

## بهره گیری از ریز جلبک ها در تولید سوخت زیستی

محمود حافظیه<sup>۱</sup>

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

### چکیده

در دهه های اخیر بهره گیری از ریز جلبک ها در تولید سوخت های زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. به همین منظور نمونه های استوک از ۱۶ ریز جلبک کشور جمع آوری شدند. پرورش در محیط کشت BG-11 صورت گرفت و بعد از سانتریفوژ و خشک کردن، ترکیبات بیوشیمیایی آنها با روش های استاندارد آنالیز و بهترین آنها از حیث تولید روغن انتخاب گردید. همچنین تاثیر محیط های کشت مختلف بر ارزش غذایی گونه های با پتانسیل تولید روغن بیشتر، مورد مطالعه قرار گرفت. گونه *Isochrysis galbana* با داشتن ۲۳ درصد چربی بالاترین درصد چربی و *Nannochloris atomus* با ۲۱٪ چربی، *Isochrysis aff. Galbana* با ۲۰٪ چربی، و *Thalassiosira pseudonana* با ۱۹٪ چربی در رده های بعدی قرار گرفتند. بهترین محیط کشت برای تولید آزمایشگاهی ایزو کراسیس گالبنا، ES بود که به تولید ۲۸/۳۸٪ چربی و ۱۲/۰۹ گرم وزن خشک زی توده ریز جلبک بر لیتر انجامید. گرچه در خصوص سایر ریز جلبک ها از جمله دنالیلا ترتیولکتا نیز محیط کشت ES بهترین پاسخ را در بر داشت، ولی با محیط کشت F/2 در میزان چربی اختلاف معنی داری نشان نداد ( $P>0.05$ ). ریز جلبک ایزوکراسیس گالبانا و محیط کشت ES بترتیب به عنوان بهترین گونه و محیط کشت جهت تولید روغن سوخت زیستی انتخاب شدند.

کلید واژه ها: ریز جلبک ها، سوخت زیستی، ترکیبات غذایی، محیط کشت

جلبک ها تنها تولید کننده های اقیانوس ها هستند که حدود ۷۱٪ سطح کره زمین را پوشانده اند و منابع اصلی کربن فسیلی یافت شده در روغن و گازهای طبیعی هستند (Anderson, 2005). ریز جلبک ها، که حدود ۷۵٪ گونه های جلبکی را بخود اختصاص داده اند، در ایجاد ۴۰٪ اکسیژن اتمسفر شراکت دارند. اولین گزارش از کشت خالص ریز جلبک ها در سال ۱۸۹۰ توسط Beijerinck ارائه گردید ایشان همچنین با موفقیت ریز جلبک سبز همزیست با هیدر و گل سنگ ها را جداسازی و کشت نمود (Beijerinck, 1893). این جلبکهای میکروسکوپی با داشتن ذخایر چربی بالا، قادر به تولید سوخت زیستی هستند چراکه سوخت تولیدی توسط آنها براحتی تجزیه زیستی شده و قابل تجدید و بدون مواد سمی است و هیچگونه رقابت غذایی با محصولات کشاورزی ندارد. در مقایسه با روغن گیاهان خشکی که به منظور تولید بیودیزل از آنها استفاده می شود، روغن استحصالی از ریز جلبک ها در محتوای چربی بیشتر، نرخ رشد سریعتر و قابلیت رشد در آبهای شور که برای کشاورزی مناسب نیستند مزایا و ارجحیت بیشتری از خود نشان داده اند (Alcaine, 2010; Puppan, 2002). برخی از سویه های ریز جلبکی تا حد ۸۰-۵۰٪ وزن خشک خودشان چربی تولید و ذخیره می کنند. گونه ای از نانوکلوپسیس و گونه ای از نئوکلوپسیس نه تنها می توانند رشد انبوه بالای سلولی (به ترتیب حدود ۵۰ و ۲۷/۵ گرم در لیتر) را دارا شوند بلکه محتوای چربی آنها به ترتیب ۵۲ و ۴۶٪ خواهد بود (Moazami et al., 2011). همچنین Gouda و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که گونه ای از *Gordonia* اگر در شرایط مخصوص کشت یابند، توانایی تجمع چربی تا ۸۰٪ وزن خشک خود را خواهد داشت ولی میزان زی توده تولیدی نسبتا کم می باشد (کمتر از ۲ گرم بر لیتر). در بهره گیری از ریز جلبک ها به عنوان سوخت زیستی، باید هزینه تولید آنها، و به خصوص هزینه استخراج روغن از آنها پایین باشد تا صرفه اقتصادی داشته باشند. به همین منظور شناسایی سویه های مناسب که توان بالایی برای تولید و ذخیره چربی در خود را داشته باشند و همچنین توان تولید و رشد با تراکم بالا را داشته باشند در راه کاهش هزینه های تولید کمک خواهد نمود. حال اگر گونه های معرفی شده، نسبت به شرایط بد محیطی هم مقاومت نشان دهند به هدف بسیار نزدیک تر خواهیم شد. البته این مهم هنوز ۱۰۰٪ بدست نیامده است، ولی امید است با تکوین سیستم های زیستی و بخصوص بهره گیری از دستکاری های ژنتیکی (مهندسی ژنتیک)، سوخت ناشی از ریز جلبک ها آنقدر اقتصادی شود که هر چه سریعتر جایگزین سوخت های فسیلی آلوده کننده محیط زیست قرار گیرد (Wijffels & Barbosa, 2010).

