

بررسی استخراج پروتئین از ریزجلبک با استفاده از روش‌های مختلف پیش تیمار

مهدی زمانی^۱، هانیه شکرکار^{۲*}، سیروس ابراهیمی^۳

۱- کارشناس ارشد مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی سهند

۲- استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی سهند

۳- استاد مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی سهند

پیام نگار: H_shokrkar@sut.ac.ir

چکیده

ریزجلبک‌ها به دلیل داشتن پروتئین با ارزش غذایی بالا، سرعت رشد سریع و توانایی زنده ماندن در شرایط سخت، جزء امیدوارکننده منابع پروتئین هستند. در این تحقیق، ابتدا کشت گونه‌های مختلف و نامعین ریزجلبک در فتوبیو راکتورهای صفحه‌ای تخت انجام شد و برای اولین بار، فرایند استخراج پروتئین از زیست‌توده ریزجلبک مختلط با استفاده از روش‌های مختلف پیش تیمار از قبیل اتولیز، آبکافت با اسید و بازی، آبکافت به وسیله امواج فراصوت و ترکیب آن‌ها بررسی شد. در پیش تیمار اسیدی و بازی با استفاده از محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف و در مدت زمان‌های متفاوت، بالاترین درصد استخراج پروتئین (در دمای ۱۲۱ و مدت زمان ۳۰ دقیقه) به ترتیب ۸۳ و ۹۳ درصد گزارش شد که نشان داد که استفاده از قلیا، بازدهی بالاتری در استخراج پروتئین دارد. همچنین، با استفاده از روش اتولیز و امواج فراصوت، بالاترین بازده استخراج به ترتیب ۶۰ و ۳۹ درصد از پروتئین کل بود. در این مطالعه، برای نخستین بار از روش اتولیز به همراه انجماد سریع برای استخراج پروتئین از ریزجلبک استفاده شد و بر اساس نتایج به دست آمده، بازدهی فرایند اتولیز به میزان ۳ تا ۱۰ درصد افزایش یافت.

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۰۶

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۷/۱۹

شماره صفحات: ۱۸ تا ۲۷

کلیدواژه‌ها: اتولیز، استخراج، فراصوت، پروتئین، ریزجلبک مختلط

۱. مقدمه

زیستی و یا محصولات ارزشمند دیگری تبدیل کرد [۲]. با توجه به اینکه تغییرات روزانه و فصلی تابش خورشید تولید چربی، پروتئین و کربوهیدرات را محدود می‌کند تولید تجاری آن در مناطقی با تابش مناسب خورشید توجیه پذیر خواهد بود [۳]. بنابراین در واحدهای معمول تولید، دی‌اکسید کربن به داخل محیط رشد ریزجلبک به وسیله منابع خارجی خوراک‌دهی می‌شود [۴ و ۵] و یا از کربنات‌های محلول مانند کربنات سدیم و بی‌کربنات سدیم استفاده می‌شود [۶].

جلبک یکی از قدیمی‌ترین گونه‌های حیات است که در تمام زیست‌بوم‌های زمین وجود دارد و از این بابت یک گونه زیستی متنوع در گستره وسیعی از شرایط محیط زیستی به شمار می‌رود [۱]. ریزجلبک‌ها چربی، پروتئین و کربوهیدرات را در مقادیر زیاد و زمان کوتاه تولید می‌کنند؛ این محصولات را می‌توان به سوخت‌های

* تبریز، شهر جدید سهند، دانشگاه صنعتی سهند، دانشکده مهندسی شیمی

مناسب و «گونه‌محور» بودن، بر مشخصه تولید مواد ذخیره‌ای و مشخصه « گونه محور بودن» استوار است. آن‌ها با فراهم آوردن یک «محیط انتخابی» به تجمع مواد ذخیره‌ای در کشت مختلط ریزجلبک پرداختند. اساس کار آن‌ها بر نقش بوم‌شناختی ماده ذخیره‌ای استوار است؛ به این معنا که هر گونه‌ای که توانایی ذخیره داشته باشد در سامانه باقی می‌ماند و هر گونه‌ای که این مشخصه را ندارد از سامانه خارج می‌شود.

با این حال، یکی از اصلی‌ترین موانع پیش روی تولید انبوه پروتئین از ریزجلبک‌ها، میزان کم بازیابی پروتئین است؛ وجود لایه‌های متعدد دیواره سلولی مانع اصلی در لیز سلولی ریزجلبک‌ها است [۲۴ و ۲۵]. پروتئین‌ها در قسمت‌های مختلف سلول واقع شده‌اند و می‌توانند در دیواره سلولی، سیتوپلاسم، کلروپلاست و سایر اندام‌های داخل سلول مشاهده شوند [۲۶]. برداشتن این مانع برای تسهیل آزادسازی پروتئین از ریزجلبک‌ها ضروری است؛ بنابراین، انتخاب یک روش مناسب برای شکستن دیواره سلولی قبل از استخراج یکی از مهم‌ترین مراحل در عملیات پایین‌دستی است [۲۵ و ۲۷].

سافی و همکاران [۲۸] تأثیر فرایند فیزیکی و آبکافت در محیط بازی در حضور سدیم هیدروکسید را جداگانه مطالعه کردند. نتایج آن‌ها نشان دهنده تأثیر بالاتر پیش‌تیمار فیزیکی نسبت به شیمیایی بود. در این مقطع تلاش‌های گسترده‌ای برای توسعه سامانه‌ها شده و روش‌های متعددی برای استخراج کربوهیدرات و لیپید به‌منظور تولید سوخت‌های زیستی استفاده شده است [۲۹] با این وجود مطالعات محدودی در مورد روش‌های مقرون به صرفه و عملی برای استخراج پروتئین از ریزجلبک وجود دارد.

کشت ریزجلبک‌ها به‌صورت کشت خالص، نیازمند ضد عفونی کردن فرایند است، که این موضوع، سبب بالا رفتن هزینه‌های سرمایه‌گذاری و عملیاتی می‌شود. بنابراین استفاده از کشت مختلط ریزجلبک باعث توجیه‌پذیری اقتصادی فرایند خواهد شد.

