

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610052836.1

[51] Int. Cl.

C12P 19/00 (2006.01)

C09K 3/32 (2006.01)

C02F 3/00 (2006.01)

A62D 3/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 2 月 7 日

[11] 公开号 CN 1908180A

[22] 申请日 2006.8.8

[21] 申请号 200610052836.1

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

[72] 发明人 孟 琴 章宏梓 朱 湧

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司
代理人 林怀禹

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 2 页

[54] 发明名称

餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物及其用途

[57] 摘要

一种餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物及其用途。传统鼠李糖脂发酵中采用植物油或葡萄糖、正己烷做碳源，成本较高。本发明对自然筛选得到的假单胞菌进行紫外诱变，挑选出合适的菌种，利用餐饮废油作为发酵的碳源，发酵产生的鼠李糖脂浓度可达到 35-45g/L，使得成本比传统发酵方法降低 25%。发酵液通过超滤去除菌体后再经过喷雾干燥法处理得到鼠李糖脂粉末状粗提物。加入 0.01-3% 粗提物到生化污水处理池中，可提高处理效率。另外，将粗提物配成浓度 0.01-0.03% 的溶液可洗涤被原油污染的土壤，促进其自然修复。

1、餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物，其特征在于该方法的步骤如下：

1) 以餐饮废油作为碳源，利用假单胞菌在发酵罐中发酵，发酵过程菌体投加质量浓度为 3-5%，碳源浓度是 3-5%，矿物盐水溶液占总培养溶液的 90-94%，采用的是一次性投料，并在 72 小时后再补充 0.1-0.5%的碳源；

2) 发酵过程温度控制在 33-37℃，pH 控制在 6.0-7.5，通空气量在 0.4-1.0vvm，压力为 0-0.05Mpa，发酵周期 4-6 天；

3) 发酵液通过膜法过滤去除菌体，得到发酵液中含鼠李糖脂 30-40g/L。

2、根据权利要求 1 所述的餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物，其特征在于：去菌体滤液通过喷雾干燥制成粉末。

3、根据权利要求 1 所述的餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物，其特征在于：所述的假单胞菌是用从炼油厂排污口土壤中自然筛选得到能产鼠李糖脂的铜绿假单胞菌，通过 15W 紫外灯紫外诱变 15-75 秒后筛选获得的鼠李糖脂高产菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ZJU.u1)。

4、根据权利要求 1 所述的餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物，其特征在于发酵过程包括菌种活化和罐内发酵两步：

1) 活化过程碳源选用甘油，甘油质量比为 3-5%，活化时间 72 小时，活化温度 30-37℃，pH 值控制在 6.0-7.5；

2) 将活化后的菌投入发酵罐进行发酵，发酵过程选用的碳源是餐饮废油。

5、根据权利要求 1 或 4 所述的餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物，其特征在于：发酵及活化过程中培养基除碳源外，还包含以下所有成分，NaNO₃: 0.2-1%；NaCl: 0.05-1.0%；KCl: 0.05-1.0%；CaCl₂·2H₂O: 0.005-0.05%；KH₂PO₄: 0.1-1%；Na₂HPO₄·12H₂O: 0.1-1%；MgSO₄: 0.005-0.05%；其余为去离子水。

6、根据权利要求 1 所述的餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物，其特征在于：发酵液通过截留分子量 30kDa 以上的超滤到 0.22 微米以下的微滤去除菌体，膜材料为聚砜、丙烯腈、尼龙、聚丙烯、醋酸纤维或无机类材料；去菌体滤液再经过喷雾干燥处理，喷雾干燥时热风的进口温度为 130~160℃，出口温度为 65℃~85℃，物料流量为 0.8~1.2 m³/h，塔内滞留时间 10 秒~20 秒。

