مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲)

مقایسه تاثیر روش‌های مختلف تخریب دیواره سلولی *Chlorella vulgaris* ISC-23 و *Spirulina platensis* PCC9108 بر میزان لیپید استخراج شده جهت تولید بیودیزل

سید مهدی حسینی*[1]، فاطمه منتظری هدش[2]، سعید افشارزاده[3]

[1]کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

[2] کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

[3]استادیار گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۲٤

چکیده

از آنجا که لیپید مستخرج از ریزجلبک ها شدیداً متاثر از روش انتخابی برای تخریب و شکستن سلول‌ها می‌باشد، یک انتخاب مناسب می‌تواند در کمیت و کیفیت بیودیزل تولیدی حائز اهمیت با شد. در این پژوهش با مقایسه چندین روش متفاوت، شامل اتوکلاو، انجماد، امواج مایکروویو، امواج اولتراسوند، بیدهای شیشه‌ای و هموژنایزر با فشار بالا، موثرترین شیوه تخریب سلول‌های ریزجلبکی (یوکاریوتی و پروکاریوتی) به منظور استخراج لیپید مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام آزمایش از ریزجلبک یوکاریوتی *Chlorella vulgaris* به عنوان نمونه‌ای از ریزجلبک‌هایی با دیواره سلولی سلولزی و ریز جلبک سبز آبی *Spirulina platensis* با دیواره‌ای مشابه باکتری‌های گرم منفی، استفاده شد. در مورد هر دو ریزجلبک مورد مطالعه نتایج نشان داد که میزان لیپید کل استخراج شده بر اساس شیوه شکستن سلول، متفاوت است. این مقادیر برای *Spirulina platensis* از ۱۸/۲ تا ۷/۲ و برای *Chlorella vulgaris* از ۴۳/۱-۱۸/۳ درصد از وزن خشک متفاوت بود. به طور کلی و با توجه به نتایج پژوهش حاضر، در هر دو نوع ریزجلبک یوکاریوتی و پروکاریوتی، کارا ترین روش تخریب سلول‌ها و استخراج لیپید جهت تولید بیودیزل از آنها، اتوکلاو کردن و امواج مایکروویو بود.

واژه‌های کلیدی: *استخراج لیپید، بیودیزل، دیواره سلول، روش‌های تخریب سلول، ریزجلبک.*

* نویسنده مسئول: سیدمهدی حسینی تلفن: ۰۹۳۵۵۸۸۸۷۹۳ Email:**sm.hoseini11@gmail.com**

مقدمه

بحران انرژی و گرم شدن جهانی زمین بر اثر مصرف سوخت‌های فسیلی، یکی از نگرانی‌های جامعه بین‌المللی محسوب می‌شود. در این راستا، هم‌اکنون تلاش‌های زیادی در جهت تولید بیودیزل توسط گیاهان، ریزجلبک‌ها و حتی روغن‌های حیوانی در حال انجام است تا به عنوان یک منبع انرژی جایگزین فراگیر شوند (Vasudevan & Briggs, 2008). مصرف بیودیزل دو مزیت عمده دارد؛ حذف دی‌اکسید کربن و جایگزینی مواد نفتی (Chisti, 2008). در این میان استفاده از ریزجلبک-ها جهت تولید بیودیزل، در مقایسه با سایر روش‌ها مزایای مشخصی دارد که می توان به سرعت رشد بالا و تولید بیومس زیاد در زمان کوتاه، فضای مورد استفاده کم اشاره کرد (Milne *et al*., 1990). فرایندهای اصلی تولید بیودیزل توسط ریزجلبک‌ها شامل کشت، برداشت، استخراج لیپید و ترانس-استریفیکاسیون لیپیدها می‌باشد. اگرچه تمام این مراحل مهم و ضروری هستند، ولی شکسته شدن سلول‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، به طوریکه میزان لیپید استخراج شده براساس شیوه مورد استفاده در شکستن سلول‌ها متفاوت است. بنابراین، استفاده از روش و وسیله مناسب جهت تخریب سلول‌ها یک مرحله کلیدی و مهم جهت افزایش کارایی استخراج لیپید می‌باشد (Grima *et al*., 2003). به طور کلی روش‌های تخریب دیواره سلول را می‌توان به دو دسته تقسیم نمود؛ اول روش‌های مکانیکی مانند هموژنیز کردن سلول‌ها، استفاده از ذرات شیشه‌ای، امواج التراسونیک، اتوکلاو کردن و دوم روش‌های غیر مکانیکی از جمله انجماد، استفاده از حلال‌های آلی، شوک اسمزی، تیمارهای شیمیایی مانند اسید و باز، و تیمارهای آنزیمی (Grima *et al*., 2003; Mata *et al*., 2010).

