Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 9:23 IRST on Sunday October 21st 2018

مجله سلامت و محیط، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی
انجمن علمی بهداشت محیط ایران
دوره هفتم ، شماره اول، بهار ۱۳۹۳ ، صفحات ۱۱ تا ۲۰

مطالعه اثرنوع حلال و خشک نمودن زیست توده بر استخراج لیپید از میکروجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا جهت تولید بیودیزل

محمد ملکوتیان[۱]، بهنام حاتمی[۲]، شیدوش دولتشاهی[۳]، احمد رجبی زاده[۴]

دریافت: ۹۱/۰۹/۲۰ پذیرش: ۹۱/۱۱/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: اخیرا بیودیزل به عنوان سوخت سبز و انرژی دوست‌دار محیط‌زیست توجه زیادی به خود جلب نموده و تلاش‌ها در جهت بهینه‌سازی شرایط تولید بیودیزل از میکروجلبک‌ها ادامه دارد. هدف از این مطالعه تعیین روش مناسب آبگیری و خشک نمودن زیست توده و انتخاب حلال آلی مناسب جهت استخراج لیپید از زیست توده است.

روش بررسی: پس از کشت نانوکلروپسیس اوکولاتا در محیط گیلارد F/۲ و رسیدن میکروجلبک به انتهای فاز رشد ثابت، زیست توده جلبکی به وسیله سانتریفیوژ از محیط آبی جدا و به سه روش فور، هوای آزاد و لیوفیلیزه خشک گردید. استخراج لیپید از تمامی نمونه‌های خشک شده، توسط دستگاه سوکسله و سه حلال دی اتیل اتر، ان هگزان وان پنتان انجام شد. کمیت و کیفیت لیپید استخراج شده در هر مرحله توسط گازکروماتوگرافی جرمی تعیین گردید.

یافته‌ها: در هر سه روش خشک کردن، اسید پالمیتیک و اسید پالمیتولئیک بطور معناداری بیشترین ترکیب اسید چرب میکروجلبک را تشکیل داده و مقدار اسید پالمیتیک در ترکیب اسید چرب استخراج شده توسط دی اتیل اتر به طور معناداری نسبت به دو حلال دیگر بیشتر است. میکروجلبک خشک شده در هوای آزاد و روش لیوفیلیزه که با حلال دی اتیل اتر استخراج لیپید از آن انجام شده بیشترین مقدار تری گلیسرید را دارد و به ترتیب برابر ۷۶/۷۲ و ۷۵/۰۳ درصد اسید چرب است.

نتیجه‌گیری: استفاده از روش لیوفیلیزه جهت آبگیری و خشک نمودن زیست توده و همچنین دی اتیل اتر به عنوان حلال جهت استخراج لیپید از زیست توده نسبت به سایر روش‌های مورد مطالعه در این تحقیق بازدهی بالاتری دارد و در تحقیقات مربوط به تولید بیودیزل از لیپید میکروجلبک کارایی بیشتری خواهد داشت.

واژگان کلیدی: نانوکلروپسیس اوکولاتا، لیپید، حلال، زیست توده، بیودیزل

۱-(نویسنده مسئول): دکتری بهداشت محیط، استاد مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان
m.malakootian@yahoo.com
۲- کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان
۳- کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، عضو مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط، مربی گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان
۴-کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، عضو مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط، مربی گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 9:23 IRST on Sunday October 21st 2018

