تولید ناپیوسته لیپید با استفاده از مخمر مولد لیپید *Rhodosporidium diobovatum* و محاسبه خصوصیات فیزیکی بیودیزل تولیدی با استفاده از پروفایل اسیدهای چرب

نیما نصیریان

استادیار گروه مهندسی مکانیزاسیون کشاورزی و بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۰۷

پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۷/۱۹

کلمات کلیدی:

مخمر مولد لیپید،

بیودیزل،

Rhodosporidium diobovatum،

تری گلیسیرید،

اسید چرب،

خواص فیزیکی سوخت

عهده دار مکاتبات:

Email: nima.nasirian@gmail.com

چکیده

در این پژوهش، رشد، تولید لیپید و راندمان مصرف منبع کربن به وسیله مخمر مولد لیپید *Rhodosporidium diobovatum* در محیط کشت با نیتروژن محدود با استفاده از دکستروز (۲۱۷ و ٤٣٤ میلی‌مولار) و گلیسرول به عنوان منابع کربن مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین مشخصات فیزیکی بیودیزل حاصل از لیپید تولیدی با دیگر انواع بیودیزل، سوخت دیزل و استانداردهای معتبر مقایسه و تجزیه و تحلیل گردید. محیط‌های کشت حاوی دکستروز و گلیسرول بیوماس تقریباً یکسانی تولید کردند؛ اما پس از ٥ روز محیط کشت حاوی ٤٣٤ میلی‌مولار دکستروز محتوای لیپید بیشتری (حدود ٤٩ درصد از وزن خشک سلولی) نسبت به دیگر منابع تولید نمود. ترکیبات اسیدهای چرب تولیدی توسط *R. diobovtum* در غلظت‌های متفاوت گلوکز و گلیسرول به طور عمده شامل اسید پالمیتیک (C16:0)، اسید اولئیک (C18:1) و اسید لینولئیک (C18:2) بودند؛ همچنین با توجه به ترکیبات اسیدهای چرب موجود در لیپید تولیدی توسط مخمر مولد لیپید، خصوصیات فیزیکی سوخت زیستی حاصل از آن شامل ویسکوزیته، وزن مخصوص، نقطه ابری، عدد ستان، عدد یدی و ارزش حرارتی بیشینه همگی در محدوده استانداردهای بین‌المللی قرار داشته و مشابهت آن‌ها با دیگر منابع تولید بیودیزل مانند دانه‌های روغنی و چربی‌های حیوانی، قابلیت بالای این نوع مخمر برای تولید سوخت و روغن مغذی در مقیاس‌های تجاری را نوید می‌دهد.

مقدمه

مصرف جهانی انرژی به دلایل رشد جمعیتی، توسعه اقتصادی، ارتقاء سطح استاندارد و رفاه زندگی و مکانیزاسیون افزایش چشمگیری داشته است (۲۱). استفاده از سوخت‌های فسیلی در دهه گذشته برای تأمین نیاز روزافزون جهانی انرژی موجب مشکلات جدی زیست‌محیطی، اقتصادی و انرژی مانند: افزایش گرمای زمین، تغییرات اقلیمی، آلودگی‌های محیطی (به مخاطره افتادن سلامت انسان‌ها، جانوران و گیاهان)، افزایش قیمت نفت، کاهش ذخایر متداول انرژی و محدودیت

دسترسی به منابع انرژی شده و رویکرد جهانی به منابع جایگزین انرژی را به یک ضرورت تبدیل کرده است (۲۴).

بیوانرژی در سال‌های اخیر، به دلیل قابلیت استفاده از منابع برگشت‌پذیر در سراسر گیتی و امکان کاربرد آن از دیدگاه فنی مورد توجه بسیار قرار گرفته است (۱۷). از میان انواع انرژی‌های زیستی موجود، بیودیزل به عنوان یک منبع برگشت‌پذیر و پایدار انرژی شناخته می‌شود که علاوه بر غیرسمی بودن و نداشتن ترکیبات گوگردی و معطر، به دلیل مشخصات مطلوب احتراقی، می تواند بدون تغیرات اساسی در ساختار و طراحی موتورهای دیزلی و بویلرهای معمول مورد استفاده قرار گیرد (۲۳).

پیرو مزایای بسیار تولید و کاربرد این نوع سوخت جایگزین، تولید سالانه بیودیزل در جهان از ۲/۴ میلیارد لیتر در سال ۲۰۰۴ با یک رشد نمایی به ۲۹/۷ میلیارد لیتر در سال ۲۰۱۴رسید (۱۹). با وجود نیاز و استقبال جهانی از این افزایش تولید، محدودیت‌هایی در استفاده از منابع اولیه مورد استفاده در صنایع زیستی تولید کننده بیودیزل به دلیل رقابت و کاربرد این منابع با صنایع غذایی وجود دارد. در حال حاضر بخش عمده‌ای از بیودیزل موجود در بازار از روغن‌های گیاهی که همگی کاربرد خوراکی دارند، تولید می‌گردد (۱۲،۱۳). از میان دانه‌های روغنی، کلزا، آفتاب‌گردان و خرما به ترتیب با ۸۴، ۱۳ و ۱ درصد و دیگر دانه‌های روغنی به همراه سویا حدود ۲ درصد از سهم بازار را به خود اختصاص داده‌اند (۱)؛ اما در سال‌های اخیر رویکرد استفاده از ریزجلبک‌ها و میکروارگانیسم‌های مولد لیپید به منظور تولید بیودیزل به عنوان یک منبع جایگزین غیرخوراکی مورد توجه فراوان قرار گرفته است.

به لیپیدهای خنثی یا تری‌آسیل‌گلیسرول[1]ها (TAGs) که به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها مانند ریزجلبک‌ها و مخمرهای مولد لیپید تولید می‌شوند، تک سلول لیپیدی[2] (SCO) می‌گویند. با وجود این‌که گونه‌های بسیاری از انواع مخمرها قابلیت تولید تک سلول لیپیدی را دارند، تنها گونه‌های کمی از میان آن‌ها قابلیت ذخیره لیپید بیشتر از ۲۰ درصد وزن سلولی خود را دارا می‌باشند که به آن‌ها مخمرهای مولد لیپید[3] می‌گویند (۲). استفاده از این نوع میکروارگانیسم‌ها برای تولید روغن میکروبی، علاوه بر دارا بودن ترکیب و محتوای انرژی مشابه با روغن‌های گیاهی و سایر منابع مانند چربی‌های حیوانی و جلبک‌ها، دارای مزایای فراوان دیگری مانند توانایی مصرف گستره فراوان و ارزان مواد اولیه مانند پسماندها، نیاز به کارگر کمتر، عدم تأثیرپذیری از تغییرات فصلی و اقلیمی و راحت‌تر بودن افزایش مقیاس تولید آن‌ها، می‌باشد (۱۳). از میان مخمرهای مولد لیپید میزان لیپید گونه‌های *Yarrowia* (*Y.*)، *Candida*، *Rhodoturula* (*Rd.*)، *Rhodosporidium* (*R.*)، *Cryptococus*، *Lipomyces* و *Thrichosporon* بیش از سایر گونه‌ها مورد تحقیق و آزمایش قرار گرفته‌اند (۲۶). برخی از این گونه‌ها (مانند *Lipomyces*، *Rhodoturula* و *Rhodosporidium*) قابلیت تجمع لیپید حتی تا بیش از ۷۰ درصد وزن خشک سلولی خود را دارا می‌باشند که تقریباً بیش از ۹۰ درصد (وزنی/وزنی) آن را تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها تشکیل می‌دهند (۱۴). اگرچه تجمع لیپید و ساختار اسیدهای چرب در گونه‌های مختلف و شرایط رشد متفاوت تحت تأثیر قرار می‌گیرد؛ اما در اغلب موارد اسیدهای چرب موجود در مخمرهای مولد لیپید در طیف‌های C_{16} و C_{18} ساخته می‌شوند که برای استفاده در تولید بیودیزل بسیار مناسب می‌باشند (۱۴،۲).