مطالعه حاضر با هدف ارائه نتایج جدیدی از نقش امواج فراصوت، اسید و باز و اتولیز بر شکستن دیواره سلولی و تسهیل استخراج پروتئین از ریزجلبک‌ها انجام شده است؛ هم‌چنین برای نخستین‌بار از روش انجامد پیایی برای تحلیل دیواره سلولی ریزجلبک استفاده و اثرات فرایندهای مجزا و ترکیبی نیز مقایسه شد.

انتشار گازهای گلخانه‌ای مانند دی‌اکسید کربن به‌دلیل سرعت بالای ریزجلبک‌ها در تثبیت آن‌ها می‌تواند به‌طور مؤثری کاهش یابد [۷ و ۸]. مواد مغذی غیر آلی نیتروژن، فسفر و سیلیکون نیز برای رشد ریزجلبک مورد نیاز است [۹].

ریزجلبک‌ها، واحدهای کوچک واقعی بیوشیمیایی هستند، که بسیار مؤثرتر از گیاهان فتوسنتز می‌کنند [۱۰]. توانایی ریزجلبک در تثبیت دی‌اکسید کربن به‌عنوان روشی برای حذف آن از گازهای دودکش کارخانه‌ها مطرح شده است؛ بنابراین میزان انتشار گازهای گلخانه‌ای از این راه می‌تواند کاهش یابد [۱۱].

ریزجلبک‌ها به‌دلیل داشتن ویژگی‌های مطلوبی همانند محتوای پروتئین بالا [۱۲]، در دسترس بودن [۱۳] بازده فتوسنتزیک بالا [۱۴]، سرعت رشد بالا با چرخه برداشت کوتاه‌تر [۷ و ۱۵]، توانایی مقاومت در برابر بیماری بالا و تراکم زیست‌توده بالا [۱۶] کم‌تر بودن محدودیت‌های فصلی و آب و هوایی [۱۷] بی‌نیازی از زمین کشت [۱۸ و ۱۹] جلب توجه کرده‌اند. برتری‌های ذکر شده، باعث می‌شود که تولید انبوه پروتئین از ریزجلبک‌ها جایگزین مناسبی برای منبع پروتئین معمولی باشد [۲۰].

استفاده از ریزجلبک‌ها برای تولید تجاری پروتئین، امیدوارکننده‌ترین و محتمل‌ترین جایگزین برای منابع پروتئین معمولی به‌ویژه آرد ماهی در صنعت آبی‌پروری است [۲۱ و ۲۲].

برای کشت ریزجلبک‌ها از دو روش کشت اختصاصی و مختلط استفاده می‌شود؛ انتخاب کشت خالص ریزجلبک برای تولید پروتئین، به‌دلیل افزایش احتمال آلودگی سامانه به گونه‌های مهاجم، می‌تواند سبب پایین آمدن نرخ بهره‌وری شود؛ لذا فرایند گونه‌محور، با چالش‌های بزرگی همراه است. هم‌چنین کشت ریزجلبک‌ها به‌صورت خالص، نیازمند استریل کردن فرایند، استفاده از فتوبیوراکتورهای بسته و استریل کردن جریان‌های ورودی و خروجی و در نتیجه سبب بالا رفتن هزینه‌های سرمایه‌گذاری و عملیاتی خواهد شد و توجیه اقتصادی استفاده ریزجلبک‌ها را برای تولید پروتئین در مقیاس صنعتی در معرض تردید قرار می‌دهد [۲۳].

در سال ۲۰۱۳ مووی و همکاران [۲۳] برای اولین‌بار نظریه بقایای چاق‌ترین را در کشت‌های مختلط ریزجلبک ارائه کردند و برای اولین بار به تولید مواد ذخیره‌ای ریزجلبکی در کشت مختلط پرداختند. نظریه بقایای چاق‌ترین، به جای انتخاب گونه ذخیره‌کننده

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ کشت ریزجلبک

ابتدا گونه‌های مختلط و بومی ریزجلبک از آب استخر ائل‌گولی تبریز جمع‌آوری شد. سپس عملیات کشت ریزجلبک نخست در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری همراه با همزدگی انجام گرفت. بعد از رشد ریزجلبک‌ها در ارلن، از آن به حجم ۱۲ لیتر و حجم کاری ۱۰ لیتر، برای کشت اصلی ریزجلبک در فتوبیوراکتور صفحه‌ای تخت از جنس پلی‌کربنات، استفاده شد. نوردهی با لامپ‌های فلورسنت با شدت نور $260 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ انجام و برای اندازه‌گیری شدت نور از نورسنج استفاده شد.

شرایط عملیاتی فتوبیوراکتور در دمای محیط، pH برابر ۹ است. فتوبیوراکتور با استفاده از هوا، که دارای تقریباً ۰/۰۴ درصد دی‌اکسید کربن است، با دبی برابر ۸ لیتر بر دقیقه هوادهی شد. محیط کشت ریزجلبک در ارلن و فتوبیوراکتور، شامل بی‌کربنات سدیم، نترات سدیم، فسفات پتاسیم، سولفات منیزیم، کلرید کلسیم، کلرید پتاسیم بترتیب با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۸، ۱/۲۵، ۰/۱، ۰/۱، ۰/۱ گرم بر لیتر و ۲ mL/L محلول تریس‌المنت^۱ است [۳۰]. غلظت عناصر موجود در محلول تریس‌المنت در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱. غلظت عناصر در محلول تریس‌المنت.

عناصر	غلظت (mg/L)
EDTA	۱۰۰
MnCl ₂ .4H ₂ O	۱۰/۱۲
FeSO ₄ .7H ₂ O	۱۰
ZnSO ₄ .7H ₂ O	۴/۴
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	۳
CoCl ₂ .6H ₂ O	۳/۲۲
CuSO ₄ .5H ₂ O	۳/۱۴

۲-۲ برداشت ریزجلبک

پس از رشد ریزجلبک‌ها درون فتوبیوراکتور، ریزجلبک با روش

1. Trace Element

ته‌نشینی برداشت شد؛ این زیست‌توده، بعد از برداشت، فاسدشدنی است و باید خشک شود؛ بنابراین، ریزجلبک در آون تحت دمای ثابت 60°C تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد. این فرایند ۲۴ ساعت زمان نیاز داشت. برای پودر کردن ریزجلبک از دستگاه آسیاب سیاره‌ای (Fritsch GmbH 8, Germany) با گلوله‌هایی از جنس استیل به قطر ۱۰ میلی‌متر استفاده شد. پودر کردن ریزجلبک به دلیل بازده تخریب بالا، حجم عملیاتی بالا و مصرف انرژی پایین در صنعت به کرات استفاده می‌شود [۳۱].

