

تعیین دمای بهینه رشد ریز جلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) برای تولید سوخت سبز (بیودیزل)

محمد ملکوتیان^{۱*}، بهنام حاتمی^۲، شیدوش دولتشاهی^۳، احمد رجبی زاده^۴

^۱ استاد مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط و گروه بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان

m.malakootian@yahoo.com

^۲ مربی گروه بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان

Bhatami88@yahoo.com

^{۳،۴} مربی مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط و گروه بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان

A_rajabizadeh@yahoo.com; sdowlatshahi00@gmail.com

چکیده: لیپید استخراج شده از ریز جلبک‌ها به‌عنوان یکی از منابع نویدبخش جهت تولید بیودیزل و کاهش بحران انرژی، در سال‌های اخیر، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر دما روی رشد و بازدهی لیپید ریز جلبک، به‌عنوان یکی از عوامل تأثیرگذار بر بازدهی اقتصادی تولید بیودیزل است. ریز جلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا در محیط والن و در هفت دمای مختلف کشت داده شد. میزان رشد سلولی به‌طور روزانه، از طریق اندازه‌گیری دانسیته سلولی با استفاده از اسپکتوفتومتر تعیین شد. تولید بیوماس و تجمع لیپید در انتهای فاز رشد ثابت ریز جلبک، تعیین گردید و ترکیبات تشکیل دهنده اسید چرب به‌وسیله گاز کروماتوگرافی تشخیص داده شد. مطابق استاندارد، کیفیت روغن استخراج شده از ریز جلبک جهت تولید بیودیزل نیز به‌وسیله اندیس ید تعیین شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد بیشترین میزان رشد ویژه ریز جلبک و تولید بیوماس در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. بیشترین درصد تبدیل بیوماس به لیپید در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رخ داد. بیشترین بازدهی لیپید در سه دمای ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود؛ اما آنالیز اسید چرب در این سه دما نشان داد که بیشترین میزان تری گلیسرید در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سلول ریز جلبک تجمع یافته است. نتایج این تحقیق نشان داد که با کشت ریز جلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا در محدوده دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌توان به حداکثر بازدهی لیپید و در نهایت، به حداکثر تولید بیودیزل دست یافت.

واژه‌های کلیدی: بازدهی لیپید، نانوکلوپسیس، دما، بیودیزل، ریز جلبک.

بیودیزل دخالت دارند [۷ و ۲۳]. بنابراین، تعیین وضعیت مناسب کشت ریزجلبک در نهایت، به افزایش راندمان تولید لیپید کمک می‌کند. این وضعیت نقش بسیار مهمی در افزایش بازدهی کل لیپید، ارتقای سطح تحقیقات مربوط به بیودیزل و کاربرد آن در مقیاس صنعتی خواهد داشت [۲۱ و ۲۳]. تاکنون مطالعات متعددی در زمینه تغییر کمیت و کیفیت لیپید سلولی گونه‌های مختلف ریزجلبک، در نتیجه تنوع شرایط رشد (میزان شوری، شدت نور) یا مشخصات محیط کشت (غلظت نیتروژن، فسفات و آهن) انجام شده است [۱۵، ۲۴ و ۲۵]. یکی از فاکتورهای تأثیرگذار در کشت ریزجلبک، دما می‌باشد که روی ساختار سلولی (به‌خصوص لیپید و پروتئین) و کنترل واکنش‌های متابولیتی تنظیم‌کننده^۵ به‌خصوص واکنش‌های آنزیمی در سلول ریزجلبک مؤثر است [۱۹]. این تأثیر در نهایت، بر میزان تولید بیوماس و لیپید مؤثر خواهد بود. الگوی سازگار و ثابتی در ارتباط با اثر دما بر تولید لیپید وجود ندارد. افزایش مقدار لیپید در نتیجه افزایش دما در برخی جلبک‌ها مشاهده شده است. این درحالی است که دمای کم باعث تولید لیپید بیشتر در ریزجلبک نیبشیا پلیسه^۶ گزارش شده است [۱۶].

