

# تولید آزمایشگاهی بیوسورفکتانت رامنولپید به منظور کاربرد در تولید شامپوهای سبز

مسعود نعمت دوست حقی، حسین امانی\*، شکوفه ملک محمودی

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، بابل، ایران

حسن کریمی نژاد

گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، بابل، ایران

**چکیده:** استفاده از سورفکتانت‌های شیمیایی مانند سدیم لوریل سولفات در شوینده‌ها باعث ایجاد مشکل‌های گوناگونی مانند تحریک پوست و چشم، اختلال دستگاه عصبی و سرطان می‌باشد. بنابراین استفاده از بیوسورفکتانت‌ها به دلیل سمیت کم و تجزیه پذیر بودن مورد توجه فراوانی قرار گرفته‌اند. در این پژوهش تولید یک نمونه آزمایشگاهی شامپوی سبز با استفاده از بیوسورفکتانت رامنولپید مورد بررسی قرار گرفت. نخست بیو سورفکتانت رامنولپید از باکتری سودموناس آرژینوزا PTCC 1340 با استفاده از منبع کرنی روغن سویا در مقیاس آزمایشگاهی در حدود ۱/۴ گرم بر لیتر تولید و اثبات آن با آنالیزهای کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و طیف سنجی تبدیل فوریه فرسرخ (FT-IR) تأیید شد. نتیجه‌های فاکتورهای تاخیر در کاغذ TLC نشان داد که مخلوطی از رامنولپید های نوع ۱ و ۳ تولید شدند. با جایگزین کردن رامنولپیدهای تولید شده به جای سدیم لوریل سولفات خواص ظاهری، شیمیایی و میکروبی شامپوهای سبز تولیدی بررسی شدند. با مقایسه نتیجه‌های به دست آمده با مقادارهای مرجع استاندارد، مشخص شد ویژگی‌های نمونه شامپوهای سبز تهیه شده بر اساس فرمولاسیون ارایه شده در این پژوهش در بازه استاندارد می‌باشند. این نتیجه‌ها می‌تواند گامی در راستای بهبود کیفیت زندگی افراد جامعه باشد.

**واژه‌های کلیدی:** بیوسورفکتانت، رامنولپید، شوینده‌ها، آرایشی و بهداشتی، شامپو سبز.

**KEYWORDS:** Biosurfactant, Rhamnolipid, Detergents, Cosmetics, Green shampoo.

## مقدمه

برای از بین بردن آلودگی‌ها توسط مواد شوینده به ترکیب چند سورفکتانت برای کاهش کشش سطحی و ایجاد پیوند با چربی‌ها است. به‌طور معمول در تهیه شامپو از چهار نوع سورفکتانت گوناگون که براساس بار الکتریکی محلول آب به چهار گروه آنیونی<sup>۱</sup> مانند

\*E-mail: hamani@nit.ac.ir

\* عهده‌دار مکاتب

(۱) Anionic Surfactants

شود [۱۰]. خوردن SLS به احتمال زیاد منجر به اسهال و استفراغ می شود [۹-۱۲]. کودکان و بیماران پوستی بیش تر از سایر اقشار در برابر آسیب های استفاده از SLS قرار دارند. بنابراین تهیه یک شامپوی مناسب و کم زیان بویژه برای این گروه از افراد جامعه ضروری می باشد. امروزه استفاده از بیوسورفکتانت ها برای تولید شامپو های سبز به دلیل تنوع، ساختار سازگار با محیط زیست، زیست تخریب پذیری، سمیت پایین، کف کنندگی بالا به شدت مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است [۱۳]. مهم ترین دسته از بیوسورفکتانت ها با جرم مولکولی پایین شامل گلایکولیپیدها، لیپوپتیدها و فسفولیپیدها می باشند [۱۴]. رامنولیپیدها که ترکیبی از یک یا دو قند رامنوز متصل شده به یک یا دو زنجیره بتا هیدروکسی اسید چرب می باشند و به طور معمول به وسیله باکتری سودوموناس آرژینوزا<sup>۱۶</sup> تولید می شوند از دسته گلایکولیپیدها هستند [۱۵]. به طور طبیعی رامنولیپید تولید شده به وسیله گونه های گوناگون سودوموناس آرژینوزا، مخلوطی از رامنولیپیدهای گوناگون (RL1، RL2، RL3، RL4) است [۱۶، ۱۷]. رامنولیپیدها می توانند کشش سطحی آب را از ۷۲ mN/m به ۳۵ mN/m کاهش دهند [۱۸-۲۰]. این مواد توسط باکتری ها از گلیسرول و گلوکز یا منابع پیچیده کربنی (روغن زیتون، روغن آفتاب گردان) یا پسماند صنایع غذایی (آب پنیر، دورریزهای تقطیر، ملاس، روغن سوخته آشپزی، پساب روغن زیتون، پساب روغن آفتابگردان) به عنوان منبع کربنی تهیه شوند [۲۱]. *دابی و ژو واکر*<sup>۱۷</sup> ۰/۹۲ g/L رامنولیپید را با تلقیح باکتری سودوموناس آرژینوزا BS2 بر روی آب پنیر تولید کردند [۲۲]. در مطالعه دیگر، *مرکادی*<sup>۱۸</sup> و همکاران سودوموناس آرژینوزا JAMM را در محیط کشت با پسماند روغن زیتون تلقیح کردند و در حدود ۱۴ g/L رامنولیپید تولید کردند [۲۳]. در مطالعه دیگر *ها با*<sup>۱۹</sup> و همکاران متوجه شدند گونه ای از سودوموناس آرژینوزا قابلیت تولید رامنولیپید ۱۶/۵ g/L بر روی پسماندهای اسید چرب روغن سویا را دارا است [۲۴]. *ریکالوویچ*<sup>۲۰</sup> و همکاران تأثیر منابع کربنی گوناگون بر روی تولید رامنولیپید به وسیله چندین گونه جدا شده سودوموناس آرژینوزا را آزمایش کردند. بهترین بازده با استفاده از روغن سرخ کردنی آفتابگردان به عنوان