۲-۳ اندازه‌گیری پروتئین

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین از روش لوری و مطابق اصلاحات واتربرگ [۳۲] استفاده شد. این فرایند شامل واکنش پروتئین‌ها با سولفات ۵ آبه^۲ و تارتارات^۳ در یک محیط بازی است که منجر به تشکیل هماتفات‌های تترادنتات مس^۴ و پروتئین می‌شود. افزودن معرف رنگی فولین^۵ به وسیله تشکیل مولیدن آبی با یون‌های مس، منجر به اکسیدشدن باندهای پپتیدی می‌شود؛ بنابراین یک منحنی استاندارد به سرم پروتئین گاوی^۶ در محدوده ۰ تا ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شد. به منظور اندازه‌گیری میزان پروتئین، ۰/۲ میلی‌لیتر از هر استاندارد یا نمونه‌های حاوی عصاره پروتئین خام گرفته و سپس ۱ میلی‌لیتر معرف اصلاح شده لوری به هر نمونه اضافه شد، بعد از آن به مدت تقریباً ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، ۰/۱ میلی‌لیتر از معرف فولین ۱ نرمال اضافه شد و نمونه دوباره دقیقاً برای ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، سپس جذب محلول رنگی آبی در ۷۵۰ و ۵۵۰ نانومتر با طیف‌سنج UV-WTW ۶۶۰۰ اندازه‌گیری شد.

۲-۴ استخراج پروتئین

برای بررسی میزان پروتئین آزادشده از ریزجلبک خشک‌شده، از روش‌های خرد کردن مکانیکی، تخریب با اسید و باز، امواج فراصوت و اتولیز^۷ به همراه انجماد متوالی در حین فرایند استفاده شد. بعد از خشک کردن ریزجلبک در آون تحت دمای 60°C ، از آن برای

2. Sulfate 5 Hydrate

3. Tartrate

4. Tetrudentate Copper

5. Folin

6. BSA (Bovine Serum Albumin)

7. Autolysis

۳. نتایج و بحث

۳-۱ مشخصه‌یابی ریزجلبک‌های کشت‌شده

پس از آن‌که کشت ریزجلبک مختلط در فتوبیوراکتور صفحه‌ای انجام شد؛ تعدادی از گونه‌های موجود در محیط کشت با میکروسکوپ نوری شناسایی شدند که در شکل (۱) مشاهده می‌شوند.

غلظت ریزجلبک در انتهای روز ۴۳ از ۰/۰۸ g/L به ۱/۶۶ g/L افزایش یافت. مقادیر خاکستر، VSS و کربوهیدرات کل در پایان ۴۳ روز به ترتیب برابر ۰/۳۸، ۱/۲۷ و ۰/۲۴ گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد. همچنین مقادیر پروتئین و لیپید به ترتیب برابر ۰/۷۲۶ و ۰/۲۸۶ گرم بر لیتر به دست آمد. بنابراین، مقادیر کل کربوهیدرات، پروتئین و لیپید بر اساس VSS به ترتیب برابر ۱۸، ۵۷ و ۲۲ درصد است.



شکل ۱. گونه‌های شناسایی شده در محیط ریزجلبک.

۳-۲ تأثیر روش‌های مختلف پیش تیمار بر آزادسازی پروتئین

از ریزجلبک

۳-۱-۱ امواج فراصوت

هنگام استفاده از امواج فراصوت، امواج صوتی منتقل شده به محیط حاوی ریزجلبک، مجموعه‌ای از حفره‌های ریز در مقیاس میکرومتری ایجاد می‌کنند که انرژی جنبشی را به سطح سلول‌ها منتقل و سرانجام دیواره سلولی را تخریب می‌کنند [۳۳].

همان‌گونه که در شکل (۲) مشاهده می‌شود، پس از قرار گرفتن نمونه‌ها در معرض امواج فراصوت به مدت زمان ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه، میزان پروتئین استخراجی به ترتیب برابر ۳۰، ۳۵ و ۳۹ درصد از

فرایندهای استخراج استفاده شد. اتولیز ریزجلبک در دماهای ۳۰، ۵۰، ۶۰، ۹۰ و ۹۸ و زمان‌های مختلف انجام شد؛ این کار با قراردادن محیط مورد نظر در داخل انکوباتور و یا آون برای ایجاد دمای مورد نظر در مدت زمانی مشخص بود.

محلول‌های اسید و باز در غلظت ۲ مولار تهیه و از آن‌ها برای ساخت محلول‌های ۱، ۵/۰ و $10^{-4} \times 5$ مولار استفاده شد. سپس این محلول‌ها برای انجام فرایند آبکافت اسیدی و بازی به پودر ریزجلبک اضافه شدند.

برای ایجاد امواج فراصوت، دستگاه Bandelin HD3100 با فرکانس ۲۰ kHz به مدت زمان ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه استفاده شد؛ بدین منظور پروب دستگاه برای تولید امواج فراصوت در محیط غوطه‌ور شد. در روش استفاده از امواج فراصوت و قلیا به صورت متوالی، ابتدا محیط در معرض امواج فراصوت قرار گرفت و در ادامه از باز رقیق برای استخراج پروتئین استفاده شد.

۲-۵ تعیین جامدات معلق فرار (VSS) ریزجلبک

غلظت زیست‌توده ریزجلبک از راه اندازه‌گیری جرم خشک کل (TSS) حساب می‌شود. برای اندازه‌گیری مقدار (TSS)، حجم مشخصی از آویزش ریزجلبکی برداشته شد. سپس از راه سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه، خالی کردن مایع رویی، خشک کردن زیست‌توده به مدت ۲۴ ساعت در آون، مقدار آن اندازه‌گیری شد.

مقدار خاکستر، با سوزاندن زیست‌توده خشک شده در کوره، در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت به دست آمد؛ جرم آلی معلق (VSS) از راه اختلاف جرم زیست‌توده خشک شده و مقدار خاکستر حساب شد.