اخیراً سایتپو و همکاران[4] (۲۳) بررسی جامعی بر مخمرهای مولد لیپید انجام داده‌اند و گونه‌هایی را که

1- Triacylglycerol

2- Single cell oil
3- Oleaginous yeast
4- Sitepu *et al*.

توانایی تولید لیپید بالایی دارند، را ازمیان ۶۹ گونه شناخته شده و جدید معرفی نموده‌اند. از میان نتایج اعلام شده، مخمر مولد لیپید *R. diobovatum* به عنوان یکی از پربازده‌ترین گونه‌ها معرفی گردید. تاکنون تحقیقات زیادی در مورد انواع گونه‌های مخمر مانند *Yarrowia lipolytica*، *Rhodosporidium toruloids*، *Rhodosporidium graminis*، و *Rhodotorula glutinis*، *Cryptococus curvatus* انجام شده است (۵،۶،۲۰،۲۲،۲۶،۲۸)؛ اما تا آنجایی که مرور منابع اجازه می‌دهد، می‌توان گفت تحقیق حاضر اولین بررسی جامع انجام شده بر روی این گونه مخمر است که چگونگی و خصوصیات لیپید تولیدی را به منظور تولید بیودیزل مورد تجزیه و تحلیل قرار می دهد.

در این پژوهش توانایی تولید لیپید توسط گونه *R. diobovatum* که تاکنون تحقیقات اندکی در مورد آن انجام شده، با استفاده از سوبستراهای گلوکز (با دو غلظت ۲۱۷ و ۴۳۴ میلی مولار) و گلیسرول (۴۳۴ میلی‌مولار) مورد بررسی قرار گرفته است. هم‌چنین با استخراج ساختار مولکولی و نوع متیل استر اسیدهای چرب موجود در آن‌ها، خصوصیات بیودیزل تولیدی پیش‌بینی و با استانداردهای موجود و سایر انواع حاصل از دانه‌های روغنی و ریزجلبک‌ها مقایسه شده است.

مواد و روش ها

میکروارگانیسم، محیط کشت و شرایط رشد

سویه مخمر *Rhodospiridium diobovatum* (۲۲۵-۰۸) از مرکز جمع‌آوری مخمر Phaff واقع در دانشگاه دیویس کالیفرنیا تهیه گردید. سویه مورد نظر در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و محیط کشت YPD شامل ۲۰g/L دکستروز، ۱۰ g/L عصاره مخمر، ۲۰g/L پپتون و ۱۵ g/L آگار رشد داد و در ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید. پس از دو روز رشد دادن میکروارگانیسم های نگهداری شده بر محیط YPD و دوبار کشت مجدد آن‌ها در آگار پلیت YPD تازه، یکی از تک کلنی های مخمر قابل رؤیت به یک فلاسک ارلن مایر مخصوص محیط‌های کشت هوازی (Baffled erlenmeyer flask) حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط پیش تولید با محدودیت نیتروژن GMY متشکل از ۳ g/L عصاره مخمر، ۶ g/L KH_2PO_4، ۰/۵ g/L $MgSO_4.7H_2O$ و ۴۰ g/L دکستروز منتقل گردید. اسیدیته این محیط پیش تولید در مقدار ۵/۵ تنظیم و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۵۰ rpm در یک انکوباتور شیکردار قرار داده شد.

پس از ۲۴ ساعت مقدار لازم از محیط پیش تولید حاوی مخمر رشد داده شده برای رسیدن به دانسیته نوری اولیه ۰/۰۲ در طول موج ۶۰۰ nm (OD_{600}) به ارلن مایرهای ۱۰۰۰ لیتری حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت GMY انتقال داده شد. دانسیته نوری توسط اسپکتروفوتومتر مدل Thermo Fisher Biomate 3 (CAT335905) اندازه‌گیری گردید.

روند انجام آزمایش و نمونه‌برداری

مقدار لازم از محیط پیش تولید از *R. dibovatum* برای رسیدن به دانسیته نوری ۰/۰۲ به هر کدام از فلاسک‌های ۱ لیتری حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت GMY انتقال داده شد. آزمایش‌ها حاوی ۴۳۴ و ۲۱۷ میلی‌مولار دکستروز و ۴۳۴ میلی مولار گلیسرول در ۳ تکرار انجام گردید. شرایط محیطی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، اسیدیته ۵/۵ و ۱۵۰ دور بر دقیقه تنظیم، و نمونه برداری از محیط کشت به منظور تعیین رشد بیومس سلولی، روند مصرف گلوکز، غلظت یون آمونیوم در ۳۰ ساعت ابتدایی هر ۶ ساعت و پس از آن در زمان‌های ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ صورت گرفت. به منظور بررسی مقدار لیپید تولیدی و پروفایل اسیدهای چرب، هر ۲۴ ساعت نمونه‌برداری انجام گرفت.

روند رشد میکروارگانیسم‌ها با اندازه‌گیری دانسیته نوری توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ nm (OD_{600}) و کشیدن نمودار حاصل با مقیاس لگاریتمی

محاسبه گردید. به منظور بررسی وزن خشک سلولی، میزان گلوکز و آمونیوم مصرف شده توسط میکروارگانیسم، نمونه‌ها با استفاده از سانتریفوژ مدل RC6 با روتور Sorvall SH-3000BK (Thermo Scientific, USA) در ۲۵۰۰ x g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و سوپرناتنت‌ها از سلول‌ها جدا و برای بررسی‌های بعدی در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. سلول‌ها پس از دوبار شستشو با آب دیونیزه و سانتریفوژ دوباره و ریختن آب از روی سلول‌ها، در ۶۰ درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند. پروسه بالا برای نمونه‌های بررسی لیپید و اسیدهای چرب نیز انجام گردید و سلول‌ها از سوپرناتنت جدا و تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند.

روش‌های آزمون و آنالیز

غلظت‌های یون آمونیوم در مدیا مطابق روش A-۱-۰۶-۱۰۷-۱۰ با استفاده از دستگاه Lachat Quick Chem 8500 (اونتاریو، کانادا) اندازه‌گیری شد و داده‌ها با نرم‌افزار Omnion مورد پردازش قرار گرفتند.

غلظت دکستروز و گلیسرول در هر نمونه‌گیری به‌وسیله دستگاه Waters Breeze HPLC مجهز به ستون کروماتوگرافی مدل HPX-87H Ion Exclusion 300 mm × 7.8 mm (در دمای ۴۰ درجه سلسیوس) و فاز متحرک اسید سولفوریک ۵ میلی‌مولار با نرخ جریان ۰/۶ mL/min اندازه‌گیری گردید. داده‌ها با نرم‌افزار Breeze 2 (Waters) پردازش شدند.

