

# 生物破乳剂产生菌混合培养及其发酵条件的优化

刘畅<sup>1</sup> 李旭<sup>2</sup> 马放<sup>3\*</sup>

(1. 环境保护部华南环境科学研究所 广东 广州 510655)

(2. 深圳市深水龙华水务有限公司 广东 深圳 518031)

(3. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院 城市水资源与水环境国家重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150090)

**摘要:**【目的】对菌株 L1 和 XH1 的混合发酵条件进行优化, 为混合菌发酵生物破乳剂的实际生产和应用提供理论依据。【方法】利用响应面实验(RSM)的中心组合旋转设计方法(CCRD)针对混合菌的发酵条件进行优化, 通过对模型乳状液进行破乳实验, 以排油率作为发酵液破乳效能的评价标准。【结果】经模型的分析与验证, 确定最佳发酵条件为: 种子液比例(L1:XH1)为 3:2, 葡萄糖投加时间为第 4 天, 投加葡萄糖后再培养 21 h, 液体石蜡含量 3.6% (体积比)。【结论】与破乳菌 XH1 和 L1 单独培养相比, 经混合培养后获得复合生物破乳剂具有投加量少、破乳接触时间短的优势。同时双株破乳菌复配培养有效地提高了培养基中主要营养物质的利用率, 减少了对底物的浪费。

**关键词:** 生物破乳剂产生菌, 混合发酵, 条件优化, 响应面法

## Mixed cultivation and optimization of fermentation conditions of demulsifying bacteria

LIU Chang<sup>1</sup> LI Xu<sup>2</sup> MA Fang<sup>3\*</sup>

(1. South China Institute of Environmental Sciences, MEP, Guangzhou, Guangdong 510655, China)

(2. Shenzhen Shen Shui Long Hua Water Group Co. Ltd., Shenzhen, Guangdong 518031, China)

(3. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

**Abstract:** [Objective] To provide theoretical basis for production and application of mix cultivated bio-demulsifier, the optimal conditions of mixed cultivation of strains L1 and XH1 were studied in this research. [Methods] Response surface methodology (RSM) based on the central composite rotation design (CCRD) was used to optimize fermentation conditions, and the demulsifying ratio was used to evaluate the demulsifying ability of fermentation broth. [Results] According to the results of the model analysis and verification, the optimal conditions were as follow: 3:2 inoculum proportion (strain L1:XH1), 3.6% (V/V) liquid paraffin contents, feeding glucose on the 4<sup>th</sup> day, and 21 h continuous incubation after feeding glucose. [Conclusion] Compared with single strain culture, the compound bio-demulsifier produced by complex culture of L1 and XH1 exhibited less dose and shorter demulsifying

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务专项项目(No. PM-zx021-201311-046)

\*通讯作者: Tel: 86-451-86282107; ✉: mafang@hit.edu.cn

收稿日期: 2014-11-17; 接受日期: 2015-01-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-03

time. The complex culture increased the utilization ratio of main nutrients in the medium.

**Keywords:** Demulsifying bacteria, Mixed cultivation, Optimal condition, Response surface methodology

在石油开采及加工、采矿、食品等诸多工业的不同生产阶段均会形成大量的乳状液<sup>[1-2]</sup>。这些乳状液处理不当将成为当地生态系统和生态环境(水体、土壤、动植物等)安全的重大威胁<sup>[3-4]</sup>。因此,乳状液的破乳在诸多工业生产中都是十分必要的。破乳剂作为表面活性剂的一种,是当今油田和炼化企业中必不可少的化学试剂之一<sup>[5]</sup>。目前几乎所有广泛应用的破乳剂都是以石油为原料进行化学合成的,化学合成的破乳剂在生产使用过程中往往会对环境造成严重的污染<sup>[6]</sup>。因此,安全无毒、环境友好的生物破乳剂的开发与应用无疑是破乳剂发展的一个重要趋势。生物破乳剂的研究起始于20世纪70年代,由加拿大西安大略(Western Ontario)大学的研究者率先开展<sup>[7]</sup>。从20世纪80年代以来,国内外研究主要集中在破乳菌的筛选纯化方面,已报道的生物破乳剂产生菌主要包括细菌、霉菌、酵母菌、放线菌等<sup>[8-11]</sup>。目前,对生物破乳剂的研究主要集中在菌种选育和培养条件优化方面,发酵方法大多采用单一菌种,存在着一定程度的底物浪费。将利用不同底物的菌种混合发酵,与单一菌种发酵相比,可以显著提高对原材料、设备和能源的利用率,从而降低菌剂的生产成本,但目前对生物破乳剂产生菌多菌种的混合发酵研究较少。