۲-۶ تعیین میزان پروتئین اولیه

پس از خشک کردن ریزجلبک تا وزن ثابت، درصد پروتئین موجود به نسبت ماده خشک سلولی بر حسب VSS مطابق رابطه زیر به دست آمد.

$$100 \times \frac{\text{مقدار پروتئین استخراج شده (g)}}{\text{مقدار کل پروتئین در ریزجلبک (g)}} = \text{بازده استخراج (\%)}$$

1. Vaporised Suspended Solid
2. Total Suspended Solid

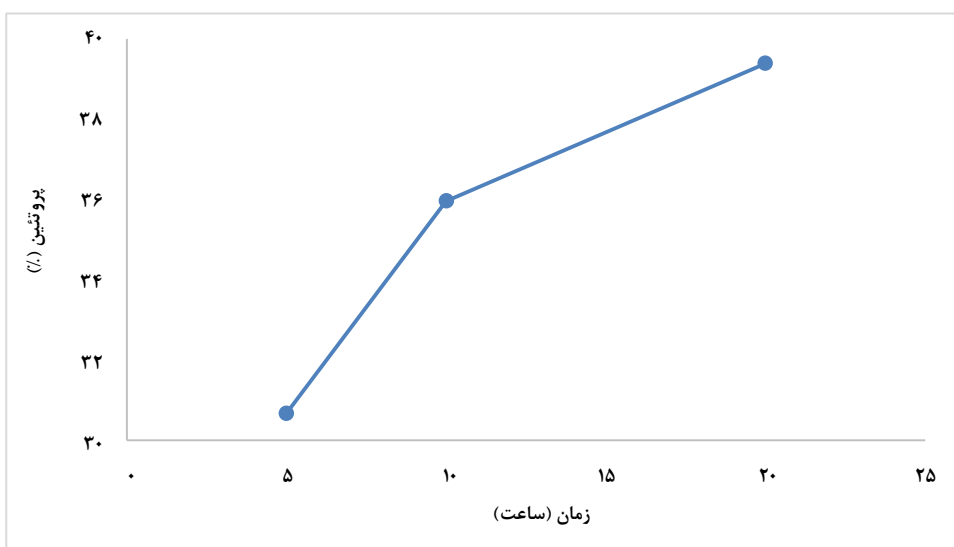
به‌ویژه آن‌هایی که دارای دیواره سلولی ضخیم هستند، مؤثر است. این روش پیش‌تیمار می‌تواند پیوندهای هیدروژنی و پیوندهای استری بین پلی‌ساکاریدها و پلی‌ساکاریدهای موجود در دیواره سلولی را آبکافت کند [۳۹ و ۳۸] در نتیجه، نفوذپذیری دیواره سلولی می‌تواند تحت تأثیر قرار گیرد و باعث افزایش استخراج پروتئین از سلول‌های ریز جلبک شود [۲۸].

نتایج آبکافت اسیدی و قلیایی در غلظت‌های بالای محلول (۱ و ۰/۵ مولار) و در دماهای ۳۰، ۶۰ و ۱۲۱ درجه سلسیوس، و غلظت‌های پایین آن‌ها (۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۱ مولار) و دماهای ۳۰ و ۶۰ درجه سلسیوس انجام گرفت. همان‌گونه که در شکل ((۳- الف، ب و پ) مشاهده می‌شود، بیشترین میزان استخراج در مدت زمان ۳۰ دقیقه اتفاق افتاده است و بعد از آن شاهد کاهش پروتئین هستیم که به دلیل تخریب پروتئین در حضور طولانی مدت اسید و باز غلیظ اتفاق افتاده است. استخراج در حضور قلیا بازدهی بیشتری از محیط اسیدی داشته است (در حدود ۱۵ درصد). شکل ((۳- ت و ث) نشان‌دهنده شرایط آزمایش در محلول‌های بازی رقیق است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، در حضور باز رقیق تخریب پروتئین‌ها ملاحظه نمی‌شود که می‌توان آن را به رقت باز نسبت داد. در این حالت میزان استخراج به مراتب کمتر از محیط قلیایی غلیظ است (۴۰ درصد بازدهی کمتر).

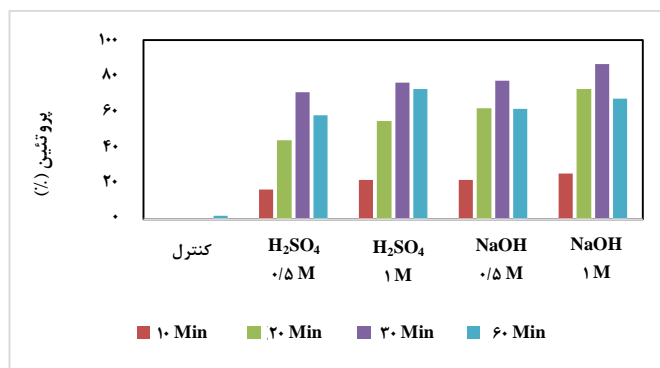
میزان پروتئین کل بود. همان‌گونه که پیداست با افزایش زمان استفاده از امواج فراصوت به ۴ برابر زمان اولیه، میزان استخراج تنها ۸ درصد افزایش یافته است که نشان می‌دهد امواج فراصوت توانایی اثرگذاری در مدت زمان‌های پایین را دارند. گزارش شده است که امواج فراصوت می‌تواند در مدت زمان استخراج کوتاهی، نفوذ اجباری بیشتری از حلال را به اجزای سلولی ایجاد کند که در نتیجه آن آزادسازی پروتئین از سلول‌های زیست‌توده را افزایش می‌دهد [۳۴] گلده و همکاران [۳۵] نشان دادند که افزایش استخراج پروتئین به‌وسیله اثر فرفره‌ای فراصوت، نفوذ حلال را از راه شکستن دیواره سلولی و انتقال جرم تسهیل می‌کند. اثر مثبت امواج فراصوت بر شکستن دیواره سلولی برای آزادسازی پروتئین به‌وسیله پاریمی و همکاران [۳۶] که از این امواج برای شکستن دیواره سلولی اسپروولینا پلاتنسیس^۱ استفاده کرده بودند، تأیید شده است. این پژوهشگران در مطالعه‌ای دریافتند که این امواج منجر به استخراج بیشتر پروتئین از مایع رویی می‌شود. علاوه بر تحقیقات ذکرشده، مطالعه‌ای نیز به‌وسیله آراجو و همکاران [۳۷] انجام شده است که نشان از کاربرد امواج فراصوت بر افزایش استخراج مواد مغذی از ریزجلبک دارد.