سدیم لوریل اتر سولفات<sup>۱</sup> (SLES)، کاتیونی<sup>۲</sup> مانند ستیل تری متیل آمونیوم برومید<sup>۳</sup> (CTAB)، غیر یونی<sup>۴</sup> مانند کوکونات دی اتانول آمید<sup>۵</sup> و آمفوتری<sup>۶</sup> مانند کوکو آمید و پروپیل بتاین<sup>۷</sup> طبقه بندی می شوند، استفاده می شود [۱-۳]. استفاده روزمره از فرآورده های آرایشی و بهداشتی مانند شامپو، خمیر دندان و ژل حمام پوست افراد را در تماس مستقیم با هزاران ماده شیمیایی گوناگون قرار می دهد که امکان نهفته جذب این مواد از پوست در بدن وجود دارد. جذب مواد شیمیایی از پوست به عامل های بسیاری مانند غلظت مواد، مدت زمان تماس، حالیت ماده شیمیایی بستگی دارد [۴]. سورفکتانت و امولسیفایر سدیم لوریل سولفات<sup>۸</sup> (SLS) به تقریب در همه شامپوها، فرآورده های مراقبت پوست سر، رنگ مو و سفید کننده ها، خمیر دندان ها، مواد شستشو دهنده بدن و تمیز کننده ها، ماده اصلی مواد آرایشی، صابون های مایع دستشویی، مواد شوینده و روغن های مورد استفاده در حمام وجود دارد. استفاده از SLS باعث ایجاد مشکل های گوناگونی مانند تحریک پوست و چشم، مسمومیت بدن، اختلال دستگاه عصبی، تغییرهای بیوشیمیایی یا سلولی، جهش های احتمالی سلولی و سرطان می باشد [۵]. *گرین*<sup>۹</sup> و همکاران جذب SLS را در چشم چندین خرگوش بررسی کردند و متوجه شدند که SLS به سرعت توسط بافت های موجود در ناحیه ای از چشم نمونه های مورد آزمایش انباشته شده و باعث تغییر در بافت پروتئینی چشم آن ها می شود. آن ها گزارش دادند که جذب SLS در چشم خرگوش های جوان تر نسبت به خرگوش های بالغ بیش تر می باشد [۶، ۷]. *بابیچ*<sup>۱۰</sup> و همکاران در سال ۱۹۹۷ میلادی اثرهای SLS را در دهان شویه بر روی زنان را بررسی کردند که نتیجه ها نشان داد SLS در دهان شویه باعث به وجود آمدن اپیتلیوم<sup>۱۱</sup> دهان و احساس سوزش در داوطلبان انسانی می شود [۸]. *لی*<sup>۱۲</sup> و همکاران با پژوهش اثرات SLS بر روی تحریک پوستی در افراد، SLS را " محرک خورنده"<sup>۱۳</sup> توصیف کردند [۹]. *هرلوفسان*<sup>۱۴</sup> و همکاران در پژوهش های خود نتیجه گرفتند که SLS باعث خالی کردن پوست از چربی های حفاظتی و رطوبت موجود در پوست، آسیب DNA، افزایش زخم های آفتی<sup>۱۵</sup> به علت تغییر ماهیت و تحریک مخاط دهان می

(۱) Sodium Lauryl Ether Sulfate

(۳) Cetyltrimethylammonium bromide

(۵) Coconut Diethanolamide

(۷) Cocamidopropyl betaine

(۹) Green et al.

(۱۱) Epithelium

(۱۳) Corrosive Irritant

(۱۵) Aphthous Ulcers

(۱۷) Dubey and Juwarker

(۱۹) Haba et al.

(۲) Cationic surfactants

(۴) Non-ionic surfactants

(۶) Amphoteric surfactants

(۸) Sodium lauryl sulfate

(۱۰) Babich et al.

(۱۲) Lee et al.

(۱۴) Herlofson et al.

(۱۶) Pseudomonas aeruginosa

(۱۸) Mercade et al.

(۲۰) Rikalovic et al.

با توجه به نتیجه‌های آرایه شده و با در نظر گرفتن خطرهای نهفته در استفاده از SLS و نیز انحصار تولید تجاری مواد شوینده سبز با رامنولیبید توسط چند کشور پیشرفته مانند ایالات متحده، آلمان، کره جنوبی و ... رسیدن به دانش فنی بومی استفاده از این مواد سبز در تهیه مواد آرایشی و بهداشتی امری ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین در این پژوهش تلاش شد در گام نخستین تولید آزمایشگاهی رامنولیبید و جایگزینی آن به جای SLS در تهیه فرمولاسیون شوینده سبز مورد بررسی قرار گیرد.

### بخش تجربی

#### پیش‌گشت

در این پژوهش باکتری سودوموناس آرژینوزا PTCC 1340 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) <sup>۱</sup> تهیه شد. ۲۰۰ میلی لیتر پیش‌گشت (LB Broth) در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه ۱۵ دقیقه اتوکلاو و پس از سرد شدن یک لوپ از باکتری به پیش‌گشت تلقیح شد. پیش‌گشت به مدت ۲۴ ساعت درون شیکر انکوباتور (MehrTajhiz ISH554D) در  $37^{\circ}\text{C}$  و با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. پیش‌گشت بعد از ۲۴ ساعت آماده تلقیح به محیط کشت اصلی می‌باشد.

#### محیط کشت اصلی

در این پژوهش از محیط کشت اصلی با نسبت‌های  $15\text{ g/L NaNO}_3$ ،  $1\text{ g/L KCl}$ ،  $0.5\text{ g/L MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ،  $10/11\text{ g/L Na}_2\text{HPO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ ،  $6/27\text{ g/L NaH}_2\text{PO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ ، روغن سویا  $80\text{ g}$ ،  $1\text{ mL/L}$  محلول عنصرهای جزئی  $0.28\text{ g/L FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ ،  $2\text{ g/L risodium citrate}.2\text{H}_2\text{O}$ ،  $1/2\text{ g/L CoCl}_2.5\text{H}_2\text{O}$ ،  $1/4\text{ g/L ZnSO}_4.6\text{H}_2\text{O}$ ،  $1/2\text{ g/L CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ ،  $0.8\text{ g/L MnSO}_4.H_2\text{O}$  استفاده شد [۱۳]. محیط کشت تهیه شده به میزان مورد نیاز تهیه و در  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شده و پس از رسیدن به دمای محیط در زیر هود عمل تلقیح با مقدار ۵ درصد حجمی پیش‌گشت انجام گرفت. سپس نمونه مورد نظر به مدت ۶ روز درون شیکر انکوباتور در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه قرار داده شد و در زمان‌های گوناگون از محیط کشت نمونه گیری انجام گرفت.

