

تولید بیودیزل از زیست توده ریز جلبک بومی ایران

طاهر شاهی، بابک بهشتی

گروه مکانیزاسیون و مکانیک ماشین‌های کشاورزی، دانشکده کشاورزی، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

علی زنوزی⁺*

سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

مرتضی الماسی

گروه مکانیزاسیون و مکانیک ماشین‌های کشاورزی، دانشکده کشاورزی، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده: تولید سوخت‌های تجدید پذیر و جایگزینی تدریجی آن‌ها به جای سوخت‌های فسیلی یکی از چالش‌های اصلی پژوهشگران در دهه‌های اخیر بوده است. بیودیزل یکی از این سوخت‌ها می‌باشد که از منابع گوناگون تولید شده و در موتورهای دیزلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این کار پژوهشی، بیودیزل از روغن ریز جلبک گونه دونالیلا بومی ایران به دو روش تر و خشک تولید شد و ویژگی‌های سوختی آن مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌ها نشان داد که روش تر، بازده بالاتری نسبت به روش خشک دارد. به طوری که بازده استخراج روغن در روش تر ۱۷/۴ درصد و در روش خشک ۱۰/۲ درصد به دست آمد. مدت زمان استخراج روغن نیز در روش تر به دلیل حذف مرحله‌های خشک نمودن و نمک زدایی به طور چشمگیری کوتاه‌تر از روش خشک می‌باشد. بنابراین در استفاده از زیست توده ریز جلبک بومی ایران، روش تر از پتانسیل بالایی برای تولید بیودیزل برخوردار است. مناسب‌ترین بازده استخراج در روش تر در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و مدت ۳۰ دقیقه به دست آمد. نتیجه‌ها نشان داد که نوع روش استخراج تأثیر معنی داری بر پروفیل اسیدهای چرب و ویژگی‌های بیودیزل تولیدی ندارد. زنجیر اسیدهای چرب در لیپید استخراج شده ریز جلبک دونالیلا از ۱۴ تا ۲۰ کربن دارد که بخش عمده آن را اسید پالمیتیک (۳۶/۶۲٪) و اسید استئاریک (۱۹/۰۸٪) تشکیل می‌دهد.

کلید واژه‌ها: ریز جلبک دونالیلا، استخراج تر، بیودیزل، زیست توده.

KEYWORDS: Micro-algae *Dunaliella SP.*, Wet extraction, Bio-diesel, Biomass.

مقدمه

بیش‌تری به بحث انرژی پاک و منابع تجدید پذیر انرژی داشته باشند. در حقیقت، ۸۵ درصد از انرژی که مورد استفاده قرار می‌گیرد از نفت،

محدودیت منابع انرژی و خطرات زیست محیطی ناشی از استفاده بیش از حد سوخت‌های فسیلی باعث شده است که پژوهشگران توجه

*E-mail: a_zenouzi@yahoo.com, zenouzi@irost.ir

* عهده دار مکاتبات

ریزجلبک در تمام طول سال توانایی رشد دارد و همچنین تولید روغن در ریزجلبک از تولید روغن در بهترین گیاهان روغنی فراتر می‌رود. برای نمونه بازده تولید دیزل زیستی برای ریزجلبک به ۱۲۰۰۰ لیتر در هکتار می‌رسد. در حالی که این بازده برای گیاه روغنی کلزا ۱۱۹۰ لیتر در هکتار است [۹]. ریزجلبک نسبت به گیاهان خاکزی نیاز به آب کمتری دارد که این آب می‌تواند آب شیرین نباشد [۱۰]. ریزجلبک را می‌توان در زمین‌های غیر قابل کشت، با استفاده از آب پساب کشت کرد [۱۱].

نرخ رشد در ریزجلبک بالاست و محتوای روغن در برخی گونه‌ها به ۲۰ تا ۵۰ درصد وزن ماده خشک زیست توده می‌رسد [۱۲، ۱۳]. ریزجلبک‌ها توانایی تثبیت زیستی گاز کربن دی‌اکسید را دارا می‌باشند (برای تولید یک کیلوگرم زیست توده خشک ریزجلبک، ۱/۸۳ کیلوگرم گاز کربن دی‌اکسید نیاز است) در نتیجه در بهبود وضعیت هوا تأثیرگذار می‌باشد [۱۲]. با استفاده از پساب در کشت ریزجلبک می‌توان برخی از مواد مغذی مورد نیاز آن از جمله نیتروژن و فسفر را تأمین کرد [۱۴]. در کشت ریزجلبک نیازی به استفاده از سموم و آفت‌کش‌ها نیست [۱۵]. از دورریزهای زیست توده باقی‌مانده پس از استخراج روغن می‌توان مواد با ارزش مانند پروتئین به دست آورد و یا از آن به عنوان کود و یا غذای دام بهره برد [۱۶]. ترکیب زیست - شیمیایی ریزجلبک را می‌توان با ایجاد تنوع شرایط کشت تغییر داد، برای نمونه می‌توان درصد روغن موجود در سلول‌ها را با کم کردن نیتروژن در دسترس آن‌ها افزایش داد [۱۷].

روغن موجود در ریزجلبک‌ها را می‌توان با استفاده از دو فرایند خشک و تر استخراج کرد [۱۸]. روش خشک شامل خشک کردن با خشک کن پاششی، خشک کردن به روش خشک کن انجمادی و خشک کردن با نور خورشید است. روش تر فرایندی است که در آن زیست توده برداشت شده برای آزاد کردن فراورده‌های درون سلولی شکافته می‌شود. روش خشک برای تولید بیودیزل به $107/3 \text{ MJ/kg}$ انرژی نیاز دارد در حالی که انرژی مصرفی در روش تر $42/3 \text{ MJ/kg}$ است [۱۹]. اعتقاد بر این است که با بهینه سازی فرایند استخراج تر، امکان کاهش مصرف انرژی برای فرایند استخراج تا 17 MJ/kg وجود دارد. بنابراین استخراج تر بدون نیاز به خشک کردن زیست توده برای استخراج روغن از ریزجلبک‌ها، دلخواه تر است [۲۰].

بازده تولید بیودیزل بین ۸۵ تا ۹۸ درصد متغیر است. به‌طور معمول واکنش در دمای ۵۷ درجه سلیسوس انجام شده و نسبت مولی متانول به روغن ۱:۶ در نظر گرفته می‌شود. واکنش

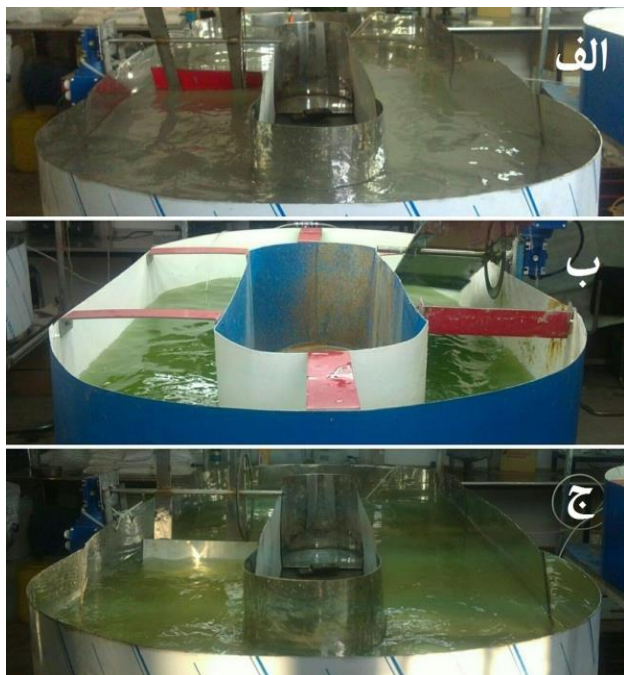
زغال سنگ و گاز طبیعی که سوخت‌های فسیلی می‌باشند به‌دست می‌آید در حالی که منابع انرژی تجدیدپذیر و انرژی هسته‌ای به ترتیب تنها ۱۳.۵ و ۶.۵ درصد از انرژی مورد نیاز را تأمین می‌کند [۴-۱]. با این حال نگرانی هشدار دهنده این است که منابع طبیعی سوخت‌های فسیلی محدود است و به دلیل مصرف و توزیع نامناسب، به سرعت در حال از بین رفتن می‌باشد. تولید و توسعه زیست‌سوخت‌ها به عنوان یکی از جایگزین‌های مناسب سوخت‌های فسیلی می‌تواند راه‌حل مناسبی برای حل این مشکل جهانی باشد. از مزایای اصلی استفاده از زیست توده به عنوان منبع انرژی می‌توان به بهبود زمین‌های تخریب شده و افزایش تنوع زیستی و به عملکرد سوخت‌های زیست توده‌ای که منجر به انباشتگی CO_2 در جو نمی‌شود اشاره کرد [۵]. همچنین استفاده از زیست توده‌ها به عنوان مواد اولیه برای تولید سوخت به دلیل ارزانی و فراوانی آن‌ها می‌تواند تا حد زیادی به کاهش نگرانی‌های ناشی از کمبود و آلودگی سوخت‌های فسیلی کمک کند [۶].

