

## تولید زیست دیزل از میکرو جلبک دونالیلا سالینا

سمیرا لطفی<sup>۱</sup>، محمد پازوکی<sup>۱\*</sup>، امیرحسین زمزمیان<sup>۱</sup>، فرزانه زمانی<sup>۱</sup>، امین حجازی<sup>۲</sup>

۱- کرج، پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشگاه انرژی

۲- تبریز، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

پیام نگار: mpazouki@merc.ac.ir

### چکیده

در این تحقیق، امکان پذیری تولید سوخت زیست دیزل از طریق آغشته کردن روغن جلبک دونالیلا سالینا با متانول با استفاده از سلول‌های ریزپوز اریزائی PTCC5174 که درون حفرات پلی اورتان تثبیت شده اند، به عنوان زیست کاتالیزگر (دارنده آنزیم لیپاز) مورد بررسی قرار گرفته است. فرایند آغشته کردن به متانول به صورت افزودن مرحله‌ای متانول در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعت، به منظور جلوگیری از کاهش فعالیت آنزیم، در حضور محلول بافر ۰/۱ مولار فسفات انجام گرفت. مدت کل فرایند ۷۲ ساعت به طول انجامید. بعد از خالص‌سازی فرایند به کمک سانتریفیوژ، میزان تبدیل متیل استر در محصول واکنش ترانس استریفیکاسیون به ۵۹٪ رسید. برای افزایش درصد تبدیل، افزودن متانول بیشتر و حلال (استون و نرمال هگزان) به محیط واکنش مورد بررسی قرار گرفت که به ترتیب، تبدیل اسیدهای چرب آزاد به متیل استر (زیست دیزل) ۷۲ و ۹۰ درصد به دست آمد. استفاده از متانول اضافی سبب مهارکنندگی فعالیت آنزیم شد، در نتیجه نسبت مولی ۲:۱ روغن به متانول نیز بررسی شد که در این حالت میزان تبدیل ۶۷ درصد به دست آمد. با توجه به نتایج به دست آمده، این روش برخلاف سایر روش‌ها احتیاج به فرایند پیچیده‌ای برای خالص‌سازی محصول ندارد، دارای بازدهی منطقی است و می‌تواند در مقیاس‌های بزرگ مورد بررسی قرار گیرد.

**کلمات کلیدی:** زیست دیزل، میکرو جلبک، سلول تثبیت شده، دونالیلا سالینا، ریزپوز اریزائی

### ۱- مقدمه

امواج و بادی، جلبک نیز می‌رود تا به صورت جدی جایگاه خود را به عنوان تولیدکننده زیست دیزل به دست آورد. زیست دیزل اخیراً توجه خاصی را به عنوان سوختی با آلودگی کم و تجدیدپذیر به خود جذب کرده است. تحقیقات فراوانی به منظور یافتن روش مناسب در تولید زیست دیزل در مقیاس وسیع انجام گرفته است. در بین منابع مختلف تولید زیست دیزل، جلبک به علت محتوای بالای چربی و رشد سریع توجه ویژه‌ای را به خود جذب کرده است [۱]. علاوه بر

بخش اعظم انرژی مصرفی در جهان از منابع فسیلی (نفت، زغال سنگ و گاز طبیعی) تأمین می‌شود. هرچند، منابع سوخت‌های فسیلی محدود هستند و در آینده‌ای نزدیک تمام خواهند شد. با کمک اختراعات و استفاده از روش‌های جدید، دنیا هر روز قدمی به عدم وابستگی به سوخت فسیلی نزدیک‌تر می‌شود. در کنار سایر منابع انرژی مانند راکتورهای اتمی، استفاده از انرژی‌های خورشیدی،

شده است که می‌تواند به کاهش قیمت تولید زیست دیزل منجر شود [۲].