۳-۲-۲ اسید و باز

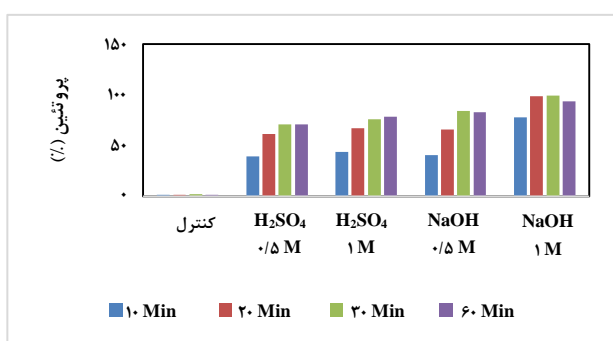
پیش‌تیمار قلیایی و اسیدی در شکستن دیواره سلولی ریزجلبک‌ها،



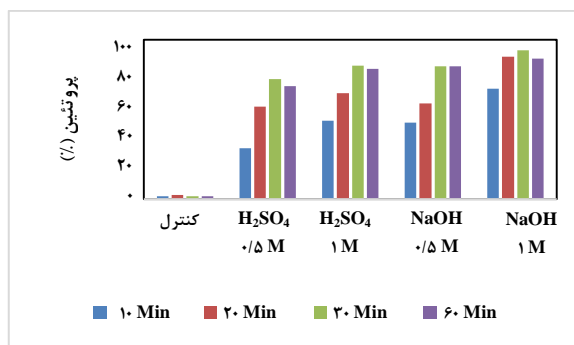
شکل ۲. استخراج پروتئین با استفاده از امواج فراصوت.



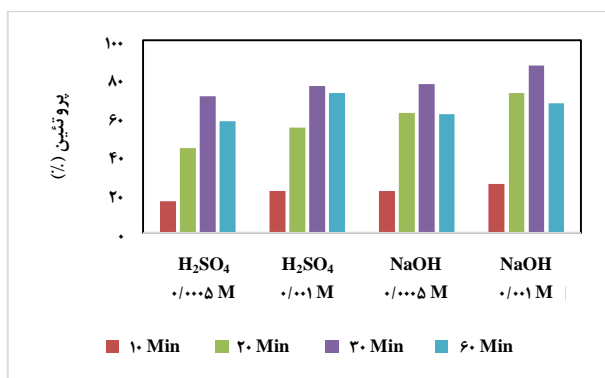
(الف)



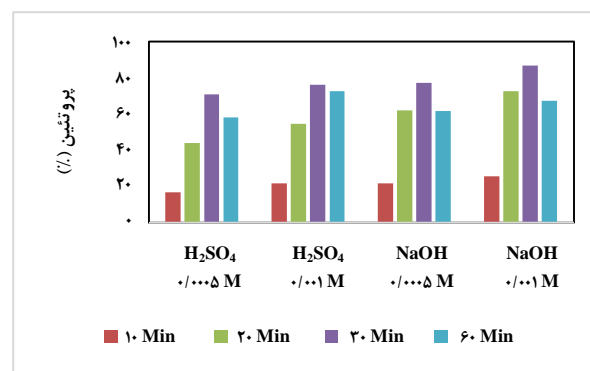
(ب)



(پ)



(ث)



(ت)

شکل ۳. استخراج پروتئین با استفاده از اسید و باز (الف) دمای ۳۰°C (ب) دمای ۶۰°C (پ) دمای ۱۲۱°C

(ت) باز رقیق در دمای ۳۰°C (ث) باز رقیق در دمای ۶۰°C

کردند که نتایج، حاکی از بیشترین میزان حلالیت در pH مابین ۷ تا ۱۱ بود.

۳-۲-۳ اثر امواج فراصوت و قلیا به صورت متوالی

هر پیش تیماری، نقاط قوت و محدودیت‌های خاص خود را دارد؛ به‌عنوان مثال امواج فراصوت با ایجاد حباب‌های پرفشاری در داخل سامانه‌های سلولی، باعث تخریب دیواره سلولی می‌شوند [۲۶]. اثر

مشخص شده است که محلول قلیایی هم‌زمان باعث تضعیف دیواره سلولی و افزایش حلالیت پروتئین می‌شود [۲۸ و ۳۶] محلول قلیایی معمولاً به دلیل حلالیت مطلوب پروتئین در pH قلیایی در استخراج پروتئین استفاده می‌شود [۴۰]. نتایج تحقیق حاضر مبنی بر حلالیت مطلوب پروتئین در محلول قلیایی مطابق با نتایج پاریمی و همکاران [۳۶] است؛ ایشان در تحقیقی تأثیر حلالیت پروتئین استخراجی از ریز جلبک اسپیرولینا را در بازه pH ۲ تا ۱۲ بررسی

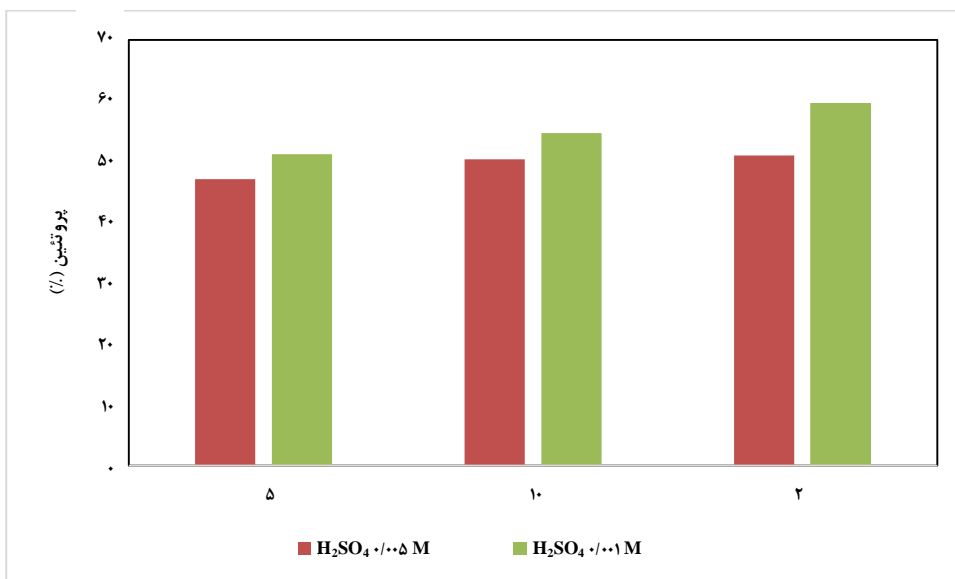
فرایند فردی است [۴۳]؛ زیرا می‌تواند بازده تخریب دیواره سلولی را بدون نیاز به انرژی زیاد افزایش دهد [۲۵].

