اثر روش‌های مختلف استخراج لیپید از ریز جلبک نانوکلروپسیس (*Nannochloropsis oculata*) بر محتویات اسیدهای چرب

نورالدین حسین‌پور آزاد[1]*
محمدحسین ناصری[2]

۱. گروه علوم گیاهی و گیاهان دارویی، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی مشکین‌شهر، اردبیل، ایران.
۲. کارشناس ارشد علوم شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

***مسئول مکاتبات:**
Gmplant21@gmail.com

کد مقاله: ۱۴۰۰۰۳۰۹۱۴
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰
این مقاله پژوهشی و برگرفته از طرح پژوهشی است.

چکیده

در میان ارگانیسم‌های آبزی، ریز جلبک‌ها اساس زنجیره غذایی را در اکوسیستم‌های آبی تشکیل می‌دهند. سویه‌های ریز جلبک نانوکلروپسیس از منابع موردعلاقه روغن و اسیدهای چرب در صنایع مختلف هستند. طی زمستان (سال ۱۳۹۹)، تأثیر چهار روش ترکیبی مختلف رسوب‌دهی ریز جلبک از محیط کشت سوسپانسیونی و روش استخراج لیپید، ازجمله رسوب‌دهی با محلول کلرید آهن (III) و استخراج به روش گرم با دستگاه سوکسله در حلال ترکیبی کلروفرم- متانول (۲:۱) (B) و همچنین استخراج با حلال مشابه در شرایط سرد (A)، رسوب‌دهی با سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰rpm و استخراج لیپید با روش سوکسله و حلال کلروفرم- متانول (۲:۱) (D) و استخراج با حلال مشابه در شرایط سرد (C)، بر محتویات اسیدهای چرب ریز جلبک نانوکلروپسیس (*Nannochloropsis oculata*) موردبررسی قرار گرفت. آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) تعداد ۱۱ اسید چرب قابل‌شناسایی را تفکیک نمود که ۷ نوع از آن اسید چرب اشباع و ۴ نوع ازجمله اسیدهای چرب غیراشباع بودند. بیشترین مقدار لیپید (۷۳/۰۱ درصد) و اسیدهای چرب اشباع (۳۲/۶۱ درصد) به‌دست‌آمده مربوط به روش استفاده از رسوب‌دهی با کلرید آهن (III) به غلظت ۰/۳ مولار و استخراج با روش سوکسله و حلال کلروفرم- متانول (B)، و مناسب‌ترین روش جهت تفکیک اسیدهای چرب غیراشباع (۲۹/۶۳ درصد) مربوط به رسوب‌دهی با سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰rpm و استخراج لیپید با روش سوکسله و حلال کلروفرم- متانول (۲:۱) (D) بود. هرچند ضرورت دارد تحقیقات بیشتری انجام شود، اما با توجه به نتایج حاصل در این تحقیق، به‌کارگیری روش‌های بهینه‌شده در صنایع کشت و تبدیلی ریز جلبک‌ها، امکان افزایش بهره‌وری در تولید روغن و اسیدهای چرب را فراهم خواهد نمود.

واژگان کلیدی: نانوکلروپسیس، لیپید، اسید چرب، رسوب‌دهی، استخراج سرد.

مقدمه

ریز جلبک‌ها در سراسر جهان به‌عنوان منبع غذایی بالقوه خوراک دام، لوازم‌آرایشی و بهداشتی و دارویی در نظر گرفته می‌شوند که سرشار از اسیدهای چرب باارزش اشباع‌نشده همچون امگا۳ و امگا ۶ هستند (Wu *et al.*, 2017). محتویات متابولیتی ریز جلبک‌ها با دارا بودن فعالیت ضدالتهابی مؤثر در پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی، دارای اثرات مفیدی بر سلامتی انسان می‌باشند (Bellou *et al.*, 2014). گونه‌های نانوکلروپسیس معمولاً دارای میانگین پروتئین ۵۵-۵۰ درصد (Hulatt, *et al.*, 2017) و حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع با

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-06]

