

## 以 *Pseudomonas aeruginosa* 生產生物界面活性劑 rhamnolipids

劉思良 蘇遠志 劉俊民\*

臺灣大學生命科學院  
微生物與生化學研究所

(接受刊載日期: 中華民國九十七年五月二十日)

界面活性劑具有表面活性及界面活性, 在工業及其它方面有廣泛之應用。微生物亦可以生產生物性之界面活性劑, 其除具有化學界面活性劑之表面活性及界面活性, 同時亦有生物分解性、多樣性, 因此, 其應用日漸重要。 *Pseudomonas aeruginosa* 可產生生物界面活性劑 rhamnolipids (RL), 本研究中探討其生長及生產 RL 較佳之培養基質, 以瞭解其最適條件。培養基質分別探討碳源、氮源、磷酸鹽、酵母萃出物、金屬離子、微量元素。試驗結果顯示, 碳源中之甘油為菌株生長及生產 RL 之最佳碳源, 碳水化合物可誘導 RL 生成, 但葡萄糖可抑制 RL 生成。氮源中硝酸鈉及 peptone 為較佳之氮源, 以硝酸鈉為氮源單位菌體產生之 RL 量最高。磷酸鹽為菌株生長所需, 但並無積極促進 RL 生成之效果。酵母萃出物可增加菌體生長, 並誘導 RL 生成。金屬離子中鉀離子具有促進 RL 生成之效果。微量元素中硫酸亞鐵可提高菌體生長, 但卻抑制 RL 生成, 而硫酸鋅、硫酸銅可同時抑制菌體生長及 RL 生成。綜合各測定之結果, 最適培養基之組成為每公升含: glycerol, 50 mL; NaNO<sub>3</sub>, 4 g; yeast extract, 3 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g; NaCl, 0.3 g; KCl, 0.2 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.01 g; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0001 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0001 g。以最適培養基培養三日, 其 RL 產量可達 4.3 g/L, 具有實際應用之潛力。

**關鍵字:** *Pseudomonas aeruginosa*, 生物界面活性劑, rhamnolipids, 培養基質, 乳化力。

## Production of Rhamnolipids Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*

Sz-Liang Liu, Yuan-Chi Su and Chung-Ming Liou\*

Institute of Microbiology and Biochemistry, College of Life Science, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan

(Accepted for publication: May 20, 2008)

Surfactant is the compound that has the ability to decrease surface and interface tension, which is broadly used in industry and many other fields. Microorganisms can also produce biological surfactants that have similar properties as chemical surfactants, which additionally have some characters as biodegradability and molecule diversity absent in chemical surfactants, have the potency to be applied more widely. Microorganisms *P. aeruginosa* can produce biosurfactant rhamnolipids (RL) when it is cultured under some conditions. For the purpose of industrially producing RL, we analysed the effect of medium substrates to subscribe better composition of medium and analysed the function of each substrate influenced in the anabolism of RL. Substrates analysed including carbon sources, nitrogen sources, yeast extract, phosphate, metal ions and trace elements. Within compounds analysed in carbon sources, glycerol is the better substrate that *P. aeruginosa* can grow well as well as produce most abundant RL, nevertheless glucose can inhibit both cell growth and production of RL, hydrocarbons can also induce the metabolism of RL. Within compounds analysed in nitrogen sources, sodium nitrate and peptone is better than the others, sodium nitrate can produce the most abundant RL, yeast extract can enhance cell growth and increase the productivity of RL. Phosphate is necessary for the growth of cell but lack the ability to increase productivity of RL. Within metal ions analysed, potassium ion have the property to induce the production of RL. In trace elements, ferrous sulfate can enhance the growth of microorganism but decline the production of RL, zinc sulfate and copper sulfate can interfere with the growth of cell and the production of RL. Microorganism with the suitable medium adjusted according to the analysis, can produce 4.3 g/L of rhamnolipid cultured in 3 days, which is possible further developed to reach the practical application.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, Biosurfactant, Rhamnolipids, Emulsifiability, Medium substrate.

\* Corresponding author. E-mail: lioucm@ntu.edu.tw

## 前 言

界面活性劑可以減低溶液之表面張力及界面張力，因此可以提高溶液之滲透性、濕潤性和乳化性，並可改善液體之分散性，且可形成特殊結構產生溶化特性，因此可以作為乳化劑、脫乳劑、發泡劑、消泡劑、清潔劑、溶化劑、濕潤劑等，在工業上之應用很廣，有很大之需求。

化學性界面活性劑由於分子具有支鏈，不易為生物所分解，因此會長期累積於自然環境中，對生態系造成不良之影響。隨著人類對環境品質之要求提高，化學性界面活性劑乃趨向於使用較易分解之直鏈化合物，但直鏈化合物之界面活性劑仍無法快速分解。除化學性界面活性劑外，微生物亦可以產生具有界面活性之生物性界面活性劑。生物性界面活性劑除具有化學性界面活性劑之性質，並具有化學性界面活性劑所無之特性，包括：良好之生物分解性，化學性界面活性劑所無之獨特結構、性質，高生物安全性；因此具有特別之應用價值。

微生物產生之生物界面活性劑分子中多包含疏水性分子，如脂質分子；與親水性分子，如醣鏈、胜肽鏈，再複合成同時具有疏水性及親水性部分之兩性分子。微生物中疏水性分子與親水性分子係經由不同代謝生成，由於微生物代謝路徑之不同，使微生物可產生各種不同之生物界面活性劑<sup>(1)</sup>。目前已知可產生生物界面活性劑之微生物，如 *Pseudomonas* 屬菌株可產生 rhamnolipids<sup>(2)</sup>；*Torulopsis* 屬菌株可產生 sophorolipids<sup>(3)</sup>；*Candida tropicalis* 可在菌株細胞表面產生 lipopolysaccharides<sup>(4)</sup>。除此之外，亦有其它微生物可產生非離子性生物界面活性劑，改變細胞表面性質，使菌絲細胞可以吸附如碳氫化合物，或再主動運輸其至胞內分解利用<sup>(4)</sup>。因此，微生物菌株可以不同方式產生各種不同之生物界面活性劑，因此使微生物產生之生物界面活性劑呈多樣性，微生物產生生物界面活性劑之多樣性，使其具有應用於不同領域之潛力<sup>(5,6)</sup>。微生物產生之生物界面活性劑，在適當環境下可刺激其大量產生，如環境中存在碳氫化合物時，可產生生物界面活性劑以利用於其適應環境生長。