本实验前期筛选出两株菌株 XH1 和 L1, 分别是以葡萄糖和液体石蜡为主要碳源合成破乳活性物质的生物破乳剂产生菌, 并对两株菌的单一菌种发酵条件进行了考察<sup>[12-16]</sup>。本实验将针对这两株菌的混合发酵过程, 用响应面分析法(RSM)对混合菌的发酵条件进行优化<sup>[17-19]</sup>, 为混合菌发酵生物破乳剂的实际生产和应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种来源: 本实验所使用的菌种来自哈尔滨

工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室保存的生物破乳剂产生菌 XH1 (*Bacillus mojavensis*, 筛选自大庆油田采油井井口长期受石油污染的土壤)<sup>[14]</sup>和生物破乳剂产生菌 L1 (*Gordonia sihwensis*, 筛选自哈尔滨太平污水处理厂曝气池活性污泥)<sup>[20]</sup>。

1.1.2 培养基: (1) XH1 种子液培养基为改进型无机盐培养基(MMSM)<sup>[14]</sup>; (2) L1 种子液培养基为无机盐培养基(MSM)<sup>[14]</sup>; (3) 混合菌发酵培养基为改进的无机盐培养基(MMSM)<sup>[14]</sup>, 其中葡萄糖和液体石蜡单独灭菌。

### 1.2 实验方法

1.2.1 模拟乳状液的配制: Tween 60-water 原液与 Span 60-oil 原液以 6.5/3.5 (体积比)比例混合, 采用乳化剪切机以 5 000 r/min 的转速搅拌 3 min, 获得 O/W 型模型乳状液, 稳定时间在 200 h 以上。

1.2.2 破乳性能的评定: 向 5 mL 模拟 O/W 型乳状液中加入 2 mL 细胞全培养液, 振荡摇匀, 在 30 °C 条件下静置 24 h 测定破乳率。破乳率= $V/V_0 \times 100\%$ ,  $V_0$  为配制乳状液中总油量,  $V$  为破乳后产生的油量。

1.2.3 混合菌发酵液培养条件优化: 利用响应面实验(RSM)的中心组合旋转设计方法(CCRD)研究混合生物破乳剂产生菌的发酵条件对破乳效能的影响, 从中优化出混合菌最佳的发酵条件。基于两株生物破乳剂产生菌 L1 和 XH1 的生长特性和底物利用特性, 本实验中初步选定两株菌 L1 和 XH1 种子液的投加比例(A)、葡萄糖投加时间(B)和液体石蜡含量(C)作为混合菌发酵条件的研究变量。3 个变量的变化范围和水平见表 1。按照表 1 所示的不同比例水平同时接入菌株 L1 和 XH1 的种子液到混合发酵培养基中, 摇床转速 140 r/min, 培养温度 30 °C 进行培养, 在不同的培养时间点投加葡萄糖后, 进一步培养 21 h 后取样测定混合破乳菌培养液的破乳效能。通过破乳实验, 测定排油率作为破乳效能的评价标准。通过 CCRD 设计 23 组实验来优化最佳条件(表 2)。

