

Dietzia sp. S-JS-1 利用废弃油脂 生产生物破乳剂的研究

刘 佳¹ 黄翔峰^{1*} 陆丽君¹ 杨 娜² 高赛男² 陈旭远¹ 杨殿海¹ 周 琪¹

(1. 同济大学环境科学与工程学院 污染控制与资源化研究国家重点实验室 上海 200092)

(2. 西北农林科技大学资源环境学院 陕西 杨陵 712100)

摘 要: 生物破乳剂是近期开发出来的用于油水分离的新型破乳剂。本研究利用从受石油污染的土壤中筛选得到、并采用 16S rRNA 鉴定为 *Dietzia* sp. 的一株破乳剂产生菌, 在以废弃油脂 MWFO、SWFO 为碳源培养下, 得到的生物破乳剂的粗重为 4 g/L、3.5 g/L; 对于 W/O、O/W 模型乳状液的破乳效果均可超过以液体石蜡产生的破乳剂, 且以 SWFO 废弃油脂培养得到的生物破乳剂可以同时应用于两种模型乳状液的使用。对于碳源利用方面 *Dietzia* sp. 在利用两种废弃油脂脂肪酸的过程中, 都是优先利用 C16 和 C18 的脂肪酸, 但对于两种废弃油脂的利用率上存在一定差异。采用 TLC 和 FTIR 分析发现, 3 种碳源培养得到的生物破乳剂均为脂肽类生物破乳剂, 其破乳剂的化学结构还有待进一步研究。

关键词: *Dietzia* sp., 废弃油脂, 生物破乳剂, 脂肽

Production of Biodemulsifier by One Strain of *Dietzia* sp. S-JS-1 in the Use of Waste Frying Oils

LIU Jia¹ HUANG Xiang-Feng^{1*} LU Li-Jun¹ YANG Na² GAO Sai-Nan²
CHEN Xu-Yuan¹ YANG Dian-Hai¹ ZHOU Qi¹

(1. College of Environmental Science & Engineering, State Key Laboratory of Pollution Control
and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

(2. College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: As a new demulsifier, bio-demulsifier is explored recently to break the oil-water emulsion. In this study, one demulsifying strain isolated from oil contaminated soil was identified as *Dietzia* sp. by 16S rRNA. When it was cultured in MMSW substrate, adding MWFO and SWFO as the carbon source, it could produce crude biodemulsifier of 4 g/L and 3.5 g/L respectively. Compared with biodemulsifier produced by paraffine as the carbon source, both of them could achieve higher demulsification ratio in breaking W/O and O/W model emulsion. Additionally, biodemulsifier produced by SWFO as the carbon source had the ability to demulsify two model emulsion effectively. By analyzing the carbon utilization, it could be concluded that C16 and C18 fatty acid of the two waste frying oils were preferable for *Dietzia* sp.. The biodemulsifiers pro-

基金项目: 上海市科委基金资助项目(No. 051258038); 上海市科委登山行动计划(No. 06DZ22007); 新疆维吾尔自治区科技支疆项目(No. 200891115)

* 通讯作者: Tel: 86-21-65982592; ✉: hxf@mail.tongji.edu.cn

收稿日期: 2009-01-20; 接受日期: 2009-02-17

duced from three different carbon sources all of which were identified as lipopeptide by TLC and FTIR. Further research should be taken to investigate its chemical structure.