منبع کربنی برابر با  $1/3\text{ g/L}$  بدست آمد [۲۵]. در مطالعه آپارنا<sup>۱</sup> و همکاران تولید  $4/97\text{ g/L}$  رامنولیبید با استفاده از تلقیح سودوموناس آرژینوزا 2B را بر روی ماس به دست آمد [۲۶]. به هر حال امروزه کاربرد رامنولیبیدها در زمینه آرایشی و بهداشتی به عنوان امولسیون کننده زمینه چشمگیری از پژوهش‌ها را فراهم کرده است [۲۶، ۲۷]. رامنولیبیدها در فرآورده‌های مراقبت سلامت در چندین فرمولاسیون گوناگون برای نمونه در مواد دفع کننده حشره‌ها، ضد انعقادها، پدهای آکنه، مح فرآورده‌های ضد شوره، محلول‌های لنز چشم، ضد عرق‌ها، فرآورده‌های مراقبت ناخن و خمیر دندان استفاده می‌شوند [۲۷، ۲۹]. ایشیگامی و همکاران<sup>۲</sup> کاربردهای رامنولیبیدها را به عنوان امولسیون کننده‌ها زیستی در فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی سبز گسترش داده‌اند [۳۰]. نتیجه‌های بررسی‌های بافتی و فاضل پور بر روی رامنولیبیدها در فرمولاسیون پودر رختشویی نشان داد که بیوسورفکتانت‌ها در حذف روغن از نمونه‌ها مؤثر بوده و نیز نتیجه‌های زیست تخریب پذیری مناسبی در فرمولاسیون شامل رامنولیبید دیدند [۳۱]. اوزدیمیر و مالا یوگ<sup>۳</sup> رفتار ترکنندگی<sup>۴</sup> مخلوط مونو و دی رامنولیبید را (در نسبت‌های ۱:۱ مونو و دی رامنولیبید) را بررسی کردند [۳۲]. کوستا<sup>۵</sup> و همکاران تغییرهای دینامیکی در زاویه تماس ترشدگی در غلظت‌های گوناگون SDS<sup>۶</sup> و رامنولیبید را بررسی کردند و متوجه شدند که رامنولیبید تولید شده به وسیله سودوموناس آرژینوزا LBI توانایی ترکنندگی بالاتری در مقایسه با SDS را از خود نشان می‌دهد [۳۳]. پیلجاک<sup>۷</sup> و همکاران فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی سبز دارای یک و یا بیش‌تر از بیوسورفکتانت رامنولیبید از برای درمان علامت‌های پیری پوست در یک پماد با مصرف یک تا سه بار در روز را ثبت اختراع کردند [۳۴]. دیسانتو<sup>۸</sup> و همکاران با استفاده از بیوسورفکتانت رامنولیبید، فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی را که در آن‌ها اندازه‌های متفاوتی از بیوسورفکتانت در فرآورده‌های تولیدی گرفته بود را ثبت اختراع و در مقیاس تجاری تولید کردند [۳۵]. همچنین دیسانتو از رامنولیبید برای تهیه اسپری، صابون، شامپو، کرم و فرآورده‌های پاک کننده برای حیوانات خانگی استفاده کرد. هابا و همکاران نشان دادند که میزان خارش پوست برای فرآورده‌های تولید شده توسط رامنولیبید بسیار کم می‌باشد [۳۶].

(۱) Aparna et al.  
(۳) Ozdemir and Malayoglu

(۵) Costa et al.

(۷) Piljac et al.

(۹) Iranian Research Organization for Science and Technology

(۲) Ishigami et al.

(۴) Wetting

(۶) Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)

(۸) Desanto et al.

**جداسازی و استخراج بیوسورفکتانت رامنولپید**

سوپرناتانت پیش از استفاده برای اطمینان از نبود باکتری به مدت ۲۰ دقیقه در دمای °C ۱۲۱ اتوکلاو شد. در نمونه دوم از بیوسورفکتانت خالص (روغن زرد متمایل به قهوه ای) که از سوپرناتانت استخراج شده بود استفاده شد. ترکیب شامپو نمونه اول و دوم عبارتند از:

شامپو نوع اول: آب ۶۵۰ mL، بتائین ۲۵۰ mL، کوکونات ۳ mL، گلیسرین ۳ mL، اوره ۱ گرم، فرمالین ۱ mL، عصاره بابونه ۳۰ mL، CMC<sup>۵</sup> ۶ گرم، بنزوئیک اسید ۱ گرم، سوپرناتانت بیو سورفکتانت ۶۰ mL اسانس ۱ mL.

شامپو نوع دوم: آب ۶۵۰ mL، بتائین ۲۵۰ mL، کوکونات ۲/۵ mL، گلیسرین ۲/۵ mL، اوره ۰/۱۵ گرم، فرمالین ۳ mL، عصاره بابونه ۸۵ mL، CMC<sup>۱۰</sup> ۱۰ گرم، رامنولپید خالص ۳ گرم، اسانس ۲ mL.

**ارزیابی ویژگی‌های شامپوهای تهیه شده**

۲ نمونه شامپو تهیه شده از لحاظ شفافیت، سیالیت به صورت بصری مورد ارزیابی قرار گرفتند [۳۷]. نمونه های تهیه شده به مدت ۶ ماه در دمای محیط نگهداری شدند و هیچ گونه تغییری در شکل ظاهری و سیالیت آنها دیده نشد. برای تعیین درصد محتوی جامد، نخست یک ظرف شیشه‌ای را تمیز و وزن کرده و سپس ۴ گرم شامپوی مورد آزمایش را در آن ریخته و ظرف در آن قرار داده شد تا مایع موجود در آن تبخیر شود. وزن قسمت جامد موجود در شامپو پس از کم کردن وزن مجموع از وزن اولیه محاسبه شد [۳۸]. در ادامه برای تعیین پخش کنندگی آلودگی، دو قطره از شامپو را در یک استوانه مدرج شامل ۱۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته شد و یک قطره جوهر زرد رنگ محلول دی نیتروسالیسیلیک اسید به آن افزوده شد. استوانه مدرج را ۱۰ بار تکان داده و سپس ثابت نگه داشته شد. میزان جوهر در کف به میزان هیچ، کم، متوسط و زیاد تخمین زده شد. برای ارزیابی فعالیت پاک کنندگی شامپوهای تهیه شده، ۵ گرم پارچه نخی را در ۴ گرم روغن سرخ کردنی آفتاب گردان آغشته کرده و سپس در ۲۰۰ mL آب مقطر (۳۵ °C) دارای ۱ گرم شامپو در یک بشر ۵۰۰ mL قرار داده شد. بشر به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۵۰ دور بر دقیقه در شیکرانکوباتور قرار داده شد. پس از خارج کردن بشر از درون شیکر آنکوباتور پارچه از درون ظرف خارج و دوباره درون آن قرار داده شد و پس از خشک شدن در دمای °C ۷۰، دوباره وزن شد. مقدار چربی حذف شده به وسیله معادله (۱) محاسبه شد.