مارکلی (۱۹۶۱) از دانشگاه همپشایر شمالی انگلستان تخمین زده است که با روش های سیستم کشت ریز جلبکی به روش باز یا استخرهای بتونی با آب چرخشی فقط در سطح ۱۵۰۰۰ مایل مربع می توان برای بخش قابل توجهی از سیستم حمل و نقل کشور سوخت تولید نمود. در جدول (۱)، تولید روغن از گیاهان مختلف با هم مقایسه شده است. در این فرآیند سلولهای

جلبکی بعد از تولید با فرآیند مایع سازی و تحت تاثیر واکنش های مخلوطی به فازهای آب، روغن، گاز و باقیمانده نهایی تقسیم شده از روغن آنها طی فرآیند کراکینگ می توان بیودیزل استخراج نمود (Markley, 1961). نکته بسیار مهم این است که این فرآیند نه تنها به تولید سوخت زیستی می انجامد بلکه در سطح قابل توجهی به کاهش دی اکسید کربن موجود در هوا و یا تولید شده توسط کارخانه های مختلف کمک می نماید (Herzog, 1993).

جدول ۱- میزان سالانه گالن تولیدی روغن در هر ۰/۶ هکتار از محصول زراعی (Markley, 1961)

محصول زراعی	گالن در سال
ذرت	۱۸
سویا	۴۸
آفتابگردان	۸۳
کلزا	۱۰۲
روغن پالم	۱۲۷
متوسط انواع میکرو جلبک	۶۳۷-۱۱۴۰

هدف از مطالعه حاضر، شناسایی گونه های جدید ریز جلبکی با تولید زی توده زیاد، محتوای چربی و نیز قابلیت ذخیره نمودن بالای آن، تولید اسید های چرب مناسب و مقاومت به شرایط نامناسب محیطی به منظور تولید بیودیزل می باشد. در این مطالعه برخی از گونه های ریز جلبکی با توانایی تولید چربی بالا، انتخاب شده و نرخ رشد، زی توده و محتوای چربی در برخی از آنها اندازه گیری گردید. در این مسیر تاثیر محیط های کشت مختلف در تولید این ترکیبات نیز بدست آمد.

### مواد و روش کار

در این مطالعه از استوک گونه های ریز جلبک موجود در بخش پرورش ریز جلبک مراکز تکثیر آبزینان کشور استفاده شد. به منظور کشت و پرورش آنها ضمن انتقال نمونه به لوله های آزمایشی با محیط های مختلف کشت، به افزایش تراکم و سپس انتقال به حجم های بالاتر ۳۰۰ لیتری و سپس تانک های ۵ متر مکعبی اقدام شد.