در انتخاب یک روش مطلوب جهت تخریب سلول‌ها می‌بایست عواملی مانند نوع دیواره سلولی ریزجلبک، طبیعت و کیفیت متابولیت مورد نظر و ابعاد کار(تجاری یا آزمایشگاهی) در نظر گرفته شود (Grima *et al*., 2003; Mata *et al*., 2010). به عنوان مثال امواج مایکروویو که سلول‌ها را با استفاده از شوک ناشی از امواج با فرکانس بالا می-شکنند، یکی از روش‌های موثر برای استخراج روغن‌های گیاهی می‌باشد (Cravotto *et al*., 2008; Virot *et al*., 2008). از طرفی ذرات ریز شیشه که هم در مقیاس آزمایشگاهی و هم در مقیاس صنعتی مورد استفاده است، با آسیب‌های مکانیکی مستقیم بر روی سلول‌ها باعث تخریب آنها می‌گردد (Geciova *et al*., 2002; Lee *et al*., 1998). یکی دیگر از روش‌هایی که بصورت گسترده جهت شکستن سلول‌های میکروبی در مقیاس آزمایشگاهی استفاده می‌شود امواج التراسونیک است (Engler, 1985). امواج التراسوند

امواجی با فرکانس بالاتر از KHz ۲۰-۱۵ می‌باشند که برای گوش انسان غیرقابل شنیدن است. این امواج در ابتدا باعث غیرفعال‌سازی سلول‌ها می-شود، ولی در قدرت بالا موجب تخریب سلول می-گردد. مکانیسم تخریب توسط این امواج به علت ایجاد حفرات ریز متعدد در مایع است، که پس از تشکیل به یکباره تخریب شده و مقدار زیادی از انرژی صوتی را به انرژی مکانیکی (امواج الاستیک) تبدیل و دیواره‌ی سلولی را تخریب می‌کند (Chisti & Moo-Young, 1986).

تعیین روش‌های بهینه جهت تخریب سلول-های جلبکی می‌تواند در استخراج بهتر چربی از این سلول‌ها و افزایش محصول کمک کننده باشد. در همین راستا، در این پژوهش از دو نوع ریزجلبک استفاده گردید؛ یکی *Chlorella vulgaris* به عنوان یک ریزجلبک سبز یوکاریوتی با دیواره‌ای سخت از جنس سلولز و دیگری ریزجلبک رشته‌ای به نام *Spirulina platensis* که نماینده جلبک‌های سبز-آبی است (البته برخی آن را یک میکروارگانیسم پروکاریوتی با دیواره‌ای از جنس پروتئین، مشابه باکتری‌های گرم منفی می دانند). روش‌های شکست سلولی که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت شامل حرارت دادن در اتوکلاو، منجمد کردن در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد، امواج مایکروویو، امواج اولتراسونیک، هموژن کردن با فشار بالا و ذرات ریز شیشه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

محیط کشت ریزجلبک‌ها

جهت کشت ریزجلبک *Spirulina platensis* PCC9108 (که از از انستیتو پاستور فرانسه خریداری گردید) از یک محیط کشت تعدیل شده که مخلوطی از محیط‌های کشت ASN-III و BG-11 با نسبت حجمی ۱:۱ است، استفاده گردید. همچنین کشت ریزجلبک *Chlorella vulgaris* ISC-23 (که از مرکز جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد) در محیط کشت استاندارد BG-11 انجام گرفت (Chang & Yang, 2003; Ghasemi *et al*., 2010).