تاکنون گستره وسیعی از منابع زیست توده به عنوان ماده اولیه برای تولید زیست‌سوخت‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. نسل اول زیست‌سوخت‌ها به طور کلی از شکر و نشاسته و یا روغن موجود در فراورده‌های زراعی خوراکی به دست می‌آیند. با توجه به محدودیت‌ها و مشکل‌هایی که در تهیه منابع زیست‌سوخت‌های نسل اول وجود داشت و امنیت غذایی را با مخاطراتی مواجه می‌کرد، زیست‌سوخت‌های نسل دوم توسعه یافته‌اند.

زیست‌سوخت‌های مایع نسل دوم که برای حمل و نقل به مصرف می‌رسند این قابلیت را دارند که از زیست توده‌های با فراوانی بیش‌تر مانند دورریزهای کشاورزی و جنگلی تولید شوند. این سوخت‌ها از زیست توده‌های چوبی و به اصطلاح لیگنینی به دست می‌آیند که استخراج سوخت از آن‌ها نیازمند فناوری‌های پیشرفته‌تری نسبت به زیست‌سوخت‌های نسل اول می‌باشد [۷].

در سال‌های اخیر ریزجلبک‌ها به عنوان منبع نسل سوم سوخت در نظر گرفته شده‌اند، زیرا آن‌ها نرخ رشد سریع‌تری نسبت به گیاهان دارند و تولیدات آن‌ها می‌تواند بیست برابر فراورده‌های زراعی بر حسب هکتار باشد [۸].

با توجه به راندمان بالای تولید ریزجلبک و تنوع زیستی فراوان آن همراه با مصرف کم نهاده، این ماده اولیه پتانسیل بالایی برای تولید نسل جدیدی از زیست‌سوخت‌ها از خود نشان داده است. گونه‌های گوناگون ریزجلبک مقدار چشمگیری روغن تولید می‌کنند که به سادگی به سوخت زیستی تبدیل می‌شود [۷].



شکل ۱: راکتور زیستی نوری ماریچی - الف) محیط کشت آماده تلقیح، ب) راکتور زیستی شماره یک، ج) راکتور زیستی شماره دو

۳۵۰۰ لوکس تنظیم شد [۲۰]. در طول مدت کشت، هوادهی به صورت پیوسته به وسیله یک پمپ هوا با شدت جریان ۲۵۰ میلی لیتر بر دقیقه انجام شد و دمای اتاق کشت بر روی 26 ± 1 درجه سلسیوس [۲۱] ثابت نگه داشته شد. pH محیط کشت با تزریق مقادیرهای قابل کنترل گاز کربن دی اکسید به کمک یک تایمر در محیط کشت در محدوده ۷/۵ نگاه داشته شد. در مرحله‌های بعد با افزایش میزان ریزجلبک، محیط کشت به درون ظروف ۲۰ لیتری منتقل شد و سرانجام به برکه ای با ظرفیت ۳۸۰ لیتر منتقل شد (شکل ۱). شرایط کشت در ظروف ۲۰ لیتری و برکه ۳۸۰ لیتری دقیقاً مشابه آنچه در مورد ظرف ۱ لیتری بود لحاظ شد با این تفاوت که در برکه ۳۸۰ لیتری به جای هوادهی توسط پمپ هوا از یک چرخ پارویی استفاده شد و با تنظیم دمای اتاق، دمای برکه در حد 26 ± 1 سلسیوس ثابت نگه داشته شد. نوردهی توسط لامپ فلورسنت انجام گرفت. تنظیم pH با کم و زیاد کردن زمان تزریق CO_2 به داخل محیط کشت توسط تایمر انجام گرفت. با رشد جلبک محیط قلیایی شده و با تزریق گاز CO_2 میزان pH محیط به دلیل اسیدی شدن کاهش یافته و در محدوده ۷٫۵ ثابت نگه داشته شد. در پایان کشت، ریزجلبک با چگالی نوری بالای ۱،۰۰۰ برداشت شد. چگالی نوری ۱ معرف ۰/۲۵ گرم ماده خشک در یک لیتر از محیط کشت می باشد.

در حضور یک کاتالیست مناسب (به‌طورمعمول پتاسیم هیدروکسید به نسبت وزنی یک به صد، بسته به میزان اسیدهای چرب آزاد) انجام می پذیرد [۱۹].

ریزجلبک *Dunaliella Sp.* سویه M_1 بومی دریاچه مهارلوی شیراز یک گونه شورپسند است. با توجه به اینکه این ریزجلبک بومی ایران می‌باشد پژوهش بر روی تولید بیودیزل و همچنین افزایش بازده استخراج روغن از آن ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین در این پژوهش، استخراج روغن به روش خشک و تر از ریزجلبک دونالیلای بومی ایران انجام گرفته و تأثیر روش استخراج بر کیفیت روغن استخراجی و بیودیزل تولیدی مورد بررسی قرار گرفت.

بخش تجربی

مواد و دستگاه‌ها

سدیم کلرید، کلسیم کلرید، کبالت کلرید، سدیم سولفات، پتاسیم سولفات، پتاسیم نترات، پتاسیم فسفات، پتاسیم یدید، روی سولفات، سدیم تیوسولفات، مس سولفات، آهن سولفات، منگنز سولفات، دی‌سدیم ادا، دی‌سدیم مولیبدات، بوریک اسید، سولفوریک اسید، کبالت کلرید و تریس بیس برای تهیه محیط کشت جانستون مورد استفاده قرارگرفت و در آزمایش‌ها نیز از متانول، اتانول، کلروفرم، n - هپتان و هگزان استفاده شد. همه مواد به کار رفته، فرآورده مرک آلمان بوده و بدون هیچ گونه خالص سازی استفاده شدند. در این پژوهش از سانتریفیوژ Heraeus ساخت Biofuge آلمان، کروماتوگرافی گازی 7890 ساخت Agilent آمریکا، گرانروی سنج SVM-3000 شرکت Anton Paar اتریش، فلش پوینت P611A ساخت آنالیز بلژیک، کارل فیشر itrino Basic794 ساخت Metrohm سوئیس، دانسیته سنج ساخت Anton Paar اتریش و CP تستر ساخت آنالیز بلژیک استفاده شد.

کشت ریزجلبک

در این پژوهش از ریزجلبک *دونالیلا* که یک گونه شورپسند است، استفاده شد. سویه ریزجلبک از کلکسیون پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تهیه شد. برای کشت ریزجلبک، محیط کشت اصلاح شده جانسون استفاده شد. محیط غنی از ریزجلبک در شرایط استریل (زیر هود لامینار) به اندازه ۱۰ درصد به محیط کشت اصلاح شده جانسون با مولاریته نمک ۱/۵ تلقیح شده و در درون ظروف ۱ لیتری استریل تقسیم شد. نور موردنیاز توسط لامپ‌های فلورسنت تأمین شده و با کم و زیاد کردن تعداد لامپ‌ها شدت نور مورد نظر بر روی

برداشت ریز جلبک



شکل ۲: برداشت ریزجلبک از محیط کشت.

دیواره سلولی حلال کلروفرم: متانول با نسبت ۱:۱ افزوده شد. مرحله‌های پیشین شامل هم زدن و ایجاد حالت سکون تکرار شد و دوباره فاز کلروفرم دارای روغن از دکانتور خارج شد. این کار تا زمان دوفازه شدن سامانه ادامه داشت. مجموعه فازهای کلروفرم جمع آوری شده به روتاری دارای خلا منتقل شده و حلال کلروفرم از روغن جداسازی و توزین شد.

