www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۷، جلد ۷، شماره ۲، صفحات ۱۷۶-۱۶۷

JRIFST

مقایسهٔ روش‌های مختلف شکست سلولی و استخراج اسید چرب از ریزجلبک *Dunaliella Salina*

فرزانه مهرابی[۱]، سیدعلی جعفرپور[۲*]، قربانعلی نعمت‌زاده[۳]

۱- دانشجوی دوره دکتری تخصصی، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲- دانشیار، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
* نویسندهٔ مسئول (a.jafarpour@sanru.ac.ir)
۳- استاد، گروه اصلاح نژاد گیاهی و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۱

واژه‌های کلیدی
استخراج چربی
تخریب سلول
ریزجلبک *Dunaliella Salina*
هموژنیزاسیون

چکیده

کمّیت و کیفیت چربی استخراج‌شده از ریزجلبک‌ها شدیداً متأثر از روش انتخابی برای تخریب و شکستن سلول‌ها و نوع حلال می‌باشد. در این پژوهش با مقایسهٔ چندین ماده و روش متفاوت، شامل آنزیم (سلولاز و فلورزایم)، التراسوند و هموژنایزر با سطوح مختلف و حلال‌های آب، اتانول و متانول مؤثرترین شیوهٔ تخریب سلول‌های ریزجلبکی *Dunaliella Salina* و بهترین حلال به‌منظور استخراج اسیدهای چرب موردبررسی قرار گرفت. براساس نتایج آنزیمی میزان روغن استخراجی با سطح سلولاز ۳ درصد و فلورزایم ۱/۵ درصد برابر ۲/۰۴ گرم بر لیتر برحسب وزن خشک جلبک، التراسوند میزان روغن استخراجی ۱/۶۱ گرم بر لیتر در مدت زمان ۳ دقیقه و ترکیب روش‌های آنزیمی و هموژنایزر ۲/۲۶ گرم بر لیتر ثبت گردید. ازطرفی میزان اسیدهای چرب C16:0، C18:1 و C18:2 استخراجی در بین ۳ حلال مختلف اتانول به‌ترتیب به میزان ۸/۲۲، ۱/۰۸ و ۵/۱۸ درصد ثبت گردید. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، ترکیب روش‌های آنزیمی و هموژنایزر برای تخریب دیوارهٔ سلولی و استخراج اسیدهای چرب با حلال اتانول را به‌عنوان راهکاری مناسب و مؤثر پیشنهاد می‌نماید.

مقدمه

ریزجلبک‌ها اهمیت تجاری و زیست‌محیطی زیادی به‌عنوان پایهٔ زنجیرهٔ غذایی و تولیدکنندهٔ اکسیژن دارند و همچنین یک منبع طبیعی از ترکیبات باارزش مانند اسیدهای چرب، استروئیدها و کاروتنوئیدها هستند (Lee *et al*., 2014) ترکیب چربی ریزجلبک‌ها برای مقاصد مختلفی موردبررسی قرار می‌گیرد. همچنین میزان بالای چربی ریزجلبک‌های دریایی و عدم نیاز آنها به زمین‌های حاصلخیز برای پرورش، انرژی بالاتر، ویسکوزیته و چگالی کمتر ریزجلبک‌ها را به گزینهٔ مناسب‌تری به‌جای منابع زمینی جهت تولید لیپید معرفی می‌کند (Grima *et al*., 2003; Rodolfi *et al*., 2009).

تغییر شرایط محیطی علاوه‌بر تأثیر بر میزان رشد و تولید چربی می‌تواند بر کیفیت لیپید ریزجلبک‌ها نیز اثرگذار باشد (Azachi *et al*., 2002; Bai *et al*., 2014). ریزجلبک‌ها ترکیبی از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع ۲۲ الی ۵۲ کربنه تولید می‌کنند (McMillan *et al*., 2013).

بسیاری از پروتکل‌هایی که برای شکستن سلول ریزجلبک‌ها استفاده می‌شود شامل روش‌های مکانیکی (Hoekman *et al*., 2012; Santos *et al*., 2012)، شیمیایی و گرمایشی (Gordillo *et al*., 1998; Peterson *et al*., 1983)، مایکروویوی (Meier, 1955)

