

استخراج سلولز از ضایعات جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) و جداسازی نانو الیاف سلولزی از آن

چکیده

هدف از این مطالعه استخراج سلولز خالص از ضایعات جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) به روش تیمارشیمیایی و جداسازی نانو الیاف سلولزی از آن با استفاده از تیمار مکانیکی بود. بدین منظور خالص سازی جلبک اسپیرولینا (جداسازی چربی و پروتئین موجود در آن) طی سه مرحله تیمار شیمیایی با استفاده از محلول ۲٪ سود و پس از آن محلول ۳٪ کلریت سدیم که توسط اسیداستیک بافر شده بود، انجام شد. سپس الیاف سلولزی استخراج شده به صورت سوسپانسیون ۱٪ وزن خشک تهیه شده و جهت تبدیل به نانو الیاف سلولزی به تعداد ۱۰ بار از هموژنایزر با فشار بالا عبور داده شدند. آزمون طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و پراش پرتو ایکس (XRD) جهت مطالعه ویژگی های شیمیایی و ساختاری نمونه ها استفاده شد. همچنین سائز نانو الیاف سلولزی تهیه شده، توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) اندازه گیری شد. طیف سنجی FTIR نشان داد که نتایج به دست آمده از نمونه تولید شده به روش رنگبری شیمیایی و هموزن سازی در فشار بالا مطابقت فراوانی با نمونه های به دست آمده در سایر تحقیقات مربوط به آزمون FTIR داشت. تصاویر SEM نشان داد که الیاف سلولزی خالص از جلبک اسپیرولینا استخراج گردیده است. مشاهدات XRD مشخص کرد که به طور کلی، نمونه های جلبک ضایعاتی شامل نواحی آمورف بوده که بعد از استفاده از تیمار شیمیایی جهت استخراج سلولز و حذف ناخالصی ها، نمونه های الیاف و نانوالیاف سلولزی استخراج شده دارای نواحی کریستالینی منطبق بر الگوی سلولوز I بود. نتایج حاصل از AFM، تهیه نانو الیاف سلولزی را تأیید می کند، به گونه ای که نانو الیاف سلولزی تولید شده دارای قطر متوسط ۳۷ نانومتر و چندین میکرون طول بوده اند. در نهایت می توان نتیجه گیری کرد که تولید نانو الیاف سلولزی با استفاده از هموژنایزر با فشار بالا از سلولز استخراج شده به روش تیمار شیمیایی امکان پذیر است.

واژگان کلیدی: سلولز، نانوالیاف سلولزی، جلبک اسپیرولینا، خالص سازی.

پیام مرادپور^۱

بهزاد بلوری^۲

عباس اخوان سپهری^۳

مائده احدنژاد^۴

مهدی جنوبی^{۵*}

^۱ استادیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۲ مدیرعامل شرکت تخته فشرده آریانا، تهران، ایران

^۳ دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

^۴ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۵ دانشیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

مسئول مکاتبات:

Mehdi.jonoobi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۲

¹. Atomic Force Microscope

مقدمه

در سال‌های اخیر تولید نانو مواد از مواد لیگنوسلولزی و پسماندهای کشاورزی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. سلولز به‌عنوان فراوان‌ترین ماده تجدیدپذیر بر روی کره زمین، یک هموپلیمر بلند و خطی متشکل از ۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ واحد β -D-گلوکوپیرانوز است که با پیوندهای گلیکوزیدی ۱ به ۴ به یکدیگر متصل شده و از واحدهای تکرارشونده سلوبیوز تشکیل شده است. سلولز به جهت اینکه ترکیب اصلی دیواره سلولی گیاهان را تشکیل می‌دهد، رایج‌ترین پلیمر زیستی است [۱].

امروزه مطالعات زیادی در ارتباط با مصارف و کاربردهای سلولز به دلیل قابلیت دسترسی بالا و فراوانی آن، قیمت پایین، سبکی، سازگاری با محیط‌زیست و غیره در حال انجام است. از جمله کاربردهای ذرات سلولزی، تولید مواد مرکب با ویژگی‌های تقویت‌شده در ترکیب با پلیمرهای طبیعی یا نفتی، استفاده در پوشش دهی کاغذ و تولید کاغذهایی ویژه باکیفیت بالا، تولید مواد غذایی و آرایشی، لوازم پزشکی و داروسازی است [۲-۳]. ذرات سلولزی نانو مواد طبیعی هستند که پتانسیل بالایی را جهت دستیابی به ویژگی‌های برتر محصولات مختلف را دارا می‌باشند. این مواد از ویژگی‌های بسیار ارزشمندی نظیر زیست‌تخریب‌پذیری، قابلیت تجدیدشوندگی، سطح ویژه و ضریب لاغری بالا، مقاومت ویژه زیاد، فراوانی ماده اولیه، فعالیت شیمیایی سطحی زیاد، غیر سمی بودن و پایداری ابعاد برخوردار هستند، از این‌رو توجه پژوهشگران بسیاری را به خود جلب نموده‌اند [۲]. این مزیت‌ها سبب برتری تقویت‌کننده‌های نانومتری آلی در مقایسه با نانو مواد غیر آلی شده است [۴]. در راستای پاسخ به نیاز بازار مصرف مواد سلولزی، میزان بهره‌برداری انسان از این ماده خام هر روز بیشتر شده و لزوم بهره‌برداری از منابع جدید برای تهیه آن را آشکارتر می‌سازد.