表 1 优化设计的自变量和水平  
Table 1 Conditions and the levels of the optimization design

自变量 Independent variable	因子 Factors	单位 Units	编码值 Coded values				
			-1.682	-1	0	1	1.682
种子液比例 Proportion of inoculation (L1:XH1)	A	%	20.00	32.16	50.00	67.84	80.00
葡萄糖投加时间 Time of adding glucose	B	d	0.00	1.62	4.00	6.38	8.00
液体石蜡含量 Content of liquid paraffin (V/V)	C	%	1.22	0.50	3.00	4.78	6.00

表 2 CCRD 的实验设计和结果  
Table 2 CCRD design of experimental values and predicted values of culture medium

实验编号 No.	A	B	C	24 h 排油率 Demulsifying ratios of 24 h (%)	
				实验值 Experimental values	预测值 Predictions values
				1	-1
2	1	-1	-1	60.57	65.88
3	-1	1	-1	62.45	61.43
4	1	1	-1	67.18	74.00
5	-1	-1	1	63.35	60.70
6	1	-1	1	53.28	59.01
7	-1	1	1	76.25	75.11
8	1	1	1	86.17	92.31
9	-1.628	0	0	72.69	78.74
10	1.628	0	0	99.83	87.89
11	0	-1.628	0	50.22	48.47
12	0	1.628	0	72.11	67.69
13	0	0	-1.628	73.50	70.08
14	0	0	1.628	78.28	75.81
15	0	0	0	93.26	94.80
16	0	0	0	95.05	94.80
17	0	0	0	94.84	94.80
18	0	0	0	97.28	94.80
19	0	0	0	93.15	94.80
20	0	0	0	95.03	94.80
21	0	0	0	98.83	94.80
22	0	0	0	93.45	94.80
23	0	0	0	91.52	94.80

## 2 结果与分析

### 2.1 混合菌发酵条件的优化

本实验中通过 RSM 的 CCRD 法建立关于破乳效能的二阶回归模型, 经 ANOVA 分析证明该模型具有很高的显著性和置信度。由回归模型分析(表 3)和方差分析(表 4)可知, 该破乳效能回归模型的  $F$ -value (17.24)对应的  $P$ -value<0.000 1 表明该模型差异显著。回归系数  $R^2$  为 0.922 7, 表明该模型可以为 92%的实验数据提供可信的解释, 该二阶模型具有理想的置信度。本实验中的方差系数  $CV$  为 7.02, 表明该模型在一定范围内可以实现符合要求的调整。破乳效能的响应值-排油率  $Y$  可由以下二阶多元回归方程解释:

$$Y=94.80+2.72A+5.63B+1.70C+4.72AB+1.16AC+6.30BC-4.06A^2-12.94B^2-7.73C^2.$$

在该回归方程中, 6 个变量因子  $B$ 、 $AB$ 、 $BC$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  ( $Prob>F<0.050$  0)是方程的显著影响因子。与其他显著影响因子相比, 其中葡萄糖的投加时间和液体石蜡含量对混合破乳菌培养液破乳活性产生的影响最显著。分析方程的变量系数(表 1), 根据  $P_{AB}$  和  $P_{BC}$  可知  $AB$  [种子液的接入比例(L1:XH1)与葡萄糖投加时间]和  $BC$  (葡萄糖投加时间与液体石蜡含量)两因子间的交互作用对混合破

乳菌破乳效能具有正效应; 同时发现混合菌种子液中 L1 比例过高, 液体石蜡含量过高或选取的葡萄糖投加时间点靠后均会对混合破乳菌的培养以及复合型生物破乳剂的效能造成不利影响。

### 2.2 响应面图分析

混合培养菌株 L1 和 XH1 的破乳效能回归模型中, 3 个自变量因子之间的相互影响可由响应面图反映。此外控制其他自变量处于中心水平时通过 3D 响应面图可直观预测混合破乳菌培养的最佳破乳效能。选择该模型中的显著因子(葡萄糖投加时间)对复合型生物破乳剂破乳能力的影响及该因子与种子液比例和液体石蜡含量之间的交互关系进行着重分析(图 1、2)。