و هیدرولیز آنزیمی (Choi *et al*., 2014) است. در انتخاب یک روش مطلوب جهت تخریب سلول‌ها می‌بایست عواملی مانند نوع دیوارهٔ سلولی ریزجلبک، طبیعت و کیفیت متابولیت موردنظر و ابعاد کار (تجاری یا آزمایشگاهی) درنظرگرفته شود(McMillan *et al*., 2013; Nascimento *et al*., 2013). به‌طورکلی شکستن با روش مکانیکی بیشتر ترجیح داده می‌شود چرا که از آلودگی شیمیایی برای آماده‌سازی جلبک اجتناب‌شده و بسیاری از قابلیت‌های عملکرد مواد سلولی حفظ می‌شود. اولتراسوند[1]، همگنی فشار بالا[2] و هموژن‌سازی[3] سه نوع از روش‌های مکانیکی هستند که به‌طور عمده استفاده می‌شوند (Choi *et al*., 2014; Hoekman *et al*., 2012; Santos *et al*., 2012). روش‌های مکانیکی مانند تنش برشی، نوعی از نیروهای قوی می‌باشند که روی دیوارهٔ سلولی صورت‌گرفته که در آنها معمولاً دیواره به‌طور مستقیم تخریب‌شده و قطعه‌قطعه می‌شود. در نتایج گزارش‌شده (Choi *et al*., 2014; Meier, 1955; Morales-Sánchez *et al*., 2013; Santos *et al*., 2012)، بازده شکستن سلول در روش مکانیکی نسبت به سایر روش‌ها نسبتاً بالاست. روش آنزیمی یک روش بیوشیمیایی است که نیاز به انرژی بسیار پایین‌تر از فرایندهای مکانیکی داشته (Islam *et al*., 2013) و انتظار می‌رود که دیوارهٔ سلولی جلبک با ازبین‌رفتن پروتئین، سلولز و یا پکتین تضعیف و سست شود. برای بهبود تخریب و شکستن دیوارهٔ سلولی جلبک به روش آنزیمی، بایستی از انواع مختلف آنزیم‌ها استفاده شود. سلولاز[4] آنزیمی است که سلولز (در دیوارهٔ سلولی وجود دارد) را شکسته و تجزیه می‌کند (Yap *et al*., 2014). سلولازوم[5] ترکیبی از آنزیم‌هاست که سریع‌تر و مؤثرتر از سلولاز عمل می‌کند. در هر ۲ مورد دیواره شکسته می‌شود و روغن و نشاستهٔ موجود در سلول آزاد می‌شود (Yap *et al*., 2014). ریزجلبک دونالیلا سالینا[6] یک جلبک سبز تک‌سلولی فاقد دیوارهٔ سلولی، متحرک و شوری پسند است که می‌تواند در شوری‌های مختلف (۰/۵ تا ۵/۵ مولار) به رشد خود ادامه دهد (Chen *et al*., 2009; Talebi *et al*., 2013; Thompson, 1994; Vo & Tran, 2014). این ریزجلبک با تولید گلیسرول و تنظیم غلظت یون‌های درون‌سلولی قادر است در شوری‌های بالا به رشد خود ادامه دهد (Talebi *et al*., 2013).

باتوجه‌به اینکه به‌کارگیری فرایندهای ترکیب مکانیکی و آنزیمی در روش‌های شکست دیوارهٔ سلول‌های ریزجلبکی دونالیلا سالینا انرژی لازم برای تخریب دیوارهٔ سلولی را کاهش می‌دهد، لذا استفاده از ترکیب روش‌های مکانیکی و بیوشیمیایی سرعت و بازدهی فرایند استخراج روغن از سلول‌های ریزجلبکی را افزایش می‌دهند، بنابراین در پژوهش حاضر آزمون گردید اگر آب‌کافت آنزیمی با به‌کارگیری آنزیم‌های سلولاز و پروتئیناز، با هموژن‌سازی یا اولتراسوند ترکیب شود به چه میزان موجب شکستن سلول‌های ریزجلبک شده و درنتیجه تغییر بهره‌وری شکستن سلول‌ها و استخراج اسید چرب به چه میزانی افزایش می‌یابد. ازسوی‌دیگر باتوجه‌به اینکه پروفیل اسید چرب استحصالی در هر نوع حلال با یکدیگر متفاوت می‌باشد بنابراین پروفیل اسید چرب استخراجی در ۳ حلال متفاوت با یکدیگر موردمقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گونه و شرایط کشت

ریزجلبک دونالیلا سالینا از مجموعهٔ محیط کشت جلبک در دانشگاه ارومیه تهیه شد. برای کشت جلبک، از محیط کشت BM[7] تغییریافته با سدیم بی‌کربنات به میزان ۱/۲۵ گرم در لیتر استفاده شد و سپس اسیدیتهٔ ابتدایی کشت ۷/۵ تنظیم شد. در مرحلهٔ بعد ظروف حاوی محیط کشت جلبک به همراه لوله‌های هوادهی و پنبه‌های کتانی با اتوکلاو استریل شد. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر از ذخیرهٔ جلبک دونالیلا سالینا (با غلظت 10^5 سلول در میلی‌لیتر) به محیط کشت‌های جداگانه اضافه گردیده (درنهایت حجم محیط کشت ۱ لیتر تنظیم شد) و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و شدت نور ۳۷۰۰ لوکس و در پروتکل

[1] Ultrasonication
[2] High-Homogeneity
[3] Homogenization
[4] Cellulase
[5] Cellulasome
[6] *Dunaliella Salina*
[7] Basal Medium

نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شده (Olofsson *et al*., 2014) و کشت برای یک دورهٔ ۲۱ روزه انجام شد.

برداشت زیست‌توده

برای برداشت زیست‌تودهٔ جلبکی هوادهی برای ۴ ساعت متوقف‌شده و نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۳۰۰×g سانتریفیوژ شد. رسوب جلبک‌ها جمع‌آوری شده و سپس در ۴ تا ۸ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداشته شد (Yap *et al*., 2014).

تخریب دیوارهٔ سلولی به‌وسیلهٔ التراسوند

به زیست‌تودهٔ سلولی ریزجلبک دونالیلا سالینا (۵۰ میلی‌گرم)، ۳ میلی‌لیتر حلال متانول اضافه شد. دیوارهٔ سلول ریزجلبک با دستگاه التراسوند (Sonics، Newtown، CT، ساخت آمریکا) با شرایط ۲۰ کیلوهرتز و دور ۱۰۰ درصد با پاس‌های ۲۰ و ۴۰ ثانیه در مدت زمان کل ۳، ۸ و ۱۳ دقیقه قرار داده شد برای جلوگیری از گرمای ایجادشده در طول تخریب دیوارهٔ سلول با التراسوند نمونه‌ها روی یخ گذاشته شد.

