DOI: http://dx.doi.org/10.22104/jift.2017.449

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، سال چهارم، شماره ۱۶، صفحه ۲۰-۱۳، تابستان ۱۳۹۶

استخراج لیپید از ریزجلبک *Dunalliela sp.* با به‌کارگیری امواج اولتراسونیک

معصومه عالی[1]، علی زنوزی[2*] ، مجیدجوانمرد داخلی[3]، محمدامین حجازی[4]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد، علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران
2. استادیار، گروه مهندسی زراعی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران
3.دانشیار، گروه مهندسی زراعی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران
4. دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

(تاریخ دریافت: **95/6/16**، تاریخ پذیرش: **95/11/9**)

چکیده

در این پژوهش ریزجلبک *Dunalliela sp.* سویه M_1 در فتوبیو راکتور برکه، باز کشت داده شد. برداشت ریزجلبک از محیط کشت به روش انعقاد الکتریکی انجام گرفت. ریزجلبک برداشت شده ابتدا خشک و سپس نمک‌زدایی گردید. فرایند استخراج روغن از ریزجلبک به روش سوکسله انجام گرفت و تاثیر فاکتورهای زمان استخراج (40-20 دقیقه)، نوع حلال (هگزان و مخلوط هگزان و ایزوپروپانول به نسبت 3 به 2) و اعمال پیش تیمار اولتراسونیک بر روی میزان روغن استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از زوج حلال هگزان و ایزوپروپانول با نسبت 3 به 2، در مدت زمان 40 دقیقه فرایند استخراج و با اعمال پیش تیمار اولتراسونیک دارای بهترین درصد استخراج روغن به میزان 16/64درصد بود. طبق آزمون‌های آماری افزایش مدت زمان استخراج با زوج حلال هگزان ایزوپروپانول تاثیر معنی‌داری ($p<0/05$) در میزان استخراج روغن از ریزجلبک داشته ولی با حلال هگزان خالص مدت زمان تاثیر معنی‌داری بر روی میزان لیپید استخراج شده نداشت. با اعمال پیش تیمار اولتراسونیک، روغن استخراج شده با زوج حلال هگزان و ایزوپروپانول به میزان 4 درصد نسبت به نمونه‌های تیمار نشده افزایش نشان داد. پروفایل اسیدهای چرب روغن استخراج شده از این ریز جلبک نشان داد که در حدود 59٪ اسیدهای چرب موجود در آن اشباع می‌باشد که بخش عمده آن را اسید پالمیتیک (36/62٪) و اسید استئاریک (19/02٪) تشکیل می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: روغن ریزجلبک، استخراج، هگزان، ایزوپروپانول، اولتراسونیک.

* نویسنده مسئول: zenozi@irost.ir

1- مقدمه

از روش‌های متداول گزارش شده برای استخراج لیپید از ریزجلبک می‌توان به استخراج با حلال، استخراج با سیال فوق بحرانی، استخراج تسریع شده با حلال یعنی استفاده از حلال در دما و فشار بالاتر از نقطه جوش، اشاره کرد. البته از روش‌های دیگر نظیر استفاده از فشارهای مکانیکی، آنزیم، امواج اولتراسونیک یا مایکروویو و شوک اسمزی نیز به‌طور معمول همراه با روش استخراج با حلال به‌منظور تخریب دیواره سلولی و افزایش راندمان استخراج استفاده می‌شود که در واقع یک مرحله آماده‌سازی قبل از استخراج می‌باشند[1، 2]. در میان تمام روش‌های استخراج لیپید، استفاده از حلال یکی از سریع‌ترین و کارآمدترین روش‌ها می‌باشد و با وجود مصرف بالای انرژی برای جداسازی روغن از حلال توسط فرایند تقطیر و هم‌چنین خطر آتش سوزی و انفجار در اثر استفاده از حلال‌های قابل اشتعال و ایجاد مشکلات زیست محیطی، روش استخراج با حلال مقرون به صرفه ترین روشی است که در حال حاضر در دسترس می‌باشد[1، 3].

