

بررسی شرایط تولید رامنولیپید حاصل از سویه‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا

فرزانه امینی^۱، نسرین صمدی^۲، مهدبه هرانده^۳، مریم نقدی^۴، انوشه شریفان^۵

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
- ۲- نویسنده مسئول: استادیار گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
پست الکترونیکی: samadin@sina.tums.ac.ir
- ۳- دانشجوی دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴- دانش آموخته دکتری داروسازی، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات زیست فناوری، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۵- استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۱/۱

چکیده

سابقه و هدف: رامنولیپیدها به گروه بیوسورفاکتانت‌های گلیکولیپیدی متعلق هستند و اولین بار از سودوموناس آئروژینوزا جدا شدند. رامنولیپیدها به دلیل سمیت پایین، زیست تخریب پذیری و عملکرد انتخابی، جایگزین مناسبی برای سورفاکتانت‌های صنعتی هستند. با توجه به مزایا و موارد کاربرد گسترده بیوسورفاکتانت‌ها، هدف از این تحقیق، بررسی شرایط تولید بیوسورفاکتانت‌های حاصل از سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۹۰۲۷ و دو سویه جهش یافته M۶ و M۳۴ بود.

مواد و روش‌ها: محیط کشت تولید رامنولیپید (Lindhardt) حاوی منابع مختلف کربن، توسط هر یک از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به طور جداگانه تلقیح شد. سپس محیط کشت در شیکر انکوباتور با زمان، دما و دوره‌های مختلف قرار داده شد. رامنولیپیدها با اسیدی کردن محیط ($\text{pH} < 2$) رسوب داده شدند و سپس با استفاده از حلال‌های آلی استخراج شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که نوع منبع کربن استفاده شده در محیط کشت، سویه باکتریایی، دما و دور گرمخانه گذاری از عوامل مهم در تولید رامنولیپید هستند. بیشترین غلظت رامنولیپید (۲/۲۱ g/l) توسط سویه M۳۴ در دمای 30°C و دور ۱۵۰ rpm پس از ۷ روز گرمخانه گذاری و با استفاده از روغن کانولا به عنوان منبع کربن به دست آمد.

نتیجه‌گیری: می‌توان برای تولید مقادیر بالای رامنولیپید جهت کاربردهای غذایی، شیمیایی، دارویی و بهداشتی از سویه جهش یافته M۳۴ استفاده کرد.

واژگان کلیدی: بیوسورفاکتانت، سودوموناس آئروژینوزا، رامنولیپید

• مقدمه

تشکیل شده‌اند که دارای یک یا دو مولکول رامنوز به عنوان ترکیب کربوهیدراتی و یک یا دو باقی‌مانده β -هیدروکسی دکانوات به عنوان بخش لیپیدی هستند (۴-۶).

بیوسورفاکتانت‌ها برای اولین بار در اواخر سال ۱۹۶۰ به عنوان عوامل حل‌کننده هیدروکربن‌ها مورد توجه قرار گرفتند. کاربرد این مواد در پنج دهه اخیر به علت زیست

بیوسورفاکتانت‌ها متابولیت‌های میکروبی دارای فعالیت سطحی هستند که از طریق تجمع در سطح بینابینی دو فاز غیر قابل اختلاط، کشش سطحی را کاهش می‌دهند و باعث افزایش حلالیت ترکیبات آلی هیدروفوب می‌شوند (۱-۳). رایج‌ترین مواد فعال سطحی با منشاء میکروبی، گلیکولیپیدها و شاخص‌ترین در بین آنها، رامنولیپیدها هستند. رامنولیپیدها عمدتاً از چهار همولوگ متفاوت

طی دو مرحله حاصل شد (۱۱). راشدی و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی تولید رامنولیپید از *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از نسبت‌های متفاوت ملاس پرداختند و نشان دادند که میزان تولید به رشد باکتری، وابسته است (۱۲). Thaniyavarn و همکاران در سال ۲۰۰۶ به بررسی مقدار تولید رامنولیپید حاصل از *Pseudomonas aeruginosa* A41 با استفاده از مقادیر متفاوت کربن از جمله روغن زیتون، پالم و نارگیل پرداختند که بهترین نتیجه با استفاده از روغن زیتون حاصل شد (۱۳). با در نظر گرفتن مزایا و کاربرد گسترده بیوسورفاکتانت‌ها و همچنین در ادامه تحقیقات قبلی انجام شده در آزمایشگاه کنترل میکروبی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران (۱۴)، هدف از این مطالعه، بررسی عوامل مختلف از جمله دما، دور و مدت زمان گرمخانه‌گذاری و منبع کربن بر میزان تولید رامنولیپیدهای حاصل از *Sudomonas aeruginosa* ATCC ۹۰۲۷ و دو سویه جهش یافته M۶ و M۳۴ برای اولین بار بود.

• مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم و شرایط کشت: در این تحقیق از سه سویه *Sudomonas aeruginosa* ATCC ۹۰۲۷ شامل سویه M۶ و M۳۴ استفاده شد. و دو سویه جهش یافته با توانایی تولید مقادیر بالای رامنولیپید با شماره‌های M۶ و M۳۴ استفاده شد. سویه‌های جهش یافته، به روش موتاسیون شیمیایی و با استفاده از اتیل متان سولفونات در آزمایشگاه کنترل میکروبی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهیه و در فریزر 70°C - نگهداری شدند. برای فعال‌سازی اولیه، سویه‌های آزمایشی پس از خروج از فریزر 70°C - روی پلیت‌های حاوی محیط (Merck Co.) agar Nutrient کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 35°C - 30°C گرمخانه‌گذاری شدند.

محیط تولید رامنولیپید: جهت تولید رامنولیپید از ارلن‌های ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت Lindhardt استفاده شد (۱۵، ۶). محیط Lindhardt از اختلاط دو محلول ۱ و ۲ حاوی اجزای ذیل حاصل شد:

تخریب‌پذیری در مقایسه با سورفاکتانت‌های شیمیایی به مقدار زیادی گسترش یافته است (۷). برخی از ویژگی‌های مهم و شاخص بیوسورفاکتانت‌ها که علاقه روز افزون به مصرف آنها در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی را موجب شده، عبارتند از: فعالیت سطحی، سمیت پایین، زیست تخریب‌پذیری، مقاومت در دماهای بالا، pH های مختلف و غلظت‌های زیاد نمک، عملکرد انتخابی، امکان تولید از مواد خام ارزان قیمت و خصوصیات ضد میکروبی (۱۰-۸). با توجه به ویژگی‌های ذکر شده، از بیوسورفاکتانت‌ها می‌توان برای این موارد استفاده کرد: کنترل آگلومره شدن گلبول‌های چربی، پایدار کردن سیستم‌های هوادهی شده، بهبود مدت زمان ماندگاری امولسیون‌های غذایی و فراورده‌های حاوی نشاسته، بهبود خصوصیات رئولوژیکی فراورده‌های دارای پایه چربی، کنترل قوام در صنایع پخت و بستنی‌سازی، به تاخیر انداختن بیاتی، بهبود حجم و مدت زمان ماندگاری فراورده‌های نانویی (۱۰).

بیوسورفاکتانت‌ها می‌توانند از طریق واکنش با پروتئین‌های میکروبی باعث تغییر ساختار آنزیمی و در نتیجه، تغییر فعالیت آنها شوند. این ترکیبات روی برخی از میکروارگانیزم‌ها اثر کشنده دارند؛ به طوری که می‌توان از آنها به عنوان عوامل ضد میکروبی جهت از بین بردن میکروبهای بیماری‌زای انسانی، حیوانی و گیاهی استفاده کرد (۱). از طرف دیگر با تخریب بیوفیلیم‌ها و جلوگیری از تشکیل آنها بر روی سطوح در تماس با مواد غذایی، از آلودگی مواد غذایی به میکروبهای بیماری‌زایی چون *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* جلوگیری می‌شود (۱۰).

مطالعات متعددی در خصوص تولید بیوسورفاکتانت‌ها توسط سویه‌های مختلف میکروبی صورت گرفته است. Albalos و همکاران در سال ۲۰۰۱ از ضایعات کارخانجات روغن سویا به عنوان منبع کربن جهت تولید رامنولیپیدهای جدید از *Pseudomonas aeruginosa* AT10 استفاده کردند. میزان رامنولیپید حاصل در این مطالعه ۹/۵g/l بود که

الف- محلول شماره یک (g/l)

- NaNO₃, 15; KCl, 1.1; NaCl, 1.1; FeSO₄.7H₂O, 0.00028; KH₂PO₄, 3.4; K₂HPO₄, 4.4; MgSO₄.7H₂O, 0.5; yeast extract; 0.5.