Keywords: *Dietzia* sp., Waste frying oil, Bio-demulsifier, Lipopeptide

生物破乳剂是生物表面活性剂的一种,是由微生物细胞代谢产生的活性物质,能够使原油乳状液油水分离,原油含水率降低使其便于运输。生物破乳剂能够降低油水界面张力,具有化学方法难以合成的亲水、亲油基团,从而具有较强的破乳活性,此外生物破乳剂因其具有低毒、可生物降解、高效稳定性等优点成为潜在的化学破乳剂的替代品。生物破乳剂的应用目前最大的瓶颈是生物破乳剂在发酵生产过程中成本较高,而在生物化工过程中原料所占总成本约为10%~30%之间^[1]。通过采用廉价易得、可再生的工农业废弃物作为碳源,是实现生物破乳剂及其同类生物表面活性剂低成本生产的一条有效路径。目前在生物表面活性剂的研究过程中,作为碳源使用的廉价物质包括废弃油脂:原油加工中高分子废弃物^[2]、食用油油脚和煎炸老油^[2,3]、动物脂肪^[4]、乳清和酿酒废物:干酪乳清^[5]、含淀粉、糖类物质:大豆糖蜜^[6]、农业固体废弃物:土豆皮^[7]、大麦麸、玉米棒^[8]等已开展了较多的研究。在这些已有的研究中,废弃油脂是研究者关注比较多的一种废弃碳源之一。

目前对废弃油脂开展的研究主要集中在 *Bacillus*、*Pseudomonas* 和 *Candida*^[1]。开展的相关研究主要包括利用废弃油脂提高生物表面活性剂的产量^[9]、考察废弃油脂中的重金属离子对产量和性质的影响^[10]、培养得到的产物的稳定性^[11]以及发酵过程中补料、条件和动力学研究^[12]等。但是,尚未看到采用废弃油脂用于生产生物破乳剂的研究,然而废弃油脂能否用于生产生物破乳剂,最重要的是合成的生物破乳剂的性质和性能是否发生变化。已有研究表明,采用废弃机油和豆油饼作为 *Corynebacterium kutscheri* 的碳源生产乙二醇脂肽时,其化学组成没有发生变化^[13],因此可作为其工业化生产的原料。

本研究以前期研究中筛选得到的一株生物破乳剂产生菌 S-JS-1 为研究对象,虽然以液体石蜡为碳源培养得到的胞壁结合的生物破乳剂具有较好的破乳效果,但考虑到液体石蜡价格随石油价格上涨而呈上涨趋势,本研究尝试以废弃食用油脂为碳源生产生物破乳剂,与液体石蜡培养产物进行了比较,

开展了碳源对生物破乳剂产量、性质和破乳性能的研究。

1 方法与材料

1.1 菌种筛选与鉴定

生物破乳剂产生菌 S-JS-1 的筛选过程、所用培养基和鉴定过程参见文献[14]。

1.2 微生物培养特性测定方法

1.2.1 生物量: 将 S-JS-1 全培养液 10000 r/min 离心 10 min 得到离心获得物,离心获得物用灭菌的生理盐水清洗 2 次后,冷冻干燥 24 h 并称重。

1.2.2 表面张力: 采用环法测定全培养液的表面张力^[15]。

1.2.3 乳化能力: 乳化能力的测定参照文献[13,16]使用的方法并加以改进。在装有 5 mL 煤油的试管中加入 5 mL 全培养液,将其在迷你振荡器上(MS2, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Germany)以最大转速振荡 2 min, 24 h 后观察乳化的效果。乳化能力及其稳定性分别以 EV、ES 表示,计算方法参照文献[12],具体如下: EV=乳状液的体积/溶液的总体积×100%; ES = [EV₂₄, % at 24 h]/[EV₀, % at 0 h]×100。

1.3 破乳试验

1.3.1 模型乳状液制备和破乳试验: W/O 型、O/W 型模型乳状液制备参照文献[7]改进,具体配置、检验方法和破乳试验参见文献[14]。

1.3.2 破乳效率计算: 乳状液的破乳效率采用上层煤油脱除率、乳状液脱除率和下层水脱除率综合表达:

$$\begin{aligned} \text{上层煤油脱除率} &= \frac{\text{上层油脱除体积}}{\text{乳状液中煤油体积}} \times 100\% \\ \text{乳状液脱除率} &= \left(1 - \frac{\text{剩余乳状液体积}}{\text{乳状液体+菌株培养液体积}} \right) \times 100\% \\ \text{下层水脱除率} &= \frac{\text{底层水脱除体积}}{\text{乳状液中蒸馏水体积+菌株培养液体积}} \times 100\% \end{aligned}$$