بنابراین، در این تحقیق، امکان‌پذیری تولید زیست دیزل از روغن جلبک *دونالیلا سالینا*<sup>۴</sup> (تهیه شده در پژوهشگاه بیوتکنولوژی تبریز) و درصد تبدیل روغن به متیل استر با استفاده از فرایند آغشته کردن روغن جلبک به متانول در حضور سلول‌های تثبیت‌شده ریزوپوز / *ریزایی*<sup>۵</sup> (تهیه شده در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) بر روی قطعات پلی‌اورتان مورد بررسی قرار گرفته است. علاوه بر این، از آنجا که روغن جلبک، سیالیتی مشابه روغن جامد گیاهی دارد، افزایش سیالیت محیط واکنش برای افزایش بازدهی فرایند لازم است. برای رسیدن به این هدف، متانول و حلال نیز به محیط واکنش افزوده شد و اثرات آن بر بازدهی فرایند مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

تمام آزمایشها با استفاده از میکروارگانیزم رشته‌ای ریزوپوز *اریزایی* به عنوان کاتالیزگر انجام شد [۴-۶]. ابتدا میکروارگانیزم بر روی آگار دکستروز سیب‌زمینی به مدت ۷۲ ساعت رشد داده شد. برای تولید میکروارگانیزم تثبیت‌شده، قطعات پلی‌اورتان به ابعاد ۳×۶×۶ میلی‌متر مکعب و محیط پایه‌ای متشکل از ۷۰ گرم پلی‌پیتون، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم آبدار، ۱ گرم فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم، ۱ گرم نیترات سدیم و روغن زیتون در ۱ لیتر آب مقطر را به همراه میکروارگانیزم رشد یافته در داخل بشر می‌ریزند. در ابتدای واکنش محیط در pH ۵/۶ تنظیم گردید و مخلوط واکنش بر روی هم‌زن با نوسان ۱۵۰ دور بر دقیقه در دمای ۳۵°C به مدت ۹۰ ساعت قرار داده شد. پس از رشد کامل میکروارگانیزم‌ها بر روی قطعات پلی‌اورتان، پایه تثبیت شده توسط آب شیر و گلوکارآلدئید شستشو داده شد.

واکنش آغشته کردن به متانول در دمای ۳۰°C در بشری ۵۰ میلی‌لیتری، با قرار دادن بشر در هم‌زن با نوسان ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۷۲ ساعت انجام می‌شود. مخلوط واکنش در ابتدا شامل ۰/۹۶۵ گرم روغن جلبک، ۰/۰۳۵ گرم متانول (معادل ۱ مول برای

این، بعضی تحولات جدید در زمینه ساخت «نیروگاه‌های بدون نشرکربن» هنوز حرکت رو به جلو دارد. یکی از این مفاهیم، بهره‌گیری از انتشارات کربنی نیروگاه‌ها برای رشد جلبک است تا نهایتاً بتوان این جلبک‌ها را به انرژی تبدیل کرد. نتایج تحقیقات، بیانگر آن است که این روش باعث نصف شدن انتشار دی‌اکسید کربن خواهد شد.

بعد از استخراج روغن از جلبک، لازم است برای کاهش چگالی روغن آن فرایندی بر روی روغن جلبک انجام گردد. فرایند تولید زیست دیزل با کمک واکنش شیمیایی، ترانس‌استریفیکاسیون (تغییر استر) نامیده می‌شود. این واکنش، استرها را از زنجیره‌های طولانی اسیدهای چرب به آلکیل استر تبدیل می‌کند. فرایند ترانس-استریفیکاسیون تری‌گلیسریدهای موجود در انواع مختلف روغن، فرایندی جدید نیست. دافی<sup>۱</sup> و پاتریک<sup>۲</sup> در سال ۱۸۵۳ این فرایند را مورد استفاده قرار دادند. در حالی که استفاده از موتورهای دیزلی از سال ۱۸۹۳ هنگامی که مخترع آلمانی رودلف دیزل<sup>۳</sup> مقاله‌ای تحت عنوان "نظریه و ساخت ماشین‌های حرارتی منطقی" را منتشر کرد شروع شد. اساس ماشین طراحی شده توسط رودلف دیزل، استفاده از روغن گیاهی به عنوان سوخت بود [۲]. به طور شیمیایی، زیست دیزل‌ها اسیدهای چرب متیل استر هستند. معمولاً نوعی کاتالیزگر برای افزایش سرعت و بازدهی واکنش استفاده می‌شود. مواردی نظیر: نوع کاتالیزگر (باز، اسید یا آنزیم)، نسبت مولی الکل به روغن، دما، خلوص واکنش‌دهنده (به خصوص محتوای آب) و محتوای اسیدهای چرب آزاد بر روی فرایند استری شدن ترانس و محتوای متیل استر محصولات تأثیر گذار است [۳]. استری شدن ترانس سبب کاهش گرانی روغن می‌شود. اخیراً، استری شدن ترانس آنزیمی به علت بازدهی بالای واکنش و خالص‌سازی راحت محصولات، توجه ویژه‌ای را در تولید زیست دیزل به خود جلب کرده است. به طوری که جداسازی از گلیسرول تنها با کمک سانتریفیوژ امکان‌پذیر است. اما قیمت آنزیم یک عامل بازدارنده برای استفاده از آن در مقیاس تجاری است. به منظور کاهش قیمت فرایند به طور مؤثر، از تثبیت سلول تولید کننده لیپاز بر روی فوم پلی‌اورتان استفاده می‌شود. در این تحقیق از فارچ ریزوپوز / *اریزایی* برای تولید زیست دیزل استفاده