تخریب دیوارهٔ سلولی به‌وسیلهٔ هموژنایزر

زیست‌تودهٔ سلولی ریزجلبک دونالیلا سالینا (۵۰ میلی‌گرم) با ۳ میلی‌لیتر حلال متانول مخلوط‌شده و دیوارهٔ سلول ریزجلبک با دستگاه هموژنایزر (IKA، ساخت آلمان) با سرعت ۷۲۰۰، ۱۱۲۰۰ و ۱۵۶۰۰ دور در دقیقه در مدت زمان ۳ دقیقه هموژن گردید.

شکستن سلول جلبک به‌وسیلهٔ آنزیم

زیست‌تودهٔ سلولی ریزجلبک دونالیلا سالینا (۵۰ میلی‌گرم) با ۳ میلی‌لیتر حلال آب مخلوط شد. نسبت آنزیم سلولاز به زیست‌تودهٔ ریزجلبک ۱ تا ۴ درصد در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت و نسبت آنزیم فلاورزایم به زیست‌تودهٔ ریزجلبک ۰/۵ تا ۲ درصد در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد در مدت زمان ۲ ساعت انتخاب شد (انتخاب میزان دما براساس بازهٔ فعالیت آنزیم‌ها استفاده شده است). سطوح مختلف آنزیم‌های سلولاز و پروتئاز برای تخریب دیوارهٔ سلولی استفاده شدند.

شکستن سلول با ترکیب روش سلولاز، پروتئاز و روش مکانیکی

در این روش سوسپانسیون سلولی جلبکی در غلظت زیست‌توده ۴ گرم در لیتر، ابتدا در معرض فلاورزایم ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد (وزنی/وزنی) برای ۲ ساعت و سپس با سلولاز ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد (وزنی/وزنی) برای ۳ ساعت قرارگرفته و سپس در معرض اولتراسوند با نوسان ۱۰۰ درصد برای ۳، ۸ و ۱۳ دقیقه و یا هموژنیزه با سرعت (۱۱۲۰۰، ۷۲۰۰ و ۱۵۶۰۰) دور در دقیقه قرار داده شد. هر نمونه سوسپانسیون، برای تعیین درجهٔ شکستن و آماده‌شدن برای استخراج لیپید استفاده شد (Yap *et al*., 2014).

استخراج اسید چرب

۱ لیتر سوسپانسیون سلولی ریزجلبکی حاوی ۴ گرم زیست‌توده به‌ترتیب تحت روش‌های اولتراسوند، هموژنیزه‌شدن، آنزیم‌های یادشده یا ترکیب این روش‌ها قرار داده شد و سپس هر سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۳۰۰×g، سانتریفیوژ شد و ریزجلبک‌ها ته‌نشین شده، فاز بالایی جداشده و حلال‌ها توسط دستگاه روتاری تبخیر شد و درنهایت چربی استخراج‌شده اندازه‌گیری شد (Yap *et al*., 2014).

شناسایی و اندازه‌گیری اسیدهای چرب موجود در چربی نمونه‌ها

در میان تمام روش‌های کروماتوگرافی، تعیین و تشخیص اسیدهای چرب به‌وسیلهٔ کروماتوگرافی گازی، دقیق‌ترین نتایج را ارائه می‌دهد. کروماتوگرافی گازی یک روش فیزیکی می‌باشد که برای جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری اجزاء فرار به‌کار می‌رود (Song *et al*., 2013) که در این تحقیق نیز از همین روش استفاده شد. برای تفکیک و جداسازی اسیدهای چرب غالباً از استرهای متیلیک آنها استفاده می‌کنند که نقطه‌جوش پایین‌تری دارند (Song *et al*., 2013) جهت متیله‌کردن اسیدهای چرب موجود در روغن‌های به‌دست‌آمده از نمونه‌ها، ابتدا ۰/۱ گرم از روغن مورد آزمایش را با ۳ میلی‌لیتر هپتان نرمال و ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول متانولی هیدروکسید پتاسیم ۲ نرمال

مخلوط‌کرده، محلول را به مدت ۲۰ دقیقه توسط همزن برقی تکان داده، بعد از گذشت این مدت گلیسرول ته‌نشین‌شده و لایهٔ رویی آن همان استرهای متیلی محلول در هپتان می‌باشند. که جهت تعیین نوع اسیدهای چرب و میزان آنها به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق شدند. مشخصات دستگاه گاز کروماتوگرافی (مدل GC-1000، DANI، ساخت ایتالیا) به‌کاربرده‌شده، بدین قرار می‌باشد: گاز حامل نیتروژن، فشار گاز ۰/۷۶ بار و شدت‌جریان آن دقیقه ۲/۱ میلی‌لیتر در این تحقیق از ستون کاپیلاری، EC-۱۰۰۰ با ماهیت قطبی از جنس شیشه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌لیتر که ضخامت فاز ساکن آن ۰/۲۵ میکرومتر بود، استفاده شد. دمای قسمت تزریق ۲۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد، آشکارساز ۲ با سوخت هیدروژن و اکسیداسیون هوا که فشار یونیزاسیون شعله‌ای آن ۰/۷۵ بار و فشار هوای فشرده ۱ بار بود. پس از تزریق هر نمونه به دستگاه گاز کروماتوگرافی، منحنی‌های رسم‌شده و زمان بازداری مربوط به هر اسید چرب با منحنی مربوط به اسید چرب استاندارد و زمان بازداری آن مقایسه گردید. که به‌این‌ترتیب نوع و میزان اسیدهای چرب موجود در نمونه‌های مورد آزمایش مشخص شدند (Song *et al.*, 2013).