1.4 废弃油脂分析

1.4.1 废弃油脂理化性质分析：两种废弃油脂分别取自餐厅使用过的煎炸老油，一种为 mixed waste frying oil (MWFO)，另外一种为 soybean waste frying oil(SWFO)。依据《食用植物油卫生标准的分析方法》等测定了两种油的酸价、过氧化值、碘价和皂化值。

1.4.2 废弃油脂脂肪酸分析：以液体石蜡、MWFO、SWFO 三种碳源生产生物破乳剂发酵前后的碳源组分均进行了 GC-MS 的分析^[17,18]。废弃油脂采用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液进行酯化，得到的脂肪酸甲酯进行 GC-MS(Thermo Focus DSQ)配以 HP-5MS 柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm)测定。初温：100℃，保持 2 min；进样口温度 250℃；程序升温 20℃/min 进行，终温 300℃，保持 1 min；检测器温度 250℃；进样量为 1 μL，分流进样，进样比 30:1；液体石蜡，采用正庚烷进行萃取，得到的溶剂相旋转蒸发与氮吹，纯化后的烷烃进行 GC-MS 的测定。

2 结果与讨论

2.1 菌种的筛选、生理生化性质与鉴定

前期研究中发现 S-JS-1 在以液体石蜡为碳源的 MMSW 培养基内，可产生胞壁结合型的生物破乳剂：将全培养液经离心后得到的菌体悬浮于蒸馏水中，其破乳效果与全培养液的破乳效果均达到 90% 以上。S-JS-1 为球状短杆状，无鞭毛，直径为 1.2 μm ~1.6 μm，在营养琼脂培养后显橙红色，圆形突起，干燥且边缘整齐。根据伯杰氏手册第八版，对 S-JS-1 进行生理生化性质的分析，结果见表 1 所示。采用 16S rRNA 对该菌进行了鉴定，结果为迪茨菌属 (*Dietzia* sp. S-XJ-1)。

2.2 S-JS-1 的培养特性

废弃油脂 MWFO、SWFO 的理化性质见表 2 所示，从表中可知两种废弃油脂均已发生腐败，不可安全食用，为废弃的煎炸老油。将 S-JS-1 在 MWFO、SWFO 废弃油脂进行培养，并与液体石蜡培养进行比较，结果见图 1a、1b、1c。S-JS-1 在 3 种碳源培养下全培养液的表面张力都从 72 mN/m 降低到 30 mN/m 左右，可见 S-JS-1 可以利用 3 种不同碳源生产生物破乳剂；S-JS-1 在 3 种碳源培养下得到的生物量存在较大的差异：在培养第 7 天时，以 MWFO、

表 1 S-JS-1 的生理生化性质 Table 1 Characteristics of S-JS-1 on its physiological and biochemical properites		
项目 Item	性质 Characteristics	推论 Inference
糖类 Glucide	葡萄糖 O Glucose O	+
	葡萄糖 F Glucose F	+
	木糖 Xylose	+
	蔗糖 Sucrose	-
	鼠李糖 Rhamnose	-
	密二糖 Melibiose	-
	阿拉伯糖 Arabinose	-
	棉子糖 Raffinose	-
	乳糖 Lactose	-
	甘露醇 Mannitol	-
醇类 Alcohol	肌醇 Inositol	-
	山梨醇 Sorbitol	-
	苦杏仁苷 Amygdalin	-
	侧金盏花醇 Adonitol	-
	卫矛醇 Galactitol	-
	脲酶 Urease	+
	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-
	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	-
	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-
	色氨酸脱氨酶 Tryptophan desaminase	-
其他类 Others	枸橼酸盐 Citrate	+
	麦康凯培养基生长 Macconkey agar	+
	ONPG	+
	吲哚 Indole	-
	H ₂ S	-
	VP	+
	明胶水解 Glutin hydrolysis	+
	葡萄糖产气 Gas production from glucose	-
	酒石酸盐 Tartrate	+
	动力 Motility	+
	甲基红 MR	-
	葡萄糖酸盐 Gluconate	-
	苯丙氨酸 Phenylalanine	-

