生物破乳剂粗产物进行索氏提取、硅胶柱纯化和 TLC 和 IR 鉴定, 所用方法和具体操作

步骤详见文献[16].

2 结果与讨论

2.1 废弃油脂的比选

生物破乳剂是生物表面活性剂的一种, 大多数研究均采用液体石蜡等碳氢化合物为主的烷烃作为碳源, 以液体石蜡为例, 目前其市场价格高达 6 000 ~ 10 000 元/t. 废弃食用油脂是指食品生产经营单位在经营过程中产生的不可再食用的动植物油脂、餐饮业废弃食用油脂, 因来源不同俗称潲水油、煎炸油、地沟油等. 国内已经有企业开展了餐饮业废弃油脂的收集并以 1 000 ~ 3 000 元/t 的价格出售. 目前研

究者采用废弃油脂作为碳源生产生物表面活性剂,以此来降低生物表面活性剂的成本^[19~21]. 菌体细胞利用烷烃的过程:烃类进入细胞后,经过生物氧化生产伯醇、醛而得到脂肪酸,这些脂肪酸直接能结合成更为复杂的脂类^[22]. 因此废弃油脂中的脂肪酸是菌体合成脂类的必要原料,采用废弃油脂代替烷烃生物合成生物破乳剂是可行的.

Alcaligenes sp. XI-T-1 起破乳作用的是与细胞表面紧密结合的耐高温的一种胞壁结合型的表面活性物质,由于其与细胞结合紧密,提取纯化过程复杂且成本高,在油田实际应用中可采用离心菌体直接投加破乳,因此本研究以细胞的干重来表征生物破乳剂的干重,并对菌体细胞表面的性质进行了研究.

将 XI-T-1 在 6 种废弃油脂中进行培养并与石蜡培养的产物活性和浓度进行比较,如表 2 所示. 从中可知,XI-T-1 在废弃油脂 II 中发酵后得到的生物菌体干重为液体石蜡中的 4.6 倍,且未对破乳剂表面活性产生影响,可见废弃油脂 II 作为碳源提高了生物量及表面结合的生物破乳剂的产量,这与 Zhu 等^[23]和 Zulficar 等^[24]利用废弃油脂生物表面活性剂可提高产量的研究结果一致. 分析原因,可能是由于废弃油脂 II 中富含的饱和脂肪酸的疏水性导致的促进作用.

对废弃油脂 II 中的脂肪酸组成进行 GC-MS 测试,结果如图 1 所示:废弃油脂 II 以 C16:0、C18:2、C18:1 和 C18:0 为主,比例分别为 25.3%、19.2%、

表 2 废弃油脂和石蜡碳源对破乳剂产量和性质的比较							
Table 2 Comparison of waste oil and paraffin in terms of the quantity and quality of produced demulsifier							
性能	WFO I	WFO II	WFO III	WFO IV	WFO V	WFO VI	石蜡
D_{500}	1.288 ± 0.022	1.522 ± 0.030	1.086 ± 0.025	1.321 ± 0.031	1.197 ± 0.011	1.486 ± 0.031	0.425 ± 0.010
干重/mg L ⁻¹	15.5 ± 0.4	25.8 ± 0.3	14.7 ± 0.3	15.8 ± 0.2	15.1 ± 0.5	17.4 ± 0.4	6.6 ± 0.6
表面张力/mN m ⁻¹	34.1 ± 0.1	32.73 ± 0.25	34.43 ± 0.21	33.5 ± 0.1	33.7 ± 0.17	33.43 ± 0.15	32.17 ± 0.15

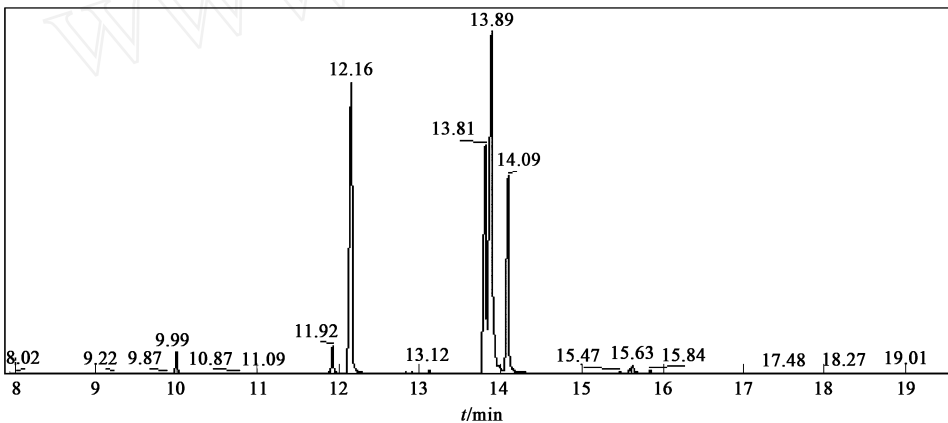


图 1 废弃油脂 II 的 GC-MS 试验结果

Fig. 1 GC-MS of WFO II

32.9%和 14.2%, 占总组分的 91.6%.