مقدار تا ۱۲ درصد از وزن خشک خود هستند (Ma *et al*., 2016). اگرچه این مقادیر می‌توانند با تغییر فاکتورهای رشدی همچون شدت نور و حرارت بهبود یابند (Adarme-Vega *et al*., 2012). برداشت ریز جلبک‌ها یکی از بخش‌های اصلی در فرایند تولید آن است که ۲۰ تا ۳۰ درصد از کل هزینه تولید را تشکیل می‌دهد (Sen Tan *et al*.,2020; Barros *et al*., 2015). به‌طورکلی، تمام تکنیک‌های برداشت باهدف برداشت حداکثری بیوماس ریز جلبک از محتویات سوسپانسیونی و حذف عوامل آسیب‌زننده به زیست‌توده جهت تسهیل در فرایندهای بعدی مانند استخراج متابولیت‌ها می‌باشد، تعداد متعددی از روش‌های برداشت ازجمله فیلتراسیون، سانتریفیوژ و لخته سازی و شناورسازی در صنایع کشت ریز جلبک استفاده می‌شود (Singh and Patidar, 2018). که در برخی شرایط ترکیب روش‌های مختلف جهت افزایش راندمان برداشت به کار گرفته می‌شوند. دو نوع عمده از عوامل لخته کننده به‌صورت شیمیایی و زیستی وجود دارند که به‌طور عمده معمولاً لخته کننده‌هایی مانند نمک‌های آهن و آلومینیوم به‌طور گسترده در صنعت استفاده‌شده است (Bracharz *et al*., 2018). مطالعات توسط محققین نشان داده است که نمک‌های فلزی مانند آلومینیوم سولفات و کلرید آهن قادر به رسوب‌دهی ۹۵ درصد از سلول‌های ریز جلبک در شرایط استاندارد هستند (Chatsungnoen and Chisti, 2016). علاقه زیاد به ترکیب لیپید ریز جلبک به محصولات غذایی و تقاضا برای استفاده از آن به‌عنوان مکمل غذایی برای تغذیه و صنایع دارویی موجب شده که از روش‌های سازگاربامحیط‌زیست در استخراج این‌گونه لیپیدها استفاده شود. در میان این حلال‌ها، دی‌اکسید کربن فوق بحرانی(scCO2) به‌عنوان یک جایگزین سبز، پایدار و سازگاربامحیط‌زیست به‌عنوان حلال‌های آلی برای استخراج لیپیدها از چندین ریز جلبک همچون *N. salina* (Solana *et al*., 2014) و *N. oculata* (Feller *et al*., 2018)، استفاده‌شده است. این روش برای استخراج لیپیدهای خنثی مانند تری اسیل گلیسرول (TAGs) که دارای مقادیر کمتری از اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه می‌باشند مناسب نبوده (Chua and Schenk, 2017)، درحالی‌که استخراج با حلال‌های آلی استخراج لیپیدهای قطبی استری‌شده به اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه و یا پیوند شده به امگا ۳ را امکان‌پذیر می‌سازد (Servaes *et al*., 2015). ریز جلبک نانوکلروپسیس ازجمله ریز جلبک‌های آب‌های شور بوده و این ویژگی آماده‌سازی بستر کشت را بدون نیاز به هزینه املاح زدایی از آب مورداستفاده برخلاف دیگر ریز جلبک‌ها امکان‌پذیر می‌سازد، هم‌چنین داشتن مقادیر لیپید بالا، گونه‌های ریز جلبک نانوکلروپسیس را موردتوجه صنایع نموده است، به همین دلیل انجام تحقیقات درزمینه تسهیل سرمایه‌گذاری درکشت این نوع از ریز جلبک‌ها و بالا بردن راندمان تولید ضروری به نظر می‌رسد، در تحقیق حاضر به بررسی اثر روش‌های مختلف رسوب‌دهی و اثر روش‌های استخراج لیپید از ریز جلبک نانوکلروپسیس (*Nannochloropsis oculata*) بر محتویات اسیدهای چرب پرداخته‌شده است.

مواد و روش‌ها

در زمستان سال ۱۳۹۹، نمونه‌های ذخیره‌شده ریز جلبک در آزمایشگاه فایکولب پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان (شهر ساری) جهت شناسایی دقیق و تخلیص از آلودگی با دیگر سویه‌های ریز جلبکی به کشت جامد مختص ریز جلبک انتقال داده شدند (Haoujar *et al*., 2020). به میزان ۱۵۰۰ میکرو لیتر از نمونه‌های ریز جلبکی برداشت‌شده و بر روی محیط کشت آگار جامد در ظروف کشت به‌طور یکسان پخش‌شده وجهت رشد در دمای ۲۵ ± ۲ °C در اتاقک رشد قرار داده شدند (Brahamsha, 1996). در این تحقیق از محیط کشت والن به‌عنوان محیط مغذی (Andersen, 2005)، و از آب دریای خزر با غلظت شوری ۱۳-۱۲ گرم بر لیتر پس از ضدعفونی با محلول کلرین ۷۰ درصد جهت آماده‌سازی بستر محیط کشت استفاده گردید (Garoma and Yazdi, 2019). بدین ترتیب که مقدار ۵ لیتر از آب ضدعفونی شده در ظرف‌های پلاستیکی به حجم ۸ لیتر ریخته شده و به هریک از آن‌ها ۲۵ درصد حجمی از محیط کشت والن به‌عنوان مواد غذایی موردنیاز رشد سلولی ریز جلبک‌ها اضافه گردیده، سپس تمامی محیط‌ها به سیستم هوادهی مداوم با پمپ هوا متصل گردیده و در زیر نور با شدت ۱۷۰۰ لوکس قرار داده

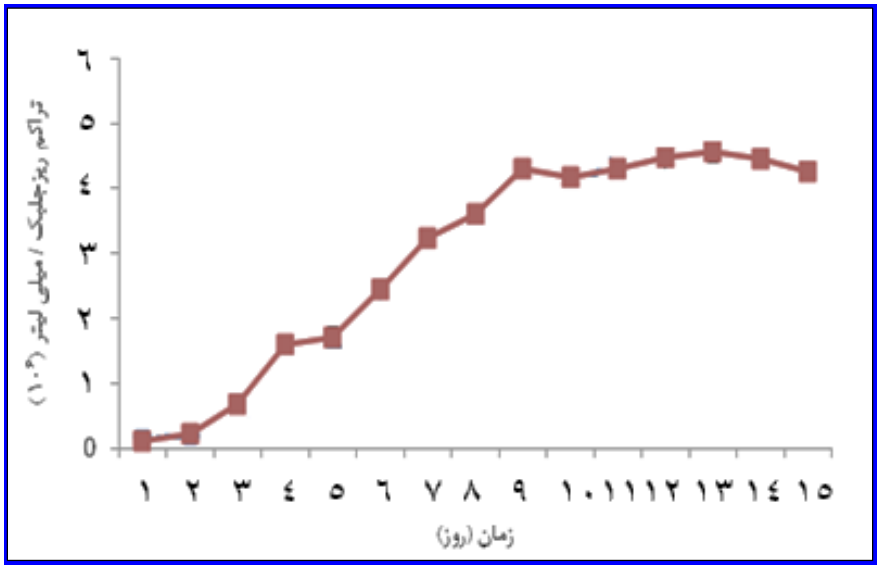
[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-06]

