Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Research article

A new strain of Rhodotrula mucilaginosa producing sophorolipid biosurfactant as an effective agent in microbial oil extraction

Zahra Ganji Ph.D., Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. zahra.gangi1@gmail.com
Keivan Beheshti-Maal Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran **(Corresponding author).** beheshtimaal@iaufala.ac.ir
Ahmadreza Massah Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahreza Branch, Islamic Azad University, Shahreza, Isfahan, Iran. massah@iaush.ac.ir
Zarrindokht Emami-Karvani Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. zarrindokht20@gmail.com

Abstract

Objective: Biosurfactants have wide applications in the microbiology of food and oil. The aim of this research was to investigate the production of stable biosurfactant in high temperature and salinity from yeasts isolated from oil-contaminated soil.

Materials and methods: Bushnell Haas culture medium was used to screen biosurfactant producing yeasts. The presence of biosurfactant was evaluated using oil dispersion and surface tension reduction tests.

Findings: The best biosurfactant producing strain of Radotrulla mucilaginosa was named GBMEIAUF1 and its 5.8s-rDNA gene sequence was registered in the NCBI gene bank under accession number CBS11162. The results of thin layer chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy confirmed that the extracted biosurfactant was sophorolipid with significant surface activity. Purified sophorolipid decreased the surface tension of water from 72 mN/m to 1.29 mN/m. The highest emulsification index, E24%, the extracted biosurfactant was 53% and retained 63.71 to 58.09% of its initial activity at 80 to 120 degrees Celsius. This biosurfactant also retained 82.67 and 89.41% of its initial activity at pH 10.5, and 12, 59.66% of its initial activity at 10% salinity.

Conclusion: This research is the first report of sophorolipid production by the yeast Redotrula mucilaginosa.

Cite this article: Ganji Z, Beheshti-Maal K, Massah AR & Emami-Karvani Z. A new strain of Rhodotrula mucilaginosa producing sophorolipid biosurfactant as an effective agent in microbial oil extraction. *Applied Biology*. 2023; 13(1): 63-84.

Received: 2022/12/23 ; **Revised:** 2023/01/21 ; **Accepted:** 2023/03/01 ; **Published online:** 2023/03/06

© the authors **Publisher:** Qom Islamic Azad University

Due to its thermal stability and high pH and salinity tolerance, sophorolipid produced by Redotrula mucilaginosa can be strongly recommended as an effective emulsifying agent for application in microbial enhanced oil extraction programs as well as food industry.

Keywords: biosurfactant, Redotrula mucilaginosa, Oil dispersion, Surface tension, Emulsion index, Sophorolipid, Microbial oil extraction.

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

مقاله پژوهشی

سویه جدید ردوترولا موسیلاژینوزا تولیدکننده بیوسورفکتانت سوفورولیپید به عنوان یک عامل مؤثر در استخراج میکروبی نفت

زهرا گنجی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
zahra.gangi1@gmail.com

کیوان بهشتی مآل دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران (نویسنده مسئول).
beheshtimaal@iaufala.ac.ir

احمدرضا مساح استاد، گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد شهرضا، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرضا، اصفهان، ایران.

زرین دخت امامی کرونی استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
massah@iaush.ac.ir

چکیده

هدف: بیوسورفکتانت‌ها کاربردهای گسترده‌ای در میکروبیولوژی مواد غذایی و نفت دارند. هدف این تحقیق بررسی تولید بیوسورفکتانت پایدار در حرارت و شوری بالا از مخمرهای جداسازی شده از خاک آلوده به نفت بود.

مواد و روش‌ها: از محیط کشت بوشنل هاس برای غربال‌گری مخمرهای مولد بیوسورفکتانت استفاده شد. وجود بیوسورفکتانت با استفاده از آزمون‌های پراکنش روغن و کاهش کشش سطحی ارزیابی شد.

یافته‌ها: بهترین سویه تولیدکننده بیوسورفکتانت *ردوترولا موسیلاژینوزا* GBMEIAUF1 نام‌گذاری شد و توالی ژن 5.8s-rDNA آن در بانک ژنی NCBI، تحت شماره دسترسی CBS11162 ثبت گردید. نتایج کروماتوگرافی لایه نازک و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه تأیید کرد که بیوسورفکتانت استخراج شده سوفورولیپیدی با فعالیت سطحی قابل توجهی بود. سوفورولیپید خالص شده کشش سطحی آب را از ۷۲ mN/m تا ۲۹/۱ mN/m کاهش داد. بیشترین شاخص امولسیون کنندگی، E24٪، بیوسورفکتانت استخراج شده ۵۳٪ به دست آمد و ۶۳/۷۱ تا ۵۸/۰۹ درصد از فعالیت اولیه خود را در دمای ۸۰ تا ۱۲۰ درجه سانتیگراد حفظ کرد. این بیوسورفکتانت همچنین به ترتیب ۸۲/۶۷ و ۸۹/۴۱ درصد از فعالیت اولیه خود را در pH ۱۰/۵، و ۱۲، ۵۹/۶۶ درصد از فعالیت اولیه خود را در در شرایط شوری ۱۰ درصد حفظ کرد.

استناد به این مقاله: گنجی ز، بهشتی مآل ک، مساح ار، امامی کرونی زد. سویه جدید ردوترولا موسیلاژینوزا تولیدکننده بیوسورفکتانت سوفورولیپید به عنوان یک عامل مؤثر در استخراج میکروبی نفت. *بیولوژی کاربردی*. ۱۴۰۲؛ ۱۳(۱): ۶۳-۸۴.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۲ ؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۱۱/۰۱ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۲/۱۰ ؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

© نویسندگان
ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

نتیجه‌گیری: این تحقیق اولین گزارش تولید سوفورولیپید توسط مخمر *ردوترولا موسیلاژینوزا* است. با توجه به پایداری حرارتی و تحمل pH و شوری بالا، سوفورولیپید تولید شده توسط *ردوترولا موسیلاژینوزا* می‌تواند به عنوان یک عامل امولسیون‌کننده مؤثر اکیداً برای کاربرد در برنامه‌های استخراج افزایش یافته میکروبی نفت و همچنین صنایع غذایی توصیه شود.

کلیدواژه‌ها: بیوسورفکتانت، *ردوترولا موسیلاژینوزا*، پراکنش روغن، کشش سطحی، شاخص امولسیون، سوفورولیپید، استخراج میکروبی نفت.