2.2 XI-T-1 在 2 种碳源条件下生产生物破乳剂的表面活性比较

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.生物表面活性剂的高效与否考察的是指能使水的表面张力明显下降时生物表面活性剂的浓度,对于某些种类和浓度尚不确定的生物表面活性剂,还可以采用 CMC⁻¹来表示^[13,23,24]. *Alcaligenes* sp. (XI-T-1)在石蜡、废弃油脂 II 发酵培养基内培养

8 d 的 XI-T-1 全培养液的 CMC⁻¹,结果见图 2. 从图 2(a)可知,液体石蜡为碳源培养时最低表面张力达到 32 mN/m,XI-T-1 的相对浓度为 0.1 时,即全培养液稀释了 10 倍的菌悬液时仍能达到最低表面张力,则 CMC⁻¹为 10;而图 2(b)所示,废弃油脂 I 为碳源时全培养液最低表面张力达到 32 mN/m 左右,CMC⁻¹为 20. 菌株 XI-T-1 在 2 种培养基培养下得到生物破乳剂粗产物的表面活性存在一定的差异,废弃油脂培养下的 CMC⁻¹更大,这与废弃油脂 I 培养得到的生物破乳剂粗产物的产量大具有一定的关系.

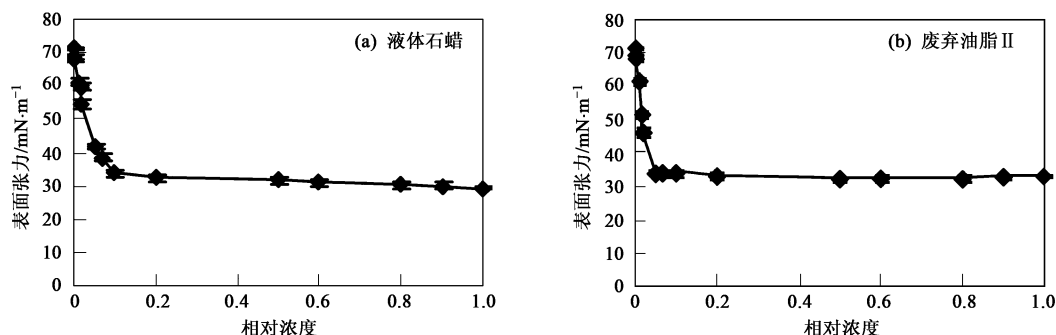


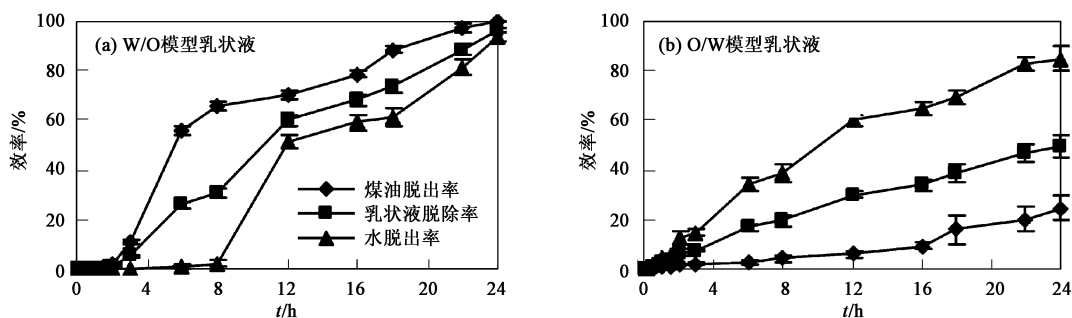
图2 不同培养基培养 XJ-T1 的 CMC-1 的测定

Fig. 2 Determination of CMC-1 value of 8-day culture of XJ-T1

2.3 菌株 XJ-T1 在 2 种碳源培养下破乳能力比较以及破乳机制分析

生物破乳剂破乳效果的评价多采用乳状液破乳率和脱水率^[15],较少关注破乳过程中油相和水相的脱出效果,而对于新型的生物破乳剂来说,其破乳特性与化学破乳剂存在差异,全面描述其破乳行为有利于研究生物破乳剂的破乳机制. 本研究中,菌株 XJ-T1 产生的生物破乳剂的破乳能力试验是在 W/O、O/W 这 2 种类型模型乳状液体系内加入体积浓度为 10 % 的培养 8 d 的微生物全培养液,该生物破乳剂的破乳率采用煤油脱出率、水脱出率和乳状液脱除率 3 个指标来综合表达,其中乳状液脱除率是油、水脱出率的整体反映. 以石蜡为碳源培养 XJ-T1 的破乳效果见图 3. 图 3(a) 反映的是在 W/O 模型乳状液中菌株 XJ-T1 的破乳效果,在反应初期,破乳效果仅体现为上层煤油的脱出,8 h 后煤油脱出率和