شرایط کشت ریزجلبک‌ها

نمونه‌های خالص هر یک از ریزجلبک‌ها در ارلن مایر یک لیتری (حاوی ۷۰۰ ml محیط کشت استریل) کشت شد. دمای اتاق کشت بین ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتیگراد و شدت نور آن با استفاده از لوکس متر Lux-UV-IR Meter (مدل LEYBOLD 666 230) در دامنه ۲۰۰Lx ± ۳۶۰۰ تنظیم گردید (Fan *et al*., 2008). سیکل روشنایی- تاریکی (۱۶/ ۸) اعمال و برای همگن سازی محیط کشت از شیکر استفاده شد، که سرعت آن برای *C. vulgaris* ، ۱۰۰ rpm و برای *S. platensis* ، که بزرگتر و مارپیچی شکل است، ۱۲۰ rpm تنظیم گردید.

روش استخراج و محاسبه محتوی لیپید کل

جهت استخراج لیپید کل از روش Bligh و Dyer استفاده شد (Bligh & Dyer, 1959; Chiu *et al.*, 2008) که به صورت خلاصه شامل مراحل زیر می‌باشد. پس از نمونه‌گیری از محیط کشت، سلول‌ها توسط سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰rpm جدا شدند. یکبار توسط آب اسیده و یکبار توسط آب مقطر شستشو داده شدند. در آخر رسوب سلولی تحت تیمارهای متفاوت جهت شکستن سلول‌ها قرار گرفت. برای استخراج لیپید، نمونه‌ها در محلولی شامل دو حلال متانول و کلروفرم با نسبت حجمی ۲ به ۱ حل شد. سپس توسط ورتکس، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه به شدت مخلوط شد. در مرحله بعد کلروفرم و کلرید سدیم ۱٪ اضافه شد، تا در آخر مخلوط بدست آمده دارای نسبت ۲ متانول/ ۱ کلروفرم / ۱ کلرید سدیم ۱٪ باشد. حلال حاوی بیومس حل شده را درون یک دکانتور[1] ریخته و اجازه داده می‌شود فاز آلی (شامل کلروفرم و لیپید کل) و فاز آبی از هم جدا شوند. بین این دو فاز نیز توده چربی گیری شده سلول‌ها قرار دارد. در نهایت کلروفرم در روتاری تبخیر و جدا می‌شود. بقایای بجا مانده از تبخیر کلروفرم را وزن کرده و درصد لیپید کل گزارش گردید.

1 - Decanter

روش‌های شکستن سلول

در این پژوهش ٦ روش متداول شکستن سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت که در ادامه به جزئیات و شرایط دقیق هر روش اشاره می‌گردد.اتوکلاو کردن؛ حرارت دادن یکی از روش‌های مورد استفاده جهت تخریب دیواره و غشای سلول است. نمونه‌ها در این روش به مدت ۵ دقیقه در دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ ℃ و فشار ۱/۵ بار قرار گرفتند. در نتیجه حرارت و فشار بالا، سلول‌ها به خوبی تخریب می‌شوند. منجمد کردن؛ انجماد باعث تشکیل بلورهای یخ در داخل سلول می‌شود. هرچه این فرایند آهسته‌تر صورت گیرد، بلورهای تشکیل شده بزرگتر بوده و آسیب بیشتری به دیواره و غشای سلول وارد می‌کند. در نتیجه استفاده از فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد جهت شکستن سلول مطلوب‌تر از انجماد در دماهای کمتر می‌باشد. امواج مایکروویو (با تولید دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد و ۲٤٥٠ MHz)؛ در این روش نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در مایکروویو قرار گرفتند که بوسیله حرارت بالایی که ایجاد می شود دیواره سلولی ریزجلبکها از هم پاشیده و استخراج لیپید تسهیل می گردد. امواج اولتراسونیک؛ این امواج دیواره سلولی و غشای سلول را بدلیل ایجاد حفرات متعدد، تخریب می‌کنند. در این روش از اولتراسونیکاتور VP200H به مدت ۵ دقیقه (پالس‌های ۳۰ ثانیه‌ای) استفاده شد. هموژن کردن با فشار بالا؛ جهت هموژن کردن

