# بهینه‌سازی تولید سورفکتین با استفاده از باکتری *Bacillus subtilis NLIM 0110* درون راکتور زیستی لرزان

حسین امانی*+
بابل، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی

فرزانه شاهمیرزایی
تهران، دانشگاه تهران، دانشکده مهندسی شیمی

**چکیده:** در این پژوهش، تولید بیوسورفکتانت سورفکتین با استفاده از باکتری *Bacillus subtilis NLIM 0110* مورد مطالعه قرار گرفت. این باکتری از خاک یک منطقه کشاورزی ایران جدا شده بود. شرایط بهینه برای تولید سورفکتین در مقیاس ارلن برابر ۲۵۰ rpm و ۳۷°C به‌دست آمد. در این شرایط بهینه، بیشترین مقدار تولید زیست توده و سورفکتین در ارلن به ترتیب به ۴ g/L و ۱٫۸ g/L رسید. بازده سورفکتین روی بیومس $Y_{p/x}$ (g/g)، بازده سورفکتین روی ساکاروز $Y_{p/s}$ (g/g) و نرخ کل تولید سورفکتین Y (mg/l. h) به ترتیب ۰٫۴۵ ، ۰٫۱۸ و ۳۰ به‌دست آمد. نتیجه‌ها همچنین نشان داد برای این میکروارگانیسم، تولید سورفکتین وابسته به رشد باکتری است. سورفکتین تولید شده توانست فعالیت سطحی خوبی از خود نشان دهد به طوری که کشش سطحی از ۷۰ mN/m به مقدار ۲۵ mN/m رسید. بنابراین، بیوسورفکتانت تولیدی را می‌توان برای کاربردهای صنعتی پیشنهاد داد.

**واژه‌های کلیدی:** بیوسورفکتانت، باسیلوس سابتیلیس، کشش سطحی، سورفکتین، بهینه‌سازی.

**KEY WORDS:** *Biosurfactant, Bacillus subtilis, Surface tension, Surfactin, Optimization.*

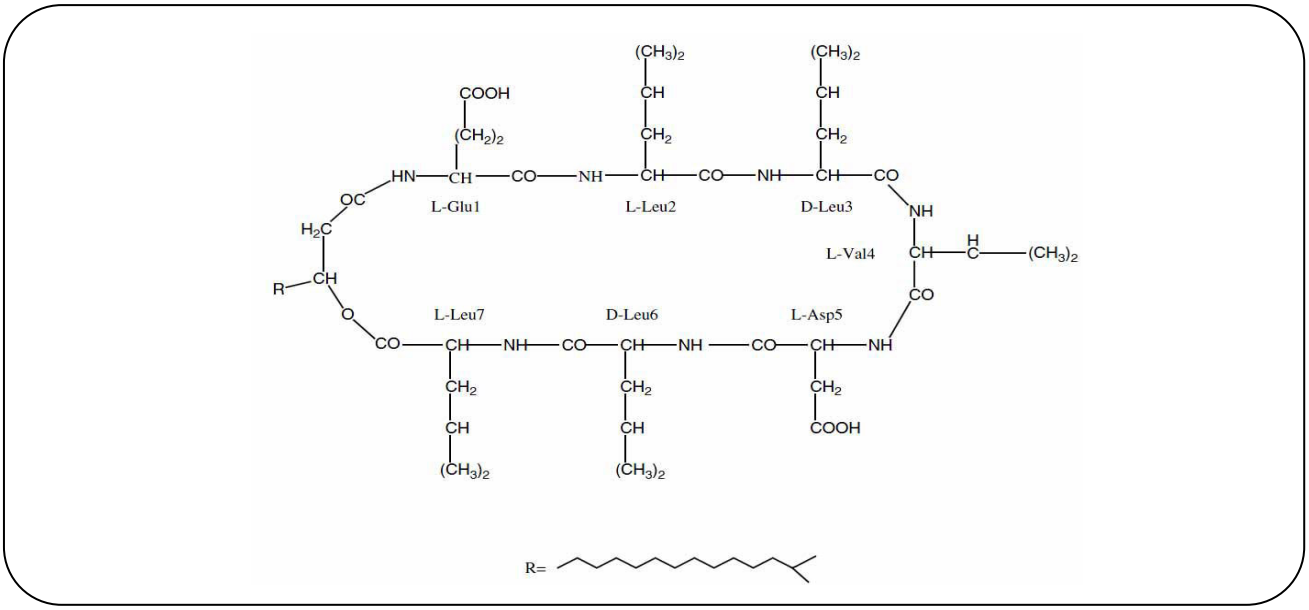
## مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها یکی از فراورده‌های مهم در میکروبیولوژی صنعتی می‌باشند که توسط میکروارگانیسم‌ها به ویژه باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تولید می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها به دلیل دارا بودن برتری‌هایی مانند کاهش کشش سطحی و بین سطحی، مقاومت دمایی و تجزیه‌پذیری در صنایع گوناگون مانند نفت و پتروشیمی، غذایی، داروسازی، پزشکی، کشاورزی، آرایشی و نساجی اهمیت بسیار دارند. بنا به دلایلی که مهمترین آنها را می‌توان تنوع زیاد، کم خطر بودن برای محیط زیست، سمیت کمتر و قابلیت بازگشت به اکوسیستم، استفاده از بیوسورفکتانت‌ها بر سورفکتانت‌های شیمیایی برتری داده می‌شود [۸-۱].