جدا سازی و خالص سازی ریز جلبک ها

از نمونه های استوک محتوی ریز جلبک ها به پتری دیش محیط کشت BG-11 آگار ( با نسبت ۱/۵٪ وزن به حجم آگار) تزریق گردید و در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد با شرایط نوری ثابت ۲۴ ساعته نور مهتابی سفید به مدت ۱۵ روز نگهداری گردید. کلونی منفرد هر نمونه برداشت و به روش چاهک در محیط جدید با ۱۵۰ میکرو لیتر BG-11 آگار در هر چاهک قرار داده شد. به منظور اطمینان از خالص شدن کشت این کار چند بار تکرار گردید که هر بار نتایج توسط میکروسکوپ آزمون شدند (Yuan et al., 2011; Xia et al., 2011).

سویه های شناسایی شده در ۲/۳ لیتر محیط کشت مغذی شامل ۱/۲ لیتر BG-11 و ۰/۲ لیتر جلبک تلقیحی تحت هوادهی مستمر و دمای ۲۶ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. طی این مدت نور دهی نیز بطور مستمر (۲۰۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) انجام گردید. هر سویه برای ۱۶ روز کشت داده شد و تغییرات زی توده به عنوان شاخص رشد با روش اسپکتروفوتومتری (طول موج ۵۴۰ نانومتر) هر روز اندازه گیری گردیدند. سپس نمونه ریز جلبک ها برداشت، سانتریفوژ و سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند.

#### ترکیبات غذایی با تاکید بر محتوای چربی

محتوای چربی ها با روش Blight-Dyer (۱۹۵۹) که توسط Luyen و همکاران (۲۰۰۷) توصیف شده، محاسبه گردید. ۱۰۰ میلی گرم سلولهای خشک با ۸ میلی لیتر آب، ۱۰ میلی لیتر کلروفرم و ۲۰ میلی لیتر متانول به هر بطری اضافه گردید. بعد از ۱۰ دقیقه مجدداً ۱۰ میلی لیتر آب و ۱۰ میلی لیتر کلروفرم اضافه گردید و مخلوط حاصله دوباره برای ۱۰ دقیقه نگهداشته شد. لایه کلروفرم پایینی جمع آوری و با بهره گیری از آون ۶۰ درجه سانتیگراد تبخیر گردید. بعد از سرد شدن در دسیکاتور، توزین بطری محتوی محلول باقیمانده انجام شد و محتوای چربی کل بدست آمد. ترکیبات غذایی دیگر آنها شامل پروتئین کل (روش کجلدال) و کربوهیدرات اندازه گیری گردید و با کمک قیف بوخنر، صافی وانمن ۴۵ میکرون، حلال استن و استفاده از روش اسپکتروفوتومتری، کلروفیل آ اندازه گیری شد (AOAC, 1997). مراحل فوق بعد از استفاده از محیط های کشت مختلف از جمله Walne و F/2 و Alga-1 و ES روی هر گونه از سویه های شناسایی شده به ترتیب انجام شدند. سپس از گونه دارای بیشترین درصد روغن با توجه به محیط کشت انتخابی و طی فرایند لخته سازی، ۴ گرم زی توده به ازای هر لیتر با رطوبت ۶۵ درصد جمع آوری گردید که طی فرایند فشردگی (Expeller) روغن آن استخراج و آنالیزهای مربوط به سوخت بر اساس استاندارد سوخت موتورهای دیزلی انجام گردید.

#### بررسی آماری

نتایج بعد از تایید نرمال بودن داده ها با بهره گیری از آزمون کولموگراف اسمیرنوف با کمک برنامه آماری SPSS ver. 14 آنالیز واریانس یک طرفه شدند و میانگین داده ها با آزمون دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

نتایج شناسایی سویه های ریز جلبکی و تعیین محتوای غذایی هر یک در در جدول (۲) آورده شده است.