برای جداسازی رامنولپید نخست نمونه‌های تهیه شده با نرمال هگزان در نسبت‌های حجمی برابر درون لوله‌های سانتیفریژ<sup>۱</sup> به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ دور بر دقیقه سانتیفریژ (UNIVERSAL 320) شدند. بعد از پایان سانتیفریژ ترکیبی ۳ فاز شامل مخلوط روغن و نرمال هگزان (فاز بالایی)، محلول آبی دارای رامنولپید (فاز میانی) و بیومس (فاز پایینی) به دست آمد. ۰/۲ میلی لیتر H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ۸۵٪ به مایع دارای رامنولپید افزوده شد تا pH به حدود ۳-۲ رسید. در مرحله بعد اتیل استات (نسبت حجمی ۱/۲۵) با فاز آبی بدست آمده ترکیب و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ دور بر دقیقه سانتیفریژ شد. سرانجام فاز آلی جدا شده که دارای اتیل استات و رامنولپید می‌باشد در تبخیر کننده (LAB DRAGON) در °C ۵۰ و سرعت ۶۰ دور بر دقیقه قرار داده می‌شود. با این روش اتیل استات تبخیر شده و رامنولپید در ته ظرف به صورت روغن زرد رنگ مایل به قهوه‌ای باقی می‌ماند [۱۳].

**آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک<sup>۲</sup> (TLC)**

برای تأیید تولید رامنولپید از آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. نخست چند قطره از بیوسورفکتانت تولید شده روی کاغذ TLC (کد ۱۰۵۵۴۴مرک) نقطه‌گذاری شد، سپس کاغذ TLC به صورت عمودی وارد فاز متحرک شامل (کلروفرم: متانول: استیک اسید با نسبت حجمی (۲:۱۵:۶۵)) قرار داده شد. هنگامی که فاز متحرک به انتهای کاغذ TLC رسید، کاغذ از فاز متحرک خارج و درون محلول آشکارساز (انیسالدئید<sup>۳</sup>: سولفوریک اسید: استیک اسید با نسبت حجمی (۱:۲:۱۰۰)) قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان ۱۰ دقیقه، کاغذ از محلول خارج و در دمای °C ۱۵۰ خشک شد. پس از این مرحله‌ها لکه‌های زرد رنگ مربوط به رامنولپید روی کاغذ ظاهر شدند [۱۵].

**آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ<sup>۴</sup> (FT-IR)**

گروه‌های عاملی تشکیل دهنده بیوسورفکتانت بدست آمده در این پژوهش با استفاده از دستگاه FT-IR (TENSOR 27) مورد بررسی قرار گرفت.

**آماده سازی شامپو و بررسی فرمولاسیون**

در این پژوهش دو نمونه متفاوت شامپو تهیه شد. در نمونه اول از سوپرناتانت به دست آمده پس از ۶ روز کشت باکتری استفاده شد.

(۱) Falcon tube

(۳) Anisaldehyde (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)

(۵) Carboxy methyl cellulose

(۲) Thin Layer Chromatography

(۴) Fourier Transform Infrared Spectrometry

سویا در  $37^{\circ}\text{C}$  و با سرعت  $150$  دور بر دقیقه پس از  $6$  روز به ترتیب  $1/4$  و  $10/3$  می‌باشد.

### بررسی آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

برای استفاده از روش آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) از رامنولپید استخراج شده در روز  $6$  استفاده شد. مقدار فاکتورهای تأخیر به دست آمده در این آنالیز برابر  $0/72$  و  $0/33$  می‌باشند که با مقایسه داده‌های بدست آمده با عددهای موجود در نمونه استاندارد مشخص می‌شود که نتیجه‌های مربوط به رامنولپیدهای نوع  $1$  و  $3$  می‌باشند. بنابراین نتیجه‌های این آنالیز نشان دهنده تأیید تولید بیوسورفکتانت رامنولپید در این پژوهش می‌باشد [۵۴].

### بررسی آنالیز FT-IR رامنولپید تولید شده

نتیجه‌های آنالیز FT-IR رامنولپید به دست آمده از این پژوهش در شکل  $1$  نشان داده شده است. بر طبق شکل  $1$  پهنای باند بین  $3740$  تا  $3400\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات کششی پیوند O-H است. بازه جذب  $3100-2700\text{ cm}^{-1}$  شامل قسمت کششی C-H می‌باشد. در بازه  $1630$  تا  $1707\text{ cm}^{-1}$  پیوند کششی C=O از گروه کربوکسیلیک اسید یافت می‌شود. در  $1740\text{ cm}^{-1}$  ارتعاش‌ها می‌توانند مربوط به پیوند کششی C=O در گروه‌های استری باشند. در طول موج‌های پایین تر C-H خمشی و C-C و C-O کششی یافت می‌شوند. پیک در  $1572/25\text{ cm}^{-1}$  می‌تواند مربوط به کشش غیر متقارن پروتئینی گروه‌های کربوکسیلیکی باشد. پیک همانند در  $1407/5\text{ cm}^{-1}$  می‌تواند مربوط به حالت متقارن آن باشد. پیک‌های  $2963/82$  و  $2924$  می‌تواند به حالت کششی نامتقارن گروه‌های  $\text{CH}_2$  و  $\text{CH}_3$  مربوط باشد. حالت کششی گروه‌های استری در  $1637/48\text{ cm}^{-1}$  C=O می‌توانند یافت شوند. جذب‌های موجود در  $2926/77\text{ cm}^{-1}$  و  $2856/06\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به پیوند C-H در  $\text{CH}_2$  و  $\text{CH}_3$  می‌باشد. پیک‌های  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$  مربوط به حالت متقارن هستند که کاهش تعداد گروه‌های  $\text{CH}_2$  مربوط به انحلال زنجیره اسید چرب می‌تواند باشد. پیک پهن موجود در  $3441/2\text{ cm}^{-1}$  ناشی از پیوند O-H گروه هیدروکسیل و جذب موجود در  $1742/60\text{ cm}^{-1}$  و  $1457/62\text{ cm}^{-1}$  نشان دهنده پیوندهای C=O و C=C می‌باشد. پیوندهای مربوط به O-C-O در  $1187/28\text{ cm}^{-1}$  تا  $1027/83$  جذب نشان داده‌اند. تمامی پیوندها مطابق با ساختار