水脱出率同步增加,在 24 h 时 2 者脱出率基本一致,可见 XJ-T1 产生的生物破乳剂首先作用于乳状液的连续相煤油. 从图 3(b) 可以看出,对于 O/W 模型乳状液,油脱出率与水脱出率同步增加,但水脱出率要大于油脱出率,可见菌株 XJ-T1 的破乳剂在 O/W 模型乳状液破乳过程中也首先作用于连续相水. 比较 2 种乳状液的破乳效果, XJ-T1 破乳剂在 W/O 乳状液的破乳效率和破乳速率均高于 O/W 模型乳状液,可见其更适应于 W/O 型模型乳状液的破乳;且该破乳剂在 2 种类型乳状液破乳时,通过发挥其表面活性降低了油水界面的张力,改变了油水界面性质实现了油水分离,且均优先作用了连续相的分离,分散相的分离相对滞后. Kosarić^[25] 认为 W/O 乳状液的破乳所需的破乳剂应为培养初期的具有亲水表面的细胞,而 O/W 型乳状液的破乳则需处于内源代谢阶段的具有疏水表面的细胞,这一现象与



未投加任何物质、投加蒸馏水和无机盐培养基的空白样 24 h 的破乳率均 < 10 %,不同

图3 以石蜡为碳源的培养物的破乳效果研究

Fig. 3 Demulsification test of biodemulsifier produced with kerosene as carbon source

XJ-T1 破乳剂的破乳效果存在差异.

将废弃油脂 II 培养后的 XJ-T1 的全培养液进行破乳试验研究,结果如图 4 所示. 从中可知,以废

弃油脂培养得到的全培养液和液体石蜡相比,破乳效果稳定,且在 W/O 乳状液中,破乳效率和破乳速率均优于液体石蜡培养得到的破乳剂. 破乳剂在

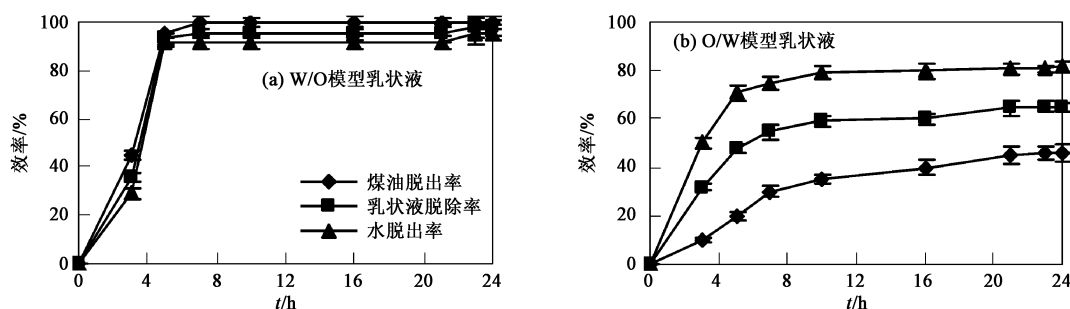


图4 以废弃油脂 II 为碳源的培养物的破乳效果

Fig. 4 Demulsification test of biodemulsifier produced with waste oil as carbon source

W/O、O/W 这 2 种乳状液中的破乳效果的趋势与图 3 相似,在 W/O 乳状液的破乳效果也优于 O/W 破乳效果.可见,以废弃油脂作为 *Alcaligenes* sp. XI-T-1 的碳源发酵生产生物破乳剂是可行的,得到的产物仍能维持较高的破乳效率.可见,菌株 XI-T-1 产生的破乳剂可使 W/O、O/W 这 2 种类型的乳状液破乳,且对 W/O 乳状液的破乳效果优于 O/W.

2.4 XI-T-1 的破乳剂有效成分分析

前期研究采用 TLC 和 IR 对液体石蜡培养得到生物破乳剂进行初步鉴定,确定为脂肽^[16];采用同样的方法对废弃油脂 II 培养得到的生物破乳剂进行了分析.对纯化后的产物进行薄层层析,喷上茚三酮显色剂后,在比移值为 0.35 ($R_f = 0.35$) 处有紫红色斑点,而溴百里香酚蓝试剂、苯酚-硫酸试剂不显色,说明该生物破乳剂为脂肽类生物表面活性剂;分析 IR 图,发现培养得到的生物破乳剂有脂肪碳链结构^[26],因此可以判断 2 种碳源培养下得到的生物破乳剂均为脂肽类生物表面活性剂.

