



مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی استحصال روغن از گونه میکروجلبکی *Haematococcus pluvialis* با استفاده از روش سطح پاسخ و بررسی پروفایل اسید چرب آن به منظور تولید بیودیزل

زینب رئوفی^۱، سید میرلطیف موسوی گرگری^{۲*}

تاریخ دریافت: تیر ۹۷

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۷

چکیده

تولید بیودیزل از منابع زیستی مانند میکروجلبک‌ها، دارای پتانسیل بالایی به عنوان جانشین دیگر سوخت‌های فسیلی در حال اتمام است. فرآیند تولید بیودیزل از میکروجلبک‌ها شامل برداشت، خشک کردن و استخراج روغن، با صرف هزینه و انرژی زیادی صورت می‌گیرد. در فرآیند تجاری‌سازی توسعه روش‌های استخراجی که قابلیت استفاده در مقیاس وسیع را داشته باشد، از مهم‌ترین نیازها در تولید این سوخت است. بنابراین هدف از این مطالعه، بهینه‌سازی شرایط استخراج روغن از میکروجلبک *Haematococcus pluvialis* شامل دما (۲۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد) و میزان مخلوط حلال‌ها (۵ تا ۳۰ میلی‌لیتر) حاوی محلول دو فازی کلروفرم/متانول با نسبت ۱:۲ (حجمی/حجمی) با استفاده از روش سطح پاسخ بود. نقاط بهینه به دست آمده ۴۲/۶ درجه سانتی‌گراد و ۱۷/۲۳ میلی‌لیتر به ترتیب برای دما و مخلوط حلال‌ها بود. مشخصات کمی و کیفی اسیدهای چرب روغن استخراجی قبل و بعد از بهینه‌سازی مقایسه شد. نتایج نشان داد که بهینه‌سازی دارای تاثیر مثبت بر پروفایل اسیدهای چرب روغن استخراجی برای استفاده در تولید بیودیزل با کیفیت بالاتر بود.

واژگان کلیدی: روش سطح پاسخ، *Haematococcus pluvialis*، روغن میکروجلبکی، بیودیزل.

۱- دکتری بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۲- استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: slmousavi@shahed.ac.ir

مقدمه

در حال حاضر، سوخت زیستی به عنوان یک منبع قابل قبول برای تامین نیازهای سوخت‌های فسیلی مورد توجه قرار گرفته است (Kubendran et al., 2017). با افزایش آگاهی‌های زیست‌محیطی در مورد پیامدهای منفی استفاده بیش از حد از سوخت‌های فسیلی، بیودیزل به عنوان منبع سوختی جایگزین، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. زیرا تجزیه‌پذیر، قابل بازیافت و غیرسمی است و دارای پروفایل انتشار کمتری است (Atadashi et al., 2010). مهم‌ترین عامل محدود کننده توسعه استفاده از بیودیزل، هزینه بالای تولید آن است. قیمت بالای مواد اولیه بیش از ۷۵ درصد هزینه کل را شامل می‌شود (Lim and Teong, 2010) و یک عامل بحرانی و تعیین کننده در رقابت بیودیزل با سوخت‌های فسیلی است (Huang et al., 2015). روغن‌های استخراجی از زیست‌توده‌ها توانایی بالایی در تولید بیودیزل پاک‌تر دارند (Ma and Hanna, 1999). سه نسل از مواد اولیه در توسعه صنعت تولید بیودیزل لحاظ شده‌اند. نسل اول بر اساس استفاده از روغن‌های گیاهی خوراکی مانند روغن دانه آفتابگردان

(*Helianthus annuus*) یا سویا (*Glycine max*) است (Ahmad et al., 2011). نسل دوم بر کاهش وابستگی به منابع خوراکی تمایل پیدا کرده است و روغن‌های غیرخوراکی مانند روغن گیاه جاتروفا (*Jatropha*)، گیاه جوجوبا (*Simmondsia chinensis*)، روغن‌های دور ریختنی، روغن‌های بازیافتی و چربی‌های جانوری را به عنوان مواد اولیه معرفی می‌کند (Ahmad et al., 2011; Pinzi et al., 2014). در مورد این گروه، تنها زمانی می‌توان استفاده از این ترکیبات روغنی را مناسب دانست که کشت این گیاهان در زمین‌های بایر صورت گیرد تا در رقابت با منابع کشاورزی خوراکی نباشند. در غیر این صورت استفاده از منابع اولیه گروه اول و دوم با صرف هزینه بالا، کارایی پایین و عدم توسعه پایدار همراه خواهد بود (Leung et al., 2010).