برای تولید بیوسورفکتانت‌ها، هزینه زیادی باید صرف تهیه مواد اولیه، طراحی و ساخت راکتور زیستی، تولید و خالص‌سازی آنها شود. راه حل‌های گوناگونی برای تولید بیوسورفکتانت ارزان پیشنهاد شده است از آنها می‌توان به بهینه‌سازی محیط کشت، بهینه‌سازی شرایط عملیاتی راکتورهای زیستی و جهش ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها اشاره نمود [۱۰ ، ۹]. پژوهشگران همچنین روش دیگری برای کاهش هزینه‌ها پیشنهاد داده‌اند. به عنوان مثال در این روش‌ها، ابتدا با هزینه بسیار پایین مقدار عامل بزرگ‌سازی(۱) دستگاه‌ها، مانند $K_La$(۲) را در حالت بهینه در ارلن تعیین می‌کنند سپس با استفاده از این مقدار به‌دست آمده، مقدارهای هوادهی و دور همزن

*عهده دار مکاتبات
+E-mail: hamani@nit.ac.ir

(۱) Scale up
(۲) Volumetric oxygen transfer coefficient




**شکل ۱ـ ساختمان سورفکتین تولید شده توسط باکتری *باسیلوس سابتیلیس*[۱۱].**

را در راکتور زیستی (مقیاس بالاتر) تعیین می‌کنند، بنابراین دیگر نیازی به بهینه‌سازی دور همزن و هوادهی در راکتور زیستی ندارند که این موضوع کمک زیادی به پایین آمدن هزینه‌ها به خاطر مصرف نشدن محیط کشت می‌کند [۱۰ ، ۹].

سورفکتین(۱) تولید شده توسط گونه‌های گوناگون *باسیلوس سابتیلیس*(۲) به‌عنوان یکی از مؤثر ترین بیوسورفکتانت‌ها با قابلیت کاهش کشش سطحی تا ۲۵ mN/m شناخته می‌شود. ساختار *سورفکتین* یک لیپو پپتید سیکلیک تشکیل شده از ۷ اسید آمینه متصل به گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل یک اسید چرب ۱۴ کربنی می‌باشد [۱۲ ، ۱۱]. ساختمان سورفکتین در شکل ۱ نشان داده شده است.

*پائولو* و *همکاران*(۳) [۱۲] در زمره‌ی اولین کسانی بودند که در سال۱۹۹۳ میلادی توانستند در یک راکتور۲ لیتری سورفکتین تولید کنند. پس از پی بردن به اهمیت بیوسورفکتانت‌ها، *وانديگ* و *همکاران*(۴) [۱۳] در سال۲۰۰۰ میلادی با استفاده از باکتری *Bacillus subtilis FE-2* توانستند سورفکتین تولید کنند. در ادامه پژوهش‌ها در این زمینه، *دیویس* و *همکاران*(۵) [۱۴] در سال ۲۰۰۱ میلادی از تشکیل کف هنگام تولید بیوسورفکتانت، به‌عنوان روشی برای بازیافت و تغلیظ سورفکتین استفاده کردند. *یه* و *همکاران*(۶) [۱۵] نیز با استفاده از باکتری *Bacillus subtilis ATCC 21332* با یک طراحی جدید از راکتور زیستی، به تولید سورفکتین پرداختند. آنها در راکتور ۵ لیتری خود، کف تولید شده را به وسیله یک لوله رابط به یک مخزن جمع‌آوری کف منتقل نمودند که در آن مخزن سورفکتین به‌دست‌آمده دارای غلظت بالاتری بود. همچنین *چن* و *همکاران*(۷) [۱۱] با استفاده از *Bacillus subtilis BBK006* به تولید سورفکتین پرداختند. آنها با طراحی یک کف شکن(۸) در قسمت بالایی راکتور زیستی مشکل راکتور زیستی *دیویس* و *همکاران* را رفع نمودند، زیرا کف تولیدی ممکن است باعث از کار افتادن راکتور زیستی شود که باید به روشی از بین برود. همچنین *جوشی* و *همکاران*(۹) [۱۶] تولید سورفکتین را از ۴ باکتری گوناگون *Bacillus licheniformis K51, Bacillus subtilis 20B, Bacillus subtilis R1, Bacillus strain HS3* مورد بررسی قرار دادند. مواد تولید شده دارای خاصیت تعلیق کنندگی خوبی برای نفت خام بود و باعث ازدیاد برداشت نفت در آزمایش‌های آنها شد.