لیپیدهای غیرقطبی (لیپیدهای خنثی) از مولکول‌های آبگریز تشکیل شده‌اند که با حلال‌های به‌نسبت غیرقطبی همانند هگزان، اتیل استر، کلروفرم و بنزن قابل استخراج می‌باشند [4]. بخش اصلی لیپیدهای غیرقطبی موجود در ریزجلبک‌ها تری گلیسریدها و اسیدهای چرب آزاد می‌باشند، در حالی‌که لیپیدهای قطبی همانند فسفولیپیدها و گلیکو لیپیدها، از گلیسریدهایی که در آن‌ها یک یا بیش از یک اسید چرب آزاد با یک گروه قطبی جایگزین شده باشد، تشکیل شده‌اند [5]. از ویژگی‌های یک حلال مناسب می‌توان به نامحلول بودن در آب، حل کردن انتخابی ترکیب مورد نظر، داشتن نقطه جوش پایین برای تسهیل جداسازی پس از استخراج، اختلاف دانسیته زیاد با آب، ارزان بودن و هم‌چنین قابلیت استفاده مجدد اشاره نمود. با توجه به ویژگی‌های ذکر شده استفاده از هگزان می‌تواند برای استخراج لیپید در مقیاس‌های بزرگ گزینه مناسبی باشد[2]. کلروفرم در استخراج لیپید از اکثر ریزجلبک‌ها موثر می‌باشد، اما با این حال برای استفاده در مقیاس‌های بزرگ لازم است تا کلروفرم را با یک حلال آلی دیگر که دارای آثار زیان آور کم‌تری باشد جایگزین نمود. هرچند بر اساس نتایج مطالعات صورت گرفته، هگزان در استخراج لیپید از ریزجلبک‌ها دارای راندمان کم‌تری نسبت به کلروفرم می‌باشد، اما سمیت کم‌تر، حداقل گرایش به سمت آلاینده‌های غیرلیپیدی و در مقابل تمایل زیاد به سمت لیپیدهای خنثی از مزیت‌های هگزان به‌شمار می‌رود [6]. به دلیل سمیت متانول و کلروفرم و هم‌چنین استخراج رنگدانه‌ها و آلاینده‌های غیرلیپیدی علاوه‌بر لیپیدها، استفاده از دیگر الکل‌ها مانند اتانول، 1-بوتانول و ایزوپروپانول نیز در حال توسعه برای جایگزین شدن متانول می‌باشند. برای استخراج لیپید از ریزجلبک‌ها استفاده از ترکیبات دیگری از حلال‌ها همانند هگزان- اتانول و هگزان- ایزوپروپانول نیز پیشنهاد شده است.

با وجود این‌که گرایش به استفاده از روغن ریزجلبک‌ها افزایش یافته است، اما هنوز هیچ روش استخراج استانداردی برای روغن آن وجود ندارد[7]. مطالعاتی بر روی استخراج روغن از ریزجلبک صورت گرفته است که البته اغلب آن‌ها بر استخراج لیپیدهای خنثی به‌منظور تولید بیودیزل متمرکز بوده است. توانایی حلال‌های مختلف برای استخراج لیپید از ریزجلبک مورد مقایسه قرار گرفته‌اند و ترکیب کلروفرم و متانول همواره به‌عنوان بهترین روش استخراج لیپید یافت شده است[8، 9]. در حالی‌که دی‌کلرومتان و متانول یا اتانول در اکثر مواقع به همان خوبی هستند [8، 9]. با این حال در نتیجه طبیعت سرطان‌زایی، فراریت و خورندگی دی‌کلرومتان، استفاده از آن به شدت محدود شده است. بنابراین حلال‌هایی با سمیت کم‌تر و غیرهالوژنه به‌عنوان جایگزین باید مورد توجه قرار گیرند. اضافه کردن الکل قطبی به حلال غیرقطبی به‌منظور افزایش کارایی استخراج منطقی ضروری به نظر می‌رسد[8-10]. ترکیب حلال‌های هگزان/متانول(2:3)، هگزان/ ایزوپروپانول(2:3) و سیکلوهگزان/1-بوتانول (1:9) به‌عنوان بهترین مخلوط‌های غیرهالوژنه مورد مطالعه قرار گرفته‌اند[8، 9 و11]. ولی این بررسی‌ها بر روی گونه خاصی صورت گرفته و نمی‌توان با قطعیت همان تاثیر مطلوب را برای دیگر گونه‌ها قائل شد. بنابراین در این پژوهش سعی خواهد شد بیش‌ترین بازده استخراج روغن را از ریزجلبک *Dunaliella Sp.* که بومی ایران می‌باشد، با استفاده از دو حلال هگزان و ایزوپروپانول به‌دست آورده و پارامترهای مختلف استخراج را بهینه سازی نمود.