7、鼠李糖脂粗提物的用途，其特征在于：

1) 在生化废水池中加入 0.01-3%粗提物，有效提高处理效率，处理时间缩短

了 15-25%，出水 BOD 下降了 10-30%。

2)鼠李糖脂粗提物用于原油污染的土壤的生物修复：将粗提物配成 0.01-0.03%的溶液,可强化油类物质在水中的溶解程度,促进原油污染土壤的生物修复。经鼠李糖脂粗提物处理过,土壤中油类物质可减少 70%以上,土壤在 30-60 天内自然修复。

餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物及其用途

技术领域

本发明涉及一种生物表面活性剂的制备方法及其用途，具体涉及一种餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物及其用途。

背景技术

作为一种阴离子表面活性剂，鼠李糖脂分子的两亲性使其在溶液表面(或油、水界面)定向排列成单分子膜，这种定向吸附的特性，使它具有很多特有的表面活性，被广泛用于石油开采、环保、农业、化妆品、食品、医药与工业净化。

鼠李糖脂的发酵一般采用各类植物油或正己烷作为碳源，发酵周期一般需要 7-11 天左右，使得生产成本较高，其中生产过程和碳源成本两个因素占到整个生产成本的 30%以上，制约了鼠李糖脂的工业化大规模生产，而利用皂角片等废料制备糖脂时，虽然降低了原材料成本，但由于产量很低，无法实现工业化生产。

我国每天在家庭和工业生产中都会产生大量的烹饪废油，给环境带来了相当大的压力。利用烹饪废油作为碳源发酵鼠李糖脂可以直接利用有机废物合成具有环境友好特性的生物表面活性剂，即实现了治理餐饮废油又制备了附加值较高的可有效促进环境中废弃有机化合物降解的生物表面活性剂—鼠李糖脂，避免了化学合成表面活性剂在生产和使用过程中带来的环境污染问题，达到了“以废治废”的目的。

菜油在烹制过程中，油成分中的脂肪酸被氧化或分解成低链脂肪酸，小于 C_{10} 的短链脂肪酸酯增加，同时增加了一定含量的极性物质，这使得常规菌种与发酵方法产量低，产品质量不稳定，而本发明可使得鼠李糖脂的产量达到 35-45g/l，对废油的利用率超过了 80%，发酵周期缩短到 4-6 天。据估计，相对于传统的发酵方法，生产成本可降低 25%以上，并有效地减少了烹饪废油对环境的压力。

鼠李糖脂作为一种良好的乳化剂和溶解剂，可以促进油类物质的生物降解，可以生物修复正己烷、萘、菲和原油等物质引起的环境污染；即使在有机物、有毒金属同时存在的环境中，它也能够促进对碳氢化合物的生物降解和对重金属的吸附。因此，在采用常规生化法处理废水中加入少量含鼠李糖脂的去菌体

发酵液，可大大提高处理效率，提高出水水质。例如，加入 0.01-3%的鼠李糖脂发酵液制备的粗提物后，效率比常规生化法提高 20%以上。

发明内容

本发明的目的在于提供一种餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物及其用途。

为了达到上述的目的，本发明采用的技术方案是：

(一)、制备方法

1、一种餐饮废油发酵生产鼠李糖脂粗提物，该方法的步骤如下：

1) 以餐饮废油作为碳源，利用假单胞菌在发酵罐中发酵，发酵过程菌体接种量为 3-5%（体积百分比），废油加入体积为 3-5%，其余 90-94%的培养体积则为水溶性矿物质，发酵培养 72 小时后再次补充占发酵液体积 0.1-0.5%的废油；

2) 发酵过程温度控制在 33-37℃，pH控制在 6.0-7.5，通空气量在 0.4-1.0vvm，压力为 0-0.05Mpa，发酵周期 4-6 天，发酵液中含鼠李糖脂 35-45g/L。