۱. مقدمه

اخیراً، به دلیل رشد صنعتی شدن و شهرنشینی انسانی، تقاضای جهانی نفت و مشتقات آن به طور فزاینده‌ای رو به افزایش نهاده است. در روش‌های معمول استخراج اولیه و ثانویه، مقدار قابل توجهی نفت خام که ۶۰ تا ۷۰% این ماده گرانبهاء را شامل می‌شود، به صورت به دام افتاده در مخازن باقی می‌ماند (۱). یکی از روش‌های شیمیایی مورد توجه، استخراج افزایش یافته نفت[1] است. در این روش، با استفاده از سورفکتانت‌ها[2] یا عوامل فعال‌کننده سطحی، استخراج باقیمانده نفت از مخازن انجام می‌شود. این ترکیبات آمفی‌فیلیک ویسکوزیته نفت خام را کاهش می‌دهند و منجر به حرکت نفت و تسهیل بازیابی آن می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها[3] می‌توانند به عنوان جایگزین‌های ارزشمند بیولوژیک سورفکتانت‌ها در نظر گرفته شوند؛ زیرا غیرسّمی هستند، در سطوح pH، درجه حرارت و شوری نامتعارف، فعالیت بالایی دارند؛ زیست تخریب‌پذیر و سازگار با محیط زیست هستند و می‌توان آنها را با استفاده از پسماندهای تجدیدپذیر تولید نمود (۲، ۳، ۴). بیوسورفکتانت‌ها به پنج گروه گلیکولیپیدها، لیپوپپتیدها، فسفولیپیدها، اسیدهای چرب و بیوسورفکتانت‌های پلیمری تقسیم می‌شوند (۴، ۵). بیوسورفکتانت‌های گلیکولیپیدی دارای چندین کاربرد در زیست پزشکی (به عنوان عوامل ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد چسب)، صنایع غذایی و کشاورزی، پالپ و نساجی، لوازم آرایشی، بهداشتی و صنایع دارویی هستند. همچنین، بیوسورفکتانت‌ها به طور فزاینده‌ای در صنایع نفتی برای استخراج افزایش یافته میکروبی نفت[4] مورد توجه قرار گرفته‌اند. اصطلاح MEOR به عنوان استفاده از میکروارگانیسم‌ها یا محصولات زیستی آنها مانند بیوسورفکتانت‌ها، برای افزایش استخراج نفت باقیمانده در مخزن تعریف شده است (۴). بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند توسط باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای و مخمّرها تولید شوند. تولید بیوسورفکتانت‌های مختلف از منابع باکتریایی و اثربخشی آنها در MEOR در مطالعات مختلف از منابع باکتریایی مانند پسودوزانتوموناس[5] (۶)، باسیلوس آمیلولیکوئی‌فاسینس[6]

1. Enhanced oil recovery, EOR
2. Surfactants
3. Biosurfactants
4. Microbial Enhanced Oil Recovery, MEOR
5. Pseudoxanthomonas sp.
6. Bacillus amyloliquefaciens

(۷)، باسیلوس سرئوس[1] و باسیلوس سابتیلیس[2] (۸)، پسودوموناس ائروژینوزا[3] (۹)، استنتروفوموناس[4] (۱۰)، میکروباکتریوم ماریتیپیکوم[5] (۳) و ارتروباکتر اکسیدانس[6] (۱۱) گزارش شده است. ویژگی‌هایی مانند توانایی استفاده از منابع هیدروکربنی متنوع، اندازه سلول بزرگ‌تر و تولید بیشتر بیوسورفکتانت، موجب شده است سویه‌های مخمری به عنوان میکروارگانیسم‌های کارآمدتری جهت تولید بیوسورفکتانت، در مقایسه با باکتری‌ها معرفی شوند (۱۲). گزارش‌های متعددی از مخمرهای تولیدکننده بیوسورفکتانت و کاربرد آنها در صنایع غذایی و کشاورزی و همچنین برای اهداف زیست پالایی در صنایع زیست محیطی وجود دارد. به عنوان مثال، تولید سوفورولیپید توسط کاندیدا بمبی‌کولا،[7] گلیکولیپید توسط مایروزیما گوئیلیرموندی[8] (۱۲)، کاندیدا ارتوپسیلوزیس،[9] کریپتوکوکوس لوتئوس،[10] ردوترولا گلوتینیس،[11] ردوترولا موسیلاژینوزا،[12] هانلا سیننسیس،[13] دیپوداسکوس آسترالیننسیس[14] و متشنیکویا کورینسیس[15] (۱۲)، پسودوزیما آنتارکتیکا،[16] پسودوزیما تسوکوبانسیس[17] و پسودوزیما گرامینیکولا[18] (۱۳)، ویکرهامیلا دومرکوئی[19] و تریکوسپورون آساهی[20] (۱۴)؛ سوفورولیپید توسط لاچانسئا ترموتولرنس[21] (۱۵) و لیپوپپتید توسط کاندیدا

1. B. cereus
2. B. subtilis
3. P. aeruginosa
4. Stenotrophomonas sp.
5. Microbacterium maritypicum
6. Arthrobacter oxidans
7. Candida Bombicola
8. Meyerozyma guilliermondii
9. Candida orthopsilosis
10. Cryptococcus luteolus
11. Rhodotorula glutinis
12. R. mucilaginosa
13. Hannaela sinensis
14. Dipodascus australiensis
15. Metschnikowia koreensis
16. Pseudozyma antarctica
17. P. tsukubaensis
18. P. graminicola
19. Wickerhamiella domercqiae
20. Trichosporon asahii
21. Lachancea thermotolerans

تروپیکالیس[1] (۱) گزارش شده است. هدف مطالعه حاضر بررسی جداسازی و شناسایی مخمر تولیدکننده بیوسورفکتانت از خاک آلوده به نفت بوده است. همچنین، خصوصیات شیمیایی و مقاومت بیوسورفکتانت خالص شده در برابر شرایط نامتعارف نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. نمونه‌گیری، غنی‌سازی و جداسازی اولیه مخمر تولیدکننده بیوسورفکتانت

با استفاده از یک ظرف شیشه‌ای استریل، مجموعاً ۵۰۰ گرم خاک آلوده به نفت، از سه موقعیت در داخل و خارج از یک تعمیرگاه خودرو در شهر الیگودرز استان لرستان، با استفاده از یک پروتکل استاندارد جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و تا مرحله بعدی کار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای جداسازی اولیه مخمرهای تولیدکننده بیوسورفکتانت، از محیط کشت بوشنل هاس[2] استفاده شد. محتویات محیط کشت شامل KH_2PO_4، ۱ گرم در لیتر؛ K_2HPO_4، ۰/۲ گرم در لیتر؛ $MgSO_47H_2O$، ۰/۲ گرم در لیتر؛ $CaCl_2$، ۰/۰۲ گرم در لیتر؛ NH_4NO_3، ۱ گرم در لیتر؛ $FeCl_3$، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر؛ NaCl، ۲ گرم در لیتر و ۱% حجم به حجم نفت خام بود. pH محیط کشت با استفاده از HCl ۱ نرمال تا حدود ۶ تنظیم شد. پس از اتوکردن محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، برای مهار رشد باکتری‌ها، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تتراسایکلین استریلیزه شده با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری، به محیط کشت اضافه شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده خاک در یک ظرف فلزی استریل درپوشیده مخلوط و خرد شدند و از یک توری استریل عبور داده شدند تا همگن شوند (۱۶). سپس ۱۰۰ میلی گرم از نمونه خاک همگن شده در شرایط استریل به ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت BHM اضافه شد و در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد تحت سرعت تکان دادن ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت ۱ هفته گرمخانه‌گذاری شد (۳). روند غنی‌سازی به صورت کشت مجدد، سه مرحله تکرار گردید و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه رشد یافته به منظور خالص‌سازی مخمرها به روش خطی بر روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار (PDA, Merck, Germany) حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تتراسایکلین کشت داده شد و در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس کلنی‌های

1. C. tropicalis
2. Bushnell Hass medium, BHM, Merck, Germany

منفرد جدا شده در PDA مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند و جوانه‌زنی آنها در لام میکروسکوپی پس از رنگ‌آمیزی ساده با رنگ آبی متیلن مشاهده شد (۱۷).