مقدمه

با افزایش جمعیت، توسعه صنایع و مصرف بیش از حد سوخت‌های فسیلی، بحران انرژی به عنوان یکی از چالش های عمده پیش روی بشر خود نمائی می‌کند(۱). استفاده ازسوخت‌های فسیلی، افزایش انتشار گازهای گلخانه ای و ایجاد پدیده گرمایش جهانی را در پی داشته و باعث توجه بیشتر به منابع انرژی پایدار با انتشار آلودگی کم شده است(۲). در سالیان اخیر، بیودیزل(سوخت سبز) به عنوان یکی از اولویت‌های انرژی تجدیدپذیر، غیر سمی و دوست‌دار محیط‌زیست جهت جایگزینی سوخت‌های فسیلی به شدت مورد توجه قرار گرفته شده است(۳–۵). در میان منابع متداول، میکروجلبک‌ها به علت سرعت رشد بالا، زمان رشد کم(۴، ۶) و تولید زیست توده زیاد(۷، ۸) به عنوان کارخانه‌های سلولی تجزیه‌کننده نور خورشید، می‌توانند با تبدیل دی اکسید کربن به سوخت سبز از میزان دی اکسید کربن جو بکاهند(۹). مراحل اساسی جهت تولید بیودیزل از میکروجلبک شامل کشت میکروجلبک، برداشت زیست توده، آبگیری وخشک نمودن زیست توده، استخراج لیپید از آن و تبدیل لیپید به بیودیزل است(۶). هرکدام از این مراحل نقش مهمی در بازدهی اقتصادی تولید بیودیزل از میکروجلبک داشته و تحقیقات در این زمینه تا دستیابی به شرایط بهینه هر مرحله ادامه دارد. به عنوان مثال مطالعات متعددی بر روی کمیت و کیفیت لیپید سلولی میکروجلبک در نتیجه تنوع شرایط رشد (دما ، شدت نور) یا مشخصات محیط کشت (غلظت نیتروژن، فسفات و آهن) انجام شده است(۱۰–۱۲). همچنین مطالعاتی بر روی روش‌های جداسازی میکروجلبک از محیط کشت بوسیله سانتریفیوژ، انعقاد شیمیایی و انعقاد الکتریکی(۱۳) و یا تبدیل لیپید به بیودیزل در حضور کاتالیزورهای گوناگون(۱۴–۱۶) انجام شده است. در این میان، خشک نمودن زیست توده میکروجلبک و استخراج لیپید از آن، از مراحل مهم در تولید بیودیزل بوده که ترکیب و ساختار متفاوت لیپید در میکروجلبک‌های گوناگون، باعث ایجاد تفاوت‌هایی در روش‌های استخراج و در نتیجه هزینه عملیات میگردد(۷). استخراج لیپید از زیست توده میکروجلبک به روش‌های گوناگونی مانند روش مکانیکی، استفاده از حلال شیمیایی، استخراج آنزیمی، جریان اسمزی، استخراج سیال فوق بحرانی، استخراج به کمک امواج صوتی و ماکروویو انجام می‌شود(۳، ۸، ۹). بر خلاف روش‌های استخراجی مانند استخراج به روش سیال فوق بحرانی و یا استفاده از ماکروویو و امواج صوتی که اخیرا توسعه یافته‌اند، استخراج لیپید از زیست توده با استفاده از حلال‌های آلی به علت سادگی، هزینه نسبتا کم و عدم نیاز به تجهیزات خاص تقدم داشته و در حال حاضر، بطور گسترده در تحقیقات مربوط به بیودیزل استفاده می‌شود(۳). در مطالعاتی که تاکنون انجام شده تنها اثر حلال بر کمیت لیپید بررسی گردیده، در حالی‌که کیفیت لیپید استخراج شده نقش مهمی در تولید بیودیزل و مطابقت آن با استانداردها دارد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر نوع حلال بر ترکیب اسید چرب استخراج شده از میکروجلبک است و با توجه به تاثیر دما بر ترکیب اسید چرب، سه روش معمول خشک نمودن زیست توده میکروجلبک مورد بررسی قرار گرفت و کیفیت اسید چرب به دست آمده از هر روش جهت تولید بیودیزل تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع بنیادی–کاربردی بوده که در مقیاس آزمایشگاهی، در نیمه اول سال ۹۱ در مرکز تحقیقات بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گرفت.

کشت میکروجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا

میکروجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا مورد استفاده در این مطالعه از ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندرامام خمینی، پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور تهیه گردید. این میکروجلبک یوکاریوت بوده و به علت ساختار ساده به سرعت رشد می‌نماید(۱۱) . میکروجلبک در ظروف پلاستیکی ده لیتری حاوی محیط کشت گیلارد F/۲ ، شوری ۳۰ g/L (که به وسیله نمک دریایی شبیه‌سازی شده) در فایکولب (محفظه استریل) مجهز به تنظیم دما و شدت نور کشت داده شد. با توجه به مطالعه Converti و همکاران(۱۱)، دمای محیط کشت بر روی ۲۰ °C و با توجه به مطالعه Banerjee و همکاران(۱۷) و Sen و همکاران (۱۸) نور مورد نیاز کشت توسط لامپ فلورسنس بر روی ۷۰ $\mu E\ m^{-2}\ S^{-1}$ تنظیم گردید. ازجریان هوای

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 9:23 IRST on Sunday October 21st 2018

حاوی ۲٪ دی اکسید کربن که ابتدا در آب اشباع شده، پس از عبور از فیلتر ۰/۴۵ µm (بمنظور جلوگیری از احتمال آلودگی میکروبی میکروجلبک) نیز به منظور هوادهی استفاده شد. جهت جلوگیری از هرگونه آلودگی در تمامی مراحل آزمایش، محیط کشت و ظروف در اتوکلاو و دمای ۱۲۱ °C به مدت ۲۰ min استریل شدند. تلقیح استوک جلبکی به ظروف حاوی محیط کشت نیز در زیر لامپ UV انجام گردید.

آبگیری و خشک نمودن زیست توده

پس از رسیدن میکروجلبک به انتهای فاز رشد ثابت، زیست توده جلبکی بوسیله سانتریفیوژ (۸۰۰۰ rpm، ۲۰ min) از محیط آبی جدا(۳، ۶) و به سه روش متفاوت خشک گردید. خشک نمودن در فور (۱۰۵ °C به مدت ۴ h)، خشک نمودن در دمای محیط (۲۰ °C تا ۲۵ به مدت یک هفته) و لیوفیلیزه کردن (بوسیله دستگاه فریز درایر مدل EyELA FD-۸۱ و دمای ۶۹ °C-) از روش‌های مورد مطالعه بودند(۹).