استخراج روغن از ریز جلبک به روش تر

در روش استخراج تر، ۱ میلی لیتر سولفوریک اسید ۱ مولار به زیست توده تر افزوده شد. پس از هم زدن، گرمادهی در سه تیمار دمایی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ درجه سلسیوس و سه تیمار زمان ۲۰، ۳۰ و ۴۰ دقیقه انجام شد. سپس ۱ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۵ مولار به مخلوط اضافه شد و دوباره گرمادهی در دماها و زمان‌های یاد شده انجام شد. پس از سانتریفوژ کردن (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه)، مایع رویی جمع آوری شد و مایع زیری به منظور شستشوی زیست توده باقیمانده با مقداری آب مقطر مخلوط و سپس سانتریفوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) شد. پس از حذف آب افزوده شده، زیست توده دوباره با مایع رویی به دست آمده از سانتریفوژ کردن پیشین مخلوط شد. در ادامه کار ۳۰۰ میکرولیتر سولفوریک اسید ۰/۵ مولار به مخلوط افزوده شد. پس از اختلاط کامل و سانتریفوژ کردن (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه)، مایع زیری جمع آوری و ۵ میلی لیتر هگزان به آن افزوده شد. پس از هم زدن، در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه گرمادهی انجام گرفت. در زمان گرمادهی، هم زدن هر ۵ دقیقه یک بار صورت گرفت. پس از سانتریفوژ کردن (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) فاز حلال دارای روغن از مخلوط جداسازی شد و هگزان توسط تبخیر کننده دوار خلاء حذف شد. شمای مرحله‌های روش استخراج تر در شکل ۳ نشان داده شده است.

برداشت ریزجلبک با استفاده از روش انعقاد الکتریکی انجام گرفت زیرا در این روش هیچ گونه ماده شیمیایی مصرف نشده و هزینه برداشت نسبت به سایر روش‌ها کمتر است. برای برداشت نخست محلول ریزجلبک از فتوراکتور زیستی به مخزن دستگاه برداشت منتقل شد (شکل ۲). همزن در درون مخزن قرار داده شد و دور همزن بر روی ۱۰۰ دور در دقیقه تنظیم شد. دو الکترود از جنس آلومینیوم با فاصله ۱ سانتیمتر از یکدیگر داخل ظرف قرار داده شد [۲۲]. برای تأمین جریان الکتریسیته از یک منبع تغذیه جریان مستقیم استفاده شد. بیشینه ولتاژ تولیدی این منبع تغذیه ۳۰ ولت و جریان بیشینه آن ۵ آمپر می‌باشد. کابل‌های مثبت و منفی منبع تغذیه به دو الکترود آلومینیومی وصل شده و شدت جریان بر روی ۱ آمپر تنظیم شد. در اثر این جریان، ولتاژ ایجاد شده توسط منبع تغذیه در دو سر الکترودها موجب آزادسازی کاتیون‌های Al^{3+} و لخته شدن زیست توده شد. لخته‌های ایجاد شده از سطح محیط کشت جدا شد. ریزجلبک‌های برداشت شده به دو دسته تقسیم شد. یک بخش به صورت تر در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد و بخش دیگر برای انجام آزمون‌های مقایسه‌ای روش‌های تر و خشک، نخست در آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شد و پس از آن نمونه خشک شده برای جداسازی نمک با آب مقطر مخلوط شد. نمک حل شده در آب با سانتریفوژ از ریزجلبک‌ها جدا شد و نمونه دوباره در آن قرار گرفته، خشک شد و تا زمان استخراج در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

استخراج روغن از ریز جلبک به روش خشک

روش اصلاح شده بلای و دایر برای استخراج روغن از ریز جلبک خشک مورد استفاده قرار گرفت [۲۳]. در این روش از مخلوط کلروفرم - متانول - آب برای استخراج روغن از ریزجلبک استفاده می‌شود. در مرحله اول، ۱۰ گرم از ریزجلبک خشک شده با حلال متانول، کلروفرم و آب به ترتیب با مقدارهای ۱۰، ۵ و ۴ میلی لیتر در درون دکانتور مخلوط شد. علت افزودن آب ایجاد شوک اسمزی و کمک به متلاشی شدن دیواره سلول‌ها می‌باشد. پس از هم زدن و اختلاط کامل، در مرحله دوم حلال کلروفرم و آب، هرکدام به مقدار ۵ میلی لیتر به درون دکانتور افزوده و هم زده شد. سپس برای جداسدن فازها، دکانتور برای مدتی (به تقریب ۱۰ دقیقه) به حالت سکون قرار گرفت. سه فاز شامل کلروفرم دارای روغن، متانول و بقایای سلولی تشکیل شد. فاز کلروفرم دارای روغن از دکانتور خارج شد و به فاز متانول دارای

از روش آب شویی حبابی استفاده شد [۲۶]. آب به نسبت ۱ به ۱ به بیودیزل افزوده شده و عمل هم زدن توسط حباب‌های هوا به آرامی انجام گرفت. پس از ۳۰ دقیقه هم زنی قطع شده و پس از ۴ ساعت آب ته نشین شده از قسمت پایین دکانتور تخلیه شد. آب شویی ۳ بار تکرار شد به طوری که در مرحله آخر آب ته نشین شده کاملاً زلال و شفاف به دست آمد. بیودیزل خالص‌سازی شده، در آون و در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا دو فاز تشکیل شود و بیودیزل شفاف به دست آید. برای اندازه‌گیری گرانبوی بیودیزل استخراجی از گرانبوی سنج، برای اندازه‌گیری نقطه اشتعال از فلش پوینت، برای اندازه‌گیری چگالی از دانسیته متر، برای اندازه‌گیری نقطه ابری شدن و ریزش از CP تستر و برای اندازه‌گیری میزان آب و رسوبات بیودیزل استخراجی از دستگاه کارل فیشر استفاده شد.

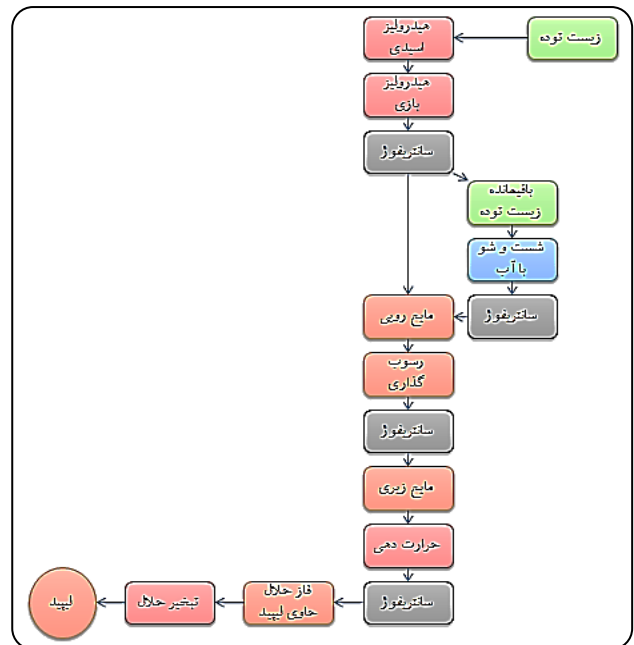
آنالیز آماری

کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت. نتیجه‌های آزمون‌ها به نرم افزار Minitab V.16 انتقال داده شد. آنالیز تجزیه واریانس بر روی داده‌ها پیاده سازی شده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن انجام شد.

نتیجه‌ها و بحث

تأثیر تیمار دما و زمان بر میزان استخراج روغن

در مطالعه حاضر نتیجه‌های آماری برآمده از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل دما و زمان بر میزان روغن استخراج شده در سطح احتمال ($p < 0.05$) معنی‌دار است. بنابراین مقایسه میانگین اثر متقابل پارامترها مورد بررسی قرار گرفت. در شکل ۴ نمودار اثر متقابل دما و زمان بر میزان روغن استخراجی از زیست توده تر ریز جلبک نشان داده شده است. دیده می‌شود که با افزایش زمان و دما میزان استخراج روغن در این روش افزایش می‌یابد. افزایش دما به علت بالا بردن جنبش مولکولی و در نتیجه افزایش انرژی جنبشی و انتقال جرم، به استخراج بیشتر لیپید می‌انجامد [۲۷، ۲۸]. نتیجه‌های پژوهش غزالی و یاسین در استخراج روغن از دانه گیاه *Moringa oleifera* نشان داد که با افزایش دما از ۶۲ به ۸۲ درجه سلسیوس بازده استخراج به میزان بیشینه خود می‌رسد [۲۹]. همچنین در استخراج روغن از ریزجلبک *Chlorella vulgaris* افزایش دما نخست باعث افزایش بازده استخراج روغن شده و پس از آن این روند رو به کاهش گذاشت [۳۰]. دلیل احتمالی این امر به خاطر افزایش ظرفیت انحلال سامانه حلال با افزایش دما می‌باشد [۳۱، ۳۲]. در پژوهش حاضر نیز همان‌گونه