(۱) Surfactin
(۲) Bacillus subtilis
(۳) Palo et al.
(۴) Veenadig et al.
(۵) Davis et al.
(۶) Yeh et al.
(۷) Chen et al.
(۸) Foam breaker
(۹) Joshi et al.

در این پژوهش، با توجه به موفقیت آمیز بودن تولید این ماده توسط پژوهشگران دیگر و همچنین به‌خاطر اهمیت این مواد در صنعت نفت، تولید این ماده از یک گونه بومی ایرانی مورد توجه قرار گرفت. بنابراین برای بررسی این دانش و سرانجام تولید سورفکتین در مقیاس تجاری انجام آزمایش‌هایی در ارلن و راکتور زیستی برای تولید صنعتی این ماده نیاز است. هدف از این پژوهش، بررسی تولید سورفکتین توسط گونه‌ی بومی *Bacillus subtilis NLIM 0110*، جدا شده از خاک‌های کشاورزی ایران و تعیین شرایط بهینه عملیاتی تولید سورفکتین مانند دمای تولید و دور همزن برای رسیدن به بیشترین مقدار تولید در مقیاس ارلن می‌باشد. این پژوهش در راستای یک پژوهش کاربردی به‌منظور بررسی ازدیاد برداشت نفت با سورفکتین تولید شده توسط یک گونه بومی ایرانی به عنوان یک مدل در مخازن نفتی می‌باشد.

## بخش تجربی

### باکتری

سویه *Bacillus subtilis NLIM 0110* از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا که توسط نصر و همکارانش جدا شده بود تهیه شد [۱۷].

### ترکیب محیط کشت تولید سورفکتین

رشد سویه به صورت هوازی در محیط E[۱] انجام شد [۱۷]. برای تهیه محیط کشت ابتدا محلول A شامل ۲/۷ g/L ،$KH_2PO_4$؛ ۱۳/۹ g/L ،$K_2HPO_4$؛ ۱۰ g/L ،sucrose؛ ۵۰ g/L ،NaCl؛ ۰/۵ g/L ،yeast extract؛ ۱ g/L ،$NaNO_3$؛ محلول B شامل ۲۵ (g/L) ،$MgSO_4$ و محلول C شامل ۱۰۰ (g/L) ،$Na_2HPO_4.2H_2O$ به صورت جداگانه به مدت۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سیلسیوس اتوکلاو شدند و سپس محلول D شامل ۰/۵ g/L ،EDTA؛ ۳ g/L ،$MnSO_4.H_2O$؛ ۱ g/L ،NaCl؛ ۰/۱ g/L ،$CaCl_2.2H_2O$؛ ۰/۱ g/L ،$ZnSO_4.7H_2O$؛ ۰/۱ g/L ،$FeSO_4.7H_2O$؛ ۰/۰۱ g/L ،$CuSO_4.5H_2O$؛ ۰/۰۱ g/L ،$AlK(SO_4)_2$؛ ۰/۰۱ g/L ،$Na_2MoO_4.2H_2O$؛ ۰/۰۰۵ g/L ،boric acid؛ ۰/۰۰۳ g/L ،$Na_2SeO_4$؛ $NiCl_2.6H_2O$ به‌خاطر حساسیت به گرما با صافی‌های ۰/۲۲ میکرونی استریل می‌شد. در شرایط استریل ۱۰mL از محلول‌های B و C و D به یک لیتر از محیط A افزوده می‌شد. برای تهیه پیش کشت، ابتدا یک لوپ از باکتری رشد کرده در محیط نوترینت آگار[۲] به یک ارلن ۵۰۰ mL دارای ۱۰۰ mL نوترینت براث[۳] پیش‌تر اتوکلاو شده منتقل شد، و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۱۵۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سلسیوس در یک شیکرانکوباتور(Climo-shaker ISF1-X Kuhner) قرار داده شد. پس از این مدت، ۵ میلی لیتر از کشت باکتری رشد کرده در محیط نوترینت براث به ۱۰۰ میلی لیترمحیط کشت اصلی که درون ارلن ۵۰۰ mL قرار داشت افزوده شد و پس از قرار دادن آن درون شیکرانکوباتور، نمونه گیری‌ها در زمان‌های گوناگون انجام شد. سنجش کشش سطحی نمونه‌ها توسط دستگاه تنسیومتر (Kruss k10T, Germany) اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری قند