۲-۲. تولید بیوسورفکتانت به وسیله مخمر جداسازی شده

کلنی خالص شده مخمر در محیط کشت القای بیوسورفکتانت[1] تلقیح گردید که حاوی KH_2PO_4، ۱ گرم در لیتر؛ K_2HPO_4، ۰/۲ گرم در لیتر؛ $MgSO_47H_2O$، ۰/۲ گرم در لیتر؛ $CaCl_2$، ۰/۰۲ گرم در لیتر؛ NH_4NO_3، ۱ گرم در لیتر؛ $FeCl_3$، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر؛ NaCl، ۲ گرم در لیتر و ۱% حجم به حجم روغن زیتون (pH حدود ۶) و در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد تحت سرعت تکان دادن ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس تولید بیوسورفکتانت توسط مخمر جدا شده با استفاده از تست شاخص امولسیون، E_{24}٪، هر ۲۴ ساعت برای مشخص شدن بهترین زمان انکوباسیون برای دستیابی به حداکثر فعالیت بیوسورفکتانت اندازه‌گیری شد (۳).

۲-۳. غربال‌گری مخمر تولید بیوسورفکتانت با استفاده از آزمون پراکنش روغن

جدایه مخمر با بالاترین قابلیت تولید بیوسورفکتانت براساس آزمون جابجایی نفت انتخاب شد. برای این منظور، ابتدا یک ظرف پتری ۱۰ سانتی‌متری استریل با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل پر شد و ۱۰۰ میکرولیتر نفت خام به سطح بالای آب اضافه شد. سپس یک میلی لیتر محیط BIM کشت‌یافته در شرایط استریل در g × ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و ۱۰ میکرولیتر از سوپرناتانت حاصل از آن به آرامی بر روی نفت خام در مرکز ظرف پتری ریخته شد و قطر منطقه روشن ناشی از پراکنش روغن اندازه‌گیری گردید (۶).

۲-٤. اندازه‌گیری فعالیت بیوسورفکتانت با استفاده از آزمون کشش سطحی

ابتدا ۵۰ میلی لیتر محیط BIM کشت‌یافته در شرایط استریل در g × ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصل، به یک تنسیومتر وارد شد و یک حلقه پلاتین به آرامی در مایع غوطه‌ور گردید. نیروی مورد نیاز برای جدا کردن حلقه از سطح مایع به عنوان کشش سطحی با واحد mN/m ثبت شد. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده گردید (۱۸).

1 Biosurfactant induction medium, BIM

۲-۵. اندازه‌گیری فعالیت بیوسورفکتانت با استفاده از تست شاخص امولسیون، E_{24}٪

ابتدا ۱۰ میلی لیتر محیط BIM کشت‌یافته در شرایط استریل در g × ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصل، به ۲ میلی لیتر نفت سفید در یک لوله آزمایش اضافه شد و پس از ۲ دقیقه ورتکس کردن، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. شاخص E_{24}٪ با تقسیم ارتفاع لایه امولسیون شده به ارتفاع کل مخلوط که با خطکش میلی‌متری اندازه‌گیری شده بود و ضرب عدد حاصل در ۱۰۰ محاسبه شد. این معیار نشان‌دهنده قدرت امولیسه‌کنندگی بیوسورفکتانت است (۱۹).

۲-۶. فرایند استخراج و خالص‌سازی بیوسورفکتانت

ابتدا مخمر تولیدکننده بیوسورفکتانت به محیط BIM تلقیح شد و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تحت سرعت تکان دادن ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس برای جداسازی زیست توده مخمر، محتویات محیط کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور g × ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت حاصل جمع‌آوری گردید. در مرحله بعد، pH سوپرناتانت با استفاده از HCl (۶ N) در حد ۲ تنظیم شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس کلروفرم و متانول با نسبت ۲:۱ (حجم به حجم) به مایع اضافه شد. سوسپانسیون حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور g × ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز آلی حاصل جمع‌آوری گردید. فاز جمع‌آوری شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت، مایع قهوه‌ای و روغنی حاصل برای بررسی ویژگی‌های شیمیایی بیوسورفکتانت استفاده شد (۱۸).

۲-۷. شناسایی مولکولی مخمر تولیدکننده بیوسورفکتانت با استفاده از توالی 5.8s-rDNA

استخراج DNA از بهترین مخمر تولید بیوسورفکتانت با استفاده از روشی که قبلاً شرح داده شده بود، استخراج گردید (۱۵). برای تکثیر فضای داخلی رونویسی ۱ (Internal Transcribed Space 1, ITS1) و 5.8s-rDNA در مخمر جدا شده، آغازگر رو به جلو ITS1 با توالی 5’-TCCTCCGCTTATTGATATGCGG-3’ و آغازگر رو به عقب ITS4 با توالی TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’-5’ مورد استفاده قرار گرفت (۲۰). حجم کل واکنش زنجیر پلی‌مراز (Polymerase chain reaction, PCR) ۲۵ میلی‌لیتر و متشکل از DNA الگو، ۱ میکرولیتر؛ آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب ITS1 و ITS4، هر کدام ۲/۵ میلی‌لیتر؛ بافر PCR

حاوی DNA پلی‌مراز Taq و $MgCl_2$، ۱۴ میلی لیتر؛ و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر بود. برنامه PCR به صورت یک مرحله تک‌رشته‌ای شدن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل مراحل تک‌رشته‌ای شدن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و یک مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. الکتروفورز با استفاده از ۵ میلی لیتر محصول PCR مخلوط با ۲ میلی لیتر بافر بارگذاری در ژل آگارز ۱/۵% حاوی ۱۰ میکرولیتر رنگ سبز SYBR به عنوان آشکارساز در ولتاژ ۱۲۰ ولت، به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر محصول PCR همراه با ۱۰ میکرولیتر از هر آغازگر به شرکت سیناکلون (تهران، ایران) برای توالی‌یابی فرستاده شد و نتایج توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega X مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نرم‌افزار Blastn،[1] برای شناسایی شباهت‌های 5.8s-rDNA مخمر تولیدکننده بیوسورفکتانت با سوابق موجود در بانک ژنی استفاده شد. پس از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک، توالی 5.8s-rDNA مخمر تولیدکننده بیوسورفکتانت در GenBank، NCBI،[2] ثبت شد (۲۱).

۲-۸. بررسی خصوصیات شیمیایی و ساختاری بیوسورفکتانت با استفاده از TLC

کروماتوگرافی لایه نازک (Thin layer chromatography, TLC) با استفاده از سیلیکاژل (Sigma, Ronkonkoma, NY، آمریکا) با ابعاد ۱۰ × ۴ سانتی‌متر برای بررسی خصوصیات بیوسورفکتانت خالص انجام شد. برای این منظور، یک قطره نمونه مایع نفتی حاصل از روش استخراج، با استفاده از یک لوله مویین در فاصله ۱ سانتی‌متری لبه کاغذ به سیلیکاژل منتقل شد. سیستم حلال مورد استفاده به عنوان فاز متحرک شامل کلروفرم/متانول/آب با نسبت ۲/۱۵/۶۵ (حجم به حجم) بود. پس از رسیدن حلال به سطح مشخص شده، سیلیکاژل با مخلوطی از اسید سولفوریک/ اتانول با نسبت ۹۵/۵ (حجم به حجم) در ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه اسپری شد. لکه‌های ظاهر شده بر روی کاغذ سیلیکاژل با استفاده از سیستم آشکارساز اشعه ماوراء بنفش مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۵).