شکل ۳: مرحله‌های استخراج روغن از ریزجلبک به روش تر

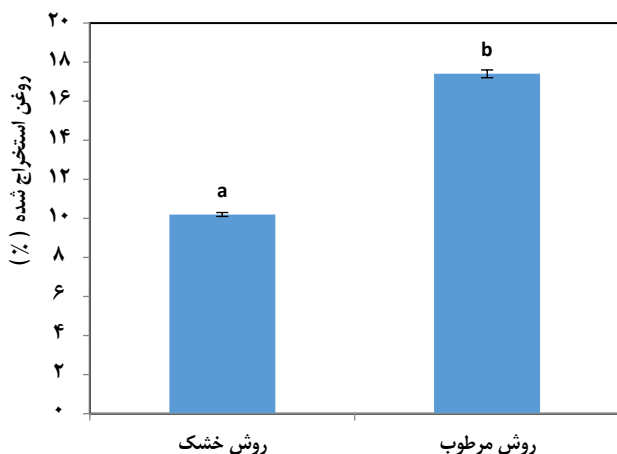
میزان درصد روغن استخراج شده در هر یک از روش‌های استخراج، با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد [۲۴].

$$L \left(100, \frac{w}{M} \right) = \frac{A}{M} \times 100 \quad (1)$$

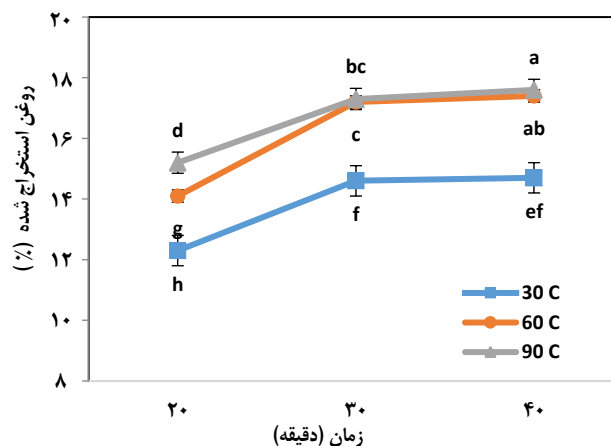
در این رابطه L درصد روغن استخراج شده نسبت به جرم نمونه اولیه، A میزان وزن روغن استخراج شده بر حسب گرم و M میزان جرم زیست توده خشک می‌باشد.

تولید بیودیزل از روغن استخراج شده

روغن ریزجلبک با استفاده از روش ترانس استریفیکاسیون، به بیودیزل تبدیل شد. برای انجام این واکنش، متانول و روغن ریزجلبک به نسبت حجمی ۱ به ۴ با هم مخلوط شدند [۲۵] تا واکنش به طور کامل به سمت تولید محصول پیش برود. به میزان ۱ درصد وزنی کاتالیست پتاسیم هیدروکسید نیز به محلول افزوده شد. این واکنش در یک بشر ۵۰۰ میلی‌لیتری در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت انجام گرفت. برای هم زدن مخلوط از همزن مغناطیسی با مگنت ۴ سانتی‌متری استفاده شده و دور آن بر روی ۶۰۰ rpm تنظیم شد. پس از گذشت ۱ ساعت همزن خاموش شده و مخلوط به دست آمده به دکانتور ۵۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد تا عمل جداسازی گلیسرین به صورت وزنی صورت پذیرد. پس از ۴۸ ساعت فاز گلیسرین از ته دکانتور تخلیه شده و بیودیزل خالص سازی شد. برای خالص‌سازی



شکل ۵: مقایسه روغن استخراج شده در روش خشک و تر



شکل ۴: نمودار اثر متقابل دما و زمان بر میزان روغن استخراج شده از زیست توده تر ریز جلبک

معنی‌داری در میزان روغن استخراج شده در این دو روش وجود دارد ($p < 0.05$). در روش استخراج خشک با توجه به پیش تیمارهایی که بر روی زیست توده صورت می‌گیرد، بخشی از روغن موجود در ریز جلبک در مراحل خشک کردن، نمک زدایی و یا ناشی از تأثیر دما بر مسیر فعالیت متابولیسمی سلول ریز جلبک از دسترس خارج می‌شود. در حالی که در روش تر فرایندهای خشک کردن حذف شده است و این امر باعث کاهش مدت زمان استخراج روغن تر نسبت به روش خشک می‌شود. از سویی تیمار هیدرولیز اسیدی و بازی در روش تر باعث تخریب دیواره سلول‌های ریز جلبک شده و روغن اندوخته در درون سلول‌ها را آزاد و در اختیار حلال قرار می‌دهد که منجر به افزایش بازده استخراج روغن تر می‌شود که در این پژوهش میزان بازدهی استخراج روغن از ۱۰٪ در روش خشک به ۱۷٪ در روش تر رسید (شکل ۵). در سال ۲۰۱۳ میلادی، برویترا و همکاران بیان داشتند که وجود رطوبت به دلیل ایجاد تورم سلولی باعث افزایش بازده استخراج می‌شود [۳۶]. البته تأثیر رطوبت به گونه ریز جلبک، دما وابسته است [۳۷]. در پژوهش‌های کاو و همکاران و همچنین قاسمی و همکاران بر روی گونه‌های دیگر ریز جلبک نتیجه‌های همانندی با استفاده از روش تر نسبت به روش خشک به دست آمده است و بیانگر آن است که روش تر دارای بازده بالاتر و هزینه کمتری نسبت به روش خشک می‌باشد که با نتیجه پژوهش حاضر مطابقت دارد [۳۸، ۳۷].

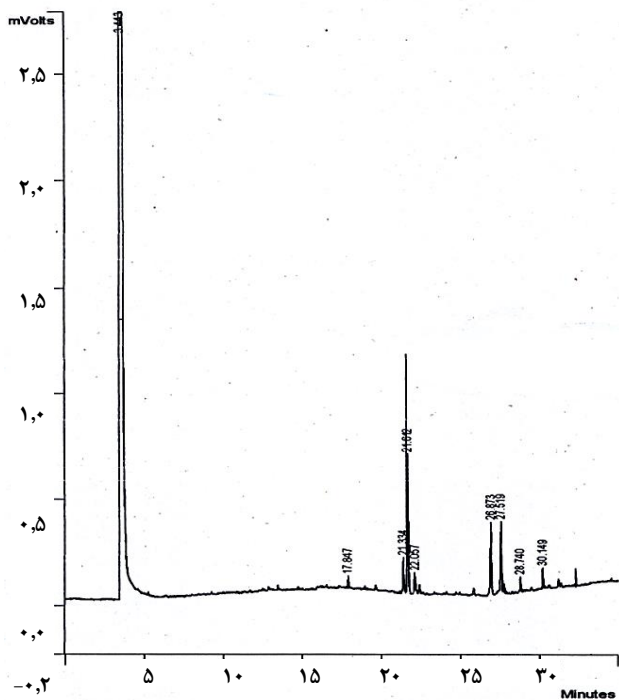
پروفیل اسید چرب روغن استخراج شده از ریز جلبک

به منظور آنالیز اسیدهای چرب از دستگاه کروماتوگرافی گازی با ستون موئینه و دارای دتکتور FID استفاده شد. از آنجایی که اسیدهای چرب دارای نقطه تبخیر بالایی هستند نخست به منظور

که در شکل ۴ دیده می‌شود با افزایش دما از ۳۰ به ۹۰ درجه سلسیوس، بازدهی استخراج روغن از زیست توده تر ریز جلبک از ۱۳ به ۱۷ درصد افزایش یافت ولی در دمای بالاتر از ۶۰ درجه سلسیوس اختلاف معنی دار نبود. نتیجه‌های پژوهش بیانگر آن است که در زمان‌های بیش‌تر از ۳۰ دقیقه در هیچ یک از شرایط دمایی تأثیر معنی‌داری در میزان روغن استخراج شده دیده نشد. بنابراین با در نظر گرفتن ملاحظات اقتصادی، زمان استخراج بیش از ۳۰ دقیقه توجیه پذیر نمی‌باشد. ساتیش و سیمس در پژوهش‌های خود بر روی استخراج روغن از ریز جلبک *Chlorella* و *Scenedesmus* به روش تر، دمای ۹۰ درجه سلسیوس و مدت زمان ۳۰ دقیقه به عنوان مناسب‌ترین دما و زمان اعلام کرده‌اند [۳۳]. با توجه به این‌که در دماهای بالاتر از ۶۰ درجه سلسیوس و مدت زمان بیش‌تر از ۳۰ دقیقه، تأثیر معنی‌داری در بازده استخراج دیده نشد بنابراین، دما و زمان مناسب برای استخراج روغن به روش تر از ریز جلبک به ترتیب ۶۰ درجه سلسیوس و ۳۰ دقیقه به دست آمد.