2-مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ریزجلبک *Dunaliella Sp.* سویه M_1 بومی دریاچه مهارلوی شیراز که یک گونه شورپسند است، استفاده گردید. این گونه از خانواده جلبک‌های سبز می‌باشند، که متعلق به شاخه کلروفیتا یکی از پر تعدادترین، پراکندهترین و از دید مورفولوژیک متنوع‌ترین شاخه‌های جلبک‌ها به‌شمار می‌روند و به‌طور معمول در محیط کشت به صورت تک سلولی هستند [12]. ایزوله *Dunaliella Sp.* از کلکسیون ریزجلبک پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال و شمال غرب کشور تهیه گردید. میکروجلبک ابتدا در ظروف شیشه‌ای استریل حاوی محیط کشت جانسون اصلاح شده تلقیح شد. اکثر ریزجلبک‌ها در محدوده دمایی بین 20 تا 30 درجه سانتی‌گراد حداکثر رشد خود را دارند و دمای بهینه برای کشت ریزجلبک دونالیلا 1±26 درجه سانتی‌گراد است[15-13]. بنابراین دمای اتاق کشت بر روی 26 درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. از آن‌جا که بهترین شدت نور برای رشد اغلب ریز جلبک‌ها در محدوده‌ای بین 2500 تا 5000 لوکس می‌باشد[5، 16]، نور مورد نیاز توسط لامپ‌های فلورسنت تامین شده و شدت نور مورد نظر بر روی 4000 لوکس تنظیم شد. در این تحقیق برای هوادهی و هم زنی محیط کشت از یک دستگاه پمپ هوا ساخت شرکت Hailea چین مدل 208 استفاده شد. pH مجاز برای کشت ریز جلبک 7 تا 7/5 می‌باشد[5]. برای تنظیم pH از کپسول CO_2 استفاده گردید. به این ترتیب که با استفاده از تایمر در فواصل زمانی مشخص CO_2 به داخل محیط کشت تزریق شد تا سطح pH را در محدوده 7/5 ثابت نگه دارد. در مراحل بعد با افزایش میزان ریز جلبک محیط کشت به درون ظروف 20 لیتری منتقل گردید. در نهایت کشت به برکه با ظرفیت 300 لیتر منتقل شد. در این فتوبیوراکتور عمل همزنی توسط پره صورت گرفت. دمای محیط نیز با استفاده از سیستم تهویه مطبوع بر روی $26\ ^{\circ}C$ ثابت نگه‌داشته شد. در این کار تحقیقی روش انعقاد الکتریکی برای برداشت ریزجلبک پس از به پایان رسیدن دوره رشد و رسیدن به جذب نوری ثابت مورد استفاده قرار گرفت. محلول ریزجلبک در ظرف تعبیه شده جهت برداشت ریخته شد. همزن در داخل آن قرار داده شد و دور همزن بر روی 100 rpm تنظیم گردید. دو الکترود از جنس آلومینیوم با فاصله 1 cm از یکدیگر داخل ظرف قرار داده شد[17]. برای تامین جریان الکتریسیته از یک منبع تغذیه DC با مدل PS-305D ساخت شرکت Dazheng چین استفاده گردید. ریزجلبک‌های جدا شده ابتدا در آون در دمای 60 درجه سانتی‌گراد خشک گردید و پس از آن نمونه خشک شده جهت جدا سازی نمک با آب مقطر مخلوط گردید. نمک حل شده در آب با سانتریفوژ از ریزجلبک‌ها جداسازی شده و نمونه دوباره در آون قرار گرفته و خشک شد. برای اعمال پیش تیمار، امواج اولتراسونیک با استفاده از دستگاه اولتراسونیک پروسسور MISONIX ساخت آمریکا به مدت20 دقیقه و با توان 50 وات به‌کار گرفته شد. از آن‌جا که همواره در حین آزمایش، دمای محیط بالا می‌رود، به‌منظور جلوگیری از افزایش دما از حمام یخ پیرامون محفظه آزمایش استفاده شد. به‌منظور انجام استخراج از دستگاه سوکسله دیجیتال مدل BUCHI ساخت سوئیس استفاده گردید. برای این منظور هر بار 5 گرم از نمونه زیست توده خشک در داخل کارتوش دستگاه قرار داده شد. هر سیکل شامل سه بخش جوشیدن (15 min)، استخراج لیپید و بازیابی حلال (15 min) بود که زمان برای مرحله دوم به صورت20، 30 و 40 دقیقه در نظر گرفته شد. جهت استخراج، حلال هگزان و زوج حلال هگزان - ایزوپروپانولبه نسبت حجمی 3 به 2 با درجه خلوص بالا و هم‌چنین نسبت حجمی 50 به 1 برای حلال و ریزجلبک، مورد استفاده قرار گرفت .لازم به ذکر است که تمامی آزمایش‌ها در سه بار تکرار انجام شده و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS V.21 تجزیه و تحلیل گردید.

3- نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر میزان لیپید استخراج شده از ریزجلبک در جدول (1) نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که اثر متقابل زمان، نوع حلال و پیش تیمار اولتراسونیک بر میزان استخراج لیپید در سطح احتمال ($p<0/05$) معنی‌دار بوده است. با توجه به درجات آزادی نیز مشاهده می‌شود که نوع حلال در دو سطح، اولتراسونیک نیز در دو سطح و زمان در سه سطح انجام گرفته است (جدول1). نظر به این‌که تاثیر متقابل زمان، نوع حلال و پیش تیمار اولتراسونیک بر میزان استخراج لیپید معنی‌دار بوده است، لذا، آزمون مقایسه

میانگین دانکن بر روی داده‌ها انجام گرفت. با توجه به جدول آزمون مقایسه دانکن مشاهده شد که تاثیرگذاری افزایش زمان استخراج بر میزان لیپید استخراج شده نمونه‌ها با ترکیب هگزان و ایزوپروپانول همواره مثبت است (جدول2).

زمان استخراج در روش سوکسله از فاکتورهای مهم استخراج می‌باشد که بایستی به حد کافی باشد تا حلال به‌خوبی حداکثر ماده را استخراج نماید. زمان استخراج به چند عامل از جمله حلالیت ماده در حلال، دمای استخراج، سطح تماس و سرعت جریان حلال بستگی دارد. هرچه سرعت جریان حلال بیش‌تر باشد، باعث کاهش لایه مرزی در سطح ماده غذایی و در نتیجه باعث افزایش استخراج می‌گردد. بررسی داده‌های مربوط به میانگین بازده استخراج حاکی از این است که با گذشت زمان میزان کلی روغن استحصالی افزایش یافت. وقوع این وضعیت در فرایندهای استخراج امری اجتناب ناپذیر می‌باشد، اما زمان و سرعت رسیدن به آن از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است (شکل1).

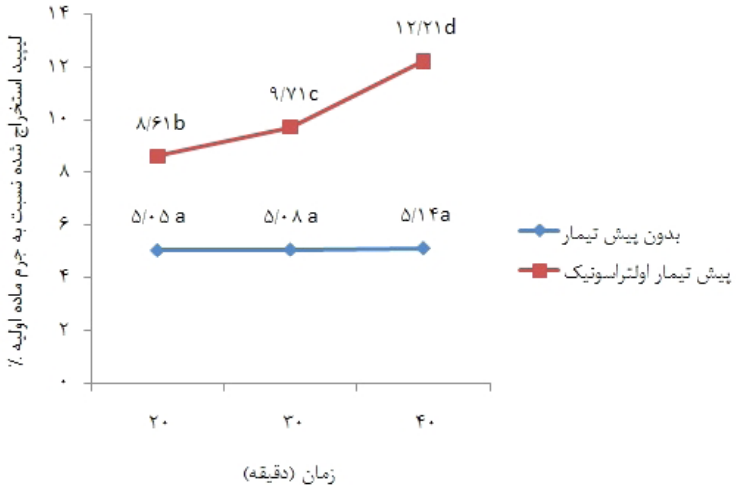
هگزان حتی با افزایش زمان استخراج توانایی نفوذ کامل در بافت سلولی و استخراج لیپید را پیدا نمی‌کند (شکل1). در

جدول(1) تجزیه واریانس بررسی تعیین اثر تیمارهای مختلف بر میزان لیپید استخراج شده از ریزجلبک

منابع تغییر	SS	Df	MS	F	Sig
زمان	65/527	2	32/764	$5/011E_5$	/000
نوع حلال	312/995	1	312/995	$4/787E_4$	/000
اولتراسونیک	109/586	1	109/586	$1/676E_4$	/000
زمان× نوع حلال	30/562	2	15/281	$2/337E_3$	/000
زمان× اولتراسونیک	9/742	2	4/871	744/898	/000
نوع حلال× اولتراسونیک	497	1	0/497	76/011	/000
زمان× نوع حلال× اولتراسونیک	7/143	2	3/572	586/198	/000
خطا	0/157	24	0/007	-	-
جمع	3898/084	36	-	-	-