به میزان ۵ml منبع کربن (روغن کانولا یا روغن ذرت) به ۹۵ml محلول شماره یک اضافه شد و سپس محلول حاصل در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه سترون شد.

ب- محلول شماره دو (g/l)

- CuSO₄.5H₂O, 0.25; CaCl₂.4H₂O, 0.24; ZnSO₄.7H₂O, 0.29; MnSO₄.H₂O, 0.17.

محلول حاصل توسط صافی غشایی سترون شد و سپس ۰/۵ml از آن به ۱۰۰ml محلول شماره یک (حاوی منبع کربن) اضافه شد. به این ترتیب، محیط کشت جهت کشت باکتری و تولید رامنولیپید آماده شد (۱۵، ۶).

مراحل تولید رامنولیپید: ابتدا سویه مورد آزمایش به محیط Nutrient broth (Merck Co.) منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵-۳۰°C گرمخانه گذاری شد. سپس، توده سلولی در شرایط آسپتیک توسط سانتریفوژ با سرعت ۸۰۰۰rpm و مدت زمان ۱۵ دقیقه جدا شد و پس از شست و شو با بافر فسفات با pH ۷/۲ دوباره سانتریفوژ شد. برای تولید رامنولیپید، توده سلولی حاصل به ۱۰۰ml محیط تولید حاوی یک نوع منبع کربن (روغن کانولا یا روغن ذرت) منتقل شد. برای بررسی شرایط تولید از شیکر انکوباتور با دورهای ۱۵۰ و ۲۵۰ دور در دقیقه، دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷°C و مدت زمان‌های ۵، ۷، ۱۰ و ۱۴ روز استفاده شد.

شناسایی رامنولیپید در محیط کشت: برای تشخیص و پیگیری تولید رامنولیپید در محیط تولید از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC، ۶۰ HF ۲۴۵-۳۶۵) استفاده شد. پس از لکه گذاری و خشک شدن لکه‌ها در مجاورت هوا، صفحه TLC در داخل تانک حاوی فاز متحرک (کلرفرم: متانول: آب ۶۵/۷: ۲۵: ۴) قرار داده شد. پس از رسیدن فاز متحرک به ۱ cm انتهایی، صفحه TLC از تانک خارج شد و برای تشخیص وجود یا عدم وجود رامنولیپید معرف α- نفتول: اسید سولفوریک، روی کل صفحه پاشیده شد. سپس برای ظاهرسازی کامل لکه‌ها، صفحه‌های TLC در فور ۱۱۰°C قرار داده شدند. ظهور لکه‌های قرمز-

قهوه‌ای ناشی از واکنش بین رامنوز و α-نفتول، نشان‌دهنده وجود رامنولیپید است (۱۶).

جداسازی و خالص سازی رامنولیپید: برای استخراج رامنولیپیدهای تولید شده، ابتدا توده سلولی توسط سانتریفوژ با سرعت ۸۰۰۰rpm و مدت زمان ۱۵ دقیقه جدا شد و سپس pH محلول رویی با استفاده از اسید هیدروکلریک ۱ نرمال در حدود ۲ تنظیم شد. برای جداسازی رامنولیپیدها از روش استخراج با حلال آلی استفاده شد. به این ترتیب که محلول رویی اسیدی شده، سه بار با محلول کلروفرم:متانول (۱:۲ v/v) در داخل دکانتور مخلوط شد. هر بار فاز آلی حاوی رامنولیپید جدا شد و فاز آبی بالایی دوباره استخراج شد. پس از تبخیر حلال در دمای ۴۰°C توسط دستگاه تبخیر در خلأ، رامنولیپید تام (مجموع رامنولیپیدهای تولید شده) به دست آمد (۶). برای محاسبه بازده تولید، رامنولیپید تام در آن خلأ تا رسیدن به وزن ثابت خشک و سپس توزین شد.

• یافته‌ها

اثر دماهای مختلف گرمخانه گذاری بر تولید رامنولیپید: تأثیر دماهای مختلف گرمخانه گذاری بر تولید رامنولیپید توسط سه سویه مورد آزمایش، در محیط Lindhardt حاوی روغن ذرت در مدت ۱۰ روز گرمخانه گذاری با دور ۲۵۰rpm بررسی شد (جدول ۱). بیشترین میزان رامنولیپید توسط سویه M۳۴ در دمای ۳۰°C تولید شد و در سایر دماها در محیط کشت، رامنولیپید تولید نشد.