مقایسه روش تر و خشک در استخراج روغن از ریز جلبک

دمایی که در آن ریز جلبک خشک می‌شود، می‌تواند بر روی الگو، مسیر و فعالیت متابولیسمی سلول ریز جلبک و در نتیجه ترکیب سلولی آن تأثیر گذارد [۳۴]. در مطالعه ای که به اثر دمای خشک شدن بر روی استخراج لیپید از کلرلا ولگاریس انجام شد، به این نتیجه رسیدند که دمای ۶۰ °C باعث کاهش کمی در مقدار لیپید استخراج شده می‌شود ولی با افزایش دمای خشک کردن به ۸۰ °C یا بیش‌تر مقدار لیپید به طور معناداری کاهش می‌یابد [۳۵]. در شکل ۵، مقایسه بازده دو روش استخراج تر و خشک بر روی ریز جلبک مورد مطالعه در این پژوهش نشان داده شده است. دیده می‌شود که اثر



شکل ۶: نمودار کروماتوگرام روغن استخراج شده از ریزجلبک

ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و یا دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) به عنوان مشتقات اسید چرب لینولنیک اسید، به سادگی در هنگام ذخیره سازی اکسید می شوند که در این حالت برای تولید بیودیزل مناسب نیستند، در حالی که پایداری بالای اکسیداسیون پالمیتیک و اولئیک اسید باعث بالا رفتن کیفیت سوخت تولیدی می شود [۴۲]. نتیجه های برآمده از این پژوهش حاکی از آن است که در بیش تر اسیدهای چرب موجود در ریز جلبک اشباع می باشد که بخش عمده آن را پالمیتیک اسید و استئاریک اسید تشکیل می دهد. بنابراین پایداری بیشتری به اکسیایش داشته و برای سوخت بیودیزل مناسب تر می باشد. و از طرفی نسبت بالای اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع با یک پیوند دوگانه در روغن حاصل از ریز جلبک پژوهش حاضر مانند جلبک های سبز از جمله گونه کلرلا، ممکن است مشکل های کمتری با پلیمریزاسیون سوخت در زمان سوختن ایجاد کند [۴۳]. از سویی نتیجه های مدل سازی نشان داد که اسیدهای چرب اشباع با زنجیره هیدروکربنی کوتاه یعنی استئارات و پالمیتیک اسید تأثیر بیشتری بر تولید توان موتور نسبت به اسیدهای چرب غیر اشباع با زنجیره هیدروکربنی بلند یعنی لینولات و لینولات دارند [۴۴]. بنابراین، باتوجه به نتیجه های برآمده از پروفیل اسیدهای چرب روغن ریزجلبک می توان گفت که برای افزایش توان موتور مناسب می باشد.

تزیق چربی به دستگاه، مشتق متیل استر آن ها باید تهیه شود تا اسیدهای چرب فرار شوند. برای تهیه مشتق متیل استر از روش ترانس استریفیکاسیون استاندارد ISO 5509 استفاده شد به این ترتیب که مقداری از لیپید استخراج شده را در یک لوله آزمایش توزین کرده و سپس حلال n- هپتان افزوده شد. مقداری از واکنش گر ترانس استریفیکاسیون (پتاسیم هیدروکسید یا سدیم متوکساید متانولیک) به لوله درب دار افزوده شده و درب لوله بسته شد و محتویات لوله مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه مقدار پودر سدیم هیدروژن سولفات به لوله افزوده شده و دوباره مخلوط شد. مقداری از مایع شفاف بالایی به دست آمده از واکنش به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزیق شد. اسیدهای چرب و مقدار هر یک از آن ها در نمونه تزیق شده تعیین شد.

در شکل ۶ نمودار کروماتوگرام روغن استخراج شده از ریزجلبک نشان داده شده است. لیپید استخراج شده از ریزجلبک *دونالیلا* سویه M_1 به ظاهر سبز رنگ و در دمای محیط به شکل مایع می باشد. زنجیر اسیدهای چرب در لیپید استخراج شده ریز جلبک از ۱۴ تا ۲۰ کربن دارد که برای تولید بیودیزل مناسب می باشد. در حدود ۵۹٪ اسیدهای چرب موجود در آن اشباع می باشد که بخش عمده آن را پالمیتیک اسید (۳۶/۶۲٪) و استئاریک اسید (۱۹/۰۸٪) تشکیل می دهد.

گونه های گوناگون ریزجلبک، پروفایل اسید چرب مربوط به خود را دارا می باشد و رابطه مستقیمی بین درصد اسیدهای چرب اشباع با کیفیت روغن تولید شده وجود دارد هر اندازه که میزان اسیدهای چرب غیر اشباع بیشتر باشد بیودیزل پایانی حساسیت بیشتری نسبت به اکسیایش خواهد داشت ولی در سرما گرانی خود را حفظ می نماید [۳۹]. همان گونه که در شکل ۶ دیده می شود مقدار اسیدهای چرب اشباع روغن به دست آمده از ریزجلبک بالاتر از اسیدهای چرب غیر اشباع آن می باشد بنابراین مقاومت به اکسیایش آن بالاتر می باشد. انواع معمول اسیدهای چرب موجود در روغن های ریزجلبک C14:0، C16:0، C18:0، C18:1، C18:2، C18:3 است که بسته به هر گونه مقدارهای آن ها متفاوت است [۴۰]. در مورد ریزجلبک های سبز آب شیرین نیز بیش ترین مقدار اسیدهای چرب مختص C18:0، C18:1، C18:2 و C18:3 است و سایر اسیدهای چرب با مقدارهای پایین تری حضور دارند [۴۱].

برخی از ریزجلبک ها غنی از اسیدهای چرب اشباع نشده هستند. اسیدهای چرب اشباع نشده با بیش از ۲ پیوند دوگانه، مانند

جدول ۱: پروفیل اسید چرب روغن استخراج شده از ریزجلبک به دو روش خشک و تر

ترکیب اسید چرب	نام اسید چرب	درصد اسید چرب در روش خشک	درصد اسید چرب در روش تر
C14	مریستیک اسید	۲/۶۴	۲/۶۶
C16	پالمیتیک اسید	۳۶/۶۲	۳۵/۳۸
C16 ₁	پالمیتولیک اسید	۵/۹	۶/۶
C18	استئاریک اسید	۱۹/۰۸	۱۹/۲۸
C18 ₁	اولئیک اسید	۱۸/۶۲	۱۸/۶۵
C18 ₂	لینولئیک اسید	۳/۲۶	۳/۳۲
C18 ₃	لینولئیک اسید	۴/۶۵	۴/۵۹
C20	آراشیدیک اسید	مثبت	مثبت
سایر	-	۹/۲۳	۹/۲۱

جدول ۲: پروفیل اسید چرب روغن‌های استخراج شده از منابع گوناگون

نام ریزجلبک / دانه روغنی	C14	C16	C16 ₁	C18	C18 ₁	C18 ₂	C18 ₃	C20	منبع
Chlorella protothecoides	۰/۲۷	۱۳/۴۲	-	۳/۴	۵۸/۹۴	۱۹/۸۶	-	-	[۴۶]
Chlamydomonas sp.	۱/۶۱	۵۰/۷۷	۰/۲۸	۱۱/۵۷	۱۳/۷۷	۳/۹۳	۲/۷۶	-	[۴۷]
Chlorella emersonii	-	۱۴/۷۵	-	۹/۸	۱۷/۰۱	۹/۰۴	۲۹/۳۲	-	[۴۸]
Nannochloropsis oculata	۳/۹	۲۰/۵	۲۵/۲	۱/۸	۴/۱	۲/۲	۹/۰	۲۹/۷	[۴۹]
Cryptophyceae	۵/۰	۱۳/۵	۲/۰	۳/۰	۵/۲	۱/۲	۱۰/۸	۱۲/۹	[۴۹]
سویا	۰/۰	۱۱/۳	۰/۱	۳/۶	۲۴/۹	۵۳/۰	۶/۱	۰/۳	[۵۰]
انگور	۰/۱	۶/۹	۰/۱	۴/۰	۱۹/۰	۶۹/۱	۰/۳	۰/۳	[۵۰]
پنبه	۶/۳۰	۱۱/۷۳	-	۹/۹	۲۹/۴	۱۳/۱۱	-	۰/۱	[۵۱]
آفتاب گردان	-	۶/۲۵	-	۱/۹۸	۴۵/۳۹	۴۶/۰۲	۰/۱۲	-	[۵۲]
زیتون	۰/۰	۱۴/۶۹	۱/۱۸	۲/۱۹	۶۸/۹۴	۱۲/۲۲	۰/۷۹	۰/۰	[۵۳]
پالم	۱/۱	۴۴/۰	-	۴/۵	۳۹/۲	۱۰/۱	۰/۴	۰/۱	[۵۴]
کنجد	-	۹/۳۹	۰/۱۰	۵/۵۱	۴۱/۳۶	۴۱/۲۵	۰/۳۵	-	[۵۵]
نارگیل	۱۸/۹۴	۸/۶۲	-	۱/۹۴	۵/۸۴	۱/۲۸	-	-	[۵۲]
کلزا	-	۳/۴۹	-	۰/۸۵	۶۴/۴	۲۲/۳	۸/۲۳	-	[۵۶]
بادام	۰/۰	۱۰/۴	۰/۵	۲/۹	۷۷/۱	۷/۶	۰/۸	۰/۳	[۵۳]