استخراج و ترانس‌استریفیکاسیون اسیدهای چرب مطابق روش اصلاح شده بلای و دایر[1] به صورت زیر انجام گرفت (۳): مقدار ۱۰ الی ۲۰ میلی‌گرم از سلول‌های خشک شده جدا و دورن لوله آزمایش قرار داده، سپس ۲ میلی‌لیتر محلول ۱۵ درصد متانول در اسید سولفوریک به همراه ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ mg/mL اسید متیل هپتادیکانوئیک (استاندارد داخلی) در کلروفرم به آن‌ها اضافه و به مدت ۵ ساعت جوشانده شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه و پس از یک شب نگهداری در دمای محیط، مقدار ۱ میلی‌لیتر از لایه زیرین که حاوی متیل استر اسیدهای چرب (FAME) در کلروفرم است را برای آنالیز جدا گردید. متیل‌استر اسیدهای چرب به روش کروماتوگرافی گازی با استفاده از دستگاه Agilent 7890A gas chromatograph (GC) مجهز به محفظه تزریق مدل split-splitless injector و ردیاب نوع FID انجام گرفت. جداسازی نهایی مولکول‌ها به وسیله یک ستون کروماتوگرافی DB-23 با مشخصات 30m × 320 µm × 0.25 µm; Agilent, California, USA صورت پذیرفت. از هلیم با نرخ جریان ۱/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده گردید. دمای آون به مدت ۴ دقیقه در ۷۵ درجه سلسیوس نگهداری و سپس با نرخ ۲۰ درجه سلسیوس بر دقیقه به دمای نهایی ۲۵۰ درجه سلسیوس رسیده و ۴ دقیقه در این دما باقی ماند. به منظور تشخیص پیک‌ها و تفکیک اسیدهای چرب مختلف از یک ترکیب استاندارد حاوی ۳۷ نوع اسید چرب (Sigma-Aldrich) استفاده گردید.

برآورد خواص سوخت بیودیزل براساس مشخصات متیل استر اسیدهای چرب

پارامترهایی که کیفیت سوخت بیودیزل را برآورد می کنند، مانند عدد ستان[2] (CN)، ارزش یدی[3] (IV)، نقطه انسداد فیلتر[4] (CFPP)، میزان صابونی شدن (SV)، لزجت[5]، وزن مخصوص[6]، نقطه ابری[7] و ارزش حرارتی بیشینه (HHV) به ساختار مولکولی متیل استر اسیدهای چرب (FAME) موجود در آن بسیار وابسته می‌باشند. این ساختار مولکولی با توجه به طول زنجیره

1- Bligh and Dyer

2- Cetane number
3- Iodine value
4- Cold filter plugging point
5- Kinematic viscosity
6- Specific gravity
7- Cloud point

کربنی، هم‌چنین تعداد و موقعیت پیوندهای دوگانه موجود، می‌تواند بسیار متفاوت باشد.

با توجه به توضیحات بالا، پس از آنالیز و استخراج مشخصات اسیدهای چرب تولیدی توسط کروماتوگرافی گازی، ساختار مولکولی، مقدار و نوع اسیدهای چرب به دست آمده به منظور برآورد خواص سوختی لیپید تولیدی به‌وسیله مخمر، مورد استفاده قرار گرفت. این خواص سوختی (عدد ستان، عدد یدی، CFPP، عدد صابونی) با روابط ارائه شده در منابع معتبر مورد محاسبه قرار گرفتند (۱۸،۱۶). به شکل خلاصه، عدد ستان با مقادیر به‌دست آمده برای عدد یدی (رابطه مستقیم با درجه غیراشباع بودن[1] (DU) و تعداد پیوندهای دوگانه روغن دارد) و عدد صابونی (رابطه معکوس با وزن مولکولی استر اسیدهای چرب دارد) محاسبه گردید (معادلات ۱، ۲ و ۳). پارامتر P درصد وزنی هر FAME در ترکیب، پارامتر M جرم مولکولی هر FAME، و پارامتر D، تعداد پیوندهای دوگانه موجود در هر FAME می‌باشند. مقدار CFPP (معادله ۴) با استفاده از پارامتری به نام طول زنجیره اشباع[2] (LCSF) که با زنجیره‌های اسید چرب اشباع و طول آن‌ها مرتبط می‌باشد، محاسبه گردید. مقدار LCSF از مجموع حاصل‌ضرب اعداد ثابت ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ به‌ترتیب در درصد وزنی زنجیره‌های اشباع موجود در روغن تولیدی (C16، C18، C20، C22، و C24) برآورد شد؛ همچنین درجه غیراشباع (DU) با استفاده از مقدار اسیدهای چرب تک اشباع (MUFA) و اسیدهای چرب چند اشباع (PUFA) موجود در لیپید تولیدی توسط مخمر به دست آمد (معادله ۵).

$$CN = 46.3 + \left(\frac{5458}{SV}\right) - (0.225 \times IV) \quad (۱)$$

$$SV = \sum (560 \times P)/M \quad (۲)$$

$$IV = \sum (254 \times DP)/M \quad (۳)$$

$$CFPP = (3.1417 \times LCSF) - 16.477 \quad (۴)$$

$$DU = MUFA + (2 \times PUFA) \quad (۵)$$

سایر خواص سوخت زیستی (لزجت (μ)، وزن مخصوص (SG)، نقطه ابری (CP) و ارزش حرارتی بیشینه (HHV)) مورد نظر با معادلات ارائه شده توسط کنت‌هاکمن و همکاران[3] (۶) محاسبه گردیدند. معادلات ارائه شده همگی بر اساس میانگین غیراشباع بودن[4] (AU) سوخت با توجه به پروفایل اسیدهای چرب موجود در لیپید تولیدی برآورد شدند (معادله ۶). این رابطه از مجموع حاصل‌ضرب تعداد پیوندهای دوگانه هر اسید چرب غیر اشباع (N) در غلظت (C_i، جزء جرمی) آن در کل لیپید تولیدی توسط مخمر به‌دست آمد. سپس هر کدام از خواص نامبرده شده به‌وسیله معادلات ۷ (لزجت)، ۸ (وزن مخصوص)، ۹ (نقطه ابری) و ۱۰ (ارزش حرارتی بیشینه) محاسبه شدند.

$$AU = \sum N \times C_i \quad (۶)$$

$$\mu = -0.6316\, AU + 5.2065 \quad (۷)$$

$$SG = 0.0055\, AU + 0.8726 \quad (۸)$$

$$CP = -13.356\, AU + 19.994 \quad (۹)$$

$$HHV = 1.7601\, AU + 38.534 \quad (۱۰)$$

نتایج و بحث

این تحقیق به منظور بررسی چگونگی تولید لیپید از دکستروز (۴۳۴ میلی‌مولار یا ۷۸/۲۵ گرم بر لیتر و ۲۱۷ میلی‌مولار یا حدود ۴۰ گرم بر لیتر) و گلیسرول (۴۳۴ میلی‌مولار یا ۴۰ گرم بر لیتر) و محاسبه خواص بیودیزل تولیدی با استفاده از پروفایل اسیدهای چرب تولیدی در آن‌ها انجام گردید. هم‌چنین مقایسه این خصوصیات با دیگر انواع روغن‌های گیاهی، چربی‌های حیوانی، ریزجلبک‌ها و مخمرهای مولد لیپید انجام شده است.