3) 发酵液通过膜法过滤去除菌体，去菌体发酵液含鼠李糖脂 30-40g/L。

2、去菌体滤液通过喷雾干燥制成粉末。

3、所述的假单胞菌是用从炼油厂排污口土壤中自然筛选得到能产鼠李糖脂的铜绿假单胞菌，通过 15W 紫外灯紫外诱变 15-75 秒后筛选获得的鼠李糖脂高产菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ZJU.u1)。

4、发酵过程包括菌种活化和罐内发酵两步：

1) 活化过程中碳源选用甘油，甘油加量为 3-5%（质量百分比），活化时间为 72 小时，活化温度 30-37℃，pH 值控制在 6.0-7.5；

2) 将活化后的菌接种到发酵罐进行发酵，发酵过程选用的碳源是餐饮废油。

5、发酵及活化过程中培养基除碳源外，还包含以下所有成分，NaNO₃: 0.2-1%；NaCl: 0.05-1.0%；KCl: 0.05-1.0%；CaCl₂·2H₂O: 0.005-0.05%；KH₂PO₄: 0.1-1%；Na₂HPO₄·12H₂O: 0.1-1%；MgSO₄: 0.005-0.05%；其余为去离子水。

6、发酵液采用截留分子量 30kDa 以上的超滤膜或者小于 0.22 微米的微滤膜去除菌体，膜材料为聚砜、丙烯腈、尼龙、聚丙烯、醋酸纤维或无机类材料。

7、去菌体发酵液经过喷雾干燥处理，喷雾干燥时热风的进口温度为 130~160℃，出口温度为 65℃~85℃，物料流量为 0.8~1.2 m³/h，塔内滞留时间 10 秒~20 秒。喷雾干燥产品含鼠李糖脂 50-70%。

(二)、鼠李糖脂粗提物的用途

1、在生化废水池中加入 0.01-3%粗提物，有效提高处理效率，处理时间缩

短了 15-25%，出水 BOD 下降了 10-30%。

2、鼠李糖脂粗提物用于原油污染的土壤的生物修复：将粗提物配成 0.01-0.03% 的溶液，可洗涤被原油污染的土壤，促进其自然修复，将洗涤后的土壤中的油减少 70% 以上，土壤可在 30-60 天内自然修复。

本发明具有如下特点：利用餐饮废油发酵制备鼠李糖脂，变废为宝，缓解了餐饮废油对环境的压力，经过诱变后产生的鼠李糖脂高产菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ZJU.u1) 相对于普通发酵生产鼠李糖脂的铜绿假单胞菌而言，其发酵周期大大缩短，利用废油作为碳源时，糖脂产量可达到 35-45g/L，可满足工业化要求，与传统工艺相比，生产成本可降低 25% 左右；粗提物本身可自然降解，对环境无害，而利用粗提物作为含油污水处理的添加剂，促进细菌对难溶性物质的摄取和代谢，提高处理效率，可缩短处理时间和提高出水品质；利用粗提物配成的溶液，可有效地处理被原油污染的土壤，促进其自然修复。

附图说明

图 1 是未经诱变的假单胞菌在不同浓度下废油中鼠李糖脂产量；

图 2 是诱变后的假单胞菌在不同浓度下废油的鼠李糖脂产量比较；

图 3 是鼠李糖脂发酵流程示意图；

图中：1. 发酵罐，2. 蠕动泵，3. 泡沫回收器，4. 空气流量计

图 4 去菌体发酵液表面张力和鼠李糖脂浓度之间的关系曲线

具体实施方式

以下将结合附图和具体实例对本发明作进一步说明。

实施例 1：自然菌株与诱变菌株的摇瓶培养：

将 50ml 摇瓶分为两批共十组，一批加入活化过的 3% 紫外诱变过的假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* ZJU.u1，一批加入活化过的 3% 未经诱变过假单胞菌；所用未诱变菌株是从炼油厂排污口土壤中自然筛选得到菌种，经过检测其 16sRNA 后确认为铜绿假单胞菌，而紫外诱变菌是以该菌株为出发菌经过 15W 紫外灯照射 30 秒后筛选得到的高产菌株，被命名为 *Pseudomonas aeruginosa* ZJU.u1。