SWFO 废弃油脂为碳源培养得到的生物量分别为 4 g/L、3.5 g/L，远远高于液体石蜡培养得到的生物量 1.8 g/L。Raza 等研究发现 *Pseudomonas putida* 在利用不同碳源生产鼠李糖脂时，大豆煎炸废油和玉米煎炸废油是最为优良的碳源，而石蜡油、煤油

表 2 废弃油脂理化性质
Table 2 Characteristics of waste frying oils on its chemical properties

废弃油脂 Waste frying oils	酸价 (mg KOH/g) Acid value (mg KOH/g)	过氧化值 (meq/kg) Peroxide value (meq/kg)	碘价 (g I/100 g) Iodine value (g I/100 g)	皂化值 (mg KOH/g) Saponification value (mg KOH/g)
MWFO	2.947	340.47	77.63	195.15
SWFO	2.56	9.24	101.26	184.18

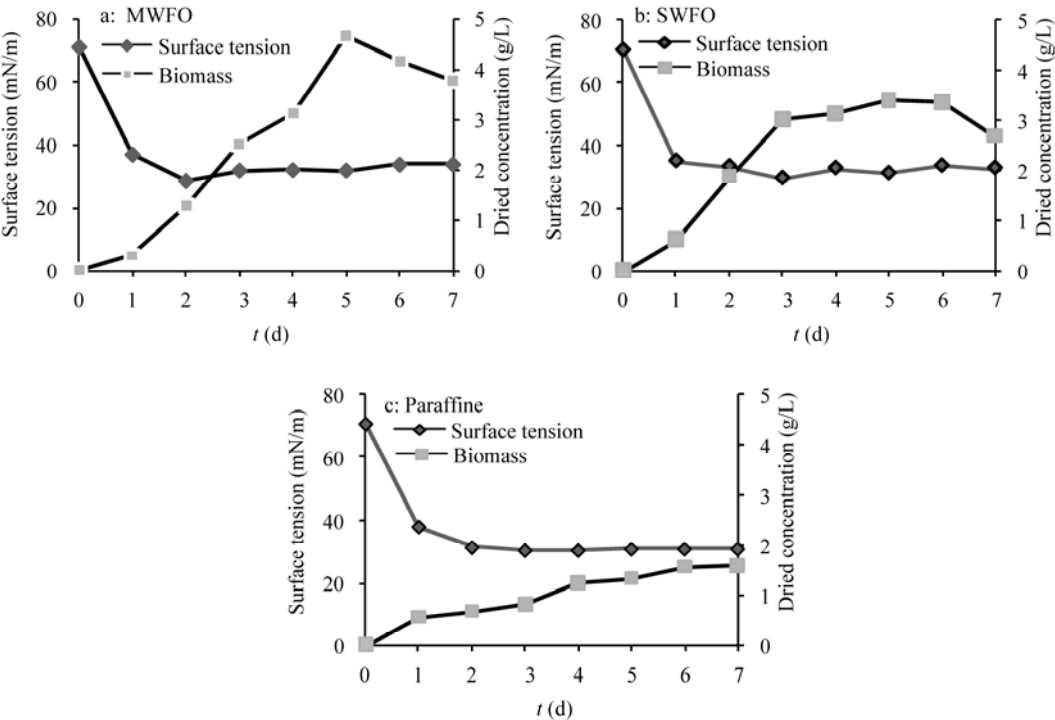


图 1 S-JS-1 在 3 种碳源中培养随时间变化
Fig. 1 Cultivation on three carbon sources of S-JS-1

则次之^[19]，与本研究得到的结果一致。

分析原因主要是废弃油脂以脂肪酸为主，而液体石蜡以烷烃为主，微生物细胞表面对这两类疏水性物质的亲和力存在差异；另外对于烷烃类的物质来说，微生物对其利用需首先进行烃氧化，转化为酸、醇类物质，然后才能与脂肪酸类物质一样，进行 β 氧化，因此微生物细胞对于脂肪酸类物质应更易利用。