استخراج لیپید از زیست توده به روش دستگاه سوکسله

۲۰ g از هر نمونه زیست توده خشک شده، به آرامی توسط هاون یکنواخت گردید و استخراج لیپید از آن توسط دستگاه سوکسله مدل Soxtec ۲۰۵۰ طبق برنامه، بدین صورت انجام شد: هر سیکل شامل جوشیدن ۲۵ min، استخراج لیپید ۴۰ min و بازیابی حلال ۱۵ min. استخراج تمامی نمونه‌ها بطور یکسان در پنج سیکل انجام گردید. جهت استخراج، سه حلال متداول، دی اتیل اتر، ان هگزان و ان پنتان با دمای جوش متفاوت و درجه خلوص بالا (HPLC grade) در نظر گرفته شد. جهت حذف بقایای میکروجلبک، لیپید استخراج شده بوسیله فیلتر ۰/۴۵ µm صاف‌سازی گردید(۱۱). هرکدام از مراحل خشک نمودن و استخراج لیپید با سه بار تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین گزارش گردید. پس از تعیین مقدار لیپید، لیپید خشک شده را در ۰/۴ mL الکل ایزوپروپیل حل نموده و مقدار تری گلیسرید در لیپید، طبق روش Li و همکاران اندازه‌گیری گردید(۱۹).

آنالیز و تعیین مشخصات اسید چرب

جهت تعیین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسید چرب، ۱۵۰ mg از هر نمونه لیپید استخراج شده، طبق استاندارد EN ISO ۵۵۰۹ (۲۰) بوسیله برم تری فلوئورید مشتق‌سازی شد. فاز آلی بدست آمده بوسیله دستگاه گازکروماتوگرافی مدل (Agilent technologies(۷۸۹۰A -۵۹۷۵c مجهز به ستون DB-WAX (طول ۳۰ m، قطر داخلی ۰/۲۵ mm، ضخامت ۰/۲۵ µm) و دتکتور یونیزاسیون شعله FID آنالیز گردید. دمای اینجکتور و دتکتور بر روی ۲۵۰ °C ثابت نگه داشته شد. دما طی ۵ min به ۱۸۰ °C رسید و سپس با سرعت ۴ °C /min به ۲۲۰ °C رسید و به مدت ۲۵ min در این دما نگه داشته شد. هلیوم نیز با میزان ۱/۵ mL/min به عنوان گاز حامل استفاده شد. ترکیبات تشکیل‌دهنده اسید چرب بر حسب درصد اسید چرب کل و بر اساس پیک‌های بدست آمده از آنالیز محاسبه گردید(۲، ۱۰).

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه(one-way Anova) آنالیز و جهت تعیین تفاوت آماری موجود در بین نمونه‌ها از آزمون Tukey با نرم‌افزار Spss استفاده شد .سطح معناداری نیز ۰/۰۵ در نظر گرفته شد(۲۱، ۲۲) .

یافته‌ها

نتایج حاصل از ترکیب اسید چرب در میکروجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا که با استفاده از فور، در مجاورت هوای آزاد و به روش لیوفیلیزه خشک شده و با استفاده از حلال‌های آلی مختلف، استخراج لیپید از آنها انجام گرفته است، به ترتیب در جداول ۱ تا ۳ ارائه شده است.

نتایج به دست آمده نشان داد از میکروجلبک خشک شده به روش های فور، هوای آزاد و لیوفیلیزه به ترتیب سیزده، پانزده و دوازده ترکیب استخراج گردید که در تمامی این روش‌ها بیشترین درصد مربوط به اسید پالمیتیک و اسید پالمیتولئیک است. همچنین در هیچ‌کدام از نمونه های استخراج شده بوسیله دی اتیل اتر، اسید ایکوزاپنیانوئیک(EPA) مشاهده نشده است که نشان میدهد دی اتیل اتر حلال مناسبی جهت استخراج EPA نیست.نتایج مربوط به کمیت ترکیبات استخراج شده نیز نشان داد که در روش لیوفیلیزه و هوای آزاد، دی اتیل اتر نسبت به دو حلال دیگر مناسب‌تر است.

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 9:23 IRST on Sunday October 21st 2018

جدول ۱ : نتایج حاصل از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسید چرب در میکروجلبک خشک شده به روش فور و با استفاده از حلال‌های آلی مختلف (٪ وزن خشک سلولی زیست توده میکروجلبک)

