



## پیش‌فرآوری و استخراج روغن از ریزجلبک *Chlorella vulgaris* توسط فراصوت

پیوند امیری<sup>۱</sup>، داریوش عربیان<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: مهر ۹۶

تاریخ پذیرش: اسفند ۹۶

### چکیده

مرحله استخراج روغن از ریزجلبک اصلی‌ترین و اساسی‌ترین مرحله تولید بیودیزل محسوب می‌شود. در این پژوهش تاثیر زمان بر روش فراصوت، در مراحل پیش‌فرآوری و استخراج، بهینه‌سازی شد. پیش‌فرآوری ریزجلبک *Chlorella vulgaris* با سه روش پیش‌فرآوری با آب گرم، تابش امواج فراصوت در حلال آب و به صورت ترکیبی صورت گرفت. استخراج روغن نیز با دو روش استخراج با حلال به کمک امواج فراصوت و بالای و دایر در زمان‌های معین و نسبت‌های حلال مشخص صورت پذیرفت و پروفایل اسیدهای چرب آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد پیش‌فرآوری ریزجلبک *C. vulgaris* بر بازده استخراج تاثیرگذار بود و باعث افزایش بازده استخراج شد. همچنین، استفاده از امواج فراصوت باعث تسریع فرآیند انتقال جرم و انرژی، کاهش دمای عملیاتی و کاهش اندازه تجهیزات شد. استفاده از آب گرم همراه با ۱۵ دقیقه تابش امواج فراصوت در پیش‌فرآوری و استخراج توسط فراصوت در ۵۰ دقیقه، بازده استخراج را تا ۲۲/۹۶ درصد افزایش داد که ۱۸/۶۳ درصد بیش از حالت بدون پیش‌فرآوری و روش بالای و دایر بود. بررسی ترکیب و میزان اسیدهای چرب ریزجلبک *C. vulgaris* نشان داد زمان تابش فراصوت تاثیر مثبت قابل ملاحظه‌ای بر میزان استخراج اسیدهای چرب غیراشباع داشت.

**واژگان کلیدی:** استخراج روغن، استخراج فراصوت، بالای و دایر، پیش‌فرآوری، *Chlorella vulgaris*.

۱- کارشناس ارشد مهندسی شیمی، پژوهشکده علوم پایه، مجتمع دانشگاهی علوم کاربردی، دانشگاه صنعتی مالک‌اشتر، اصفهان، ایران.

۲- استادیار پژوهشکده علوم پایه، مجتمع دانشگاهی علوم کاربردی، دانشگاه صنعتی مالک‌اشتر، اصفهان، ایران.

\* نویسنده مسئول: [darabian@mut.ac.ir](mailto:darabian@mut.ac.ir)

## مقدمه

در همین زمینه روش استخراج لیپید را می‌توان بر اساس نحوه آماده‌سازی زیست توده ریزجلبک، به دو دسته استخراج مرطوب و خشک و بر اساس نحوه استخراج به دو دسته مکانیکی و شیمیایی یا ترکیبی از این دو تقسیم کرد. در روش مرطوب، تخریب سلول‌های جلبک پس از تغلیظ مقدماتی و در شرایطی که زیست توده هنوز حاوی مقدار زیادی آب باقی‌مانده است، صورت می‌گیرد. در حالی که در روش‌های خشک، تخریب مکانیکی یا شیمیایی سلول‌ها پس از آب‌زدایی ریزجلبک‌ها و رساندن رطوبت نسبی آن‌ها به حدود ۱۰ درصد، صورت می‌گیرد (Ayahyan and Demibas, 2010; Kanno, 2013). روش‌های استخراج مکانیکی می‌تواند به استخراج به کمک ماکروویو، فراصوت و فشرده‌سازی نام برد (Browne et al., 2009). از روش‌های شیمیایی نیز می‌تواند به استخراج با حلال و استخراج آنزیمی اشاره کرد (Gong and Jang, 2011).

اثر روش‌های مختلف بر نژادهای مختلف ریزجلبک‌ها، با توجه به اندازه، شکل و ساختار دیواره سلولی متفاوت آن‌ها، یکسان نیستند. خواص دیواره سلولی ریزجلبک به دلیل مقاوت

با توجه به نیاز روز افزون بشر به انرژی و کاهش سریع منابع فسیلی، پژوهش‌ها در زمینه سوخت‌های تجدیدپذیر و پایدار به طور فزاینده‌ای اهمیت یافته است (Ayahyan and Demibas, 2010). از آنجا که میزان تقاضا در بخش انرژی، به علت الگوهای ناپایدار جاری در بخش تولید و مصرف انرژی، رو به افزایش است، در نتیجه، هرچند افزایش آگاهی در رابطه الگو مصرف پایدار می‌تواند در کاهش مصرف منابع موثر باشد، اما باز هم نیاز به منابع جدید احساس می‌شود. با توجه به طولانی بودن زمان فرآیند تولید سوخت‌های فسیلی که در واقع همان هیدروکربن‌های درون یک زیست‌توده هستند که در طی فرآیند فسیلی شدن به سوخت‌های فسیلی تبدیل می‌شوند، تولید سوخت از زیست توده، خود می‌تواند به عنوان جایگزینی برای سوخت‌های فسیلی مطرح شود (Mandil, 2003). یکی از سوخت‌های جایگزین، سوخت زیستی است. پژوهش‌های متعددی در گذشته بر روی بیودیزل صورت گرفته است (Ayahyan and Demibas, 2010; Kanno, 2013). این سوخت از طریق استخراج لیپید از زیست توده و واکنش با یک الکل تولید می‌شود.

بالای آن، نقش مهمی را در انتخاب روش مناسب برای استخراج لیپید ایفا می‌کند. همچنین استخراج لیپید از ریزجلبک تا حد زیادی تحت تاثیر اندازه کوچک سلول‌های ریزجلبک و مقدار آب موجود در آن‌ها است (Halim et al., 2012). بعد از عملیات استخراج نیز باید به منظور حذف بقایای سلول از مخلوط به دست آمده که شامل حلال، آب باقی‌مانده و لیپیدها است، از یک مرحله جداسازی جامد-مایع مانند فیلتراسیون استفاده شود (Halim, et al., 2012). برای جداسازی حلال آلی و آب باقی‌مانده نیز از یکی از روش‌های جداسازی مایع-مایع مانند تقطیر یا تبخیر در خلا استفاده می‌شود. از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر کل فرآیند تولید بیودیزل از ریزجلبک، استخراج محصول از زیست‌توده است (Suganya and Renganathan, 2012). در مجموع روش‌های استخراج لیپید از ریزجلبک‌ها در دو مکانسیم کلی طبقه‌بندی می‌شوند: (۱) نفوذ از درون سلول و از دیواره سلولی به کمک یک یا مخلوطی از چند حلال با قدرت نفوذ، گزینش‌پذیری و حلالیت بالا. (۲) تخریب دیواره سلولی و خروج محتوای آن به درون حلال. به دلیل ضریب نفوذ پایین حلال‌ها، روش اول بازدهی کمتری داشته است، در نتیجه استفاده از روش‌هایی که بر مبنای مکانیسم دوم عمل می‌کنند بهینه است (Wen and Johnson, 2009).

یکی از این روش‌های استخراج روش بلای و دایر (Bligh and Dyer Method) است. در سال ۱۹۵۷ ابتدا دانشمندی به نام Folch و همکارانش از مخلوط کلروفرم-متانول به منظور استخراج تمامی لیپیدهای موجود در یک نمونه زیست توده ماهی استفاده کرد. Folch و همکاران (۱۹۵۷) در آزمایش‌های خود از نسبت ۲ به ۱ کلروفرم به متانول استفاده کردند (Folch et al., 1957). Bligh و Dyer در سال ۱۹۵۹ آزمایش‌های مشابه را با نسبت عکس حلال انجام دادند و با توجه به یافته‌های آن‌ها، تا کنون روش آن‌ها به عنوان اصلی‌ترین روش استخراج لیپید از زیست توده مورد استفاده قرار گرفته است (Smedes and Asklund, 1999). بر اساس نتایج به دست آمده، اگر میزان لیپید موجود در نمونه کمتر از ۲ درصد باشد، روش بلای و دایر عملکرد بسیار مناسبی دارد و مقدار کل لیپید استخراج شده و همچنین ترکیب اسیدهای چرب به دست آمده توسط این روش با روش فولچ (Folch Method) کاملاً یکسان است (Iverson et al., 2001). تا کنون روش‌ها و حلال‌های