۳-۲-۴ اتولیز

فرایند اتولیز در دماهای مختلف 30°C ، 50°C ، 60°C و 90°C در مدت زمان ۱۰ دقیقه، ۳۰ دقیقه و ۱، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد. در شکل (۵) الف و ب) نتایج حاصل از اتولیز ریزجلبک در دماهای 30°C ، 50°C ، 60°C و 90°C در دوره ۱۰ دقیقه، ۳۰ دقیقه، ۱، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داده شده است. شکل (۴) الف) نشان‌دهنده فرایند اتولیز به صورت پیوسته است، در حالی که در شکل (۵) ب) نتایج فرایند اتولیز با انجماد سریع ۱۰ دقیقه‌ای در طول بازه زمانی یک ساعت است. نمونه کنترل در دمای 4°C انجام شده است. همان‌طور که در شکل (۴) الف) مشاهده می‌شود، با افزایش دما میزان آزادسازی پروتئین افزایش یافته است که نشان‌دهنده نقش تأثیرگذار دما در فرایند اتولیز است. اتولیز در دمای 30°C تأثیر زیادی بر روی ریزجلبک نداشته است و در انتهای ۴۸ ساعت ۱۶ درصد پروتئین از ریزجلبک آزاد شده است. نتایج دماهای 50°C و 60°C نزدیک به هم بوده و در انتهای بچ^۲ به ترتیب به ۴۹ و ۵۳ درصد و در دمای 90°C در انتهای ۴۸ ساعت به ۵۸ گرم بر لیتر رسیده است؛ درحالی‌که نتایج اتولیز در آب جوش همانند 90°C بوده و آزادسازی پروتئین ۵ درصد بالاتر است.

مکانیکی امواج فراصوت می‌تواند با تسهیل دسترسی حلال از راه ایجاد اختلال در دیواره سلولی و افزایش نرخ انتقال جرم، حلالیت پروتئین را افزایش دهد [۴۱]. در این روش ابتدا محلول ریزجلبک در معرض امواج فراصوت به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و در ادامه از محلول‌های بازی با غلظت‌های ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۵ مولار برای استخراج پروتئین استفاده شد. قرارگرفتن ریزجلبک در معرض پیش‌تیمار متوالی امواج فراصوت و قلیا، بالاترین بازده را در مقایسه با تیمارهای امواج فراصوت و قلیا به صورت مجزا نشان داد، همان‌طور که در شکل (۴) مشاهده می‌شود این میزان افزایش بازده در حالت استفاده از محلول بازی ۰/۰۰۱ مولار سود، ۲۷٪ بالاتر است. همین‌طور با توجه به شکل (۴) اثر سود ۰/۰۰۱ مولار بالاتر از سود ۰/۰۰۵ است؛ دلیل استفاده نکردن از اسید به دلیل بازدهی پایین‌تر آن نسبت به قلیا است.

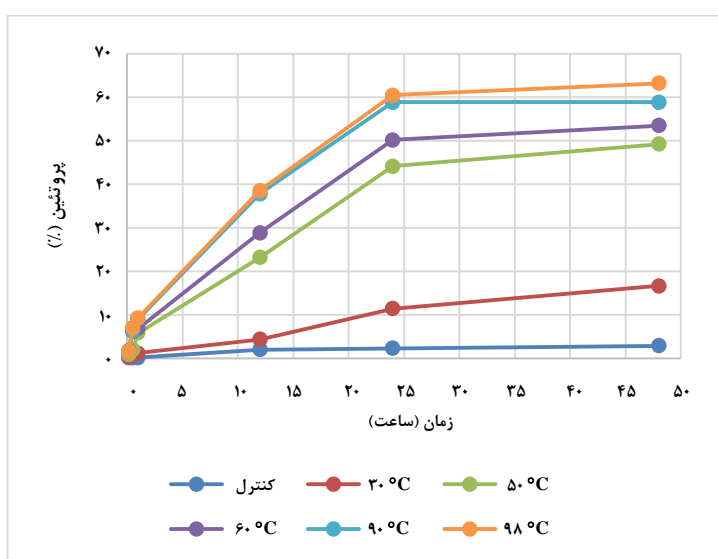
نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پیش‌تیمار کردن با تلفیق روش قلیایی و فراصوت، نه تنها کاستی‌های هر دو روش را جبران می‌کند، بلکه منجر به بازده بیشتر در استخراج پروتئین می‌شود. نتایج به دست آمده از این تحقیق با نتایج مطالعه جدیدی که شامل استخراج پروتئین از ریزجلبک دریایی قهوه‌ای ایرلندی آسکوفیلوم نودوسوم^۱ است تطابق دارد. نتایج آن‌ها نشان داده است که روش استخراج مبتنی بر قلیا می‌تواند پس از ترکیب با امواج فراصوت افزایش یابد [۴۲]. فرایند متوالی به‌طور کلی کارآمدتر و اقتصادی‌تر از



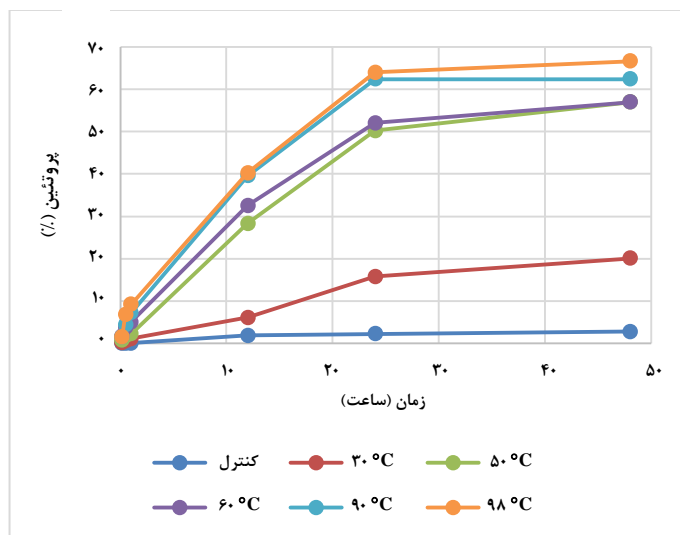
شکل ۴. اثر امواج فراصوت و قلیا به صورت متوالی.