سلولز را می‌توان از منابع مختلف گیاهی، جلبک-ها (آل‌ها) و برخی جانوران دریایی تهیه کرد. مقدار تولید سلولز گیاهی تحت تأثیر تغییرات فصلی است؛ اما جلبک‌ها در آب‌های شور و شیرین، در روی صخره‌ها، سنگ و خاک رشد کرده و حتی می‌توانند در شرایط مصنوعی مانند تالاب‌ها و دریاچه‌هایی که شرایط آن‌ها مدیریت می‌شود،

مخازن محصور و راکتورهای زیستی به‌صورت انبوه تولید شوند. از نقاط مثبت جلبک‌ها می‌توان به رشد سریع آن‌ها اشاره کرد. همچنین ریز جلبک‌ها (میکروآلگ‌ها) دارای طیف وسیع تفاوت در رنگ‌دانه، مواد ذخیره‌ای حاصل از فتوسنتز، ساختمان دیواره سلولی، اسیدهای چرب، چربی، روغن، استرول، هیدروکربن و مواد بیولوژیک هستند. بسیاری از ریزجلبک‌ها می‌توانند به‌عنوان منبع غذایی (برای انسان و دام و آبزیان و ...)، مواد معدنی و بیوشیمیایی مصرف شوند [۵-۶]. تولید موادی اختصاصی مانند اسیدهای چرب غیراشباع که در گیاهان و جانوران وجود ندارد، ویژه ریزجلبک‌هاست [۷]. علاوه بر آن ریزجلبک‌ها تولیدکننده پروتئین، استرول، هیدروکربن، روغن، اسیدهای چرب و انواع متنوعی رنگ‌دانه (بتاکارتن، رنگ‌دانه‌های مورد پرورش طیور، کلروفیل و ...) بوده و همچنین می‌توانند در تولید انرژی زیستی، صنعت داروسازی، مواد غذایی و شیمیایی مورد استفاده قرار گیرند [۸-۱۲].

دیواره سلولی در جلبک‌ها معمولاً از دولایه تشکیل شده است. لایه بیرونی لایه ژلاتینی است که از مواد پکتینی ساخته شده و در آب گرم حل می‌شود و لزج بودن جلبک‌ها به دلیل وجود این لایه بیرونی است. لایه درونی از جنس سلولز است که در آب گرم نامحلول بوده و مقدار آن به بیش از ۷۰٪ وزنی می‌رسد. هر دو این مواد نوعی پلی ساکارید هستند. در اکثر موارد ترکیبات دیگر از قبیل پروتئین، کربنات کلسیم، آهن، سیلیس، کیتین و غیره در ساختار دیواره سلولی جلبک‌ها دیده می‌شود. درصد بالای سلولز موجود در لایه درونی جلبک، موجب افزایش راندمان تولید نانوسلولز می‌شود. در حقیقت تولید نانوسلولز از جلبک امکان بهره‌مندی از یک منبع فراوان و گسترده را فراهم می‌سازد. انواع ریزجلبک‌ها را ۱۰۰۰۰۰ مورد تخمین می‌زنند که از بین آن‌ها ۵۰ ریز جلبک به‌صورت صنعتی تولید می‌شوند. جدول ۱ مهم‌ترین ریز جلبک‌های تولیدشده به روش صنعتی و کاربرد آن‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۱- مهم ترین ریز جلبک های تولید شده به روش صنعتی و کاربرد آن ها

نوع ریز جلبک	کاربرد	نوع ریز جلبک	کاربرد
Spirulina	منبع ویتامین و مواد معدنی - غذای آبزیان - غذای سالم	Dunaliella	آنتی اکسیدان - رنگدانه غذایی - پرو ویتامین A - غذای سالم
Chlorella	پروتئین - ویتامین C	Ochromonas	ویتامین A - E - پروتئین
Anabaena	تثبیت کننده ازت - کود بیولوژیک	Porphyridium	رنگدانه - پلی ساکارید
Tetraselmis	غذای آبزیان - منبع اسیدهای چرب	Chlamydomonas	پلی ساکارید
Scenedesmus	غذای آبزیان - پروتئین - ویتامین	Haematococcus	رنگدانه

آب های با شوری بالا و قلیائی (pH=۸/۳-۱۱) و با حضور کربنات، بی کربنات و نیتروژن غیر آلی هست [۱۳] شکل ۱ تصویر جلبک اسپیرولینا را با بزرگنمایی ۴۰۰ نشان می دهد.



شکل ۱- جلبک اسپیرولینا [۱۱]

جلبک سبز- آبی اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) چند سلولی و رشته ای است که رشد آن سریع بوده و دارای طول ۱-۵ mm است. جلبک اسپیرولینا در دمای بالای ۲۰ درجه سانتی گراد قادر به رشد و پرورش در

استفاده از اسپیرولینا برای انسان و حیوانات انجام شده است [۱۶]. علیرغم تولید سلولز از منابع متعدد، در ارتباط با استفاده از ضایعات جلبک اسپیرولینا و استخراج سلولز از آن مطالعات چندانی صورت نگرفته است. با توجه به موارد ذکر شده، هدف اصلی این تحقیق تولید سلولز از ضایعات جلبک اسپیرولینا و جداسازی نانوالیاف سلولزی از آن است.