$$DP (\%) = 100 \left(1 - \frac{T}{C}\right) \quad (1)$$

DP معرف درصد قدرت پاک‌کنندگی، C وزن روغن اولیه در نمونه کنترل شده و T وزن روغن باقی مانده پس از شستشو در نمونه می‌باشند [۳۹]. در ادامه برای تعیین قابلیت کف‌کنندگی روش لوله تکان داده شده مورد استفاده قرار گرفت [۴۰].  $50$  میلی لیتر از محلول  $1\%$  شامپو در یک استوانه مدرج  $250\text{ mL}$  میلی لیتری ریخته شد و  $10$  بار با دست تکان داده شد. سپس حجم کلی میزان کف در فاصله‌های  $1$  دقیقه‌ای برای  $4$  مرتبه ثبت شد. برای مطالعه پایداری  $5\text{ mL}$  از نمونه شامپوهای تولید شده را پس از مخلوط کردن در دو لوله در سمبادهای  $20\text{ mL}$  ریخته و در هر دو لوله بسته شد. یکی از لوله‌ها را به مدت یک هفته در دمای  $45^{\circ}\text{C}$  و دیگری را به مدت یک هفته در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. پس از طی مدت زمان لازم نمونه را از انکوباتور خارج و پس از رسیدن به دمای محیط لوله‌ها به تعداد  $5$  مرتبه سر و ته شد و بعد از  $2$  ساعت از نظر شکل ظاهری بررسی شد. نمونه‌ها باید با نمونه‌های شاهد (نمونه اولیه) از نظر شکل ظاهری یکسان باشند. برای بررسی تأثیر زمان نیز  $5\text{ mL}$  از نمونه را پس از مخلوط کردن در لوله‌های آزمایش  $20\text{ mL}$  ریخته و به مدت  $30$  روز در دمای  $40^{\circ}\text{C}$  نگه‌داری شد، پس از سپری کردن مدت زمان آزمایش نمونه‌ها را از انکوباتور خارج کرده و بعد از رسیدن به دمای محیط به تعداد  $5$  مرتبه سر و ته شد. نمونه‌ها باید از نظر ظاهری با نمونه شاهد یکسان باشند. قابل توجه است که همه آزمایش‌های بالا به صورت بصری مورد بررسی قرار گرفت. در ضمن آنالیزهای کمی نمونه‌های شامپو تولید شده باید در بازه استاندارد باشند. در این پژوهش کل مواد قابل استخراج در الکل (درصد جرمی)، pH محلول  $10\%$ ، فلزهای سنگین بر حسب سرب ( $\mu\text{g/g}$ )، آرسنیک بر حسب ( $\text{AS}_2\text{O}_3$ ) ( $\mu\text{g/g}$ )، فرمالدئید ( $\mu\text{g/g}$ )، دی اکسان ( $\mu\text{g/g}$ )، نیتروز آمین ( $\mu\text{g/Kg}$ ) و عدد زئین بر طبق استاندارد ملی ایران انجام گرفت [۴۸-۴۱] همچنین آنالیزهای میکروبی برای مشخص شدن حضور باکتری‌هایی مانند باکتری‌های هوازی مزوفیل<sup>۲</sup>، اشریشیاکلی<sup>۳</sup>، سودوموناس آرژینوزا، استفیلوکوکوس ارتوس<sup>۴</sup>، کاندیدا البیکنس<sup>۵</sup> بر طبق استاندارد ملی ایران انجام شد [۵۳-۴۹].

### نتیجه‌ها و بحث

#### تولید و ارزیابی بیوسورفکتانت رامنولپید

با بررسی نتیجه‌های به دست آمده در این پژوهش مشخص شد که بالاترین میزان تولیدی رامنولپید و زیست‌توده با منبع کربنی