جدول ۲- میزان ترکیبات غذایی (درصد در سلول) گونه های فیتوپلانکتونی دارای استفاده عمده در صنعت آبی پروری کشور

	وزن خشک ( میلی گرم/لیتر)	کلروفیل-آ	پروتئین	کربوهیدرات	چربی
<b>Bacillariophyceae</b>					
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	۱۱/۳h	۳/۰۱a	۳۴a	۶cd	۱۶cd
<i>Chaetoceros gracilis</i>	۷۴/۸f	۱/۰۴c	۱۲e	۴/۷d	۷/۲e
<i>Nitzschia closterium</i>	-	-	۲۶c	۹/۸c	۱۳de
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	۷۶/۷f	۰/۵۳d	۳۰b	۸/۴c	۱۴d
<i>Skeletonema costatum</i>	۵۲/۲hg	۱/۲۱bc	۲۵c	۴/۶d	۱۰ed
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	۲۸/۴hg	۰/۹۵cd	۳۴a	۸/۸c	۱۹c
<b>Chlorophyceae</b>					
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	۹۹/۹d	۱/۷۳b	۲۰d	۱۲/۲b	۱۵cd
<i>Nannochloris atomus</i>	۲۱/۴hg	۰/۳۷e	۳۰b	۲۳a	۲۱b
<b>Cryptophyceae</b>					
<i>Chroomonas salina</i>	۱۲۲/۵c	۰/۸cd	۲۹b	۹/۱c	۱۲ed
<b>Eustigmatophyceae</b>					
<i>Nannochloropsis oculata</i>	۶i	۰/۸۹cd	۳۵a	۷/۸c	۱۸c
<b>Prasinophyceae</b>					
<i>Tetraselmis chui</i>	۲۶۹a	۱/۴۲bc	۳۱b	۱۲/۱b	۱۷c
<i>Tetraselmis suecica</i>	۱۶۸/۲b	۰/۹۷cd	۳۱b	۱۲b	۱۰ed
<b>Prymnesiophyceae</b>					
<i>Isochrysis galbana</i>	۳۰/۵hg	۰/۹۸cd	۲۹b	۱۲/۹b	۲۳a
<i>Isochrysis aff. galbana(T-iso)</i>	۲۹/۷hg	۰/۹۸cd	۲۳d	۶cd	۲۰b
<i>Pavlova lutheri</i>	۱۰۲/۳c	۰/۸۴cd	۲۹b	۹c	۱۲ed
<i>Pavlova salina</i>	۹۳/۱d	۰/۹۸cd	۲۶c	۷/۴cd	۱۲ed

طبق جدول (۲) گونه ایزوکراسیس گالبا از رده Prymnesiophyceae با داشتن ۲۳ درصد چربی در بین گونه های مورد مطالعه بالاترین چربی را در خود جای داده و بعد از آن، نانوکلوویس اتوموس از رده Chlorophyceae با ۲۱٪ چربی و گونه دیگری از جنس ایزوکراسیس با ۲۰٪ چربی در رتبه سوم و تالاسیوسیرا پسودونانا از رده Bacillariophyceae با ۱۹٪ چربی در مراتب بعدی می باشند. همانطور که می دانیم ارزش غذایی گونه های مختلف ریز جلبکی به اندازه سلول، میزان هضم پذیری، تولید ترکیبات سمی و ترکیبات بیوشیمیایی آن بستگی دارد.

از طرف دیگر ارزش غذایی ریز جلبک ها به شدت تحت تاثیر محیط کشت آنها است. در جدول (۳) ارزش غذایی و ترکیبات بیوشیمیایی برخی از ریز جلبک ها در محیط های کشت مختلف با هم مقایسه شده است.

جدول ۳- مقایسه ترکیبات غذایی ( درصد از وزن خشک) چهار گونه ی ریز جلبک دارای میزان چربی بالا و مورد استفاده در صنعت آبی پروری کشور در محیط های کشت مختلف