روش‌های آماری

این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام‌شده و آزمایش‌ها در ۳ تکرار صورت گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۱۹ انجام شد. داده‌های مختلف به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد. تفاوت بین میانگین‌ها توسط آنالیز واریانس دوطرفه انجام و درصورت وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها، از آزمون دانکن در سطح ($P<۰/۰۵$) استفاده شد.

نتایج و بحث

تخریب دیوارهٔ سلولی با التراسوند

میزان روغن استخراج‌شده توسط شکستن دیوارهٔ سلولی ریزجلبک با التراسوند در ۳ زمان مختلف با یکدیگر متفاوت و دارای اختلاف معنی‌دار آماری است ($P<۰/۰۵$). بیشترین میزان روغن استخراجی ۰/۶۱۳±۰/۰۰۷ گرم در لیتر مربوط به شکستن دیوارهٔ سلولی در مدت زمان ۳ دقیقه و کمترین میزان ۰/۴۹۳±۰/۰۲۵ گرم در لیتر مربوط به دقیقهٔ ۱۳ می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱ - تخریب دیوارهٔ سلولی ریزجلبک دونالیلا سالینا با التراسوند

زمان (دقیقه)	دامنهٔ نوسان (درصد)	روغن استخراجی (گرم بر لیتر)
۳	۱۰۰	۰/۶۱۳±۰/۰۰۷[a]
۸	۱۰۰	۰/۵۷۸±۰/۰۴۲[b]
۱۳	۱۰۰	۰/۴۹۳±۰/۰۲۵[c]

حروف بالانویس کوچک انگلیسی متفاوت در ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

تخریب دیوارهٔ سلولی به‌وسیلهٔ هموژنایزر

در طول انجام آزمایش‌ها در این مطالعه مشاهده گردید که میزان روغن استخراج‌شده توسط شکستن دیوارهٔ سلولی ریزجلبک با سرعت‌های مختلف هموژنایزر در سرعت‌های مختلف با یکدیگر متفاوت و دارای اختلاف معنی‌دار آماری است ($P<۰/۰۵$). به‌طوری‌که بیشترین میزان روغن استخراجی ۱/۲۱±۰/۰۳۷ گرم در لیتر مربوط به شکستن دیوارهٔ سلولی با سرعت ۷۲۰۰ دور در دقیقه و کمترین میزان ۰/۹۷۳±۰/۰۳۹ گرم در لیتر با سرعت ۱۵۶۰۰ دور در دقیقه می‌باشد (جدول ۲).

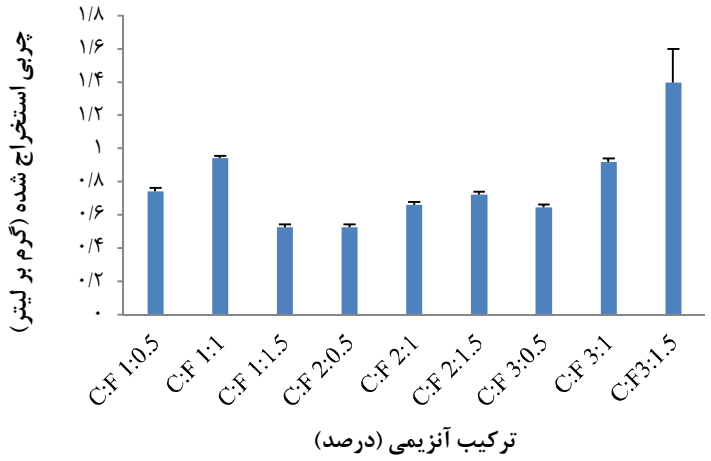
جدول ۲ - تخریب دیوارهٔ سلولی ریزجلبک دونالیلا سالینا با هموژنایزر

زمان (دقیقه)	سرعت (دور در دقیقه)	روغن استخراجی (گرم بر لیتر)
۳	۷۲۰۰	۱/۲۱±۰/۰۳۷[a]
۳	۱۱۲۰۰	۱/۱۶۳±۰/۰۴[b]
۳	۱۵۶۰۰	۰/۹۷۳±۰/۰۳۹[c]

حروف بالانویس کوچک انگلیسی متفاوت در ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

تخریب دیوارهٔ سلولی به‌وسیلهٔ آنزیم

نتایج میزان روغن استخراجی با تخریب دیواره به‌وسیلهٔ آنزیم‌ها نشان داد که بیشترین میزان روغن استخراجی با سطح سلولاز ۳ درصد و فلورزایم ۱/۵ درصد برابر ۲/۰۴±۰/۰۲۶۴ گرم بر لیتر برحسب وزن خشک جلبک و کمترین میزان مربوط به سطح سلولاز ۱ درصد و فلورزایم ۱ درصد برابر ۰/۷۳۳±۰/۰۷۳۷ گرم بر لیتر برحسب وزن خشک جلبک می‌باشد (شکل ۱).

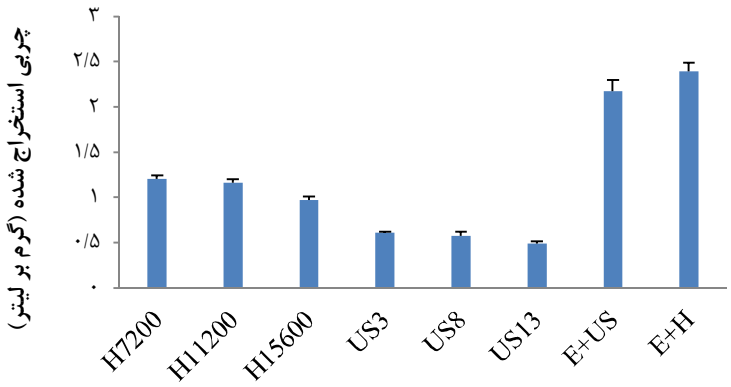


شکل ۱ – مقایسهٔ ترکیب کاربرد سطوح مختلف آنزیم سلولاز و پروتئاز و میزان روغن استخراجی از ریزجلبک دونالیلا سالینا