شدند (Sun *et al.*, 2016). ارزیابی باروری محیط‌های کشت پس از تلقیح با ریز جلبک‌ها و روند رشد سلولی با استفاده از روش سنجش تراکم سلولی در واحد حجم از محیط‌های کشت با به‌کارگیری روش اسپکتروفتومتری در طول‌موج ۶۸۴ نانومتر در هر ۲۴ ساعت تا روز سیزدهم که مصادف با شروع دوره رشدی کمون بود صورت گرفت (Vesile and Mete, 2020 ؛Dökümcüoğlu and Yılmaz, 2020). در مرحله برداشت توده سلولی ریز جلبک‌ها و استخراج لیپید به جهت تخلیص توده‌های ریز جلبک رشد یافته از محیط کشت سوسپانسیونی و استخراج لیپید از چهار روش ترکیبی مجزا استفاده شد، در روش اول (A) رسوب‌دهی با محلول کلرید آهن (III) به غلظت ۰/۳ مولار و استخراج لیپید به روش سرد و به نسبت حجمی از حلال کلروفرم- متانول (۲:۱)، در روش دوم (B) رسوب‌دهی با محلول کلرید آهن (III) به غلظت ۰/۳ مولار و استخراج لیپید با روش سوکسله و حلال کلروفرم- متانول (2:1)، در روش سوم (C) رسوب‌دهی با سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰rpm و استخراج لیپید به روش سرد و به نسبت حجمی از حلال کلروفرم- متانول (۱ : ۲) و در روش چهارم (D) رسوب‌دهی با سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰rpm و استخراج لیپید با روش سوکسله و حلال کلروفرم- متانول (۱: ۲) انجام‌شده و درصد لیپید برای هر یک از نمونه‌ها محاسبه گردید (AOCS, 1997). لیپیدهای استخراج‌شده از هر چهار روش مورداستفاده ابتدا قبل از تزریق در دستگاه کروماتوگرافی گازی به روش زیر جهت حذف گلیسرول و سنتز متیل استر اسیدهای چرب بکار گرفته شدند. از روغن استخراج‌شده، ۱۵ قطره درون لوله‌آزمایش درب پیچ‌دار ریخته شده و مقدار ۷ میلی‌لیتر حلال ان-هگزان به آن افزوده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از پتاس متانلی ۲ مولار به آن اضافه و درب لوله‌آزمایش را بسته و به مدت ۶۰ ثانیه با شیکر، محتویات لوله‌ها شدیداً مخلوط شدند. سپس لوله‌آزمایش درون بن ماری با دمای ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده‌شده در این مدت، هر ۵ دقیقه یک‌بار محتویات لوله بهم‌زده شد. پس از تشکیل دو فاز متفاوت در لوله‌ها از فاز بالایی (فاز هگزان) مقدار موردنیاز را برداشته و درون لوله فالکنی ریخته شد. برای حذف رطوبت‌های جزئی احتمالی، مقدار کمی سولفات سدیم انیدر به محلول اضافه کرده و هم زده شد. درنهایت محلول را صاف‌کرده و درون ویال شیشه‌ای درب‌داری ریخته شد، این محلول آماده تزریق به دستگاه گاز کروماتوگراف می‌باشد (AOCS, 1997). جهت تفکیک و شناسایی اسیدهای چرب ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول متیل استر آماده‌شده در دستگاه کروماتوگرافی مدل TraceGC شرکت ThermoFinigan ساخت کشور ایتالیا با شرایط، آون: دمای ۵۰ درجه به مدت یک دقیقه/ افزایش دما با شیب ۱۰ درجه در دقیقه تا دمای ۱۸۷ درجه و مدت‌زمان توقف در این دما ۳۵ دقیقه، دمای انژکتور: ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد/ تزریق ۱ میکرو لیتر به روش Split با نسبت ۴۰ (Split ratoio)، سرعت گاز حامل (نیتروژن): ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه، شرایط دتکتور FID: گاز هیدروژن ۳۵ میلی‌لیتر در دقیق/ هوا ۳۵۰ میلی‌لیتر در دقیقه/ گاز جبرانی (نیتروژن) ۵۰ میلی‌لیتر در دقیقه، دمای دتکتور ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد و مشخصات ستون: BPX-70, 60 m, id: 0.25 mm, df:0.25 µm، تزریق گردید. داده‌های حاصله از آزمایش از طریق نرم‌افزار آماری با نرم‌افزار GenStat 12.1 و هم‌چنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون t-test در سطح احتمال پنج درصد (P< ۰/۰۵) انجام شد.