ریز جلبک	محیط کشت	وزن خشک (میلی گرم / لیتر)	پروتئین	کربوهیدرات	چربی
<i>T.suecica</i>					
	Walne	۲/۲۹b	۱۳/۳۱d	۶/۲۰b	۷/۰۴
	ES	۲/۵۸b	۱۶/۹۸c	۶/۹۳b	۷/۲۲
	F/2	۲/۳۸b	۲۱/۷۵b	۸/۳۷a	۷/۹۲
	Alga-1	۴/۱۱a	۳۲/۲۲a	۸/۸۲a	۸/۶۵
<i>D.tertiolecta</i>					
	Walne	۴/۰۴b	۱۳/۳۷b	۱۳/۲۲c	۲۲/۲۸a
	ES	۴/۲۴b	۱۴/۸۸b	۱۵/۷۳b	۲۳/۹۳a
	F/2	۴/۹۷b	۱۳/۲۶b	۱۷/۹۱a	۲۳/۶۷a
	Alga-1	۸/۴۵a	۱۸/۸۲a	۱۱/۰۸d	۱۸/۱۸b
<i>I.galbana</i>					
	Walne	۱۰/۱۱c	۵/۱۷d	۴/۲۸	۲۵/۹۵b
	ES	۱۲/۰۹b	۷/۲۳c	۵/۲۱	۲۸/۳۸a
	F/2	۱۰/۸۱c	۸/۱۳b	۵/۵۹	۲۶/۸۲a
	Alga-1	۱۶/۱۵a	۹/۵۷a	۴/۲۸	۲۰/۶۸c

<i>P.tricontum</i>					
	Walne	۱۹/۰۱c	۲/۶۵c	۶/۴۲bc	۶/۵۱
	ES	۱۶/۲۳d	۵/۲۱a	۹/۲۰a	۶/۴۵
	F/2	۲۴/۶۵b	۳/۳۴c	۶/۶۰b	۵/۵۲
	Alga-1	۳۹/۰۴a	۴/۲۰b	۵/۹۸c	۵/۷۹

همانطور که جدول (۳) نشان می دهد، بهترین محیط کشت برای تولید آزمایشگاهی ایزو کراسیس گالنا، محیط ES است که به تولید ۲۸،۳۸ درصد چربی در این ریز جلبک می انجامد گرچه در خصوص سایر ریز جلبک ها از جمله دنالیلا ترتیولکتا نیز محیط کشت ES بهترین پاسخ را در بر داشته است ولی با نتایج چربی حاصل از محیط کشت F/2 و Walne اختلاف معنی داری نشان نداد ( $P > 0.05$ ) و تنها با محیط کشت Alga-1 اختلاف آماری را نشان داد ( $P < 0.05$ ).

از طرف دیگر ویژگی های سوختی روغن استخراجی از ریز جلبک شامل حداقل نقطه اشتعال ۶۰ درجه سانتیگراد است که در مقایسه با پترودیزل ( ۵۴ درجه سانتیگراد ) بسیار نزدیک است، دانسیته آن در دمای ۱۵/۶ درجه سانتیگراد حدود  $710 \text{ kg/m}^3$  است که در مقایسه با پترودیزل  $840 \text{ kg/m}^3$  فاصله معنی دار داشته، عدد ستان (زمان تاخیر احتراق سوخت) آن نزدیک به ۴۰ می باشد که در مقایسه با حداقل استاندارد عدد ستان برای پترودیزل (۵۰) فاصله کمی دارد که این اشکالات با خالص سازی دقیق تر روغن برطرف خواهد گردید.

در ایران تلاش برای جمع آوری سویه هایی مقاوم به شرایط نامناسب محیطی (خشکی، شوری آب و دماهای بالا) برای کشت انبوه هر چند مراحل مقدماتی خود را پشت سر می گذارد ولی امید است با توجه به سویه هایی که از مناطق گرمسیر خشک کویری بدست آمده است و همچنین با توجه به پتانسیل آنها در تولید چربی که در این مطالعه به ۱۶ گونه مورد آزمایشی اشاره شده است بتوان گام موثری در تحقیقات تولید سوخت زیستی از محصول فرآیند ابزی پروری این ریز جلبک ها بدست آورد.

زی توده سویه های ریز جلبکی بدست آمده در این مطالعه، بیشتر از سویه های مشابه بدست آمده توسط Abou-Shanab و همکاران (۲۰۱۱ a,b)، می باشد.