Lu, 2006). در مجموع استفاده از فراصوت در استخراج از ریزجلبکها موجب افزایش انتقال جرم، نفوذ بهتر حلال، دمای پایین عملیات استخراج، وابستگی کمتر به حلال، کاهش زمان فرآیند و راندمان مطلوب می‌شود (Jayasooriya et al., 2004; Mason and Riera, 2005; Dolatowski et al., 2007). در این پژوهش بررسی تاثیر پیش‌فرآوری ریزجلبک *Chlorella vulgaris* توسط آب گرم و امواج فراصوت با حلال آب مقطر، بر راندمان استخراج روغن و تاثیر زمان‌های مختلف تابش فراصوت در هر دو مرحله پیش‌فرآوری و استخراج صورت گرفت و مقایسه روش استخراج به کمک فراصوت با روش بلای و دایر و همچنین مقایسه میزان اسیدهای چرب استخراجی پس از بهینه‌سازی کلی نیز مد نظر قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

**محیط پیش‌کشت و کشت ریزجلبک *Chlorella vulgaris***  
محیط پیش‌کشت ریزجلبک *Chlorella vulgaris* (محیط کشت زاروک) از دو گروه عناصر اصلی و عناصر کمیاب تهیه شده است که انواع و مقادیر آنها به ازای گرم در لیتر

متنوعی برای بالا بردن بازده و کاهش زمان استخراج روغن از دانه‌های روغنی متفاوت و آنالیز آنها صورت گرفته است (Canella et al., 1979; Liangfu and Zelong, 2008; Wang et al., 2008). با توجه به پژوهش‌های انجام شده روش فراصوت عملاً ساده‌تر و سریع‌تر است (Garcia and Castro, 2003) و میزان کمتری حلال مصرف می‌شود (Jacques et al., 2006). با توجه به آزمایش‌ها و مطالعات صورت گرفته، عمل استخراج را می‌توان با شرایط مناسبی در حرارت‌های پایین نیز انجام داد تا مصرف انرژی کاهش یابد (Nandes et al., 2008). استخراج به کمک این امواج یکی از مهم‌ترین روش‌های حل کردن ترکیبات ارزشمند گیاهی است (Vilkhu and Mawson, 2008) که در مقیاس‌های صنعتی قابل اجرا است (Vinatoru, 2001).

مکانیسم اصلی استخراج توسط امواج فراصوت به پدیده کاویتاسیون مربوط می‌شود که طی آن حباب‌های بسیار ریزی در توده مایع تشکیل می‌شود و به سرعت تا یک اندازه بحرانی رشد می‌کنند و سپس منفجر می‌شود. انفجار این حباب‌ها اغلب با آزاد شدن مقدار زیادی انرژی همراه است که به شکل تنش برشی به محیط اطراف اعمال می‌شود (Ji and

(آب شیرین) به ترتیب در جدول ۱ ارائه شده است. پیش‌فراوری با آب گرم و امواج فراصوت، آماده‌سازی شد.

**پیش‌فراوری ریزجلبک** به منظور بررسی تاثیر پیش‌فراوری ریزجلبک *C. vulgaris* بر روی بازده استخراج روغن، نمونه‌ها با روش‌های پیش‌فراوری با آب گرم، پیش‌فراوری با امواج فراصوت و مقدار ۲ گرم از نمونه خشک ریزجلبک *C. vulgaris* که به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در آون (Dena، ایران) خشک شده بود تا رطوبت آن به حدود ۳ درصد

جدول ۱: محیط کشت زاروک و ترکیب مواد موجود در آن

مقدار (g/L)	فرمول شیمیایی	ماده
<b>عناصر اصلی</b>		
۱	NaCl	سدیم کلراید
۰/۰۴	CaCl <sub>2</sub>	کلسیم کلراید
۱۶/۸	NaHCO <sub>3</sub>	سدیم بی‌کربنات
۱	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	پتاسیم سولفات
۰/۵	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	پتاسیم هیدروژن فسفات
۲/۵	NaNO <sub>3</sub>	سدیم نیترات
۰/۲	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	منیزیم سولفات ۷ آبه
۰/۰۱	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	آهن سولفات ۷ آبه
۰/۰۸	EDTA	سدیم ا.د.ت.آ
<b>عناصر کمیاب</b>		
۰/۲۲۲	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	روی سولفات ۷ آبه
۰/۰۷۹	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	مس سولفات ۵ آبه
۰/۰۱۷۷	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	سدیم مولیبدات ۲ آبه
۱/۸۱	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	منگنز کلرید ۴ آبه
۲/۸۶	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	بوریک اسید

### استخراج روغن

به منظور بررسی تاثیر روش استخراج بر کمیت و کیفیت روغن استخراجی، روغن با روش‌های بلای و دایر و امواج فراصوت استخراج شد و با استفاده از ترازوی دیجیتالی (Sartorius، آلمان) با دقت (۰/۰۰۱) توزین شد.

### استخراج روغن با روش بلای و دایر

یک گرم از نمونه خشک توسط ترازوی دیجیتالی به طور دقیق وزن و درون فالدون ریخته شد. به ازای یک گرم از نمونه ۳/۷۵ میلی‌لیتر از مخلوط حلال‌های کلروفرم و متانول با نسبت حجمی ۲:۱ به نمونه اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه با ورتکس (Heidolph، آلمان) هم زده شد. مقدار ۱/۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم به نمونه اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با ورتکس هم زده شد. مقدار ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با ورتکس هم زده شد. نمونه‌ها برای مدت حدوداً یک ساعت بر روی شیکر (Heidolph، آلمان) با سرعت ۱۵۰rpm قرار گرفتند (برای ایجاد انتقال جرم مطلوب). سپس نمونه با سرعت ۱۰۰۰rpm و به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ

برسد (Canella et al., 1979)، در آب غوطه‌ور شد و به مدت ۲۴ ساعت در بن ماری با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

### پیش‌آوری با امواج فراصوت

مقدار ۲ گرم از نمونه خشک در حلال آب با نسبت وزنی حلال به جامد ۵ به ۱ تحت تاثیر امواج فراصوت (۳۰۰ وات، ۲۸ کیلوهرتز) در زمان‌های مختلف (۰/۱، ۲/۵۸، ۸/۷۹، ۱۵ و ۱۷/۵۷ دقیقه) قرار گرفت (Chemat et al., 2011). سپس در آون با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شد (Canella et al., 1979).

### پیش‌آوری با آب گرم و امواج فراصوت

نمونه در آب غوطه‌ور شد و به مدت ۲۴ ساعت در بن ماری (Zenith Lab, HH-S8، چین) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس نمونه خشک ریزجلبک در حلال آب با نسبت حلال به جامد ۵ به ۱ تحت تاثیر امواج فراصوت در زمان‌های مختلف قرار گرفت. پس از آن در آون با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شد (Canella et al., 1979).

ریزجلبک و تجزیه آن‌ها بر اساس روش‌های استاندارد ایزو ۵۵۰۹ (ISO 5509, 1978) انجام پذیرفت. شناسایی اسیدهای چرب با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی با ستون سی-پی سیل ۸۸ (۱۰۰ متر  $\times$  ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت فیلم ۰/۲ میکرومتر) و گاز حامل نیتروژن با دبی جریان ۱۴ میلی‌لیتر در دقیقه صورت گرفت. شرایط عملیاتی فرآیند نیز عبارت است از دمای آون ۱۹۸ درجه سانتی‌گراد، دمای دتکتور (یونیزاسیون شعله‌ای) ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد و دمای انجکتور ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد. برای شناسایی پیک نمونه مورد آزمون از داده‌های زمان بارداری به دست آمده از مخلوط مرجع استفاده شد.

#### بررسی خواص فیزیکوشیمیایی

##### عدد یدی

اندازه‌گیری عدد یدی با استفاده از روش استاندارد آزمون به روش هانوس صورت گرفت (Alimentarius, 1981). برای انجام آزمایش، نمونه روغن حل شده در حلال با ۲۵ میلی‌لیتر از محلول هانوس، در یک ظرف در بسته در تاریکی قرار داده شد. سپس به آن ۱۰ میلی‌لیتر پتاسیم یدید و آب افزوده شد. یادآور شده از هالوژن اضافی با محلول سدیم

(Eppendorf, آلمان) شد. در نهایت قبل از انتقال به ظرف نهایی مخلوط حلال و جلبک برای اطمینان از عدم وجود ذرات ریزجلبک، از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد.