در حال حاضر توجه پژوهشگران بر نسل سوم مواد اولیه برای تولید بیودیزل معطوف شده است که شامل استفاده از روغن‌های میکروجلبکی است. در مقایسه با نسل اول و دوم، میکروجلبک‌ها به عنوان منابع اولیه، جایگزین امید بخش‌تری هستند و برای تولید بیودیزل گزینه مناسبی هستند، زیرا دارای

در حال حاضر، سوخت زیستی به عنوان یک منبع قابل قبول برای تامین نیازهای سوخت‌های فسیلی مورد توجه قرار گرفته است (Kubendran et al., 2017). با افزایش آگاهی‌های زیست‌محیطی در مورد پیامدهای منفی استفاده بیش از حد از سوخت‌های فسیلی، بیودیزل به عنوان منبع سوختی جایگزین، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. زیرا تجزیه‌پذیر، قابل بازیافت و غیرسمی است و دارای پروفایل انتشار کمتری است (Atadashi et al., 2010). مهم‌ترین عامل محدود کننده توسعه استفاده از بیودیزل، هزینه بالای تولید آن است. قیمت بالای مواد اولیه بیش از ۷۵ درصد هزینه کل را شامل می‌شود (Lim and Teong, 2010) و یک عامل بحرانی و تعیین کننده در رقابت بیودیزل با سوخت‌های فسیلی است (Huang et al., 2015). روغن‌های استخراجی از زیست‌توده‌ها توانایی بالایی در تولید بیودیزل پاک‌تر دارند (Ma and Hanna, 1999). سه نسل از مواد اولیه در توسعه صنعت تولید بیودیزل لحاظ شده‌اند. نسل اول بر اساس استفاده از روغن‌های گیاهی خوراکی مانند روغن دانه آفتابگردان

استفاده می‌شود که شامل استفاده از تشعشعات مایکروویو و مواد لیز کننده شیمیایی است (Halim et al., 2012). لازم به ذکر است که استفاده از این تیمارها در مقیاس آزمایشگاهی مناسب است در حالی که در مقیاس صنعتی و گسترده، هزینه و انرژی زیادی را در بر دارد و برای تولید سوخت مقرون به صرفه نیست. در نهایت فرآیند استخراج باید ساده با حلال‌های ارزان قیمت و بدون نیاز به هیچ گونه پیش‌تیمار هزینه‌بری انجام‌پذیر باشد تا گزینه مناسبی برای استفاده در تولید بیودیزل تلقی شود (Chatsungnoen and Chisti, 2016).

با توجه به مطالب گفته شده، بهینه‌سازی فرآیند استحصال روغن میکرو جلبکی برای استفاده به عنوان منبع تولید بیودیزل در مسیر تولید سوخت امری مهم به نظر می‌رسد.

در سال ۲۰۱۴ پژوهش‌هایی در رابطه با بهینه‌سازی شرایط استخراج روغن از گونه میکرو جلبکی *Nannochloropsis gaditana* با کمک تشعشعات مایکروویو و امواج فراصوت صورت گرفت که ثابت کرد میزان استخراج با استفاده از این روش‌ها در کنار مخلوط حلال‌ها بیشترین بازده را دارد (Bermudez et al., 2014). همچنین Islam و همکارانش (۲۰۱۴) تاثیر شرایط از جمله دما

بازده تولید روغن بالا، تولیدمثل و تکثیر سریع و عدم نیاز به سیستم آبیاری یا آب شیرین است و محصولات جانبی با ارزشی نیز در کنار روغن از آن‌ها قابل بهره‌برداری است (Pinzi et al., 2014). تولید بیودیزل از منابع میکرو جلبکی چندین مرحله دارد که شامل کشت سلول، برداشت سلول، استخراج روغن و سنتز بیودیزل است (Goncalves et al., 2013).

روغن‌های میکرو جلبکی پتانسیل مناسبی برای استفاده به عنوان منابع اولیه برای تولید بیودیزل به شمار می‌آیند (Chisti, 2007). این روغن‌ها عمدتاً با استفاده از روش Bligh و Dyer (۱۹۵۹) استخراج می‌شوند که اساس آن استفاده از مخلوط حلال‌ها و آب است و معمولاً دارای بازده نسبتاً پایینی است. زیرا این روش اولین بار به طور اصلی برای استحصال روغن از بافت ماهی طراحی شد. بعدها با تغییراتی که در این روش ایجاد شد توانستند بازده روغن بالاتری را از زیست‌توده‌های میکرو جلبکی دریافت کنند (Chatsungnoen and Chisti, 2016). عمدتاً به منظور بهبود فرآیند استخراج با استفاده از حلال‌ها، از روش‌های مختلفی به عنوان پیش‌تیمار^۱