نماد علمی ترکیب	نام علمی ترکیب	نام عمومی ترکیب	حلال مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات اسید چرب		
			دی اتیل اتر	ان هگزان	ان پنتان
C8:0	octanoic acid	اسید کاپریلیک	۰/۳۵±۰/۰۰۳	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد
C10:0	decanoic acid	اسید کاپریک	تشخیص داده نشد	۰/۲±۰/۰۰	تشخیص داده نشد
C12:0	Dodecanoic acid	اسید لائوریک	۰/۷۶±۰/۰۰۲	۱/۳۲±۰/۰۱	تشخیص داده نشد
C14:0	Tetradecanoic acid	اسید مایریستیک	٦/۷۸±۰/۰۱٤	٤/۳۰۵±۰/۰۲۱	۵/۹۱±۰/۰۲۸
C15:0	Pentadecanoic acid	اسید پنتادسیلیک	تشخیص داده نشد	۰/٦٤±۰/۰۰۱	۰/۵۱±۰/۰۰٤
C16:0	Hexadecanoic acid	اسید پالمیتیک	۳٤/۰٤±۰/۰۵٦	۲۱/۸۷±۰/۰۱٤	۲٤/۳۱۵±۰/۰۰۵
C16:1 n-7	9-Hexadecenoic acid	اسید پالمیتولئیک	۱۳/۳۸±۰/۰۲٦	۱٦/۷٦۵±۰/۰۰۳	۲۳/۰۵±۰/۰٦
C17:0	Heptadecanoic acid	اسید مارژیریک	تشخیص داده نشد	۰/۲٦±۰/۰۰۱	۰/۳۹±۰/۰۰۲
C18:0	Octadecanoic acid	اسید استئاریک	تشخیص داده نشد	۰/۲٤±۰/۰۰۳	تشخیص داده نشد
C18:1 n-9	9-Octadecenoic acid	اسید اولئیک	۳/۹۵±۰/۰۱٤	٦/٤٦۵±۰/۰۲۱	۹/۷۱۵±۰/۳
C18:2 n-6	9,12-Octadecadienoic acid	اسید لینولئیک	۲/۲±۰/۰۰	٤/٦٤۵±۰/۰۰۵	۵/۰۵±۰/۰۷
C18:3 n-3	9,12,15-Octadecatrienoic acid	اسید آلفا لینولئیک	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد
C20:5 n-3	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	EPA	تشخیص داده نشد	۸/۲۰±۰/۰۵٤	۱۰/۰٤±۰/۰۷٦
جمع	–	–	٪۶۱/۵۴	٪۶۴/۹۲	٪۷۹

جدول ۲ : نتایج حاصل از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسید چرب در میکروجلبک خشک شده در هوای آزاد و با استفاده از حلال‌های آلی مختلف (٪ وزن خشک سلولی زیست توده میکروجلبک)

نماد علمی ترکیب	نام علمی ترکیب	نام عمومی ترکیب	حلال مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات اسید چرب		
			دی اتیل اتر	ان هگزان	ان پنتان
C5:0	Pentanoic acid	اسید والریک	۱۰/۵۹±۰/۰۲۷	۱/۸۱±۰/۰۰۱	۰/٤۸±۰/۰۱۲
C8:0	octanoic acid	اسید کاپریلیک	۰/٦۸±۰/۰٤۱	۰/٤٤±۰/۰۰۵	تشخیص داده نشد
C9:0	Nonanoic acid	اسید پلاروژنیک	۰/۱۵±۰/۰۰۱	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد
C10:0	decanoic acid	اسید کاپریک	۰/٤۷±۰/۰۰۲	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد
C12:0	Dodecanoic acid	اسید لائوریک	۰/۸۳±۰/۰۰۱۵/	۲/۳۹±۰/۰۰۳	۲/٤۹±۰/۰۰٦
C14:0	Tetradecanoic acid	اسید مایریستیک	۷/۲±۰/۱	۵/۰۳±۰/۰۰	۳/۳۸±۰/۰۰۱
C15:0	Pentadecanoic acid	اسید پنتادسیلیک	۰/۷۳±۰/۰۳٦	۰/٤٤±۰/۰۰۸	تشخیص داده نشد
C16:0	Hexadecanoic acid	اسید پالمیتیک	۲۵/٤۳±۰/۰۵	۲۵/۲۸±۰/۰۰	۱۰/۷۸±۰/۰۷
C16:1 n-7	9-Hexadecenoic acid	اسید پالمیتولئیک	۲۳/۷٦±۰/۰۵	۲۱/۸۲±۰/۰۳	۲۷/۸۲±۰/۰٤
C17:0	Heptadecanoic acid	اسید مارژیریک	۰/۵۲±۰/۰۰۲	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد
C18:0	Octadecanoic acid	اسید استئاریک	۰/۸٤±۰/۰۰۳	۰/٤۷±۰/۰۰٤	تشخیص داده نشد
C18:1 n-9	9-Octadecenoic acid	اسید اولئیک	۱/۵۲±۰/۰۱	۸/۵۲±۰/۰۰۲	٤/۳۹±۰/۰۲
C18:2 n-6	9,12-Octadecadienoic acid	اسید لینولئیک	٦/۰٦±۰/۰۲	٤/٦٦±۰/۰۳	۱/۷۵±۰/۰۰۱
C18:3 n-3	9,12,15-Octadecatrienoic acid	اسید آلفا لینولئیک	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد
C20:5 n-3	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	EPA	تشخیص داده نشد	۹/۰۷±۰/۰۰٤	۸/۳٦±۰/۰۰۷
جمع	–	–	٪۸۲/۷۸	٪۷۸/۹۳	٪۴۷/۵

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 9:23 IRST on Sunday October 21st 2018

جدول ۳ : نتایج حاصل از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسید چرب در میکروجلبک خشک شده به روش لیوفیلیزه و با استفاده از حلال‌های آلی مختلف (٪ وزن خشک سلولی زیست توده میکروجلبک)