اثر دوره‌های مختلف شیکر انکوباتور بر تولید رامنولیپید: اثر دوره‌های مختلف شیکر انکوباتور بر تولید رامنولیپید توسط سه سویه سودوموناس آئروژینوزا در محیط Lindhardt حاوی روغن ذرت در مدت ۱۰ روز گرمخانه گذاری در دمای ۳۰°C بررسی شد. هر سه سویه مورد آزمایش در ۱۵۰rpm مقدار رامنولیپید بیشتری تولید کردند و در این میان، بیشترین مقدار تولید به سویه M۳۴ مربوط بود (شکل ۱).

اثر مدت زمان گرمخانه گذاری بر تولید رامنولیپید: بررسی اثر مدت زمان گرمخانه گذاری بر تولید رامنولیپید

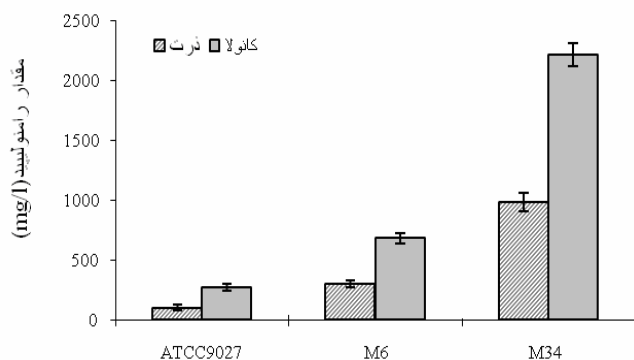
در محیط کشت Lindhardt با استفاده از سه سویه آزمایشی در دمای 30°C ، دور 150rpm در مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری در شکل ۴ آمده است. همان گونه که مشخص است، هر سه سویه با استفاده از روغن کانولا مقدار رامنولیپید بیشتری تولید کردند و سویه M34 بیشترین مقدار رامنولیپید ($2/21\text{ g/l}$) را با استفاده از روغن کانولا تولید کرد.

توسط سه سویه سودوموناس آئروژینوزا در محیط Lindhardt با دمای 30°C و دور 150rpm مشخص شد که هر سه سویه در مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری بیشترین میزان تولید را داشتند و با افزایش مدت زمان گرمخانه‌گذاری، میزان تولید رامنولیپید کاهش یافت (جدول ۲). همچنین، بیشترین میزان تولید رامنولیپید پس از ۷ روز گرمخانه‌گذاری به سویه M34 مربوط بود. نوع منبع کربن: نتایج مربوط به مقدار رامنولیپید تولید شده با دو منبع متفاوت کربن (روغن کانولا و روغن ذرت)

جدول ۱- مقدار رامنولیپید تام تولید شده توسط سه سویه سودوموناس آئروژینوزا در محیط Lindhardt حاوی روغن ذرت، در مدت ۱۰ روز گرمخانه‌گذاری با دور 250rpm و دماهای مختلف

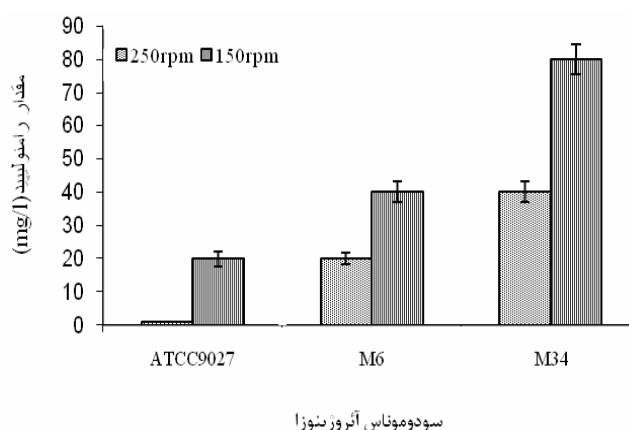
مقدار رامنولیپید (mg/l)			میکروارگانسیم مورد آزمایش
25°C	30°C	37°C	
—	*	—	سودوموناس آئروژینوزا ATCC 9027
—	$20 \pm 2/3$	—	سودوموناس آئروژینوزا M6
—	$40 \pm 3/8$	—	سودوموناس آئروژینوزا M34

* رامنولیپید تولید شده با آزمون α -نفтол واکنش مثبت داد. ولی به دلیل کم بودن مقدار، قابل بازیافت نبود. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده اند.