生物界面活性劑如同一般界面活性劑，可存在於溶液之表面，其構造可使表面張力改變，因此降低溶液之表面張力。由於界面

活性劑同時具有親水性及疏水性分子，在兩種溶液同時存在時，可存在於兩種溶液之界面，因此使界面張力改變，降低兩種溶液之界面張力。降低表面張力及界面張力使界面活性劑具有表面活性及界面活性，因此表面張力及界面張力之減低為界面活性劑重要之性質。界面活性劑在達一定濃度時，其分子可形成微膠粒 (micelle)，其可形成微膠粒之最低濃度為其臨界微膠粒濃度 (critical micelle concentration, CMC)<sup>(7)</sup>。界面活性劑溶液在達 CMC 時，溶液之表面張力、界面張力、滲透壓等物理化學性質均會有大幅度變化，因此大幅改變其清潔力、乳化力、密度等，因此 CMC 與表面張力、界面張力為評估界面活性劑效率之重要指標<sup>(8)</sup>。生物界面活性劑具有不同於化學性界面活性劑之分子構造，其親水性及疏水性分子構造變化亦比化學性界面活性劑為多，因此使生物界面活性劑具有不同於化學性界面活性劑之性質，其性質較化學性界面活性劑更具多樣性，使其在應用上比化學性界面活性劑更為廣泛，亦使其可應用在一些化學性界面活性劑無法作用之領域，使生物界面活性劑之使用日漸重要<sup>(9,10)</sup>。

生物界面活性劑分子中之親水性及疏水性分子構造，親水性分子構造如碳水化合物、胺基酸、磷酸基或其它基團；疏水性分子構造多為長鏈碳氫化合物、脂質基團。親水性分子構造及疏水性分子構造係由微生物細胞代謝形成。由於各種菌株之代謝型式不同，影響其提供之親水性分子及疏水性分子<sup>(11)</sup>。另一方面，菌株在培養生長時，其代謝之調控亦受生長之環境及生長條件之影響，因此影響代謝型態，產生不同種類之生物界面活性劑<sup>(1,12)</sup>。因此，生物界面活性劑之生產因菌株種類、培養基質、生長條件會產生差異，調節培養基質、生長條件可使菌株產生生物界面活性劑之質與量不同。本研究室由環境中篩選得可產生生物界面活性劑之菌株，經菌種鑑定為 *Pseudomonas aeruginosa*。該菌株具有碳氫化合物耐性，且可受煤油 (kerosene) 誘導產生生物界面活性劑，可利用於產生生物界面活性劑。本研究中再對該菌株探討各種培養基質對其生長及產生生物界面活性劑性質之影響，期望能瞭解各種條件下產生生物界面活性劑之性質，提高其生物界面活性劑生產量，以誘導菌株產生高量之生物界面活性劑，達於應用之目的。



## 材料與方法

### 一、菌株、培養基及藥品

本試驗使用之菌株為環境中篩選分離之菌株，可以利用煤油為碳源生長，並產生生物界面活性劑。本菌株具有硫氮化合物耐性，經菌種鑑定為 *P. aeruginosa*<sup>(13)</sup>。菌株冷凍保存於 -20℃ 下，使用時先取 0.1 mL 冷凍保存菌液接種於含 100 mL Nutrient broth 之 Hinton 氏三角瓶中，於 30℃、125 rpm 下振盪培養三日活化二次後，由活化之菌株取一接種環接種於 Nutrient broth 中，在 30℃、125 rpm 下振盪培養一夜作為種菌液使用。

菌株培養及各試驗中使用之培養基及各培養基組成如下。菌株保存、種菌培養使用 Nutrient broth (每公升含：Nutrient broth, 8.0 g) 及 Nutrient agar (每公升含：Nutrient broth, 8.0 g; agar, 15.0 g)，最適培養條件之探討使用基礎培養基 (Basal medium, 每公升含：CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, 4.0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; yeast extract, 1.0 g; MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 1.0 mg; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.0 mg; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.0 mg; pH 8.0)。

試驗中使用之一般藥品購自德國 Merck 公司、日本林純藥公司、日本和光純藥公司、日本島久藥品公司、日本關東化學公司、日本試藥公司、德國 Ferak 公司、臺灣皓峰公司等，培養基用藥品及材料購自美國 Difco 公司。

### 二、菌株最適培養條件之探討

最適培養條件之探討採改變單一變數方法，依序逐項測定培養基質之最適條件，最後得到全培養基質之最適條件。培養基質先測定碳源化合物，再依序測定氮源化合物及其它酵母萃取物、金屬離子、微量元素等項目。改變基礎培養基中各測定項目之培養基質，再將 100 mL 各測定培養基裝於 500 mL 容積之 Hinton 氏三角瓶中，於其中接種 1 mL 種菌液，在 30℃、125 rpm 下振盪培養，之後於各預定時間取樣，測定菌株生長量及生物界面活性劑含量。菌株生長量測定其 OD<sub>600</sub> 吸光值，並以 pH 計測定培養液中 pH 之變化，另測定其中生成之生物界面活性劑。

### 三、生物界面活性劑之製備及純化

各菌株培養液經 8,000 × g 離心 10 分鐘去除

菌體後，再以 5% 鹽酸調至 pH 2.0，以三倍體積 (v/v) 之乙酸乙酯萃取後，去除其有機溶劑層中之有機溶劑，製成粗生物界面活性劑。

粗生物界面活性劑以 silicic acid 層析管柱純化。以正己烷溶離試樣中殘留之碳源、以氯仿溶離去除色素，再以氯仿-甲醇 (97:3, v/v) 或氯仿-甲醇 (93:7, v/v) 溶液溶解生物界面活性劑後供測定使用。

### 四、生物界面活性劑之測定法

經分離、純化之生物界面活性劑再以直接測定法測定其 RL 量，以間接測定法測定其 RL 之性質。

#### 1. 生物界面活性劑之直接測定法

RL 量以 orcinol 定量法定量其中之 rhamnose，以 rhamnose 量表示 RL 量<sup>(14)</sup>。取 1.6% 之 orcinol 溶液與 60% 之硫酸以 1:7.5 比例混合，製成反應試劑。於 3.4 mL 之反應試劑中加入 0.4 mL 生物界面活性劑試樣溶液，於 80℃ 熱水浴中反應 15 分鐘，之後冷卻 15 分鐘，再測定其 OD<sub>565</sub> 吸光值。另以 rhamnose 為標準品，測定其濃度-吸光值標準曲線，由標準曲線計算試樣中之 rhamnose 量。

#### 2. 生物界面活性劑之間接測定法

生物界面活性劑之間接測定法測定菌株培養液之乳化力、表面張力、CMC 及 CMC 稀釋倍數 (CMC dilution factor, *F<sub>cmc</sub>*)。

