مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال چهارم، شماره۱، بهار ۱۳۸۸ ، صفحات ۳۸-۳۳

بررسی شرایط تولید رامنولیپید حاصل از سویه‌های مختلف *سودوموناس آئروژینوزا*

فرزانه امینی[۱] ، نسرین صمدی[۲] ، مهدیه 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 دریافت: ۸۷/۱۱/۱ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱/۲۵

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 صناعی هستند. با توجه به مزایا و موارد کاربرد گسترده بیوسورفاکتانت ها، 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 دورهای مختلف قرار داده شد. رامنولیپیدها با اسیدی کردن محیط (pH <۲) 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 ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm 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

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 (۳-۱). رایج ترین مواد فعال سطحی با منشاء میکروبی، گلیکولیپیدها و شاخص‌ترین در بین آنها، رامنولیپیدها هستند. رامنولیپیدها عمدتاً از چهار همولوگ متفاوت 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 (۶-۴).

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

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، سمّیت پایین، زیست تخریب‌پذیری، مقاومت در دماهای بالا، pH های مختلف و غلظت های 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 بستنی سازی، به تاخیر انداختن بیاتی، بهبود حجم و مدت زمان ماندگاری فراورده‌های نانوایی (۱۰).

بیوسورفاکتانت‌ها می‌توانند از طریق واکنش با پروتئین های میکروبی باعث تغییر ساختار آنزیمی و در نتیجه، تغییر فعالیت آنها شوند. این ترکیبات روی برخی از میکروارگانیسم‌ها اثر کُشنده دارند؛ به طوری که می توان 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 بیوفیلم‌ها و جلوگیری از تشکیل آنها بر روی سطوحِ در تماس با مواد غذایی، از آلودگی مواد غذایی به میکروب‌های بیماری‌زایی چون *Salmonella typhi* ،*Listeria monocytogenes* ، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* 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 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 گرمخانه گذاری و منبع کربن بر میزان تولید رامنولیپیدهای حاصل از *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC ۹۰۲۷ و دو سویه جهش یافته M۶ و M۳۴ برای اولین بار بود.

• مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم و شرایط کشت: در این تحقیق از سه سویه *سودوموناس آئروژینوزا* شامل سویه ATCC ۹۰۲۷ و دو سویه جهش یافته با توانایی تولید مقادیر بالای رامنولیپید با شماره های 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 ۷۰°C- نگهداری شدند. برای فعال‌سازی اولیه، سویه های آزمایشی پس از خروج از فریزر ۷۰°C- روی پلیت های حاوی محیط agar (Merck Co.) Nutrient کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵°C-۳۰ 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:

الف- محلول شماره یک (g/l)

- $NaNO_3$, 15; KCl, 1.1; NaCl, 1.1; $FeSO_4.7H_2O$,0.00028; KH_2PO_4, 3.4; K_2HPO_4, 4.4; $MgSO_4.7H_2O$, 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)

- $CuSO_4.5H_2O$, 0.25; $CaCl_2.4H_2O$, 0.24; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.29; $MnSO_4.H_2O$, 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 دمای۳۵°C-۳۰ 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 و۱۴ 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 وخشک شدن لکه‌ها در مجاورت هوا، صفحه TLC در داخل تانک حاوی فاز متحرک (کلرفرم: متانول: آب ۶۵v/v: 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 لکه ها، صفحه‌های TLC در فور ۱۱۰°C قرار داده شدند . ظهور لکه‌های قرمز-قهوه‌ای ناشی از واکنش بین رامنوز و α-نفتول، نشان‌دهندهٔ 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 (v/v ۱:۲) 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 آون خلأ تا رسیدن به وزن ثابت خشک و سپس توزین شد.