نماد علمی ترکیب	نام علمی ترکیب	نام عمومی ترکیب	حلال مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات اسید چرب		
			دی اتیل اتر	ان هگزان	ان پنتان
C5:0	Pentanoic acid	اسید والریک	۱/۰۸±۰/۰۰۵	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد
C8:0	octanoic acid	اسید کاپریلیک	٦/۱۰±۰/۰۱	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد
C12:0	Dodecanoic acid	اسید لائوریک	۰/۹۹±۰/۰۰۳	تشخیص داده نشد	۰/۸٦±۰/۰۰۲
C14:0	Tetradecanoic acid	اسید مایریستیک	۷/۳±۰/۱۵	۱/۵۲±۰/۰۰۲	۳/٤۸±۰/۰۰۸
C15:0	Pentadecanoic acid	اسید پنتادسیلیک	تشخیص داده نشد	۰/۳٦±۰/۰۰۲	تشخیص داده نشد
C16:0	Hexadecanoic acid	اسید پالمیتیک	۳۱/۰۸±۰/۰٤۵	۸/۱۳±۰/۰۲۳	۱٦/۰۵±۰/۰۱۷
C16:1 n-7	9-Hexadecenoic acid	اسید پالمیتولئیک	۱٦/٦۸±۰/۰٤۲	۸/۳٦±۰/۰۳۱	۲۳/٤٦±۰/۰٤٦
C18:0	Octadecanoic acid	اسید استئاریک	۰/۷۹±۰/۰۰۵	۰/٦٤±۰/۰۰٤	۱/۲۳±۰/۰۰۵
C18:1 n-9	9-Octadecenoic acid	اسید اولئیک	۱۱/۰۱±۰/۰۱۲	٤/۵±۰/۰۱٤	۱۵/۷±۰/۰۱٤
C18:2 n-6	9,12-Octadecadienoic acid	اسید لینولئیک	۱/۱۸±۰/۰۰	۰/۹۵±۰/۰۰۱	۲/۷۸±۰/۰۰۲
C18:3 n-3	9,12,15-Octadecatrienoic acid	اسید آلفا لینولئیک	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد	تشخیص داده نشد
C20:5 n-3	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	EPA	تشخیص داده نشد	۲/۵۱±۰/۰۰۳	۷/۰۵±۰/۰۰٤
جمع	–	–	٪۷۶/۲۱	٪۲۶/۹۷	٪۷۰/۶۱

بحث

اثر روش خشک نمودن زیست توده بر اسید چرب استخراج شده از میکروجلبک

روغن‌های گیاهی که اغلب جهت تولید بیودیزل استفاده می‌شوند عمدتا ۱۶ و ۱۸ کربن دارند (۲۳). در مطالعه Olofsson و همکارانش(۲۴) بر روی نانوکلروپسیس اوکولاتا و همچنین مطالعه Hu و Gao (۲۵) بر روی نانوکلروپسیس اسپیروژا، اسیدهای چرب مناسب جهت تولید بیودیزل، اسید مایریستیک (C۱۴:۰)، اسید پالمیتیک(C۱۶:۰)، اسید پالمیتولئیک(C۱۶:۱)، اسید استئاریک(C۱۸:۰) و اسید اولئیک(C۱۸:۱) معرفی شدند. در این مطالعه، نتایج آزمون واریانس یک طرفه و آزمون Tukey نشان داد که در هر سه روش خشک کردن زیست توده، اسید پالمیتیک و اسید پالمیتولئیک نسبت به سایر ترکیبات، بطور معناداری بیشترین ترکیب اسید چرب میکروجلبک را تشکیل می‌دهند($P<۰،۰۵$). مقایسه این دو ترکیب در میان سه روش خشک نمودن میکروجلبک نیز نشان داد که مقدار اسید پالمیتیک در روش لیوفیلیزه و روش فور بطور معناداری نسبت به روش دیگر بیشتر است. اما مقدار اسید پالمیتولئیک در میکروجلبک خشک شده در هوای آزاد به طور معناداری از دو روش دیگر بیشتر است. مقایسه جداول ۱ تا ۳ نشان داد نسبت اسید پالمیتولئیک به اسید پالمیتیک با افزایش دما ، کاهش می‌یابد به طوریکه در زیست توده خشک شده در هوای آزاد نسبت به زیست توده خشک شده در فور، به دلیل افزایش دما، این نسبت کاهش یافته و از ۱/۳۹۸ به ۰/۶۶ درصد رسیده است که با نتایج Kleinschmidt و همکارانش(۲۶) مطابقت دارد. Widjaja و همکارانش(۳) نیز در مطالعه‌ای که به اثر دمای خشک شدن بر روی استخراج لیپید از کلرلا ولگاریس انجام دادند به این نتیجه رسیدند که دمای $^{\circ}C$ ۶۰ باعث کاهش کمی در مقدار لیپید استخراج شده می‌شود اما با افزایش دما به $^{\circ}C$ ۸۰ یا بیشتر، مقدار لیپید به طور معناداری کاهش می‌یابد. دما می تواند بر روی الگو، مسیر و فعالیت متابولیسمی سلول میکروجلبک و در نتیجه ترکیب سلولی تاثیر گذارد(۲۷). همچنین نتایج به دست آمده نشان می‌دهد با توجه به اینکه بیشترین درصد اسید چرب در میکروجلبک خشک شده در هوای آزاد بدست آمده اما طولانی بودن زمان خشک