1- Pretreatment

در فواصل این کار برای شکستن دیواره سلولی بر روی یخ قرار داده شدند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول دو فاز کلروفرم/ متانول (Merck، آلمان) با نسبت ۲:۱ (حجمی/ حجمی) به این مخلوط اضافه شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه تا تشکیل دو لایه با شیکر (KS 130 Control، IKA، آلمان) تکان‌دهی شد. به منظور جداسازی بهتر، مخلوط با دور ۶۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (HAEMATOKRIT، Hettich، آلمان) شد. در این حالت لایه زیرین حاوی حلال و لایه بالایی حاوی روغن میکروجلبکی از یکدیگر جداسازی شدند و لایه بالایی برای تبخیر حلال در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس میزان بازده روغن (OE) با رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱:

$$OE(\%) = (W_O / W_A) \times 100$$

W_A : میزان پودر میکروجلبکی استفاده شده (گرم)؛
 W_O : وزن روغن استخراج شده (گرم).

طراحی آزمایش با روش سطح پاسخ

در مطالعه حاضر، مهم‌ترین مسئله بررسی آثار اصلی و متقابل متغیرهای دما و میزان مخلوط حلال‌ها و پیش‌بینی بهینه این متغیرها

را بر میزان بازده و ویژگی‌های پروفایل اسیده‌های چرب مخلوط میکروجلبکی‌های دریایی برای رسیدن به بهینه شرایط، بررسی کردند. *Haematococcus pluviialis* یک میکروجلبک سبز آب شیرین است که به خاطر تولید زیاد آنتی‌اکسیدان آستاگزانتین مورد توجه قرار گرفته است (Lorenz and Cysewski, 2000) و در پژوهش حاضر برای اولین بار برای تولید روغن استفاده شد.

در این مطالعه میزان استحصال روغن از این گونه میکروجلبکی با استفاده از روش سطح پاسخ^۱ (RSM) بهینه‌سازی شد و پروفایل اسید چرب روغن استخراجی قبل و بعد از بهینه‌سازی به منظور تعیین پتانسیل آن‌ها در تولید بیودیزل بررسی شد.

مواد و روش‌ها

استخراج روغن از نمونه‌های میکروجلبکی

ابتدا ۵۰ میلی‌گرم پودر خشک میکروجلبک *Haematococcus pluviialis* (پارسیان قشم، ایران) توزین و با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. نمونه‌ها در سه زمان ۱۵ دقیقه‌ای تحت شرایط سونیکیشن با سونیکاتور (Hielscher، آلمان) تیمار شدند و

1- Response Surface Method

رفلاکس انجام شد. سپس ۱۵ میلی‌لیتر فلوتور برم (Merck، آلمان) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه به آرامی جوشانده شد. پس از توقف حرارت‌دهی، به فاز آبی نمک طعام اضافه شد. فاز حلال که حاوی روغن متیل استری شده بود جداسازی و به میزان یک میکرولیتر از آن به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد.

بررسی پروفایل اسید چرب روغن‌های

میکروجلبکی قبل و پس از بهینه‌سازی

در مطالعه حاضر برای خوانش نمونه‌های متیل استری شده پیش از بهینه‌سازی با دمای ۳۰ درجه و میزان ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط حلال‌ها و پس از بهینه‌سازی، از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) (Sigma-Varian، Aldrich، آمریکا) مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای^۲ با ستون BPX با ابعاد $100\text{m} \times 0.22\text{mm} \times 0.25\mu\text{m}$ استفاده شد. دمای ورودی تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و دمای آشکارساز ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای آون ابتدا روی ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس هر دو دقیقه ۱۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت.

با بالاترین بازده روغن بود و از این رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد. این روش که مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است برای بهینه‌سازی پاسخ که متاثر از چندین متغیر بود به کار رفت. با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش یافت و کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل متغیرها، قابل برآورد شد. در این مطالعه از طراحی مرکب مرکزی^۱ که زیرمجموعه روش سطح پاسخ است، استفاده شد. متغیرها در پنج سطح و با پنج تکرار در نقطه مرکزی، برای تایید تکرارپذیری آزمایش توسط نرم‌افزار Design-Expert 7.1.4 تعریف شد (جدول ۱). با استفاده از نتایج آزمایش‌های انجام شده، نرم‌افزار دو نقطه برای متغیرها برای رسیدن به بیشترین بازده روغن را پیش‌بینی کرد که برای بررسی صحت آن‌ها، به صورت عملی آزمایش شد.