اندازه گیری ساکاروز با استفاده از کیت ارزیابی قند انجام گرفت. این کیت با استفاده از روش نور سنجی (اسپکتوروسکوپی) غلظت قند را اندازه گیری می‌کند. این کیت از شرکت پارس آزمون ایران خریداری شد.

### اندازه گیری بیوسورفکتانت:

محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و مایع رویی با صافی ۰/۲۲ μm (واتمن) صاف شد. pH مایع صاف شده توسط اسید HCL ۳M به ۲ رسانده شد تا عمل رسوب‌گذاری انجام شود. مواد رسوبی با صافی ۲/۵ μm ساخته شده از استرهای سلولز نیترو سلولز (واتمن) جمع آوری شدند تا *سورفکتین* خام به‌دست آید. برای خالص‌سازی بیشتر سورفکتین خام در آب دیونیزه حل شد و سپس ۳ بار توسط حجم یکسانی از دی کلرومتان استخراج شد. بعد از صاف کردن بیشتر و خشک کردن، بیوسورفکتانت تصفیه شده به دست آمد [۱۸، ۱۵، ۱۱، ۱۰].

## نتیجه‌ها و بحث

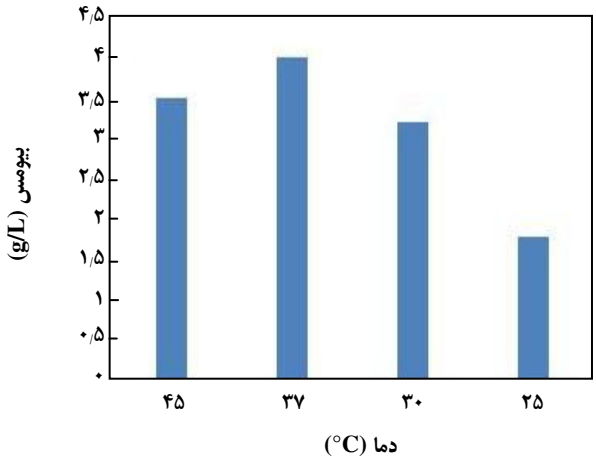
### بررسی درجه حرارت بهینه رشد باکتری

برای به‌دست آوردن بهترین دمای رشد باکتری، مقدار زیست توده (بیومس) تولید شده بعد از ۵ روز رشد در یک ارلن۵۰۰ میلی لیتری که شامل ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت بود در درجه دماهای مختلف اندازه گیری شد. نتیجه‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. این شکل، ارتباط بین دما

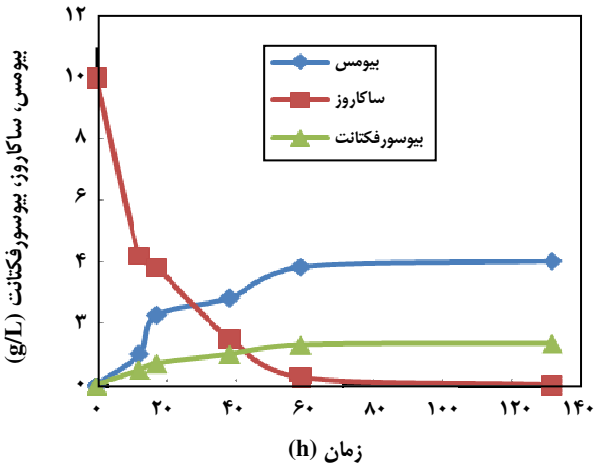
(۱) E-medium

(۲) Nutrient agar

(۳) Nutrient broth medium




**شکل ۲ـ مقدار بیومس تولید شده توسط باکتری *Bacillus subtilis NLIM 0110* بعد از ۵ روز از شروع آزمایش در ۲۵۰ rpm و دماهای گوناگون.**




**شکل ۳ـ منحنی رشد باکتری *Bacillus subtilis NLIM 0110* ، مصرف ساکاروز و تولید بیوسورفکتانت در ۳۷ °C و ۲۵۰rpm.**

و رشد باکتری در حین تولید بیوسورفکتانت را نشان می‌دهد و مشخص می‌سازد بهترین دمای رشد این باکتری ۳۷ °C می‌باشد.