نتایج

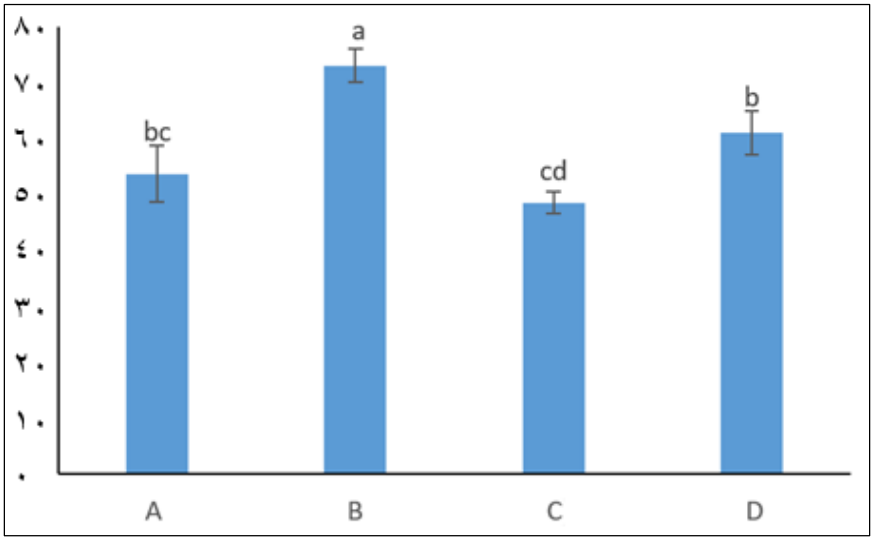
در طول دوره رشدی در فاز تکثیر همبستگی بین چگالی نوری اندازه‌گیری شده در طول‌موج ۶۸۴ نانومتر و میزان غلظت سلولی با شمارش سلول‌ها در واحد سطح با لام هماسیتومتر تعیین گردید (شکل ۱). همان‌طور که مشخص است دوره رشد نمایی ریز جلبک در محیط کشت والن از روز دوم تلقیح شروع‌شده و در روز نهم دوره رشدی به پایان رسیده است و به دنبال آن در روز دهم وارد فاز رشدی سکون شده که عملاً در این مرحله به تراکم سلولی ریز جلبک اضافه نشده و نهایتاً بعد از روز سیزدهم دوره مرگ سلولی فرارسیده‌است، به همین دلیل رسوب‌دهی سلولی در ابتدای فاز سکون (روز دهم) انجام پذیرفت (شکل ۱).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-06]



شکل ۱: اندازه‌گیری غلظت سلولی نانوکلروپسیس (*Nannochloropsis oculata*) در محیط کشت به روش هماسیتومتر (سال ۱۳۹۹).

بیشترین مقدار لیپید استخراج‌شده مربوط به نمونه (B) (استفاده از روش رسوب‌دهی با کلرید آهن (III) به غلظت ۰/۳ مولار و استخراج لیپید با روش سوکسله و حلال کلروفرم- متانول) بود (شکل ۲).



شکل ۲: مقایسه میانگین درصد لیپید با روش‌های استخراج و رسوب‌دهی متعدد با آزمون t-test در سطح احتمال پنج درصد (P< ۰/۰۵) (سال ۱۳۹۹).

(محور عمودی: درصد لیپید، محور افقی: A: رسوب‌دهی با محلول کلرید آهن (III) و استخراج به روش سرد، B: رسوب‌دهی با محلول کلرید آهن (III) و استخراج به روش گرم، C: رسوب‌دهی با سانتریفیوژ و استخراج با روش سرد، D: رسوب‌دهی با سانتریفیوژ و استخراج به روش گرم).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-06]

از تعداد 11 اسید چرب قابل‌شناسایی در هر یک از تیمارها ۷ اسید چرب اشباع و ۴ عدد غیراشباع می‌باشند. بیشترین درصد اسیدهای چرب غیراشباع در تمامی نمونه‌ها لینولایدیک اسید و برای اسیدهای چرب اشباع در نمونه‌های (A, B, C) کاپروئیک اسید و برای نمونه (D) پالمیتیک اسید بود. بیشترین میزان اسیدهای چرب غیراشباع با یک باند مضاعف و چندین باند مضاعف برای نمونه‌های (D) مشاهده گردید. یافته‌های جدول ۱ نشان‌دهنده کارایی روش رسوب‌دهی با سانتریفیوژ و استخراج به روش سوکسله را در ارتباط با میزان استخراج اسیدهای چرب غیراشباع را نشان داد (جدول ۱) .

در نمودار ۳ مقادیر اسیدهای چرب شناسایی شده به تفکیک روش‌های رسوب‌دهی و استخراج نشان داده‌شده است، ساختار اسیدهای چرب با شش کربن که مربوط به کاپروئیک اسید شروع‌شده و در اسید چرب آلفالینولنیک ۱۸ کربنه به اتمام رسیده است، در بین اسیدهای چرب اشباع بالاترین مقدار مربوط به اسید چرب شش کربنه کاپروئیک اسید بوده که طریق روش (B) حاصل گردیده است، کمترین میزان اسید چرب اشباع شناسایی‌شده برای اسید چرب ۱۴ کربنه میریستیک بود، همان‌گونه که در نمودار ۳ مشخص است بیشترین میزان اسید چرب غیراشباع شناسایی‌شده مربوط به اسید چرب ۱۸ کربنه لینوالایدیک اسید به دست آمد (شکل ۳).

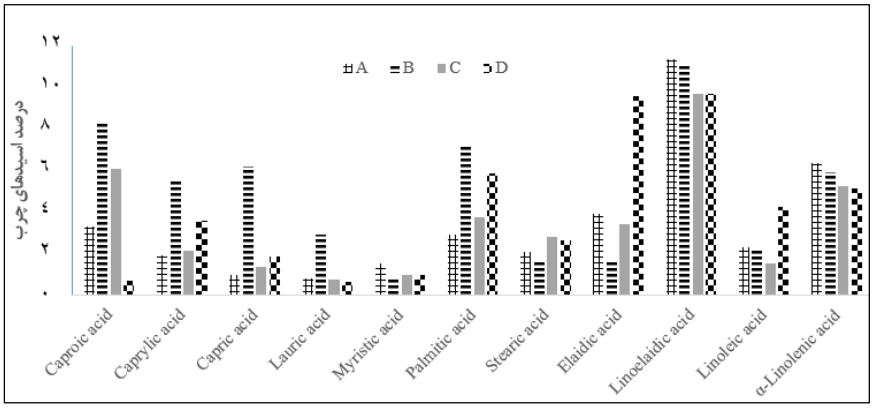
جدول ۱: ترکیب اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع نانوکلروپسیس (*Nannochloropsis oculata*) تغذیه‌شده با محیط کشت والن (سال ۱۳۹۹).