1. Scirtists E. Duffy
2. J. Patrick
3. Rudolph Diesel

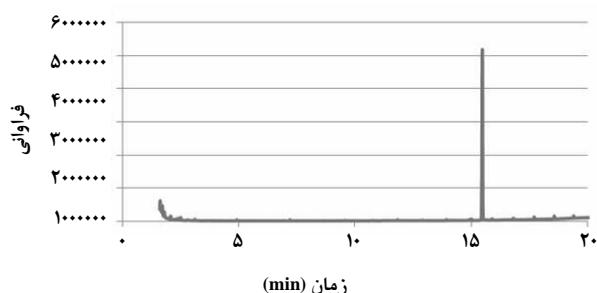
4. *Dunaliella salina*
5. *Rhizopus oryzae*

بتواند به عنوان سوخت مورد استفاده قرار گیرد باید تغییراتی به منظور کاهش چگالی و بهبود خواص آن بر روی روغن انجام گیرد. همان طور که قبلا اشاره شد یکی از روش های کاهش چگالی، استفاده از واکنش استری شدن ترانس است که تغییرات حاصل بر روی ترکیب روغن بر اثر این واکنش توسط سلول تثبیت شده به عنوان کاتالیزگر در نمودارهای زیر نمایش داده شده است. همان طور که به وضوح دیده می شود پس از انجام واکنش، زمان پیک نمودار کاهش می یابد که نشان دهنده وجود موادی با چگالی کمتر، ترکیبات متیل استر یا همان زیست دیزل، در محصول واکنش است. نتیجه واکنش استری شدن ترانس با نسبت مولی ۱:۱ (روغن/متانول) که درصد تبدیل واکنش ۵۸/۷۴٪ را می دهد در شکل (۲) نمایش داده شده است. همان طور که در بازه مشخص شده دیده می شود انواع ترکیبات متیل استر در محصول واکنش به وجود می آیند. در این حالت، برای جلوگیری از کاهش فعالیت آنزیم، متانول با نسبت مولی ۱:۱ به محیط واکنش اضافه شده است. هنگامی که متانول با نسبت مولی ۲:۱ (روغن/متانول) به محیط واکنش اضافه می شود، بازدهی واکنش به ۶۶/۶۷٪ افزایش می یابد (شکل (۳)). هنگامی که محیط واکنش از متانول اشباع می شود، بازدهی فرایند به ۹۰/۰۳٪ خواهد رسید. در این حالت، علی رغم اینکه بازدهی واکنش بالاست، به علت محدودیتی که در استفاده مجدد از آنزیم ایجاد می کند برای استفاده تجاری قابل استفاده نیست. وارد کردن حلال نرمال هگزان به محیط واکنش نیز مورد بررسی قرار گرفته است که سبب درصد تبدیل ۷۱/۹۷٪ اسیدهای چرب آزاد به ترکیبات متیل استر می شود که این ترکیبات در شکل (۵) نمایش داده شده است.