#### استخراج روغن به کمک امواج فراصوت

نمونه‌های پیش‌فراوری شده با اضافه کردن حلال ترکیبی متانول-کلروفرم (۱:۳) با نسبت حجمی جامد به حلال ۱ به ۲۰ تحت تاثیر امواج فراصوت در توان ۳۰۰ وات، فرکانس ۲۸ کیلوهرتز و بازه دمایی ۲۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد و در سه زمان متفاوت (۱۰، ۳۰ و ۵۰ دقیقه) قرار گرفتند. سپس نمونه‌های پیش‌فراوری شده از حلال و روغن توسط دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۷ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه جدا و با عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون به ارلن منتقل شدند. سپس ترکیب حلال و روغن با استفاده از روتاری درایر (۱۵ کیلوگرمی؛ شرکت دورسا، ایران) تحت خلاء جداسازی شد و ۲ ساعت در آون قرار گرفت. پس از سرد شدن، میزان روغن استخراجی با دقت بالا تعیین شد.

#### بررسی ترکیب اسیدهای چرب

آماده‌سازی متیل‌استرهای اسیدهای چرب

**تجزیه و تحلیل داده‌ها**

در مطالعه حاضر از روش RSM (Response Surface Methodology) برای بهینه‌سازی فرآیندهای تحلیل آماری استفاده شد تا اثر متغیرهای مختلف بر پاسخ به دست آمده تعیین شود. به این ترتیب تعداد آزمایش‌ها کاهش یافت و کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها، قابل برآورد شد. در این مطالعه از سه مدل طراحی استفاده شد:

**طرح اول:** بررسی اثر متغیر مستقل A، استفاده از فراصوت و آب گرم در پیش‌فرآوری همراه با استخراج بالای و دایر توسط آزمون تک‌فاکتوریل انجام شد و از مدل Linear برای بررسی استفاده شد.

**طرح دوم:** بررسی اثر متغیر مستقل B، استفاده از آب گرم در پیش‌فرآوری همراه با استخراج توسط فراصوت با استفاده از آزمون تک‌فاکتوریل انجام شد و از مدل Cubic برای بررسی استفاده شد.

**طرح سوم:** بررسی اثر متغیرهای مستقل شامل D زمان پیش‌فرآوری فراصوت و E زمان استخراج توسط فراصوت با آزمون Central Composite انجام شد و از مدل Quadratic برای بررسی استفاده شد.

تیوسولفات استاندارد عیارسنجی شد. همزمان آزمایش شاهد نیز انجام شد. مقدار عدد یدی (I%) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱:

$$I = [12.69 \times N \times (V_1 - V_2)] / m$$

N: نرمالیت سدیم تیوسولفات؛  $V_1$ : حجم محلول سدیم تیوسولفات مصرفی برای شاهد (میلی‌لیتر)؛  $V_2$ : حجم محلول سدیم تیوسولفات مصرفی برای نمونه (میلی‌لیتر)؛ m: وزن نمونه (گرم).

**عدد صابونی**

اندازه‌گیری عدد صابونی با استفاده از روش استاندارد آزمون ایزو ۳۶۵۷ (ISO 3657, 2002) به این صورت انجام گرفت که نمونه با یک لیتر از هیدروکسید پتاسیم الکلی تحت یک جریان برگشتی حرارت داده و صابونی شد و هیدروکسید پتاسیم اضافی با محلول اسید کلریدریک استاندارد عیارسنجی شد. در نهایت عدد صابونی (S%) با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد.

رابطه ۲:

$$S = [56.1 \times C \times (V_1 - V_2)] / m$$

C: غلظت دقیق اسید کلریدریک (%/);  $V_1$ : حجم اسید کلریدریک مصرفی برای شاهد (میلی‌لیتر)؛  $V_2$ : حجم اسید کلریدریک مصرفی برای نمونه (میلی‌لیتر)؛ m: وزن نمونه (گرم).



یک بلوک و هفت تکرار در نقطه مرکزی (برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند)، طرح تک متغیر خطی زمان تابش فراصوت در استخراج بدون پیش‌فرآوری در ۵ سطح و دو بار تکرار، طرح تک متغیر خطی زمان تابش فراصوت در پیش‌فرآوری همراه با استخراج بالای و دایر در ۵ سطح و دو بار تکرار و طرح تک متغیر خطی زمان تابش فراصوت در استخراج با پیش‌فرآوری آب گرم در ۵ سطح و دو بار تکرار، برای محاسبه بازده استخراج لیبید استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### پیش‌فرآوری

عواملی که به شدت بر بازده استخراج روغن از ریزجلبک *Chlorella vulgaris* تاثیر گذاشتند، روش‌های پیش‌فرآوری نمونه‌ها بودند.

#### پیش‌فرآوری توسط آب گرم

نتایج به دست آمده از بررسی اثر پیش‌فرآوری بر روی استخراج روغن توسط بالای و دایر نشان داد که استفاده از پیش‌فرآوری با آب گرم، میزان بازده استخراج را افزایش داد (شکل ۱).

در مرحله بعد، طرح آماری گزینش شده و رابطه مدل مورد استفاده برای پیش‌بینی، برازش شد و مورد ارزیابی قرار گرفت. در RSM از مدل درجه دوم استفاده شد و برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف شد تا اثر اصلی و متقابل فاکتورها بر روی هر متغیر جداگانه مشخص شود. در این معادله  $Y$  پاسخ پیش‌بینی شده،  $\beta_0$ ،  $\beta_1$ ،  $\beta_2$ ،  $\beta_{11}$ ،  $\beta_{22}$ ،  $\beta_{12}$ ،  $\beta_{21}$ ،  $\beta_{12}$ ،  $\beta_{21}$ ،  $\beta_{11}$ ،  $\beta_{22}$ ،  $\beta_{12}$ ،  $\beta_{21}$  ضرایب ثابت،  $\Omega_0$ ،  $\Omega_1$  و  $\Omega_2$  اثرات متقابل هستند. از نرم‌افزار Design Expert 7.1.3 برای تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ استفاده شد.

مدل ۱:

$$Y = \Omega_0 + \Omega_1 B$$

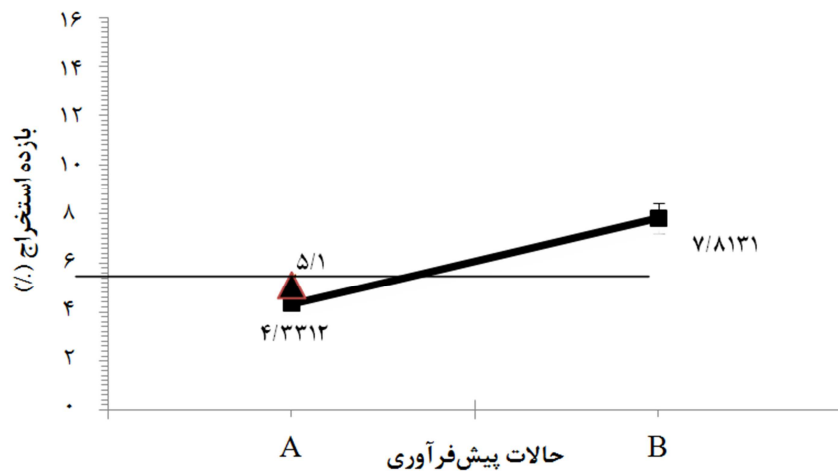
مدل ۲:

$$Y = \xi_0 + \xi_1 C + \xi_{11} C^2 + \xi_{22} C^2$$

مدل ۳:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 D + \beta_2 E + \beta_{12} DE + \beta_{11} D^2 + \beta_{22} E^2$$

در مطالعه حاضر از طرح‌های مرکب مرکزی با دو متغیر مستقل شامل زمان تابش فراصوت در پیش‌فرآوری (۰/۱، ۲/۵۸، ۸/۷۹، ۱۵ و ۱۷/۵۷ دقیقه) و زمان تابش فراصوت در استخراج (۱/۷۲، ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۵۸ دقیقه)،



شکل ۱: بازده استخراج روغن از ریزجلبک *Chlorella vulgaris*. A: بدون پیش‌فرآوری. B: پیش‌فرآوری با آب گرم. نماد مثلث (▲) مشخص کننده میزان بازده در مطالعات گذشته است (Gouveia and Oliveira, 2009).