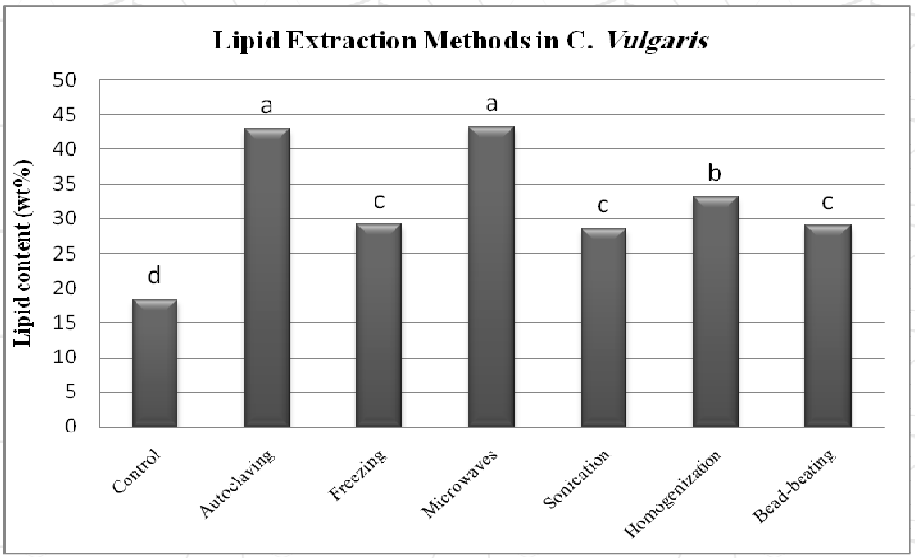
سلول‌ها از دستگاه هموژنیزر Heidolph Diax 900 استفاده شد. کل فرایند هموژن کردن به مدت ۵ دقیقه، در پالس‌های ۳۰ ثانیه‌ای، انجام شد. ذرات ریز شیشه‌ای؛ یکی از روش‌های آزمایشگاهی مرسوم در شکستن سلول، استفاده از ذرات شیشه است. این ذرات به نمونه اضافه شده و سپس به مدت ۵ دقیقه توسط ورتکس به شدت مخلوط گردید.

روش‌های آماری

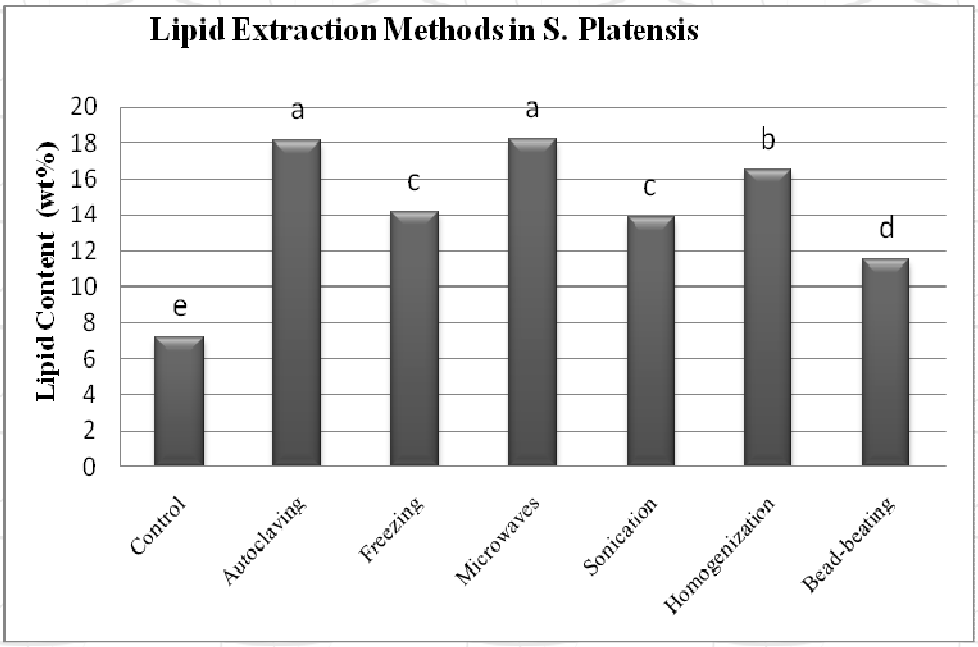
به منظور مقایسه میانگین لیپید استحصالی به وسیله روش‌های مختلف شکست سلولی، با استفاده از نرم SPSS، آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه به انجام شد. پس آزمون دانکن بمنظور مقایسات چندگانه روش‌های مختلف شکست مورد استفاده قرار گرفت. سطح معنی داری آماری ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