جدول(2) آزمون مقایسه میانگین دانکن برای تعیین اثر متقابل زمان و نوع حلال واعمال پیش تیمار بر میزان لیپید استخراج شده

میانگین	اولتراسوند	حلال	زمان
5/05 j	-	هگزان	20
5/08 j	+	هگزان	20
5/14 j	-	هگزان	30
7/29 i	+	هگزان	30
8/44 h	-	هگزان	40
8/61 g	+	هگزان	40
9/29 f	-	هگزان-ایزوپروپانول	20
9/71 e	+	هگزان-ایزوپروپانول	20
10/86 d	-	هگزان-ایزوپروپانول	30
10/93 c	+	هگزان-ایزوپروپانول	30
15/93 b	-	هگزان-ایزوپروپانول	40
16/64 a	+	هگزان-ایزوپروپانول	40



شکل(1) نمودار تاثیر زمان بر میزان استخراج لیپید در نمونه‌های پیش تیمار نشده

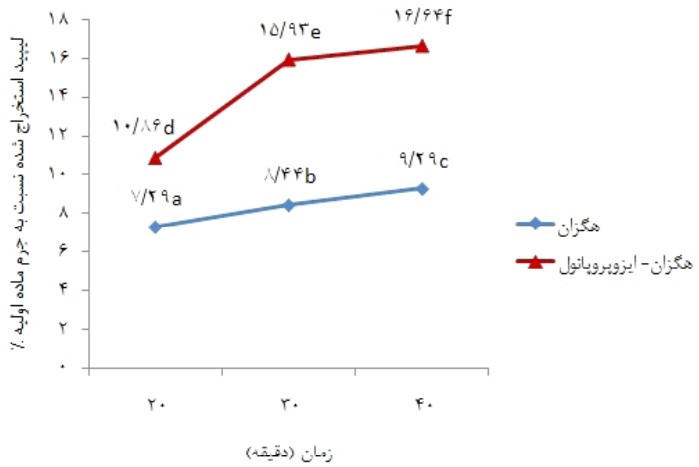
صورتی‌که افزایش زمان استخراج در نمونه‌های پیش تیمار شده با امواج اولتراسونیک که با هگزان استخراج شده‌اند موجب بالا رفتن بازده استخراج گردید (شکل2). حروف لاتین متفاوت نشان دهنده معنی‌داری تیمارها با یکدیگر می‌باشد. واضح است که اعمال پیش تیمار اولتراسونیک به دسترسی حلال به لیپید سلول در طول زمان کمک شایانی کرده است.

همان‌طور که انتظار می‌رفت بازده استخراج با زوج حلال هگزان و ایزوپروپانول بهتر از هگزان به تنهایی بود. آن‌چه که مشخص است، کم‌ترین بازده استخراج مربوط به استفاده از هگزان خالص است که از زوج حلال هگزان- ایزوپروپانول بازده کم‌تری را نشان می‌دهد. یکسان نبودن بافت‌های زیستی از نظر ساختار، ترکیب، حساسیت و هم‌چنین محتوای لیپید منجر به ایجاد روش‌های زیادی برای استخراج لیپید شده است. لیپیدهای مختلف دارای میزان قطبیت‌های متفاوتی نیز هستند. به‌همین دلیل انتخاب یک حلال به تنهایی برای استخراج آن‌ها کافی نیست. از آن‌جا که لیپیدهای قطبی اغلب در غشاء سلولی از طریق پیوندهای قوی هیدروژنی یا الکترواستاتیک به مولکول‌های پروتئین متصل هستند، افزودن یک حلال قطبی همانند اتانول، متانول و یا ایزوپروپانول، باعث دناتوره شدن پروتئین و قطع پیوندهای بین لیپید و پروتئین قبل از استخراج با حلال می‌شود. بنابراین افزودن الکل به حلال‌های غیرقطبی میزان لیپید نهایی استخراج شده را تا حد زیادی افزایش می‌دهد. علاوه‌بر این، اگر چه هگزان به آسانی لیپیدهای خنثی را در خود حل می کند، اما ساختارهایی از نوع میسل از استخراج مقادیر قابل توجه لیپید جلوگیری می‌کند و اغلب افزودن یک الکل به تخریب سریع آن کمک می‌نماید [4، 6]. بنابراین حلال یا مخلوط حلال استفاده شده باید برای حل کردن لیپیدهای موجود در غشاهای سلولی به اندازه کافی قطبی باشد، اما نه به اندازه‌ای که حلال، دیگر مواد غیر لیپیدی را در خود حل کند [18]، بنابراین استخراج به کمک هگزان خالص دارای بازده مناسب نخواهد بود. علت این امر را میتوان در چگونگی ساختار سلولی ریزجلبک جستجو نمود. از آن‌جا که دیواره سلولی ریزجلبک مورد استفاده، فسفولیپیدی (لیپیدهای کاملا قطبی) بوده و طبق اطلاعات موجود میزان انحلال فسفولیپیدها در هگزان تقریبا نزدیک به صفر است، لذا امکان انحلال دیواره سلولی و نفوذ موثر به آن جهت استخراج لیپیدهای غیرقطبی در مدت زمان انجام آزمایش وجود نداشته است. برای حل این مشکل باید از حلالی قطبی استفاده نمود که توانایی انحلال فسفولیپیدها را در خود داشته باشد و به همین دلیل از ایزوپروپانول استفاده گردید.