1. http://www.blastn.ncbi.nlm.nih.gov
2. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

۲-۹. بررسی خصوصیات شیمیایی و ساختاری بیوسورفکتانت با استفاده از FTIR

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) برای بررسی خصوصیات بیوسورفکتانت خالص انجام شد. برای این منظور، ۱۰ میلی گرم از بیوسورفکتانت استخراج شده با ۴۰۰ میلی‌گرم پتاسیم برماید خالص خشک شده مخلوط شد و با فشار بالا ۳۰ ثانیه فشار داده شد تا یک قرص نازک نیمه شفاف به دست آمد. سپس قرص وارد دستگاه FTIR (Mattson 1000 FT، انگلستان) شد و طیف مادون قرمز در محدوده طول موج ۴۵۰-۴۰۰۰ cm^{-1} ارزیابی گردید (۳).

۲-۱۰. تعیین اثر سطوح مختلف دما، pH و شوری بر پایداری بیوسورفکتانت

ابتدا کلنی مخمر به محیط BIM تلقیح شد و در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت تحت سرعت تکان دادن ۱۳۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط BIM کشت یافته در شرایط استریل در g × ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای اندازه‌گیری پایداری حرارتی بیوسورفکتانت، ۴۵ میلی لیتر سوپرناتانت در ۹ لوله آزمایش استریل تقسیم شد و لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر سوپرناتانت، به ترتیب در انکوباتورهایی با دماهای ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰ و ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس ۲ میلی لیتر از محتویات هر لوله جدا شد و شاخص امولسیون، E_{24}٪، با روشی که قبلاً شرح داده شد، اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری اثر pH بر پایداری بیوسورفکتانت، ۴۰ میلی لیتر سوپرناتانت به ۸ لوله استریل تقسیم شد و pH لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر سوپرناتانت، با استفاده از HCl و NaOH ۱ نرمال به ترتیب در حد ۲، ۴، ۵/۵، ۷/۲، ۸/۵، ۹/۳، ۱۰/۵ و ۱۲ تنظیم شد و لوله‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۲ میلی لیتر از محتویات هر لوله جدا شد و شاخص امولسیون، E_{24}٪، با روشی که قبلاً شرح داده شد، اندازه‌گیری گردید.

برای اندازه‌گیری اثر شوری بر پایداری بیوسورفکتانت، ۲۵ میلی لیتر سوپرناتانت به ۵ لوله استریل تقسیم شد و شوری لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر سوپرناتانت، به ترتیب در حد ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد (وزن به حجم) با استفاده از NaCl تنظیم شد. سپس ۲ میلی لیتر از محتویات هر لوله جدا شد و شاخص امولسیون، E_{24}٪، با روشی که قبلاً شرح داده شد، اندازه‌گیری گردید (۶).

۳. یافته‌ها

۳-۱. مخمر جداسازی شده تولیدکننده بیوسورفکتانت

تلقیح نمونه‌های خاک آلوده به نفت به محیط BHM و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتیگراد تحت سرعت تکان دادن ۱۳۰ دور در دقیقه، به مدت ۱ هفته نشان‌دهنده حضور احتمالی مخمرهای تولیدکننده بیوسورفکتانت بود. انتقال کشت اولیه به محیط کشت PDA حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تتراسایکلین و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت، موجب رشد کلنی‌های بزرگ خالص با قطر ۶ ≤ میلی‌متر با رنگ کرم شد. رنگ‌آمیزی ساده کلنی‌های منفرد با متیلن آبی و مشاهده میکروسکوپی سلول‌های هسته‌دار جوانه زده در گسترش روی لام، مؤید حضور مخمر بود.

۳-۲. غربال‌گری مخمر تولید بیوسورفکتانت با استفاده از سنجش پراکنش روغن

سه کلنی مخمر مختلف از نمونه‌های خاك جداسازی شد. از میان این ۳ جدایه، یک جدایه مخمری که نتیجه سنجش پراکنش روغن آن به عنوان اولین آزمون غربال‌گری برای ارزیابی تولید بیوسورفکتانت مثبت بود، انتخاب شد. قطر منطقه روشن پس از رها کردن سوپرناتانت در بالای نفت خام در مرکز ظرف پتری ۹ سانتیمتر بود (شکل ۱). بنابراین به طور اولیه، این جدایه مخمری خالص شده از خاک به عنوان یک مخمر تولیدکننده بیوسورفکتانت در نظر گرفته شد و آزمایش‌های بعدی بر روی آن انجام گرفت. نتیجه سنجش بر روی دو جدایه مخمر دیگر منفی بود و به همین دلیل ادامه آزمایش‌ها بر روی این جدایه‌ها انجام نشد.

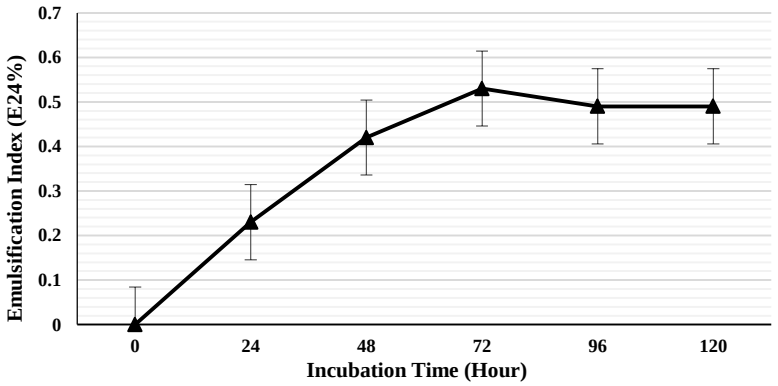
شکل ۱- نتیجه مثبت آزمایش پراکنش روغن توسط جدایه مخمری رشدیافته در محیط کشت بوشنل هاس پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد تحت سرعت تکان دادن ۱۳۰ دور در دقیقه

۳-۳. فعالیت بیوسورفکتانت تولید شده با استفاده از آزمون کشش سطحی

سوپرناتانت حاوی بیوسورفکتانت تهیه شده از جدایه مخمری، کاهش بسیار قابل توجهی در کشش سطحی، معادل ۴۲/۹ mN/m نشان داد. به عبارت دیگر، سوپرناتانت ذکر شده می‌توانست کشش سطحی را از ۷۲ mN/m به ۲۹/۱ mN/m کاهش دهد. بنابراین، آزمون کشش سطحی به عنوان دومین آزمون غربال‌گری، تولید بیوسورفکتانت را تأیید کرد و نشان داد مخمر جداسازی شده می‌تواند به عنوان مخمر قابل توجه در تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته شود.