### بررسی رشد باکتری

مقدارهای غلظت بیوسورفکتانت، ساکاروز و بیومس در زمان‌های گوناگون رشد اندازه‌گیری شدند. نمودار تولید بیومس، تولید بیوسورفکتانت و مصرف قند در هنگام رشد باکتری در شکل ۳ نشان داده شده است. طبق این شکل، یک ارتباط مستقیم بین تولید بیوسورفکتانت و مصرف ساکاروز و رشد باکتری وجود دارد. این شکل نشان می‌دهد که با مصرف ساکاروز، تولید بیوسورفکتانت افزایش می‌یابد بنابراین تولید بیوسورفکتانت وابسته به رشد باکتری است. بشترین مقدار تولید بیومس در لحظه‌ای که مقدار ساکاروز به طور کامل تمام شد به ۴ g/L رسید. رشد تولید بیوسورفکتانت تا ساعت شصتم ادامه پیدا کرد و به مقدار نهایی ۱/۸ g/L رسید. همان‌گونه که شکل ۳ نشان می‌دهد با افزایش بیومس، تولید بیوسورفکتانت افزایش یافت در حالی که مقدار ساکاروز کاهش یافت. این نتیجه‌ها با دیگر نتیجه‌های پژوهشگران سازگاری دارد. به عنوان نمونه پژوهشگرانی مانند لین[۱] [۱۹] با استفاده از باکتری *B.linchoformis*، کوپر و *همکاران*[۲] [۲۰] با استفاده از باکتری *B.subtilis BM12*، *چن* و *همکاران* [۱۱] با استفاده از باکتری *B.subtilis BBK006* و *والتر*[۳] [۲۱] با استفاده از باکتری *Bacillus subtilis ATCC21332* نشان دادند که یک ارتباط مستقیم بین تولید سورفکتین و مصرف منبع کربن و رشد باکتری وجود دارد. بنابراین نتیجه‌ی به‌دست آمده از این پژوهش در سطح قابل قبولی می‌باشد. بازده بیوسورفکتانت روی بیومس Yp/x (g /g) ، بازده بیوسورفکتانت روی ساکاروز Yp/s (g /g) و نرخ کل تولید بیوسورفکتانت Y(mg/l.h) به ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۱۸ و ۳۰ به‌دست آمد.

*چن* و *همکاران* [۱۱] با استفاده از باکتری *B.subtilis BBK006* برخی از پارامترها مانند Yp/x (g /g)، $Y_{P/S}$ (g /g) و Y (mg/l.h) با شرایطی همانند با کار اخیر گزارش داده اند که برای مقایسه در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که در جدول ۱ دیده می‌شود باکتری استفاده شده در این پژوهش بازده بیشتری نسبت به *B.subtilis BBK006* دارد. از این‌رو فرایند زیستی پیشنهادی برای تولید بیوسورفکتانت از پتانسیل کافی برای کاربردهای تجاری برخوردار می‌باشد.

### آزمایش تأثیر دور شیکر روی کشش سطحی، زیست توده و pH

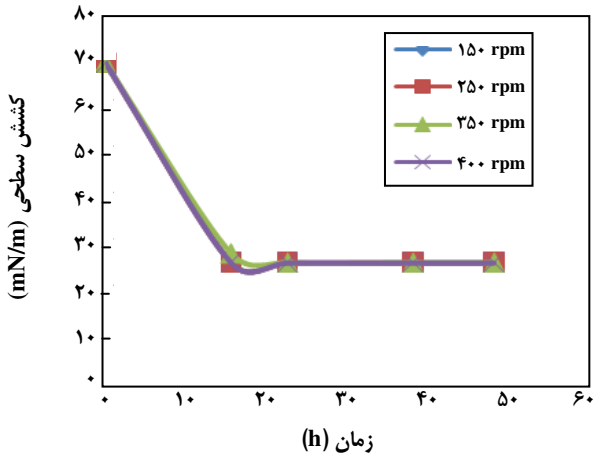
آزمایش پیشین در دورهای گوناگون در دمای ۳۷ °C مورد بررسی قرار گرفت. در خلال آزمایش مقدارهای کشش سطحی، pH و زیست توده اندازه گیری شد. شکل ۴ نشان می‌دهد در تمامی دورها، با افزایش غلظت سورفکتین کشش سطحی کاهش می‌یابد