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 9:23 IRST on Sunday October 21st 2018

شدن یکی از معایب این روش بوده که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست. در حالیکه آماده سازی میکروجلبک به روش لیوفیلیزه در زمان کوتاه‌تری انجام شده، نیاز به شرایط ذخیره خاصی نداشته و به راحتی آبگیری انجام می‌شود(۹). روش لیوفیلیزه با افزایش سطح تماس نمونه، منجر به استخراج بهتر لیپید می‌گردد(۲۸). همچنین با توجه به اینکه میکروجلبک شامل محیط سلولی ویژه‌ای بوده که ضخیم است، به روش مناسب شکست سلولی قبل از استخراج لیپیدنیاز دارد. به همین دلیل، روش لیوفیلیزه به عنوان یکی از روش‌های مهم، در این زمینه مطرح است(۷).

اثرنوع حلال بر اسید چرب استخراج شده از میکروجلبک

در استخراج لیپید از میکروجلبک با استفاده از حلال دو مرحله عمده وجود دارد: یکی استخراج کامل و حل نمودن لیپید در حلال آلی، دیگری حذف اجزاء غیر لیپیدی در محلول استخراج شده. بازیابی حلال استفاده شده و نوع حلال نقش مهمی در راندمان استخراج لیپید و بازدهی اقتصادی فرآیند دارد(۷). حلال‌های گوناگون، انواع مختلف لیپید را در خود حل می‌نمایند که با توجه به ارتباط میان لیپید میکروارگانیسم و سایر اجزاء سلولی، ارتباط بین محیط لیپید و همزیستی حلال و همچنین مشخصات حلال مانند قطبیت و طول زنجیره مولکولی متفاوت است(۷). نتایج آزمون واریانس یک طرفه و انجام آزمون Tukey در بین حلال‌های مورد مطالعه نشان داد مقدار اسید پالمیتیک و اسید مایریستیک در ترکیب اسید چرب استخراج شده توسط دی اتیل اتر به طور معناداری نسبت به دو حلال دیگر بیشتر است ($P< ۰/۰۵$). همچنین مقدار اسید پالمیتولئیک، اسید استئاریک و اسید اولئیک در ترکیب اسید چرب استخراج شده توسط ان پنتان به طور معناداری نسبت به دو حلال دیگر بیشتر است ($P< ۰/۰۵$). این نتایج نشان داد قطبیت حلال استفاده شده، تاثیر معناداری بر روی بازدهی و ترکیب لیپید استخراج شده از میکروجلبک دارد. در این مطالعه از سه حلال آلی مختلف استفاده شد که دی اتیل اتر، حلال با قطبیت بالا و ان هگزان و ان پنتان حلال‌های غیر قطبی هستند. نتایج به دست آمده نشان داد همانند مطالعه Widjaja و همکارانش(۳) و مطالعه Ryckebosch و همکارانش(۹) بر روی نانوکلروپسیس سالینا، ان هگزان حلال مناسبی جهت استخراج لیپید از میکروجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا و تولید بیودیزل از آن نیست در حالی‌که در مطالعه‌ای که بر روی گونههای Botryccocus، کلرلاولگاریس و سندسموس انجام شد، حلال مخلوط هگزان/ایزوپروپانول نسبت به سایر حلال‌ها در دما و فشار گوناگون، نتایج بهتری نشان داد(۲۹). همچنین در مطالعه McNichol و همکارانش(۲۰)، نتایج حاصل از آزمایشات مربوط به استخراج به روش سوکسله و اثر قطبیت حلال بر روی بازدهی لیپید نشان داد که حلال‌های قطبی مانند کلروفرم / متانول، اتانول و استن بازدهی لیپید بالاتری نسبت به حلال‌های غیر قطبی مانند هگزان دارند. نقطه جوش حلال عامل دیگری است که در انتخاب حلال جهت استخراج لیپید زیست توده تاثیر می‌گذارد. در بین حلال‌های مورد مطالعه، دی اتیل اتر پایین‌ترین نقطه جوش را داشته و نسبت به دو حلال دیگر مزیت دارد.