متیل استری شدن اسیدهای چرب موجود در روغن میکروجلبکی *Haematococcus pluvialis*

در یک بالن حاوی یک گرم از روغن‌های استحصالی، ۲۵ میلی‌لیتر پتاس متانولی (Merck، آلمان) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه

2- Flame Ionization Detector (FID)

1- Central Composite Design

جدول ۱: سطوح تعیین شده برای متغیرهای دما و میزان حلال‌ها در روش سطح پاسخ برای میکروجلبک *Haematococcus pluviialis*

متغیرها	سطح -۱/۴۱	سطح -۱	سطح ۰	سطح +۱	سطح +۱/۴۱
دما (درجه سانتی‌گراد)	۲۰	۲۴/۳۹	۳۵	۴۵/۶	۵۰
میزان حلال‌ها (میلی‌لیتر)	۵	۸/۶۶	۱۷/۵	۲۶/۳۳	۳۰

نتایج

گاز حامل مورد استفاده نیتروژن بود که میزان جریان آن یک میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شد. همچنین کامپیوتر متصل به دستگاه دارای کتابخانه کروماتوگرام استانداردهای داده شده به دستگاه بود که برای تشخیص کمی کروماتوگرام‌های به دست آمده از آزمایش به کار گرفته شد. با استفاده از مساحت زیر نمودار برای هر پیک، مقدار کمی هر متیل استر اسید چرب محاسبه شد.

استحصال روغن پیش از بهینه‌سازی میزان بازده روغن به دست آمده از میکروجلبک *Haematococcus pluviialis* ۱۹/۴ درصد به دست آمد.

بهینه‌سازی استحصال روغن با استفاده از روش سطح پاسخ

بر اساس جدول طراحی شده توسط روش سطح پاسخ (جدول ۱)، ۱۳ آزمایش طراحی و بر روی نمونه میکروجلبکی انجام شد که نتایج به عنوان Response 1 که درصد بازده روغن معرفی شده بود، ثبت شد. دو متغیر اصلی دما و میزان حلال‌ها به عنوان متغیرهای اصلی برای بهینه‌سازی بازده روغن استخراجی از پودر میکروجلبکی معرفی شد که بر اساس نتایج وارد شده برای آزمایش‌های پیشنهادی نرم‌افزار،

تجزیه و تحلیل‌های آماری

با استفاده از آزمون نمونه مستقل t-test داده‌های مربوط به درصد‌های وزنی اسیدهای چرب روغن‌های استحصالی قبل و بعد از بهینه‌سازی مقایسه شد. این آزمون با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ انجام شد.

انجام شد که میزان بازده ۲۱/۴۲ درصد به دست آمد که با میزان به دست آمده از نرم‌افزار تفاوت معنی‌داری نداشت.

مقایسه پروفایل‌های اسید چرب به دست آمده قبل و بعد از بهینه‌سازی

پروفایل اسیدهای چرب روغن‌های استحصال‌ی قبل و بعد از بهینه‌سازی در شکل ۲ نمایش داده شده است. در هر دو حالت بیشترین درصد وزنی اسیدهای چرب مربوط به پالمیتیک اسید با میزان ۳۲ و ۳۳/۱ درصد به ترتیب برای قبل و بعد از بهینه‌سازی به دست آمد. همچنین کاهش معناداری ($P < 0.05$) در میزان اسید مریستیک به میزان ۶/۱۱ درصد مشاهده شد.

بهترین مدل با سطح اطمینان ۹۵٪، مدل مربع^۱ پیشنهاد شد که رابطه ۲ مربوط به گونه *H. pluvialis* است.

رابطه ۲:

$$OE (\%) = 21.40 + 0.17A + 0.44B - 0.27AB - 0.49A^2 - 0.31B^2$$

A: متغیر میزان مخلوط حلال‌ها (میلی‌لیتر)؛ B: دما (درجه سانتی‌گراد).

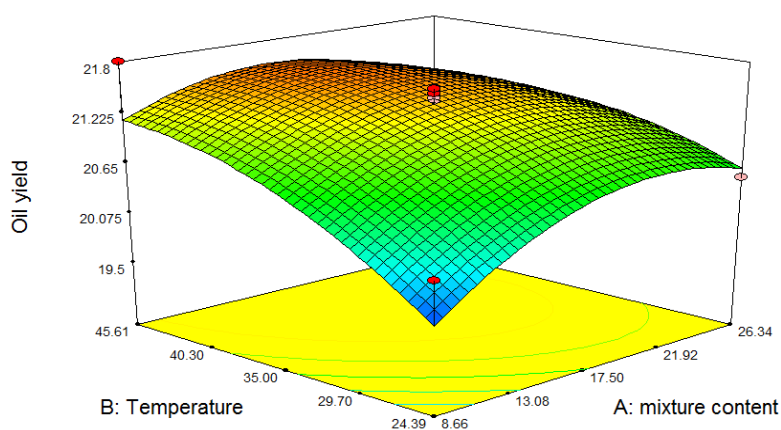
در رابطه ۲ دما دارای تاثیر اصلی بود و هر دو متغیر دما و میزان حلال‌ها تاثیر مثبت بر میزان بازده روغن داشتند. همچنین اثر متقابل دو متغیر معنادار بود.