مواد و روش ها

مواد

در این تحقیق از ضایعات جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) که از منابع داخلی (بخش شیمی پژوهشگاه صنعتی ایران) خریداری شده بود (شکل ۲)، به عنوان منبعی جهت تهیه سلولز با ارزش افزوده بسیار بالا استفاده شد. همچنین مواد شیمیایی مورد نیاز جهت خالص سازی سلولز از قبیل اتانول، سود، اسید استیک و کلریت سدیم از شرکت مرک کشور آلمان خریداری شدند.

اسپیرولینا به دلیل پروتئین بالا و ترکیبات فعال زیستی مختلف مثل اسیدهای آمینه ضروری، اسیدهای چرب ضروری (اسید گاما لینولنیک و اسید لینولئیک)، ویتامین های گروه B (ریبوفلاوین، سیانوکوبالامین، تیامین، اسید نیکوتینیک)، رنگدانه ها (فیکوسیانین و کلروفیل a) و کاروتنوئیدها به عنوان «غذایی برای آینده» شناخته شده است [۱۴]. اسپیرولینا علاوه بر ارزش غذایی ذکر شده، در پاسخ به سیستم ایمنی و محافظت در برابر اشعه بسیار مؤثر است [۱۵]. ترکیب شیمیایی اسپیرولینا نشان می دهد که می توان از این سیانوباکتر به عنوان غذای مناسب برای انسان و دام استفاده نمود حدود ۶۰ درصد از وزن خشک آن را پروتئین تشکیل می دهد البته میزان پروتئین بستگی به شرایط کشت و پرورش و نوع آن دارد. مقادیر اسیدهای آمینه سولفوردار نظیر (متیونین و سیستئین) در این سیانوباکتر کم است، بعلاوه اسپیرولینا حاوی مقادیری گلوکز، ساکاروز، گلیسرول، انواع ویتامین ها مانند نیاسین، تیامین، توکوفرول، است [۱۶]. مطالعات متعددی در زمینه



شکل ۲- پودر جلبک ضایعاتی اسپیرولینا مورد استفاده در این تحقیق

استخراج سلولز از جلبک ضایعاتی

جهت استخراج سلولز از جلبک اسپیرولینا، ابتدا خالص سازی آن با استفاده از تیمار شیمیایی انجام شد و سلولز عاری از پروتئین، چربی و مواد استخراجی و سایر ناخالصی ها از جلبک به دست آمد. جدول ۲ شرایط فرایند خالص سازی جلبک اسپیرولینا را طی سه مرحله تیمار شیمیایی نشان می دهد. بدین منظور، تیمار شیمیایی نمونه های اسپیرولینا که قبلاً بخشی از پروتئین آن (استخراج به وسیله آب گرم و مخلوط الکل استون در بخش شیمی پژوهشگاه صنعتی ایران) خارج شده بود، توسط محلول ۲٪ وزنی سود (NaOH) با چندین بار تعویض به مدت ۸ ساعت انجام شد. در این رابطه، هر دو ساعت یک بار شستشو با آب مقطر انجام گرفته و آزمایش چهار بار تکرار گردید. سپس از محلول ۳٪ وزنی کلریت سدیم (NaClO_2) که توسط اسید استیک (CH_3COOH) بافر شده و اسیدیته آن به ۴/۹ رسیده بود استفاده شد [۱۷-۱۸]. نمونه در این محلول به مدت ۶ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در بن ماری قرار گرفته و پس از عبور از کاغذ صافی، با آب مقطر شستشو و تعویض

محلول انجام گرفت. نمونه ها پس از ۶ ساعت، مجدداً با آب مقطر شسته و صاف شدند. به این ترتیب پروتئین و چربی و سایر مواد استخراجی از نمونه خارج شده و نمونه به رنگ سفید درآمد. در مرحله اول، نمونه با غلظت ۱۰ درصد با ۲ درصد کلریت سدیم و ۳ درصد اسید استیک مخلوط شده و در داخل بن ماری به مدت ۱۸۰ دقیقه تحت دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس از کاغذ صافی عبور داده شده و شستشو با آب مقطر انجام گرفت. در مرحله دوم، از ۱/۵ درصد هیدروکسید سدیم و ۱ درصد پراکسید هیدروژن استفاده شد. در این مرحله نیز مواد به مدت ۹۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از صاف شدن نمونه و شستشو، مرحله سوم آغاز شد. مخلوط ۱۰ درصد جلبک، ۳ درصد اسید استیک و ۱/۲۵ درصد کلریت سدیم در بن ماری دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفت تا نمونه سفید و خالص گردد. نمای ظاهری سوسپانسیون جلبک و مواد شیمیایی قبل و بعد از سه مرحله تیمار شیمیایی در شکل ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲ - شرایط خالص سازی جلبک اسپیرولینا با استفاده از تیمار شیمیایی

مرحله ۳	مرحله ۲	مرحله ۱	مراحل آزمایش
کلریت سدیم (۱/۲۵٪)	هیدروکسید سدیم (۱/۵٪)	کلریت سدیم (۲٪)	مواد شیمیایی
اسید استیک (۳٪)	پراکسید هیدروژن (۱٪)	اسید استیک (۳٪)	
۱۰	۱۰	۱۰	غلظت جلبک (٪)
۷۰	۷۰	۷۰	درجه حرارت (°C)
۹۰	۹۰	۱۸۰	زمان (دقیقه)



شکل ۳ - سوسپانسیون جلبک و مواد شیمیایی، قبل و بعد از سه مرحله تیمار شیمیایی

طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR) و پراش پرتو ایکس (XRD) ویژگی‌های شیمیایی و ساختاری نمونه‌ها مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. همچنین قطر و طول نانو الیاف سلولزی پس از تولید توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) اندازه‌گیری شد.