۳-٤. فعالیت بیوسورفکتانت با استفاده از تست شاخص امولسیون، E_{24}٪

نتایج E_{24}٪ بیوسورفکتانت پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری، به ترتیب ۲۳، ۴۲، ۵۳، ۴۹ و ۴۹ درصد بود. این نتایج نشان داد که حداکثر تولید و فعالیت بیوسورفکتانت پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری به دست آمد و برابر با ۵۳% بود (شکل ۲).



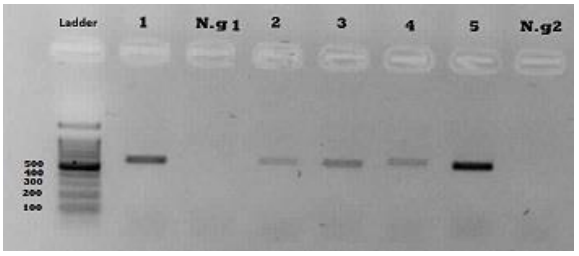
شکل ۲- نتایج اندازه‌گیری E_{24}٪ بیوسورفکتانت به دست آمده از جدایه مخمری رشد یافته در محیط کشت بوشنل هاس پس از ۱۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتیگراد تحت سرعت تکان دادن ۱۳۰ دور در دقیقه

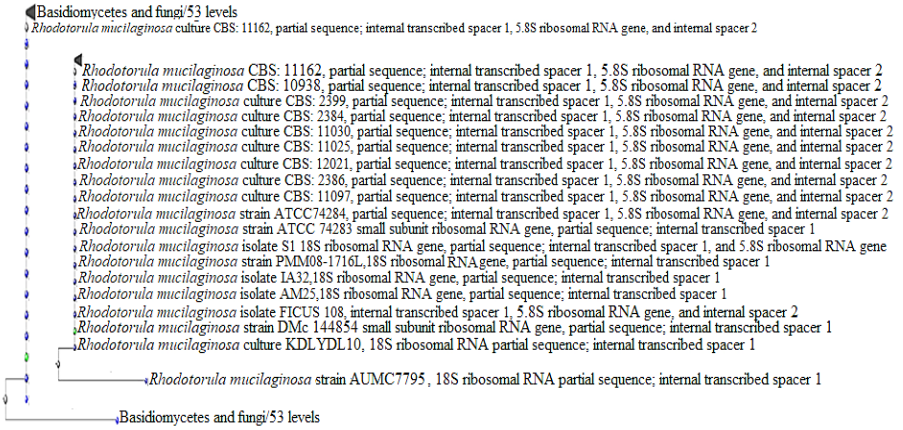
۳-۵. شناسایی مولکولی مخمر تولیدکننده بیوسورفکتانت با استفاده از توالی 5.8s-rDNA

همان‌طور که در شکل (۳ الف) نشان داده شده است، اندازه مورد انتظار محصول PCR در حدود ۶۸۰ جفت باز بود. تجزیه و تحلیل توالی 5.8s-rDNA با استفاده از نرم‌افزار Blastn نشان‌دهنده ۸۸% پوشش جستجو و ۹۸/۲۱% شباهت به مخمر ردوترولا موسیلاژینوزا[1] (شماره

1. Rhodotorula mucilaginosa

دسترسی بانک ژنی CBS11162) بود. با توجه به تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک، مخمر مولد بیوسورفکتانت سویه *ردوتورولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 (R. mucilaginosa GBME-IAUF-1) نام گرفت و توالی ITS/5.8s-rDNA آن در بانک ژنی NCBI تحت شماره عضویت MT012935 ثبت گردید. درخت فیلوژنتیک مخمر جدا شده در بررسی حاضر در شکل (۳ ب) نشان داده شده است.





شکل ۳- بررسی مولکولی سویه مخمری *ردوتورولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 تولیدکننده بیوسورفکتانت جدا شده از خاک آلوده به روغن شهر الیگودرز استان لرستان،
الف: ژل الکتروفورز توالی 5.8s-rDNA تکثیر شده با PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1 و ITS4.
شماره ۱، باند ۶۸۱ جفت بازی؛ n.g1، کنترل منفی. ب: درخت فیلوژنتیک.

۳-۶. خصوصیات شیمیایی و ساختاری بیوسورفکتانت با استفاده از TLC

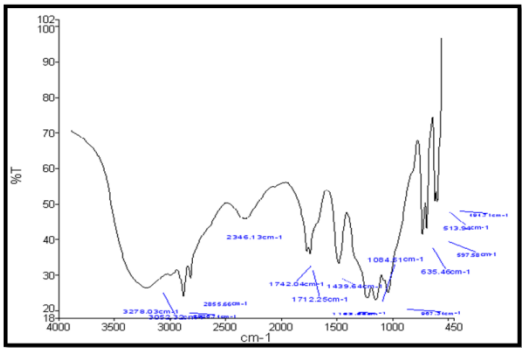
نتیجه TLC یک لکه با RF برابر با ۰/۶۶ را نشان داد (شکل ۴). این مقدار RF معرف آن است که بیوسورفکتانت تولید شده توسط *ردوتورولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 یک فرم لاکتونیک از سوفورولیپیدها می‌باشد که متعلق به بیوسورفکتانت‌های گلیکولیپیدی هستند (۱۵).

شکل ٤- TLC بیوسورفکتانت استخراج شده از *ردوترولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 جدا شده از خاک آلوده به روغن شهر الیگودرز استان لرستان.

مقدار RF برابر با ۰/۶۶ نشان‌دهنده فرم لاکتونیک بیوسورفکتانت‌های سوفورولیپیدی است.

۳-۷. بررسی خصوصیات شیمیایی و ساختاری بیوسورفکتانت با استفاده از FTIR

طیف FTIR بیوسورفکتانت استخراج شده از *ردوترولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 با طول موج cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۵۰ ثبت شد و در شکل (۵) نشان داده شده است. باند جذب گسترده بین cm^{-1} ۳۰۰۰ و ۳۶۰۰ نشان‌دهنده کشش OH است و حضور گروه هیدروکسیل را در بخش قندی بیوسورفکتانت استخراج شده تأیید می‌کند. قله‌های ۲۹۲۶ و ۲۸۵۵ cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی نوار C-H بخش هیدروکربنی آلیفاتیک است. همچنین بیوسورفکتانت، خمش C-H یک جذب را در قله ۱۴۳۱ cm^{-1} نشان می‌دهد. نوارهای C=O در ۱۷۴۴ و ۱۷۱۱ cm^{-1} ظاهر شده‌اند. باند کربونیل علاوه بر قله‌های قوی در محدوده cm^{-1} ۱۳۰۰-۱۰۰۰ به علت ارتعاش کشش C-O، نشان‌دهنده مشارکت لاکتون‌ها، استرها یا اسیدها در بیوسورفکتانت خالص شده است. بر اساس این نتایج به دست آمده از طیف FTIR؛ بیوسورفکتانت استخراج شده و مقایسه با طیف‌های مشابه FTIR به دست آمده از تحقیقات قبلی (۳، ۲۲)، ساختار بیوسورفکتانت گلیکولیپید استخراج شده از *ردوترولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 به صورت یک سوفورولیپید شناسایی شد.