1- Degree of unsaturation
2- Long-chain saturated factor
3- Kent Hoekman *et al.*
4- Average unsaturation

رشد سلولی و تولید لیپید

همانطور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، تولید وزن خشک سلولی در سوبستراهای مختلف اختلاف معنی‌داری نداشته‌اند. محیط کشت *R. diobovatum* حاوی ۴۳۴ و ۲۱۷ میلی مولار دکستروز به ترتیب ۱۰/۲۴±۰/۲۵ و ۱۰/۶۵±۰/۱۱ گرم بر لیتر بیوماس تولید کردند، و ۱۰/۶۰±۰/۳۹ گرم بر لیتر در محیط‌های حاوی گلیسرول تولید شد. اما همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، محدود نبودن منبع کربن باعث بیشتر شدن محتوای لیپید در محیط‌های حاوی ۴۳۴ میلی‌مولار دکستروز (حدود ۴۹ درصد از وزن خشک سلولی) گردید. در مقابل حدود ۴۶ و ۴۴ درصد لیپید از وزن خشک سلولی به ترتیب در ۲۱۷ میلی‌مولار دکستروز و ۴۳۴ میلی‌مولار گلیسرول تولید شد؛ همچنین بهره‌وری لیپید و بازده تولید لیپید از کربن در ۴۳۴ میلی‌مولار دکستروز با اختلاف معنی‌داری از بقیه بیشتر بود. به منظور بررسی دلایل افزایش محتوای لیپید و در نتیجه بهره‌وری و بازده بیشتر در محیط کشت حاوی ۴۳۴ میلی‌مولار دکستروز، روند مصرف دکستروز و گلیسرول و سهم تولید لیپید متقابل آن‌ها در هر روز محاسبه و تجزیه و تحلیل گردید (جدول ۲). با وجود این‌که میانگین مصرف گلوکز در ۲۱۷ میلی‌مولار (۷/۵ گرم بر روز) بیشتر از معادل آن در ۴۳۴ میلی‌مولار دکستروز (۶/۹۹ گرم بر روز) بود؛ اما کاهش مقدار دکستروز در محیط کشت در روز چهارم باعث کاهش چشمگیر لیپید تولیدی در آن گردید. به طوری‌که سهم تولید لیپید در روز آخر از کل تولید تنها ۵/۱۳ درصد بود؛ در حالی‌که مقدار معادل آن در محیط حاوی ۴۳۴ میلی‌مولار دکستروز به بیش از ۳۶ درصد از کل میزان تولید لیپید در طی ۵ روز رسید. میزان مصرف تنها ۱/۹۲ گرم بر لیتر دکستروز در مقابل ۸/۱۱ گرم بر لیتر از آن شاهدی برای این کاهش تولید می‌باشد. میزان مصرف تقریباً نزدیک گلیسرول در روزهای مختلف موجب تولید حدوداً یکسان لیپید در هر روز گردید. روند تولید بالاتر لیپید در ۳ روز اول در ۲۱۷ میلی‌مولار دکستروز نشان‌دهنده مصرف آسان‌تر آن نسبت به گلیسرول توسط مخمر *R. diobovatum* می‌باشد. هم‌چنین می‌توان استنتاج کرد که غلظت پایین‌تر دکستروز می تواند بازده لیپید بالاتری را نتیجه دهد.

پروفایل اسیدهای چرب تولیدی

ترکیبات اسیدهای چرب تولیدی توسط *R. diobovatum* در غلظت‌های متفاوت گلوکز و گلیسرول به طور عمده شامل اسید پالمیتیک (C16:0)،

جدول(۱) وزن خشک سلولی، محتوای لیپید، بهره‌وری لیپید و بازده لیپید نسبت به مقدار کربن اولیه
Table(1) Dry cell weight, Lipid content, Lipid productivity and lipid coefficient

سوبسترا Substrate	وزن خشک سلولی Dry cell weight	محتوای لیپید Lipid content	بهره‌وری لیپید Lipid productivity	بازده لیپید به کربن Lipid coefficient
	g/L	% dcw	g/L/h	g/g
گلوکز (۴۳۴ میلی‌مولار) (Dextrose)	10.24 ± 0.25^{b}	49.49 ± 0.89^{a}	0.057 ± 0.001^{a}	0.495 ± 0.05^{a}
گلوکز (۲۱۷ میلی‌مولار) (Dextrose)	10.65 ± 0.11^{a}	46.29 ± 0.92^{b}	0.053 ± 0.005^{b}	0.430 ± 0.1^{b}
گلیسرول (۴۳۴ میلی‌مولار) (Glycerol)	10.60 ± 0.39^{a}	44.57 ± 0.49^{b}	0.050 ± 0.004^{b}	0.455 ± 0.03^{ab}

جدول(۲) میزان مصرف روزانه سوبسترا و سهم تولید لیپید

Table(2) Substrate consumption rate and lipid synthesis percentage at different time-point

زمان (Time) (h)	سهم تولید لیپید در هر روز (٪) Daily lipid synthesis			میزان مصرف سوبسترا (g/L) Substrate consumption		
پس از تلقیح post) (inoculation	دکستروز (Dextrose) (۷۸/۲۵ گرم بر لیتر)	دکستروز (Dextrose) (۴۰ گرم بر لیتر)	گلیسرول (Glycerol) (۴۰ گرم بر لیتر)	دکستروز (Dextrose) (۷۸/۲۵ گرم بر لیتر)	دکستروز (Dextrose) (۴۰ گرم بر لیتر)	گلیسرول (Glycerol) (۴۰ گرم بر لیتر)
0	0	0	0	0	0	0
24	7.51	8.62	4.63	7.10	6.89	5.81
48	20.13	28.79	22.26	8.28	10.24	8.54
72	18.52	38.37	28.26	6.35	9.14	4.22
96	17.80	19.06	19.63	5.12	9.29	7.62
120	36.01	5.13	25.19	8.11	1.92	7.71
جمع	100	100	100	34.98	37.50	33.92

اسید اولئیک (C18:1) و اسید لینولئیک (C18:2) بودند (جدول ۳). این روند در سایر تحقیقات انجام شده با مخمرهای متفاوت مانند *R. babjavae*، *Y. Lipolytica*، *R. toruloids*، *Rd. graminis*، و *Rd. glutinis* به صورت مشابه وجود دارد. هم‌چنین اسیدهای چرب ذکر شده به‌علاوه اسید استیریک (C18:0)، اسید گاما-لینولنیک (C18:3ω6) در تمامی مخمرهای مولد لیپید بیش از ۸۵ درصد ترکیب پروفایل اسیدهای چرب تولیدی را به خود اختصاص داده‌اند. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، این پروفایل بسیار مشابه ترکیب اسیدهای چرب موجود در دانه‌های روغنی و چربی‌های حیوانی می‌باشد که بیش از ۹۰ درصد اسیدهای چرب موجود در پروفایل آن‌ها نیز حاوی ۵ اسید چرب ذکر شده است. این روند مشابه با کمی تفاوت در ریزجلبک‌ها نیز دیده می‌شود. تنها تفاوت، وجود مقادیر بیشتر اسید آلفا-لینولنیک (C18:3ω3) به جای اسید لینولئیک می‌باشد. در لیپید تولیدی توسط *R. diobovatum* و تمامی تحقیقات نامبرده شده، مخمرهای مولد لیپید، درصد اسید اولئیک بیش از سایر اسیدهای چرب موجود در پروفایل بوده است، که ارزش لیپید آن‌ها را از دیدگاه سوختی و غذایی دوچندان می‌کند.