اثر روش خشک نمودن زیست توده و نوع حلال بر تولید بیودیزل از میکروجلبک

با توجه به نتایج متفاوتی که از ترکیب اسید چرب در اثر روش‌های متفاوت خشک کردن زیست توده و نوع حلال به دست آمد، تفسیر این نتایج جهت تولید بیودیزل در قالب مقدار تری گلیسرید به دست آمده در هر روش معنادار است .زیرا روغن استخراج شده از میکروجلبک به شکل تری گلیسرید قابل تبدیل به بیودیزل است(۲۲). تری گلیسیرید در نانوکلروپسیس اوکولاتا شامل اسیدهای چرب اشباع و اسیدهای چرب غیر اشباع تک پیوندی بوده(۲۲) که در واکوئل سلول ذخیره شده (۲۴) و در برخی گونه‌های میکروجلبک، ۴۰ تا ۷۰ درصد وزن خشک زیست توده را تشکیل می‌دهد(۲۲). با توجه به نتایج به دست آمده در جداول ۱ تا ۳ و انجام آزمون واریانس یک طرفه و آزمون Tukey، مقدار تری گلیسرید در ترکیب اسید چرب میکروجلبک خشک شده در هوای آزاد و روش لیوفیلیزه که استخراج لیپید از آن به وسیله حلال دی اتیل اتر انجام شده، به طور معناداری بیشتر بوده و به ترتیب برابر ۷۶/۷۲ و ۷۵/۰۳ درصد اسید چرب است. در این مطالعه از سه دمای بالا (روش فور)، دمای متوسط (هوای آزاد) و دمای پایین (لیوفیلیزه) استفاده شد. بنابراین دما یکی از عوامل تاثیرگذار بر مقدارتری گلیسرید در ترکیب اسید چرب میکروجلبک و

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 9:23 IRST on Sunday October 21st 2018

تولید بیودیزل است(۳۰)، بطوریکه با افزایش دمای استخراج در روش فور، مقدار تری گلیسرید کاهش یافته است. علت این امر، اکسیداسیون تری گلیسرید در دمای بالا و در نتیجه تشکیل گروه‌های هیدروپروکسید (OOH^-) در زنجیره است که هیدروپروکسید تشکیل شده با آلدئیدها ،کتون‌ها و اسیدهای چرب واکنش بیشتری نشان می‌دهد(۳).

نتیجه‌گیری

روش خشک نمودن زیست توده به علت اثر دما بر ساختار سلولی میکروجلبک و نوع حلال به علت اثر بر روی ترکیب اسید چرب، از عوامل تعیین‌کننده در استخراج لیپید زیست توده میکروجلبک هستند. نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از روش لیوفیلیزه جهت آبگیری و خشک نمودن زیست توده و همچنین دی اتیل اتر به عنوان حلال جهت استخراج لیپید از زیست توده نانوکلروپسیس اوکولاتا نسبت به سایر روش‌های مورد مطالعه در این تحقیق بازدهی بالاتری داشته و در تحقیقات مربوط به تولید بیودیزل از لیپید میکروجلبک کارایی بیشتری خواهند داشت.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه با عنوان "پرورش میکروجلبک نانوکلروپسیس اوکولاتا در فتوبیوراکتور ستون حباب‌دار و تولید بیودیزل از آن در حضور کاتالیزور آنزیمی" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۱ و کد ۳۷۱ است که زیر نظر مرکز تحقیقات بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری این دانشگاه انجام یافته، بدینوسیله از مساعدت های آنان که هموارکننده انجام این پژوهش بوده است، سپاسگزاری می‌نماید.

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 9:23 IRST on Sunday October 21st 2018

منابع

1.Xin L, Hong-Ying H, Yu-Ping Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. Bioresource Technology. 2011;102(3):3098-102.

2.Gouveia L, Oliveira A. Microalgae as a raw material for biofuels production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2009;36(2):269-74.

3.Widjaja A, Chien CC, Ju YH. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2009;40(1):13-20.

4.Tran HL, Hong SJ, Lee CG. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from Botryococcus braunii LB 572 and Synechocystis sp. PCC 6803. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2009;14(2):187-92.

5.Xue F, Zhang X, Luo H, Tan T. A new method for preparing raw material for biodiesel production. Process Biochemistry. 2006;41(7):1699-702.

6.Lee JY, Yoo C, Jun SY, Ahn CY, Oh HM. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Bioresource Technology. 2010;101(1):S75-S77.

7.Wang C, Chen L, Rakesh B, Qin Y, Lv R. Technologies for extracting lipids from oleaginous microorganisms for biodiesel production. Frontiers in Energy. 2012;6(3):266-74.

8.Araujo GS, Matos LJBL, Fernandes JO, Cartaxo SJM, Gonçalves LRB, Fernandes FAN, et al. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. Ultrasonics Sonochemistry. 2013;20(1):95-98.

9.Ryckebosch E, Muylaert K, Foubert I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2012;89(2):189-98.

10.Huerlimann R, Rocky dN, Kirsten H. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. Biotechnology and Bioengineering. 2010;107(2):245-56.

11.Converti A, Casazza AA, Ortiz EY, Perego P, Del Borghi M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 2009;48(6):1146-51.

12.Srinivas R, Ochs C. Effect of UV-A irradiance on lipid accumulation in Nannochloropsis oculata. Photochemistry and Photobiology. 2012;88:684-89.

13.Uduman N, Qi Y, Danquah MK, Forde GM, Hoadley A. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. Journal of Renewable and Sustainable Energy. 2010;2(1):012701.

14.Tan T, Lu J, Nie K, Deng L, Wang F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. Biotechnology Advances. 2010;28(5):628-34.

15.Arai S, Nakashima K, Tanino T, Ogino C, Kondo A, Fukuda H. Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. Enzyme and Microbial Technology. 2010;46(1):51-55.