همان طور که در شکل مشخص است، بازده استخراج لیپیدها با پیش‌فرآوری آب گرم به طور چشمگیری افزایش یافت. استفاده از آب گرم موجب مرطوب شدن بافت دیواره سلولی ریزجلبک *C. vulgaris* می‌شود و از ورود حلال غیرقطبی و آب‌گریز به داخل و یا خروج روغن به خارج جلوگیری می‌کند. این نتیجه توسط پژوهشگران دیگر نیز مورد تایید قرار گرفته است (Mcmillan et al., 2013; Avinesh et al., 2015). ذکر این نکته لازم است که استفاده از روش غوطه‌وری در آب گرم باعث افزایش حدوداً ۳/۵ درصدی در مقایسه با حالت بدون پیش‌فرآوری می‌شود. این امر نشان می‌دهد که غوطه‌وری در آب گرم از پیش‌فرآوری‌های بسیار موثر محسوب می‌شود. در مقایسه با مطالعات گذشته (Gouveia and Oliveira, 2009)، با استفاده از آب گرم میزان استخراج ۲/۷ درصد افزایش یافت. در حقیقت استفاده از آب گرم بازده بیشتری را نسبت به پیش‌فرآوری با ۲۰ دقیقه فراصوت و توسط حلال پروپانول به دنبال داشت که مشابه نتایج به دست آمده توسط Mcmillan و همکاران (۲۰۱۳) است. استفاده از آب گرم روشی بسیار ساده است که بدون نیاز به هیچ

گونه تجهیزات پیشرفته‌ای، نمونه‌ها را تا حد بسیار زیادی آماده‌سازی می‌کند. مکانیسم استخراج توسط حلال پس از پیش‌فراوری به این صورت است که به علت برهم‌کنش‌های بین زنجیره‌های بلند و آب‌گریز اسیدهای چرب، لیپیدهای خنثی در ایجاد جاذبه‌های ضعیف واندروالس بین یکدیگر شرکت می‌کنند و گلبول‌هایی را در سیتوپلاسم تشکیل می‌دهند (Lee et al., 2011). هیچ کدام از روش‌های مورد استفاده در استخراج، قادر به تخریب کامل دیواره‌های سلولی نیستند. بنابراین مکانیسم غالب فرآیند استخراج لیپید، نفوذ از دیواره سلولی است (Rajan et al., 2010). هنگامی که یک سلول ریزجلبک در معرض حلال آلی غیرقطبی همانند هگزان یا کلروفرم قرار می‌گیرد، حلال آلی از طریق غشا سلولی به درون سیتوپلاسم نفوذ می‌کند و طی برهم‌کنش با لیپیدهای خنثی در اثر تشابه نیروهای واندروالس، یک کمپلکس حلال-لیپید را تشکیل می‌دهد. این کمپلکس حلال-لیپید به وسیله نیروی محرکه حاصل از گرادیان غلظت، از عرض غشا و فیلم ساکن حلال آلی اطراف سلول به درون توده حلال آلی نفوذ می‌کند و لیپیدهای خنثی استخراج شده از سلول، به صورت محلول در حلال آلی غیرقطبی باقی می‌مانند (Ramluckan et al., 2014). فیلم ساکن حلال آلی در اطراف سلول ریزجلبک به علت برهم‌کنش بین حلال آلی و دیواره سلول تشکیل می‌شود و تحت تاثیر جریان یا تلاطم حلال قرار نمی‌گیرد (Halim et al., 2012). برخی دیگر از لیپیدهای خنثی در سیتوپلاسم به صورت کمپلکس با لیپیدهای قطبی یافت می‌شوند. این کمپلکس‌ها از طریق پیوندهای قوی هیدروژنی یا الکترواستاتیک به پروتئین‌های غشای سلولی متصل می‌شوند. برهم‌کنش ایجاد شده در اثر نیروهای واندروالس بین حلال غیرقطبی آلی و لیپیدهای خنثی در این کمپلکس‌ها، برای شکستن پیوندهای پروتئین-لیپید موجود در غشا کافی نیست (Ryckebosch et al., 2012). بر خلاف حلال‌های غیرقطبی، حلال‌های قطبی آلی همانند متانول از طریق تشکیل پیوندهای هیدروژنی با لیپیدهای قطبی این کمپلکس‌ها، قادر به شکستن پیوندهای لیپید-پروتئین هستند. مکانیسم استخراج کمپلکس‌های لیپید متصل به غشا، مشابه فرآیند استخراج با حلال غیرقطبی است. با این تفاوت که علاوه بر ایجاد پیوند واندروالس بین حلال غیرقطبی و لیپیدهای خنثی، بین حلال قطبی و لیپیدهای قطبی نیز پیوندهای هیدروژنی که قدرت کافی

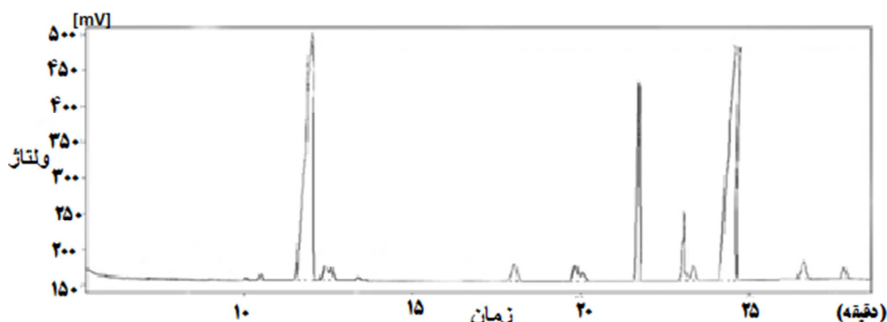
برای جایگزین شدن پیوندهای لیپید و پروتئین در غشای سلولی را دارند، ایجاد می‌کنند. در نتیجه افزودن یک حلال آلی قطبی به یک حلال آلی غیرقطبی، با کمک به استخراج کمپلکس‌های لیپیدهای غیرقطبی متصل به غشا، میزان لیپید نهایی استخراج شده را تا حد زیادی افزایش می‌دهد (Jeon et al., 2013). به همین دلیل در این آزمایش‌ها برای اطمینان از استخراج کامل تمام لیپیدهای خنثی، چه به شکل گلبول‌های آزاد و چه به شکل کمپلکس‌های متصل به غشا، هر دو نوع حلال غیرقطبی و قطبی به سلول‌های ریزجلبک افزوده شد. در مطالعات مشابه به عنوان نمونه، Thomason و Smedes (۱۹۹۶) اثر نسبت‌های مختلفی از کلروفورم و متانول را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که میزان لیپید به دست آمده، با افزایش میزان متانول می‌تواند افزایش یابد. نتایج مطالعه Ryckebosch و همکارانش (۲۰۱۱) نیز این یافته را تایید می‌کند. آن‌ها برای یافتن

کاراثرین حلال (یا مخلوط چند حلال) برای استخراج لیپید از ریزجلبک، اثر حلال‌های مختلف را در استخراج لیپید از *C. vulgaris* که به روش خشکاندن انجام‌دهی آماده شده بود، بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که مقدار لیپید استخراج شده توسط کلروفورم و متانول با نسبت ۲ به ۱، ۷۶/۵ درصد لیپید استخراج شده توسط کلروفورم و متانول با نسبت ۱ به ۱ بود (Ryckebosch et al., 2011). همچنین بررسی میزان اسیدهای چرب نشان داد که اختلافی در مورد بعضی از صفات وجود دارد (جدول ۲).

نمودار پیک اسید چرب طی استخراج به روش بلای و دایر پس از پیش‌فرآوری با آب گرم در شکل ۲ آورده شده است. همان طور که در جدول نیز مشخص است با پیش‌فرآوری آب گرم میزان استخراج اسیدهای چرب به ویژه لینولنیک و اولئیک اسید در مقایسه با بررسی‌های صورت گرفته توسط سایر پژوهشگران (Lee et al., 2011) افزایش یافت.

جدول ۲: میزان اسیدهای چرب و بازده استخراج روغن از ریزجلبک *Chlorella vulgaris* تحت تاثیر پیش‌فرآوری آب گرم و استخراج با روش بلای و دایر

میزان اسید چرب (%)									
بازده استخراج (%)									
لینولنیک	لینولنیک	اولئیک	پالمیتولنیک	آراکیدیک	استئاریک	پالمیتیک	میربستیک	لئوریک	
۲۹/۵۶	۱۱/۹۲	۳۰/۰۷	۲/۴۳	۲/۸۱	۲/۱۲	۲۰/۳۵	۰/۶۵	۰/۱۰	۷/۸۱