نتایج به دست آمده از جدول ANOVA برای مدل پیش‌بینی در جدول ۲ آورده شده است. میزان F-value نتایج به دست آمده از تحلیل مدل پیش‌بینی شده به صورت نمودار سه بعدی نمایش داده شده است (شکل ۱). همچنین با استفاده از قسمت بهینه‌سازی نرم‌افزار Design-Expert، نقطه بهینه دو متغیر میزان حلال‌ها و دما به ترتیب ۱۷/۲۳ میلی‌لیتر و دمای ۴۲/۶ درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به بالاترین بازده روغن به میزان ۲۱/۵ درصد با میزان مطلوبیت ۰/۸ پیش‌بینی شد. آزمایش با دو کمیت تعیین شده از متغیرها

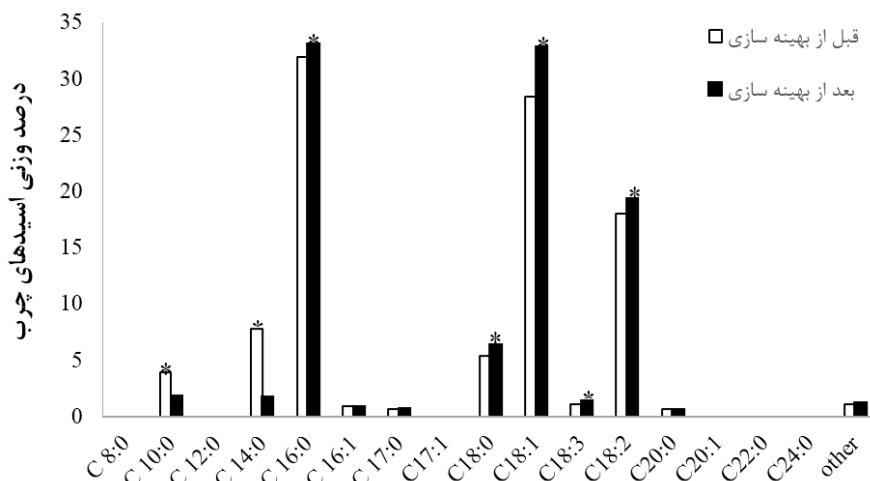
1- Quadratic Model

جدول ۲: نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) در روش سطح پاسخ برای مدل پیش‌بینی شده و متغیرهای دما و میزان حلال‌ها

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	4.16	5	0.83	4.25	0.0428
A-mixture conte	0.22	1	0.22	1.14	0.3206
B-Temperature	1.54	1	1.54	7.87	0.0263
AB	0.30	1	0.30	1.54	0.2542
A ²	1.65	1	1.65	8.43	0.0229
B ²	0.68	1	0.68	3.47	0.1050
Residual	1.37	7	0.20		
Lack of Fit	1.35	3	0.45	71.86	0.0006



شکل ۱: پاسخ سطح برای دو متغیر میزان حلال‌ها و دما در میزان بازده روغن برای میکرو جلبک *Haematococcus pluvialis*



شکل ۲: مقایسه مشخصات کمی و کیفی اسیدهای چرب روغن استحصالی از میکرو جلبک *Haematococcus pluvialis* قبل و بعد از بهینه‌سازی. علامت ستاره نشان دهنده وجود اختلاف معنادار بین دو حالت قبل و بعد از بهینه‌سازی است ($P < 0.05$).

al., 2012). با این حال، در این مطالعه برای

استخراج بیشتر و سریع‌تر روغن میکرو جلبکی از پودر خشک *H. pluvialis* از روش حلال دو فازی کلروفرم/ متانول استفاده شد. Lee و همکارانش (۱۹۹۸) نیز پنج نوع از مخلوط حلال‌ها را برای استخراج روغن از گونه جلبکی *Botryococcus braunii* مورد آزمایش قرار دادند که بیشترین بازده تولید روغن از روش حلال دو فازی کلروفرم و متانول بود.

بهینه‌سازی استحصال روغن از میکرو جلبک *Haematococcus pluvialis*

نتایج به دست آمده از معادله درجه دوم نرم‌افزار نشان داد که دما دارای تاثیر اصلی و

بحث

استخراج روغن از *Haematococcus pluvialis* با استفاده از حلال دو فازی

در استخراج روغن میکرو جلبکی می‌توان از دو روش استخراج به وسیله حلال‌های آلی یا استخراج با روش سیالات فوق بحرانی استفاده کرد. برای استفاده از روش حلال‌های آلی، انتخاب این حلال‌ها باید به گونه‌ای باشند که در نهایت فرار باشند و با صرف انرژی پایین از نمونه روغن میکرو جلبکی خام تخلیه شوند. استخراج با استفاده از مخلوط حلال‌های کلروفرم و متانول سریع‌تر از آن- هگزان انجام می‌گیرد در حالی که سمی‌تر است (Halim et