(۱) Percentage of detergency

(۳) Escherichia coli

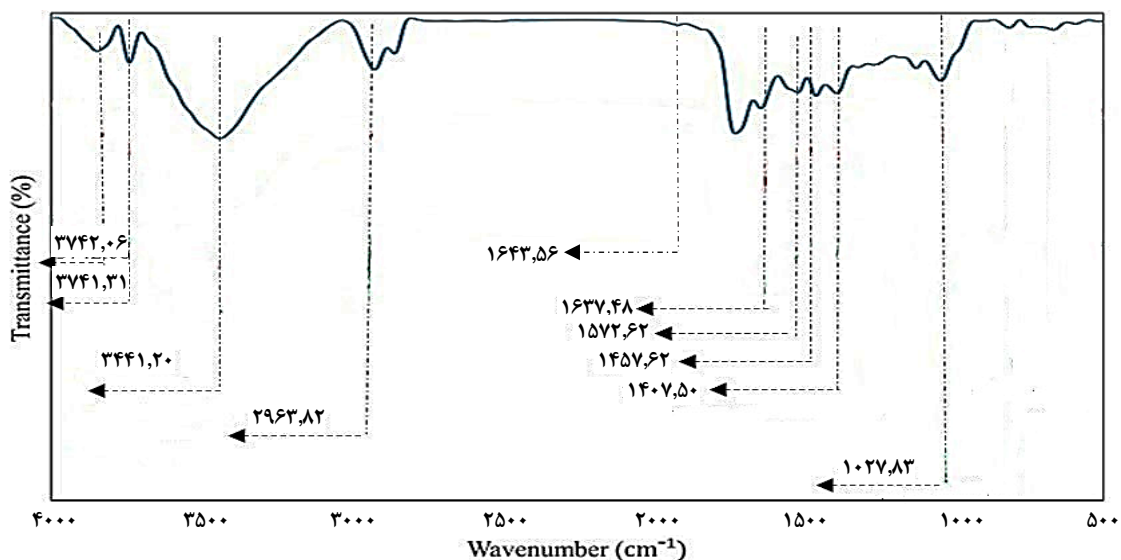
(۵) Candida albicans

(۲) Mesophile aerobic bacteria

(۴) Staphylococcus aureus

جدول ۱: نتیجه‌های آنالیز شیمیایی شامپوهای تهیه شده در این پژوهش

ویژگی ها	استاندارد شامپو بزرگسال	استاندارد شامپو بچه	آنالیز شامپو اول	آنالیز شامپو دوم	روش آزمون طبق استاندارد ملی
آرسنیک ( $\mu\text{g/g}$ )	بیشینه ۲/۰	بیشینه ۲/۰	۰/۲۸	۰/۵۸	[۴۱]
فرمالدئید ( $\mu\text{g/g}$ )	بیشینه ۵۰۰	بیشینه ۲۵۰	۲۶۳/۲	۷۵۵/۵۷	[۴۲]
نیتروز آمین ( $\mu\text{g/Kg}$ )	بیشینه ۵۰	بیشینه ۵۰	۰	۰	[۴۳]
فلز سرب ( $\mu\text{g/g}$ )	کم‌تر از ۲۰	کم‌تر از ۲۰	کم‌تر از ۲۰	کم‌تر از ۲۰	[۴۴]
عدد زئین ( $\frac{100 \text{ mg نیترات}}{100 \text{ ml محلول}}$ )	بیشینه ۴۰۰	بیشینه ۱۰۰	۳۶/۴	۴۴/۸	[۴۵]
دی اکسان ( $\mu\text{g/g}$ )	بیشینه ۱۰	بیشینه ۱۰	۰	۰	[۴۶]
کل مواد قابل استخراج در الکل (درصد جرمی)	۱۲	۱۰	۱۲	۱۰/۸۴	[۴۷]
pH محلول ۱٪	۷/۵-۴/۵	۷-۴/۵	۵/۳	۵/۶	[۴۸]



شکل ۱: طیف جذبی آنالیز FT-IR بیوسورفکتانت رامنولیبید تولید شده

در فرمولاسیون نمونه ۲ استفاده شد (ردیف ۵). با توجه به خطرناک توصیف شدن فرمالین برای سلامت انسان توسط سازمان‌های مرتبط، بهتر است از سایر نگه دارنده‌ها به جای فرمالین در شامپو استفاده شود.

رامنولیبید استاندارد می‌باشد [۵۷-۵۵]. با توجه به نتیجه‌های FT-IR می‌توان نتیجه گرفت که ماده تولید شده در این آنالیز رامنولیبید است.

**بررسی ویژگی‌های شامپوی تولید شده بر اساس فرمولاسیون رامنولیبید**

**بررسی میکروبی شامپوهای سبز تهیه شده**  
 نتیجه‌های آنالیز میکروبی در جدول ۲ نشان داده شده است. براساس این جدول شمارش کلی باکتری‌های هوازی مزوفیل، اشریشیاکلی، سودوموناس آرژینوزا، استافیلوکوکوس ارئوس، کاندیدا البیکنس مورد بررسی قرار گرفت. بر طبق جدول ۲ آزمایش‌های میکروبی مربوط به نمونه‌ها نشان دهنده استاندارد بودن آن‌ها از لحاظ میکروبی می‌باشد.

آنالیز کمی شامپوهای تهیه شده در این پژوهش در جدول ۱ ارائه شده است. نتیجه‌ها نشان می‌دهد که آنالیز شیمیایی نمونه شامپوهای تهیه شده در بازه استاندارد ملی می‌باشند که این بیانگر قابل پذیرش بودن نمونه‌های تهیه شده می‌باشد. در آزمایش‌های مربوط به نمونه دوم که از رامنولیبید به صورت خالص به جای SLS استفاده شد نیز نتیجه‌های همانندی به دست آمد. تنها در نمونه دوم برای اطمینان از رشد نکردن هرگونه باکتری از فرمالین بیش‌تری

جدول ۲: نتیجه‌های آنالیز میکروبی شامپوهای سبز تولید شده در این پژوهش

روش (استاندارد)	آنالیز شامپو دوم	آنالیز شامپو اول	استاندارد کودکان (CFU)	استاندارد بزرگسال (CFU)	باکتری
[۴۹]	منفی	منفی	منفی	منفی	کاندیدا آلبیکنس
[۵۰]	منفی	منفی	منفی	منفی	اشریشیاکلی
[۵۱]	منفی	منفی	منفی	منفی	استافیلوکوکوس ارئوس
[۵۲]	منفی	منفی	منفی	منفی	سودوموناس آرژینوزا
[۵۳]	کم‌تر از ده	کم‌تر از ده	۱۰۰	۵۰۰	باکتری‌های هوازی مزوفیل

جدول ۳: آنالیز بصری انجام شده بر روی شامپوهای سبز تولید شده در این پژوهش پس از شش ماه

شامپوی اولیه نمونه اول	شامپوی اولیه نمونه دوم	شامپو نمونه اول بعد از شش ماه	شامپو نمونه دوم بعد از شش ماه	رنگ
زرد	زرد	زرد	زرد	رنگ
شفاف	شفاف	شفاف	شفاف	شفافیت
۵/۳	۵/۶	۵/۳	۵/۶	pH محلول ۱۰ درصد
۹٪	۱۲٪	۸/۴	۱۱٪	درصد محتوی جامد
۱۶۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	حجم کف تولیدی (mL)
۱۷٪	۱۲٪	۱۵/۳۰٪	۱۱/۱٪	درصد قدرت پاک‌کنندگی

### ارزیابی بصری شامپوهای سبز تولید شده

به منظور بررسی فرمولاسیون شامپوی تهیه شده آنالیزهایی شامل ارزیابی تعیین وزن خشک باقی مانده، شفافیت، pH محلول ۱۰٪، درصد محتوی جامد، حجم کف تولیدی، درصد قدرت پاک‌کنندگی در جدول ۳ آورده شده است. همچنین شامپوهای نمونه یک و دو بعد از شش ماه بررسی پایداری شدند که نتیجه‌ها نشان داد ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن‌ها تغییر نکرده است. با مقایسه جدول ۳ و جدول ۱ مشخص می‌شود که شامپوهای تولیدی در بازه استاندارد ملی هستند که نشان دهنده پایدار بودن فرمولاسیون مورد استفاده می‌باشد. به هر حال نتیجه‌های به‌دست آمده از این پژوهش یک گام آغازین آزمایشگاهی است. بایستی توجه داشت که در گام بعدی باید اثرهای منجر به تحریک‌های پوستی و آزمایش‌های بالینی را بر روی گروه‌های هدف از جمله داوطلبان انسانی بررسی شود که این موضوع می‌تواند در پژوهش‌های آینده مد نظر قرار گیرد.