سایر اسیدهای چرب موجود در ترکیب لیپید تولیدی (کمتر از ۱۰ درصد کل پروفایل را تشکیل دادند) شامل اسید تریدسیلیک (C13:0)، اسید پالمیتولئیک (C16:1)، اسید آراکدیک (C20:0) و اسید لیگنوسریک (C24:0) بودند. همچنین کمتر از یک درصد هم اسیدهای چرب دیگر بودند که توسط گاز کروماتوگرافی تشخیص داده شدند.

برآورد خصوصیات سوخت زیستی با استفاده از پروفایل اسیدهای چرب

اندازه‌گیری خصوصیات سوخت زیستی نیاز به مقدار قابل توجهی از روغن حاصل از منبع تولید لیپید و تجهیزات تخصصی برای استخراج آن دارد. به‌تازگی به منظور غلبه بر این محدودیت‌ها، معادلات پیش‌بینی با اعتمادپذیری قابل قبولی با توجه به پروفایل اسیدهای چرب تشکیل دهنده لیپید تولیدی توسط پژوهشگران ارائه شده است (۱۶،۹،۷). در این تحقیق از معادلات گزارش شده توسط ناسیمنتو و همکاران[1] (۱۶) و کنت‌هوکمن و همکاران (۷) استفاده گردیده است. همان‌طور که در جدول ۴ ملاحظه می‌شود، با توجه به ترکیبات اسیدهای چرب موجود در لیپید تولیدی توسط

1- Nascimento *et al*.

جدول(۳) ترکیب اسیدهای چرب در منابع متفاوت تولید کننده لیپید

Table(3) Fatty acid composition by different lipid production sources

منبع (Reference)	مجموع (Sum)	اسید چرب (Fatty acid)						منبع لیپید (Lipid source)
-	%	C18:3ω3	C18:3ω6	C18:2	C18:1	C18:0	C16:0	-
					مخمر (Yeast)			
This work	89.2		0.1	9.7	39.6	3.3	36.5	R. diobovatum (Glucose 78 g/L)
This work	91.0		0.2	13.2	44.7	2.1	30.9	R. diobovatum (Glucose 40 g/L)
This work	90.4		0.4	19.7	35.3	5.2	29.7	R. diobovatum (Glycerol 40 g/L)
15	90.0		3.0	20.0	33.0	6.0	28.0	R. diobovatum (Glycerol 40 g/L)
15	90.0		5.0	16.0	38.0	7.0	24.0	R. babjavae (Glycerol 40 g/L)
15	85.0			10.0	55.0	9.0	11.0	Y. lipolytica (Glycerol 40 g/L)
22	90.0			15.0	47.0	10.0	18.0	Y. lipolytica (Glycerol 40 g/L)
27	97.7		2.0	10.0	42.0	15.0	28.7	R. toruloides (Glycerol 50 g/L)
27	98.5		3.8	9.2	46.4	13.0	26.1	R. toruloides (Glucose 50 g/L)
6	92.0		2.0	20.0	43.0	7.0	20.0	Rd. graminis (Glycerol 50 g/L)
6	96.6		2.0	15.5	53.5	2.7	22.9	Rd. graminis (Glucose 50 g/L)
					ریز جلبک (Microalgae)			
16	85.9	26.5	0.4	2.0	24.1	2.7	30.2	Ankistrodesmus falcatus
16	86.6	26.3	0.2	12.2	18.8	2.1	27.0	Ankistrodesmus fusiformis
16	90.0	39.7	0.0	4.5	18.5	2.0	25.3	Kirchneriella lunaris
16	92.5	0.0	11.1	8.6	44.3	2.9	25.7	Coelastrum microporum
16	94.8	8.5	1.0	12.0	42.4	3.3	27.6	Desmodesmus brasiliensis
16	88.4	0.0	2.8	4.6	21.5	7.5	52.1	Scenedesmus obliquus
16	94.4	9.3	0.6	7.5	46.2	2.9	28.0	Pseudokirchneriella subcapit.
16	87.7	1.6	0.0	8.5	29.3	8.0	40.3	Chlorella vulgaris
16	95.6	5.3	0.0	5.2	76.3	1.6	7.2	Botryococcus braunii
16	90.3	7.2	0.0	5.0	39.7	3.1	35.2	Botryococcus terribilis
					دانه روغنی (Vegetable oil)			
7	97.4		9.6	21.2	60.4	2.0	4.2	Canola (کانولا)
7	99.3		0.6	58.7	26.6	1.9	11.5	Corn (ذرت)
7	97.9		0.3	36.2	40.4	6.1	14.9	Jatropha (جاتروفا)
7	97.8		0.3	9.5	41.3	4.2	42.5	Palm (نخل)
7	95.2		8.4	21.5	59.5	1.6	4.2	Rapeseed (کلزا)
7	99.3		0.1	74.3	14.2	2.5	8.2	Safflower (گلرنگ)
7	98.9		5.9	53.8	23.7	3.9	11.6	Soy (سویا)
7	99.5		1.5	66.3	21.7	3.6	6.4	Sunflower (آفتاب گردان)
18	98.1		0.6	7.8	75.0	3.1	11.6	Olive (زیتون)
18	91.8		0.3	28.4	53.3	1.8	8.0	Peanut (بادام‌زمینی)
18	99.1		0.1	69.1	19.0	4.0	6.9	Grape (انگور)
18	98.8		0.8	7.6	77.1	2.9	10.4	Almond (بادام)
					چربی (Fat)			
7	90.0		0.9	4.4	42.2	18.2	24.3	Tallow (پیه)
7	94.4		1.1	25.1	44.6	7.1	16.5	Yellow grease (گریس)

جدول(٤) استانداردهای بین‌المللی و خواص فیزیکی بیودیزل تولیدی توسط منابع مختلف

Table(4) International standards and Physical properties of produced biodiesel by different sources