##### (a) 乳化力之測定

乳化力之測定，於 16 × 150 mm 之試管中加入 3 mL 煤油與 2 mL 菌株培養液，以 Vortex 振盪機振盪兩分鐘使其乳化，再靜置 24 小時後測定其殘留乳化層之厚度，以乳化層厚度對反應液高度之百分比值為其乳化指數 (*E<sub>24</sub>*, emulsion index)，以乳化指數表示其乳化力。

##### (b) 表面張力之測定

表面張力之測定以表面張力計 (Face Surface Tensiometer CBNP-A3, 日本協和界面科學株式會社) 測定。

##### (c) CMC 及 *F<sub>cmc</sub>* 之測定

CMC 以表面張力法測定，取菌株培養液以蒸餾水稀釋成各種濃度，測定其表面張力，其表面張力大幅變化之濃度即其 CMC，試樣到達其 CMC 之稀釋倍數即其 *F<sub>cmc</sub>* 值。

本研究中由環境篩選可產生生物界面活性劑之菌株，經鑑定屬 *P. aeruginosa*。根據報告 *P. aeruginosa* 可產生生物界面活性劑 rhamnolipids (RL)<sup>(15)</sup>，RL 為在以 C<sub>10</sub> 為主之碳鏈上含有 rhamnose 分子 (Rha) 之酯脂 (glycolipid, Rha<sub>n</sub>C<sub>10</sub>)，RL 中之 rhamnose 分子及酯脂部份可因菌株種類、培養生產條件等改變。本研究中菌株產生之生物乳化劑以直接測定法測定其 RL 量，並以間接測定法測定生成 RL 之性質。

### 一、培養成分對菌株生長及生物界面活性劑合成之影響

本研究中培養成分對菌株生長及生物界面活性劑合成之影響，為以單一變數法探討培養基各成分之影響<sup>(16-19)</sup>。

#### 1. 碳源化合物之影響

菌株可以利用碳氫化合物為碳源生長產生生物界面活性劑，但碳水化合物一般為微生物利用良好之碳源，因此亦可能為菌株利用產生生物界面活性劑<sup>(17,20)</sup>。碳氫化合物中多種為疏水性物質，不易為菌株直接利用，但碳氫化合物進入菌株胞內後可誘導菌株之代謝能力，使菌株產生生物界面活性劑。相對地，碳水化合物較易為菌株吸收，碳水化合物在菌株中除可提供微生物生長外，亦可代謝合成生物界面活性劑之前驅基質，使菌株合成生物界面活性劑。由於上述機制不同，本研究中測定各種不同碳源對菌株生長及 RL 生產之影響。使用之碳源化合物包括碳氫化合物之煤油、正十六碳烷、正十四碳烷，及碳水化合物之甘油、葡萄糖、琥珀酸鈉、檸檬酸鈉、醋酸鈉等。在基礎培養基中分別添加 5% 固態 (w/v) 或液態 (v/v) 碳源化合物，碳氫化合物不另添加其它乳化劑，使其具有誘導菌株產生生物界面活性劑之作用，再測定碳源對菌株產生生物界面活性劑之影響，其結果如表一所示。

由表一結果可知，菌株以甘油為碳源培養時，*P. aeruginosa* 生長最好。以琥珀酸鈉、檸檬酸鈉為碳源培養時次之，但以葡萄糖培養時，菌株生長最差，菌株亦無法利用醋酸鈉為碳源生長。以煤油、正十六碳烷、正十四碳烷為碳源培養時，菌體量次於碳源琥珀酸鈉、檸檬酸鈉，顯示生長速度較碳水化合物甘油、琥珀酸鈉、檸檬酸鈉緩慢，因此菌株較易利用碳水化合物為碳源，較不易利用碳氫化合物為碳源。

表一 碳源種類對 *P. aeruginosa* 產生 RL 之影響  
Table 1. Effect of carbon source on production of RL by *P. aeruginosa*

Carbon source	OD <sub>660</sub>	Rhamnolipids (g/L)	Surface tension (mN/m)
Glucose	0.1	n.d. <sup>1</sup>	67.1
Acetate	n.g. <sup>2</sup>	n.d.	70.5
Glycerol	8.3	0.50	30.9
Succinate	4.3	0.35	28.5
Citrate	4.4	0.31	31.0
Kerosene	1.3	0.27	53.3
Hexadecane	1.1	0.27	49.9
Tetradecane	0.9	0.26	60.2

1 n.d.: Not detectable.

2 n.g.: No growth.

生物界面活性劑之生產，以甘油為碳源培養時，RL 產量為 0.5 g/L，其次以琥珀酸鈉、檸檬酸鈉為碳源培養時，RL 產量為 0.3-0.35 g/L。以上三種碳源培養時，培養液之表面張力值均可降低至 28.5-31.0 mN/m，其表面張力值降低之差異不大，顯示三種碳源間產生之 RL 種類類似。相對地，以煤油、正十六碳烷、正十四碳烷為碳源進行培養時，其 RL 產量為 0.26-0.27 g/L，雖然產量不如碳源琥珀酸鈉、檸檬酸鈉，但其生長菌體量不高，換算其單位菌體 RL 產量高於其它碳源之甘油、琥珀酸鈉、檸檬酸鈉，顯示碳氫化合物可以誘導 RL 生產，但其利用性並非最佳。以碳氫化合物為碳源時，各碳源間表面張力值可降低至 53.3-60.2 mN/m，但其表面張力值均高於以甘油、琥珀酸鈉及檸檬酸鈉為碳源時之值，明顯地菌體產生之 RL 性質與以甘油、琥珀酸鈉及檸檬酸鈉培養時產生之 RL 不同。同時三種碳氫化合物碳源間產生之 RL 所降低之表面張力值之差異亦大，顯示三種碳氫化合物碳源間產生之 RL 種類差異大。以上測定之碳源化合物中，以甘油為碳源培養時，菌體生長及 RL 產量均佳，因此為較佳之碳源。

#### 2. 氮源化合物之影響

氮源之探討使用者有硝酸鈉、硝酸鉍、peptone、醋酸鉍、氯化鉍、硫酸鉍等氮源化合物。於基礎培養基中添加 5% (v/v) 甘油為碳源，再分別添加 0.5% 之各種氮源，測定氮源對菌株產生生物界面活性劑之影響，其結果如表二所示。