شکل ۲- مقدار رامنولیپید تام تولید شده توسط سه سویه

سودوموناس آئروژینوزا در دمای 30°C ، دور 150 در دقیقه، مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری و منابع مختلف کربن



شکل ۱- مقدار رامنولیپید تام تولید شده توسط سه سویه

سودوموناس آئروژینوزا در محیط lindhardt حاوی روغن ذرت، در مدت ۱۰ روز و دمای 30°C با دورهای مختلف شیکر انکوباتور

جدول ۲- مقدار رامنولیپید تام تولید شده توسط سه سویه سودوموناس آئروژینوزا در محیط Lindhardt حاوی روغن ذرت در دمای ۳۰°C، دور ۱۵۰rpm و مدت زمان های مختلف گرمخانه گذاری

میکروارگانسیم مورد آزمایش	مقدار رامنولیپید (mg/l)			
	۱۴	۱۰	۷	۵
سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۹۰۲۷	*	۴۰±۳/۷	۱۰۰±۹/۷	۴۰±۴/۲
سودوموناس آئروژینوزا M۶	*	۸۰±۹/۴	۳۰۰±۲۴/۵	۱۰۰±۱۱/۶
سودوموناس آئروژینوزا M۳۴	*	۴۰۰±۲۲/۱	۹۸۰±۵۳/۵	۴۰۰±۱۸/۸

* رامنولیپید تولید شده با آزمون α -نفتول واکنش مثبت داد، ولی قابل بازیافت نبود. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

• بحث

تولید رامنولیپید ولی با استفاده از سویه‌های دیگری استفاده کردند (۱۹، ۱۸).

در این مطالعه، مقدار تولید رامنولیپید در هر سه سویه پس از روز هفتم کاهش یافت. با توجه به مطالب گفته شده، علت کاهش تولید پس از روز هفتم را می‌توان این طور بیان کرد که با کاهش و اتمام منبع کربن پس از روز هفتم (با توجه به ضرورت وجود منبع کربن جهت تولید رامنولیپید) امکان ساخت زنجیره β -هیدروکسی دکانویک اسید و اتصال آن به رامنوز حاصل از D-گلوکز از بین می‌رود و در نتیجه، از یک طرف، تولید رامنولیپید متوقف می‌شود و از طرف دیگر، میکروارگانسیم احتمالاً برای رشد و تکثیر خود از رامنولیپید موجود در محیط به عنوان منبع کربن استفاده می‌کند.

مطالعات نشان داده اند که بهترین منبع کربن برای سودوموناس آئروژینوزا جهت تولید رامنولیپید روغن‌های گیاهی هستند. علت را این طور می‌توان توضیح داد که در حضور ترکیبات آب‌دوست (مانند گلوکز و فروکتوز) به علت حلالیت مناسب این ترکیبات در آب، سلول نیازی به تولید بیوسورفاکتانت و رهاسازی آن در محیط جهت بهبود حلالیت این ترکیبات ندارد، در حالی که در صورت استفاده از منابع کربن آب‌گریز (روغن‌های گیاهی و هیدروکربن‌ها) سلول برای استفاده از این منابع ناچار به تولید بیوسورفاکتانت است (۲۰، ۸، ۴). نتایج این تحقیق که با استفاده از دو نوع روغن گیاهی انجام شد، نشان داد که با استفاده از روغن کانولا در مقایسه با روغن ذرت، رامنولیپید بیشتری تولید می‌شود. علت این افزایش تولید را می‌توان به خصوصیات فیزیکی روغن کانولا مانند

با توجه به مزایای بیوسورفاکتانت‌ها مانند داشتن فعالیت سطحی، سمیت پایین، زیست تخریب‌پذیری، عملکرد انتخابی و امکان تولید از مواد خام ارزان قیمت نسبت به سورفاکتانت‌های مصنوعی، در این تحقیق اثر عوامل مختلف از جمله منبع کربن، دما و مدت زمان گرمخانه‌گذاری و دور مناسب شیکر انکوباتور بر میزان تولید رامنولیپیدهای حاصل از سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۹۰۲۷ و دو سویه جهش یافته M۶ و M۳۴ بررسی شد.