آزمون طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه

(FTIR)

طیف FTIR نمونه‌ها با استفاده از دستگاه طیف‌سنج طیف Spectrum 400 -Perkin Elmer گرفته شد. پیش از انجام آزمایش الیاف تا رسیدن به قطر ۱۰۰ میکرومتر کوبیده شدند و سپس با KBr مخلوط شدند تا سوسپانسیون همگنی فراهم شود. سپس در بین پالت‌های شفاف قرار گرفتند و در بازه فرکانس ۴۰۰۰ تا ۵۰۰ cm^{-1} ، مد عبوری مورد ارزیابی قرار گرفت.

جداسازی نانوالیاف سلولزی

جداسازی نانوالیاف سلولزی از سلولز خالص با استفاده از دستگاه هموژنایزر تحت فشار بالا انجام شد. بدین منظور سوسپانسیون ۱٪ وزن خشک از الیاف سلولزی در آب تهیه شد و به تعداد ۱۰ مرتبه از درون دستگاه هموژنایزر با فشار بالا با نام تجاری IKA تحت فشار ۱۰۰۰ بار عبور داده شدند. هموژنایزر با فشار بالا دارای یک پمپ پرفشار و یک دریچه با قطر ۲۵ میکرومتر است. سوسپانسیون، از محفظه استوانه‌ای به قطر ۳ میلی‌متر با فشار از دریچه مذکور عبور داده شده و در حین همگن شدن، سلولز توسط نیروهای برشی زیاد و همچنین برخورد شدید ذرات به یکدیگر ریز شده و نانو ذرات سلولز به دست آمدند. شکل ۴ سوسپانسیون نانوالیاف سلولزی را در آب نشان می‌دهد.

ارزیابی ویژگی‌های الیاف و نانو الیاف سلولزی

به‌دست آمده از جلبک ضایعاتی اسپیرولینا

قبل و بعد از تیمار شیمیایی، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، آزمون



شکل ۴ - سوسپانسیون نانو الیاف سلولزی در آب

³. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

⁴. X-Ray Diffraction

⁵. Atomic Force Microscope

¹. High Pressure Homogenizer

². Scanning Electron Microscopy

نتایج و بحث

طیف‌سنجی FTIR

شکل ۵، طیف FTIR به‌دست‌آمده از جلبک ضایعاتی اسپیرولینا و الیاف سلولزی قبل و بعد از تیمار شیمیایی را نشان می‌دهد. در نمونه‌های جلبک ضایعاتی، نتایج FTIR پیک‌هایی را در نواحی $3300-3500\text{ cm}^{-1}$ ، $2800-2900\text{ cm}^{-1}$ ، 1650 cm^{-1} ، 1320 cm^{-1} ، 1150 cm^{-1} ، $900-655\text{ cm}^{-1}$ نشان داد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده پیک‌های نواحی بین $3300-3500\text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه‌های OH است. از سوی دیگر، پیک دیده‌شده در ناحیه $2800-2900\text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه‌های C-H کششی آلکان‌ها است. پیک دیده‌شده در ناحیه 1650 cm^{-1} ، مربوط به گروه‌های $C=C$ موجود در آلکان‌ها است. همچنین پیک مشاهده‌شده در 1320 cm^{-1} نشان از گروه‌های C-O و OH موجود در الکل‌ها، استر و اتر است. پیک مربوط به ناحیه 1150 cm^{-1} مربوط به خانواده آلکید هالیدها است. پیک مربوط به ناحیه $900-655\text{ cm}^{-1}$ ، نشان‌دهنده گروه‌های N-H آمین است. اولین پیک در ناحیه 3420 cm^{-1} مشاهده شد که مربوط به گروه‌های OH آزاد در مولکول‌های سلولز است. پیک بعدی (2926 cm^{-1}) به دلیل گروه‌های C-H کششی در سلولز به وجود آمده و نمایانگر حضور پلی ساکاریدها است. در ناحیه 1764 cm^{-1} پیک مشاهده‌شده مربوط به C=O کششی گروه‌های استیلی همی سلولزها است. پیک 1657 cm^{-1} احتمالاً مربوط به رطوبت جذب‌شده در سلولز کریستالی است. محدوده $1470-1480\text{ cm}^{-1}$ مشخصه پیوندهای C-H است. پیک موجود گستره $1430-1425\text{ cm}^{-1}$ نشانگر گروه‌های C-O در حلقه آروماتیک سلولز است. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد نمونه تولیدشده به روش رنگ‌بری شیمیایی و هموزن سازی در فشار بالا مطابقت فراوانی با نمونه‌های به‌دست‌آمده از سایر تحقیقات [۲۰] مربوط به آزمون FTIR الیاف و نانوالیاف سلولزی داشت.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

آنالیز میکروسکوپی و مشاهدات ریخت‌شناسی الیاف سلولزی با استفاده از SEM مدل Zeiss Ultra 55 scanning microscope-Carl Zeiss SMT AG کشور آلمان انجام گردید. جهت انجام این آنالیز گلیمر پلیت با کربن رسانا بر روی نگه‌دارنده نمونه ثابت‌شده و سپس یک قطره از نمونه بر روی آن قرار گرفت. نمونه در محیط هوا خشک و فیبریل‌های باقی‌مانده با یک‌لایه طلا با ضخامت حدود ۵ نانومتر پوشانده شد. تصاویر با بزرگنمایی تا ۷۰۰۰ ولتاژ شتابی ۲۵ کیلوولت، فشار ۰/۶ تور گرفته‌شده و قطر ۱۰۰ فیبر اندازه‌گیری شد.