۰/۹۶۵ گرم روغن) و بین ۰ تا ۳ میلی لیتر محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۶/۸) و ۵۰ قطعه سلول تثبیت شده می باشد. لیکن حداقل ۳ مول متانول برای تبدیل کامل روغن به متیل استر لازم است. بنابراین ۰/۳۵ گرم متانول به ترتیب در بازه های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت به محیط واکنش اضافه شد. پس از تکمیل واکنش، زیست کاتالیزگر به وسیله صاف کردن از محیط واکنش جدا شد. نتیجه واکنش استری شدن ترانس، بازده تبدیل اسیدهای چرب آزاد به متیل استر، به وسیله دستگاه طیف سنج کروماتوگرافی (گازی/جرمی) تشخیص داده شد. دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد استفاده، ساخت کمپانی تکنولوژی آجیلنت<sup>۱</sup>، مدل 6890N، سیستم کروماتوگرافی شبکه ای<sup>۲</sup> و دستگاه جرمی مورد استفاده، مدل آشکارساز انتخابی جرمی شبکه ای<sup>۳</sup> ۵۹۷۳ از همان کمپانی ساخت کشور آمریکا بود. نمونه از داخل ستونی به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر عبور داده شد. در ابتدای فرایند، نمونه برای مدت ۲ دقیقه در دمای ۱۶۰°C می ماند. بعد از آن، دما با سرعت (۸°C/min) افزایش می یابد. سرانجام، نمونه برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰۰°C باقی می ماند. کل زمان آنالیز ۲۹/۵ دقیقه است. روغن جلبک، حالتی نیمه جامد دارد که برای افزایش بازدهی واکنش لازم است بر سیالیت محیط واکنش افزوده شود. برای رسیدن به این هدف می توان از متانول اضافی یا حلال به محیط واکنش استفاده کرد. علاوه بر میزان تبدیل با نسبت مولی ۱:۱ (متانول/روغن)، در ادامه تحقیق، نسبت مولی ۱:۲ (متانول/روغن)، واکنش با متانول اضافی و نیز با حلال اضافی، مورد بررسی قرار گرفت.

### ۳- بحث و نتیجه گیری

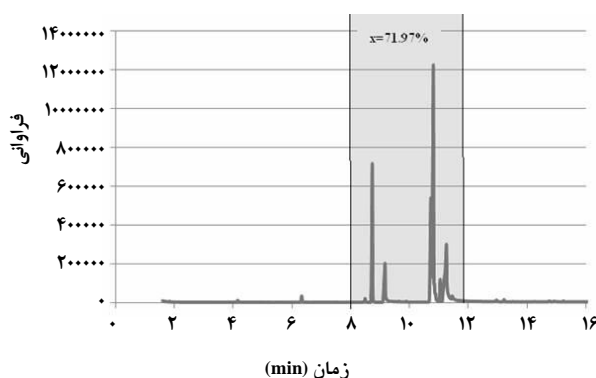
در نمودارهای زیر، نتایج واکنش های استری شدن ترانس که بر روی روغن جلبک *دونالیلا سالیئا* انجام شده است، مطابق فرایندی که در بخش قبل توضیح داده شد، نمایش داده شده است. در شکل (۱)، ترکیبات اولیه روغن نشان داده شده که عمده ترکیب آن اسیدهای چرب آزاد می باشد. چگالی روغن جلبک بسیار بالاست. برای اینکه



شکل ۱- محتویات روغن جلبک

1. Agilent Technology
2. Network Gc System
3. 5973 Network Mass Selective Detector

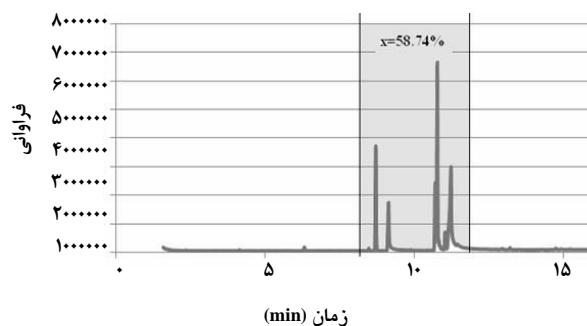
انوئیک اسید (اسید لینو لایدیک) در زمان ۱۰/۵ دقیقه می‌باشند. می‌توان مشاهده کرد که اضافه کردن متانول و حلال به محیط واکنش سبب افزایش بازدهی واکنش می‌گردد، و هرچه میزان متانول افزایش یابد، بازدهی واکنش نیز افزایش خواهد یافت. افزایش حلال نیز به محیط واکنش، سبب افزایش بازدهی واکنش خواهد شد. با توجه به اینکه متانول اضافی سبب از بین رفتن فعالیت آنزیم می‌شود، می‌توان نتیجه گرفت که اضافه کردن حلال که موجب افزایش بازده منطقی می‌شود و اثری در کاهش فعالیت آنزیم ندارد شیوه‌ای مطمئن برای استفاده در مقیاس تجاری است.