سانتی‌گراد به ۸۰ درجه افزایش یافت بازده استخراج روغن با افزایش دما به میزان حداکثر خود رسید، در حالی که افزایش بیشتر از این مقدار کاهش قابل توجهی را در بازده استحصال در پی داشت. در استحصال روغن از میکروجلبک *Chlorella vulgaris* نیز افزایش دما ابتدا باعث افزایش بازده استخراج روغن شد و پس از آن این روند رو به کاهش گذاشت (Abdullah et al., 2017). این نتیجه احتمالاً به دلیل افزایش ظرفیت انحلال سیستم حلال با افزایش دما است (Suganya and Renganathan, 2012). به علاوه افزایش دما تا حد مناسب انتقال جرم را تسریع می‌کند و بازده استخراج روغن را بهبود می‌بخشد (Wanget al., 2008).

مقدار P-value به دست آمده در این مطالعه، تایید کننده صحت مدل است و میزان اطمینان به مدل را در سطح بسیار بالا تضمین می‌کند. هدف از طراحی آزمایش یافتن یک سری از شرایط بهینه برای رسیدن به پاسخ بهینه است. میزان مطلوبیت نسبتاً بالایی در رسیدن به شرایط بهینه برای بیشترین بازده روغن به دست آمد که نتایج عملی به دست آمده از نقاط بهینه پیش‌بینی شده با نتایج نرم‌افزار تفاوت معناداری نداشت و صحت این

هر دو متغیر دما و میزان حلال‌ها تاثیر مثبت بر میزان بازده روغن داشتند. همچنین اثر متقابل دو متغیر معنادار بود. میزان F-value به دست آمده به معنای مقایسه واریانس متغیرها یا مدل با واریانس خطا است و در حقیقت نسبت واریانس خطا به واریانس مدل را نشان می‌دهد. هر چه قدر F-value به عدد ۱ نزدیک شود نشان دهنده اثر غیرمعنادار متغیر بر پاسخ است. میزان بالاتر این شاخص اهمیت بیشتر متغیر را بیان می‌کند (Arshadi and Mousavi, 2014). بر اساس نتایج به دست آمده از جدول ANOVA (جدول ۲)، در این مطالعه F-value به دست آمده برای متغیر دما بسیار بیشتر از میزان مخلوط حلال‌ها بود که نشان دهنده اثر تعیین کننده این متغیر بر استحصال روغن از این گونه است. دما تاثیر قابل توجهی بر میزان استحصال روغن از دانه‌های روغنی و نمونه‌های گیاهی با استفاده از حلال‌ها دارد. در این مطالعه، با افزایش دما میزان بازده افزایش یافت، اما در دماهای بالاتر روند کاهش مشاهده شد (Wingard and Phillips, 1951). در مطالعه Ghazali و Yasin (۲۰۱۶) بر استخراج روغن از دانه گیاه *Moringa oleifera*، هنگامی که دما از ۶۰ درجه

مربوط به اولئیک اسید (اسید چرب غیراشباع) و پالمیتیک اسید (اسید چرب اشباع) بود. الگوی اسیدهای چرب موجود در روغن میکرو جلبکی این مطالعه با روغن استخراجی از گونه میکرو جلبکی *Chlorella vulgaris* مشابه بود (Huang et al., 2015). همچنین Knothe (۲۰۰۸) نیز بیشترین میزان درصد اسید چرب در نمونه روغن میکرو جلبکی استخراجی را برای اولئیک اسید، پالمیتولئیک اسید و پالمیتیک اسید گزارش کردند. Prartono و همکاران در سال ۲۰۱۳ در بررسی پروفایل اسیدهای چرب جلبک *Chaetoceros gracilis* نتایج مشابهی را به دست آوردند.

انواع معمول اسیدهای چرب موجود در روغن‌های میکرو جلبکی C16:0، C14:0، C18:0، C18:1، C18:2 و C18:3 است که بسته به هر گونه مقادیر آن‌ها متفاوت است (Amaro et al., 2011). در مورد میکرو جلبک‌های سبز آب شیرین نیز بیشترین مقدار اسیدهای چرب مختص C16:0، C18:0، C18:1، C18:2 و C18:3 است و سایر اسیدهای چرب با مقادیر پایین‌تری حضور دارند (Knothe, 2009).

طراحی را تایید کرد. سطوح پاسخ نمودار سه بعدی به دست آمده از آزمون ANOVA در این آزمایش، نیز نشان دهنده بالا بودن میزان بازده روغن در نقاط پیش‌بینی شده است.