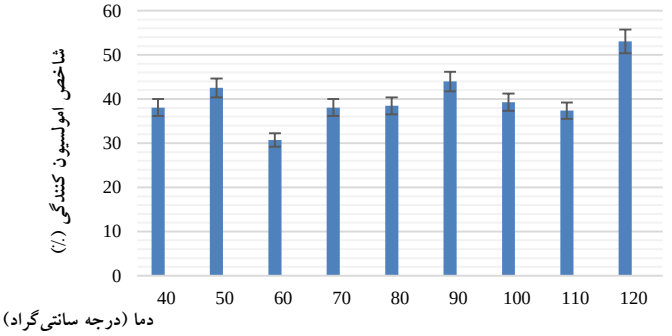


شکل ٥- تجزیه و تحلیل FTIR بیوسورفکتانت استخراج شده از R. mucilaginosa GBME-IAUF-1 جدا شده از خاک آلوده به نفت در الیگودرز، لرستان.

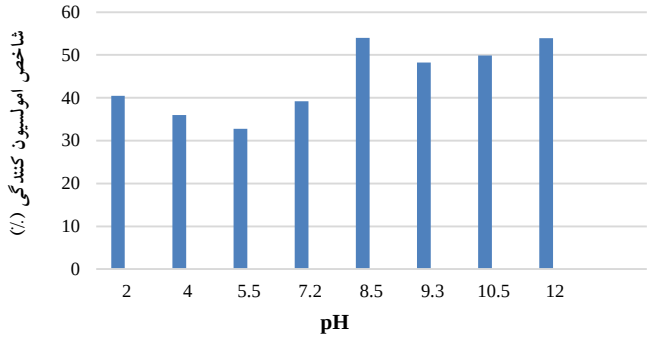
ساختار شیمیایی بیوسورفکتانت نشان‌دهنده سوفورولیپیدی بودن آن است.

۳-۸. اثر سطوح مختلف دما، pH و شوری بر پایداری بیوسورفکتانت استخراج شده از *ردوتورولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1

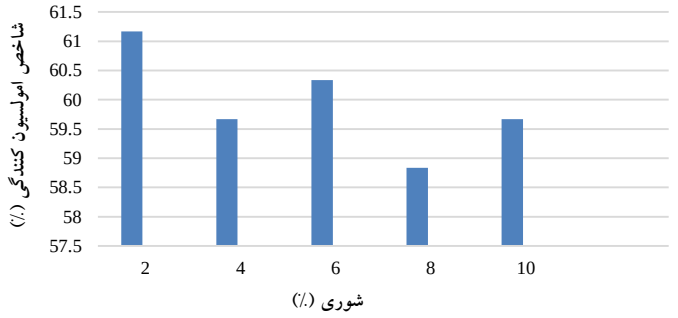
اندازه‌گیری E_{24}٪ بیوسورفکتانت سوفورولیپید خالص شده پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰ و ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۳۸/۰۷، ۴۲/۵۱، ۳۰/۷۱، ۳۸/۰۸، ۳۸/۴۴، ۴۳/۹۷، ۳۹/۲۸، ۳۷/۳۶ و ۳۵/۰۵ درصد ثبت شد (شکل ۶ الف). این نتایج نشان داد که بیشترین پایداری سوفورولیپید در ۹۰ درجه سانتی‌گراد (E_{24}٪ برابر با ۴۳/۹۷%) بود. همچنین سوفورولیپید استخراج شده دارای پایداری قابل توجهی در دماهای بالا یعنی ۸۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد با E_{24}٪ از ۳۸/۴۴ تا ۴۳/۹۷ درصد بود. اندازه‌گیری E_{24}٪ بیوسورفکتانت سوفورولیپید خالص شده پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در مقادیر pH ۲، ۴، ۵/۵، ۷/۲، ۸/۵، ۹/۳، ۱۰/۵ و ۱۲ به ترتیب ۴۰/۴۶، ۳۵/۹۶، ۳۲/۷۷، ۳۹/۱۸، ۵۳/۹۹، ۴۸/۲۱، ۴۹/۸۸ و ۵۳/۹۱ درصد ثبت شد. (شکل ۶ ب). این نتایج نشان داد که بیشترین پایداری سوفورولیپید در pH ۸/۵ (E_{24}٪ برابر با ۵۳/۹۹%) بود. همچنین سوفورولیپید استخراج شده پایداری قابل توجهی در pH قلیایی (۱۲-۸/۵) داشت. اندازه‌گیری E_{24}٪ بیوسورفکتانت سوفورولیپید خالص شده پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در مقادیر NaCl ۲، ۴، ۶ و ۱۰ درصد به ترتیب ۶۱/۱۶، ۵۹/۶۶، ۶۰/۳۳ و ۵۹/۶۶ درصد ثبت شد (شکل ۶ پ). این نتایج نشان داد که بیشترین پایداری سوفورولیپید در شوری ۲ درصد (E_{24}٪ برابر با ۶۱/۱۶%) بود. همچنین سوفورولیپید استخراج شده پایداری قابل توجهی در محدوده گسترده شوری ۲ تا ۱۰ درصد با E_{24}٪ برابر با ۶۱/۶۶-۵۹/۶۶ % داشت.



(الف)



(ب)



(پ)

شکل ٦- پایداری بیوسورفکتانت سوفورولیپیدی استخراج شده از *ردوترولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 در برابر شرایط دشوار. الف: دمای ٤٠ تا ١٢٠ درجه سانتی‌گراد، ب: ۲ تا ۱۲، پ: سطح شوری ۲ تا ۱۰ درصد.

٤. بحث

بیوسورفکتانت‌های گلیکولیپیدی مانند سوفورولیپیدها، به دلیل کاربردهای چندگانه در صنایع مختلف و همچنین سطوح بالای تولید توسط میکروارگانیسم‌ها، محبوب‌ترین و امیدوارکننده‌ترین عوامل کاهش‌دهنده کشش سطحی هستند (۱۳). در حالی که گزارش‌های متعددی از تولید سوفورولیپید توسط مخمرها وجود دارد، با توجه به دانش موجود، این اولین گزارش تولید بیوسورفکتانت سوفورولیپید توسط *ردوترولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 در جهان است که از خاک‌های آلوده به نفت در الیگودرز، استان لرستان، جداسازی شد. با توجه به تجزیه و تحلیل مولکولی و بیوانفورماتیک، مخمر تولیدکننده سوفورولیپید R. mucilaginosa GBME-IAUF-1 نامیده شد و توالی 5.8s-rDNA آن در بانک ژنی NCBI، با شماره دسترسی MT012935 ثبت شد.

در گزارش‌ها متعددی محیط کشت YMG حاوی گلوکز، عصاره مخمر، پپتون و عصاره مالت برای غربال‌گری مخمرهای مولد سوفورولیپید استفاده شده است (۱۳، ۱۵، ۲۳).