2.3 生物破乳剂破乳效果比较

S-JS-1 产生的生物破乳剂对两种类型的模型乳状液均具有一定破乳效果，见图 2。在 W/O 模型乳状液，3 种碳源培养下的生物破乳剂的脱油率和脱水率均可达到 90%以上，MWFO 废弃油脂培养得到的生物破乳剂的破乳效果略好；比较脱油率和脱水率，可以发现 3 种碳源培养得到的破乳剂的脱油率都大于相应的脱水率，可见该破乳剂优先作用于模型乳

状液的连续相，且连续相的脱出率也更大。

在 O/W 模型乳状液中(图 2b)，破乳效果与 W/O 模型乳状液的破乳效果出现了较大的差异。3 种碳源培养得到的生物破乳剂，脱水率远高于脱油率，这可能与 O/W 模型乳状液中分散相是水有关；此外在 O/W 模型乳状液中，MWFO、SWFO 废弃油脂培养得到的生物破乳剂的脱油率和脱水率均要高于液体石蜡，这可能是由于在废弃油脂为碳源时得到的生物破乳剂的浓度高于以液体石蜡培养得到的破乳剂；另外，有研究发现生物表面活性剂的脂肪酸的组成与其降低碳氢化合物表面张力有关^[20]，因此上述现象也可能由于 3 种碳源合成的生物破乳剂结构存在差异，从而导致破乳剂的破乳性能不同。此外，需要值得关注的是 SWFO 废弃油脂培养得到的产物，在 W/O 和 O/W 模型乳状液中破乳效果均很好，这与一般的化学破乳剂的破乳性能存在差异，其破乳机

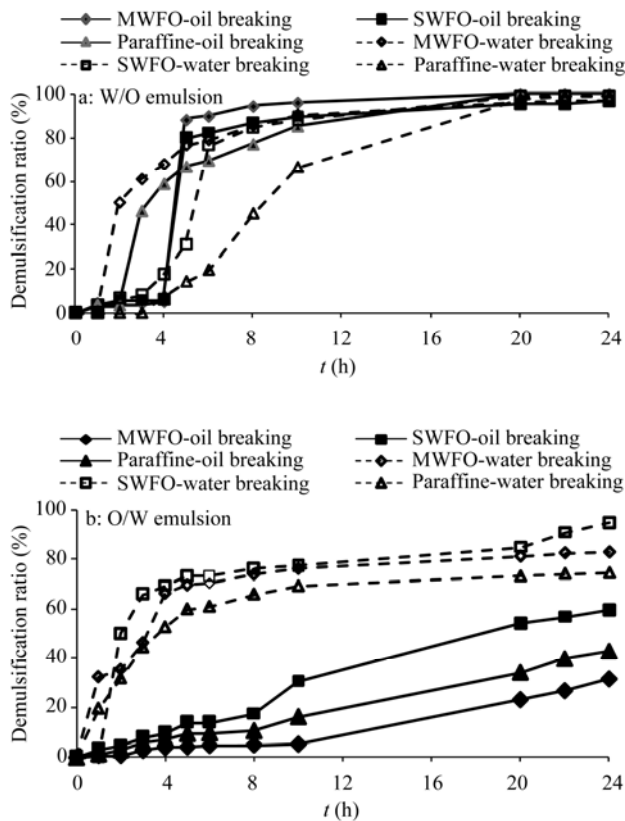


图2 S-JS-1在3种碳源培养下在乳状液中破乳效果比较
Fig. 2 Comparison of demulsification ratio in model emulsion by product of S-JS-1 in the use of three carbon sources

注: a: 空白油脱出率小于10%, 水脱出率为0; b: 空白水脱出率小于10%, 油脱出率为0。

Note: a: In W/O emulsion, the blank showed less than 10% of oil breaking ratio and its water breaking ratio was 0 within 24 h; b: In O/W emulsion, the blank showed less than 10% of water breaking ratio and its oil breaking ratio was 0 within 24 h.