دمای بهینه تولید رامنولیپید توسط هر سه سویه مورد آزمایش ۳۰°C و بیشترین میزان تولید به سویه M۳۴ مربوط بود. تولید رامنولیپید توسط سودوموناس آئروژینوزا به رشد باکتری وابسته است و در نتیجه، بین رشد مصرف سوپسترا و تولید بیوسورفاکتانت رابطه مستقیم وجود دارد (۱۷، ۹). بنابراین، به نظر می‌رسد که علت تولید کمتر رامنولیپید در دماهای ۲۵°C و ۳۷°C رشد کمتر میکروارگانسیم‌ها در دمای ۲۵°C و مصرف مواد غذایی جهت تکثیر سلول‌ها در دمای ۳۷°C باشد.

تولید رامنولیپید در دور ۱۵۰rpm تقریباً دو برابر مقدار آن در دور ۲۵۰rpm بود. احتمالاً هوادهی و همچنین اختلاط روغن با محیط کشت که از عوامل مهم رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت هستند، در دور ۱۵۰rpm بهتر از دوره‌های بالاتر مثل ۲۵۰rpm انجام می‌شود. Haba و همکاران در سال ۲۰۰۰ و Albalos و همکاران در سال ۲۰۰۲ هم از دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm جهت

روغن کانولا به عنوان منبع کربن به دست آمد. از این رو، می‌توان از سویه جهش یافته M۳۴ برای تولید مقادیر بالای رامنولیپید جهت کاربردهای غذایی، شیمیایی، دارویی و بهداشتی استفاده کرد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران برای تامین بودجه لازم جهت انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

گرانروی و همچنین ترکیب شیمیایی آن در مقایسه با روغن ذرت نسبت داد که دسترسی میکروارگانیزم را به منبع کربن برای ساخت زنجیره β -هیدروکسی دکانویک اسید موجود در ساختمان رامنولیپید آسان تر کرده است. نتایج نشان دادند که نوع منبع کربن استفاده شده در محیط کشت، سویه باکتریایی، دما و دور گرمخانه‌گذاری از عوامل مهم در تولید رامنولیپید هستند. بیشترین غلظت رامنولیپید توسط سویه M۳۴ در دمای 30°C و دور ۱۵۰ rpm پس از ۷ روز گرمخانه‌گذاری و با استفاده از

• References

- Heyd M, Kohnert A, Tan T-H, Nusser M, Kirschhöfer F, Brenner-Weiss G, et al. Development and trends of biosurfactant analysis. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391: 1579-1590.
- Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi T K, Sivachidambaram P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Curr Sci* 2008; 94(6): 736-747.
- Van Hamme J D, Singh A, Ward O P. Physiological aspects, part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol Adv* 2006; 24: 604-620.
- Cha M, Lee N, Kim M, Lee S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technol* 2008; 99(7): 2192-2199.
- Monteiro S A, Sasaki G L, de Souza L M, Meira J A, de Araújo J M, Mitchell D A, et al. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chem Phys Lipids* 2007; 147: 1-13.
- Sim L, Ward O, Li ZY. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1997; 19: 232-238.
- Cameotra S S, Makkar R S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7: 262-266.
- Abouseoud M, Maachi R, Amrane A, Boudergua S, Nabi A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination* 2008; 223: 143-151.
- Desai J D, Banat I M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol* 1997; 61: 47-64.
- Nitschke M, Coast S G. Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci Technol* 2007; 18: 252-259.
- Albalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, Garcia F, Manresa A. Physicochemical & antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 2001; 17 1367-1371.
- Rashedi H, Mazaheri Assadi M, Bonakdarpour B, Jamshidi E. Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. *Int J Environ Sci Tech* 2005; 2(1): 59-62.
- Thaniyavarn J, Chongchin A, Noppart W, Thaniyavarn S, Pinphanichakarn P, Leepipatpiboon N et al. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source. *J Gen Appl Microbiol* 2006; 52: 215-222.
- Tahzibi A, Kamal F, Mazaheri Assadi M. Improved Production of Rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant. *Iranian Biomed J* 2004; 8 (1): 25-31.
- Lindhardt T J, Bakhit R, Danies L, Mayerl R, Pickenhagen W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnol Bioeng* 1989; 33: 365-368.
- Benincasa M, Contiero J, Manresa M A, Moraes I O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *J Food Eng* 2002; 54: 283-288.
- Soberon-Chavez G, Lepine F, Deziel E. Production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68: 718-725.
- Haba E, Espuny M J, Busquets M, Manresa A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 379-387.
- Abalos A, Maximo F, Manresa MA, Bastida J. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *J Chem Technol Biotechnol* 2002; 77: 777-784.
- Wei Y H, Chou C L, Chang J S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochem Eng J* 2005; 27 146-154.