تأثیر امواج اولتراسونیک در کاهش زمان استخراج توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است[19، 20]. نظر بر این است که امواج اولتراسونیک با تشکیل، رشد و انفجار حباب‌ها، گرداب‌ها و جریان‌های اغتشاشی را در سرتاسر توده سیال ایجاد می‌کند که باعث تعدیل گرادیان غلظت و افزایش سرعت انتقال جرم و در نتیجه کاهش زمان استخراج می‌گردد. به‌علاوه تخریب بافت و نفوذ حلال به داخل آن موجب تماس بیش‌تر حلال با روغن شده و سرعت انتقال جرم را تشدید

می‌کند [19]. به نظر می‌رسد که استفاده از امواج اولتراسونیک در فرایند استخراج تا حدود زیادی جبران کننده اختلاف بین زمان استخراج و نوع حلال به‌کارگرفته شده در برخی تیمارها است. افزایش میزان استحصال روغن در حضور امواج اولتراسونیک را می‌توان به ایجاد حفره و انفجار حباب‌ها در توده حلال و نیز در مجاورت سطح سلول‌ها مربوط دانست. پدیده اخیر باعث ایجاد جریان‌های پرسرعت حلال به طرف سلول‌ها شده که در اثر برخورد آن‌ها به سطح، بافت متلاشی شده و منافذ و کانال‌های متعددی در آن به‌وجود می‌آید. از طریق همین مجاری حلال به داخل نفوذ و روغن به بیرون انتشار می‌یابد. هم‌چنین در اثر ارتعاش دیواره حباب‌ها و نیز گرداب‌ها و جریان‌های موضعی ناشی از تشکیل و فروپاشی حباب‌ها، از اشباع شدن لایه مرزی اطراف سلول‌ها جلوگیری به عمل آمده و به این ترتیب با ایجاد گرادیان غلظت انتقال جرم تسریع می‌شود. بنابراین با مقایسه شکل‌های 1 و 2 مشاهده می‌کنیم که بیش‌ترین بازده استخراج لیپید در زمان استخراج 40 دقیقه برای ترکیب حلال هگزان و ایزوپروپانول به نسبت 3 به 2 که پیش تیمار اولتراسونیک برای آن اعمال شده بود به‌دست آمد و کم‌ترین درصد لیپید استخراج شده به نمونه‌های تیمار نشده که با هگزان استخراج شده بودند، اختصاص داشت که حتی افزایش زمان استخراج نیز بر آن تاثیری نداشت.

نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی برای تعیین اسیدهای چرب روغن استخراج شده در جدول (3) آمده است.