نتایج

آزمون ANOVA یک طرفه نشان داد که بین روش‌های مورد بررسی شکست سلول در هر دو گونه ریزجلبک موردنظر، در سطح معنی داری ۰/۰۵، تفاوت آماری معنی داری وجود دارد ($P<0.05$). به عنوان نمونه شاهد، هیچ یک از روش‌های شکستن سلول اعمال نگردید. پس آزمون دانکن نشان داد که میانگین میزان استحصال چربی از ریزجلبک *C.vulgaris* توسط تمامی روش‌های مورد بررسی، به صورت معنی داری بالاتر از میانگین این مقدار در گروه کنترل (شاهد) بود. از بین روش‌های مقایسه شده، اتوکلاو کردن و امواج مایکروویو بهترین گزینه برای تخریب سلول‌های ریزجلبک *Chlorella vulgaris* بود، در حالی‌که امواج التراسونیک، ذرات شیشه‌ای و انجماد نتایج مشابهی را نشان داده و از کمترین کارایی در استخراج چربی برخوردار بودند. با این وجود، روش هموژناسیون کارایی بیشتری نسبت به التراسونیک، ذرات شیشه‌ای و انجماد داشت. نتایج آماری و میزان چربی استخراجی از *C.vulgaris* در شکل ۱ آمده است. مقایسات میانگین در مورد *S.platensis* نیز حاکی از معنی داری اختلافات در میانگین استحصال چربی در تمامی روش‌های مورد بررسی نسبت به گروه کنترل بود. همچنین کارایی شکستن سلول توسط اتوکلاو کردن و امواج مایکروویو دارای عملکرد مشابهی بود و در بین تمامی روش‌های بررسی شده، بیشترین میزان چربی توسط این دو روش بدست آمد. از طرفی بین روش‌های انجماد و التراسونیک نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد، در حالی که روش هموژناسیون کارایی بیشتری داشت. نتایج آماری و میزان چربی استخراجی از ریزجلبک *S.platensis* در شکل ۲ آمده است.



شکل ۱- لیپید مستخرج بر اساس روش‌های متفاوت شکستن سلول در ریز جلبک *Chlorella vulgaris* (حروف متفاوت در بالای هر ستون نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد).



شکل ۲- لیپید مستخرج بر اساس روش‌های متفاوت شکستن سلول در ریز جلبک *Spirulina platensis* (حروف متفاوت در بالای هر ستون نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد).

بحث

دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها سخت‌تر از چیزی است که به نظر می‌رسد. فشار داخلی یک میکروارگانیسم همانند *Micrococcus lysodeikticus* یا *Sarcina lutea* حدود ۲۰ اتمسفر است و ساختاری که مسئول حفظ این استحکام است، همان دیواره سلولی میکروارگانیسم است (Chisti & Moo-Young, 1986). دیواره سلولی کریپتوفیت‌ها به راحتی شکسته می‌شود، ولی در مورد سیانوباکتریها دیواره‌ی آنها بسیار سخت و محکم است (Siegelman & Kycia, 1978). مشاهده مقطع عرضی *S.platensis* در زیر میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که دیواره سلولی آن از ٤ لایه تشکیل شده است، که مشابه دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی بوده و قسمت عمده آن را لایه پپتیدوگلیکان تشکیل داده است (Richmond, 2006; Vonshak, 2002). ریزجلبک *C.vulgaris* نیز حاوی دیواره‌ای سخت از جنس سلولز است. بنابراین تخریب دیواره‌ی سلولی این دو ریزجلبک به روش موثری نیاز دارد.