(A: رسوب‌دهی با محلول کلرید آهن (III) و استخراج به روش سرد، B: رسوب‌دهی با محلول کلرید آهن (III) و استخراج به روش گرم، C: رسوب‌دهی با سانتریفیوژ و استخراج با روش سرد، D: رسوب‌دهی با سانتریفیوژ و استخراج به روش گرم، Rt: زمان بازداری).

No.	Fatty acid	Common Name	(A)	(B)	(C)	(D)	Rt
۱	C6:0	Caproic acid	۳/۲۹ ± ۰/۷	۸/۳۲ ± ۰/۳۸	۶/۱۰ ± ۰/۱۶	۰/۶۶ ± ۰/۰۲	۸/۱۹
۲	C8:0	Caprylic acid	۱/۸۹ ± ۰/۶	۵/۴۶ ± ۰/۳۸	۲/۱۱ ± ۰/۰۱	۳/۶۰ ± ۰/۰۶	۱۰/۳۹
۳	C10:0	Capric acid	۰/۹۹ ± ۰/۵	۶/۲۰ ± ۰/۱	۱/۳۳ ± ۰/۰۱	۱/۸۷ ± ۰/۳	۱۲/۷۵
۴	C12:0	Lauric acid	۰/۸۲ ± ۰/۵	۲/۹۰ ± ۰/۳۶	۰/۷۵ ± ۰/۰۳	۰/۶۳ ± ۰/۱۱	۱۴/۶۶
۵	C14:0	Myristic acid	۱/۵۴ ± ۰/۶	۰/۸۷ ± ۰/۴	۰/۹۶ ± ۰/۰۳	۰/۹۵ ± ۰/۰۱	۱۷/۳۲
۶	C16:0	Palmitic acid	۲/۹۲ ± ۰/۷	۷/۱۹ ± ۰/۰۳	۳/۷۳ ± ۱/۲۹	۵/۸۵ ± ۱/۰۲	۲۱/۸۶
۷	C18:0	Stearic acid	۲/۰۹ ± ۰/۹	۱/۶۳ ± ۰/۶	۲/۷۹ ± ۰/۳۱	۲/۶۵ ± ۰/۷۵	۲۹/۲۶
۸	C18:1t	Elaidic acid	۳/۸۹ ± ۰/۶	۱/۶۰ ± ۰/۰۲	۳/۴۱ ± ۱/۵۱	۹/۵۸ ± ۰/۹۱	۳۱/۱۱
۹	C18:2t	Linoelaidic acid	۱۱/۳۷ ± ۱/۰	۱۱/۱۵ ± ۰/۷۶	۹/۷۱ ± ۰/۲۲	۹/۶۷ ± ۰/۰۸	۳۳/۵۶
۱۰	C18:2c	Linoleic acid	۲/۲۹ ± ۰/۳	۲/۱۵ ± ۰/۰۲	۱/۵۲ ± ۰/۰۴	۴/۲۲ ± ۰/۵۲	۳۴/۷۸
۱۱	C18:3	α-Linolenic acid	۶/۳۵ ± ۰/۷	۵/۸۹ ± ۰/۳۱	۵/۲۴ ± ۱/۰۲	۵/۱۵ ± ۰/۳۳	۳۹/۹۷
کل		(٪) کل روغن در ۱۰۰ میلی‌گرم	۵۳/۷۲	۷۳/۱	۴۸/۵۲	۶۱/۰۳	-
		اسیدهای چرب اشباع	۱۳/۵۶	۳۲/۶۱	۱۷/۸۱	۱۶/۲۴	-
		اسیدهای چرب غیراشباع با یک باند مضاعف	۳/۸۹	۱/۶۱	۳/۴۲	۹/۵۸	-
		اسیدهای چرب غیراشباع با چندین باند مضاعف (لینولایدیک، لینولئیک و آلفا لینولنیک اسید)	۲۰/۰۳	۱۹/۲	۱۶/۵	۲۰/۰۵	-

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-06]

No.	Fatty acid	Common Name	(A)	(B)	(C)	(D)	Rt
		اسیدهای چرب غیراشباع (الایدیک، لینولایدیک، لینولئیک و آلفا لینولنیک اسید)	۲۳/۹۲	۲۰/۸۱	۱۹/۹۲	۲۹/۶۳	-
		با یک باند –/ چرب غیراشباع با چندین باند مضاعف	۵/۱۵	۱۱/۹۲	۴/۸۲	۲/۰۹	-
		لینولئیک – آلفا/ لینولئیک	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۲۹	۰/۸۱	-
		اشباع / غیراشباع با یک باند	۰/۲۸	۰/۰۵	۰/۱۹	۰/۵۹	-
		اشباع / غیراشباع با چند باند	۱/۴۸	۰/۵۹	۰/۹۳	۱/۲۳	-
		اشباع / کل غیراشباع	۱/۷۶	۰/۶۴	۱/۱۲	۱/۸۲	-



شکل ۳: مقایسه مقادیر اسیدهای چرب شناسایی‌شده از لیپیدهای حاصله از به‌کارگیری روش‌های رسوب‌دهی و استخراج (سال ۱۳۹۹).

(A: رسوب‌دهی با محلول کلرید آهن (III) و استخراج به روش سرد، B: رسوب‌دهی با محلول کلرید آهن (III) و استخراج به روش گرم، C: رسوب‌دهی با سانتریفیوژ و استخراج با روش سرد، D: رسوب‌دهی با سانتریفیوژ و استخراج به روش گرم).