由表二結果可知，當菌株以 peptone、醋酸鉍為氮源培養時，菌株生長最好，以硝



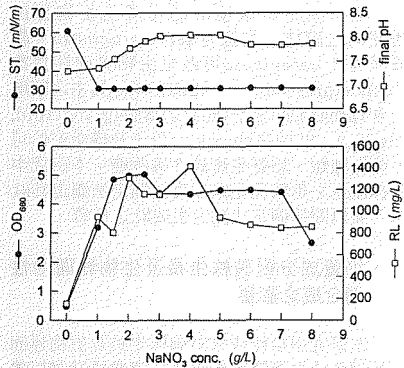
表二 氮源種類對 *P. aeruginosa* 生產 RL 之影響  
Table 2. Effect of nitrogen source on production of RL by *P. aeruginosa*

Nitrogen source	OD <sub>660</sub>	Rhamnolipids (g/L)	Surface tension (mN/m)	Fcmc
Control <sup>1</sup>	0.48	0.05	67.2	0
NaNO <sub>3</sub>	4.10	1.00	30.9	15
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	8.21	0.73	27.6	12
Peptone	6.79	0.79	27.6	16
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.39	0.35	60.2	0
NH <sub>4</sub> Cl	1.65	0.16	65.4	0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.86	0.15	65.5	0

1 Control: No nitrogen source added.

酸鈉培養時次之，以硝酸鉍、氯化鉍、硫酸鉍等為氮源培養時，菌株生長較差。生物界面活性劑之生產，以硝酸鈉、peptone、醋酸鉍為氮源培養時較佳，RL產量為0.7-1.0 g/L，培養液之表面張力值均可降至31 mN/m以下。添加硝酸鉍培養時，RL產量為0.35 g/L次之，以氯化鉍、硫酸鉍為氮源培養時為0.15 g/L再次之，但此三種氮源培養液之表面張力值降低不大，氯化鉍、硫酸鉍培養所得之生物界面活性劑之表面張力值更與對照組相差不多，顯示產生之RL量極低，因此可推測鉍鹽可能誘導菌株產生rhamnose分子，但只有部份合成RL。相對於Fcmc值在peptone、硝酸鈉、醋酸鉍三者時均為12-16，硝酸鉍、氯化鉍、硫酸鉍為0，亦顯示硝酸鉍、氯化鉍、硫酸鉍產生之RL量極低，所測定者可能為rhamnose分子。由上述結果可知，以peptone為氮源時菌體生長良好，亦可產生大量之RL，以硝酸鈉為氮源培養時，菌體生長並非最佳，但RL產量最高，其單位菌體生產之RL最高，因此為較佳之氮源。

其次再測定以硝酸鈉為氮源培養時之較佳濃度，於其中各添加不同濃度之硝酸鈉為氮源，測定其生長及RL產量，其結果如圖一所示。由圖一之結果可知，硝酸鈉濃度低於1.5 g/L及高於7.0 g/L時，菌體生長均不佳。濃度1.5-2.5 g/L時，菌體生長最佳，濃度3.0 g/L以上時，菌體生長稍減低，濃度7.0 g/L以上時，菌體生長大幅降低。RL產量隨硝酸鈉濃度增加提高，當硝酸鈉濃度為1.0 g/L以上時，培養液之表面張力值均可降低至31 mN/m，硝酸鈉濃度2.0-4.0 g/L時RL生成量達1.4 g/L為最高，因此硝酸鈉具有促進RL生成之效果；但濃度4.0 g/L以上時，菌體生長雖良好，但RL產量減低為0.9 g/L，因此高濃度硝酸鈉對RL生成之效果



圖一 培養基中硝酸鈉濃度對 *P. aeruginosa* 生長及 RL 生產之影響

Fig. 1. Effect of sodium nitrate concentration on the growth and RL production of *P. aeruginosa*. Bacteria are inoculated in a 500 mL Hinton's flask containing 100 mL basal medium including 5% glycerol and each concentration of sodium nitrate, cultured at 30°C, 125 rpm for 72 h. RL: rhamnolipids, ST: surface tension.

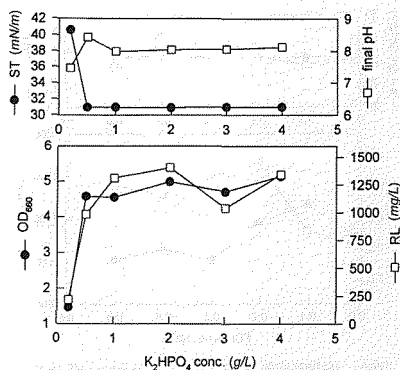
減低，其單位菌體生產之RL減少。綜合以上結果，硝酸鈉添加濃度以2.0-4.0 g/L最佳。

### 3. 磷酸鹽之影響

磷酸鹽在培養基中可供應生長所需之磷，並有酸鹼緩衝之作用，各種濃度之磷酸氫二鉀對生長及RL產量之影響如圖二所示。由圖二可知，磷酸氫二鉀濃度低於0.5 g/L時，菌體生長不佳。濃度0.5 g/L以上時，菌體生長良好，培養液之表面張力值亦可降低至31 mN/m，其RL產量可增加至1.0-1.3 g/L，其增加量與菌體生長之情形相似。因此，磷酸鹽為菌生長所需，亦為生成RL所需，但並無誘導RL生成之效果，磷酸氫二鉀添加濃度以0.5 g/L以上為佳。

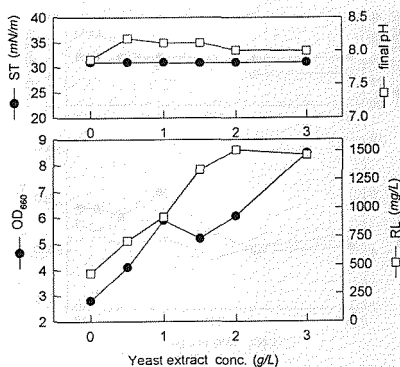
### 4. 酵母萃出物之影響

酵母萃出物中含生長因子，可促進菌株生長，亦可促進菌株之代謝。酵母萃出物對菌株生長及RL生產之影響如圖三所示。由圖三可知，酵母萃出物對菌株生長有促進之作用，在培養基中添加3.0 g/L酵母萃出物時，OD<sub>660</sub>可由2.8上升至8.5。RL產量在添加0-2.0 g/L酵母萃出物時，產量隨添加量呈比例增加；當添加2.0 g/L以上時，菌體生長提高但產量並未成比例增加。因此，添加酵母萃出物可增加菌體量並促進RL產量，添加



圖二 培養基中磷酸鹽濃度對 *P. aeruginosa* 生長及 RL 生產之影響

Fig. 2. Effect of phosphate concentration on the growth and RL production of *P. aeruginosa*. Bacteria are inoculated in a 500 mL Hinton's flask containing 100 mL basal medium including 5% glycerol, 0.4% NaNO<sub>3</sub>, and each concentration of dipotassium hydrophosphate, cultured at 30°C, 125 rpm for 72 h. RL: rhamnolipids, ST: surface tension.