شکل (2) نمودار تاثیر زمان بر میزان استخراج لیپید در نمونه‌های تیمار شده با اولتراسونیک

جدول (3) نوع و درصد اسیدهای چرب لیپید استخراج شده نسبت به کل اسیدهای چرب ریزجلبک *Dunallielasp* سویه M_1

ترکیب اسید چرب	نام اسید چرب	درصد اسید چرب ریزجلبک
C_{12}	لوریک اسید	منفی
C_{14}	مریستیک اسید	2/64
C_{16}	پالمیتیک اسید	36/62
C_{161}	پالمیتولئیک اسید	5/9
C_{20}	آراشیدیک اسید	مثبت
C_{18}	استئاریک اسید	19/08
C_{181}	اولئیک اسید	18/62
C_{182}	لینولئیک اسید	3/26
C_{183}	لینولنیک اسید	4/65

لیپید استخراج شده از ریزجلبک *Dunaliella Sp.* به ظاهر سبز رنگ و در دمای محیط به شکل مایع می‌باشد. زنجیر اسیدهای چرب در لیپید استخراج شده ریز جلبک از 14 تا 20 کربن دارد. در حدود 59٪ اسیدهای چرب موجود در آن اشباع می‌باشد، که بخش عمده آن را اسید پالمیتیک (36/62%) و اسید استئاریک (19/02٪) تشکیل می‌دهد. میزان اسید پالمیتیک موجود در لیپید استخراج شده از ریز جلبک از میزان آن در روغن پالم (47-41٪)، که در میان روغن‌های گیاهی خوراکی بیش‌ترین اسید پالمیتیک را دارد کم‌تر می‌باشد، اما از روغن‌های گیاهی خوراکی دیگر نظیر آفتابگردان (10-3٪)، سویا (14-7٪)، کانولا (3/5٪)، زیتون (20-7/5٪)، ذرت (14-9٪)، نارگیل (17/2٪) و پنبه دانه بیش‌تر است [21]. میزان اسید استئاریک آن هم از تمامی روغن‌های گیاهی خوراکی یاد شده بیش‌تر می‌باشد [21]. اسید چرب تک غیراشباعی عمده لیپید استخراج شده از ریز جلبک مورد آزمون اسید اولئیک (18/62٪) می‌باشد که این مقدار نزدیک به مقدار اسید اولئیک روغن‌های آفتابگردان (16/5٪)، سویا (26-18%) و پنبه دانه (44-13٪) (مطابق استاندارد کدکس آمریکا) است، ولی از روغن‌های زیتون (83-55٪)، کنجد (50-35٪)، پالم (44-36٪)، ذرت (42-24٪) و نارگیل (25/4٪) کم‌تر می‌باشد [21]. در نهایت میزان اسیدهای چرب چند غیراشباعی در روغن استخراج شده از این ریزجلبک حدود 8٪ می‌باشد که بیش‌تر آن را اسید لینولنیک (4/65٪) تشکیل می‌دهد که از روغن سویا (10-5/5٪) کم‌تر و از سایر روغن‌های ذکر شده بیش‌تر است. هم‌چنین مقدار اسید لینولئیک لیپید استخراج شده (3/26٪) از تمامی روغن‌های بررسی شده کم‌تر می‌باشد.

با توجه به این‌که هدف از این پژوهش بررسی میزان افزایش استخراج لیپیدهای ذخیره‌ای موجود در ریزجلبک دونالیلا با استفاده از امواج اولتراسونیک می‌باشد، لذا مقدار فسفولیپیدها که تشکیل دهنده اجزای غشا بوده و جزء لیپیدهای ذخیره‌ای نمی‌باشند، اندازه‌گیری نگردید.

4- نتیجه‌گیری

بازده استخراج روغن از نمونه‌های پیش تیمارشده با امواج اولتراسونیک با زوج حلال هگزان- ایزوپروپانول به نسبت 3به2 در مدت زمان استخراج40 دقیقه، برابر با 16/64 ٪ می‌باشد، در حالی که در نمونه‌های بدون تیمار حداکثر بازده استخراج به 12/2درصد رسید. در روش سوکسوله بازده استخراج لیپید ریزجلبک وابستگی زیاد به نوع حلال‌ها و ویژگی‌های آن‌ها دارد. به همین دلیل و بر اساس قابلیت انحلال، طیف وسیع‌تری از لیپیدها توسط زوج حلال هگزان- ایزوپروپانول نسبت به هگزان جداسازی می‌شوند.

انجام پیش تیمار اولتراسونیک و افزایش ایزوپروپانول به‌عنوان یک حلال قطبی به هگزان موجب افزایش قطبیت حلال و کمک به انحلال دیواره فسفولیپیدی ریزجلبک می‌گردد، سبب افزایش راندمان استخراج می‌شود. ترکیب اسیدهای چرب لیپید استخراج شده با اسیدهای چرب موجود در روغن‌های گیاهی خوراکی مطابقت دارد. طول زنجیره کربنی اسیدهای چرب استخراج شده از ریز جلبک از 14 تا 20 کربن می‌باشد که در حدود 59٪ اسیدهای چرب موجود در آن اشباع می‌باشد و بخش عمده آن را اسید پالمیتیک (36/62٪) و اسید استئاریک (19/02٪) تشکیل می‌دهد.