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق از روش‌های سانتریفیوژکردن و لخته سازی با نمک کلرید آهن ($FeCl_3$) جهت برداشت توده سلولی ریز جلبک استفاده شد. امروزه سعی بر آن است که لخته کننده‌های زیستی به دلیل سازگاری با محیطزیست و عدم نیاز به فرایندهای شستشو بعد از لخته سازی جایگزین روش‌های شیمیایی شوند (Nguyen, *et al*., 2019؛ Rinanti and Purwadi, 2018). کیتوزان و بیو پلیمرهایی همچون اسید اکریلیک ازجمله لخته کننده‌های زیستی بوده که با غلظت‌های کم قادر به بازیابی ۹۰ درصد از توده‌های سلولی ریز جلبک هستند (Pugazhendhi, *et al*., 2019؛ Zhu and Hiltunen, 2018). به دلیل اینکه در ابتدای فاز سکون محیط کشت با فقر غذایی مواجه می‌شود، این عامل به‌عنوان شوک محیطی برای ریز جلبک به‌حساب آمده و در واکنش به آن مقداری از متابولیت‌های ذخیره‌شده را جهت مقابله با تنش مصرف می‌نماید (Coulombier *et al*., 2021)، به همین دلیل معمولاً رسوب‌دهی را قبل از شروع دوره سکون که تراکم سلولی ثابت‌شده انجام می‌دهند. در تحقیق حاضر علاوه بر استفاده از عمومی‌ترین روش رسوب‌دهی که روش سانتریفیوژ با صرف هزینه انرژی بالایی همراه است، بهینه‌ترین و

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-06]

کاراترین مقدار نمک کلرید آهن ۳ پس از آزمایش‌ها متعدد و به‌کارگیری غلظت‌های مختلف به مقدار ۰/۳ مولار به‌عنوان دیگر روش انتخاب گردید، این مقدار پایین‌ترین سطح از این نمک بود که دارای کارایی بالا در رسوب‌دهی و عدم نیاز به شستشوی بیوماس حاصله در پایان مرحله رسوب‌دهی بود. این نمک با حذف بارهای الکتریکی سطح سلولی ریز جلبک‌ها منجر به تشکیل توده سلولی بزرگ‌تر و ته‌نشینی به‌وسیله نیروی گرانشی می‌گردد (Zhu *et al*., 2020). ریز جلبک‌ها به دلیل داشتن محتویات سلولی غنی از لیپید شناخته‌شده هستند که میزان لیپید آن‌ها با توجه به محتویات غذایی آن‌ها تا ۸۰ درصد قابل‌افزایش است (Chisti, 2007). به‌طورکلی لیپیدهای مشتق شده از ریز جلبک‌ها دو کاربرد عمده دارند یکی استفاده از آن‌ها به‌عنوان سوخت زیستی سازگار با محیط و دیگری استفاده از مشتقات اسیدهای چرب محتویات روغن به‌عنوان سنتز انواع مکمل‌های غذایی است (Kings, 2017). میانگین لیپید کل استخراج‌شده با روش‌های بکار گرفته‌شده در این تحقیق با میزان لیپید گزارش‌شده با روش‌های معمول بین ۴۰-۷۰ درصد محاسبه‌شده با دیگر یافته‌ها مطابقت داشت (Obeid *et al*., 2018). بیشترین مقدار لیپید به‌دست‌آمده مربوط به روش رسوب‌دهی استفاده از نمک کلرید آن و استخراج گرم با دستگاه سوکسله در حضور حلال ترکیب کلروفرم- متانول (روش B) بود. درواقع، استخراج با کمک حلال گرم برای افزایش کارایی و راندمان بکار گرفته می‌شود به این دلیل که گرما با ایجاد سیالیت در دیواره‌های سلولی اثر حلال را تسهیل می‌کند، و حلال به سلول نفوذ کرده و اجازه می‌دهد محصول درون‌سلولی آزادشده و میزان استخراج چربی را تا حد زیادی بهبود می‌بخشد (Milledge and Heaven, 2013). همچنین حلال‌های کلروفرم و متانول با دارا بودن ضریب دی‌الکتریک از ۴/۸ تا ۳۲/۶ امکان استخراج انواعی از لیپیدها با بار الکتریکی مختلف را فراهم می‌نمایند (Melo *et al*., 2021). قطبیت بالای متانول با توانایی بالا در نفوذ به غشای سلولی ریز جلبک‌ها همراه بوده و بنابراین قادر به استخراج چربی‌ها با کارایی بالا می‌باشد. مجموعه این عوامل منجر به کارایی روش (B) در استخراج لیپید گردیده است، اما در مقابل روش رسوب‌دهی با سانتریفیوژ و استخراج به روش سرد (روش C) دارای حداقل کارایی در استخراج لیپید بوده است، احتمال دارد در استفاده از روش سانتریفیوژ جهت رسوب‌دهی، علاوه بر سلول‌های ریز جلبک تمامی محتویات جامد موجود در سوسپانسیون محیط کشت طی روند شیب چگالی رسوب یافته و بیوماس حاصله دارای ناخالصی‌های غیر جلبکی باشد و این مسئله با در نظر گرفتن نسبت لیپید حاصله به وزن بیوماس استفاده‌شده، محاسبه درصد روغن را با افت مواجه نموده است. در صورتی که درروش رسوب‌دهی بانمک کلرید آهن صرفاً بیوماس حاصله حاوی سلول‌های ریز جلبکی با بارهای خنثی‌شده در سطح سلول‌های خود هستند. در بررسی میزان اسیدهای چرب تفکیک‌شده در روش‌های بکار گرفته‌شده، درروش (B) بالاترین میزان اسیدهای چرب اشباع و درروش استفاده از رسوب‌دهی با سانتریفیوژ و استخراج با روش سوکسله (روش D) بالاترین میزان در نسبت‌های مختلف اسیدهای چرب غیراشباع حاصل گردید. احتمالاً عنصر آهن (Ⅲ) استفاده‌شده میزان الحاق اسیدهای چرب غیراشباع را در گروه‌های عاملی گلیسرول افزایش داده و منجر به سنتز تری آسیل گلیسرول‌های غیراشباع شده باشد. گزارش‌های متعددی در منابع علمی در مورد اثرات تحریک‌کننده یون‌های فلزی بر تولید بیوماس یا چربی در میکروارگانیسم‌ها وجود دارد. در تحقیقی سلول‌های ریز جلبک در مرحله ابتدایی از دوره رشد سکون با استفاده از سانتریفیوژ جمع‌آوری‌شده و مجدداً در محیط کشت جدید که با ۵ غلظت از آهن (Ⅲ) تیمار شده بود تلقیح گردیدند. نتایج نشان‌دهنده افزایش میزان چربی کل و افزایش ۳-۷ برابری بیوماس ریز جلبک نسبت به شرایط شاهد و کشت بدون به‌کارگیری عنصر آهن بود (Zhi *et al*., 2008). هم‌چنین به دلیل اینکه رسوب‌دهی ریز جلبک در مرحله انتهایی رشد نمایی صورت می‌گیرد یعنی درزمانی که عملاً مواد غذایی محیط کشت به اتمام رسیده و سلول‌ها دیگر رشدی ندارند و ورود موادی همچون کلرید آهن به محیط کشت به‌مانند عامل تنش برای سلول‌های ریز جلبک تلقی شده و ریز جلبک را وادار به استفاده از مکانیسم‌های دفاعی خود هم چون تولید اسیدهای چرب خواهد نمود. زمانی که رشد ریز جلبک کاهش پیدا می‌کند و دیگر ماده‌ای برای سنتز ترکیبات جدید برای آن‌ها وجود ندارد، سلول‌های ریز جلبک در عوض اسیدهای چرب را به‌صورت تری اسیل گلیسرول (TAG) ذخیره می‌کنند. به عبارتی سلول‌های ریز جلبک تحت شرایط کمبود مواد مغذی، به‌عنوان یک مکانیزم دفاعی، TAG را افزایش می‌دهند تا از خود محافظت کنند (Sharma *et al*., 2012). در اغلب مشاهدات، دگرگونی در اسیدهای چرب غیراشباع به دلیل تغییر در لیپیدهای غشایی که به دنبال یک شیب دمایی رخ