由响应面图 1 和 2 可知, 通过三维响应面的曲率变化可直观预测到破乳效能函数的最优位置; 而等高线图上的平原区可显示响应值随两个因素的变化情况。由图 1A 可知, 混合培养获得的复合型生物破乳剂的破乳效能受葡萄糖投加时间和种子液比例交互影响, 当菌株 L1 占总种子液总量的 50%–70%时, 在培养 3–5 d 期间投加葡萄糖, 混合菌发酵液具有较高的排油率(>90%)。由图 2 可知, 当液体石蜡含量在 3.0%–4.0%范围内, 在培养 3–6 d 期间投加葡萄糖, 均能获得具有

表 3 回归模型分析结果  
Table 3 Results of regression model analysis

Source	DF	SS	Mean square	F-value	P-value (Prob>F)
Model	9	4 910.16	545.57	17.24	<0.000 1
A	1	101.08	101.08	3.19	0.097 2
B	1	433.33	433.33	13.69	0.002 7
C	1	39.58	39.58	1.25	0.283 7
AB	1	178.51	178.51	5.64	0.033 6
AC	1	10.74	10.74	0.34	0.570 1
BC	1	317.14	317.14	10.02	0.007 4
A <sup>2</sup>	1	262.06	262.06	8.28	0.013 0
B <sup>2</sup>	1	2 658.66	2 658.66	84.01	<0.000 1
C <sup>2</sup>	1	948.82	948.82	29.98	0.000 1
Residual	13	411.39	31.65		
Lack of fit	5	371.29	74.26	4.82	0.000 7
Total	22	5 321.55			

Note: DF: Degrees of freedom; SS: Sum of squares.

表4 方差分析

Table 4 ANOVA (analysis of variance) for the experiments

项目 Item	数值 Value
标准偏差 Standard deviation	5.630 0
平均值 Mean	80.120 0
方差系数 Coefficient of variance	7.020 0
预测平方和 Press	2 866.860 0
回归系数 $R^2$	0.922 7
校正回归系数 Adjusted $R^2$	0.869 2
预测回归系数 Predicted $R^2$	0.461 3
满足精度 Adequate precision	12.417 0

较高破乳效能的复合型生物破乳剂。由该破乳效能回归模型预测的最优结果表明当种子液比例(L1:XH1)为3:2,葡萄糖投加时间为4.97 d、液体石蜡含量为3.57%时,混合菌发酵液的排油率最高达到97.1%。该最佳破乳效能可由3D图(图1B)观测到。