منابع

[1] Cheng, C. H., Du, T. B., Pi, H.C., Jang, S. M., Lin, Y. H., Lee, H. T. (2011). Short Communication Comparative study of lipid extraction by organic solvent and supercritical CO_2. *J. BioresTechno.*, 102(21), 10151-3.

[2] Mercer, P., Armenta, R. E. (2011). Review Article Developments in oil extraction from microalgae. *J. Lipid Sci. Technol.*,113(5), 539 - 547.

[3] Gong, Y., Jiang, M. (2011). Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *J. Biotechnol Lett.*, 33(7), 1269-84.

[4] Borowitzka, M., Isdepsky, A. A., Sing, S. F., Moheimani, N. R.)2011(. Production of biofuels from microalgae. *J. Mitig. adapt. Strategies glob. chang.*, 10.1007/s11027-011-9294-x.

[5] Richmond, A.)2004(. Handbook of Microalgal Culture. first Edition. *Blackwell Science. Iowa.*, USA

[6] Halim, R. (2010). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *J. Bioresour Technol.*, 102(1), 178-85.

[7] Khozin-Goldberg, U., Iskandarov, Z., Cohen, L. C., (2011). PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91, 905–915.

[8] Ryckebosch, E., CuéllarBermúdez, S. P., TermoteVerhalle, R., Muylaert, K., Parra Saldivar, R., Foubert, I. (2013). Influence of extraction solvent system on the extractability of lipid compounds from the biomass of Nannochloropsis gaditana. *J. Appl. Phycol.*, 26(3), 1501–1510.

[9] Balasubramanian, R. K., Yen, D. T. T., Obbard, J. P. (2013). Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *J. Chem. Eng.*, 215, 929–936.

[10] Ryckebosch, E., Muylaert, K., Foubert, I. (2012). Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 89, 189–198.

[11] Long, R., Abdelkader, E. (2011). Mixed-polarity azeotropic solvents for efficient extraction of lipids from Nannochloropsis microalgae. *J. Biochem.Biotechnol.*, 7, 70–73.

[12] Ben-Amotz, A. (2004). Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products-Major Industrial Species. Handbook of Microalgal Culture. *J. Biotechnol.*, 5,17-29.

[13] Zebib, T. (2008). Microalgae Grown in Photobioreactors for Mass Production of Biofuel. Rutgers University, Department of Bioenvironmental Engineering.

[14] Lee, A. K., Lewis, D. L., Ashman, P. J. (2009). Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J.ApplPhycol.*, 21, 559-567.

[15] Miravalles A. B., Leonardi P. I. (1999). Optimization of culture conditions of an Argentine strain of Dunaliellasalina (Chlorophyta), for the synthesis of beta-carotene. *J. Hort.*,502, 153-157.

[16] فرامرزی، م. ح؛ فروتن فر، ح؛ شکیبایی، م. (1389) بیوتکنولوژی ریز جلبک‌ها، چاپ اول، *دانشگاه علوم پزشکی تهران*، ص83-35.

[17] زنوزی، ع. (1390) طراحی، ساخت و ارزیابی دستگاه هیبرید جداساز ریزجلبک از محیط کشت به‌منظور بهبود تراز انرژی تولید بیودیزل. رساله دوره دکتری مکانیک ماشین‌های کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، ایران.

[18] Iverson, S. J., Lang, S. L. C., Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total lipid determination in a broad range of marine tissues. *J. Lipids.*, 36(11), 1283-1287.

[19] Mason, T. J., Riera, E. (2005). Application of Ultrasound. In: Da-Wen S, editor. EmergingTechnologies for Food Processing. London: Academic Press. 323-51. London, England.

[20] Ji, J. b., Lu, X. h. (2006). Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. *J.Ultrasonics Sonochemistry.*,13(5), 455-462.

[21] مالک، ف. (1387) چربی‌ها و روغن‌های نباتی خوراکی ویژگی‌ها و فراوری، *آموزش و ترویج کشاورزی، نشر و پخش غلامی*، ص141 -9.