در بررسی حاضر از محیط‌های کشت BHM و سپس BIM برای غربال‌گری و تولید اولیه سوفورولیپید توسط مخمر *ردوتروولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 استفاده شد. برای ارزیابی فعالیت بیوسورفکتانت، اندازه‌گیری کاهش کشش سطحی، یکی از کارآمدترین شاخص‌هایی است که در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. تانیاواران[1] و همکاران سوفورولیپید به دست آمده از *پیچیا آنومالا*[2] را گزارش کردند که کشش سطحی را از ۷۰ تا ۲۸ mN/m کاهش داد (۲۴). فونتس[3] و همکاران بیوسورفکتانت تولید شده توسط *یاروویا لیپولیتیکا*[4] IMUFRJ50682 را گزارش کردند که کشش سطحی را از ۷۰ تا ۲۰/۹ mN/m کاهش داد (۲۵). در یک تحقیق دیگر، سوفورولیپید تولید شده توسط *ردوتروولا بابجوا* (*R. babjevae*) ys3 کشش سطحی را از ۷۰ تا ۳۲/۶ mN/m کاهش داد (۱۹). همچنین در تحقیقی بیوسورفکتانت حاصل از *کاندیدا اسفریکا* (*C. sphaerica*) UCP0995 موجب کاهش کشش سطحی از ۷۲ به ۲۵/۶ mN/m شد (۲۶). آلمیدا[5] و همکاران نشان دادند که بیوسورفکتانت تولید شده توسط *کاندیدا تروپیکالیس* UCP0996 کشش سطحی را از ۷۲ تا ۲۹/۹۸ mN/m کاهش داد (۲۷). در مطالعه حاضر، سوفورولیپید استخراج شده از *ردوتروولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 می‌تواند کشش سطحی را از ۷۲ تا ۲۹/۱ mN/m کاهش دهد. مقایسه میزان کاهش کشش سطحی در گونه‌های مختلف مخمری تولیدکننده گلیکولیپید پیشنهاد می‌کند که *ردوتروولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 جدا شده در این تحقیق می‌تواند به عنوان یک مخمر قابل توجه در تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته شود. کامارگو[6] و همکاران نیز نشان دادند که E_{24}% بیوسورفکتانت تولید شده توسط *ردوتروولا گلوتینیس* (R. glutinis) و *میروزیما گوئیلیرموندی*[7] به ترتیب ۵۲/۵% و ۴۲/۸% می‌باشد. گونه‌های مخمر *ردوتروولا موسیلاژینوز*،

1. Thaniyavarn
2. *Pichia anomala*
3. Fontes
4. *Yarrowia lipolytica*
5. Almeida
6. Camargo
7. Meyerosyma guilliermondii

دیپوداسکوس آسترالیننسیس[1] و *متشنیکویا کورینسیس*،[2] ۳۵%≤E_{24}% را نشان دادند و *کاندیدا ارتوپسیلوسیس*،[3] *کریپتوکوکوس لوتئوس*[4] و *هانلا سینسیس*[5] هیچ فعالیت امولسیون‌سازی نداشتند (۲۸). داس[6] نیز در پژوهشی گزارش داد که بیوسورفکتانت استخراج شده از *کاندیدا تروپیکالیس* MTCC230 دارای شاخص E_{24}% برابر با ۵۵% می‌باشد. در این تحقیق، حداکثر E_{24}٪ سوفورولیپید *ردوترولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 معادل ۶۰/۳۳% ثبت شد که در مقایسه با سایر گزارش‌ها، مقدار بسیار قابل قبولی از فعالیت بیوسورفکتانت بود (۱). معمولاً مخازن نفت خام دارای شرایط حرارتی، pH و شوری شدید هستند. بنابراین، زمانی که یک بیوسورفکتانت مشخص به طور عملی انتخاب شود، مقاومت آن در برابر شرایط سخت مهم است. بیوسورفکتانت‌های *ردوترولا گلوتینیس* و *میروزیما گوئیلیرموندی* در pH ۲ تا ۴ به ترتیب ۸۷/۳% و ۹۱/۳۸% از فعالیت اولیه خود را حفظ کرده‌اند (۲۵). داس (۲۰۱۸) نشان داد که بیوسورفکتانت *کاندیدا تروپیکالیس* MTCC230 در مقادیر مختلف pH ۲ تا ۱۲، ۸۶/۳۳-۶۷/۷۴% و در دمای ۳۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد، ۹۰-۷۰% از فعالیت اولیه خود را حفظ کرده است (۱).

در تحقیق حاضر سوفورولیپید استخراج شده در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد دارای E_{24}% معادل ۴۳/۹۷% بود و با توجه به E_{24}% حداکثر ۶۰/۳۳%، ۷۲/۸۸% از فعالیت اولیه خود را حفظ کرده است. قابل توجه است که این بیوسورفکتانت ۶۳/۷۱ تا ۵۸/۰۹ درصد از فعالیت اولیه خود را در دمای ۸۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد حفظ کرد و با توجه به مقاومت آن در برابر شرایط استریل‌سازی اتوکلاو، می‌توان آن را برای کاربرد در MEOR و همچنین صنایع غذایی به عنوان یک امولسیفایر عالی توصیه کرد. سوفورولیپید خالص شده از مخمر *ردوترولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 توانست به ترتیب ۸۹/۴۹، ۷۹/۹۱، ۸۲/۶۷ و ۸۹/۴۱ درصد از فعالیت اولیه خود را در مقادیر pH ۸/۵، ۹/۳، ۱۰/۵ و ۱۲ حفظ کند؛ در حالی‌که نفت خام دارای محدوده وسیعی از pH از اسیدی تا قلیایی با توجه به مبنای ژئوشیمیایی مخزن خود است، در فرآیند EOR،

1. Dipodascus australiensis
2. Metschnikowia koreensis
3. C. orthopsilosis
4. Cryptococcus luteolus
5. Hannaela sinensis
6. Das

آب دریا همراه با عوامل جذب‌کننده یون‌های فلزی مانند EDTA، برای افزایش بازیافت نفت خام استفاده می‌شود که منجر به افزایش pH نفت خام و همچنین میدان نفتی به ۱۱-۹ می‌شود (۲۹، ۳۰). با توجه به پایداری قابل توجه سولفورو لیپید بررسی شده در این مطالعه در برابر pH قلیایی ۱۲-۸/۵ (۹۲/۴۳-۸۴/۷۳%)، این بیوسورفکتانت به عنوان یک عامل بالقوه در MEOR پیشنهاد می‌شود. شاخص امولسیون سوفورولیپید خالص شده در سطوح شوری ۱۰-۲ درصد به اندازه حدود ۶۰ درصد اندازه‌گیری شد و به این معناست که این بیوسورفکتانت ۹۹/۵ درصد از فعالیت خود را در این شرایط حفظ کرده است. فعالیت اصلی سورفکتانت‌ها در شرایط شوری شدید رخ می‌دهد که در EOR و MEOR وجود دارد (۲۹). بنابراین، سوفورولیپید تولید شده توسط *ردوتورولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 به دلیل پایداری زیاد در غلظت‌های بالای NaCl، به عنوان پیشنهاد عالی جهت استفاده برای MEOR نفت خام و همچنین به عنوان یک عامل مناسب امولسیون‌کننده در صنایع غذایی مطرح می‌شود.