a、培养基组成 (g/L)：NaNO₃, 4.0; NaCl, 1.0; KCl, 1.0; CaCl₂·2H₂O, 0.1; KH₂PO₄, 3.0; Na₂HPO₄·12H₂O, 3.0; MgSO₄, 0.2; FeSO₄·7H₂O, 0.001; 微量元素, 2mL/L, 组成 (g/L)：FeCl₃·6H₂O 0.08, ZnSO₄·7H₂O 0.75, CuSO₄·5H₂O 0.075, MnSO₄·H₂O 0.75, H₃BO₃, 0.15;

b、在两批十组摇瓶中均分别加入 1%、2%、3%、4%、5% 浓度的烹饪废油进行发酵，总溶液体积为 20ml,摇床振荡时间为 300 r/min；温度 37℃，pH 控制在 6.5~6.8；

发酵 48 和 120 小时的鼠李糖脂含量如图 1、2 所示。

由图中可以看出，经过诱变后的菌种 *Pseudomonas aeruginosa* ZJU.u1 鼠李糖脂的产量要比普通未经诱变菌种产量提高一倍以上，达到 24g/L。

培养基成分经优化后再采用 *Pseudomonas aeruginosa* ZJU.u1 进行鼠李糖脂发酵。在 120 小时时最高产量达到 32g/L，此时培养基中废油用量为 5%(体积比)，而水溶性矿物质组成如下(g/L):NaNO₃, 4.0; NaCl, 1.0; KCl, 1.0; CaCl₂·2H₂O, 0.1; KH₂PO₄, 3.0; Na₂HPO₄·12H₂O, 3.0; MgSO₄, 0.2; FeSO₄·7H₂O, 0.001；微量元素，2mL/L，组成(g/L): FeCl₃·6H₂O 0.08, ZnSO₄·7H₂O 0.75, CuSO₄·5H₂O 0.075, MnSO₄·H₂O 0.75, H₃BO₃, 0.15；

而未经诱变的普通菌种产量最高只能达到 12g/L。

实施例 2：鼠李糖脂粉末状粗产物的制备(一)

1、菌种：发酵菌种为铜绿假单胞菌 ZJU.U1 (*Pseudomonas aeruginosa* ZJU.u1)

2、将菌种置于甘油培养基，放入摇床活化 48-72 小时，以获得足够的接种量用于发酵,活化温度 36 -37℃。pH 控制在 6.5-7.0 之间,震荡时间为 300 rpm。

3、活化培养基组成如下 (g/L)：

甘油, 30; NaNO₃, 4.0; NaCl, 1.0; KCl, 1.0; CaCl₂·2H₂O, 0.1; KH₂PO₄, 3.0; Na₂HPO₄·12H₂O, 3.0; MgSO₄, 0.2; FeSO₄·7H₂O, 0.001；微量元素，2 mL/L，组成(g/L): FeCl₃·6H₂O 0.08, ZnSO₄·7H₂O 0.75, CuSO₄·5H₂O 0.075, MnSO₄·H₂O 0.75, H₃BO₃, 0.15

4、发酵罐生产鼠李糖脂

a、培养基组成 (g/l)：NaNO₃, 5.0; NaCl, 1.0; KCl, 1.0; CaCl₂·2H₂O, 0.06; KH₂PO₄, 4.0; Na₂HPO₄·12H₂O, 4.0; MgSO₄, 0.15; FeSO₄·7H₂O, 0.001；微量元素，2mL/L，组成(g/L): FeCl₃·6H₂O 0.08, ZnSO₄·7H₂O 0.75, CuSO₄·5H₂O 0.075, MnSO₄·H₂O 0.75, H₃BO₃, 0.15。

b、废油含量 40g/L

c、在 50L 发酵罐中装入 50%液量，菌种接种量为发酵液的 3%，培养条件为：通风比 0.6 vvm；搅拌转速 300 r/min；温度 34~37℃，pH6.8~7.0。反应器连接一个泡沫回收装置。由于表面活性剂发酵过程中有大量的泡沫产生，而消泡剂又会对糖脂的生产产生影响，所以如图 3 所示，从发酵罐 1 顶部将泡沫引