بررسی پروفایل و درصد وزنی اسیدهای چرب روغن استحصال شده قبل و بعد از بهینه‌سازی برای استفاده در تولید بیودیزل

ترکیبات اسید چرب روغن مورد استفاده در فرآیند ترانس استریفیکاسیون برای تولید بیودیزل، تعیین کننده کیفیت نهایی محصولات تولید شده است که به دلیل ویژگی‌های شیمیایی مختلف از قبیل طول زنجیره هیدروکربنی و درجه عدم اشباعیت اسیدهای چرب موجود در روغن است (Mahmoud et al., 2015). این چنین که ثابت شده است افزایش درجه عدم اشباعیت، به تمایل بیشتر بیودیزل تولیدی به اکسید شدن منجر خواهد شد (Islam et al., 2013). بنابر این با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی اسیدهای چرب موجود در روغن استخراجی قبل و پس از بهینه‌سازی شرایط، بر اساس کیفی و کمی مورد آزمایش قرار گرفت. بر اساس نتایج بیشترین درصد اسیدهای چرب این نمونه روغن قبل و پس از بهینه‌سازی

اسید در هر دو نمونه بالا بود و حتی میزان اولئیک اسید پس از بهینه‌سازی افزایش معناداری را نشان داد که می‌توان گفت بهینه‌سازی این روغن استخراجی باعث افزایش کیفیت آن در جهت تولید بیودیزل شده است. همچنین عدد ستان (Cetane Number) به دست آمده برای هر سوختی بسیار به ترکیبات اسیدهای چرب استفاده شده در تولید آن سوخت بستگی دارد که برای بالا رفتن کیفیت احتراق بیودیزل، نسبت ۵:۴:۱ به ترتیب برای اسیدهای چرب پالمیتولئیک، اولئیک و مریستیک اسید ایده آل است (Schenk et al., 2008). در این مطالعه نیز نزدیکی به این نسبت در هر دو نمونه روغنی قبل و بعد از بهینه‌سازی دیده شد.

کلیه نتایج گویای این مطلب است که روغن استحالی از گونه میکروجلبکی *Haematococcus pluvialis* با ویژگی‌های پروفایل اسید چرب تعیین شده به ویژه پس از بهینه‌سازی، گزینه مناسبی برای تولید بیودیزل است و بهینه‌سازی شریط استخراج، باعث بالا رفتن بازده تولید روغن از این گونه و بالا رفتن کیفیت بیودیزل تولید شده، می‌شود.

نتایج حاصل از مقایسه درصد‌های وزنی اسیدهای چرب قبل و بعد از بهینه‌سازی نشان داد که عمدتاً افزایش‌های معنادار مربوط به اسیدهای چرب زنجیره بلند بود. زیرا با افزایش دما، استخراج اسیدهای چرب زنجیره بلند با کارایی بیشتری صورت می‌گیرد. مطالعات Islam و همکارانش (۲۰۱۴) نیز صحت این یافته را تایید کردند. برخی از میکروجلبک‌ها غنی از اسیدهای چرب اشباع نشده هستند. اسیدهای چرب اشباع نشده با بیش از ۴ پیوند دوگانه، مانند ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و یا دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) به عنوان مشتقات اسید چرب لینولنیک اسید، به راحتی در هنگام ذخیره‌سازی اکسید می‌شوند 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 می‌شود (Richter et al., 1996). درصد وزنی مربوط به اسید چرب لینولنیک اسید در روغن‌های استخراجی قبل و بعد از بهینه‌سازی بسیار کم بود و در هر دو حالت تفاوت معناداری مشاهده نشد. در حالی که مقادیر اسیدهای چرب پالمیتیک و اولئیک

منابع

- Abdullah N., Amran N.A. and Yasin N.H.M. 2017.** Algae oil extraction from freshwater microalgae *Chlorella vulgaris*. Malaysian Journal of Analytical Sciences, 21(3): 735–744.
- Ahmad A., Yasin N.M., Derek C. and Lim J. 2011.** Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15(1): 584–593.
- Amaro H.M., Guedes A.C. and Malcata F.X. 2011.** Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. Applied Energy, 88(10): 3402–3410.
- Arshadi M. and Mousavi S. 2014.** Simultaneous recovery of Ni and Cu from computer-printed circuit boards using bioleaching: Statistical evaluation and optimization. Bioresource Technology, 174: 233–242.
- Atadashi I., Aroua M. and Aziz A.A. 2010.** High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(7): 1999–2008.
- Bermudez Menendez J.M., Arenillas A., Menendez Diaz J.A., Boffa L., Mantegna S., Binello A. and Cravotto G. 2014.** Optimization of microalgae oil extraction under ultrasound and microwave irradiation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 89(11): 1779–1784.
- Bligh E.G. and Dyer W.J. 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37(8): 911–917.
- Chatsungnoen T. and Chisti Y. 2016.** Optimization of oil extraction from *Nannochloropsis salina* biomass paste. Algal Research, 15: 100–109.
- Chisti Y. 2007.** Biodiesel from micro-algae. Biotechnology Advances, 25: 294–306.
- Ghazali Q. and Yasin N.H.M. 2016.** The effect of organic solvent, temperature and mixing time on the production of oil from *Moringa oleifera* seeds. Paper Presented at the IOP Conference Series, 1–36 (012053).
- Goncalves A.L., Pires J.C. and Simoes M. 2013.** Green fuel production: Processes applied to microalgae. Environmental Chemistry Letters, 11(4): 315–324.
- Halim R., Danquah M.K. and Webley P.A. 2012.** Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. Biotechnology Advances, 30(3): 709–732.