C: سلولاز ، F: فلورزایم

مقایسهٔ روش‌های استخراج چربی

۳ روش به‌منظور یافتن مؤثرترین روش تخریب و هضم دیوارهٔ سلولی و استخراج چربی از ریزجلبک دونالیلا سالینا موردبررسی قرار گرفت. اثربخشی تخریب دیوارهٔ سلولی با میزان چربی کل استخراج‌شده سنجیده شد. تخریب دیوارهٔ سلولی باعث دسترسی بهتر به اجزاء درون سلول می‌گردد (Gordillo *et al*., 1998). شکل (۲) درصد کل چربی استخراج‌شده به‌وسیلهٔ روش‌های مختلف تخریب دیوارهٔ سلولی را نشان می‌دهد. تمام روش‌های تخریب دیوارهٔ سلولی مورداستفاده در این پژوهش نشان‌دهندهٔ شکست دیوارهٔ سلولی ریزجلبک دونالیلا سالینا بوده اگرچه میزان استخراج روغن تولیدی به‌وسیلهٔ هرکدام از روش‌ها متغیر است.



شکل ۲ – روش‌های مختلف تخریب دیوارهٔ سلولی ریزجلبک دونالیلا سالینا و استخراج چربی

H: هموژنایزر، US: التراسوند، E: آنزیم

در شکل (۲) نتایج نشان داد روش التراسوند کمترین و ترکیب روش‌های آنزیمی و هموژنایزر بیشترین میزان تخریب دیوارهٔ سلولی و استخراج چربی از ریزجلبک می‌باشند که مطالعه‌های مشابهی برای تخریب دیوارهٔ سلولی و استخراج چربی از ریزجلبک دونالیلا سالینا انجام شده است.

Zhang و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی میزان تخریب دیوارهٔ سلولی و استخراج لیپید از ریزجلبک دونالیلا سالینا با روش‌های مختلف پرداختند و گزارش کردند که میزان استخراج لیپید با روش التراسوند ۲۶ درصد، روش بیولوژیکی ۲۲ درصد، هموژنایزر ۱۷ درصد و روش انجمادسازی ۱۰ درصد بود. که روش التراسوند و بیولوژیکی جهت تخریب دیوارهٔ سلول‌های دونالیلا سالینا نسبت به سایر روش‌ها بهتر و ازنظر مصرف کمتر انرژی روش بیولوژیکی توان بالقوه‌ای جهت تولید لیپید در مقیاس بزرگ کاربردی است (Zhang *et al*., 2016).

Qv و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی میزان لیپید استخراجی از ریزجلبک دونالیلا سالینا با تخریب دیوارهٔ سلولی با روش‌های التراسوند و مایکروویو پرداختند و به این نتیجه رسیدند که میزان لیپید استخراجی با التراسوند ۴۵/۹۴ درصد و مایکروویو ۵۷/۰۲ درصد و ترکیب دو روش ۴۹/۹۷ درصد بود (Qv *et al*., 2014).

Günerken و همکاران (۲۰۱۵)، با بررسی اثر انواع روش‌های مکانیکی بر شکست دیوارهٔ سلولی میکروجلبک‌ها به این نتیجه رسیدند که امواج فراصوت‌شده بهره‌وری زیادی در شکستن سلول نداشته و علاوه‌برآن انرژی زیادی نیز مصرف می‌کنند (Günerken *et al*., 2015). همچنین Meier و همکاران (۱۹۵۵) با مقایسهٔ شکستن سلول نانوکلر.پسیس اکلاتا[1]، با روش مایکروویو، حمام آب، مخلوط‌کن، فراصوت و لیزر، نشان دادند که کمترین بهره‌وری در شکستن سلول مربوط به امواج فراصوت ۱/۶۶±۰/۹۷ درصد با مصرف انرژی ۱۳۲ میلی‌ژول در لیتر در غلظت $۱/۸\times۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر بود (Meier, 1955). استفاده از ترکیب روش‌های آنزیمی و هموژنایزر در تخریب دیوارهٔ سلولی بیشترین درصد چربی استخراج‌شده (۹۴/۳۳ درصد) نسبت به کاربرد هرکدام از روش‌های تخریب دیوارهٔ سلولی به تنهایی را به همراه داشته است ازطرفی Jin و همکاران (۲۰۱۲) و Taher و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی تأثیر انواع روش‌ها بر شکست دیوارهٔ سلولی ریزجلبک‌ها به این نتیجه رسیدند که روش آنزیمی اثر بالایی بر تخریب سلول‌ها نداشت. همچنین دریافتند که با استفادهٔ آنزیم به‌طور جداگانه، چربی کمی استخراج شد؛ یعنی بیشتر از ۴۹ درصد چربی به‌دست نیامد (Jin *et al*., 2012, Taher *et al*., 2014).