16.Umdu ES, Tuncer M, Seker E. Transesterification of Nannochloropsis oculata microalga's lipid to biodiesel on Al_2O_3 supported CaO and MgO catalysts. Bioresource Technology. 2009;100(11):2828-31.

17.Banerjee S, Hew WE, Khatoon H, Shariff M, Fatimah M. Growth and proximate composition of tropical marine Chaetoceros calcitrans and Nannochloropsis oculata cultured outdoors and under laboratory conditions. African Journal of Biotechnology. 2011;10(8):1375-83.

18.Sen B, Kocer M, Alp M, Erbas H. Studies on growth of marine microalgae in batch cultures: III. Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyta). Asian Journal of Plant Sciences. 2005;4(6):642-44.

19.Xin L, Hong-Ying H, Jia Y, Yin-Hu W. Enhancement effect of ethyl-2-methyl acetoacetate on triacylglycerols production by a freshwater microalga, Scenedesmus sp. LX1. Bioresource Technology. 2010;101(24):9819-21.

20.McNichol J, MacDougall KM, Melanson JE, McGinn PJ. Suitability of Soxhlet extraction to quantify microalgal fatty acids as determined by comparison with in situ transesterification. Lipids.

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 9:23 IRST on Sunday October 21st 2018

2012;47(2):195-207.
21. Durmaz Y. Vitamin E (α-tocopherol) production by the marine microalgae Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. Aquaculture. 2007;272(1–4):717-22.
22. Pal D, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Boussiba S. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by Nannochloropsis sp. Applied Microbiology and Biotechnology. 2011;90(4):1429-41.
23. Griffiths M, Harrison SL. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. Journal of Applied Phycology. 2009;21(5):493-507.
24. Olofsson M, Lamela T, Nilsson E, Bergé JP, del Pino V, Uronen P, et al. Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae Nannochloropsis oculata grown in outdoor large-scale photobioreactors. Energies. 2012;5(5):1577-92.
25. Hu H, Gao K. Response of growth and fatty acid compositions of Nannochloropsis sp. to environmental factors under elevated CO_2 concentration. Biotechnology Letters. 2006;28(13):987-92.
26. Kleinschmidt M, McMahon VA. Effect of growth temperature on the lipid composition of Cyanidium caldarium I. Class separation of lipids. Plant physiology. 1970;46(2):286-89.
27. Huang X, Huang Z, Wen W, Yan J. Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (Tetraselmis subcordiformis, Nannochloropsis oculata and Pavlova viridis). Journal of Applied Phycology. 2012:1-9.
28. Abu-Rezq T, Al-Musallam L, Al-Shimmari J, Dias P. Optimum production conditions for different high-quality marine algae. Hydrobiologia. 1999;403(0):97-107.
29. Boselli E, Velazco V, Fiorenza Caboni M, Lercker G. Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. Journal of Chromatography A. 2001;917(1):239-44.
30. Sandnes JM, Källqvist T, Wenner D, Gislerød HR. Combined influence of light and temperature on growth rates of Nannochloropsis oceanica: linking cellular responses to large-scale biomass production. Journal of Applied Phycology. 2005;17(6):515-25.

Survey of Solvent type and drying of biomass effects on lipid extraction from Nannochloropsis Oculata for biodiesel production

Mohammad Malakootian[1]*, Behnam Hatami[2], Shidvash dolatshahi[3], Ahmad Rajabzadeh[4]

[1]Environmental Health Engineering Research Center,Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
[2] Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
[3] Environmental Health Engineering Research Center,Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
[4] Environmental Health Engineering Research Center,Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

Received; 10 December 2012 Accepted; 18 February 2013

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 9:23 IRST on Sunday October 21st 2018

ABSTRACT

Background and Objectives: As a green fuel and environmentally friendly energy, biodiesel has recently attracted much attention and efforts are ongoing to optimizing biodiesel production from microalgae's. The aim of this study was to determine the appropriate method of dewatering and drying biomass and selecting a suitable organic solvent for extraction lipids from biomass.

Materials and Methods: After culturing Nannochloropsis Oculata in Gillard F/2 medium and reaching at the end of the stationary growth phase, algal biomass was separated from aqueous by centrifuge and drying in three methods: fore, air-dried and lyophilized. Lipid extractions of each sample was performed using soxhlet apparatus and three solvents including diethyl ether, n-hexane and n-pentane. At each stage, the quantity and quality of the extracted lipids was determined by gas chromatography.

Results: In all three drying methods, palmitic acid and palmitoleic acid were significantly the main fatty acid composition of microalgae. The fatty acid composition of palmitic acid extracted by diethyl ether was significantly more than the other two solvents. Maximum production of triglyceride was observed in air dried and lyophilized (using diethyl ether solvent) microalgae as 75.03 and 76.72 % of fatty acid respectively.

Conclusion: The use of lyophilized method for dewatering and drying of biomass and diethyl ether as solvent for the extraction of lipids from biomass yielded more compared with other methods studied in this paper and would be more efficient in research works related to the production of biodiesel from microalgae's lipid.

Keywords: Nannochloropsis Oculata, lipid, solvent, biomass, biodiesel

*Corresponding Author: m.malakootian@yahoo.com
Tel:-----*Fax*:------