3 结论

(1) 高效破乳剂产生菌 *Alcaligenes* sp. XI-T-1 在疏水性碳源条件下培养后,具有较强的表面活性和破乳活性;利用破乳菌株 XI-T-1 在以废弃油脂 II 为碳源发酵生产生物破乳剂,与以石蜡为碳源相比,可提高生物破乳剂产量 4.6 倍,其 CMC^{-1} 提高到 20 倍.

(2) 以油脱出率、乳状液脱除率和水脱出率 3 个指标综合评价破乳剂在不同乳状液中的破乳效能,对分析破乳剂的破乳机制和提高破乳剂的适用性具有一定的意义.

(3) 废弃油脂培养下的 XI-T-1 产生的生物破乳剂仍能保持相同的高破乳活性,且均为脂肽类生物表面活性剂,其高效破乳效能和低成本有望应用于

工业化使用.

参考文献:

- [1] Banat I M. Characteristics of biosurfactants and their use in pollution removal-state of art[J]. Acta Biotechnol, 1995, 15 (3): 252-267.
- [2] 陈延君,王红旗,王然,等. 鼠李糖脂对微生物降解正十六烷以及细胞表面性质的影响[J]. 环境科学, 2007, 28 (9): 2117-2122.
- [3] Chen C Y, Baker S C, Richard C D. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources[J]. J Microbiol Meth, 2007, 70 (3): 503-510.
- [4] Mukhejee S, Das P, Sen R. Towards Commercial Production of Microbial Surfactants[J]. Trends Biotechnol, 2006, 24 (11): 509-515.
- [5] Felizardo P, Correia M J N, Raposo I, et al. Production of Biodiesel from Waste Frying Oils[J]. Waste Manage, 2006, 26 (5): 487-494.
- [6] Kulkarni M G, Dalai A K. Waste Cooking Oil-an Economical Source for Biodiesel: a Review[J]. Ind Eng Chem Res, 2006, 45 (9): 2901-2913.
- [7] 郭萍梅,黄凤洪,黄庆德. 高酸值废弃油脂转化生物柴油的技术研究[J]. 中国油脂, 2006, 31 (7): 66-69.
- [8] 葛蕴珊,何超,韩秀坤,等. 生物柴油排放颗粒特性的试验研究[J]. 环境科学, 2007, 28 (7): 1632-1636.
- [9] 姚亚光,纪威,符太军,等. 基于酸催化的餐饮业废弃油脂与醇类酯化反应试验研究[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11 (3): 113-116.
- [10] 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.
- [11] 陆丽君,黄翔峰,刘佳,等. 一株高效生物表面活性剂产生菌的筛选鉴定及其性能研究[J]. 工业微生物, 2008, 38 (5): 40-44.
- [12] Bodur 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 Meth, 1998, 32 (3): 273-280.
- [13] Carrillo P G, Mardaraz S I, Alvarez P, et al. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria[J]. World J Microb Biot, 1996, 12 (1): 82-84.
- [14] 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.
- [15] Akit J , Cooper D G, Manninen K I, *et al.* Investigation of potential biosurfactant production among *Phytopathogenic corynebacteria* and related soil microbes[J]. *Curr Microbiol* , 1981 , **6**(3) : 145-150.
- [16] 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.
- [17] Kato S, Kunisawa K, Kojima T, *et al.* Evaluation of ozone treated fish waste oil as a fuel for transportation[J]. *J Chem Eng Jpn* ,2004 , **37**(7) :863-870.
- [18] Nitschke M, Costa S, Haddad R, *et al.* Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LB1[J]. *Biotechnol Progr* ,2005 , **21**(5) :1562-1566.
- [19] Benincasa M, Abalos A, Oliveira I, *et al.* Chemical structure , surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LB1 from soapstock[J]. *Anton Leeuw Int J G* , 2004 ,**85**(1) :1-8.
- [20] Das K, Mukherjee A K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants[J]. *Process Biochem* , 2007 ,**42**(8) : 1191-1199.
- [21] Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, *et al.* Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake [J]. *Lett Appl Microbiol* , 2007 , **45**(6) :686-691.
- [22] 张天胜. 生物表面活性剂及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 15-23.
- [23] 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]. *Journal of Zhejiang University Science A* , 2007 , **8**(9) :1514-1520.
- [24] Zulfiqar A R, Muhammad S K, Zafar M K, *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) :16-23.
- [25] Kosaric N. Biosurfactants in industry[J]. *Pure &Appl Chem* , 1992 , **64**(11) :1731-1737.
- [26] Lee S C, Lee S J , Kim S H, *et al.* Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil[J]. *Bioresour Technol* , 2008 ,**99**(7) : 2288-2292.