در این پژوهش مشخص شد که کارایی امواج مایکروویو و اتوکلاو در شکست سلولی و استخراج چربی از هر دو گونه‌ی مورد مطالعه، نسبت به سایر روش‌های مقایسه شده، بیشتر است. همچنین بنظر می‌رسد که ریزجلبک *Chlorella vulgaris* نسبت به *Spirulina platensis* تا حدود ۳ برابر میزان لیپید بیشتری دارد (مقایسه میزان لیپید این دو گونه در پژوهش دیگری از همین محققین که در دست چاپ می باشد صورت گرفته است). به عنوان مثال Moraes و همکاران جهت استخراج C-فیکوسیانین از *S.platensis* و شکستن سلول‌ها چندین تیمار شیمیایی با اسید، انجماد و امواج التراسونیک را مورد مقایسه قرار دادند. نتایج آنها نشان دهنده بیشترین میزان C-فیکوسیانین استخراج شده توسط روش‌های التراسونیک و تیمار اسیدی بود (Moraes *et al.*, 2011). البته مقایسه این محققین صرفاً بین روش‌های ذکر شده بوده و از اتوکلاو یا مایکروویو استفاده نکرده‌اند. همچنین Zheng *et al.* (2011) نیز که چندین روش آنزیمی، انجماد در نیتروژن مایع و امواج مایکروویو را جهت شکستن دیواره سلولی *C.vulgaris* استفاده کردند،گزارش نمودند که یکی از موثرترین روش‌ها استفاده از مایکروویو است. Lee *et al.* (2010) نیز روش‌های متفاوتی را برای مقایسه شکستن سلول و استخراج چربی از ریزجلبک‌های *Botryococcus*، *Chlorella vulgaris* و *Scenedesmus* مورد مقایسه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که امواج مایکروویو و اتوکلاو بیشترین کارایی را دارند.. در بین روش‌های مکانیکی، کارایی هموژنیزر به عنوان یک روش مناسب در مقیاس صنعتی، توسط برخی از پژوهشگران اثبات شده است (Chisti & Moo-Young, 1986). در این ارتباط، نتایج نشان از

کارایی بالای این روش در هر دو ریزجلبک داشت، به طوری که پس از اتوکلاو و مایکروویو بیشترین استخراج لیپید توسط این روش صورت گرفت.

به طور کلی روش استخراج یک نکته‌ی کلیدی در بدست آمدن حداکثر پروتئین و چربی از جلبک‌ها می‌باشد (Lee *et al*., 2010; Niu *et al*., 2006). این روش‌ها بستگی زیادی به طبیعت و کیفیت متابولیت مورد نظر دارد. به عنوان مثال در مورد استخراج آستاگزانتین، Cravotto *et al*. (2008) روش‌های مختلفی را مورد بررسی قرار دادند و بهترین گزینه جهت استخراج این متابولیت از ریزجلبک *Haematococcus* را مربوط به استفاده از اتوکلاو و تخریب مکانیکی سلول‌ها اعلام کردند. در همین ارتباط قابل ذکر است که روش‌های شیمیایی همانند تیمار با اسید و باز، با وجود کارایی زیاد جهت تجزیه دیواره‌ی سلولی، برای استخراج محصولات حساسی همچون پروتئین‌ها مناسب نمی‌باشد. با این وجود تیمار قلیایی می‌تواند برای جدا کردن اسیدهای چرب آزاد مورد استفاده قرار گیرد. حلال‌های آلی مانند هگزان، اتانول، کلروفرم و دی‌اتیل‌اتر با تخریب غشای پلاسمایی می‌توانند تا حدودی بیومس را متلاشی کنند. این روش به طور گسترده برای استخراج متابولیت‌هایی مانند آستاگزانتین، بتا-کاروتن و اسیدهای چرب استفاده می‌گردد (Grima *et al*., 2003). همچنین برخی محققین از حلال‌های آلی جهت استخراج لیپید برای تولید بیودیزل استفاده کرده‌اند. در این مورد، مخلوطی از هگزان و اتانول ۹۶٪ بر روی بیومس لیوفیلیز شده اعمال می‌شود. با این وجود، اگر چه با این روش می‌توان لیپیدها را استخراج کرد، ولی ترکیبات دیگری همچون قندها، اسیدهای آمینه، نمک‌ها، پروتئین‌های هیدروفوب و پیگمنت‌ها نیز به صورت ناخواسته وارد فاز آلی می‌گردند (Cravotto *et al*., 2008).