ترکیبات اسیدهای چرب روغن استخراجی

پروفیل اسیدهای چرب روغن استخراجی با حلال‌های متفاوت (آب، اتانول و متانول) که با دستگاه GC (ساخت آمریکا) شناسایی‌شده بود در جدول (۳) نشان داده شده است. اسیدهای چرب غالب، پالمیتیک اسید[2] (C16:0) اولئیک اسید[3] (C18:1) لینولئیک اسید[4] (C18:2) لینولنیک اسید[5] (C18:3) هستند که ۸۰ درصد کل اسیدهای چرب را شامل می‌شوند. سایر اسیدهای چرب مثل پالمیتولنیک اسید[6] (C16:1) و آراشیدیک[7] (C20:0) درصد کمی را شامل می‌شوند. اسیدهای چرب شناسایی‌شده در این پژوهش مشابه با گزارش El-Baky و همکاران (۲۰۰۴) بود. اگرچه نسبت برخی از اسیدهای چرب مثل C18:2 استخراج‌شده با حلال‌های مختلف متفاوت می‌باشد. به‌عنوان‌مثال زمانی که از حلال اتانول جهت استخراج استفاده می‌شود میزان اسیدهای چرب C18:1، C18:2 و C18:3 افزایش می‌یابد (جدول ۳). به‌طورکلی حلال اتانول بیشتر اسیدهای چرب اشباع، حلال آب اسیدهای چرب تک‌زنجیرهٔ غیراشباع و حلال متانول اسیدهای چرب چندزنجیرهٔ غیراشباع را استخراج می‌کند. اگر بتوان اسیدهای چرب امگا-۳ بخصوص دکوزاهگزانوئیک اسید[8] (DHA) را از سایر اسیدهای چرب ریزجلبک دونالیلا سالینا جدا نمود باتوجه‌به ارزش اقتصادی آن به‌عنوان یک فراوردهٔ زیست‌فعال می‌توان هزینه‌های تولید را تا حدودی کاهش داد (Salama *et al*., 2013; Society & Firestone, 1994).

[1] *Nannochloropsis Oculata*

[2] Palmitic Acid
[3] Oleic Acid
[4] Linoleic Acid
[5] Linolenic Acid
[6] Palmitoleic Acid
[7] Arachidic Acid
[8] Docosahexaenoic Acid

جدول ۳ - پروفیل اسیدهای چرب روغن استخراجی با حلال‌های متفاوت در ریزجلبک دونالیلا سالینا

اسید چرب		حلال‌ها		
		اتانول	متانول	آب
اشباع	C16:0	۱/۰۷۹	۱/۹۵۴	۳/۴۳۴
	C18:0	۲/۰۹۶	۰/۴۹۲	۰
	C20:0	۴/۳۷۹	۲/۶۹۴	۱۲/۹۱۷
غیر اشباع	C16:1	۱۱/۶۷۲	۰/۶۶۶	۱/۸۳۲
	C18:1	۸/۲۲۰	۰/۱۴۵	۱۲/۳۰۰
	C18:2	۵/۱۸۳	۰/۱۲۶	۳/۱۸۶
	C18:3	۲۰/۲۷۶	۰/۱۵۵	۱/۹۶۲
	C20:1	۸/۱۰۷	۰/۵۴۲	۰
	C20:2	۳/۸۸۵	۲/۰۳۷	۲۲/۰۸۸
	C20:3	۰	۰/۴۰۹	۰/۸۴۲
	C20:4	۲/۲۹۰	۰/۸۴۳	۵/۴۴۳
	C20:5	۱/۰۷۹	۰/۳۳۴	۰
	C22:6	۲/۰۹۶	۶/۰۸۵	۰
	C24:1	۴/۳۷۹	۶۴/۹۴۹	۰

در بین روش‌های مکانیکی، کارایی هموژنایزر به‌عنوان یک روش مناسب در مقیاس صنعتی، توسط برخی از پژوهشگران گزارش شده است (Chisti & Moo-Young, 1986). دراین‌ارتباط، نتایج نشان از کارایی بالای این روش در ریزجلبک دونالیلا سالینا داشت، به‌طوری‌که پس از ترکیب روش‌های مکانیکی و آنزیمی بیشترین استخراج لیپید توسط ترکیب این روش‌ها صورت گرفت. به‌طورکلی روش استخراج یک نکتهٔ کلیدی در به‌دست‌آمدن حداکثر پروتئین و چربی از جلبک‌ها می‌باشد. درهمین‌ارتباط قابل ذکر است که روش‌های شیمیایی همانند تیمار با اسید و باز، باوجود کارایی زیاد جهت تجزیهٔ دیوارهٔ سلولی برای استخراج محصولات حساسی همچون پروتئین‌ها مناسب نمی‌باشد. بااین‌وجود تیمار قلیایی می‌تواند برای جداکردن اسیدهای چرب آزاد مورداستفاده قرار گیرد. حلال‌های آلی مانند هگزان، اتانول، کلروفرم و دی‌اتیل اتر با تخریب غشای پلاسمایی می‌توانند تا حدودی سلول را متلاشی کنند. این روش به‌طور گسترده برای استخراج متابولیت‌هایی مانند آستاگزانتین، بتاکاروتن و اسیدهای چرب استفاده می‌گردد (Grima *et al*., 2003). دراین‌مورد، مخلوطی از هگزان و اتانول ۹۶ درصد روی بیومس لیوفیلیزشده اعمال می‌شود. بااین‌وجود، اگرچه با این روش می‌توان لیپیدها را استخراج کرد، ولی ترکیبات دیگری همچون قندها، اسیدهای آمینه، نمک‌ها، پروتئین‌های هیدروفوب و رنگدانه‌ها نیز به‌صورت ناخواسته وارد فاز آلی می‌گردند (Cravotto *et al*., 2008). از دیگر عوامل مهم دربارهٔ شیوهٔ تخریب سلول، ابعاد کار است، که بنابر مقیاسی که موردنظر است، تجاری یا آزمایشگاهی، روش نیز تغییر می‌کند. همچنین باوجود کارایی زیاد امواج التراسونیک در برخی از گونه‌های باکتریایی و یا جلبکی، از این روش تنها می‌توان برای شکستن سلول در مقادیر کم بیومس استفاده کرد، درحالی‌که در مقیاس وسیع کاربردی نمی‌باشد (Grima *et al*., 2003). پس از کشت و تولید انبوه میکروارگانیسم‌ها جهت مقاصد تجاری، در راستای فراوری بیوماس حاصله برای استحصال ترکیبات درون سلولی، مهم‌ترین مسئله انتخاب یک روش مناسب برای شکستن سلول‌ها می‌باشد. اغلب روش‌هایی که دراین‌مورد برای باکتری‌ها استفاده می‌شود را می‌توان برای ریزجلبک‌ها نیز اعمال نمود (Grima *et al*., 2003). به‌طورکلی در مقیاس صنعتی روش‌های مکانیکی برای شکستن سلول کارایی بیشتری داشته و مقرون‌به‌صرفه هستند. روش‌های آنزیمی و شیمیایی بیشتر در مقیاس آزمایشگاهی کاربرد دارند. استفاده از چندین روش به‌صورت توأم نیز می‌تواند مفید باشد (Chisti & Moo-Young, 1986; Kula & Schütte, 1987). در پژوهشی دیگر Wang و همکاران (۲۰۱۵)