آزمون پراش پرتو ایکس (XRD)

آنالیز ساختاری و فازی نمونه‌ها با استفاده از پراش پرتو ایکس مدل ARL X'TRA، آشکارساز Si-Li، تابش Cu-K α (طول موج ۱/۵۴۰۵ آنگستروم)، با ولتاژ ۴۵ کیلوولت و ۴۰ میلی‌آمپر انجام شد. نمونه‌ها در محدوده زاویه پراش ۵ تا ۶۰ درجه (Θ) بررسی شدند. کریستالیت‌ها نانو الیاف سلولزی با استفاده از روش سگال مطابق رابطه زیر حساب شد [۱۹].

$$\text{CIR}(\%) = \frac{I_{200} - I_{AM}}{I_{200}} \times 100 \quad (1)$$

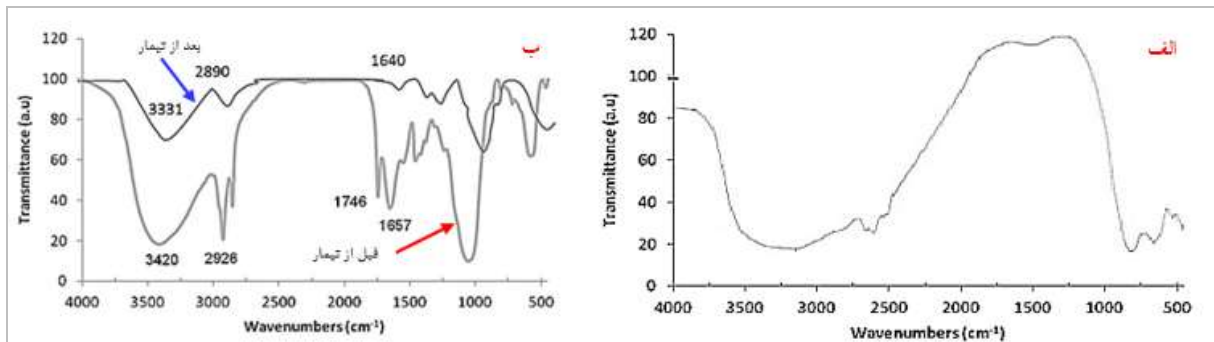
که در آن CIR درصد کریستالیت، I_{200} بیشترین شدت بازتابش نزدیک زاویه $\Theta = 6/22^\circ$ ، I_{AM} کمترین شدت نزدیک زاویه $\Theta = 3/18^\circ$ است.

میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

به‌منظور ارزیابی نانو الیاف سلولزی از میکروسکوپ نیروی اتمی مدل Instruments-CP Auto Probe ساخت ایالات متحده آمریکا استفاده شد. یک قطره سوسپانسیون نانوسلولز رقیق‌شده بر روی بستر سیلیکون ریخته شد و اجازه داده شد در دمای اتاق خشک شود. تجهیزات در وضعیت نیمه تماسی^۱ در یک فرکانس تشدید شده در حدود ۷۰ کیلوهرتز و ثابت فنر^۲ N/m -۱ مورد استفاده قرار گرفتند. قطر الیاف با استفاده از نرم‌افزار ویژه آنالیز تصویر اندازه‌گیری شد.

1. Tapping

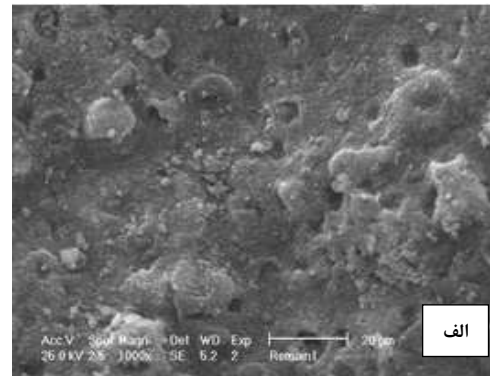
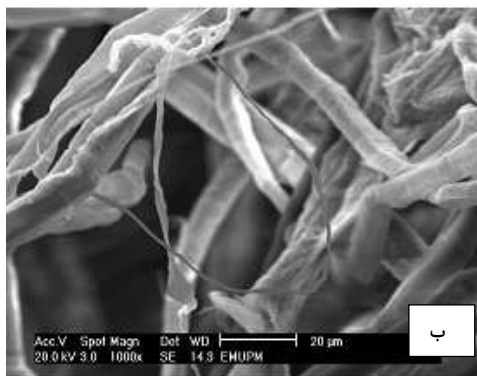
2. spring constant



شکل ۵- طیف FTIR الف) جلبک ضایعاتی اسپیرولینا، ب) الیاف سلولزی قبل و بعد از خالص سازی تصاویر SEM

کلوخه شده (پروتئین، چربی و سایر مواد استخراجی) در طی مراحل سه گانه تیمار از نمونه جلبک اولیه خارج شده و الیاف سلولزی به صورت مجموعه رشته‌هایی از الیاف مشاهده می‌گردد. این مقایسه نشان می‌دهد تیمار سه مرحله‌ای رنگ‌بری قابلیت خروج ناخالصی‌ها از جلبک ضایعاتی را داشته است، به گونه‌ای که مواد حاصله پس از تیمار شیمیایی حاوی الیاف سلولزی است.