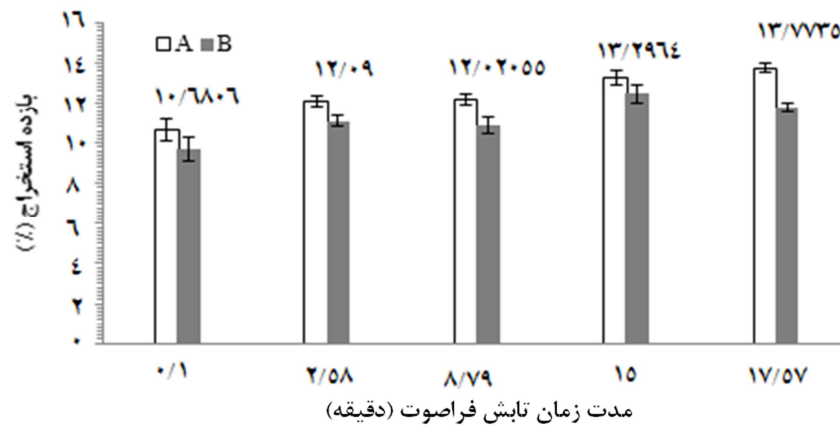
شکل ۲: پیک اسید چرب به دست آمده از بررسی لیپید استخراجی از ریزجلبک *Chlorella vulgaris* با روش پیش‌فراوری آب گرم و استخراج بلای و دایر

استفاده از روش پیش‌فراوری با آب گرم می‌تواند میانگین لینولنیک و اولئیک اسید را به ترتیب تا ۳۰/۶ و ۱۱/۹۲ درصد افزایش دهد، در صورتی که استفاده از آب گرم میزان پالمیتولنیک و میریستیک اسید را به طور متوسط ۰/۳ درصد کاهش داد. نتایج به دست آمده در بازه گزارش شده (افزایش ۳۰ و ۱۲ درصدی لینولنیک و اولئیک اسید) توسط سایر پژوهشگران (Lee et al., 2011) قرار دارد و استفاده از روش‌های پیشنهادی موجب افزایش میزان استخراج اسیدهای چرب می‌شود.

نتایج مشخص کرد استفاده همزمان از موارد مذکور باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در میزان بازده استخراج شد (شکل ۳). همان‌طور که در نمودار نیز مشخص است ترکیب روش‌های پیش‌فراوری با آب گرم باعث افزایش بازده استخراج شد. با استفاده از روش ترکیبی پیش‌فراوری با آب گرم و استخراج حدود ۶ درصد نسبت به حالت بدون پیش‌فراوری

#### پیش‌فراوری توسط آب گرم و فراصوت

در این مرحله تاثیر استفاده همزمان آب گرم و امواج فراصوت در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته شد. با توجه به مقدار



شکل ۳: بازده استخراج لیپید از ریز جلبک *Chlorella vulgaris* تحت تاثیر پیش فرآوری. A: پیش فرآوری با آب گرم همراه با امواج فراصوت. B: پیش فرآوری تنها با امواج فراصوت.

و عدم نفوذ کامل حلال به داخل بافت سلول کارایی مناسبی ندارد. نتایج به دست آمده با توجه به نمودارهای ارائه شده، بیانگر این موضوع است که استفاده از روش ترکیبی آب گرم و ۱۷/۵۷ دقیقه تابش فراصوت در استخراج توسط روش بلای و دایر حالت بهینه پیش فرآوری محسوب می شود. در این مطالعه از فرکانس ۲۸ کیلوهرتز استفاده شد که نتایج به دست آمده مشابه نتایج مطالعات دیگر مانند Cravotto و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Halim و همکاران در سال ۲۰۱۲ است که نتایج آنها نشان داد تاثیر در فرکانس های پایین (۱۸ تا ۴۰ کیلوهرتز) بسیار قوی و در فرکانس های بالا (۴۰۰ تا ۸۰۰ کیلوهرتز) ناچیز بود.

افزایش یافت. استفاده از امواج فراصوت در پیش فرآوری موجب ایجاد شکست سلولی و تضعیف دیواره می شود. آماده سازی نمونه ها با این روش باعث تمرکز بیشتر انرژی بر روی تک تک سلول ها می شود و در نتیجه ریز جلبک به راحتی روغن موجود در خود را با حلال آزاد می کند. این نتایج قابل قیاس با نتایج Avinesh و همکاران (۲۰۱۵) است که افزایش ۹ درصدی استخراج را با استفاده از پیش فرآوری ترکیبی به دست آوردند. بهره گیری از امواج فراصوت به تنهایی باعث استخراج میزان قابل توجهی از اسیدهای چرب شد. اما در مجموع استفاده از امواج فراصوت به دلیل کامل نشدن آماده سازی نمونه ها برای استخراج

## استخراج با حلال به کمک فراصوت

نمونه‌های پیش‌فراوری شده، با حلال و به کمک فراصوت مورد استخراج قرار گرفتند. این روش استخراج بر اساس پدیده کاویتاسیون انجام می‌شود که طی آن حباب‌های بسیار ریزی از حلال در توده مایع تشکیل شده، به صورت میکروجت به سمت سطح ذره هجوم برده، سطح ذره را متلاشی کرده، به داخل آن نفوذ می‌کنند و روغن موجود را جذب می‌کنند. پدیده کاویتاسیون بیش از توان به فرکانس فراصوت مرتبط می‌شود. این پدیده توسط Browne و همکاران (۲۰۰۹) نیز به تایید رسیده است. بر این اساس نمونه‌ها با روش‌های مختلف زیر پیش‌فراوری شدند و سپس توسط امواج فراصوت مورد استخراج قرار گرفتند.

طرفی بخشی از حلال به علت افزایش دما تبخیر می‌شود (Mubarak et al., 2016). با توجه به مقدار  $Adj\ R-Squared = 0/9825$  حاصل از نتایج آزمایش است، مقدار پیش بینی شده توسط مدل برای  $Pred\ R-Squared = 0/9746$  یک مقدار معقول و مناسب است که نشان دهنده صحیح و قابل اتکا بودن مدل طراحی شده بر اساس داده‌های آزمایش است.  $Adeq\ Precision$  نیز مقداری بیش از ۴ معادل  $33/34$  را به خود اختصاص داد که بسیار مطلوب است. با استفاده از پیش‌فراوری آب گرم نتایج به صورت مثبت تغییر یافت. معادله به دست آمده برای آزمایش‌ها برای پیش‌بینی اعداد خارج از بازه آزمایش شده به صورت رابطه ۳ بود.

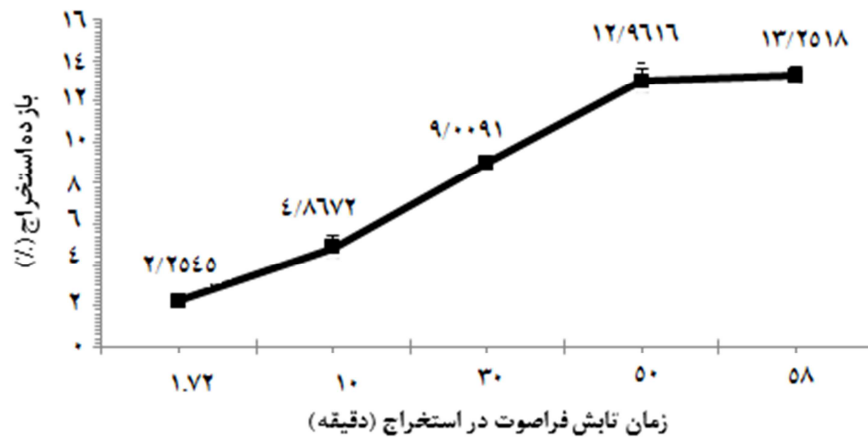
## پیش‌فراوری توسط آب گرم

همان طور که در شکل ۴ نیز مشخص است با افزایش زمان فراصوت در استخراج میزان استحلال لیپید نیز افزایش یافت. این میزان افزایش تا زمان ۵۰ دقیقه شیب تندتری را داشت، اما بعد از ۵۰ دقیقه این شیب بسیار کند شد. این پدیده به این دلیل است که پس از ۵۰ دقیقه تابش فراصوت اگرچه ممکن است مقدار بیشتری از سلول‌ها شکسته شود اما از

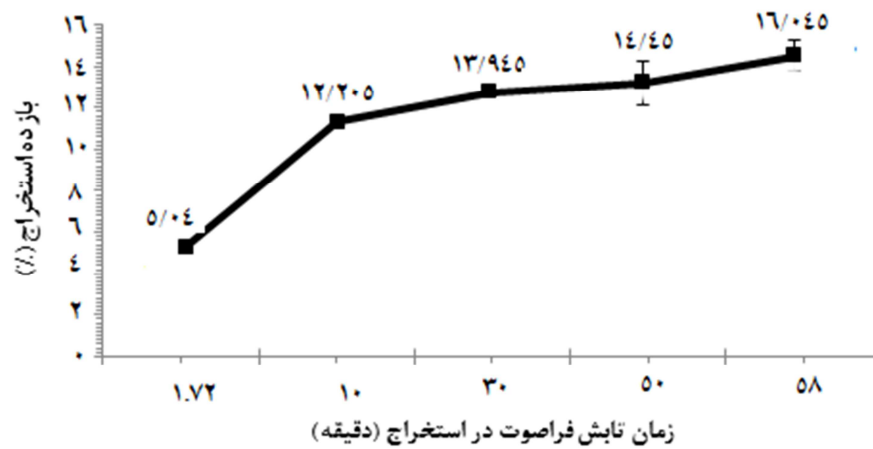
## رابطه ۳:

$$Efficiency = 2/50849 + 1/12116C - 0/25811C^3 + 3/46327E - 0/04C^3$$

همان طور که در شکل ۵ مشخص است با تاثیر گذاشتن آب گرم به عنوان یک روش پیش‌فراوری قبل از استخراج، بازده استخراج نسبت به حالت بدون پیش‌فراوری افزایش یافت.