طی بررسی انواع روش‌های تخریب دیوارهٔ سلولی از قبیل اولتراسوند، همگن‌سازی تحت‌فشار بالا، هیدرولیز آنزیمی و ترکیب هیدرولیز آنزیمی با هموژنایزر تحت‌فشار بالا و اولتراسوند در ریزجلبک نئوکلریس اولئوابوندنس[1] به این نتیجه رسیدند که بالاترین درجهٔ شکستن دیواره بالای ۹۴/۴۱ درصد بود که با استفاده از روش ترکیب هیدرولیز آنزیمی و هموژنایزر با فشار بالا به‌دست آمد. با استفاده از ترکیب این روش‌ها، ۶۳/۹۲ درصد از چربی‌های درون سلول استحصال شد و بیان کردند که ترکیب این روش‌ها کارآمدتر و مقرون‌به‌صرفه‌تر از کاربرد این روش‌ها به‌صورت انفرادی است (Wang *et al*., 2015).

نتیجه‌گیری

براساس نتایج می‌توان بیان نمود که درخصوص شکستن دیوارهٔ سلولی ریزجلبک دونالیلا سالینا روش آنزیمی با سطح سلولاز ۳ درصد و فلورزایم ۱/۵ درصد بیشترین کارایی و سطح سلولاز ۱ درصد و فلورزایم ۱ درصد کمترین کارایی را دارد. ازسویی در روش التراسوند بیشترین میزان روغن استحصالی مربوط به شکستن دیوارهٔ سلولی در مدت زمان ۳ دقیقه و کمترین مربوط به زمان ۱۳ دقیقه بود. براساس نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش کارآمدترین روش برای تخریب دیوارهٔ سلولی ترکیب روش‌های آنزیمی و هموژنایزر بوده بهترین حلال برای استخراج چربی اتانول می‌باشد.

منابع

1- Azachi, M., Sadka, A., Fisher, M., Goldshlag, P., Gokhman, I., & Zamir, A. 2002. Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*. Plant physiology, 129(3):1320-1329.

2- Bai, X., Naghdi, F.G., Ye, L., Lant, P., & Pratt, S. 2014. Enhanced lipid extraction from algae using free nitrous acid pretreatment. Bioresource technology, 159:36-40.

3- Chen, H., Jiang, J-G., & Wu, G-H. 2009. Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. Journal of agricultural and food chemistry, 57(14):6178-6182.

4- Chisti, Y., & Moo-Young, M. 1986. Disruption of microbial cells for intracellular products. Enzyme and Microbial Technology, 8(4):194-204.

5- Choi, S-A., Jung, J-Y., Kim, K., Lee, J-S., Kwon, J-H., Kim, S.W., Yang, J-W., & Park, J-Y. 2014. Acid-catalyzed hot-water extraction of docosahexaenoic acid (DHA)-rich lipids from *Aurantiochytrium* sp. KRS101. Bioresource technology, 161:469-472.

6- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., & Cintas, P. 2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. Ultrasonics sonochemistry, 15(5):898-902.

7- El-Baky, H.H.A., El-Baz, F.K., & El-Baroty, G.S. 2004. Production of lipids rich in omega 3 fatty acids from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Biotechnology, 3(1):102-108.

8- Gordillo, F.J., Goutx, M., Figueroa, F.L., & Niell, F.X. 1998. Effects of light intensity, CO_2 and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. Journal of Applied Phycology, 10(2):135-144.

9- Grima, E.M., Belarbi, E.-H., Fernández, F.A., Medina, A.R., & Chisti, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology advances, 20(7-8):491-515.

10- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M ,.Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. Biotechnology advances, 33(2):243-260.

11- Hoekman, S.K., Broch, A., Robbins, C., Ceniceros, E., & Natarajan, M. 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16:143-169.

12- Islam, M.A., Magnusson, M., Brown, R.J., Ayoko, G.A., Nabi, M.N., & Heimann, K. 2013. Microalgal species selection for biodiesel production based on fuel properties derived from fatty acid profiles. Energies, 6(11):5676-5702.

13- Jin, G., Yang, F., Hu, C., Shen, H., & Zhao, Z.K. 2012. Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides*. Bioresource technology, 111:378-382.

[1] Neochloris Oleoabundans

14- Kula, M.R. & Schütte, H. 1987. Purification of proteins and the disruption of microbial cells. Biotechnology Progress, 3(1):31-42.