ریخت‌شناسی الیاف سلولزی با استفاده از SEM مورد مطالعه قرار گرفت. سطح نرم و صاف نمونه‌ها در شکل ۶ نمایان است. همان‌گونه که در شکل ۶ الف دیده می‌شود، نمونه جلبک اولیه عاری از هرگونه الیاف بوده و سطح آن شبیه ذراتی است که در اثر تجمع یافتن به صورت ذرات کلوخه شده مشاهده می‌گردد. اما پس از استفاده از تیمار شیمیایی (رنگ‌بری) همان‌گونه در شکل ۶ ب مشاهده می‌شود، ناخالصی‌های موجود در ذرات



شکل ۶- تصاویر SEM به دست آمده از الیاف سلولزی الف) نمونه خالص سازی نشده، ب) نمونه خالص سازی شده

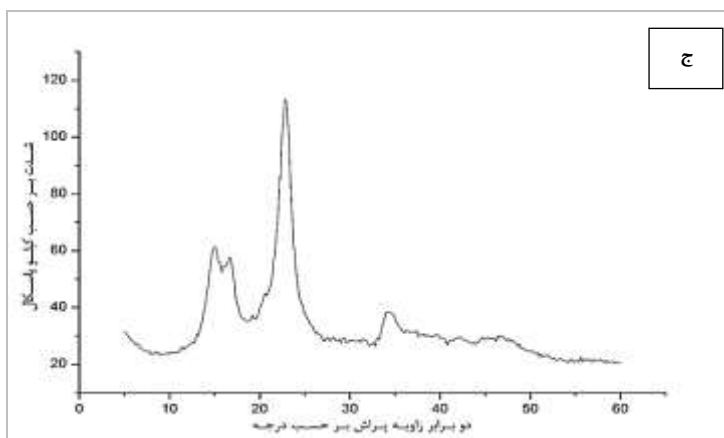
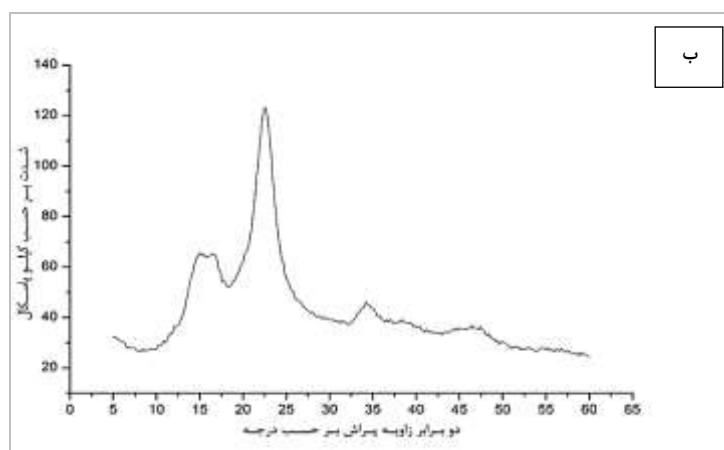
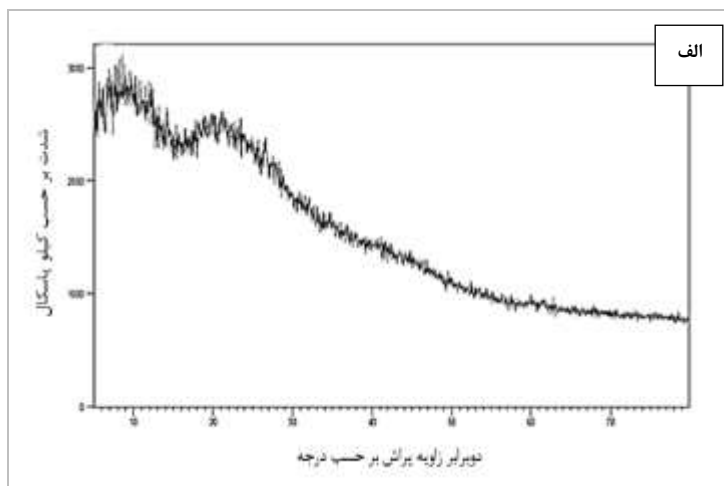
الگوی XRD الیاف و نانو الیاف سلولزی با سلولز نوع اول (I) مطابقت داشت و پیک‌های مربوط به مناطق کریستالیتی در نواحی 2θ برابر با $14/7$ ، $16/2$ و $22/7$ درجه مشاهده گردید. اما نتایج آزمون XRD نشان داد که در اثر بازآرایی مجدد زنجیرهای سلولزی در فرایند هموزن سازی، میزان کریستالیت نانوالیاف سلولزی افزایش داشته است. نتایج نشان داد که درجه بلورینگی الیاف سلولزی از ۵۷ درصد به ۶۴ درصد در نمونه نانوالیاف سلولزی افزایش یافته است. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به نتایج حاصله از آزمون XRD، نمونه‌های جلبک