از دیگر عوامل مهم در رابطه با شیوه تخریب سلول، ابعاد کار است، که بنابر مقیاسی که مورد نظر است، تجاری یا آزمایشگاهی، روش نیز تغییر می‌کند. به طور مثال Bubrick (1991) با استفاده از روش انجماد در ۱۷۰- درجه سانتیگراد (روش کریوژنیک) بیومس Haematococcus را جهت استخراج آستاگزانتین توسط butylated hydroxytoluene تیمار کرد. بدیهی است این روش برای مصارف تجاری منطقی نمی‌باشد. در عوض، استفاده از هموژنیزر جهت استخراج آستاگزانتین از بیومس ریزجلبک *Haematococcus* ، نسبت به دیگر روش‌ها بازده سه برابری دارد. همچنین با وجود کارایی زیاد امواج التراسونیک در برخی از گونه‌های باکتریایی و یا جلبکی، از این روش تنها می‌توان برای شکستن سلول در مقادیر کم بیومس استفاده کرد، در حالی که در مقیاس وسیع کاربردی نمی‌باشد (Grima *et al*., 2003).

پس از کشت و تولید انبوه میکروارگانیسم‌ها جهت مقاصد تجاری، در راستای فراوری بیوماس حاصله برای استحصال ترکیبات درون سلولی، مهمترین مسئله انتخاب یک روش مناسب برای شکستن سلول‌ها می‌باشد. اغلب روش‌هایی که در این مورد برای باکتری‌ها استفاده می‌شود را می‌توان برای ریزجلبک‌ها نیز اعمال نمود (Grima *et al*., 2003). به طور کلی در مقیاس صنعتی روش‌های مکانیکی برای شکستن سلول کارایی بیشتری داشته و مقرون به صرفه هستند. روش‌های آنزیمی و شیمیایی بیشتر در قیاس آزمایشگاهی کاربرد دارند. استفاده از چندین روش به صورت توأم نیز می‌تواند مفید باشد (Chisti & Moo-Young, 1986; Kula & Schütte, 1987). در هر دو گونه جلبک مورد بررسی، بالاترین کارایی به روش اتوکلاو کردن و امواج مایکروویو تعلق داشت. سپس به ترتیب روش هموژن کردن، انجماد، التراسونیک و ذرات شیشه‌ای در رتبه‌های بعدی اهمیت قرار داشتند. با این تفاوت که سه روش آخر در استحصال چربی از ریزجلبک *C.vulgaris* کارایی مشابهی داشتند اما کارایی ذرات شیشه‌ای در رابطه با ریزجلبک *S.platensis* پایین تر از دو روش دیگر بود. با توجه به کارایی بیشتر و سهولت استفاده از امواج مایکروویو، می‌توان به این نتیجه رسید که احتمالا مایکروویو از نظر مصارف صنعتی نیز گزینه‌ی قابل توجهی در استخراج چربی از سلول‌های ریزجلبکی می‌باشد.

سپاسگزاری

از خانم سارا عظیمی برای انجام آنالیز آماری نتایج و همچنین مسئولین آزمایشگاه تحقیقاتی (فیزیولوژی گیاهی) دانشگاه اصفهان برای همکاری سپاسگزاریم.

منابع

Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian journal of biochemistry physiology 37: 911-917.

Bubrick P, (1991). Production of astaxanthin from *Haematococcus*. Bioresource Technology 38: 237-239.

Chang EH, Yang SS (2003). Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. Botanical Bulletin of Academia Sinica 44: 43-52.