理有待进一步研究。

总之, 采用废弃油脂生产生物破乳剂的破乳效果可与液体石蜡生产得到的生物破乳剂相匹敌, 而采用废弃油脂作为碳源, 可大大节省生物破乳剂的生产费用, 且作为一种可再生的废弃资源, 解决了环境中的污染问题。

2.4 三种碳源利用对生物破乳剂表面性质的影响

2.4.1 菌种利用2种废弃油脂的研究: 对液体石蜡进行GC-MS分析, 结果发现液体石蜡为C20-C30烷烃的同分异构体, 发酵利用后的剩余烷烃仍以C20-C30为主, 但长链烷烃的利用较多。根据GC-MS分析结果, 发现MWFO、SWFO废弃油脂主要以C16:0、C18:2、C18:1为主; 对于MWFO废弃油脂, 饱和脂肪酸:单不饱和脂肪酸:多不饱和脂肪

酸=2:2:1, 而对于SWFO废弃油脂这一比例为3:4:3。图4反映了S-JS-1对两种废弃油脂中的脂肪酸的利用情况。从图中可知, S-JS-1对MWFO废弃油脂中除C14:0之外的脂肪酸的利用率都要高于SWFO废弃油脂; 而对于SWFO废弃油脂来说, 对C18:0的利用率最高, 而有研究发现 *Pseudomonas aeruginosa* 在利用油脚的过程中对C18:0没有利用^[3], 这一差异可能与不同菌种的利用特性有关。可见, S-JS-1在利用两种废弃油脂脂肪酸的过程中, 都是优先利用C16和C18的脂肪酸, 这与大多数研究类似^[17]。

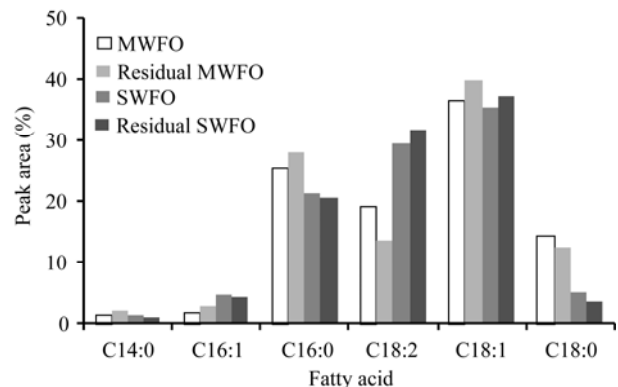


图3 S-JS-1培养前后脂肪酸含量比
Fig. 3 Comparison of fatty acid utilization difference

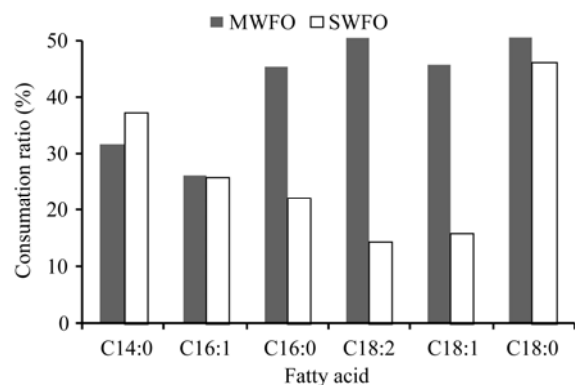


图4 S-JS-1利用两种废弃油脂脂肪酸的利用率
Fig. 4 Comparison of fatty acid utilization ratio

已有报道, 当采用单一脂肪酸作为碳源时利用C18培养得到的槐糖脂产量最大; 而对于C18的不同饱和度的脂肪酸进行研究时发现C18:1的利用效果最好^[10]。通过对碳源的分析可知, S-JS-1对于C18:2和C18:1的利用效率相似, 本研究中所用的不同来源的两种废弃油脂, 脂肪酸的种类和浓度存在一定的差异^[17], 且废弃油脂的成分复杂, 可能还含有其他类的物质, 从而导致对于同一菌种来说利用