(۱) Lin
(۲) Cooper et al.
(۳) Valter

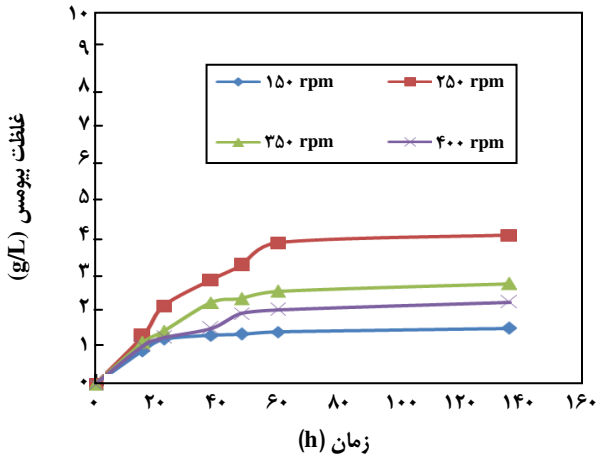
جدول ۱ـ مقایسه بازده تولید بیوسورفکتانت تولید شده با نتیجه‌های پژوهشگران دیگر.

| مرجع | $Y_{P/S}$ g/g | $Y_{P/X}$ g/g | $Y_{X/S}$ g/g | Y g/L.h | بیشترین مقدار تولید بیوسورفکتانت (g/L) | بیشترین مقدار تولید زیست توده (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| مطالعه حاضر | ۰/۱۸ | ۰/۴۵ | ۰/۴ | ۰/۰۳ | ۱/۸ | ۴ |
| نتیجه‌های چن و همکاران [۱۱] | ۰/۰۴۶ | ۰/۰۷۱ | ۰/۶۴۵ | ۰/۰۰۳۸ | ۰/۰۹۲ | ۱/۹ |

*(Y) Volumetric production rate, (Yp/x) Yield of biosurfactant on biomass, (Yp/s) Yield of biosurfactant on substrate, (Yx/s) Yield of biomass on substrate*




شکل ۴ـ نمودار تغییرهای کشش سطحی بر حسب زمان در دورهای گوناگون و ۳۷°C.



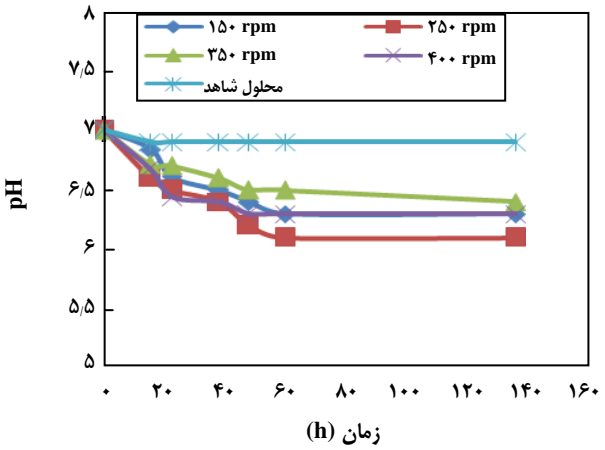

شکل ۵ ـ نمودار تغییرهای بیومس بر حسب زمان در دورهای گوناگون و ۳۷°C.