15- Lee, S.-Y., Kim, S.-H., Hyun, S.-H., Suh, H.W., Hong, S.-J., Cho, B.-K., Lee, C.-G., Lee, H., & Choi, H.-K. 2014. Fatty acids and global metabolites profiling of *Dunaliella tertiolecta* by shifting culture conditions to nitrate deficiency and high light at different growth phases. Process Biochemistry, 49(6):996-1004.

16- McMillan, J.R., Watson, I.A., Ali, M., & Jaafar, W. 2013. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. Applied Energy, 103:128-134.

17- Meier, R.L. 1955. Biological cycles in the transformation of solar energy into useful fuels. Solar energy research, 23:179-183.

18- Morales-Sánchez, D., Tinoco-Valencia, R., Kyndt, J. & Martinez, A. 2013. Heterotrophic growth of Neochloris oleoabundans using glucose as a carbon source. Biotechnology for Biofuels, 6(1):100

19- Nascimento, I.A., Marques, S.S.I., Cabanelas, I.T.D., Pereira, S.A., Druzian, J.I., De Souza, C.O., Vich, D.V., De Carvalho, G.C., & Nascimento, M.A. 2013. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. Bioenergy Research, 6(1):1-13.

20- Niu, J-F., Wang, G-C., & Tseng, C-K. 2006. Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev. Protein Expression and Purification, 49(1):23-31.

21- Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J-P., Del Pino, V., Uronen, P., & Legrand, C. 2014. Combined effects of nitrogen concentration and seasonal changes on the production of lipids in *Nannochloropsis oculata*. Marine drugs 12(4):1891-1910.

22- Peterson, C., Wagner, G., & Auld, D. 1983. Vegetable oil substitutes for diesel fuel. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers, 26:322-0327.

23- Qv, X.Y., Zhou, Q.F., & Jiang, J.G. 2014. Ultrasound-enhanced and microwave-assisted extraction of lipid from *Dunaliella tertiolecta* and fatty acid profile analysis. Journal of Separation Science, 37(20):2991-2999.

24- Salama, E-S., Kim, H-C., Abou-Shanab, R.A., Ji, M.-K., Oh, Y-K., Kim, S-H., & Jeon, B-H. 2013. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. Bioprocess and Biosystems Engineering, 36(6):827-833.

25- Santos, A., Janssen, M., Lamers, P., Evers, W., & Wijffels, R. 2012. Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline–saline conditions. Bioresource Technology, 104:593-599.

26- Society, A.O.C., & Firestone, D. 1994. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. American Oil Chemists' Society press.

27- Song, M., Pei, H., Hu, W., & Ma, G. 2013. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. Bioresource Technology, 141:245-251.

28- Talebi, A.F., Mohtashami, S.K., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Mirzaei, H.H., Mirzajanzadeh, M., Shafaroudi, S.M., & Bakhtiari, S. 2013. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. Algal Research, 2:258-267.

29- Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A.H., Haik, Y., & Farid, M. 2014. Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production. Biomass and bioenergy, 66:159-167.

30- Thompson, G.A. 1994. Mechanisms of osmoregulation in the green alga Dunaliella salina. Journal of Experimental Zoology, 268(2):127-132.

31- Vo, T., & Tran, D. 2014. Effects of salinity and light on growth of *Dunaliella* isolates. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2(5):208-211.

32- Wang, D., Li, Y., Hu, X., Su, W. & Zhong, M. 2015. Combined enzymatic and mechanical cell disruption and lipid extraction of green alga *Neochloris oleoabundans*. International Journal of Molecular Sciences, 16(4):7707-7722.

33- Yap, B.H., Crawford, S.A., Dumsday, G.J., Scales, P.J., & Martin, G.J. 2014. A mechanistic study of algal cell disruption and its effect on lipid recovery by solvent extraction. Algal Research, 5:112-120.

34- Zhang, Y., Deng, C., Cui, Y., & Cheng, J. 2016. Effect of different methods on cell disruption and oil extraction of microalgae. China Oils and Fats, 41(3):61-65.

Comparison of Different Cell-wall Disruption and Fatty Acid Extraction from *Dunaliella Salina* Microalgae

Farzaneh Mehrabi[1], Seyed Ali Jafarpour[2*], Ghorban-Ali Nematzadeh[3]

1- PhD. Student, Fisheries Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2- Associate Professor, Fisheries Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
* Corresponding author (a.jafarpour@sanru.ac.ir)
3- Professor, Plant Breeding and Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Abstract

As extracted oil from microalgae is highly affected by selected cell-wall breaking method and type of the solvent used, thus an appropriate choice matters in which it might affect the quantity. This study was conducted to determine the most effective method on *Dunaliella salina* microalga cell disruption and solvent by comparing several methods. According to the results, the most efficient technique for oil extraction from *Dunaliella salina* microalgae was recorded as combination of enzymatic and homogenization methods (2.26±0.02 g.L-1), followed by enzymatic method with 3% cellulose and 1.5% flavourzyme (2.04±0.02 g.L-1), and finally ultrasonication (1.61±0.00 g.L-1). Based on the fatty acid profile, C16:0, C18:1 and C18:2 fatty acids were recorded as the main constituents ethanol was the most effective solvent by extraction of 8.22%, 1.07% and 5.18% of above mentioned fatty acids. Furthermore, present results demonstrated that in order to efficiently extract lipid from *Dunaliella salina*, enzymatic and homogenization methods exhibited the most efficient technique for cell disruption.

Keywords: Cell Destruction, *Dunaliella Salina*, Homogenization, Lipid Extraction