شکل ۴: بازده استخراج لیپید از ریز جلبک *Chlorella vulgaris* بدون پیش‌فرآوری و تحت تاثیر استخراج با حلال به کمک فراصوت



شکل ۵: بازده استخراج لیپید از ریز جلبک *Chlorella vulgaris* با پیش‌فرآوری آب گرم و تحت تاثیر استخراج با حلال به کمک فراصوت



تابش فراصوت در استخراج بود. Feng و Weiss در سال ۲۰۱۱ نیز به این نتیجه رسیدند که انجام این پدیده سبب افزایش توربولنسی موضعی و اختلاط مایع در مقیاس میکرو می‌شود که این امر سبب افزایش انتقال جرم و از طرفی ایجاد شدت برش لازم برای تخریب دیواره سلولی می‌شود. در واقع حباب‌های تشکیل شده در اثر پدیده کاویتاسیون می‌تواند از طریق ایجاد یک گرادیان فشار به اندازه کافی بزرگ، باعث متلاشی شدن دیواره سلولی و رها شدن محتویات موجود در آن شود که Browne و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ در مطالعه مشابهی که تاثیر امواج فراصوت را در استخراج روغن از ریزجلبک‌ها بررسی می‌کردند به این نتیجه دست یافتند.

#### پیش‌فرآوری توسط آب گرم و فراصوت

نتایج تاثیر زمان‌های مختلف تابش فراصوت در استخراج و پیش‌فرآوری، همراه آب گرم، بر بازده استخراج مشخص کرد که استفاده از زمان‌های مختلف باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ درصد در میانگین عملکرد استخراج شد.

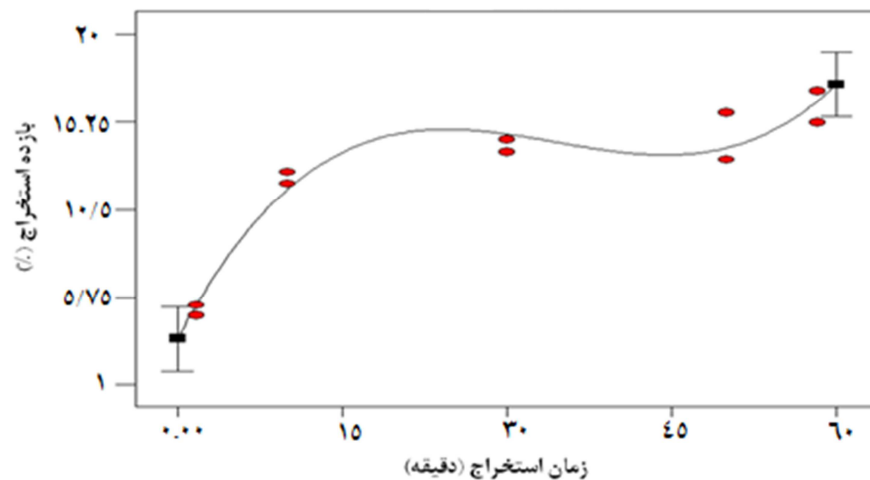
در این آزمایش نسبت حاصل شده معادل ۱۸/۰۱۸، نشان دهنده یک نسبت مناسب است

همان طور که مشخص است وجود پدیده کاویتاسیون در استخراج به همراه مرطوب‌سازی بافت سطح ذره می‌تواند موجب نرم شدن و تخریب بیشتر بافت سلول شود که منجر به استحلال مقدار بیشتری لیپید می‌شود. این نتایج قابل قیاس با نتایج پژوهشگران دیگر است (Mubarak et al., 2016; Naghdi et al., 2016). همان طور که در نمودار نیز مشخص است با افزایش زمان تا ۵۸ دقیقه میزان بازده نیز متعاقبا افزایش یافت. زیرا با افزایش زمان تابش، تعداد انفجار حباب‌ها در اطراف ذرات طبق پدیده کاویتاسیون، منجر به آزاد شدن میزان بیشتری انرژی می‌شود که بیشتر به شکل تنش برشی است. در این حالت یعنی با استفاده کردن از فراصوت فقط در مرحله پیش‌فرآوری این میزان تنش ایجاد شده تا ۵۸ دقیقه موجب تخریب ساختار لیپید نمی‌شود.

شکل ۶ میزان تاثیر زمان تابش فراصوت در استخراج به همراه پیش‌فرآوری توسط آب گرم را نشان می‌دهد. همان طور که در شکل نیز مشخص است میزان استخراج با افزایش زمان تابش فراصوت روندی افزایشی داشت، اما این روند به صورت خطی نبود. در مجموع بالاترین میانگین استخراج مربوط به زمان ۵۸/۲۸ دقیقه

و در نتیجه مقادیر پوشش داده نشده پیش‌فرآوری و استخراج قابلیت پیش‌بینی شدن را با مدل فوق با خطای ناچیز دارند. آزمایش طراحی شده تحت تاثیر زمان‌های مختلف استفاده از استخراج فراصوت با پیش‌فرآوری آب گرم همراه با تابش فراصوت در جدول ۳ آورده شده است.

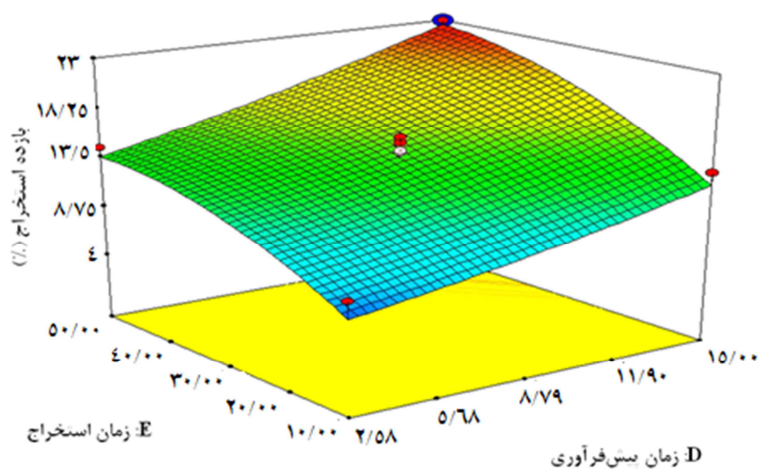
نمودار RSM مربوط به فرآیند در شکل ۷ نشان داده شده است. همان طور که در نمودار



شکل ۶: نمودار سطح تک بعدی اثر زمان تابش فراصوت در استخراج با پیش‌فرآوری آب گرم بر بازده استخراج لیپید از ریز جلبک *Chlorella vulgaris*

جدول ۳: پیش‌فرآوری ریزجلبک *Chlorella vulgaris* به روش تابش فراصوت و غوطه‌وری در آب گرم و استخراج با حلال به کمک فراصوت

ترتیب	زمان پیش‌فرآوری (دقیقه)	زمان استخراج (دقیقه)	بازده استخراج (%)
۱	۸/۷۹	۱/۷۲	۴/۳۶۹۷
۲	۲/۵۸	۱۰	۸/۲۰۱۵
۳	۱۵	۱۰	۱۳/۹۸۵۶
۴	۰/۰۱	۳۰	۹/۳۱۲۹
۵	۸/۷۹	۳۰	۱۴/۰۰۵۴
۶	۸/۷۹	۳۰	۱۵/۸۷۷۷
۷	۸/۷۹	۳۰	۱۴/۹۵۶۴
۸	۸/۷۹	۳۰	۱۶/۳۹۲۹
۹	۸/۷۹	۳۰	۱۵/۱۱۷۳
۱۰	۱۷/۵۷	۳۰	۲۰/۶۳۴۲
۱۱	۲/۵۸	۵۰	۱۴/۵۱۷۱
۱۲	۱۵	۵۰	۲۲/۹۶۴۷
۱۳	۸/۷۹	۵۸/۲۸	۱۷/۳۱۹۵



شکل ۷: نمودار RSM پیش‌فرآوری توسط آب گرم و فراصوت و استخراج با حلال به کمک فراصوت