میزان پالمیتیک اسید موجود در لیپید استخراج شده از *دونالیلا* از میزان آن در روغن پالم (۴۴٪)، که در میان روغن‌های گیاهی خوراکی بیش‌ترین پالمیتیک اسید را دارد، کم‌تر می‌باشد. ولی از روغن‌های گیاهی خوراکی دیگر مانند آفتابگردان (۳/۱۰٪)، سویا (۱۱،۳٪)، زیتون (۱۴،۶۹٪)، کنجد (۹/۳۹٪) و نارگیل (۸،۶۲٪) بیش‌تر است (جدول ۲). همچنین میزان پالمیتیک اسید به دست آمده از لیپید استخراج شده از *دونالیلا* از میزان آن در ریزجلبک *Chlamydomonas sp.* (۵۰،۷۷ درصد) کم‌تر و از میزان آن در سایر ریزجلبک‌های ذکر شده در جدول ۲ بیش‌تر است. میزان استئاریک اسید آن هم از درصد جرمی آن در همه روغن‌های گیاهی خوراکی و ریزجلبک‌های ذکر شده بیش‌تر می‌باشد.

در جدول ۱ پروفیل اسید چرب روغن استخراج شده از ریزجلبک به دو روش خشک و تر نشان داده شده است. دیده می‌شود که روش خشک یا تر تأثیر چندانی در پروفیل اسید چرب ریزجلبک ندارد. در پژوهش ملک‌زاده و همکاران بر روی ریز جلیبک کلرلاولگاریس نیز پروفیل اسیدهای چرب ریزجلبک تر به تقریب همانند با ریزجلبک خشک گزارش شده است [۲۷]. لی و همکاران نیز نتیجه‌های همانندی را در مورد تأثیر نداشتن روش استخراج بر اسیدهای چرب ارائه نموده اند. طبق نتیجه های آنان روش استخراج با دی کلرومتان: متانول، ۲ پروپانول: هگزان و استخراج با CO₂ فوق بحرانی، تأثیر معنی‌داری بر پروفیل اسیدهای چرب روغن استخراجی از ریزجلبک ندارد [۴۵].

جدول ۳: ویژگی‌های بیودیزل تولید شده از روغن ریزجلبک با استاندارد های مربوطه

واحد	بیودیزل از روش تر	بیودیزل از روش خشک	حدود مجاز	استاندارد آزمون	آزمون
°C	۱۳۸	۱۳۵	کمترین ۱۳۰	ASTM D-92	نقطه اشتعال
mm ² /s	۵/۴	۵/۳	۶/۰-۱/۹	ASTM D-445	گرانروی سینماتیک
°C	۴	۵	-	ASTM D-2500	نقطه ابری شدن
°C	-۷	-۶	-	ASTM D-97	نقطه ریزش
% vol.	۰/۰۵	۰/۰۵	بیشترین ۰/۰۵	ASTM D-2709	آب و رسوبات
g/cm ³	۰/۸۶۰	۰/۸۶۰	-----	-----	چگالی

جدول ۴: ویژگی‌های بیودیزل استخراجی از روغن های خوراکی گوناگون

واحد	کنجد	زیتون	نارگیل	بادام زمینی	آفتاب گردان	پالم	پنبه	انگور	کلزا	سویا	آزمون
°C	۱۷۰	۱۶۳	۱۱۰	۱۷۶	۱۸۳	۱۳۵	۱۶۲	۱۷۵	>۱۵۰	۱۶۰	نقطه اشتعال
mm ² /s	۴/۲	۴/۵۱	۲/۸۳	۴/۹	۴/۰۶	۴/۷۱	۵/۸	۴/۱	۴/۷	۵/۱۹	گرانروی سینماتیک
°C	-۶	-	-۳	۵	۱	۱۶	-	-	-۴	۱	نقطه ابری شدن
°C	-۱۴	۱۷	-۱۲	-	-	-	-	-	-۱۰	-	نقطه ریزش
g/cm ³	۰/۸۶۷	۰/۸۸۰	۰/۸۷۳	۰/۸۸۳	۰/۸۶۰	۰/۸۶۴	۰/۸۹۵	-	۰/۸۸۴	۰/۸۴۷	چگالی
	[۶۵]	[۶۴]	[۶۳]	[۶۲]	[۶۲]	[۶۱-۶۰]	[۵۹]	[۵۰]	[۵۸]	[۵۷]	منبع

جدول ۵: ویژگی‌های بیودیزل استخراجی از ریزجلبک های گوناگون

واحد	<i>Chlorella sp.</i>	<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	<i>Chlorella protothecoides</i>	آزمون
°C	۱۶۴/۱۲	۱۴۴	۱۳۰	۹۵	۱۲۴	نقطه اشتعال
mm ² /s	۴/۲۲	۴/۱۹	۵/۶۶	۵/۰۶	۴/۲۲	گرانروی سینماتیک
°C	۶۶۸	۷	-	۱۶	-	نقطه ابری شدن
°C	۰/۵۶	-۶	۱۸-	-	-	نقطه ریزش
g/cm ³	۰/۸۹۰	۰/۸۶۹	۰/۸۶۰	۰/۹۱۲	۰/۹۰۰	چگالی
-	[۷۰]	[۶۹]	[۶۸]	[۶۷]	[۶۶]	منبع

که نوع روش استخراج تأثیر چندانی در ویژگی‌ها و کیفیت بیودیزل تولید شده ندارد. همه ویژگی‌های بیودیزل تولید شده مطابق با استاندارد ASTM D-6751 می باشد. نقطه اشتعال بیودیزل تولید شده از ریزجلبک *دونالیلا* کم‌تر از بیودیزل روغن آفتابگردان، روغن سویا، روغن کلزا، روغن انگور، روغن پنبه، روغن بادام زمینی و روغن کنجد و همچنین روغن‌های برآمده از ریزجلبک‌های *Nannochloropsis sp.* و *Chlorella sp.* است (جدول ۵ و ۴). گرانروی بیودیزل تولیدی از این ریزجلبک (۵/۴۰) بیش‌تر از بیودیزل روغن آفتابگردان (۴/۰۶)، روغن سویا (۵/۱۹)، روغن کلزا (۴/۷) و روغن زیتون (۴/۵۱) می‌باشد (جدول ۴). همچنین گرانروی بیودیزل تولیدی از ریزجلبک *دونالیلا* از همه ریزجلبک‌های ذکر شده در جدول ۵ به جز *Spirulina platensis* بیش‌تر است. با این حال همه ویژگی‌های به دست آمده در بازه استاندارد است.

اسید چرب تک غیراشباعی عمده روغن استخراج شده از *دونالیلا*، اولئیک اسید (۱۸/۶۵٪) می‌باشد. مطابق با جدول ۱ میزان اسیدهای چرب چند غیراشباعی در روغن استخراج شده از این ریزجلبک حدود ۸٪ می‌باشد که بیشتر آن را لینولینیک اسید (۴/۵۹ درصد) تشکیل می‌دهد. که از میزان آن در روغن سویا، انگور، کلزا و ریزجلبک *Chlorella emersonii* و *Chroomonas salina* کم‌تر و از سایر روغن‌های ذکر شده بیش‌تر است. همچنین مقدار لینولینیک اسید لیپید استخراج شده (۳/۳۲٪) از بیش‌تر روغن‌های بررسی شده کم‌تر می‌باشد (جدول ۲).

ویژگی‌های بیودیزل تولیدی از ریز جلبک

در جدول ۳ ویژگی‌های بیودیزل تولید شده از روغن ریزجلبک استخراجی به دو روش خشک و تر نشان داده شده است. دیده می‌شود

نتیجه گیری

زمان کوتاه تر برای تولید بیودیزل از روغن ریزجلبک مناسب تر از روش خشک می باشد. از سویی نوع روش استخراج تأثیر معنی داری بر پروفیل اسیدهای چرب و ویژگی های بیودیزل تولیدی ندارد و بیودیزل تولید شده از ریزجلبک *دونالیلا* به لحاظ این که حدود ۵۹٪ اسیدهای چرب موجود در آن اسیدهای چرب اشباع و بخش عمده آن را پالمیتیک اسید و استتاریک اسید تشکیل می دهد، پایداری بیش تری نسبت به اکسایش داشته و برای تولید بیودیزل و افزایش توان موتور مناسب تر است. همه ویژگی های بیودیزل تولید شده مانند نقطه اشتعال و گرانشی نیز مطابق با استاندارد ASTM D-6751 می باشد.