محیط کشت تحت اتولیز در دمای منفی 20°C برای مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. هدف از این کار بررسی تأثیر انجماد سریع بر تخریب پوشش سلولی ریزجلبک است؛ همان‌گونه که مشاهده می‌شود با اعمال شرایط انجماد بعد از یک ساعت بازدهی روش اتولیز به میزان ۳ تا ۱۰ درصد افزایش یافته است. این مقدار افزایش در استخراج پروتئین می‌تواند به دلیل تحلیل رفتن دیواره سلولی ریزجلبک در اثر انجماد و گرم‌کردن‌های پی‌پی برای ۴۸ ساعت باشد که با انجماد و افزایش حجم آب موجب تحلیل ساختار دیواره سلولی می‌گردد.

نکته قابل توجه، نداشتن تغییر محسوس بعد از ۲۴ ساعت است که در 30°C ، 50°C ، 60°C ، 90°C و 98°C به ترتیب ۱۱، ۴۴، ۵۰، ۵۸ و ۶۰ درصد است که در بیشترین حالت افزایش ۱۰ درصدی را نشان می‌دهد. تفاوت میزان استخراج بین دماهای 60°C و 50°C با 60°C و 90°C به میزان ۵ درصد است که نشان‌دهنده کاهش تأثیر عامل دمایی بر میزان استخراج در دماهای بالای 60°C است؛ به همین دلیل دمای 60°C به عنوان دمای بهینه برای فرایند اتولیز انتخاب شد. در شکل (۵) (ب) نتایج فرایند اتولیز با یک تغییر نشان داده شده است؛ در این بخش از آزمایش‌ها در فاصله‌های زمانی یک ساعت،



(الف)



(ب)

شکل ۵. اثر اتولیز بر استخراج پروتئین از ریزجلبک (الف) استخراج به وسیله فرایند اتولیز (ب) استخراج به وسیله فرایند اتولیز به همراه وقفه‌های انجمادی.

- [5] Shokrkar, H., Ebrahimi, S., Zamani, M., "Enzymatic hydrolysis of microalgal cellulose for bioethanol production, modeling and sensitivity analysis" *Fuel*, 228, pp. 245-258, (2018).
- [6] Colman, B., Rotatore, C., "Photosynthetic inorganic carbon uptake and accumulation in two marine diatoms. *Plant Cell Environ*", pp. 919-934, (1995).
- [7] Cheah, W. Y., Show, P. L., Chang, J. S., Ling, T. C., Juan, J. C., "Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae", *Bioresour Technol*, pp. 190-201, (2015).
- [8] Taberero, A., Martín del Valle, E. M., Galán, M. A., "Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics", *Biochem Eng J*, pp. 104-115, (2012).
- [9] Chisti, Y., "Biodiesel from microalgae", *Biotechnology advances*, 25(3), pp. 294-306, (2007).
- [10] Carneiro, M., Pradelle, F., "Potential of biofuels from algae: Comparison with fossil fuels, ethanol and biodiesel in Europe and Brazil through life cycle assessment (LCA)", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73, pp. 324-331, (2017).
- [11] Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., "Biodiesel production from oleaginous microorganisms", *Renewable energy*, 34(1), pp. 1-5, (2009).
- [12] Gao, M. T., Shimamura, T., Ishida, N., Takahashi, H., "Investigation of utilization of the algal biomass residue after oil extraction to lower the total production cost of biodiesel" *Journal of bioscience and bioengineering*, 114(3), pp. 330-333, (2012).
- [13] Norambuena, F., Hermon, K., Skrzypczyk, V., Emery, J. A., Sharon, Y., Beard, A., "Algae in Fish Feed: Performances and Fatty Acid Metabolism in Juvenile Atlantic Salmon", *Pond DW, PLoS One*, pp. 498-506, (2015).
- [14] Muto, M., Nojima, D., Yue, L. H. K., "Potential of water surface-floating microalgae for biodiesel production: Floating-biomass and lipid productivities", *J of bioscience*, pp. 124-132, (2017).
- [15] Tran, D. T., Chen, C. L., Chang, J. S., "Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using" *Bioresour technology*, 135, pp. 213-231, (2013).
- [16] Roy, S. S., Pal, R., "Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics" In *Proceedings of the Zoological Society*, Vol. 68, No. 1, pp. 1-8, (2015).
- [17] Manirafasha, E., Ndikubimana, T., Zeng, X., Lu, Y., Jing, K., "Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochem Eng J* pp: 282-296, (2016).