- Huang J., Xia J., Jiang W., Li Y. and Li J. 2015.** Biodiesel production from microalgae oil catalyzed by a recombinant lipase. *Bioresource Technology*, 180: 47–53.
- Islam M.A., Brown R.J., O'Hara I., Kent M. and Heimann K. 2014.** Effect of temperature and moisture on high pressure lipid/oil extraction from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 88: 307–316.
- 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(11): 5676–5702.
- Knothe G. 2008.** “Designer” biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy and Fuels*, 22(2): 1358–1364.
- Knothe G. 2009.** Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy and Environmental Science*, 2(7): 759–766.
- Kubendran D., Salma Aathika A.R., Amudha T., Thiruselvi D., Yuvarani M. and Sivanesan S. 2017.** Utilization of leather fleshing waste as a feedstock for sustainable biodiesel production. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 39(15), 1587–1593 .
- Lee S.J., Yoon B.D. and Oh H.M. 1998.** Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnology Techniques*, 12(7): 553–556.
- Leung D.Y., Wu X. and Leung M. 2010.** A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87(4): 1083–1095.
- Lim S. and Teong L.K. 2010.** Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3): 938–954.
- Lorenz R.T. and Cysewski G.R. 2000.** Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18(4): 160–167.
- Ma F. and Hanna M.A. 1999.** Biodiesel production: A review. *Bioresource Technology*, 70(1): 1–15.
- Mahmoud E.A., Farahat L.A., Aziz Z.K.A., Fatthallah N.A. and El Din R.A.S. 2015.** Evaluation of the potential for some isolated microalgae to produce biodiesel. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(1): 97–101.

- Pinzi S., Leiva D., Lopez-Garcia I., Redel-Macias M.D. and Dorado M.P. 2014.** Latest trends in feedstocks for biodiesel production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(1): 126–143.
- Prartono T., Kawaroe M. and Katili V. 2013.** Fatty acid composition of three diatom species *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira* sp. and *Chaetoceros gracilis*. *International Journal of Environment and Bioenergy*, 6(1): 28–43.
- Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avdalovic N. and Pohl C. 1996.** Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6): 1033–1039.
- Schenk P.M., Thomas-Hall S.R., Stephens E., Marx U.C., Musgnug J.H., Posten C., Kruse O. and Hankamer B. 2008.** Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 1(1): 20–43.
- Suganya T. and Renganathan S. 2012.** Optimization and kinetic studies on algal oil extraction from marine macroalgae *Ulva lactuca*. *Bioresource Technology*, 107: 319–326.
- Wang L., Yang B., Du X. and Yi C. 2008.** Optimisation of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Pueraria lobata*. *Food Chemistry*, 108(2): 737–741.
- Wingard M. and Phillips R. 1951.** Solvent extraction IV. The effect of temperature on extraction rate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 28(4): 149–152.



Research Paper

Optimization of oil extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae using response surface method and evaluation of its fatty acid profile in order to biodiesel production

Zeinab Raoufi¹, Seyed Mir Latif Mousavi Gargari^{2*}

Received: July 2018

Accepted: September 2018

Abstract

Large scale biodiesel production from renewable sources like microalgae is an appropriate option to replace nonrenewable fuels. The biodiesel production procedure from microalgae involves costly and energy consuming processes such as harvesting and drying of microalgae and oil extraction. The expansion of effective commercially oil extraction processes is considered as one of the most requirements for large scale production. Thus, in this study, oil extraction conditions from *Haematococcus pluvialis*, including temperature and solvent mixture content, was optimized by applying response surface method. Optimum points were obtained at 42.6°C and 17.23 mL for temperature and solvents content, respectively. The algal oil was extracted in optimized and unoptimized conditions and fatty acid profile of these extracted oils was compared together. Results showed that the optimization has positive effects on the extracted fatty acids profile which can be used to produce biodiesel with higher quality.

Key words: *Response Surface Method, Haematococcus pluvialis, Microalgae Oil, Biodiesel.*

1- Ph.D. in Microbial Biotechnology, Department of Biology, Shahed University, Tehran, Iran.

2- Professor in Biology Department, Shahed University, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: slmousavi@shahed.ac.ir