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

Chisti Y (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends Biotechnology 26: 126-131.

Chiu SY, Kaoa CY, Chen CH, Kuan TC, Ong SC, Lin CS (2008). Reduction of CO_2 by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. Bioresource Technology 99: 3389-3396.

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

Engler CR (1985). Disruption of microbial cells. Comprehensive Biotechnology, second ed. Pegamon Press: Oxford, England. pp: 305-324.

Fan LH, Zhang YT, Zhang L, Chen HL (2008). Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. Journal of Membrane Science 325: 336-345.

Geciova J, Bury D, Jelen P (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. International Dairy Journal 12: 541-553.

Ghasemi Y, Mohagheghzadeh A, Ostovan Z, Moshavash M, Rasoul-Amini A, Morowvat MH (2010). Biotransformation of some monoterpenoid ketones by *Chlorella vulgaris* MCCS 012. Chemistry of Natural Compounds 46: 734-737.

Grima EM, Belarbi EH, Acie´n Ferna´ndez FG, Robles Medina A, Chisti Y (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advances 20: 491-515.

Kula MR, Schütte H (1987). Purification of Proteins and the Disruption of Microbial Cell. Biotechnology Progress 3: 1-31.

Lee JY, Yoo C, Jun SY, Ahn CY, Oh HM (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Bioresource Technology 101: 75-77.

Lee SJ, Yoon BD, Oh HM (1998). Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. Biotechnology Techniques. 12: 553-556.

Mata TM, Martins A, Caetano NS (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14: 217-232.

Milne TA, Evans RJ, Nagle N (1990). Catalytic conversion of microalgae and vegetable oils to premium gasoline, with shape-selective zeolites. Biomass 21: 219-232.

Moraes CC, Sala L, Cerveira GP, Kalil SJ (2011). C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. Brazilian Journal of Chemical Engineering 28: 45-49.

Niu J-F, Wang G-C, Tseng C-K (2006). Method for Large-Scale Isolation and Purification of RPhycoerytrin Red Alga Polysiphonia urceolata Grev. Protein Expression and Purification 49: 1-23.

Richmond A (2006). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. 3nd ed, Blackwell Science Ltd. Australia. pp: 273-280.

Siegelman HW, Kycia HJ (1978). Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press, Cambridge. pp 71–79.

Vasudevan PT, Briggs M (2008). Biodiesel production-current state of the art and challenges. Journal of Indian Microbiology Biotechnology 35: 421-430.

Virot M, Tomao V, Ginies C, Visinoni F, Chemat F (2008). Microwave-integrated extraction of total fats and oils. Journal of Chromatography 4: 57-64.

Vonshak A (2002). *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor & Francis Publishers, London. pp.131-158.

Zheng H, Yin J, Gao Z, Huang H (2011). Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. Applied Biochemistry and Biotechnology 164: 1215-1224.

Comparison of cell disruption methods for extracting lipid from *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*

Hoseini S.M.[*1,3]; Montazeri F.[2]; Afsharzadeh S.[1]

[1]MSc., Plant physiology Division, Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
[2]MSc., Cell and molecular Division, Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
[3]Assistant Professor, Plant physiology Division, Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Abstract

Biodiesel production processes from microalgae include biomass harvesting, lipid extraction and transestrification. Undoubtedly, selection of a high-quality cell disruption method increased the efficiency of lipid extraction and so biodiesel production. Various methods, including autoclaving, freezing, bead-beating, microwaves, sonication and high pressure homogenization, were tested to identify the most effective cell disruption method. The total lipids from *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* were extracted using standard method. The total lipid contents from the tow species were 7.2-18.2 and 18.3-43.1 %DW respectively. Both microalgae showed the highest total lipid contents when the cells were disrupted using the microwave oven and autoclaving method. Thus, among the tested methods, the microwave oven method was identified as the most simple, easy, and effective for lipid extraction from microalgae.

Key words: *cell wall*, *cell disruption*, *lipid extraction*, s*pirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*

[*] Corresponding Author: Hoseini S.M. Tel: 09355888793 Email: sm.hoseini11@gmail.com