圖三 培養基中酵母萃出物濃度對 *P. aeruginosa* 生長及 RL 生產之影響

Fig. 3. Effect of yeast extract concentration on the growth and RL production of *P. aeruginosa*. Bacteria are inoculated in a 500 mL Hinton's flask containing 100 mL basal medium including 5% glycerol, 0.4% NaNO<sub>3</sub>, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and each concentration of yeast extract, cultured at 30°C, 125 rpm for 72 h. RL: rhamnolipids, ST: surface tension.

2.0 g/L 之酵母萃出物時，單位菌體之 RL 產量達最高。

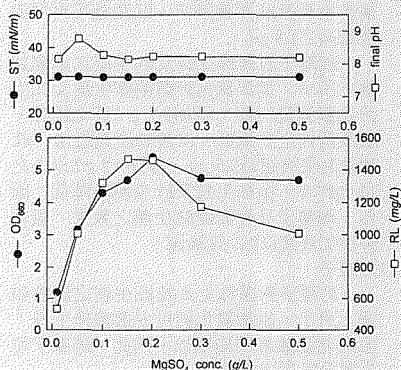
## 5. 金屬離子之影響

### (a) 鎂離子

鎂離子為一些酵素之 cofactor，缺乏鎂離子會降低此些酵素之活性，影響菌株之生長及代謝。鎂離子對菌株生長及 RL 生產之影響如圖四所示。與對照組相較，添加硫酸鎂可以促進菌株生長，硫酸鎂添加至 0.2 g/L 時，菌株生長及 RL 產量均隨添加濃度之比例增加，添加 0.2 g/L 硫酸鎂時菌株生長最佳，RL 產量亦為最高 (1.5 g/L)。硫酸鎂添加至 0.2 g/L 以上時，菌株生長及 RL 產量反呈減低趨勢。因此，鎂離子為菌株生長及產生 RL 所需，但並無誘導 RL 生成之效果，硫酸鎂添加濃度以 0.2 g/L 最佳。

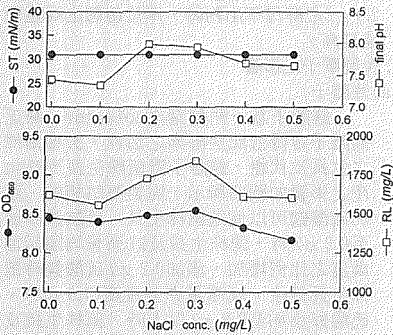
### (b) 鈉離子及鉀離子

鈉離子及鉀離子之添加會影響培養基之滲透壓，並影響細胞膜內外電位差，因此亦可能影響菌株生長及代謝。鈉離子對菌株生長及 RL 生產之影響如圖五所示。添加氯化鈉對菌株生長及 RL 生產之影響並不明顯，可能是由於培養基成分如硝酸鈉亦



圖四 培養基中硫酸鎂濃度對 *P. aeruginosa* 生長及 RL 生產之影響

Fig. 4. Effect of magnesium sulphate concentration on the growth and RL production of *P. aeruginosa*. Bacteria are inoculated in a 500 mL Hinton's flask containing 100 mL basal medium including 5% glycerol, 0.4% NaNO<sub>3</sub>, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% yeast extract, and each concentration of magnesium sulfate, cultured at 30°C, 125 rpm for 72 h. RL: rhamnolipids, ST: surface tension.



圖五 培養基中氯化鈉濃度對 *P. aeruginosa* 生長及 RL 生產之影響

Fig. 5. Effect of sodium chloride concentration on the growth and RL production of *P. aeruginosa*. Bacteria are inoculated in a 500 mL Hinton's flask containing 100 mL basal medium including 5% glycerol, 0.4% NaNO<sub>3</sub>, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% yeast extract, 0.2% MgSO<sub>4</sub>, and each concentration of sodium chloride, cultured at 30°C, 125 rpm for 72 h. RL: rhamnolipids, ST: surface tension.

提供鈉離子所致。添加 0.3 g/L 氯化鈉時，菌株生長及 RL 產量最佳，RL 產量可再增加至最高之 1.8 g/L。

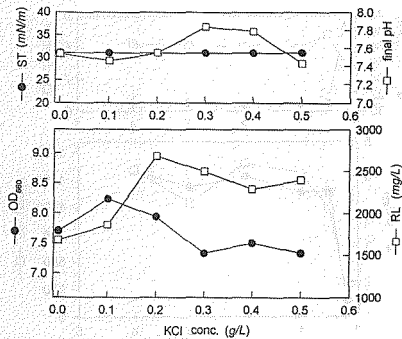
鉀離子對菌株生長及 RL 生產之影響如圖六所示。添加氯化鉀對菌株生長及 RL 生產之影響較明顯。添加 0.2 g/L 氯化鉀時，雖然菌株生長減低，但其 RL 產量最佳，RL 產量為最高超過 2.5 g/L。添加 0.2 g/L 以上之氯化鉀時，菌株生長及 RL 生產均降低。因此，鉀離子具有促進 RL 生產之效果，氯化鉀添加濃度以 0.2 g/L 最佳。

#### (c) 鈣離子

鈣離子對菌株生長及 RL 生產之影響如圖七所示。添加氯化鈣可促進菌株生長，但 RL 產量並無明顯增加。因此，鈣離子並無促進 RL 生成效果。

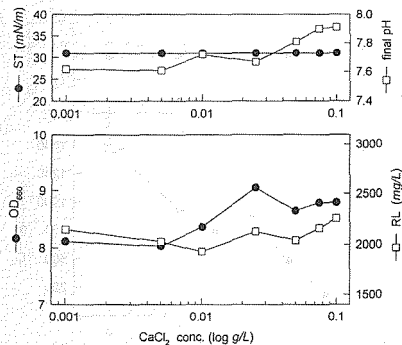
#### (d) 微量元素

微量元素探討硫酸亞鐵、硫酸鋅、硫酸錳、硫酸銅、硼酸對 *P. aeruginosa* 生長及 RL 生成之影響。添加硫酸亞鐵的結果如圖八所示，添加硫酸亞鐵接近 1 mg/L 以上時，雖可促進菌株生長，但添加 0.1 mg/L 以上時，RL 產量便降低。因此硫酸亞鐵可促進菌株生長，但降低 RL 產量，具有抑制 RL 生成作用。