۴. نتیجه‌گیری

استخراج بهینه محتوای سلول نیاز به شکستن و یا نفوذپذیرشدن دیواره‌های سلول دارد. ایجاد یک روش ساده و سریع شکستن دیواره سلول که مقرون به صرفه، مقیاس‌پذیر و سازگار با محیط باشد، بسیار ضروری است. در این مطالعه، تأثیر روش‌های مختلف پیش‌ تیمار بر آزادسازی پروتئین از ریز جلبک ارائه شد؛ برای کشت ریز جلبک از ریز جلبک مختلط استفاده شد و نتایج نشان دادند که پیش‌ تیمار قلیایی نقش مهمی در تخریب دیواره سلولی و حلالیت پروتئین دارد. در این تحقیق امواج فراصوت قدرت بالایی در شکستن دیواره سلولی و آزادسازی پروتئین در مدت زمان‌های پایین از خود نشان دادند. استفاده از پیش‌ تیمار ترکیبی (قلیایی + امواج فراصوت) با استخراج ۲۷ درصد بالاتر از روش قلیایی، که به راحتی می‌توان آن را برای فرایندهای زیستی در مقیاس بزرگ به کار برد، در افزایش استخراج پروتئین مؤثر بود. بر اساس نتایج به دست آمده، می‌توان نتیجه گرفت که پیش‌ تیمار ترکیبی امواج فراصوت و قلیا مؤثرترین روش استخراج پروتئین با توجه به مقرون به صرفه بودن و سازگاری با محیط زیست است. همچنین، در این تحقیق برای اولین بار از روش ترکیبی اتولیز به همراه انجماد محیط در منفی ۲۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه در بازه‌های زمانی یک ساعت استفاده شد؛ نتایج نشان‌دهنده افزایش بازدهی فرایند اتولیز به میزان ۳ الی ۱۰ درصد بود.

مراجع

- [1] Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., "Microalgae for biodiesel production and other applications: a review", *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), pp. 217-232, (2010).
- [2] Brennan, L., Owende, P., "Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products", *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), pp. 557-577, (2010).
- [3] Pulz, O., Scheibenbogen, K., "Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. In: *Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis*". Springer Berlin Heidelberg, pp. 123-52, (2007).
- [4] Shokrkar, H., Abbasabadi, M., Ebrahimi, S., "Model-based evaluation of continuous bioethanol production plant", *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(1), pp. 11-20, (2019).

- [18] Chen, C. Y., Zhao, X. Q., Yen, H. W., Ho, S. H., Cheng, C. L., Lee, D. J., "Microalgae-based carbohydrates for biofuel production", *Biochem Eng J.*, pp. 1-10, (2013).
- [19] Sambusiti, C., Bellucci, M., "Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: a comprehensive review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 44, pp. 20-36, (2015).
- [20] Vanthoor- Koopmans, M., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., Eppink, M. H., "Biorefinery of microalgae for food and fuel", *Bioresour Technol*, pp. 142-149, (2013).
- [21] Spolaore, P., Joannis- Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., "Commercial applications of microalgae", *J Biosci Bioeng*, pp. 87-96, (2006).
- [22] Solana, M., Rizza, C., "Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*", *Chlorella*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, pp. 311-318, (2014).
- [23] Mooij, P., Stouten, G., "Survival of the fattest", *Energy & Environmental Science*, 6(12), pp. 3404-3406, (2013).
- [24] Ciudad, G., Rubilar, O., Azócar, L., Toro, C., Cea, M., Torres, Á., "Performance of an enzymatic extract in *Botryococcus braunii* cell wall disruption", *J Biosci Bioeng*, pp. 75-80, (2014).
- [25] Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia- Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R. H., "Cell disruption for microalgae biorefineries", *Biotechnol Adv*, pp. 243-260 (2015).
- [26] Safi, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., "Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods", *Algal Res*, 3, pp. 61-65 (2014).
- [27] Piasecka, A., Krzemińska, I., Tys, J., "Physical methods of microalgal biomass pretreatment", *International Agrophysics*, 28(3). pp. 341-8, (2014).
- [28] Safi, C., Frances, C., Ursu, AV., Laroche, C., Pouzet, C., Vaca- Garcia, C., "Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase", *Algal research*, 8, pp. 61-68, (2015).
- [29] Foley, P. M., Beach, E. S., Zimmerman, J. B., "Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges", *Green Chemistry*, 13(6), pp. 1399-1405. 2011).
- [30] شکرکار، ه.، "بررسی استخراج کربوهیدراتها از ریز جلبک جهت تولید اتانول"، پایان‌نامه دکتری، دانشگاه صنعتی سهند (۲۰۱۷).
- [31] Postma, P., Miron, T., Olivieri, G., "Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling", *Bioresource technology*, 184, pp. 297-304, (2015).
- [32] Waterborg, J. H., "The Lowry Method for Protein Quantitation", in *The protein protocols handbook*, pp.7-10, Humana Press, Totowa, NJ, (2009).
- [33] Mendes- Pinto, M. M., Raposo, M. F. J., Bowen, J., Young, A. J., Morais, R., "Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: Effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability", *J Appl Phycol*, 13(1), pp. 19-24, (2001).
- [34] Show, K., Lee, D., Tay, J., Lee, T., "Microalgal drying and cell disruption—recent advances", *Elsevier , Bioresource technology*, 184, pp. 258-266, (2015).
- [35] Guldhe, A., Singh, B., Rawat, I., Ramluckan, K., Bux, F., "Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production", *Fuel*, 128, pp. 46-52 (2014).
- [36] Parimi, N. S., Singh, M., Kastner, J.R., Das, K. C., Forsberg, L. S., Azadi, P., "Optimization of protein extraction from *Spirulina platensis* to generate a potential co-product and a biofuel feedstock with reduced nitrogen content", *Front Energy Res*, 3, pp. 256-263 (2015).
- [37] Araujo, G., Matos, L., "Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method", *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), pp. 95-98 (2013).
- [38] Kim, J., Yoo, G., Kim, K., Lee, H., Lim, J., Kim, W., "Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae", *Biotechnology advances*, 31(6), pp. 862-76 (2013).
- [39] Costa, G., Plazanet, I., "Plant cell wall, a challenge for its characterisation", *Plant cell wall*, pp. 1-6 (2016).
- [40] Boye, J. I., Barbana, C., "Protein Processing in Food and Bioproduct Manufacturing and Techniques for Analysis", *Food and industrial bioproducts and bioprocessing*, 10, pp. 85-113 (2015).
- [41] Gerde, J. A; Wang, T., Yao, L., Jung, S., Johnson, L. A., Lamsal, B., "Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass", *Algal Res*, 2(2), pp. 145-153 (2013).
- [42] Kadam, S. U., Álvarez, C., Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., "Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum*", *Food Res Int*, 99, pp. 1021-7 (2017).
- [43] Wang, D., Li, Y., Hu, X., Su, W., Zhong, M., "Combined Enzymatic and Mechanical Cell Disruption and Lipid Extraction of Green Alga *Neochloris oleoabundans*", *International journal of molecular sciences*, 16(4), pp. 7707-22 (2015).