موجود در بازار و تصفیه آسان تر پسماند‌های به جا مانده فرآورده‌های پاک‌کننده، به کار بردن سورفکتانت‌های زیستی گامی رو به جلو در پاک‌سازی و احیای محیط زیست را نوید می‌دهد. در این پژوهش نخست بیوسورفکتانت رامنولپید از باکتری سودوموناس آرژینوزا PTCC 1340 تولید و اثبات آن با آنالیزهای کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرسوخ (FT-IR) تأیید شد. با جایگزین کردن رامنولپیدهای تولید شده به جای سدیم لوریل سولفات خاص ظاهری، شیمیایی و میکروبی شامپوهای سبز تولیدی بررسی شدند. نتیجه‌های این پژوهش نشان داد که بیوسورفکتانت رامنولپید می‌تواند جایگزین مناسبی برای سورفکتانت‌های شیمیایی خطرناکی مانند SLS باشد. بنابراین می‌توان با ادامه پژوهش‌ها در ساخت و تولید شوینده‌ها با بیوسورفکتانت‌ها و کسب دانش فنی بومی آن گامی در برای بهبود کیفیت زندگی افراد جامعه برداشت.

### قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل به دلیل حمایت‌های صورت گرفته از این پایان‌نامه با اعتبار پژوهشی شماره BNUT/۳۷۰۳۴۲/۹۷ اعلام می‌دارند.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۰۲

### نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش مصرف لوازم آرایشی و بهداشتی در سطح جامعه، تهیه فرآورده‌های سبز برای سلامت جامعه و محیط زیست نیازی اساسی می‌باشد. استفاده از سورفکتانت‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها و یا گیاهان می‌تواند کمک چشمگیری در بهبود سلامت افراد جامعه داشته باشد. از سوی دیگر به‌خاطر زیست‌تخریب‌پذیری بالای بیوسورفکتانت‌ها و تجزیه سریع‌تر نسبت به نمونه‌های شیمیایی

## مراجع

- [1] Nasrollahi S., Alibakhshi H., Firooz A., **Determination of Concentration of Anionic and Amphoteric Surfactants in Shampoos Using Potentiometric Titration Method**, *Dermatology and Cosmetic*. **4**: 188-195 (2013).
- [2] Rieger M. M., Rhein L.D., Dekker M., "Surfactants in Cosmetics," *Flavour and Fragrance Journal*. **13(4)**: 279-281 (1997).
- [3] Lorna A., **Types of Surfactants in Your Shampoo**. Available at: <http://www.hairmomentum.com/types-of-surfactants-in-shampoo>. Accessed August 19, (2018).
- [4] Boss J. D., **The 500 Dalton Rule for the Skin Penetration of Chemical Compounds and Drugs**, *Experimental Dermatology*. **9(3)**: 165-169 (2001).
- [5] Boss J. D., **Environmental Working Group: Skin Deep Cosmetic Safety Database: U.S. Food and Drug Administration**, **8(2)**: (2006).
- [6] B. P., "Sodium Lauryl Sulfate", Paula's Choice: Superior Skin Care, Expert Information
- [7] Green K., Chapman J.M., Cheeks L., Clayton M. R., **Detergent Penetration into Young and Adult Rabbit Eyes Green: Comparative Pharmacokinetics**, *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology*, **6(2)**: 89-107 (1987).
- [8] Babich H., **Sodium Lauryl Sulfate and Triclosan: In Vitro Cytotoxicity Studies with Gingival Cells**, **19**: 189-196 (1997).
- [9] Lee C.H., Kim H. W., Han H.J., Park C.W., **A Comparison Study of Nonanoic Acid and Sodium Lauryl Sulfate in Skin Irritation**, *Exogenous Dermatology*, **3(1)**: 19-25 (2004).
- [10] Herlofson B. B., **Sodium Lauryl Sulfate and Recurrent Aphthous Ulcers: A Preliminary Study**, *Acta Odontol Scand*, **3(2)**: 257-259 (1994).
- [11] "Sodium Lauryl Sulfate", Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium\\_laureth\\_sulfate](https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_laureth_sulfate) . Accessed March 4, (2019).
- [12] V. J., **Death Traps in the Cosmetics We Use**, Consumer Health Organization of Canada.
- [۱۳] امانی ح.، تولید بیوسورفکتانت‌های رامنولیپید به منظور کاربرد در فرایند ازدیاد برداشت نفت، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، **۳۲(۱)**: ۸۳ تا ۷۳ (۱۳۹۲).
- [14] Van Hamme J., Singh A., Ward O., **Physiological Aspects. Part 1 in a Series of Papers Devoted to Surfactants in Microbiology and Biotechnology**, *Biotechnol Adv*, **24(6)**: 604-20 (2006).
- [15] Amani H., **Application of a Dynamic Method for the Volumetric Mass Transfer Coefficient Determination in the Scale-Up of Rhamnolipid Biosurfactant Production**, *Journal of Surfactants and Detergents*, **21(6)**: 827-833 (2018).
- [16] Yun Nian T., Qingxin L., **Microbial Production of Rhamnolipids Using Sugars as Carbon Sources**, *Microbial Cell Factories*, **17(1)**: 89-89 (2018).