### 2.3 模型的验证

根据回归模型,控制3个独立变量处于最优条件,分别是种子液比例(L1:XH1)为3:2,葡萄糖投

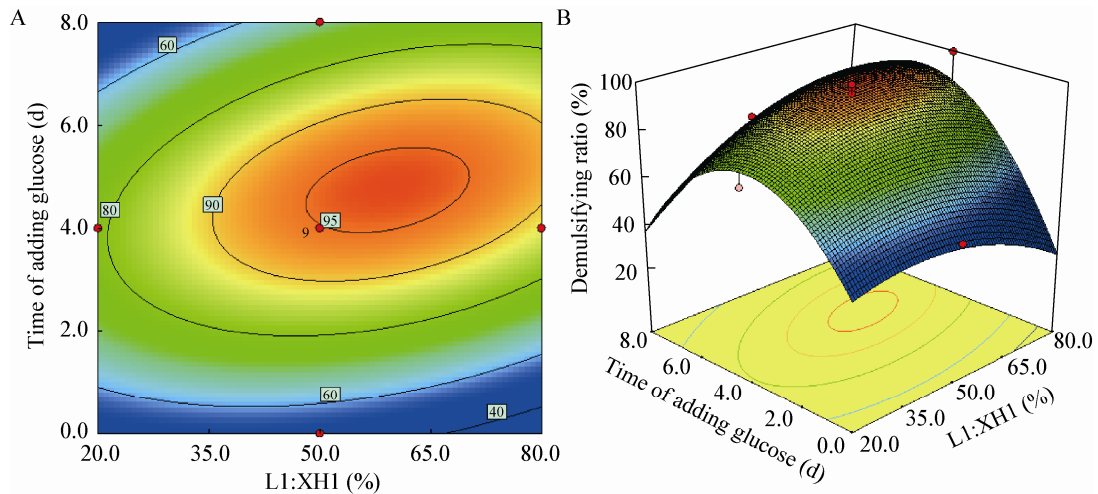


图1 葡萄糖投加时间和种子液比例的响应面图

Figure 1 Response surface of glucose dosing time and seed liquid rate

Note: A: Three dimensional chart; B: Contour chart.

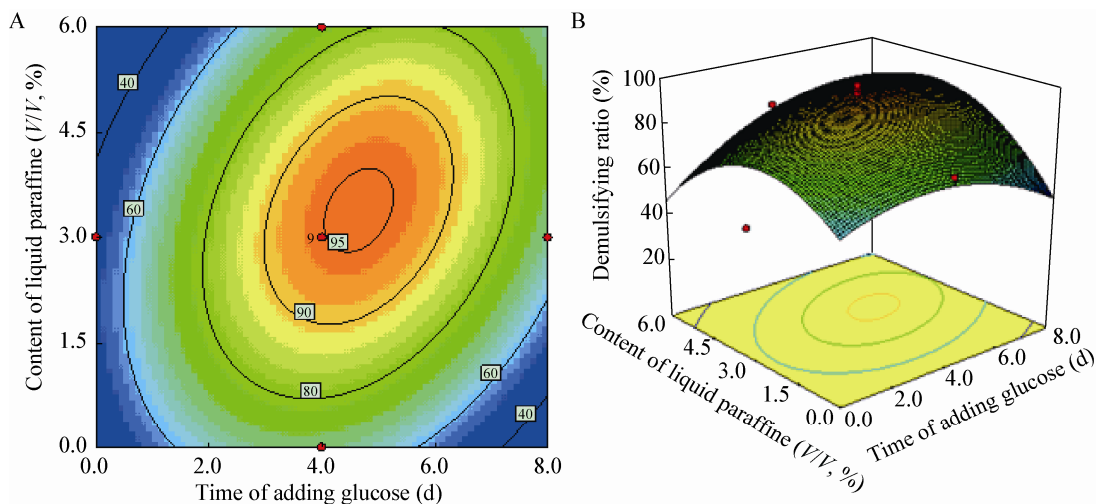


图2 葡萄糖投加时间和液体石蜡含量的响应面图

Figure 2 Response surface of glucose dosing time and liquid paraffin content

Note: A: Three dimensional chart; B: Contour chart.

加时间为 4.97 d 和液体石蜡含量为 3.57% 时, 混合菌发酵液达到最高排油率。为进一步验证该模型的准确程度, 分别采用响应面法优化后的混合菌培养 3 个因子和不同水平下葡萄糖投加时间和液体石蜡含量进行验证实验, 实验结果见表 5。

由表 5 可知, 达到混合菌发酵液最高排油率 98.45% 时, 种子液比例为 3:2, 葡萄糖投加时间为 4.97 d, 液体石蜡含量 3.57%, 与回归模型优化后的复配培养条件相一致, 由此说明该模型具有理想的准确程度。此外, 由表 5 发现当种子液比例为 3:2, 葡萄糖投加时间为 5 d, 液体石蜡含量 3.6% 时, 其获得培养液破乳效能接近模型优化结果为 97.83%, 而葡萄糖投加时间为 4 d 或液体石蜡含量为 4 g/L 时, 培养液排油率也可达到 95% 以上。考虑到缩短培养时间有助于今后降低发酵生产的运行成本, 而培养至第 4 天投加葡萄糖与第 5 天投加葡萄糖生产的发酵产品相比, 破乳能力相差不显著, 因此本实验确定最佳葡萄糖投加时间为第 4 天。综上, 结合响应面法优化结果, 确定破乳菌 L1 和 XH1 混合培养产复合型生物破乳剂的最佳培养条件为种子液比例为 3:2, 葡萄糖投加时间为第 4 天, 液体石蜡含量为 3.6% (体积比)。