منبع (References)	ارزش حرارتی (HHV)	عدد یدی (IV)	عدد ستان (CN)	نقطه ابری (CP)	وزن مخصوص (SG)	لزجت (Viscosity)	مولد لیپید (Oleaginous)
-	MJ/Kg	-	-	°C	-	mm^2/s	
This work	39.86	68.2	57.8	9.88	0.876	4.72	R. diobovatum, 217mM, glu.
This work	39.94	72.3	57.5	9.26	0.877	4.69	R. diobovatum, 434 mM, glu.
This work	39.64	56.8	58.6	11.59	0.876	4.80	R. diobovatum, 434 mM, gly.
مخمرهای مولد لیپید (Oleaginous yeast)							
25	40.02	75.33	57.2	8.75	0.877	4.67	criptucoccus sp
15	39.99	78	57.3	8.90	0.877	4.68	R. babjavae
15	40.04	78	56.7	8.50	0.877	4.66	R. diobovatum
15	39.94	78	58.1	9.3	0.877	4.70	Y. lipolytica
22	40.01	76.4	56.7	8.77	0.877	4.67	Y. lipolytica
27	39.73	61.4	59.2	10.91	0.876	4.77	R. toruloids
6	40.10	80.4	57.5	8.10	0.877	4.64	Rd. graminis
ریزجلبک ها (Microalgae)							
16	40.49	101.3	50.5	5.12	0.878	4.50	Ankistrodesmus falcatus
16	40.73	113.8	48	3.28	0.879	4.41	Ankistrodesmus fusiformis
16	41.18	136.9	42.4	-0.097	0.880	4.25	Kirchneriella lunaris
16	39.06	27.3	64.9	15.96	0.874	5.01	Chlamydomonas sp
16	40.73	113.9	48.3	3.27	0.879	4.41	Chlamydocapsa bacillus
16	40.25	88.4	52.9	6.96	0.877	4.59	Coelastrum microporum
16	40.22	87.0	53.2	7.15	0.877	4.59	Desmodesmus brasiliensis
16	39.22	35.3	63.6	14.76	0.874	4.95	Scenedesmus obliquus
16	40.14	82.8	53.9	7.76	0.877	4.62	Pseudokirchneriella subcapitata
16	39.54	52.6	61.	12.29	0.875	4.84	Chlorella vulgaris
16	40.37	94.6	52.6	5.99	0.878	4.54	Botryococcus braunii
16	39.84	66.9	59.5	10.07	0.876	4.73	Botryococcus terribilis
دانه‌های روغنی (Vegetable oil)							
7	45.2	152.8	50.4	3	0.882	3.8	Camelina
7	41.3	108.8	53.7	-2	0.883	4.38	Canola
7	38.1	18.5	59.3	-3	0.874	2.75	Coconut
7	43.1	101	55.7	-3	0.883	4.19	Corn
7	40.7	109.5	55.7	5	0.876	4.75	Jatropha
7	40.6	54	61.9	14	0.873	4.61	Palm
7	41.1	116.1	53.7	-3	0.879	4.5	Rapeseed
7	42.2	141	51.1	-4	0.879	4.14	Safflower
7	39.7	125.5	51.3	0	0.882	4.26	Soy
7	40.6	128.7	51.1	2	0.878	4.42	Sunflower
18	40.22	84	57	7.19	0.877	4.5	Olive
18	40.52	97	53	4.85	0.878	4.6	peanut
18	41.49	138	48	-2.5	0.881	4.1	Grape
18	40.64	102	53	3.95	0.879	4.4	H.O. Sunflower
18	40.41	92	57	5.75	0.878	4.2	Almond
چربی حیوانی و دیگر مواد (Animal fat and others)							
7	39.7	65.9	58.9	13	0.878	4.69	Tallow
7	39.4	88.9	56.9	8	0.879	4.8	Yellow Grease
استانداردها و سوخت دیزل (Standards and diesel fuel properties)							
Europe (EN 14214)					0.86 - 0.90	3.5 - 5	Biodiesel (B100)
U.S. (ASTM D6751-08)						1.9 -6	Biodiesel (B100)
U.S. (ASTM D7467-08)						1.9 - 4.1	B6-B20 Blends
4	average =45		51	-18	0.82 - 0.86	2-4.5	Diesel fuel

مخمر مولد لیپید، خصوصیات فیزیکی سوخت زیستی حاصل از آن شامل لزجت، وزن مخصوص، نقطه ابری، عدد ستان، عدد یدی و ارزش حرارتی بیشینه توسط این مدل‌های ریاضی و آماری برآورد شده است. این خصوصیات با استانداردهای ارائه شده توسط سازمان‌های صالح (ASTM در آمریکا و EN در اروپا) موجود در دنیا و همچنین خصوصیات موجود سوخت‌های دیزل متداول مقایسه شده‌اند. به طور کلی نتایج نشان می‌دهند که خصوصیات سوخت زیستی تولیدی توسط مخمرها مشابه بیودیزل تولیدی از دانه‌های روغنی بوده و در محدوده استاندارد تعیین شده قرار دارند.

لزجت یا ویسکوزیته سینماتیکی شاخصی است که بر خصوصیات تزریق سوخت مؤثر است. به‌طورکلی ویسکوزیته بالاتر اتمیزه شدن سوخت را کاهش می‌دهد. ویسکوزیته بالا باعث به‌وجود آمدن قطرات بزرگتر، تبخیرپذیری کمتر و تزریق با زاویه پاشش محدودتر می‌گردد. همه این‌ها باعث احتراق ضعیف‌تر و آلودگی بیشتر می‌گردند (۷). به‌طور معمول ویسکوزیته سوخت‌های زیستی از سوخت دیزل بیشتر می‌باشد. همان‌گونه که در جدول ۴ دیده می‌شود، ویسکوزیته سوخت دیزل بین ۲ تا ۴/۵ میلی‌متر مربع بر ثانیه می‌باشد. استاندارد اتحادیه اروپا محدوده آن‌را برای بیودیزل بین ۳/۵ تا ۵ میلی‌متر مربع بر ثانیه قرارد داده، در حالی‌که استاندارد ASTM از ۱/۹ تا ۶ میلی‌متر مربع بر ثانیه را محدوده قابل قبول آن می‌داند. معادلات مربوطه ویسکوزیته لیپید تولیدی توسط *R. diobovatum* را در سوبستراهای مختلف از ۴/۶۹ تا ۴/۸۰ میلی‌متر مربع بر ثانیه برآورد کردند. از میان دانه‌های روغنی پایین‌ترین ویسکوزیته مربوط به روغن نارگیل با ۲/۷۵ میلی‌متر مربع بر ثانیه وبیشترین جاتروفا با ۴/۷۵ میلی‌متر مربع بر ثانیه گزارش شده است. ویسکوزیته سینماتیکی بیودیزل حاصل از ریزجلبک‌ها و مخمرها در محدوده استاندارد واقع شده است. همچنین وزن مخصوص (دانسیته هم می‌توان بیان کرد) از خصوصیات کلیدی سوخت می‌باشد که بر عملکرد موتور تأثیر مستقیم دارد. پمپ‌های تزریق کننده سوخت را حجمی اندازه گرفته و پاشش را انجام می‌دهند؛ بنابراین کم یا زیاد شدن جرم سوخت پاشیده شده در محفظه احتراق به دانسیته آن سوخت مربوط می‌باشد. به‌طور کلی وزن مخصوص سوخت زیستی کمی از سوخت دیزل بالاتر می‌باشد (۷). وزن مخصوص تمام سوخت‌های زیستی اشاره شده در جدول ۴ بین ۰/۸۷ تا ۰/۸۸ گزارش شده است و استاندارد اتحادیه اروپا ۰/۸۶ تا ۰/۹۰ را به عنوان محدوده قابل قبول ارائه داده است. براساس گزارش‌های پژوهش‌های انجام شده طولانی‌تر بودن زنجیره کربنی استرها باعث افزایش دانسیته و ویسکوزیته سوخت‌های زیستی می‌گردد، درحالی‌که افزایش تعداد پیوندهای دوگانه منجر به کاهش این خواص فیزیکی در بیودیزل‌ها می‌شود (۱۰).