در این کار پژوهشی، بیودیزل از روغن ریزجلبک به دو روش تر و خشک از گونه *دونالیلا* بومی ایران تولید شد. نتیجه ها نشان داد که روش تر یا به عبارت دیگر روش مسقیم، با توجه به این که بیودیزل به طور مستقیم از زیست توده تر تولید می شود بازده بالاتر و زمان کوتاه تری را نسبت به روش خشک دارا می باشد. به طوری که بیشینه بازده استخراج روغن در روش تر ۱۷/۴ درصد و در روش خشک ۱۰/۲ درصد به دست آمد. مدت استخراج روغن نیز در روش تر به دلیل حذف مرحله های خشک کردن و نم زدایی به طور چشمگیری کوتاه تر از روش خشک می باشد. در روش تر بیش ترین بازده استخراج به ترتیب در زمان و دمای ۳۰ دقیقه و ۶۰ درجه سلسیوس به دست آمد. بنابراین روش تر به دلیل بازده بالای استخراج و مدت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸، ۶، ۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸، ۱۰، ۲

مراجع

- [1] Asif M., Muneer T., *Energy Supply, Its Demands and Security Issues for Developed and Emerging Economies. Renew. Sustain. Energ. Rev.* **11**: 1388-1413 (2007). doi:10.1016/j.rser.2005.12.004
- [2] Kumar R., Hanumantha Rao P., Arumugam M., *Lipid Extraction Methods from Microalgae: A Comprehensive Review. Frontiers in Energy Research*, **2**: 61 (2015).
- [3] Khan S.A., Rashmi Hussain M.Z., Prasad S., Banerjee U., *Prospects of Biodiesel Production from Microalgae in India. Renew. Sustain. Energ. Rev.* **13**: 2361-2372 (2009).
- [4] Arumugam M., Agarwal A., Arya M.C., Ahmed Z. *Microalgae: Renewable Source for Second Generation Biofuel. Curr.Sci.* **100**: 1141-1142 (2011). doi:10.1007/s00253-009-1935-6
- [5] Guedes R.E., Luna A.S., Torres A.R. *Operating Parameters for Bio-Oil Production in Biomass Pyrolysis: A Review. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **129**: 134-149. (2018).
- [6] Biller P., Ross A.B. *Potential Yields and Properties of Oil from the Hydrothermal Liquefaction of Microalgae with Different Biochemical Content. Bioresource Technology*, **102(1)**: 215-225 (2011).
- [7] Borowitzka M.A., Moheimani N.R., "Algae for Biofuels and Energy", Springer Dordrecht Heidelberg New York London. (2013).
- [8] Wahidin S., Idris A., Yusof N.M., Kamis N.H.H., Shaleh S.R.M. *Optimization of the Ionic Liquid-Microwave Assisted One-Step Biodiesel Production Process from Wet Microalgal Biomass. Energy Conversion and Management*, **171**: 1397-1404. (2018).
- [9] Schenk P.M., Thomas-Hall S.R., Stephens E., Marx U.C., Mussgnug J.H., Posten C Hankamer B. *Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. Bioenergy Research*, **1(1)**: 20-43 (2008).
- [10] Dismukes G.C., Carrieri D., Bennette N., Ananyev G. M., Posewitz M. C. *Aquatic Phototrophs: Efficient Alternatives to Land-Based Crops for Biofuels. Current Opinion in Biotechnology*, **19(3)**: 235-240 (2008).

- [11] Searchinger T., Heimlich R., Houghton R.A., Dong F., Elobeid A., Fabiosa J., ... & Yu T.H. Use of US Croplands for Biofuels Increases Greenhouse Gases Through Emissions from Land-Use Change. *Science*, **319(5867)**: 1238-1240 (2008).
- [12] Chisti, Y. Biodiesel from Microalgae. *Biotechnology Advances*, **25(3)**: 294-306 (2007).
- [13] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, **101(2)**: 87-96 (2006).
- [14] Cantrell K.B., Ducey T., Ro K.S., Hunt P.G. Livestock Waste-to-Bioenergy Generation Opportunities. *Bioresource Technology*, **99(17)**: 7941-7953 (2008).
- [15] Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **102(1)**: 100-112 (2009).
- [16] Hirano A., Ueda R., Hirayama S., Ogushi Y. CO₂ Fixation and Ethanol Production with Microalgal Photosynthesis and Intracellular Anaerobic Fermentation. *Energy* **22(2-3)**: 137-142 (1997).
- [17] Qin J. Bio-Hydrocarbons from Algae - Impacts of Temperature, Light and Salinity on Algae Growth. *Barton, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation*; (2005).
- [18] Kapoore R., Butler T., Pandhal J., Vaidyanathan S. Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: from Biofuels to Biorefinery. *Biology*, **7(1)**: 18 (2018).
- [19] Patil P.D., Gude V.G., Mannarswamy A., Cooke P., Nirmalakhandan N., Lammers P., Deng S. Comparison of Direct Transesterification of Algal Biomass under Supercritical Methanol and Microwave Irradiation Conditions. *Fuel*, **97**, 822-831 (2012).
- [20] Richmond A. (Ed.). "Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology", Oxford: Blackwell Science, Vol. 577 (2004).
- [21] Zebib T., "Microalgae Grown in Photobioreactors for Mass Production of Biofuel". Rutgers University Department of Bioenvironmental Engineering September **30** (2008)
- [22] Shahi T., Zonouzi A., Beheshti B., Almasi M. Comparison of Four Lipid Extraction Methods from Microalgae *Dunaliella* Sp. for Biodiesel Production. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, **39(4)**: 371-378 (2020).
- [23] Bligh E.G., Dyer W.J.A., Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37(8)**: 911-917 (1959).
- [24] Zenouzi A., Ghobadian B., Hejazi M.A., Rahneemooon P., Harvesting of Microalgae *Dunaliella Salina* using Electroflocculation. *JAST*, **15(5)** (2013)
- [۲۵] زنوزی، ع. قبادیان، ب. توکلی هاشجین، ت. فیض اله نژاد، م. باقرپور، ح. تأثیر ترکیب سوخت‌های دیزل و بیودیزل حاصل از پسماند روغن‌های خوراکی در عملکرد موتور اشتعال تراکمی (CI). *مجله سوخت و احتراق*، **۱(۱)**: ۵۹ تا ۵۳ (۱۳۸۷).
- [۲۶] فیض اله نژاد، م. قبادیان، ب. توکلی هاشجین، ت. باقرپور، ح. زنوزی، ع. بررسی پارامترهای مؤثر بر آبشویی سوخت بیودیزل. *مجله مهندسی بیوسیستم ایران*، **۴۰(۲)**: ۱۴۷ تا ۱۵۴ (۱۳۸۸).

- [۲۷] ملک زاده، عابدینی، وثوقی، رشتچیان. بررسی تجربی و مدل‌سازی ترمودینامیکی فرآیند استخراج لیپید از ریزجلبک تر. پژوهش نفت، ۲۶(۴): ۱۶۴ تا ۱۵۳ (۱۳۹۵).
- [28] Wang L., Yang B., Du X., Yi C. Optimisation of Supercritical Fluid Extraction of Flavonoids from *Pueraria Lobata*. *Food Chemistry*, **108(2)**: 737-741 (2008).
- [29] Ghazali Q., Yasin N.H.M. The Effect of Organic Solvent, Temperature and Mixing Time on the Production of Oil from *Moringa Oleifera* Seeds. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing. **36(1)**: 012053 (2016).
- [30] Abdullah N., Amran, N.A., Yasin N.H.M. Algae Oil Extraction from Freshwater Microalgae *Chlorella Vulgaris*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, **21(3)**: 735-744 (2017).
- [31] Suganya T., Renganathan, S. Optimization and Kinetic Studies on Algal Oil Extraction from Marine Macroalgae *Ulva Lactuca*. *Bioresource Technology*, **107**: 319-326 (2012).
- [۳۲] رثوفی، موسوی گرگری، سید لطیف. بهینه‌سازی استحصال روغن از گونه میکروجلبکی *Haematococcus pluvialis* با استفاده از روش سطح پاسخ و بررسی پروفایل اسید چرب آن به منظور تولید بیودیزل. نشریه علمی فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۷(۱): ۱۶۰ تا ۱۴۵ (۱۹۷۰).
- [33] Sathish A., Sims R.C., Biodiesel from Mixed Culture Algae via a Wet Lipid Extraction Procedure. *Bioresource Technology*, **118**: 643-647 (2012).
- [34] Huang X., Huang Z., Wen W., Yan J., Effects of Nitrogen Supplementation of the Culture Medium on the Growth, Total Lipid Content and Fatty Acid Profiles of Three Microalgae (*Tetraselmis Subcordiformis*, *Nannochloropsis Oculata* and *Pavlova Viridis*). *Journal of applied phycology*, **25(1)**: 129-137 (2013).
- [35] Widjaja A., Chien C.C., Ju Y.H., Study of Increasing Lipid Production from Fresh Water Microalgae *Chlorella Vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **40(1)**: 13-20 (2009).
- [36] Borowitzka M.A., Moheimani N. R. (Eds.). "Algae for Biofuels and Energy", Springer, Dordrecht, the Netherlands. **5**: 133-152 (2013).
- [37] Ghasemi Naghdi F., González González L.M., Chan W., Schenk P.M. Progress on Lipid Extraction from Wet Algal Biomass for Biodiesel Production. *Microbial Biotechnology*, **9(6)**: 718-726 (2016).
- [38] Cao H., Zhang Z., Wu X., Miao X. Direct Biodiesel Production from Wet Microalgae Biomass of *Chlorella Pyrenoidosa* through in Situ Transesterification. *BioMed Research International*, (2013).
- [۳۹] یزدانی، خسروی رینه، احمدی، اکرم. بررسی ترکیب اسید چرب و پتانسیل تولید بیودیزل برخی ریزجلبک‌ها در زیستگاه‌های مختلف. زیست‌شناسی کاربردی، ۳۱(۳): ۱۶۰ تا ۱۵۲ (۲۰۱۸).
- [40] Amaro H.M., Guedes A.C., Malcata F.X. Advances and Perspectives in using Microalgae to Produce Biodiesel. *Applied Energy*, **88(10)**: 3402-3410 (2011).
- [41] Knothe G. "Designer" Biodiesel: Optimizing Fatty Ester Composition to Improve Fuel Properties. *Energy & Fuels*, **22(2)**: 1358-1364 (2008).