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-06]

می‌دهد، می‌باشد. ثابت‌شده است هنگامی‌که سیالیت غشا در دمای پایین کاهش پیدا می‌کند، افزایش اسیدهای چرب غیراشباع یک مکانیزم تطبیق‌دهنده در برابر تغییرات محیطی می‌باشد (Sharma *et al*., 2012).

همان‌طور که در این تحقیق مشاهده شد، رسوب‌دهی ریز جلبک از محیط کشت با کلرید آهن(III) و استخراج لیپیدها با روش سوکسله و حلال کلروفرم- متانول کارایی بالایی در استخراج لیپیدهای با محتویات اسیدهای چرب اشباع را داشته، و رسوب‌دهی ریز جلبک‌ها با به‌کارگیری سانتریفیوژ و سپس استخراج لیپید با روش سوکسله و حلال کلروفرم- متانول بیشترین بازدهی را جهت استخراج اسیدهای چرب غیراشباع را دارد. نتایج حاصل‌شده نشان دادند که روش‌های رسوب‌دهی و به دنبال آن استخراج لیپید از ریز جلبک‌ها تأثیر مستقیمی بر میزان اسیدهای چرب در ترکیب لیپیدها داشته و بر اساس نوع هدف در دستیابی به انواع اسیدهای چرب بایستی روش مناسب‌تری برای رسوب‌دهی و استخراج لیپیدها بکار گرفته شود.

منابع

Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K. Y., Timmins, M. F., Vernen, Y. and Schenk, P. M., 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fattyacid production, Microbial Cell Factories, 11: 96.

Andersen, R. A., 2005. Algal culturing techniques, Elsevier Academic Press, pp: 1- 578.

AOCS., 1997. Preparation of Methyl Esters of Fatty acids, Official Method Ce 66, 5th edit.

Barros, A. I., Gonçalves, A. L. and Simões, M., 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: a review. Renewable and Sustainable Energic Review, 41: 1489–1500.

Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D. F. and Sayegh, G., 2014. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives, Biotechnol. Adv, 32(8):1476-93.

Brahamsha, B. A., 1996. genetic manipulation system for oceanic cyanobacteria of the genus Synechococcus. Applied and Environmental Microbiology. 62 (5): 1747–1751.

Bracharz, F., Helmdach, D., Aschenbrenner, I., Funck N., Wibberg, D., Winkler, A., Bohnen, F., Kalinowski, J., Mehlmer, N. and Brück, T. B., 2018. Harvest of the Oleaginous Microalgae *Scenedesmus obtusiusculus* by Flocculation From Culture Based on Natural Water Sources. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 6: 200.

Chatsungnoen, T. and Chisti, Y., 2016. Harvesting microalgae by flocculation– sedimentation. Algal Research, 13: 271–283.

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advaces. 25(3): 294–306.

Chua, E. T. and Schenk, P. M., 2017. A biorefinery for Nannochloropsis: induction, harvesting, and extraction of EPA-rich oil and high-value protein, Bioresource. Technology. 244 (2): 1416-1424.