عدد ستان شاخصی برای بیان تأخیر در اشتعال سوخت‌ها در موتور دیزل می‌باشد و بیشتر بودن آن باعث کاهش زمان اشتعال و پیرو آن کاهش کوبش در موتور دیزل می‌گردد (۹). ارزش ستان یک سوخت دیزل آثاری فراتر از کوبش موتور دارد. اگر میزان ستان خیلی کم باشد، روشن کردن موتور مشکل یا غیر ممکن می‌شود. استفاده از سوخت‌های با ستان خیلی بالا هم موجب بروز مشکلاتی می‌گردد. ممکن است تأخیر در اشتعال، کوتاهتر از آن باشد که اجازه مخلوط شدن مناسب سوخت با هوا را بدهد (۱۰). معمولاً عدد ستان سوخت‌های دیزل در محدوده ۴۰ تا ۵۰ مناسب می‌باشد. استاندارد شماره D675 انجمن مواد و آزمون‌های آمریکا (ASTM) حداقل نمره ستان برای سوخت‌ها را ۴۷، استاندارد شماره EN 14214 از استانداردهای اروپایی حداقل را ۵۱ و آژانس ملی برزیل برای نفت، گاز طبیعی و سوخت‌های زیستی (استاندارد شماره ANP 07/2008) حداقل آن‌را ۴۵ اعلام کرده‌اند (۱۶). به خوبی مشخص است که عدد ستان سوخت

زیستی به منبعی که لیپید را تولید می‌کند، بسیار وابسته است. اسیدهای چرب با زنجیره بلندتر و مولکول‌های اشباع بیشتر عدد ستان بالاتر را نتیجه می‌دهند (۷). عدد ستان در این تحقیق حدود ۵۷/۵ با سوبسترای دکستروز و حدود ۵۸/۵ با سوبسترای گلیسرول محاسبه گردید. برآورد عدد ستان سوخت‌های زیستی حاصل از مخمرها همگی در محدوده استاندارد محاسبه شدند. به‌طور معمول عدد ستان پایین نتیجه وجود مقادیر زیاد ترکیبات غیر اشباع مانند استر اسیدهای لینولئیک (C18:2) و لینولنیک (C18:3) می‌باشد (۸). با توجه به جدول ۳ می‌توان مشاهده کرد که روغن آفتاب‌گردان، انگور، سویا و گلرنگ حاوی مقادیر بالایی اسید لینولئیک و لینولنیک می‌باشند و در نتیجه عدد ستان پایینی را می‌توان در جدول ۴ برای آن‌ها مشاهده نمود. از میان گونه‌های ریز جلبک *Ankistrodesmus fusiformis*، *Kirchneriella lunaris* و *Chlamydocapsa bacillus* با عددهای ستان ۴۸، ۴۲/۴ و ۴۸/۳ کمتر از حد استاندارد محاسبه شدند که به دلیل وجود مقدیر بالای ترکیبات غیراشباع بود (جدول ۳). همچنین وجود مقادیر زیاد استر اسیدهای چرب اشباع مانند پالمیتیک (C16:0) و استیریک (C18:0) باعث مشاهده عدد ستان بالا می‌شود (۸). روغن پالم شاهدی برای این موضوع می‌باشد (جداول ۳ و ۴). وجود ترکیبات استر اسیدهای تک اشباع مانند اسید اولئیک (C18:1) نیز باعث بالا رفتن عدد ستان سوخت‌های زیستی شده است (۷). همان‌طور که در لیپید حاصل از مخمرها و روغن زیتون، بادام و کلزا می‌توان در جداول ۳ و ۴ مشاهده نمود که نزدیک به عدد ستان سوخت زیستی حاصل از روغن پالم می‌باشند.

عدد یدی (مقدار ید مصرف شده به گرم توسط ۱۰۰ گرم از یک ماده شیمیایی) تمایل سوخت زیستی به واکنش با اکسیژن در دمای محیط را نشان می‌دهد. این خصوصیت به تعداد و موقعیت پیوندهای دوگانه در زنجیره کربنی استرها بستگی دارد. عدد یدی بالاتر، اکسیداسیون بیشتر، ته‌نشینی بیشتر مواد و کاهش روان کنندگی سوخت بیودیزل را موجب می‌شود. بیشترین میزان قابل قبول عدد یدی در اروپا ۱۲۰ گرم I_2 بر ۱۰۰ گرم می‌باشد. این عدد برای روغن سویا بین ۱۲۰ تا ۱۴۱ است (۱۱). عدد یدی در تحقیق حاضر حداکثر ۷۲/۳ برای محیط کشت حاوی ۴۳۴ میلی‌مولار دکستروز به‌دست آمد. عدد صابونی شدن نیز به میلی‌گرم هیدروکسید پتاسیم لازم برای صابونی کردن ۱ گرم روغن گفته می‌شود، که با وزن مولکولی استر اسیدهای چرب رابطه معکوس دارد (۱۶).

عملکرد موتورها در دماهای پایین یکی از ملاحظات مهم کاربران در استفاده از سوخت می‌باشد. به‌طور کلی باید از عملکرد سوخت زیستی در دماهای کم مطمئن بود. معمولاً مقدار نقطه انسداد فیلتر(CFPP) و نقطه ابری به‌منظور پیش‌بینی چگونگی جریان‌پذیری سوخت‌های بیودیزل در دماهای پایین مورد استفاده قرار می‌گیرد. استاندارد اروپا (EN 116) پایین‌ترین دمایی را که ۲۰ میلی‌لیتر سوخت در مدت ۶۰ ثانیه از یک فیلتر عبور می‌کند، برای CFPP تعریف کرده است (۱۸،۹). انجمن ملی سوخت‌های نفتی، گازی و زیستی برزیل (ANP) دمای ۱۹ درجه سلسیوس را به عنوان بیشینه این پارامتر معرفی کرده است (۱۶). طولانی‌تر بودن زنجیره کربنی و هم‌چنین بالاتر بودن درجه اشباع متیل استر اسیدهای چرب تشکیل دهنده سوخت زیستی باعث بالاتر رفتن شاخص CFPP شده و عملکرد و خصوصیات سوخت را در دماهای پایین کاهش می‌دهد؛ همچنین دمایی را که کریستال‌های جامد شروع به تشکیل شدن می‌کنند نقطه ابری می‌نامند (۱۸) و در بسیاری از آزمایشگاه‌های استاندارد خواص سوختی از این شاخص استفاده می‌نمایند. میزان نقطه ابری برای محیط‌های حاوی ۲۱۷ و ۴۳۴ میلی‌مولار دکستروز بالاتر از ۹ درجه سلسیوس و برای ۴۳۴ میلی‌مولار گلیسرول ۱۱/۵۹ درجه سلسیوس به‌دست آمد (جدول ۴).