出至一个泡沫回收器 3, 通过蠕动泵 2 将沉降下来的发酵液打回发酵罐 1 里面, 4 为空气流量计, 72 小时后补充 0.075kg 的餐饮废油, 120 小时后发酵结束。

d、发酵液通过 30kDa 的聚砜中空纤维超滤组件去除菌体, 获得去菌体发酵液, 将过滤后发酵液进行培养检测, 并未发现残留假单胞菌, 其鼠李糖脂含量为 41.3g/L。去菌体发酵液在进口温度 145℃, 出口温度 85℃, 物料流量为 1.0 m³/h 条件下进行喷雾干燥, 得到含量为 65% 的鼠李糖脂粉末状粗产物。

实施例 3: 鼠李糖脂发酵液的制备 (二)

1、菌种: 同实施例 1

2、活化: 同实施例 1

3、发酵罐生产鼠李糖脂

a、培养基组成 (g/l): NaNO₃, 2.0; NaCl, 5.0; KCl, 0.5; CaCl₂·2H₂O, 0.03; KH₂PO₄, 2.0; Na₂HPO₄·12H₂O, 6.0; MgSO₄, 0.05; FeSO₄·7H₂O, 0.005; 微量元素, 2mL/L, 组成 (g/L): FeCl₃·6H₂O 0.08, ZnSO₄·7H₂O 0.75, CuSO₄·5H₂O 0.075, MnSO₄·H₂O 0.75, H₃BO₃, 0.15。

b、废油含量 30g/L

c、发酵条件: 72 小时后补充的餐饮废油量为 0.125Kg, 其余条件同实施例一; 滤液直接作为鼠李糖脂溶液粗产品。

d、发酵液除菌与粗提物制备: 通过 0.22 微米的聚丙烯腈微滤去除菌体, 其余同实施例 1

最后, 去菌体发酵液中鼠李糖脂产量达到 31.8/L

实施例 4: 鼠李糖脂发酵液的制备 (三)

1、菌种: 同实施例 1;

2、活化: 同实施例 1;

3、发酵罐生产鼠李糖脂:

a、培养基组成 (g/l): NaNO₃, 7.0; NaCl, 0.5; KCl, 5.0; CaCl₂·2H₂O, 0.01; KH₂PO₄, 1.0; Na₂HPO₄·12H₂O, 7.0; MgSO₄, 0.3; FeSO₄·7H₂O, 0.003; 微量元素, 2mL/L, 组成 (g/L): FeCl₃·6H₂O 0.08, ZnSO₄·7H₂O 0.75, CuSO₄·5H₂O 0.075, MnSO₄·H₂O 0.75, H₃BO₃, 0.15。

b、废油含量 50g/L;

c、发酵条件: 72 小时后补充的餐饮废油量为 0.025Kg, 其余条件同实施例一; 120 小时后发酵结束。

d、发酵液除菌与粗提物制备: 通过 70kDa 的聚丙烯腈板式超滤去除菌体,

滤液直接作为鼠李糖脂溶液粗产品。其余条件同实施例 1

用本实施例得到发酵液中鼠李糖脂的产量达到 33.5g/L。

实施例 5：生化污水处理池中加入鼠李糖脂发酵液来提高处理效率

发酵液中鼠李糖脂加入水中会降低水的表面张力，促进生化废水池中细菌对难溶性物质的吸收，缩短处理时间，提高出水水质，表面张力与水中发酵液的关系见附图 2。

将粗提物配成的溶液加入水体含原油 15%炼化厂污水中，进行生化处理，浓度为 0.03-0.05%,其余步骤同传统的生化处理步骤，与未加入发酵液的污水处理相比，周期缩短了 25 %，出水 BOD 降低了 30 %。