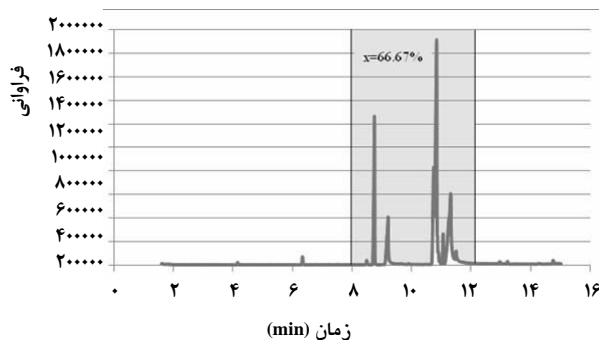
شکل ۵- نتیجه واکنش استری شدن ترانس با حلال اضافی

### مراجع

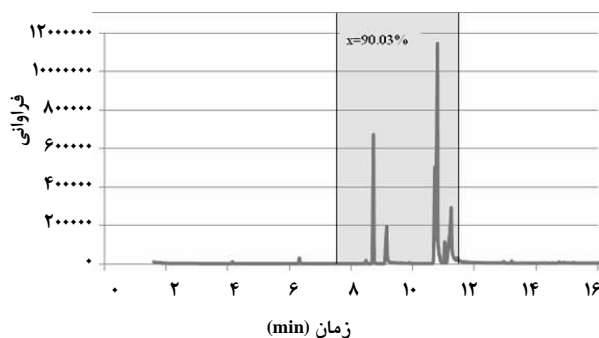
- [1] S. V.Ranganathan, S. L.Narasimhan, K.Muthukumar, "An overview of enzymatic production of biodiesel", *Bioresource Technology*, 99, 3975–3981, (2008).
- [2] M.Oda, M.Kaieda, S.Hama, H.Yamaji, A.Kondo, E.Izumoto, H.Fukuda, "Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production", *Biochemical Engineering*, 23, 45–51, (2005).
- [3] S.Okumura, M.Iwai, Y.Tsujisaka, "Positional specificities of four kinds of microbial lipases", *Agric. Biol. Chem.* 40, 655–660, (1976).
- [4] M.Matori, T.Asahara, Y.Ota, "Positional specificity of microbial lipases", *Ferment. Bioeng.*, 72, 397–398, (1991).
- [5] H.Schieb, J. Pleiss, P.Stadler, A.Kovac, A.P.Potthoff, L.Haalck, F.Spender, F.Paltauf, R.D.Schmid, "Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward *triradylglycerols*", *Protein Eng.*, 11, 675–682, (1998).
- [6] K.Ban, S.Hama, K.Nishizuka, M.Kaieda, T.Matsumoto, A.Kondo, H.Noda, H.Fukuda, "Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production", *Mol. Catal. B: Enzymatic*, 17, 157–165, (2002).



شکل ۲- نتیجه واکنش استری شدن ترانس با نسبت مولی ۱:۱ (روغن/ متانول)



شکل ۳- نتیجه واکنش استری شدن ترانس با نسبت مولی ۲:۱ (روغن/ متانول)



شکل ۴- نتیجه واکنش استری شدن ترانس با متانول اضافی

در شکل (۱) پیک نمایش داده شده مربوط به ۸۰/۷ بیس فتالات (۲-اتیل هگزیل) در روغن جلبک *دونالیلا سالینا* می‌باشد. در شکل‌های (۳)، (۴) و (۵) دو پیک بزرگ به ترتیب مربوط به فراوانی متیل استر هگزادسنوئیک اسید (اسید پالمیتوئیک) و متیل استر هگزادکانوئیک اسید (اسید پالمیتیک) در زمان ۸/۵ دقیقه و متیل استر اکتا دسنوئیک اسید (اسید اولئیک) و متیل استر اکتا دکا دی

1. Bis (2-Ethylhexyl) Phthalate