#### 2.4 混合培养与单一破乳菌培养产生物破乳剂的性能比较

将不同体积的破乳剂产生菌培养液投加到 5 mL O/W 型模型乳状液中, 测试 24 h 排油率, 测试结果见图 3。从图 3 可以看出, 全培养液投加量在一定的范围内, 破乳效率都是随着投加量的增加

而升高的, 当投加量达到一定值之后, 排油率基本保持稳定, 维持恒定。根据图 3 的结果, 对于 5 mL O/W 型模型乳状液, 菌株 XH1 和 L1 发酵液的最佳投加量分别为 2.00 mL 和 1.50 mL, 而混合发酵液的最佳投加量只有 0.75 mL。因此, 通过复配培养, 单位体积发酵液中的破乳有效成分总量明显增加, 生物破乳剂的产量得到了提高。

将 2 mL 破乳剂产生菌培养液分别投加到 5 mL O/W 型模型乳状液中, 测试不同接触时间的排油率, 测试结果见图 4。从图 4 可以看出, 与单株菌株培养液的破乳速率相比, 复配培养菌液的破乳速率明显提高, 在接触时间为 12 h 时, 基本可以达到最佳的破乳效果, 比单独培养的两株菌株的接触时间减少 4 h 以上。由此可知, 通过复配培养, 培养液的破乳速率可以显著提升, 有效缩短破乳时间。

#### 2.5 混合培养与单一破乳菌培养对培养基中底物的利用情况

分别考察破乳菌 XH1、L1 单独培养和 XH1+L1 复配培养至生长稳定期时, 改进无机盐培养基 (MMSM) 中破乳菌 XH1 对液体石蜡、葡萄糖、总磷和总氮的消耗情况; 无葡萄糖的改进无机盐培养基 (MMSM) 中破乳菌 L1 对液体石蜡、总磷和总氮的消耗情况; 改进无机盐培养基 (MMSM) 中混合破乳菌 XH1+L1 对液体石蜡、葡萄糖、总磷和总氮的消耗情况。全培养液经旋转蒸发浓缩后, 再经 105 °C 烘干 4 h 后所获得的固体, 即为破乳粗产品。实验结果见表 6。

表 5 破乳效能模型的验证

Table 5 Model validation of demulsifying efficiency

种子液比例 Proportion of inoculation	葡萄糖投加时间 Time of adding glucose (d)	液体石蜡含量 Content of liquid paraffine (V/V, %)	24 h 排油率 Demulsifying ratios of 24 h (%)
3:2	4.00	3.60	95.67±0.25
3:2	5.00	3.60	97.83±0.22
3:2	6.00	3.60	81.52±0.41
3:2	5.00	3.00	72.69±0.42
3:2	5.00	4.00	96.28±0.34
3:2	4.97	3.57	98.45±0.32