将粗提物配成的溶液加入市政污水进行生化处理，浓度为 0.01-3%，与未加入发酵液的污水处理相比，周期缩短了 10%，出水 BOD 降低了 15 %。

将粗提物配成的溶液加入含大量餐饮废油的污水中进行生化处理，浓度为 0.01，与未加入发酵液的污水处理相比，周期缩短了 30%，出水 BOD 降低了 30 %。

实施例 6、发酵液直接用于炼油厂含油土壤的生物修复

将 3g 储油罐罐底油泥(含 10%左右原油)放入 250ml 三角烧瓶中，加入 50ml 水及粗提物，配成不同浓度的溶液,进行搅拌，搅拌速度为 80rpm,环境温度 20℃, 72h 后测泥土中原油含量如下：

鼠李糖脂粗提物加入浓度	0	0.003%	0.006%	0.015%	0.03%
泥土中油含量 (%)	9.32	8.75	6.09	3.25	1.98

经鼠李糖脂粗提物处理后得到的含油废水再补充少量的粗提物(同实施例 5)后通过生化法降解,可达到国家排放标准,洗涤后的污泥中原油含量大幅度降低,其中经 0.03%的鼠李糖脂粗品处理后的泥土中残存油量小于 1.98%,该残余油量在 22 天内自然降解完毕;经 0.015%的鼠李糖脂粗品处理后的泥土中残存油含量也小于 3.25%,在 32 天后自然降解完毕,用水洗涤后的泥土，在 60 天后油含量高于 7.5%。