به دلیل بالاتر بودن مقدار اکسیژن در سوخت‌های زیستی، مقدار انرژی مخصوص آن‌ها از سوخت دیزل کمتر می‌باشد. هرچه در یک سطح غیر اشباع مشخص زنجیره کربنی اسید چرب افزایش یابد، مقدار جرمی اکسیژن کاهش و در نتیجه ارزش حرارتی سوخت بالاتر می‌رود. ارزش حرارتی سوخت زیستی حاصل از میکروارگانیسم‌ها در محدوده MJ/kg ۴۰ محاسبه گردید. میانگین این مقدار برای سوخت‌های دیزل حدود ۴۵ می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق رشد و تولید لیپید توسط مخمر مولد لیپید *R. diobovatum* در محیطی با محدودیت نیتروژن و حاوی دوغلظت ۲۱۷ و ۴۳۴ میلی‌مولار دکستروز و ۴۳۴ میلی‌مولار گلیسرول مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت. هم‌چنین مشخصات فیزیکی سوخت بیودیزل تولیدی با استفاده از پروفایل اسیدهای چرب مستخرج از گازکروماتوگرافی و مدل‌های پیش‌بینی موجود، بررسی و با استانداردهای معتبر، سوخت دیزل متداول و دیگر انواع بیودیزل مقایسه گردید. نتایج نشان داد که در محیط حاوی ۲۱۷ میلی‌مولار دکستروز تولید لیپید در روزهای ابتدایی برتری معنی‌داری با دیگر محیط‌ها داشت؛ ولی در روز آخر به‌دلیل کاهش میزان دکستروز در محیط کاهش تولید لیپید مشاهده گردید. وجود کربن مازاد در محیط کشت حاوی ۴۳۴ میلی‌مولار دکستروز، تولید لیپید در روز آخر را با افزایش معنی‌داری نسبت به سایرین مواجه نمود. در محیط کشت حاوی گلیسرول تولید لیپید متعادلی در طول دوره رشد مشاهده گردید. مشخصات فیزیکی سوخت بیودیزل تولیدی در تمامی محیط‌ها با استانداردهای موجود در اروپا (EN) و آمریکا (ASTM) مطابقت داشت. مطابقت مشخصات سوخت حاصل و پروفایل اسیدهای چرب تولیدی با مخمر با پروفایل حاصل از برخی گونه‌های ریزجلبک، چربی حیوانی و دانه‌های روغنی قابلیت بالای این گونه مخمر مولد لیپید را برای کاربردهای تغذیه‌ای و سوختی نشان می‌دهد. تحقیقات علمی و مهندسی بیشتر به منظور افزایش همزمان تولید بیوماس و محتوای لیپید و استفاده از سوبستراهای ارزان قیمت مانند مواد لیگنوسلولزی مورد نیاز بوده و پیشنهاد می‌گردد.

سپاس‌گزاری

این تحقیق بخشی از پژوهش دوره فوق‌دکترای انجام شده توسط نویسنده مقاله در گروه مهندسی بیوسیستم دانشگاه مانیتوبا در کانادا می‌باشد. پشتیبانی مالی این پروژه توسط دانشگاه مانیتوبا و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر انجام گرفته است که بدین وسیله مراتب تشکر و سپاس خود را از این دو دانشگاه اعلام می‌دارم.

منابع

1. Atabani, A.E., Silitonga, A.S., Badruddin, I.A., Mahlia, T.M.I., Masjuki, H.H., and Mekhilef, S. 2012. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16:2070-2093.

2. Beopoulus, A., Nicaud, J., Gaillardin, C. 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological process. Applied Microbiology and Biotechnology, 90:1193-1206.

3. Bligh, E.G., and Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37: 911–917.

4. Canakci, M., and Sanli, H. 2008. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35:431-441.

5. Freitas, C., Parriera, T.M., Roseiro, J., Reis, A., and Da Silva, T.L. 2014. Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. Bioresource Technology, 158: 355-359.

6. Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, Z., Bianchi, D., and Compagno, C. 2012. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis.* Bioresource Technology, 111: 398-403.

7. Kent Hoekman, S., Broch, A., Robbins, C., Ceniceros, E., and Natarajan, M. 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specification. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16: 143-169.

8. Knothe, G., Matheaus, A.C., and Ryan, T.W. 2003. Cetane number of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. Fuel, 82: 971-975.

9. Knothe, G. 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. Fuel Processing Technology, 86: 1059-1070.

10. Knothe, G. 2007. Some aspects of biodiesel oxidative stability. Fuel Processing Technology, 88: 669-677.

11. Krisnangkura, K. 1986. A simple method for estimation of cetane index of vegetable oils methyl esters. Journal of American oil chemists' society, 63 (4): 552-553.

12. Li, Q., Du, W., and Liu, D. 2008. Perspective of microbial oils for biodiesel production. Applied Microbiology and Biotechnology, 80: 749-756.

13. Liang, M., and Jian, J. 2013. Advancing oleaginous microorganism to produce lipid via metabolic engineering technology. Progress in Lipid Research, 52: 395-408.

14. Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., and Xian, M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy, 34: 1-5.

15. Munch, G., Sestric, R., Sparling, R., Levin, D.B., and Cicek, N. 2015. Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodosporidium babjevae* and *Rhodosporidium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. Bioresource Technology, 185: 49-55.

16. Nascimento, I.A., Marques, S.S.I., Cabanelas, I.T.D., Periera, S.A., Druzian, J.I., De Souza, C.O., Vich, D.V., De Carvalho, G.C., and Nascimento, M.A. 2013. Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. Bioenergy Research, 6: 1-13.

17. Nasirian, N., Almassi, M., Minaei, S., and Widmann, R., 2011. Development of a method for biohydrogen production from wheat straw by dark fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, 36: 411-420.

18. Ramos, M.J., Fernandez, C.M., Casas, A., Rodriguez, L., and Perez, A. 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. Bioresource Technology, 100: 261-268.

19. Renewable Energy Policy Network for the 21st Century (2015). Annual Reporting on Renewables. http://www.ren21.net/status-of-renewables/global-status-report. Html. (access June 2016).

20. Saeng, C., Cheirslip, B., Suksaroge, T.T., and Bourtoom, T. 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Bioresource Technology, 46: 210-218.

21. Schneider, T., Graeff-Honninger, S., French, W.T., Hernandez, R. Merkt, N., Claupein. W., Hetrick, M., and Pham P. 2013. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. Energy, 61: 34-43.

22. Sestric, R., Munch, G., Cicek, N., Sparling, R., and Levin, D.B. 2014. Growth and neutral lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* on various carbon substrates under nutrient-sufficient and nutrient-limited conditions. Bioresource Technology, 164: 41-46.

23. Sitepu, I.R., Garay, L.A., Sesteric, R., Levin, D.B., Block, D.E., German, J.B., and Boundy-Mills, K.L. 2014. Oleaginous yeast for biodiesel: Current and future trends in biology and production. Biotechnology Advances, 32(7): 1336-1360.

24. Sung, M., Yeong, H.S., Shin, H., and Jong-In., H. 2014. Biodiesel production from yeast *Cryptococcus sp.* Using Jerusalem artichoke. Bioresource Technology, 155: 77-83.

25. Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M. Yamaguchi, S., Sakuradani, E., Ogawa, J., and Shima, J. 2014. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. Bioresource Technology, 153: 230-235.

26. Thiru, M., Sankh. S., and Rangaswamy V. 2011. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. Bioresource Technology, 102: 10436-10440.

27. Xu, J., Zhao, X., Wang, W., Du, W., and Liu, D. 2012. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. Biochemical Engineering Journal, 65: 30-36.

28. Zhang, Z., Zhang, X., and Tan, T. 2014. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. Bioresource Technology, 157: 149-153.