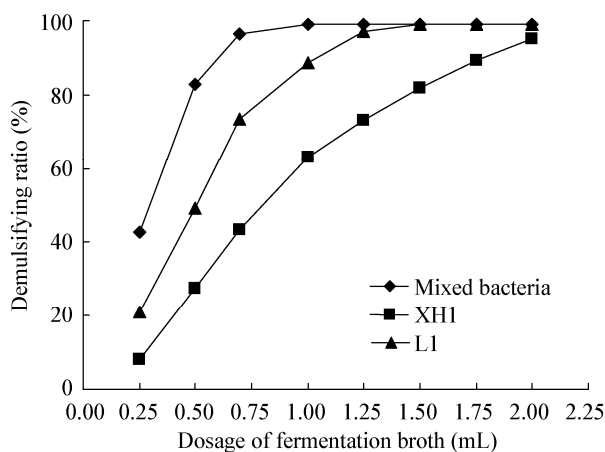


图3 发酵液投加量对破乳效果的影响

Figure 3 Effect of fermentation broth dosage on the de-emulsification activity

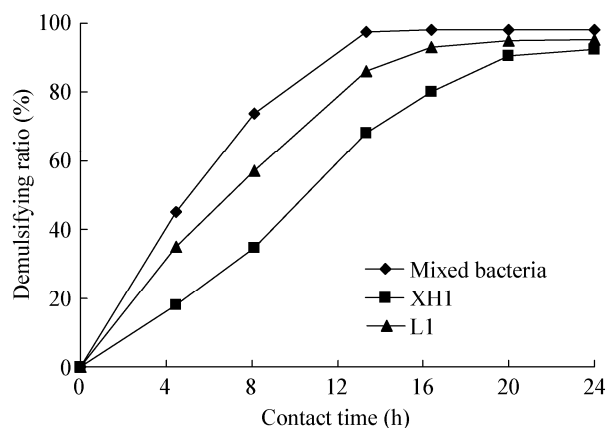


图4 接触时间对破乳效果的影响

Figure 4 Effect of contacting time on de-emulsification activity

表6 单菌培养与混合培养对培养基中主要营养物质的利用情况

Table 6 Nutrients utilization in the medium of single and complex cultivation

菌种 Strain	培养基中营养物质利用率 Utilization of nutrients in the medium (%)				破乳粗产品干重 Dry weight of demulsifier crude product (g/L)
	液体石蜡 Liquid paraffin	总氮 Total nitrogen	总磷 Total phosphorus	葡萄糖 Glucose	
	XH1	28.5	36.1	3.2	
L1	83.6	20.4	2.5	—	28.78±0.15
XH1+L1	91.5	53.8	6.1	100	43.12±0.35

由表6可知,单独培养破乳菌 XH1 的过程中,培养基中分别有 71.5%的液体石蜡、63.9%的氮源和 96.8%的磷源未被充分利用,由此说明分批培养破乳菌 XH1 产生物破乳剂存在较为严重的营养物质浪费现象。单独培养 L1 的过程中发现液体石蜡的利用率为 83.6%,而对磷源和氮源的利用率很低。混合培养菌株 XH1 和 L1,发现液体石蜡和葡萄糖的利用率均在 90%以上,氮源和磷源的利用率也相应提高,同时满足两种破乳菌生理活动的需要。特别是复配培养获得的复合型生物破乳剂的产量高于两株菌单独培养时分别获得生物破乳剂产量总和,由此说明双株破乳菌混合培养有效地提高了培养中主要营养物质的利用率,减少了对底物的浪费;同时在微生物协同作用下,促进了两株菌破乳

剂的合成能力。

### 3 结论

(1) 混合培养生物破乳剂产生菌 L1 和 XH1,采用响应面法优化混合培养发酵条件,经模型的分析与验证,确定最佳培养条件为:种子液比例(L1:XH1)为 3:2,葡萄糖投加时间为第 4 天,投加葡萄糖后再培养 21 h,液体石蜡含量 3.6%(体积比)。

(2) 与单独培养生物破乳剂产生菌 XH1 和 L1 相比,经混合培养后获得复合生物破乳剂具有投加量少、破乳接触时间短的优势。同时双株破乳菌混合培养有效地提高了培养基中主要营养物质的利用率和发酵液中破乳有效成分的含量,减少了对底物的浪费。