率不同。废弃油脂中脂肪酸的种类、浓度与合成的生物破乳剂关系需要深入研究。

2.4.2 生物破乳剂的乳化能力：生物表面活性剂的乳化能力是其重要的性质之一，乳化能力强可反映该表面活性剂对乳化对象具有较强的降解能力。考虑到不同碳源在合成生物表面活性剂过程中，会对其乳化能力产生影响^[21]，考察了3种碳源培养得到的菌悬液的乳化能力，见图5a、5b、5c。从图中可知，S-JS-1的产物具有较强的乳化能力，可以对废弃

油脂和煤油产生乳化能力，对于废弃油脂的乳化能力EV24可以达到60%左右，而对于液体石蜡的乳化能力存在一定的差异。对于液体石蜡的乳化，发现以液体石蜡培养得到的产物其乳化能力达到20%，远高于另外2类产物。可见，液体石蜡培养得到的S-JS-1产生的表面活性剂对液体石蜡的乳化能力更高。另外，从乳化能力的稳定性来看，3种碳源培养得到的生物表面活性剂对SWFO的乳化能力稳定性最强，而对MWFO的乳化能力稳定性最弱。

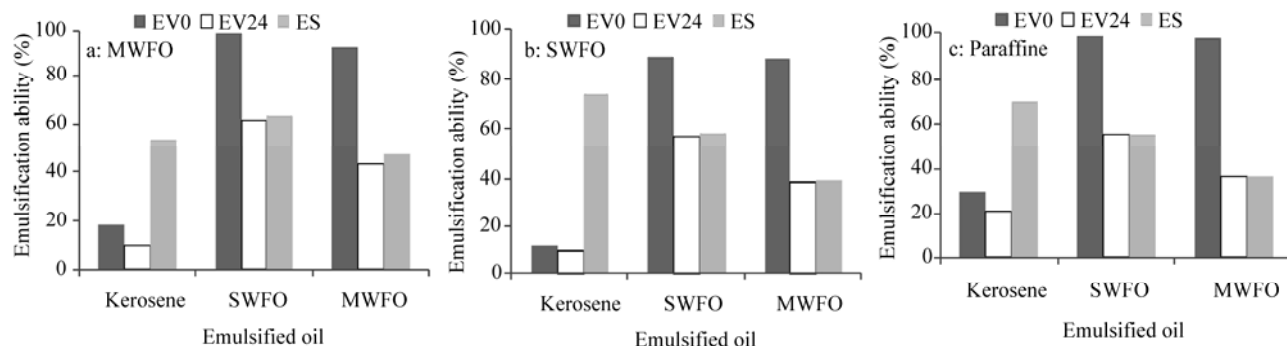


图5 S-JS-1以3种碳源培养的乳化能力

Fig. 5 Comparsion of emulsificaiton ability of S-JS-1 cultivated on three carbon sources

S-JS-1产生的生物表面活性剂属胞壁结合型，因此其所产生的乳化能力与细胞表面对疏水物质的亲和力具有一定的关系；而细胞表面的亲和力可能与细胞对有机相摄取生长基质、碳源特性、自身诱导机制等有关^[2]。因此可以推断本研究中所发现的对于煤油的不同乳化结果可能是因为，碳源与乳化对象一致^[22]而引起乳化对象与表面活性剂的结构具有相似性，从而可以得到更高的乳化能力^[22]。

2.5 生物破乳剂的初步鉴定

目前对于脂肽类生物表面活性剂合成的机理已经有了相关研究，如对于*Bacillus* spp.合成脂肽的分子遗传学研究等^[23]。但总体而言，生物表面活性剂的合成是微生物细胞群体感应系统控制，对于每种细胞来说均存在差异。采用TLC和FTIR对经纯化后的这3种生物破乳剂进行分析与研究，采用TLC对生物破乳剂进行初步鉴定发现，喷上茚三酮显色剂后，在比移值为0.35($R_f=0.35$)处有紫红色斑点，而溴百里香酚蓝试剂、苯酚-硫酸试剂不显色，说明该生物破乳剂为脂肽类生物表面活性剂。对得到IR图进行分析，发现3种碳源培养得到的生物破乳剂均有脂肪碳链结构，因此可以判断得到的生物破乳