- [42] Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avdalovic N., Pohl C. **Accelerated Solvent Extraction: a Technique for Sample Preparation.** *Analytical Chemistry*, **68(6)**: 1033-1039 (1996).
- [43] Canakci M., Sanli H. **Biodiesel Production from Various Feedstocks and Their Effects on the Fuel Properties.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **35(5)**: 431-441 (2008).
- [44] Kenyon C.N., Rippka R., Stanier R.Y. **Fatty Acid Composition and Physiological Properties of Some Filamentous Blue-Green Algae.** *Archiv für Mikrobiologie*, **83(3)**: 216-236 (1972).
- [45] Li Y., Naghdi F.G., Garg S., Adarme-Vega T.C., Thurecht K.J., Ghafor W.A., ... Schenk P.M. **A Comparative Study: the Impact of Different Lipid Extraction Methods on Current Microalgal Lipid Research.** *Microbial Cell Factories*, **13(1)**: 14 (2014).
- [46] Xiong W., Li X., Xiang J., Wu Q. **High-Density Fermentation of Microalga Chlorella Protothecoides in Bioreactor for Microbio-Diesel Production.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, **78(1)**: 29-36 (2008).
- [47] Nascimento I.A., Marques S.S.I., Cabanelas I.T.D., Pereira S.A., Druzian J.I., de Souza C.O., ... Nascimento M.A. **Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective criteria.** *Bioenergy Research*, **6(1)**: 1-13 (2013).
- [48] Talebi A.F., Mohtashami S.K., Tabatabaei M., Tohidfar M., Bagheri A., Zeinalabedini M., Bakhtiari S. **Fatty Acids Profiling: A Selective Criterion for Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production.** *Algal Research*, **2(3)**: 258-267 (2013).
- [49] Zhukova N.V., Aizdaicher N.A. **Fatty Acid Composition of 15 Species of Marine Microalgae.** *Phytochemistry*, **39(2)**: 351-356 (1995).
- [50] Ramos M. J., Fernández C.M., Casas, A., Rodríguez, L., Pérez, Á. **Influence of Fatty Acid Composition of Raw Materials on Biodiesel Properties.** *Bioresource Technology*, **100(1)**: 261-268 (2009).
- [51] Roy S.K., Karim S.M.M., Rahman Z., Aziz S., Hassan S.M.M. **The Fatty Acid Composition and Properties of Oil Extracted from Cotton (Gossypium Herbaceum) Seed of Bangladesh.** *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, **47(3)**: 303-308 (2012).
- [52] Chowdhury K., Banu L.A. Khan S., Latif A. **Studies on the Fatty Acid Composition of Edible Oil.** *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, **42(3)**: 311-316 (2007).
- [53] Al-Bachir, M., Sahloul, H. **Fatty Acid Profile of Olive Oil Extracted from Irradiated and Non-Irradiated Olive Fruits.** *International Journal of Food Properties*, **20(11)**: 2550-2558 (2017)
- [54] Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orrù, S., Buono, P. **Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health.** *Molecules*, **20(9)**: 17339-17361 (2015).
- [55] Varsha Thakur, Seema Paroha, Ravi Prakash Mishra. **Free Fatty Acid Profile of Seven Sesame (Sesamum Indicum L.), Verities.** *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **7(7)**: 3439-3453 (2018). doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.399>

- [56] Ramadhas A.S., Muraleedharan C., Jayaraj S. Performance and Emission Evaluation of a Diesel Engine Fueled with Methyl Esters of Rubber Seed Oil. *Renewable Energy*, **30(12)**: 1789-1800 (2005).
- [57] Candeia R.A., Silva M.C.D., Carvalho Filho J.R., Brasilino M.G.A., Bicudo T.C., Santos I.M.G., Souza A.G. Influence of Soybean Biodiesel Content on Basic Properties of Biodiesel–Diesel Blends. *Fuel*, **88(4)**: 738-743 (2009).
- [58] Labeckas G., Slavinskas S., The Effect of Rapeseed Oil Methyl Ester on Direct Injection Diesel Engine Performance and Exhaust Emissions. *Energy Conversion and Management*, **47(13-14)**: 1954-1967 (2006).
- [59] Thirumurugaveerakumar, Raghul, Sam Vimal Kumar Ajay R, Production and Property Analysis of Biodiesel from Cotton Seed Oil Using Natural Catalyst, *International Journal of Applied Engineering Research*, **13**: 5672-5679 (2018).
- [60] Sarin R., Sharma M., Sinharay S., Malhotra R.K. Jatropha–Palm Biodiesel Blends: An Optimum Mix for Asia. *Fuel*, **86(10-11)**: 1365-1371 (2007).
- [61] Benjumea P., Agudelo J., Agudelo A. Basic Properties of Palm Oil Biodiesel–Diesel Blends. *Fuel*, **87(10-11)**: 2069-2075 (2008).
- [62] Barnwal B.K., Sharma M.P. Prospects of Biodiesel Production from Vegetable Oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **9(4)**: 363-378 (2005).
- [63] Lafont J. J., Espitia A.A., Sodr  J.R. Potential Vegetable Sources for Biodiesel Production: Cashew, Coconut and Cotton. *Materials for Renewable and Sustainable Energy*, **4(1)**: 1 (2015).
- [64] Abderrabba M. Biodiesel Production from Unrefined and Refined Olive Pomace Oil: Comparative Study. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **6(12)**: 906-915 (2014).
- [65] Saydut A., Duz M.Z., Kaya C., Kafadar A.B., Hamamci C. Transesterified Sesame (*Sesamum Indicum* L.) Seed Oil as a Biodiesel Fuel. *Bioresource Technology*, **99(14)**: 6656-6660 (2008).
- [66] Al-Iwayzy S.H., Yusaf T. Diesel Engine Performance and Exhaust Gas Emissions using Microalgae *Chlorella Protothecoides* Biodiesel. *Renewable Energy*, **101**: 690-701 (2017).
- [67] Islam M.A., Rahman M.M., Heimann K., Nabi M.N., Ristovski Z.D., Dowell A., ... Brown R.J. Combustion Analysis of Microalgae Methyl Ester in a Common Rail Direct Injection Diesel Engine. *Fuel*, **143**: 351-360 (2015).
- [68] Nautiyal P., Subramanian K.A., Dastidar M.G. Production and Characterization of Biodiesel from Algae. *Fuel Processing Technology*, **120**: 79-88 (2014).
- [69] Haik Y., Selim M.Y., Abdulrehman T. Combustion of Algae Oil Methyl Ester in an Indirect Injection Diesel Engine. *Energy*, **36(3)**: 1827-1835 (2011).
- [70] Kumar V., Muthuraj M., Palabhanvi B., Ghoshal A.K., Das D. Evaluation and Optimization of Two Stage Sequential in Situ Transesterification Process for Fatty Acid Methyl Ester Quantification from Microalgae. *Renewable Energy*, **68**: 560-569 (2014).