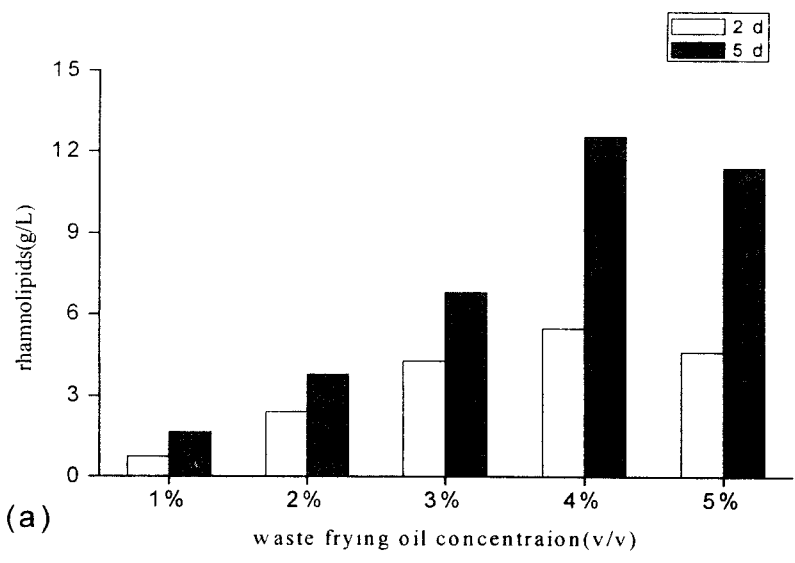


图 1

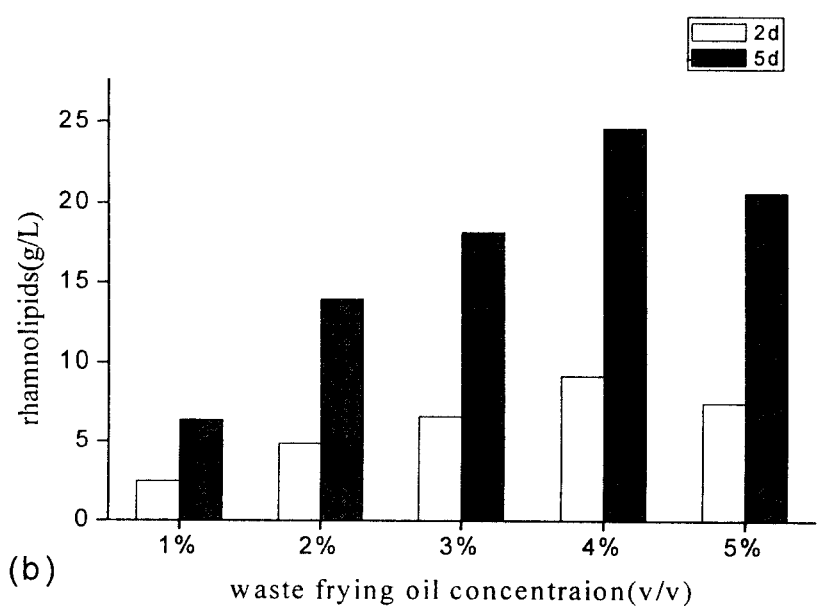


图 2

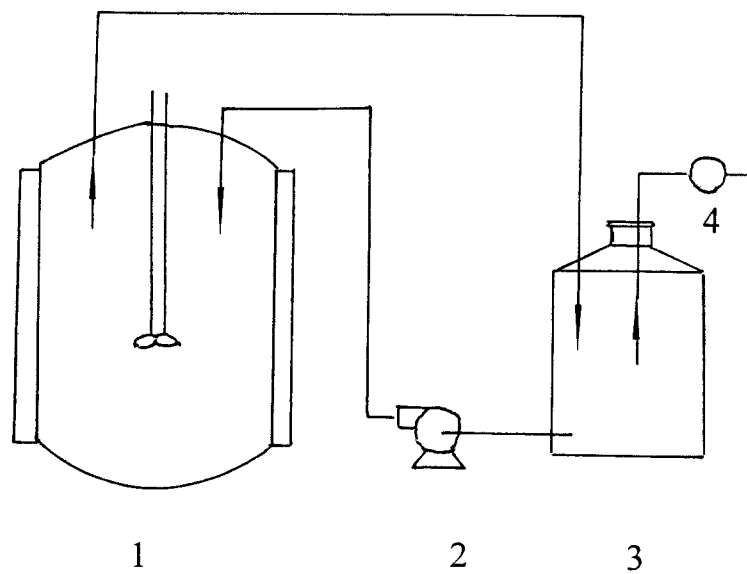


图 3

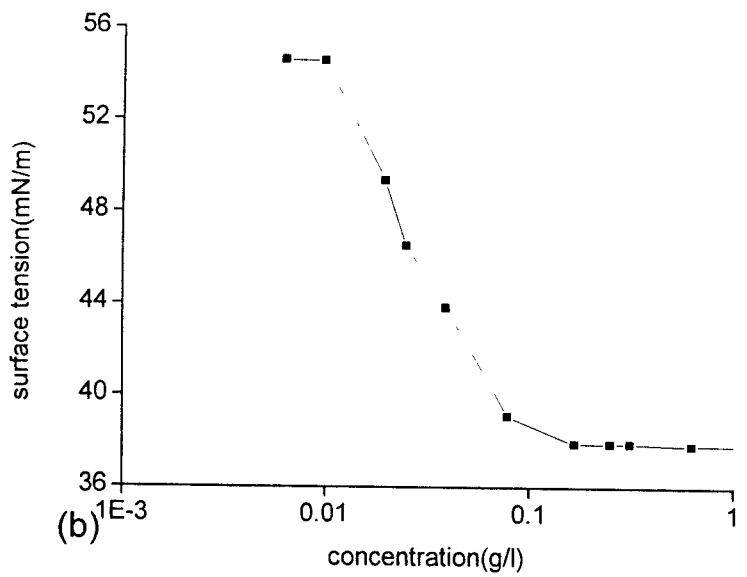


图 4