کریستالیت و آزمون XRD

شکل ۷ الگوی XRD نمونه‌های جلبک اسپیرولینا، الیاف سلولزی حاصل از تیمار شیمیایی و نانو الیاف سلولزی به دست آمده از تیمار مکانیکی را نشان می‌دهد. نتایج آزمون XRD نشان از آمورف بودن نمونه‌های جلبک ضایعاتی دارد.، میزان کریستالیت سلولزها متفاوت بوده و به خواص ذاتی منبع اولیه آن وابسته است. از سوی دیگر روش استخراج نانو سلولزها نیز می‌تواند روی این فاکتور اثرگذار باشد. نمونه‌های نانوالیاف سلولزی اغلب به صورت مخلوطی از حالت کریستالی و آمورف موجود هستند.

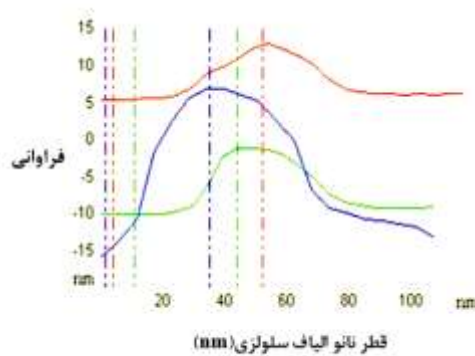
نانوالیاف سلولزی استخراج شده نیز از الگوی کریستالینی سلولز I پیروی کرده با این تفاوت که درصد کریستالیته نانوالیاف سلولزی از مقدار بالاتری برخوردار بودند.

ضایعاتی شامل نواحی آمورف بوده که بعد از استفاده از تیمار شیمیایی جهت استخراج سلولز و حذف ناخالصی‌ها، نمونه‌های الیاف سلولزی استخراج شده دارای نواحی کریستالینی منطبق بر الگوی سلولز I بود. همچنین



شکل ۷- الگوی پراش پرتو ایکس نمونه‌های الف) جلبک، ب) الیاف سلولزی، ج) نانو الیاف سلولزی

۳۷ نانومتر بود. طول عمده نانو الیاف سلولزی در حدود چندین میکرون ارزیابی شد. همان‌گونه که تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی نشان می‌دهد نانوالیاف سلولزی به‌طور موفقیت‌آمیز از دیواره سلولی جلبک به دست آمده‌اند.



شکل ۸- تصاویر حاصل از AFM نمونه جلبک اسپیرولینا و دامنه قطر نانو الیاف سلولزی

از درون دستگاه هموژنایزر با فشار بالا توانایی استخراج نانوالیاف سلولزی و آزادسازی آن‌ها را تنها با عبور ۱۰ مرتبه از درون دستگاه هموژنایزر نشان می‌دهد. پیک‌های مربوط به آزمون FTIR نشان داد که ساختار سلولزی مربوط به الیاف و نانوالیاف سلولزی استخراج‌شده از جلبک منطبق بر آزمایش‌های انجام‌شده قبلی است. نتایج حاصل از آزمون XRD نشان داد اگرچه نمونه جلبک اولیه حاوی مناطق آمورف است ولی پس از خالص‌سازی جلبک که منجر به خروج چربی‌ها و پروتئین‌ها از دیواره سلولی جلبک گردیده، الیاف و نانوالیاف سلولزی حاصله به‌وضوح وجود مناطق کریستالینی را درون نمونه‌ها نشان داده که الگوی حاصله کاملاً مشابه الگوی کریستالینی سلولوز I است.

آنالیز تصاویر AFM

ارتفاع و قطر نانوالیاف سلولزی اندازه‌گیری شدند و دامنه‌ای از نانو الیاف سلولزی توسط AFM بررسی شدند. شکل ۸ نشان می‌دهد که نانو الیاف سلولزی دارای قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر داشته و میانگین قطرشان در حدود

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد نمونه تولیدشده به روش رنگ‌بری شیمیایی و هموژن‌سازی در فشار بالا حاوی مقادیر زیاد نانوالیاف سلولزی است به‌گونه‌ای که آنالیز ناشی از آزمون AFM میانگین قطر نانوالیاف استخراج‌شده را در دامنه عددی ۳۷ نانومتر مشخص نمود. نتایج حاصله اثبات نمود که شیوه انتخاب‌شده جهت رنگ‌بری به‌منظور استخراج الیاف سلولزی خالص به‌درستی انتخاب گردیده به‌گونه‌ای که خالص‌سازی جلبک (خروج چربی‌ها و پروتئین‌ها) که جزئی از سخت‌ترین مراحل این (انتخاب شیوه مناسب بدون آسیب رساندن به سلولوز موجود در جلبک) تحقیق بوده است، به‌گونه‌ای مطلوب حاصل گردیده است. از طرفی عبور سوسپانسیون الیاف سلولزی

منابع

- [1] Zaini, L.H., Jonoobi, M., Tahir, P. A. and Karimi, S., 2013. Isolation and Characterization of Cellulose Whiskers from Kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) Bast Fibers. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4:37-44.
- [2] Roohani, M., Habibi, Y., M. Belgacem, N., Ebrahimi, Gh., Karimi, A. N. and Dufresne, A., 2008. Cellulose whiskers reinforced polyvinyl alcohol copolymers nanocomposites. *European Polymer Journal*, 44:2489-2498.