از نظر محتوای چربی در مطالعات گذشته، مقادیر ۲۰ تا ۶۰٪ وزن زی توده خشک بدست آمد حتی در برخی سویه ها تا ۸۰٪ بدست آمد (Mata et al., 2010) که با چربی کل نمونه های مورد مطالعه تفاوت زیادی نشان می دادند. همانطور که گفته شد، بدیهی است که شرایط کشت و از همه مهمتر محیط کشت و ترکیبات آن می تواند در افزایش یا کاهش محتوای غذایی

ریز جلبک ها نقش ایفا نماید. در مطالعات Mata و همکاران (۲۰۱۰)، محیط کشت Gillard به همراه برخی غنی سازها در ترکیب چربی ریز جلبک های مورد مطالعه تاثیر افزاینده از خود نشان داد.

### یافته پژوهشی

نتایج این بررسی نشان داد که ریز جلبک ایزوکرایسیس گالبانا در محیط کشت ES بالاترین پتانسیل تولید روغن سوخت زیستی را در خود ذخیره می نماید. در ایران منابع آبهای شور بلا استفاده زیادی وجود دارد که از آنها می توان برای کشت گونه های ریز جلبکی مقاوم به شوری (از قبیل دنالیلا) و استخراج مواد چربی و همچنین بتاکاروتن به عنوان یکی از رنگدانه های مهم در صنایع غذایی و بهداشتی و همچنین رنگ های طبیعی استفاده نمود.

### تقدیر و تشکر

از موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی بدلیل حمایت های مالی و معنوی در اجرای این پروژه تقدیر و تشکر می شود.

### منابع

- Anderson, R. A., 2005. Algal culturing techniques, Elsevier Academic Press, London. 112 p.
- Alcaine, A. A., 2010. Biodiesel from microalgae, Royal School of Technology Kungliga Tekniska Hogskolan, Stockholm, Sweden. 220p.
- Abou-Shanab, R. A.I., Matter, I. A., Kim, S-N., Oh, Y-K., Choi, J. and Jeon, B-H., 2011a. Characterization and identification of lipid- producing microalgae species isolated from a freshwater lake," Biomass and bioenergy, 1-7.
- Abou-Shanab, R. A.I., Hwang, J-H., Cho, Y., Min, B. and Jeon, B-H., 2011b. Characterization of microalgal species isolated from freshwater bodies as a potential source for biodiesel production, " Applied Energy 88, 3300-3306.
- AOAC (Association of official Analytical Chemists), 1997. Official Methods of Milk Analysis. 16th Ed., 3rd Revision Washington, USA.
- Beijerinck, M. W., 1890. "culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen, " Botanical Zeitung, 48, 725-785.
- Beijerinck, M. W., 1893. " Bericht uber meine Kulturen niederer Algen auf Nahrgeatine. Zentralbl, " Bakt 13, 781-786.



- Blight, E.G. and Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification, : Canadian Journal Biochemical Physiology, 37, 911-923.
- Gouda, M. K., Omar. S. H. and Aouad, L. M., 2008. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro- industrial wastes," World Journal of Microbiology and Biotechnology 24(9), 1703-1711.
- Herzog, H., 1993: The Capture, Utilization and Disposal of Carbon Dioxide from Fossil Fuel Power Plants. Report to the U.S. Department of Energy DOE/ER-30194
- Mata, T.M., Martins, A.A., and Caetano, N.S. 2010. "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, " Renewable Sustainable Energy reviews 14(1), 217-232.
- Moazami, N., Ranjbar, R., Ashori, A., Tangestani, M. and Nejad, A.S., 2011. "Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island," Biomass and Bioenergy 35(5): 1935-1939.
- Markley, K., 1961. "Chapter 9: Esters and Esterfication," in Fatty Acids: Their Chemistry, Properties, Production and Uses Part 2, 2nd Edition (Markley, K.; ed.). Interscience Publications, New York.45p.
- Puppan, D., 2002. Environmental evaluation of biofuels," Periodica Polytechnic research Society Manual Sciences, 10, 95-116.
- Wijffels, R. and Barbosa, M. J., 2002. "An outlook on microalagae biofuels," Science 329(5993):796-799.