- [17] Mohammed A., Tayel A., Elguindy N.M., [Production of New Rhamnolipids Rha C16-C16 by Burkholderia sp. through Biodegradation of Diesel and Biodiesel](#), *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, **7(4)**: 492-498 (2018).
- [18] Costa S.G., Nitschke M., Haddad R., Eberlin M.N., Contiero J., [Production of Pseudomonas aeruginosa LBI Rhamnolipids Following Growth on Brazilian Native Oils](#), *Process Biochemistry*, **41(2)**: 483-488 (2006).
- [19] Heyd M., [Development and Trends of Biosurfactant Analysis and Purification Using Rhamnolipids as an Example](#), *Anal Bioanal Chem*, **391(5)**: 1579-90 (2008).
- [20] Marchant R., Banat I. M., ["Microbial Biosurfactants: Challenges and Opportunities for Future Exploitation"](#), *Trends Biotechnol*, **30(11)**: 558-65 (2012).
- [21] Rikalovic M.G., Déziel E., Gojic-Cvijovic G., [Comparative Analysis of Rhamnolipids from Novel Environmental Isolates of Pseudomonas Aeruginosa](#), *Journal of Surfactants and Detergents*, **16(5)**: 673-682 (2013).
- [22] 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.*, **88(3)**: 379-87 (2000).
- [23] Benincasa M., Contiero J., Manresa M.A., Moraes I.O., ["Rhamnolipid Production by Pseudomonas aeruginosa LBI Growing on Soapstock as the Sole Carbon Source"](#), *Journal of Food Engineering*, **54(4)**: 283-288 (2002).
- [24] Nitschke M., Costa S. G., Contiero J., ["Structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste"](#), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **160(7)**: 2066-74 (2001).
- [25] Lebron-Paler A., Pemberton J.E., Becker B.A., Otto W.H., Larive C.K., Maier R.M., [Determination of the Acid Dissociation Constant of the Biosurfactant Monorhamnolipid in Aqueous Solution by Potentiometric and Spectroscopic Methods](#), *Anal. Chem.*, **78(22)**: 7649-58 (2006).
- [26] Dubeau D., Déziel E., Woods D.E., Lépine F., [Burkholderia thailandensis Harbors Two Identical rhl Gene Clusters Responsible for the Biosynthesis of Rhamnolipids](#), *Microbiology*, **9(1)**: 263-270 (2009).
- [27] Visnja P.G., [Pharmaceutical Preparation Based on Rhamnolipid, Against Dermatological Diseases, e.g papilloma Virus Infection](#) (1995).
- [28] Kleckner V., Kosaric N., [Biosurfactants. Production. Properties](#) (1993).
- [29] Vasileva-Tonkova E., Galabova D., Karpenko E., Shulga A., [Biosurfactant-Rhamnolipid Effects on Yeast Cells, \(in En.\)](#), *Lett. Appl. Microbiol.*, **33(4)**: 280-4 (2001).
- [30] Ishigami Y.G.Y., Nagahora H., Hongu T., Yamaguchi M., [Rhamnolipid Liposomes, USP4902512A](#), (1990).
- [31] Bafghi M.K., Fazelipoor H.M., [Application of Rhamnolipid in the Formulation of a Detergent, Surfactants Deterg](#), **15**: 679-684 (2012).

- [32] Ozdemir G, Malayoglu U., [Wetting Characteristics of Aqueous Rhamnolipids Solutions](#), *Colloids Surf B Biointerfaces*, **39(1)**: 1-7 (2004).
- [33] Costa S., [Wettability of Aqueous Rhamnolipids Solutions Produced by Pseudomonas aeruginosa LBI](#), *Journal of Surfactants and Detergents*, **12(2)**: 125-130 (2009).
- [34] Piljac P.G.T., [Use of Rhamnolipids as Cosmetics](#), *EP 1056462 B1* (2007).
- [35] DeSanto K. (2011). *U.S.P. 7,985,722*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. (2006).
- [36] Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M. J., Infante M. R., Manresa A., [Physicochemical Characterization and Antimicrobial Properties of Rhamnolipids Produced by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCBIM 40044](#), *Biotechnol Bioeng*, **81(3)**: 316-22 (2003).
- [37] Aghel N., [Formulation of a Herbal Shampoo Using Total Saponins of Acanthophyllum squarrosum](#), *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **6(3)**: 167-172 (2007).
- [38] Ashok Kumar R.R.M., [Evaluation of Prepared Shampoo Formulations and to Compare Formulated Shampoo with Marketed Shampoos](#), *Semantic Scholar*, **3(1)**: 35-40 (2010).
- [39] Sharma P.P., "Cosmetic Formulation, Manufacturing, and Quality Control", 3rd ed., Vandana Publications, Lucknow, 644-647 (1998).
- [40] Klein K., [Evaluating Shampoo Foam](#), *Cosmetics and Toiletries Magazine*, **10(119)**: 32-35 (2004).
- [41] [National Iranian Standard No. 1106: "Arsenic Measurement Method in Cosmetic Products"](#) (2001)
- [42] [National Iranian Standards No. 3573: "Cosmetic Products - Free Formaldehyde Measurement"](#) (1995).
- [43] [Iranian National Standard](#)", No. 11107; "Cosmetic Products - Measuring Nitrosamine", (2008).
- [44] [National Iranian Standard: "Cosmetic Products - Measurements of Heavy Metals"](#) (2009).
- [45] [Association of Detergents](#), "Cosmetics and Health of Iran" (2012).
- [46] [EN 12974: "Surface Active Agent-Determination of 1, 4 -Dioxane in Alkyl-ethoxy Sulfate Products by GLC/Head Space Procedure"](#) (1999).
- [47] [National Iranian Standard No. 18-3178: "Test Methods for Scrapers - Method for Measuring Total Ethanol Extractable Material"](#).
- [48] [National Iranian Standard No. 18-3178: "Test Methods for Scavengers - Method for Measuring Acidity and Water Solubility"](#).
- [49] [National Iranian Standard No. 9607: "Microbiology of Health Products, Cosmetics - Search and Identification of Candida Albicans"](#).
- [50] [National Iranian Standard No. 9933: "Microbiology of Health Products, Cosmetics - Searching for and Identifying Escherichia coli"](#).
- [51] [National Iranian Standard No. 9934: "Microbiology of Health Products, Cosmetic - Search and Identification of Staphylococcus aureus"](#).

- [52] [National Standard of Iran No. 9793](#): "Microbiology of Health Products, Cosmetics - Search and Identification of *Pseudomonas aeruginosa*".
- [53] [National Iranian Standard No. 11804](#): "Microbiology of Health Products, Cosmetics - Search and Identification of Aerobic Mesophyte Bacteria".
- [54] Guihong L., Qiang F., Yongqiang L., Chao C., Guixiang L., Yu L., Xiaobo Y., [Rhamnolipid Production from Waste Cooking Oil Using \*Pseudomonas SWP-4\*](#), *Biochemical Engineering Journal*. **101**: 44-54 (2015).
- [55] Lan G., [Rhamnolipid Production from Waste Cooking Oil Using \*Pseudomonas SWP-4\*](#), *Biochemical Engineering Journal*. **101**: 44-54 (2015).
- [56] Deepika K., Sridhar P. R., Bramhachari. P., "[Characterization and Antifungal Properties of Rhamnolipids Produced by Mangrove Sediment Bacterium \*Pseudomonas Aeruginosa\* Strain KVD-HM52](#)", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **4(4)**: 608-615 (2015).
- [57] Tahzibi A., Kamal F., Mazaheri Assadi M., [Improved Production of Rhamnolipids by a \*Pseudomonas aeruginosa\* Mutant](#), *Iranian Biomedical Journal*, **8(1)**: 25- 31 (2004).