## 参 考 文 献

- [1] Mason SL, May K, Hartland S. Drop size and concentration profile determination in petroleum emulsion separation[J]. *Colloids and Surfaces*, 1995, 96: 85-92
- [2] Zhang XM, Wu FP, Chen B, et al. Status and prospect of research on demulsification methods for W/O emulsion[J]. *Petrochemical Technology & Application*, 2010, 28(2): 159-163 (in Chinese)  
张贤明, 吴峰平, 陈彬, 等. 油包水型乳化液破乳方法研究现状及展望[J]. *石化技术与应用*, 2010, 28(2): 159-163
- [3] Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53: 495-508
- [4] Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67: 503-549
- [5] Wang SR, Li XG, Liu DZ, et al. *Surfactant Chemistry*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 6-32 (in Chinese)  
王世荣, 李祥高, 刘东志, 等. *表面活性剂化学*[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 6-32
- [6] Chen F, Yang Z. General overview of the demulsification methods with mulsion[J]. *Petrochemical Industry Application*, 2009, 28(2): 1-3 (in Chinese)  
陈锋, 杨总. 乳状液破乳方法综述[J]. *石油化工应用*, 2009, 28(2): 1-3
- [7] Fang Y, Xia YM. *Biosurfactant*[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1992: 210-265 (in Chinese)  
方云, 夏咏梅. *生物表面活性剂*[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 210-265
- [8] Zhang TS. *Biosurfactant and its Applications*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 1-14, 294-316 (in Chinese)  
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: 1-14, 294-316
- [9] Liu J, Huang XF, Lu LJ, et al. Optimization of biodemulsifier production from *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 and its application in breaking crude oil emulsion[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 183: 466-473
- [10] Huang XF, Wen Y, Yang BH, et al. Screening and demulsification capability of demulsifying bacterial strain TR-1 for crude oil dehydration[J]. *Oilfield Chemistry*, 2006, 23(2): 136-139 (in Chinese)  
黄翔峰, 闻岳, 杨葆华, 等. 破乳菌种 TR-1 的筛选与破乳性能的实验研究[J]. *油田化学*, 2006, 23(2): 136-139
- [11] Huang XF, Liu J, Lu LJ, et al. Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp.[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 1358-1365
- [12] Li X, Li A, Liu C, et al. Characterization of the extracellular biodemulsifier of *Bacillus mojavensis* XH1 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimization of the production medium composition[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47: 626-634
- [13] Li X, Yang JX, Ma F, et al. Experimental study on demulsification characteristics of water-in-oil emulsions by a *Bacillus mojavensis* sp.[J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2009, 41(8): 74-78 (in Chinese)  
李旭, 杨基先, 马放, 等. 一株芽孢杆菌破乳特性的试验研究[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2009, 41(8): 74-78
- [14] Li X, Yang JX, Ma F, et al. Selection of de-emulsification strains and optimization of fermentation conditions[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(4): 604-609 (in Chinese)  
李旭, 杨基先, 马放, 等. 生物破乳菌的筛选及发酵条件的优化[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(4): 604-609
- [15] Liu C, Li X, Ma F, et al. Evaluation of methods for screening bio-demulsifier producing bacteria and detecting bio-demulsifying efficiency[J]. *Journal of Beijing University of Technology*, 2012, 38(4): 602-606 (in Chinese)  
刘畅, 李旭, 马放, 等. 生物破乳剂产生菌筛选及效能检测的方法[J]. *北京工业大学学报*, 2012, 38(4): 602-606
- [16] Hou N, Li DP, Yang JX, et al. Culture condition optimization and the demulsification efficiency of a bacterial strain[J]. *China Environmental Science*, 2010, 30(3): 357-361 (in Chinese)  
侯宁, 李大鹏, 杨基先, 等. 高效破乳菌的培养条件优化及破乳效能研究[J]. *中国环境科学*, 2010, 30(3): 357-361
- [17] Beg QK, Saxena RK, Gupta R. Kinetic constants determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavensis* using response surface methodology[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 78(3): 289-295
- [18] Pal MP, Vaidya BK, Desai KM, et al. Media optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: artificial intelligence versus a statistical approach[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36: 747-756
- [19] Amezcua-Vega C, Poggi-Valardo HM, Esparza-Garcia F, et al. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 237-240
- [20] Liu C, Li X, Ma F, et al. Study on screening method of bio-demulsifying microorganism from activated sludge and characteristic[J]. *International Conference on Computer Distributed Control system and Intelligent Environment Monitoring*, 2011: 433-437