圖六 培養基中氯化鉀濃度對 *P. aeruginosa* 生長及 RL 生產之影響

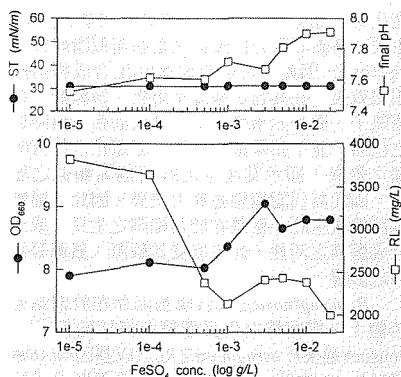
Fig. 6. Effect of potassium chloride concentration on the growth and RL production of *P. aeruginosa*. Bacteria are inoculated in a 500 mL Hinton's flask containing 100 mL basal medium including 5% glycerol, 0.4% NaNO<sub>3</sub>, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% yeast extract, 0.2% MgSO<sub>4</sub>, 0.02% NaCl, and each concentration of potassium chloride, cultured at 30°C, 125 rpm for 72 h. RL: rhamnolipids, ST: surface tension.



圖七 培養基中氯化鈣濃度對 *P. aeruginosa* 生長及 RL 生產之影響

Fig. 7. Effect of calcium chloride concentration on the growth and RL production of *P. aeruginosa*. Bacteria are inoculated in a 500 mL Hinton's flask containing 100 mL basal medium including 5% glycerol, 0.4% NaNO<sub>3</sub>, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% yeast extract, 0.2% MgSO<sub>4</sub>, 0.02% NaCl, 0.03% KCl, and each concentration of calcium chloride, cultured at 30°C, 125 rpm for 72 h. RL: rhamnolipids, ST: surface tension.





圖八 培養基中硫酸亞鐵濃度對 *P. aeruginosa* 生長及 RL 生產之影響

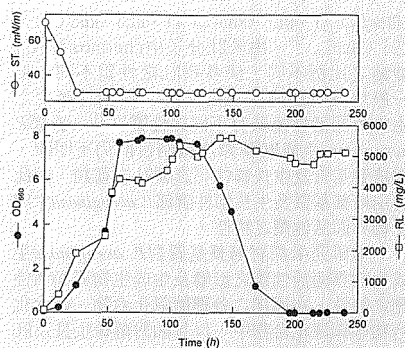
Fig. 8. Effect of ferrous sulphate concentration on the growth and RL production of *P. aeruginosa*. Bacteria are inoculated in a 500 mL Hinton's flask containing 100 mL basal medium including 5% glycerol, 0.4% NaNO<sub>3</sub>, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% yeast extract, 0.2% MgSO<sub>4</sub>, 0.02% NaCl, 0.03% KCl, and each concentration of ferrous sulphate, cultured at 30°C, 125 rpm for 72 h. RL: rhamnolipids, ST: surface tension.

添加硫酸鋅、硫酸錳、硫酸銅、硼酸之影響，硫酸錳、硼酸對菌株生長及 RL 產量之影響並不明顯，硫酸鋅、硫酸銅會減低菌株生長及 RL 產量(未圖示)。因此，硫酸鋅、硫酸銅對菌株生長具有抑制作用，並因此減低 RL 產量。

由以上結果可知，硫酸亞鐵可提高菌體生長；提高硫酸鋅、硫酸銅量，同時抑制菌體生長及 RL 產量；而硼酸並不影響菌體生長及 RL 產量。經調整各微量元素在最適濃度，培養三日時菌株生長為 OD<sub>600</sub> = 7.8，RL 產量為 4.3 g/L。

## 二、以最適培養基培養菌株之生長及生物界面活性劑之生成

由上述各探討之結果組成生產培養基 (production medium)，其組成為每公升含：glycerol, 50 mL; NaNO<sub>3</sub>, 4 g; yeast extract, 3 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g; NaCl, 0.3 g; KCl, 0.2 g; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 10.0 mg; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.1 mg; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.1 mg。以生產培養基接種菌株培養後，菌株之生長及 RL 產量如圖九所示。菌株於接種後 12 小時進入對數生長期，培養 74 小時菌體量達最高，之後進入遲緩期，培養 121



圖九 生產培養基中 *P. aeruginosa* 之生長及 RL 之生產

Fig. 9. Growth and production of RL of *P. aeruginosa* cultured in production medium. Bacteria are inoculated in a 500 mL Hinton's flask containing 100 mL production medium, cultured at 30°C, 125 rpm. The production medium contains: glycerol, 50 mL; NaNO<sub>3</sub>, 4 g; yeast extract, 3 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g; NaCl, 0.3 g; KCl, 0.2 g; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.01 g; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.0001 g; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.0001 g in each liter. RL: rhamnolipids, ST: surface tension.

小時菌體量開始減少，196 小時後菌體死滅。菌株之 RL 產量，接種後即緩慢增加，25 小時後明顯增加，培養 48 至 74 小時時快速增加，之後增加減緩並維持累積量，120-150 小時之間 RL 之累積量最高，可達 4.5-5.5 g/L。以上結果顯示，培養液中 RL 之生產隨菌體生長增加，菌株在對數期時增加最高，在進入遲緩期後 RL 之生產減緩，因此菌株生產 RL 會隨菌體之生長時期不同而變化。菌株產生之 RL 即使在菌體死滅時亦不受分解，並可累積於培養液中，因此增加菌體量可以提高整體 RL 之產量。同時，縮短菌株遲滯期，延長菌株對數期，亦可以提高 RL 之產量，因此亦適於利用連續發酵培養生產。

## 討 論

生物界面活性劑之合成是由菌株代謝生成親水性分子部份及疏水性分子部份，再形成生物界面活性劑。RL 之合成路徑於 1949 年由 Jarvis 開始研究後，其合成路徑已經大致明瞭<sup>(21)</sup>。RL 包含親水性分子之 rhamnose 部份及疏水性分子之 C<sub>10</sub> 碳鏈部份，親水性分子與疏水性分子再形成醱脂。*P. aeruginosa* 可產生含一分子或兩分子 rhamnose 之 RL，及含一分子或兩分子 C<sub>10</sub> 碳鏈之 RL，因此可生成四種型態之 RL: RL1