Coulombier, N., Jauffrais, T. and Lebouvier, N., 2021. Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. Marine Drugs, 19(10): 549.

Dökümcüoğlu, V. E. and Yılmaz, M., 2020. Assessment of Cell Counting Method Based on Image Processing for a Microalga Culture, MedFAR, 3(2): 75-81.

Feller, R., Matos, A. P., Mazzutti, S., Moecke, E. H. S., Tres, M. V., Derner, R. B., Oliveira, J. V. and Junior, A. F., 2018. Polyunsaturated Ω- ۳and Ω-6 fatty acids, total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO۲and subcritical n-butane, Journal of Supercritical Fluids, 133: 437-443.

Garoma, T. and Yazdi, E. R., 2019. Investigation of the disruption of algal biomass with chlorine. BMC Plant Biology, 19:18.

Hulatt, J. C., Wijffels, H. R., Bolla, S. and Kiron, V., 2017. Production of Fatty Acids and Protein by *Nannochloropsis* in Flat-Plate Photobioreactors. PLos One, 12(1): e0170440.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-06]

Haoujar, I., Cacciola, F., Manchado, M., Abrini, J., Haoujar, M., Chebbaki, K., Oteri, M., Rigano, F., Mangraviti, D., Mondello, L., Essafi, A., Chairi, H. and Skali Senhaji, N., 2020. Isolation of Microalgae from Mediterranean Seawater and Production of Lipids in the Cultivated Species. Foods, 9 (11): 1601.

Kings, A. J., Raj, R. E., Miriam, L. R. M., andVisvanathan, M. A., 2017. Cultivation, extraction and optimization of biodiesel production from potential microalgae Euglena sanguinea using eco-friendly natural catalyst. Energy Convers Manag.141: 224–235.

Ma X.N., Chen, T.P., Yang, B., Liu, J., Chen, F., 2016. Lipid production from Nannochloropsis, Marine Drugs, 14(4):61.

Melo, T., Ana, R.P., Figueiredo, E. C., Couto, D., Joana S., Domingues, M. R. and Pedro D., 2021. Ethanol Extraction of Polar Lipids from Nannochloropsis oceanica for Food, Feed, and Biotechnology Applications Evaluated Using Lipidomic Approaches. Marine Drugs, 19 (11): 593.

Milledge, J. J. and Heaven, S., 2013. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. Rev Environ Sci Biotechnol. 12(2):165–178.

Nguyen, T. D. P., Le, T. V. A., Show, P. L., Thanh, T. N., Minh, H. T. and Thi, N. T. T. and Sze, Y. L., 2019. Bioflocculation formation of microalgae-bacteria in enhancing microalgae harvesting and nutrient removal from wastewater effluent. Bioresource Technology, 272: 34–39.

Obeid, S., Beaufils, N., Camyd, S., Takache, H., Ismail, A. and Pontaliera, P. Y., 2018. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of lipids from freeze-dried microalgae Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris. Algal Research- Biomass, Biofuels and Bioproducts, 34: 49–56.

Pugazhendhi, A., Shobana, S., Bakonyi, P., Nándor, N., Ao, X., Rajesh, B. J. and Gopalakrishnan, K., 2019. A review on chemical mechanism of microalgae flocculation via polymers. Biotechnology Reports, 21: e00302.

Rinanti, A. and Purwadi, R., 2018. Harvesting of freshwater microalgae biomass by Scenedesmus sp. As bioflocculant. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Jakarta, Indonesia: IOP Publishing.

Sharma, K. K., Schuhmann, H. and Schenk, P. M., 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5 (5): 1532- 1553.

Servaes, K., Maesen, M., Prandi, B., Sforza, S. and Elst, K., 2015. Polar lipid profile of Nannochloropsis oculata determined using a variety of lipid extraction procedures, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 63 (15): 3931-3941.

Singh, G. and Patidar, S., 2018. Microalgae harvesting techniques: a review. Journal of Environmental Management, 217: 499–508.

Solana, M., Rizza, C. S. and Bertucco, A., 2014. Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: comparison between Scenedesmus obliquus, Chlorella protothecoides and Nannochloropsis salina, The Journal of Supercritical Fluids, 92: 311-318.

Sun, Z., Liu, J. and Zhou, Z. G., 2016. Algae for biofuels: an emerging feedstock. In: Luque R, Lin CSK, Wilson K, Clark J, editors. Handbook of biofuels production. Woodhead Publishing, pp: 673–698.

Sen Tan, J., Lee S. Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, J. W. and Ho, S. H., 2020. Show A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. Bioengineered, 11 (1): 116-129.

Vesile, E. D. and Mete, Y., 2020. Assessment of Cell Counting Method Based on Image Processing for a Microalga Culture. Conference: 20th National Fisheries Symposium. Turkey.

Wu J., M.A. Alam, Y. Pan, D. Huang, Z. and Wang, T., 2017. Wang, Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl acetate for biodiesel production, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 71: 323-329.

Zhi-Yuan L. A. C., Guang-Ce, Wang, A. B. and Bai-Cheng Zhou, A., 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in Chlorella vulgaris. Bioresource Technology, 99 (11): 4717–4722.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-06]

Zhu, L., Hu, T., Li, S., Nugroho, Y. K., Li, B., Cao, J., Show, P. L. and Hiltunen, E., 2020. Effects of operating parameters on algae Chlorella vulgaris biomass harvesting and lipid extraction using metal sulfates as flocculants. Biomass and Bioenergy, 132.

Zhu, L. and Li, Z. and Hiltunen, E., 2018. Microalgae Chlorella vulgaris biomass harvesting by natural flocculant: effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction. Biotechnology for Biofuels, 11(1): 183.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-06]