• یافته‌ها

اثر دماهای مختلف گرمخانه گذاری بر تولید رامنولیپید: تأثیر دماهای مختلف گرمخانه‌گذاری بر تولید رامنولیپید توسط سه سویه مورد آزمایش، در محیط Lindhardt حاوی روغن ذرت در مدت ۱۰ روز گرمخانه‌گذاری 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 دورهای مختلف شیکر انکوباتور بر تولید رامنولیپید: اثر دورهای مختلف شیکرانکوباتور بر تولید رامنولیپید توسط سه سویه *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط Lindhardt حاوی روغن ذرت در مدت ۱۰ روز گرمخانه‌گذاری 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 گرمخانه‌گذاری بر تولید رامنولیپید: در بررسی اثر مدت زمان گرمخانه‌گذاری بر تولید رامنولیپید

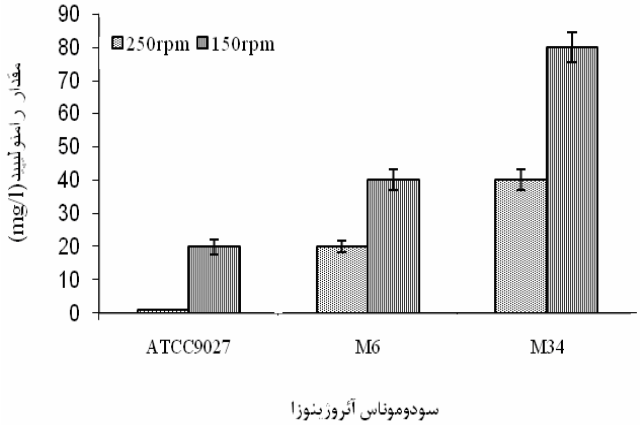
توسط سه سویه *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط Lindhardt با دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm مشخص شد که هر سه سویه در مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری بیشترین میزان تولید را داشتند و با افزایش مدت زمان گرمخانه‌گذاری، میزان تولید رامنولیپید کاهش یافت (جدول ۲). همچنین، بیشترین میزان تولید رامنولیپید پس از ۷ روز گرمخانه‌گذاری به سویه M۳۴ مربوط بود.

نوع منبع کربن: نتایج مربوط به مقدار رامنولیپید تولید شده با دو منبع متفاوت کربن (روغن کانولا و روغن ذرت) در محیط کشت Lindhardt با استفاده از سه سویه آزمایشی در دمای ۳۰°C، دور ۱۵۰rpm 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 M۳۴ بیشترین مقدار رامنولیپید (۲/۲۱ g/l) را با استفاده از روغن کانولا تولید کرد.

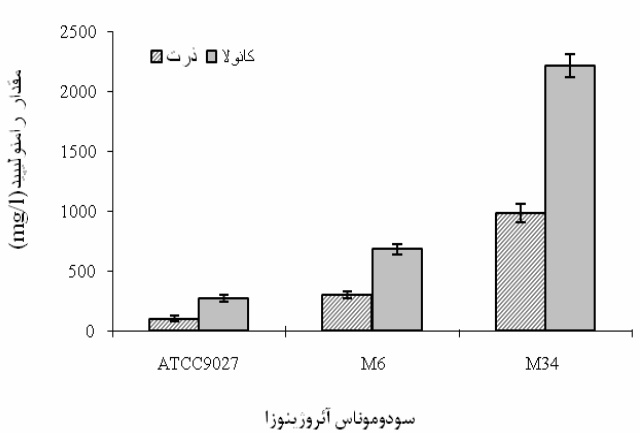
جدول۱- مقدار رامنولیپید تام تولید شده توسط سه سویه *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط Lindhardt حاوی روغن ذرت، در مدت ۱۰ روز گرمخانه‌گذاری با دور ۲۵۰rpm و دماهای مختلف

میکروارگانیسم مورد آزمایش	مقدار رامنولیپید (mg/l)		
	۳۷°C	۳۰°C	۲۵°C
سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۹۰۲۷	ـــ	*	ـــ
سودوموناس آئروژینوزا M۶	ـــ	۲۰±۲/۳	ـــ
سودوموناس آئروژینوزا M۳۴	ـــ	۴۰±۳/۸	ـــ

* رامنولیپید تولید شده با آزمون α-نفتول واکنش مثبت داد. ولی به دلیل کم بودن مقدار، قابل بازیافت نبود.
نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان دا ده شده اند.