چربی بودند که با این تکنیک میزان استخراج آن‌ها افزایش یافت. همان طور که درخشان (۱۳۹۲) گزارش کرد، با بهره‌گیری از حلال متانول-کلرفرم با نسبت ۳ به ۱ میزان استخراج لینولنیک اسید افزایش یافت. شکل ۸ پیک اسید چرب حاصل از بررسی را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده همزمان از فراصوت در هر دو مرحله استخراج و پیش‌فراوری نه تنها موجب تخریب اسیدهای چرب نمی‌شود بلکه باعث افزایش بازده استخراج لیپید از نمونه می‌شود. این امر می‌تواند به دلیل آماده‌سازی نمونه‌ها با فراصوت باشد که در مرحله استخراج باعث نفوذ هر چه بیشتر میکروجت‌ها و تخریب بافت و ترکیب حلال با روغن موجود در نمونه می‌شود (Mubarak et al., 2016). Prabakaran و Ravindran (۲۰۱۱) در مطالعه مشابهی اثر استفاده از امواج فراصوت، امواج میکروویو، اتوکلاو، آسیاب گلوله‌ای و شوک اسمزی با

با توجه به آزمایشات انجام شده و مدل سازی توسط نرم افزار رابطه ای به صورت زیر بدست آمد که ازین طریق میزان استخراج برای هر زمانی قابل محاسبه است.

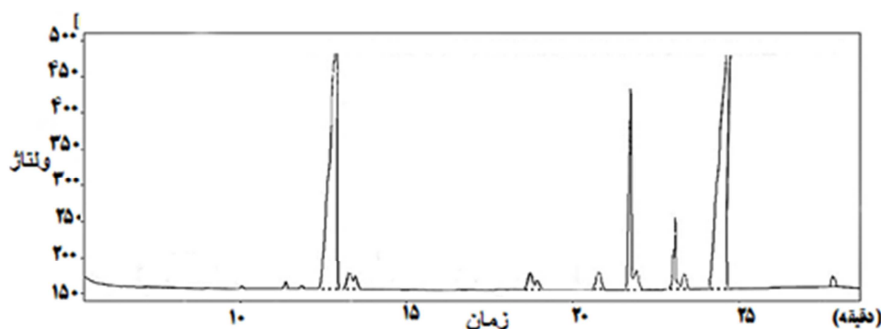
رابطه ۴:

$$\text{Efficiency} = 1/89116 + 0/2826D + 0/41959E + 5/36131E - 0/03DE + 9/18127E - 0/03D^2 - 4/27827E - 0/03E^2$$

برای بررسی ترکیب اسیدهای چرب لیپید استخراج شده در حالت بهینه آب گرم به همراه ۱۵ دقیقه پیش‌فراوری با تابش فراصوت با ۵۰ دقیقه استخراج با تابش فراصوت، از کروماتوگرافی گازی استفاده شد که نتایج آن در جدول ۴ آورده شده است. همان طور که در این جدول مشخص است میزان استخراج اسیدهای چرب نسبت به حالت بدون پیش‌فراوری و استخراج با روش بالای و دایر در برخی موارد رشد داشته است. لینولنیک، لینولئیک و اولئیک از مهم‌ترین اسیدهای

جدول ۴: میزان اسیدهای چرب استخراجی از ریز جلبک *Chlorella vulgaris* تحت تاثیر استفاده از آب گرم و امواج فراصوت در پیش‌فراوری و استخراج با حلال به کمک فراصوت

میزان اسید چرب (%)		بازده استخراج (%)								
		لینولنیک لینولئیک اولئیک پالمیتولئیک آراکیدیک استئاریک پالمیتیک میریستیک لئوریک								
۲۲/۹۶	۰/۱۲	۰/۹۳	۱۸/۲۱	۱/۹	۲/۶۲	۳/۱۲	۲۹/۳۷	۹/۲۶	۳۲/۶۵	



شکل ۸: پیک اسید چرب به دست آمده از بررسی لیپید استخراجی از ریزجلبک *Chlorella vulgaris* با روش پیش‌فرآوری با آب گرم و تابش فراصوت و استخراج با حلال به کمک فراصوت

*lactuca* مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که روش‌های پیش‌فرآوری با فراصوت و اتوکلاو بیشترین تاثیر را در استخراج لیپید از ریزجلبک داشتند.

به کارگیری روش نوین استفاده از امواج فراصوت در پیش‌فرآوری در پژوهش حاضر به طور میانگین موجب افزایش ۶/۳۶ درصدی بازده استخراج نسبت به پژوهش‌های قبلی که با همین روش انجام شدند (Gouveia and Oliveira, 2009)، شد. این امر با حذف حلال از پیش‌فرآوری و کاهش زمان فرآیند نیز همراه بود.

خواص فیزیکوشیمیایی روغن استخراج شده نتایج بررسی خواص فیزیکوشیمیایی روغن استخراجی مشخص کرد که استفاده از حالت

محلول ۱۰٪ سدیم کلرید را بر میزان لیپید استخراج شده از سه ریزجلبک *Chlorella sp.*، *Nostoc sp.* و *Tolypothrix sp.* مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه نیز از مخلوط کلروفرم و متانول با نسبت ۲ به ۱ برای استخراج لیپید پس از تخریب دیواره سلولی استفاده شد. نتایج آن‌ها نشان داد که استخراج موثر لیپید از ریزجلبک به گونه ریزجلبک و روش مورد استفاده بستگی دارد. در این مطالعه بیشترین میزان لیپید و بیشترین بازده در بازیابی لیپید از *Chlorella sp.* و با استفاده از امواج فراصوتی به دست آمد (Prabakaran and Ravindran, 2011). در مطالعه Suganya و Renganathan (۲۰۱۲) که اثر شش روش مختلف آماده‌سازی قبل از استخراج، بر میزان لیپید استخراج شده از جلبک *Ulva*

استفاده از امواج فراصوت در شرایط مذکور و زمان‌های متفاوت، باعث افزایش معنی‌دار میزان روغن استخراجی و میزان اسیدهای چرب غیراشباع در مقایسه با حالت بدون پیش‌فرآوری و با روش بلای و دایر شد. با استفاده از این روش میزان استخراج روغن از ریزجلبک *C. vulgaris* از مقدار متوسط ۱۰-۳ درصد به ۲۲/۹۶ درصد افزایش یافت. به طور میانگین در تمامی مراحل آزمایش نتایج حاصل از به کارگیری فراصوت هم در فرآیند پیش‌فرآوری و هم در استخراج، مثبت و رو به افزایش بود. در مجموع به کارگیری فراصوت تاثیر منفی بر ساختار اسیدهای چرب نداشت و موجب کاهش زمان استخراج و میزان حلال مصرفی شد. روش به کار گرفته شده علاوه بر کاهش میزان حلال مصرفی و رساندن زمان استخراج روغن از ۱۲۰ دقیقه به حداقل ۳۰ دقیقه برای روش فراصوت، با کاهش دمای فرآیند از حداقل ۷۰ درجه سانتی‌گراد به حدود ۴۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد، می‌تواند برای برداشتن گام‌های بلند در کاهش مصرف انرژی در صنایع، بسیار کارآمد باشد.

بهینه استخراج و پیش‌فرآوری در عدد صابونی و یدی اختلافی به ترتیب ۳ و ۴ واحدی ایجاد کرد. همان طور که قبلاً هم اشاره شد عدد یدی و صابونی جزء خواص فیزیکوشیمیایی روغن‌ها و چربی‌ها هستند که در مفهوم اصلی خود به ترتیب درجه غیراشباعیت و اشباعیت روغن را مشخص می‌سازند. میزان اعداد یدی و صابونی برای حالت بهینه پیش‌فرآوری (آب گرم به همراه ۱۵ دقیقه فراصوت در پیش‌فرآوری و ۵۰ دقیقه فراصوت در استخراج) به ترتیب ۱۴۳/۱۶۷۳ و ۱۹۲/۳۳۲۵ بود. Islam و همکاران (۲۰۱۳) و Avinesh و همکاران (۲۰۱۵) نیز ضمن دستیابی به نتایج مشابه از عدد یدی و صابونی و همچنین ترکیب اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع عدم تغییر در ترکیب اسیدهای چرب به علت افزایش دما را ثابت کردند.