۵. نتیجه‌گیری

این مطالعه اولین گزارش تولید بیوسورفکتانت توسط گونه مخمر *ردوتورولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 است. در مطالعه حاضر از نمونه خاک آلوده به نفت یک تعمیرگاه در الیگودرز لرستان، استفاده شد. با توجه به پایداری حرارتی، pH و شوری بالا، سوفورولیپید تولید شده توسط *ردوتورولا موسیلاژینوزا* GBME-IAUF-1 می‌تواند برای برنامه‌های کاربردی در MEOR و همچنین صنایع غذایی به عنوان یک عامل امولسیون‌کننده عالی پیشنهاد شود. تولید بیوسورفکتانت توسط این سویه در فلاسک‌های آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و تولید آن در مقیاس پایلوت و سپس در فرمانتورهای نیمه صنعتی می‌تواند پیش‌درآمدی بر استفاده از این سویه جدید تولیدکننده بیوسورفکتانت در میکروبیولوژی صنعتی باشد. همچنین امتحان اثر این بیوسورفکتانت سوفورولیپیدی در مقیاس آزمایشگاهی یا پایلوت به عنوان یک تقویت‌کننده MEOR در آزمایشات بعدی می‌تواند موجب شود که یک محصول بیوتکنولوژیک مهم عملیاتی در صنعت نفت مورد استفاده قرار گیرد.

٦. تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از رساله دکتری میکروبیولوژی، ارائه شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان با کد رهگیری ۱۶۲۲۷۱۷۹۱ می‌باشد. نویسندگان از ریاست تحصیلات تکمیلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان اصفهان، برای حمایت فنی پژوهش حاضر تشکر می‌کنند.

References

1. Das MD. Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C. tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water. *J Pet Sci Eng*. 2018; 170: 40-8.
2. Thavasi R, Jayalakshmi S & Banat IM. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. *Biores Technol*. 2011; 102: 3366-72.
3. Akbari E, Beheshti-Maal K, Rasekh B, Emami-Karvani Z & Omidi M. Isolation and Identification of Current Biosurfactant-Producing *Microbacterium maritypicum* ABR5 as a Candidate for Oily Sludge Recovery. *J Surfact Deterg*. 2020; 23: 137-44.
4. Geetha SJ, Banat IM & Joshi SJ. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatal Agric Biotechnol*. 2018; 14: 23-32.
5. Mukherjee S, Das P & Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol*. 2006; 24: 509-15.
6. Astuti DI, Purwasena IA, Putri RE, Amaniyah M & Sugai Y. Screening and characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. G3 and its applicability for enhanced oil recovery. *J Petrol Explor Prod Technol*. 2019; 9: 2279-89.
7. Alvarez VM, Jurelevicius D, Marques JM, de Souza PM, de Araújo LV, Barros TG, de Souza RO, Freire DM & Seldin L. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. *Colloids Surf B.* 2015; 136: 14-21.
8. Amani H, Sarrafzadeh MH, Haghighi M & Mehrnia MR. Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. *J Pet Sci Eng.* 2010; 75: 209-14.
9. He C, Dong W, Li J, Li Y, Huang C & Ma Y. Characterization of rhamnolipid biosurfactants produced by recombinant *Pseudomonas aeruginosa* strain DAB with removal of crude oil. *Biotechnol Lett.* 2017; 39: 1381-8.
10. Sabati H & Motamedi H. Ecofriendly demulsification of water in oil emulsions by an efficient biodemulsifier producing bacterium isolated from oil contaminated environment. *Biotechnol Lett*. 2018; 40: 1037-48.
11. Lima TM, Procópio LC, Brandão FD, Carvalho AM, Tótola MR & Borges AC. Simultaneous phenanthrene and cadmium removal from contaminated soil by a ligand/biosurfactant solution. *Biodegradation*. 2011; 22: 1007-15.
12. Camargo FP, Araujo ACV, Moraes EM de & et al. A comparison between cactophilic yeast communities isolated from *Cereus hildmannianus* and *Praecereus euchlorus* necrotic cladodes. *Fungal Biol*. 2016;120: 1175–83.
13. Konishi M, Maruoka N, Furuta Y, Morita T, Fukuoka T, Imura T & Kitamoto D. Biosurfactant-producing yeasts widely inhabit various vegetables and fruits. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014; 78: 516-23.
14. Mnif I & Ghribi D. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Pep Sci.* 2015; 104: 129-47.

15. Mousavi F, Beheshti-Maal K & Massah AR. Production of sophorolipid from an identified current yeast, *Lachancea thermotolerans* BBMCZ7FA20, isolated from honey bee. *Curr Microbiol*. 2015; 71: 303-10.
16. Mohawesh O, Janssen M, Maaitah O & et al. Assessment the effect of homogenized soil on soil hydraulic properties and soil water transport. *Eurasian Soil Sci*. 2017; 50: 1077–85.
17. Mousavi F, Beheshti-Maal K & Massah AR. Isolation of yeasts from bee bread of honey bees, Apis mellifera and evaluation of its ability to produce sophorolipid biosurfactant. *Iranian J Med Microbiol*. 2014; 8: 44–53.
18. Salehizadeh H & Mohammadizad S. Microbial enhanced oil recovery using biosurfactant produced by Alcaligenes faecalis. *Iranian J Biotechnol*. 2009; 7: 216-23.
19. Sen S, Borah SN, Bora A & Deka S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microb Cell Fact.* 2017; 16: 95.
20. Harju S, Fedosyuk H & Peterson KR. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n'Grab. *BMC Biotechnol*. 2004; 4: 8.
21. Akbari E, Beheshti-Maal K & Nayeri H. A novel halo-alkalo-tolerant bacterium, *Marinobacter alkaliphilus* ABN-IAUF-1, isolated from Persian Gulf suitable for alkaline lipase production. *Int J Environ Sci Technol*. 2018; 15: 1767-76.
22. Chen J, Song X, Zhang H & Qu Y. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. *Enz Microb Technol*. 2006; 39: 501-6.
23. Kurtzman CP, Price NP, Ray KJ & Kuo TM. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella* (*Candida*) *bombicola* yeast clade. *FEMS Microbiol Lett*. 2010; 311: 140-6.
24. Thaniyavarn J, Chianguthai T, Sangvanich P, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M & Thaniyavarn S. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72: 2061-8.
25. Fontes GC, Fonseca Amaral PF, Nele M & Zarur Coelho MA. Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 23: 1-8.
26. Luna JM, Rufino RD, Sarubbo LA, Rodrigues LR, Teixeira JA & de Campos-Takaki GM. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. *Curr Microbiol*. 2011; 62: 1527-34.
27. Almeida DG, Soares da Silva RD, Luna JM, Rufino RD, Santos VA & Sarubbo LA. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. *Front Microbiol*. 2017; 8: 157.
28. Camargo FP, Menezes AJ, Tonello PS, Dos Santos AC & Duarte IC. Characterization of biosurfactant from yeast using residual soybean oil under acidic conditions and their use in metal removal processes. *FEMS Microbiol Lett*. 2018; 365(10): fny098.
29. Song J, Rezaee S, Guo W, Hernandez B, Puerto M, Vargas FM, Hirasaki GJ & Biswal SL. Evaluating physicochemical properties of crude oil as indicators of low-salinity–induced wettability alteration in carbonate minerals. *Sci Rep*. 2020; 10:1-6.
30. Mahmoud M, Elkatatny S & Abdelgawad KZ. Using high- and low-salinity seawater injection to maintain the oil reservoir pressure without damage. *J Petrol Explor Prod Technol.* 2017; 7: 589-96.