شکل ۱- مقدار رامنولیپید تام تولید شده توسط سه سویه سودوموناس آئروژینوزا در محیط lindhardt حاور روغن ذرت، در مدت ۱۰ روز و دمای ۳۰°C با دورهای مختلف شیکر انکوباتور



شکل ۲- مقدار رامنولیپید تام تولید شده توسط سه سویه سودوموناس آئروژینوزا در دمای ۳۰°C ، ۱۵۰ دور در دقیقه، مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری و منابع مختلف کربن

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 گرمخانه‌گذاری

میکروارگانیسم مورد آزمایش	مقدار رامنولیپید (mg/l)			
	۵	۷	۱۰	۱۴
سودوموناس آئروژینوزا ATCC۹۰۲۷	۴۰±۴/۲	۱۰۰±۹/۷	۴۰±۳/۷	*
سودوموناس آئروژینوزا M۶	۱۰۰±۱۱/۶	۳۰۰±۲۴/۵	۸۰±۹/۴	*
سودوموناس آئروژینوزا M۳۴	۴۰۰±۱۸/۸	۹۸۰±۵۳/۵	۴۰۰±۲۲/۱	*

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

• بحث

با توجه به مزایای بیوسورفاکتانت‌ها مانند داشتن فعالیت سطحی، سمّیت 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 وM۳۴ 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 سوبسترا و تولید بیوسورفاکتانت رابطه مستقیم وجود دارد (۱۷، ۹). بنابراین، به نظر می‌رسد که علت تولید کمتر رامنولیپید در دماهای ۲۵ و ۳۷°C رشد کمتر میکروارگانیسم‌ها 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 ۱۵۰ rpm بهتر از دورهای بالاتر مثل ۲۵۰ rpm انجام می‌شود. *Haba* و همکاران در سال ۲۰۰۰ و *Albalos* و همکاران در سال ۲۰۰۲ هم از دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm جهت 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 دکانوئیک 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، میکروارگانیسم احتمالاً برای رشد و تکثیر خود از رامنولیپید موجود در محیط به عنوان منبع کربن استفاده می کند.

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

گرانروی و همچنین ترکیب شیمیایی آن در مقایسه با روغن ذرت نسبت داد که دسترسی میکروارگانیسم را به منبع کربن برای ساخت زنجیره β-هیدروکسی دکانوئیک اسید موجود در ساختمان رامنولیپید آسان‌تر 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 ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm پس از ۷ روز گرمخانه‌گذاری و با استفاده از 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 می شود.

• References

1. 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.
2. Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi T K, Sivachidambaram P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. Curr Sci 2008; 94(6): 736-747.
3. 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.
4. 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.
5. Monteiro S A, Sassaki G L, de Souza L M, Meira J A, de Ara´ujo 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.
6. 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.
7. Cameotra S S, Makkar R S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. Curr Opin Microbiol 2004; 7: 262-266.
8. 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.
9. Desai J D, Banat I M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Mol Biol 1997; 61: 47-64.
10. Nitschke M, Coast S G. Biosurfactants in food industry. Trends Food Sci Technol 2007; 18: 252-259.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Tahzibi A, Kamal F, Mazaheri Assadi M. Improved Production of Rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant. Iranian Biomed J 2004; 8 (1): 25-31.
15. 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.
16. 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.
17. Soberon-Chavez G, Lepine F, Deziel E. Production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68: 718-725.
18. Haba E, Espuny M J, Busquets1 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.
19. 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.
20. 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.