剂为脂肽类生物表面活性剂。

3 结论

- 1) *Dietzia* sp.菌利用废弃油脂发酵生产生物破乳剂是可行的，产生的生物破乳剂的表面性质和破乳性能与采用液体石蜡相比没有较大的改变；
- 2) SWFO废弃油脂作为碳源时产生的生物破乳剂在W/O和O/W的乳状液的破乳效果均较好；
- 3) 生物破乳剂的性能与碳源的种类有一定关系，与微生物细胞对碳源的利用机制有关；
- 4) 3种碳源培养得到的生物破乳剂均为脂肽类生物破乳剂，其化学结构是否发生变化有待进一步研究。

参考文献

- [1] Mukherjee S, Das P, Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24(11): 509-515.
- [2] Yuste L, Corbella ME, Turiegano MJ, et al. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbi-*

- ology Ecology, 2000, **32**(1): 69–75.
- [3] Benincasa M, Accorsini FR. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(9): 3843–3849.
- [4] Costa S, Nitschke M, Contiero J. Fats and oils wastes as substrates for biosurfactant production. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*, 2008, **28**(1): 34–38.
- [5] Joshi S, Bharucha C, Jha S, *et al.* Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 2008, **99**: 195–199.
- [6] Solaiman DKY, Ashby RD, Zerkowski JA, *et al.* Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnology Letters*, 2007, **29**(9): 1341–1347.
- [7] Das K, Mukherjee AK. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*, 2007, **42**(8): 1191–1199.
- [8] Rodrigues L, Moldes A, Teixeira J, *et al.* Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, **28**(2): 109–116.
- [9] Zhu LZ, Zhang M. Effect of rhamnolipids on the uptake of PAHs by ryegrass. *Environmental Pollution*, 2008, **156**(1): 46–52.
- [10] Felse PA, Shah V, Chan J, *et al.* Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, **40**(2): 316–323.
- [11] Rufino RD, Sarubbo LA, Campos-Takaki GM. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2007, **23**(5): 729–734.
- [12] Raza ZA, Khan MS, Khalid ZM, *et al.* Production of biosurfactant using different hydrocarbons by *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8 mutant. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 2006, **61**(1-2): 87–94.
- [13] Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, *et al.* Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2008, **24**(7): 917–925.
- [14] Huang XF, Liu J, Lu LJ, *et al.* Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp. *Bioresource Technology*, 2009, **100**(3): 1358–1365.
- [15] Bodour AA, Miller-Maier RM. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, **32**(3): 273–280.
- [16] Plaza GA, Jangid K, Lukasik K, *et al.* Reduction of petroleum hydrocarbons and toxicity in refinery wastewater by bioremediation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, **81**(4): 329–333.
- [17] Nitschke M, Costa S, Haddad R, *et al.* Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnology Progress*, 2005, **21**(5): 1562–1566.
- [18] Kato S, Kunisawa K, Kojima T, *et al.* Evaluation of ozone treated fish waste oil as a fuel for transportation. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 2004, **37**(7): 863–870.
- [19] Raza ZA, Rehman A, Khan MS, *et al.* Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. *Biodegradation*, 2007, **18**(1): 115–121.
- [20] Youssef NH, Nguyen T, Sabatini DA, *et al.* Basis for formulating biosurfactant mixtures to achieve ultra low interfacial tension values against hydrocarbons. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2007, **34**(7): 497–507.
- [21] Abouseoud M, Maachi R, Amrane A, *et al.* Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 2008, **223**(1-3): 143–151.
- [22] Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, **61**(1): 47–64.
- [23] Sullivan ER. Molecular genetics of biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, **9**(3): 263–269.