( $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ )、RL2 ( $\text{RhaC}_{10}\text{C}_{10}$ )、RL3 ( $\text{Rha}_2\text{C}_{10}$ )、RL4 ( $\text{RhaC}_{10}$ )<sup>(7)</sup>。由於 RL 分子中 rhamnose 與  $\text{C}_{10}$  碳鏈之比例不同，使各種 RL 之性質不同，但一般培養可能產生混合之 RL，使菌株產生之生物界面活性劑具有不同之性質<sup>(22-24)</sup>。影響 *P. aeruginosa* 生成 RL 種類之機制目前仍不明瞭，但培養基質及生長條件可影響 RL 之種類，因此可由培養基質及生長條件調節 *P. aeruginosa* 生成生物界面活性劑之特性。

本研究中探討培養基質對 *P. aeruginosa* 生成生物界面活性劑之影響及生成生物界面活性劑之特性。在添加之各種碳氫化合物、碳水化合物等碳源化合物中，以甘油對菌株生長及 RL 合成同時具有最佳效果，碳水化合物之琥珀酸鈉、檸檬酸鈉其次，但碳水化合物之葡萄糖卻可抑制菌株之生長及 RL 合成，此結果顯示碳水化合物中除葡萄糖外對生成 RL 具有促進之效果，葡萄糖以外之碳水化合物可能利於菌株代謝合成 rhamnose 或  $\text{C}_{10}$  碳鏈，但葡萄糖對菌株之影響明顯與其它碳水化合物不同。葡萄糖在微生物代謝之調控上常影響細胞對其它基質化合物之利用，包括其它基質化合物由胞外至胞內之輸送，以及其它基質化合物在胞內代謝之調控。本研究顯示葡萄糖可能對 *P. aeruginosa* 具有類似之效果，因此可抑制 *P. aeruginosa* 之生長及 RL 之合成，此種影響是否與一般 *P. aeruginosa* 菌株之細胞性質有關，或只與 *P. aeruginosa* 產生 RL 能力有關，須再進一步探討。另一方面，碳氫化合物對菌株之影響，雖對生長無顯著之促進效果，但可增加 RL 之合成，顯示菌株對碳氫化合物之利用不似碳水化合物，但菌株明顯可受碳氫化合物誘導合成 RL。此外，由各種類碳氫化合物間表面張力值降低之差異較大，亦可推測菌株可直接利用碳氫化合物為基質合成 RL，但碳氫化合物種類之不同亦可能對菌株之代謝型態產生不同之影響，此點亦有再探討之必要。

氮源化合物對菌株之影響方面，氮源化合物中之硝酸鈉、醋酸鈉、peptone 在菌株生長、RL 生成方面均與其他之硝酸鈉、氯化鈉、硫酸鈉不同，鈉化合物除醋酸鈉外均不利於菌株之生長、RL 生成，顯示含鈉之化合物可能有類似碳源化合物葡萄糖之效果，對菌株細胞、代謝型態產生影響。由於其表面張力值降低、*Fcmc* 之型態與硝酸鈉、醋酸鈉、peptone 三者不同，顯示鈉化合物可能影響菌株之代謝型態，產生不同於硝酸鈉、醋酸鈉、peptone 三者之 RL。硝酸鈉之細胞生長雖非最佳，但可

產生最大量之 RL，顯示硝酸分子可能誘導 RL 生成，其表面張力值降低之型態類似醋酸鈉、peptone，因此，可能有促進 RL 合成相關基因之效果。在其它之酵母萃出物、磷酸鹽、金屬離子、微量元素等之中，其表面張力值降低之型態，並不如碳源化合物、氮源化合物有明顯之差異，顯示其產生之 RL 可能為類似之種類，因此其代謝型態應無大差異。因此，影響本菌株產生 RL，應該在其細胞之生長，或其合成酵素之活性，此可能受其碳源、氮源等條件之影響。

*P. aeruginosa* 之 RL 合成基因存在於細胞染色體上，與菌株之生長環境有密切關係<sup>(25)</sup>。Ochsner 選殖 *P. aeruginosa* 之 RL 合成基因 *rhlAB* 轉殖於 *E. coli* 中時，重組基因可以表現 RL 合成酵素 rhamnosyltransferase，但轉殖株之 RL 產量並不高。再提高其酵素活性時，其 RL 產量仍不理想，由原菌株之 0.15 g/L 提高四倍為 0.6 g/L。Ochsner 推測產量無法大幅提高是由於菌株細胞中合成 RL 前驅物之濃度不高，因此推論合成 RL 之前驅分子係由不同之代謝路徑合成<sup>(26-28)</sup>。由於基因重組菌株中合成前驅分子之代謝為非誘導性表現，雖有充足之合成酵素，RL 之合成仍非誘導性表現。但野生株在受到環境刺激，如環境中碳氫化合物之存在，或碳源、氮源低時，可提高其 RL 前驅分子之代謝合成，而增加 RL 合成。因此，推測 *P. aeruginosa* 存在相關之調控機制可調控 RL 前驅分子合成，而調整培養條件時，可誘導 *P. aeruginosa* 中 RL 合成。本研究結果顯示，碳源及氮源會影響 RL 之生成，特別在碳源為碳氫化合物時，其誘導菌株產生 RL 更為顯著，但其總生成量仍以碳水化合物為碳源時較高。相較於碳氫化合物可誘導 RL 生成但總生成量並非最高，顯示菌株利用基質產生前驅物之代謝不同，因而影響菌株 RL 之生成量。由上述之點可以推測基質對細胞之通透性可能影響菌株細胞內前驅物之量，因此影響菌株產生 RL 之生成量，在以葡萄糖及醋酸鈉為碳源時，菌株之生長不佳，亦可能由於兩種碳源進入細胞之量不高，因此影響菌株 RL 之生成量。

本研究探討 *P. aeruginosa* 合成 RL 之培養條件，檢討 RL 合成之最適條件，及對所生成 RL 性質之影響，可得到最適組成之培養基。在最適培養基中，RL 之合成以甘油為碳源時，可產生高量之 RL。雖然碳氫化合物顯示具有誘導 RL 生成之性質，但甘油顯示可以取代碳氫化合物。甘油為水溶性，其在應用上較碳氫化合物更易於操作培養。培養基中以硝酸鈉為氮源時顯示

具有較peptone更佳之效果，使用硝酸銨為氮源較使用peptone費用更低，可以減低培養之耗費。其它之酵母萃取物、鉀離子又具有促進之效果，可提高RL之產量。因此該培養基為易於操作、耗費較低，亦可得到較佳產量之培養基。