در مجموع، پیش‌فرآوری ریزجلبک *C. vulgaris* با استفاده از امواج فراصوت ۳۰۰ وات با فرکانس ۲۸ کیلوهرتز در ۴۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف به همراه آب گرم، همچنین استخراج روغن موجود در آن با

منابع

- درخشان. م. ۱۳۹۲. رشد و استخراج لیپید از میکروجلبک؛ افزایش بازده استخراج، مدل سازی فرآیند و مطالعه پارامترهای موثر بر استخراج
- حلالی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی مالک اشتر. ۱۳۵ص.
- Alimentarius C. 1981.** International Food Standards. National Academy Press, USA. 505P.
- Avinesh R.B., Gupta A., Barrow C.J. and Puri M. 2015.** Comparison of cell disruption methods for improving lipid extraction from *Thraustochytrid* strains. *Marine Drugs*, 13: 5111–5127.
- Ayahyan D. and Demibas F. 2010.** Algae technology. P: 49–74. In: Ayahyan D. and Demibas F. (Eds.). *Algae Energy, Algae as a New Source of Biodiesel*. Springer, Germany.
- Browne B., Gibbs R., McLeod J., Parker M., Schwanda W. and Warren K. 2009.** Oil Extraction from Microalgae. *Algae Oil Extraction Capstone*. 23P.
- Canella M., Cardinalli F., Castriotta G. and Nappucci R. 1979.** Chemical properties of the seeds of different tomato varieties. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 56: 8–11.
- Chemat F., Huma Z. and Kamran Khan M. 2011.** Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 813–835.
- Cravotto G., Boffa L., Mantegna S., Perego P., Avoquadro M. and Cintas P. 2008.** Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15: 898–902.
- Dolatowski Z.J., Stadnik J. and Stasiak D. 2007.** Application of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum*, 6: 89–99.
- Feng H. and Weiss J. 2011.** The thermodynamic and kinetic aspects of power ultrasound. P: 107–123. In: Feng H., Barbosa-Canovas G.V. and Weiss J. (Eds.). *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, New York.
- Folch O., Lees M. and Stanley G.H.S. 1957.** A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1): 497–509.
- Garcia J.L. and Castro M.D. 2003.** Ultrasound: A powerful tool for

- leaching. *Trend Analytical Chemistry*, 22: 41–47.
- Gong Y. and Jang M. 2011.** Biodiesel production with microalgae as feedstock: From strains to biodiesel. *Biotechnology*, 33: 1269–1284.
- Gouveia L. and Oliveira A.C. 2009.** Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 269–274.
- Halim R., Danquah M.K. and Webley P.A. 2012.** Research review paper- Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30: 709–732.
- Islam M.A., Magnusson M., Brown R.J., Ayoko G.A., Nabi M.N. and Heimann K. 2013.** Microalgal species selection for biodiesel production based on fuel properties derived from fatty acid profiles. *Energies*, 6: 5676–5702.
- ISO 3657. 2002.** Animal and vegetable fats and oils determination of saponification value.
- ISO 5509. 1978.** Animal and vegetable fats and oils preparation of methylesters of fatty acids.
- Iverson S.J., Lag S.L.C. and Cooper M.H. 2001.** Comparison of the Bligh and Dyer and Folch method for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36: 2356–4512.
- Jacques R.A., Peres V.F., Freitas L.S., Dariva C., Oliveira J.V. and Caramo E.B. 2006.** Chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): A study of extraction methods. *Journal of Separation Science*, 29: 2780–2784.
- Jayasooriya S.D., Bhandari B.R., Torley P. and Darcy B.R. 2004.** Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: A review. *International Journal of Food Properties*, 7: 301–319.
- Jeon J.M., Choi H.W., Yoo G.C., Choi Y.K., Choi K.Y., Park H.Y., Park S.H., Kim Y.G., Kim H.J. and Lee S.H. 2013.** New mixture composition of organic solvents for efficient extraction of lipids from *Chlorella vulgaris*. *Biomass Bioenergy*, 59: 279–284.
- Ji J.b. and Lu X.h. 2006.** Improvement of leaching process of *Geniposide* with ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13: 455–462.
- Kanno T. 2013.** *Chlorella* comprehensive report. Retrieved February, 2013 form <https://woodlandpublishing.com>.
- Koberg M., Cohen M., Ben-Amotz A. and Gedanken A. 2011.** Biodiesel production directly from the biomass of *Nanochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology*, 102: 4265–4269.



- Lee J., Yoo C., Jun S. and Ahn C. 2011.** Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Applied Microbiology*, 53: 150–154.
- Liangfu Z. and Zelong L. 2008.** Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15: 731–737.
- Mandil C. 2003.** Biofuels for Transport, an International Perspective. IEA, France. P: 216.
- Mason T.J. and Riera E. 2005.** Application of ultrasound. P: 323–351. In: Da-Wen S. (Ed.). *Emerging Technologies for Food Processing*. Academic Press, London.
- McMillan J.R., Watson I.A., Ali M. and Jaafar W. 2013.** Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. *Applied Energy*, 103: 128–134.
- Mubarak M., Shaija A. and Suchithra T.V. 2016.** Ultrasonication: An effective pre-treatment method for extracting lipid from *Salvinia molesta* for biodiesel production. *Resource-Efficient Technologies*, 2: 126–132.
- Naghdi F.G., Gonzalez L.M., Chan W. and Schenk P.M. 2016.** Progress on lipid extraction from wet algal biomass for biodiesel production. *Applied Microbiology*, 9: 718–726.
- Nandes F.A.N., Linhares F.E. and Rodrigues S. 2008.** Ultrasound as pretreatment for drying of pineapple. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15: 1049–1054.
- Prabakaran P. and Ravindran A. 2011.** A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letter of Applied Microbiology*, 53: 150–4.
- Rajan A., Patil C. and Moholkar V.S. 2010.** Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49: 178–185.
- Ramluckan K., Moodley K.G. and Bux F. 2014.** An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel*, 116: 103–108.
- Ryckebosch E., Bruneel C., Muylaert K. and Foubert I. 2012.** Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technology*, 24: 128–130.
- Ryckebosch E., Muylaert K. and Foubert I. 2011.** Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of American*

- Oil Chemistry Society, 89(2): 189–198.
- Smedes F. and Askland K. 1999.** Revisiting the development of the of the Bligh and Dyer total lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin*, 38: 199–201.
- Smedes F. and Thomason K. 1996.** Evaluation of the Bligh and Dyer lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin*, 32: 681–688.
- Suganya T. and Renganathan S. 2012.** Optimization and kinetic studies on algal oil extraction from marine microalgae *Ulva lactuca*. *Bioresource Technology*, 107: 319–326.
- Vilkhu K. and Mawson R. 2008.** Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry- A review. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 9: 161–169.
- Vinatoru M. 2001.** An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303–313.
- Wang X., Tang C., Yang X. and Gao W. 2008.** Characterization amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L) proteins. *Food Chemistry*, 107: 11–18.
- Wen Z. and Johnson B. 2009.** Microalgae as feedstock for biofuel production. Retrieved July 13, 2014, from [www.ext.vt.edu](http://www.ext.vt.edu).



## Pre-treatment and extraction of oil from *Chlorella vulgaris* microalgae by ultrasound

Peyvand Amiri<sup>1</sup>, Daryush Arabian<sup>2\*</sup>

Received: October 2017

Accepted: March 2018

### Abstract

The oil extraction step from the microalgae is considered to be the most important and essential step in the production of biodiesel. In this research, the effect of time on the ultrasound method was optimized in the pre-processing and extraction stages. *Chlorella vulgaris* microalgae pretreatment was carried out with methods of pretreatment with hot water and ultrasound radiation in water solvent. Extraction of oil was done by two methods of solvent extraction by ultrasound and Bligh and Dyer at certain times and specific solvent ratios, and its fatty acid profile was investigated. The results showed that pre-treatment of *C. vulgaris* microalgae had an effect on extraction efficiency and increased extraction rate. Also, using ultrasonic waves accelerates the process of mass and energy transfer, decreases the operating temperature and the size of the equipment. Using hot water with 15 minutes of ultrasound radiation in pre-treatment and ultrasound extraction in 50 minutes increased extraction efficiency by 22.96%, which were 18.63% more than no pre-treatment and Bligh and Dyer. Investigating the composition and amount of fatty acids of *C. vulgaris* showed that ultrasound time has a significant positive effect on the amount of unsaturated fatty acids extraction.

**Key words:** *Oil Extraction, Ultrasonic Extraction, Bligh and Dyer, Pre-treatment, Chlorella vulgaris.*

1- M.Sc. in Chemical Engineering, Basic Science Research Institute, University Institute of Applied Science, Malek Ashtar University of Technology, Isfahan, Iran.

2- Assistant Professor in Basic Science Research Institute, University Institute of Applied Science, Malek Ashtar University of Technology, Isfahan, Iran.

\*Corresponding Author: [darabian@mut.ac.ir](mailto:darabian@mut.ac.ir)