توجه به این شکل مشخص می‌سازد که سورفکتین تولید شده می‌تواند کشش سطحی را از ۶۸ mN/m به ۲۵mN/m برساند. همچنین از این شکل پیداست روند تغییرهای کشش سطحی برای تمامی دورها یکسان است. پایین ترین مقدار کشش سطحی در همان زمان‌های اولیه (۱۴ ساعت) به‌دست آمد که این می‌تواند به علت پایین بودن مقدار CMC[(۱)] باشد. برای بیوسورفکتانت خالص به‌دست آمده در این پژوهش، مقدار کمترین غلظت بیوسورفکتانت که بعد از آن دیگر کشش سطحی تغییر نمی‌کند (CMC) برابر ۵۰mg/L به‌دست آمد. همچنین منحنی رشد باکتری در دورهای گوناگون اندازه‌گیری شد که نتیجه‌های آن در شکل ۵ نشان داده شده است. از شکل ۵ مشخص است که بهترین نرخ همزن به دلیل بیشترین تولید بیومس ۲۵۰ rpm می‌باشد. می‌توان گفت افزایش دور همزن تا ۲۵۰rpm منجر به افزایش انتقال اکسیژن و در نتیجه افزایش تولید بیومس می‌شود. در این آزمایش همچنین دیده شد اگر دور همزن از ۲۵۰rpm بیشتر شود یک افزایش کف روبه‌رو رخ می‌دهد که این موضوع باعث کاهش انتقال جرم و در نتیجه باعث کاهش زیست توده می‌شود. به طور معمول تولید کف باعث مشکل‌هایی در فرایندهای تخمیری مانند جداسازی ناخواسته فراورده، مواد مغذی و باکتری‌ها از محیط کشت می‌شود [۱۴و۱۱]. تغییر pH در خلال آزمایش‌ها در شکل ۶ نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد pH در تمامی دورها در زمان تخمیر کاهش می‌یابد که می‌تواند نتیجه تولید اسید توسط باکتری باشد. به طور کلی این باکتری موادی مانند بیوسورفکتانت، بیو گاز، اسید، بیومس و غیره تولید کنند. بنابراین بهترین شرایط تولید بیوسورفکتانت ۳۷ °C و ۲۵۰rpm می‌باشد. در تمامی آزمایش‌ها محیط کشت بدون باکتری به‌عنوان محلول شاهد برای کنترل آزمایش‌ها وجود داشت.

## نتیجه گیری

این پژوهش نشان داد که سورفکتین تولید شده با استفاده از باکتری *Bacillus subtilis NLIM 0110* که از خاک‌های سطحی

(۱) Critical Micelle Concentration




**شکل ۶ ـ نمودار تغییر pH بر حسب زمان در دورهای گوناگون و ۳۷°C.**

یک منطقه فعال کشاورزی به‌دست آمده بود دارای پتانسیل خوبی در کاهش کشش سطحی است. در این پژوهش بهترین شرایط عملیاتی تولید بیوسورفکتانت مانند دور شیکر و دما برابر ۲۵۰ rpm و ۳۷°C به‌دست آمد. تولید سورفکتین در مقیاس ارلن در شرایط بهینه نشان داد تولید به رشد باکتری وابسته است. این نتیجه‌ها با نتیجه‌های سایر پژوهشگران مانند *لین*، *کوپر* و *همکاران*، *چن* و *همکاران* و *والتر* سازگاری دارد. بنابراین نتیجه به‌دست آمده از این پژوهش در سطح قابل قبولی می‌باشد. بیشترین اندازه تولید بیومس و سورفکتین در ارلن به ترتیب به مقدارهای ۴ g/L و ۱/۸ g/L رسید. بازده سورفکتین روی بیومس $Y_{p/x}$ (g/g)، بازده سورفکتین روی ساکاروز $Y_{p/s}$ (g/g) و نرخ کل تولید سورفکتین Y (mg/L. h) به ترتیب ۰/۴۵، ۰/۱۸ و ۳۰ به‌دست آمد که دارای بازده بیشتری نسبت با دیگر پژوهش‌های همانند است. همچنین کمترین مقدار کشش سطحی و مقدار CMC به ترتیب به مقدار ۲۵ mN/m و ۵۰mg/L رسید. این نتیجه‌ها نشان‌دهنده این موضوع است که سورفکتین تولید شده در این پژوهش یک بیوسورفکتانت با ویژگی‌های بسیار خوب می‌باشد که قابلیت بررسی برای تولید تجاری در صنایع گوناگون را دارد.

## نمادها

| | |
|---|---|
| بازده سورفکتین روی زیست توده (g/g) | $Y_{p/x}$ |
| بازده زیست توده روی ساکاروز (g/g) | $Y_{x/s}$ |
| بازده سورفکتین روی ساکاروز (g/g) | $Y_{p/s}$ |
| نرخ کل تولید سورفکتین (mg/L.h) | Y |

## قدردانی

نویسندگان این مقاله از شرکت مهندسی و توسعه نفت به خاطر تأمین هزینه‌ها و حمایت های مادی این پروژه (قرارداد شماره ۵۵۳- م ت ن ) و همچنین از دکتر محمد رضا صعودی از دانشگاه الزهرا به خاطر جداسازی باکتری و در اختیار قرار دادن آن تشکر می‌نمایند.

*تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۱۳*

## مراجع

[1] Sen R., Biotechnology in Petroleum Recovery: The Microbial EOR, *Progress in Energy and Combustion Science*, **34**, p. 714 (2008).

[۲] راشدی ح.، جمشیدی ا.، مظاهری اسدی م.، بنکدار پور ب.، بررسی تولید رامنولیپید توسط میکروارگانیسم *سودوموناس آرجینوزا* جدا شده از مخازن نفتی، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، (۱) **۲۵**، ص. ۲۵ (۱۳۸۵)

[۳] امینی ف.، صمدی ن.، هرانده م.، نقدی م.، شریفان ان.، بررسی شرایط تولید رامنولیپید حاصل از سویه های مختلف *سودوموناس آرجینوزا*، *نشریه علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*، **۱**، ص. ۳۳ (۱۳۸۸).

[4] Carrillo P.G., Mardaraz C., Pitta-Alvarez S.I., Giulietti A.M., Isolation and Selection of Biosurfactant-Producing Bacteria, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2**, p.82 (1996).

[5] Desai J. D, Banat I. M., Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, *Microbio. Mol. Biol.*, **61**, p. 47 (1997).

[6] Sim L., Ward O., Li Z.Y., Production and Characterization of a Biosurfactant Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, p. 232 (1997).

[7] Abu-Ruwaida A.S., Banat I.M., Haditirto S., Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria, Product Characterization and Evaluation, *Biotechnology*, **2**, p.315 (1991).

[8] Müller M.M., Hörmann B., Syldatk C., Hausmann R., *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a Model for Rhamnolipid Production in Bioreactor Systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **87**, p. 167 (2010).

[۹] امانی ح.، بررسی فرایند ازدیاد برداشت میکروبی نفت با بیوسورفکتنت‌ها، پایان نامه دکتری، دانشکده فنی، دانشگاه تهران، (۱۳۸۹).

[10] Amani H., Mehrnia M.R., Haghighi M., Sarrafzadeh M.H., Soudi M.R., Scale up and Application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhanced Oil Recovery, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **162** , p.510 (2010).

[11] Chen C.Y., Baker S.C., Darton R.C., Batch Production of Biosurfactant with Foam Fractionation, *Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, p. 1923 (2006).

[12] Paolo C., paola C., Method of Producing Surfactin with the Use of Mutant of *Bacillus subtilis*, *USP 5,227,294*, (1993).

[13] Veenandig N.K., Gowthaman M.K., Karanth N.G.K., Scale up Studies for the Production of Bioosurfactant in Packed Column Bioreactor, *Bioprocess Engineering*, **22,** p. 95 (2000).

[14] Davis D.A., Lyncha H.C., Varley J., The Application of Foaming Recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 Cultures, *Enzyme Microbiol. Technol.,* **28**, p. 346 (2001).

[15] Yeh M.S., Wei Y.H., Chang J.S., Bioreactor Design for Enhanced Carrier-assisted Surfactin Production with *Bacillus subtilis*, *Process Biochemistry*, **41**, p. 1799 (2006).

[16] Joshi S., BharuchaC., Jha S., Yadav S., Nerurka A., Desai A.J., Biosurfactant Production Using Molasses and Whey under Thermophilic Conditions, *Bioresource Technology*, **99**, p. 195 (2008).

[17] Nasr S., Soudi M.R., Mehrnia M.R., Sarrafzadeh M.H., Characterization of Novel Biosurfactant Producing Strains of *Bacillus spp.* Isolated from Petroleum Contaminated Soil, *Iranian Journal of Microbiology*, **1**, p. 54 (2009).

[18] Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K.N., Knapp R.M., McLnerney M.J., Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production by Diverse Microorganisms, *J.of Microbiol. Meth.*, **56**, p.339 (2004).

[19] Lin S.C., Recovery and Purification of the Lipopeptide Biosurfactant of *Bacillus subtilis* by Ultrafiltration, *Biotechnol. Techniques*, **11,** P. 413 (1997).

[20] Cooper D.G., Macdonald C.R., Duff S.F.B., Kosaric N., Enhanced production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions, *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, p.408 (1981).

[21] Valter P.J., Lipopeptides, An Attractive Class of Microbial Surfactants, *Prog. Colloid. Polym. Sci.* **72**, p. 12 (1986).