微生物生產之生物界面活性劑，由已往發表之報告可知，以*Torulopsis bombicola*最高，以葡萄糖及油酸為碳源培養時產生之sophorolipids可達38-77 g/L<sup>(8)</sup>。但sophorolipids之乳化力不佳，無法使水、油脂完全乳化，只能增加油脂在水中分散性。RL具有良好之乳化力，可完全使油脂分散於水中形成乳化液，又可由培養條件之調整使其產生種類不同之RL，因此具有更廣泛之利用性。本研究由*P. aeruginosa*合成RL之產量，以最適培養基培養時可達4.3 g/L，延長培養期間可達4.5-5.5 g/L。本研究以外，Robert等人以各種碳化合物、碳水化合物及橄欖油為碳源培養*P. aeruginosa* 44T1株，其產生之RL以橄欖油為碳源可產生4.8 g/L，以甘油為碳源時可產生3.5 g/L<sup>(16)</sup>。Sim等人以葡萄糖及芥籽油(canola oil)為碳源，由*P. aeruginosa* UW-1產生之RL分別為1.2 g/L及11.0 g/L<sup>(23)</sup>。Benincasa等人以橄欖油、向日葵籽油、大豆油、向日葵籽油為碳源，產生之RL以向日葵籽油皂產生最高為16.0 g/L，其它橄欖油、向日葵籽油、大豆油分別為4.8-5.4 g/L<sup>(29)</sup>。上述試驗中以添加植物油可得較佳之產量，但植物油在培養操作上因為疏水性物質不易操作，並有成本之考慮。相對地，本研究中顯示可以甘油為碳源產生RL，甘油為水溶性並有價廉、量大、不影響培養基pH等優點，為極佳之碳源。以甘油為碳源產生RL之例如Rahman等人可生產1.77 g/L<sup>(30)</sup>，Santa等人可生產6.9 g/L<sup>(31)</sup>，本研究中可產生4.5-5.5 g/L，菌株及其它生產條件之差異可能為RL產量不同之原因。因此，本研究中使用菌株*P. aeruginosa*，以最適培養基培養時可容易地培養，並得到高量之RL，具有實際應用之可能性。

## 參 考 文 獻

1. C. Sylbatk and F. Wagner: Production of biosurfactants. In: *Biosurfactants and Biotechnology* (N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray eds.), pp. 88-120. Marcel Dekker Inc., New York (1987).
2. M. M. L. Burger, L. Glaser and R. M. Rurton: The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, **33**: 1619-1627 (1969).
3. D. G. Cooper and D. A. Paddock: Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 173-176 (1984).
4. N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray: Microbial deemulsifiers. In: *Biosurfactants and Biotechnology* (N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray eds.), pp. 247-321. Marcel Dekker Inc., New York (1987).
5. B. E. Anderson and T. Henrysson: Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**: 647-652 (1996).
6. N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray: In situ microbial enhanced oil recovery. In: *Biosurfactants and Biotechnology* (N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray eds.), pp. 163-181. Marcel Dekker Inc., New York (1987).
7. S. Lang and F. Wagner: Structure and properties of biosurfactants. In: *Biosurfactants and Biotechnology* (N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray eds.), pp. 21-45. Marcel Dekker Inc., New York (1987).
8. G. Georgiou, S. C. Lin and M. M. Sharma: Surfactant-active compounds from microorganisms. *BioTechnology*, **10**: 60-65 (1992).
9. I. M. Banat, R. S. Makkar and S. S. Cameotra: Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**: 495-508 (2000).
10. C. N. Mulligan: Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.*, **133**: 183-198 (2005).
11. C. Sylbatk and F. Wagner: Production of biosurfactant. In: *Biosurfactants and Biotechnology* (N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray eds.), pp. 89-119. Marcel Dekker Inc., New York (1987).
12. K. V. Rammana and N. G. Karanth: Production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. *Biotech. Lett.*, **11**: 437-442 (1989).
13. 劉思良、蘇道志、劉俊民：生物界面活性劑生產菌 *Pseudomonas aeruginosa* 之碳化合物耐性及利用。中華生質能源學會會議，**26**: 93-104 (2007)。
14. E. V. Chandrasekaran and J. N. Bemiller: Constituent analyses of glycosaminoglycans. In: *Method in Carbohydrate Chemistry* (R. L. Whistler ed.), pp. 89-96. Academic Press, Inc., New York (1980).
15. I. M. Banat: Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. *Biores. Technol.*, **51**: 1-12 (1995).
16. M. Robert, M. E. Mercade, M. P. Bosch, J. L. Parra, M. J. Espuny, M. A. Manresa, J. Guinea: Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotech. Lett.*, **11**: 871-874 (1989).
17. L. H. Guerra-Santos, O. Kappeli and A. Fiechter: Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**: 443-448 (1986).
18. C. M. Tsai and C. E. Frasch: A sensitive silver stain for detecting lipo-polysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **119**: 115-119 (1982).
19. L. C. Parks (ed.): *Handbook of Microbiological Media*, p. 468-471, 647, 736-742. CRC Press, New York (1993).
20. D. G. Copper, C. R. Maedindak, S. J. B. Duff and N. Kosaric: Enhanced production of surfactin from *Bacillus*



- subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**: 408-412 (1981).
21. F. G. Jarvis and M. J. Johnson: A glycol-lipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**: 4124-4126 (1949).
22. E. Deziel, F. Lepine, S. Milot and R. Villemur: Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim. Biophys. Acta*, **1485**: 145-152 (2000).
23. L. Sim, O. P. Ward and Z. Y. Li: Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **19**: 232-238 (1997).
24. S. Arino, R. Marchal and J. P. Vandecasteele: Identification and production of rhamnolipids biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 162-168 (1996).
25. C. G. MacElwee, H. Lee and J. T. Trevors: Production of extracellular emulsifying agent by *Pseudomonas aeruginosa* UG1. *J. Ind. Microbiol.*, **5**: 25-32 (1990).
26. U. A. Ochsner, J. Reiser, A. Fiechter and B. Witholt: Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 3503-3506 (1995).
27. U. A. Ochsner, A. Fiechter and J. Reiser: Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.*, **269**: 19787-19795 (1994).
28. U. A. Ochsner, A. K. Koch, A. Fiechter and J. Reiser: Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **176**: 2044-2054 (1994).
29. M. Benicosa, J. Contiero, A. Manresa and I. O. Moraes: Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *J. Food Eng.*, **54**: 283-288 (2002).
30. K. S. M. Rahman, T. J. Rahman, S. McClean, R. Marchant and I. M. Banat: Rhamnolipid biosurfactant production by strain of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol. Prog.*, **18**: 1277-1281 (2002).
31. L. M. Santa Anna, G. V. Bebastian, E. P. Menezes, T. L. M. Alves, A. S. Santos, Jr. Pereira and D. M. G. Freire: Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Braz. J. Chem. Eng.*, **19**: 159-166 (2002).