- [3] Fattahi, T., Dadashian, F., Sadeghi, G.M.M. and Ebrahimi Zanjani, H., 2014. Spherical cellulose nanoparticles preparation from waste cotton using a green method. *Powder Technology*, 261: 232-240.
- [4] Jonoobi, M., Mathew, AP. and Oksman, K., 2012. Producing low-cost cellulose nanofiber from sludge as new source of raw materials. *Industrial Crops and Products*, 40:232-238.
- [5] Kim, C.K., Jung, Y.H. and Oh, H.M., 2007. Factors indicating culture status during cultivation of *Spirulina platensis*. *The Journal of Microbiology*, 45: 122-127.
- [6] Henrikson, R., 1989. *Earth food spirulina*. Laguna Beach, CA: Ronore Enterprises, Inc, p.187.
- [7] Singh, Y., 2005. Spiruling-A wonder vegetarian protein source. (Accessed 12th August 2003)
- [8] Landrun, J.T., 2009. *Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties*, CRC Press. 544P.
- [9] Chisty, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26:126-131.
- [11] Volkmann, H., Imianovsky, U., Oliveira, J. L.B. and Sant Anna, E.S., 2008. Cultivation of *Arthrospira platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino acid profile. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:1-4.
- [12] Choonawala, B.B., 2007. *Spirulina production in brine effluent from cooling towers* (Doctoral dissertation at the Durban University of Technology).
- [13] Andrade, M.R. and Costa, J.A.V., 2007. Mixotrophic cultivation of *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264(1-4), pp.130-134.
- [14] Choonawala, B.B. and Swalaha, F.M., 2004. *Spirulina sp.* Production in brine effluent from cooling tower water, Durban Institute of Technology.
- [16] Goksan, T., Zekeriyaoğlu, A. and Ak, I., 2007. The growth of *Spirulina platensis* in different culture systems under greenhouse condition. *Turkey Journal Biology*, 31:74-52.
- [17] Jaime-Ceballos, B., Hernandez-Llamas, A., Garcia, T., Perez-Jar, L. and Villareal, H., 2006. Substitution of *Chaetoceros mulleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* larvae. *Aquaculture*, 266:215-220.
- [18] Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Arad, S. and Richmond, A., 1982. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2(3), pp.175-185.
- [19] Imai, T., Sugiyama, J., Itoh, T. and Horii, F., 1999. Almost Pure Ia Cellulose in the Cell Wall of *Glaucozystis*. *Journal of Structural Biology*, 127: 248–257.
- [20] Wada, M., Okano, T. and Sugiyama, J., 2001. Allomorphs of native crystalline cellulose I evaluated by two equatorial d-spacings. *Journal of Wood Science*, 47:124-128.
- [21] Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E. and Conrad, C.M., 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-Ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 29(10):786–794.
- [22] Asadi, F., Nazarneshad, N. and AsadpourAttoeii, G.H., 2016, Preparation of nano-cellulose from cladophora, fibrous algae, and utilizing at the product to improve the strength properties of CMP pulp. *Iranian Journal of Wood and Paper Science Research*, 31 (4): 695-702. (In Persian).

Cellulose extraction from spirulina wastes (*Spirulina platensis*) and isolation of cellulose nanofiber from it

Abstract

The purpose of this study was to extract pure cellulose from the waste spirulina alga (*Spirulina platensis*) using a method of chemical treatment and then isolation of cellulose nanofibers by applying a mechanical process. For this purpose, purification of spirulina algae (separation of fat and protein) was carried out during three stages of chemical treatment using a 2% Sodium hydroxide solution, followed by 3% sodium chlorite solution, which was buffered by acetic acid. The extracted cellulose fibers were then subjected to 1% dry weight suspension and passed through a high pressure homogenizer in order to isolate the cellulose nanofibers. Before and after chemical treatment, the infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD) were used to study the chemical and structural properties of the samples. Also, the diameter and length of the prepared cellulose nanofibers were measured by atomic force microscopy (AFM). The FTIR results showed that the chemical and mechanical treatment could successfully isolated cellulose and nanocellulose fibers which are totally compatible with previously studies. The analysis of SEM images showed that pure cellulose fibers were extracted from spirulina algae. In addition, the XRD analysis illustrated that the cellulose and nanocellulose fibers had similar diffractogram to the cellulose I. AFM images demonstrated that the nanofibers had average diameter of 37 nm while their length was several microns. It can be concluded that the isolation of cellulose nanofibers by using the high pressure homogenizer could be possible from the chemically treated cellulose fibers.

Keywords: cellulose, cellulose nanofibers, spirulina algae, purification.

P. Moradpour¹
B. Belouri²
A. Akhavan Sepahi³
M. Ahadnezhad⁴
M. Jonoobi^{5*}

¹ Assistant Prof., Department of wood and paper science and technology, Faculty of natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran

² CEO of Ariana pressed board industry, Tehran, Iran

³ Associate Prof., Microbiology, Faculty of life sciences, Islamic Azad university, Tehran North branch, Tehran, Iran

⁴ M.Sc. Department of wood and paper science and technology, Faculty of natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran

⁵ Associate Prof., Department of wood and paper science and technology, Faculty of natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Corresponding author:
amisaghi@ut.ac.ir

Received: 2018/01/23

Accepted: 2018/02/11