مطالعاتی که تاکنون روی گونه نانوکروپسیس اوکولاتا انجام شده، تنها به بررسی عوامل گوناگون روی تولید بیوماس یا مقدار لیپید سلولی پرداخته و به بررسی اثر دما بر بازدهی لیپید کمتر توجه شده است. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر دما روی بازدهی لیپید به‌عنوان یکی از فاکتورهای تأثیرگذار در بازدهی اقتصادی تولید بیودیزل است. همچنین در مطالعه حاضر، لیپید استخراج‌شده از ریزجلبک، از نظر کمیت و کیفیت ترکیبات تشکیل‌دهنده، آنالیز شده است و قابلیت کاربردی آن جهت تولید بیودیزل بررسی و با استانداردهای موجود مقایسه شده است.

۲. مواد و روش‌ها

پژوهش از نوع بنیادی-کاربردی است که در مقیاس آزمایشگاهی، در نیمه اول سال ۹۱ در مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گرفت.

۱.۲. ریزجلبک

ریزجلبک نانوکروپسیس اوکولاتای مورد استفاده در این مطالعه، به‌صورت استوک^۷ جلبکی با تراکم زیاد (25×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر)، از ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی،

۱. مقدمه

هفتاد درصد انرژی مورد نیاز در دنیا به‌صورت سوخت و در بخش‌های حمل‌ونقل، کارخانجات و گرمایش خانگی مصرف می‌شود [۱]. در اتحادیه اروپا، بخش حمل‌ونقل به‌طور تقریبی، مسئول ۲۵ درصد انتشار گازهای گلخانه‌ای است [۲]. به‌علت توسعه سریع فعالیت‌های انسانی و مصرف بی‌رویه سوخت‌های فسیلی، بحران انرژی بزرگ‌ترین چالش قرن ۲۱ بوده و تخمین زده می‌شود که ذخایر گازی و نفتی زمین در طی ۴۰ تا ۶۰ سال آینده کاهش یابد. نگرانی در مورد کاهش منابع سوخت‌های فسیلی، به‌خصوص نفت و گاز طبیعی، همراه با تغییرات آب و هوایی و افزایش گرمایش جهانی، موجب توجه بیشتر به منابع تجدیدپذیر انرژی شده است [۳ و ۴]. اخیراً بیودیزل (سوخت سبز) به‌عنوان انرژی تجدیدپذیر و غیر سمی، با آلودگی بسیار کم به‌عنوان جایگزین سوخت‌های فسیلی، به‌شدت مورد توجه قرار گرفته شده است [۵-۸]؛ زیرا استفاده از آن با کاهش انتشار گازهای آلاینده‌ای مانند مونوکسید کربن، هیدروکربن‌ها، ذرات معلق و اکسیدهای گوگرد همراه بوده و به‌عنوان انرژی دوستدار محیط زیست، کاربرد آن مطابق خط‌مشی‌های پیمان کیوتو^۱ است [۲].

ریزجلبک‌ها ارگانیزم‌های تک‌سلولی فتوسنتزکننده بوده که پتانسیل فوق‌العاده‌ای برای کشت به‌عنوان محصولات پرانرژی داشته و قادرند تعداد زیادی از محصولات باارزش نظیر لیپیدها، قندها، رنگدانه‌ها و بسیاری از ترکیبات کاربردی دیگر تولید کنند [۹-۱۲]. تولید لیپید و زیست‌توده (بیوماس) توسط ریزجلبک‌ها در حدود ۱۵ تا ۳۰۰ برابر بیشتر از سایر محصولات گیاهی است [۷]. ساخت و تجمع لیپیدها به‌وسیله ریزجلبک‌ها، یکی از منابع مهم تولید بیودیزل به‌شمار می‌رود [۱۳]. واکنش لیپید ریزجلبک به شکل تری‌گلیسیرید^۲ با الکل‌های ساده (که به ترانس استریفیکاسیون معروف است) منجر به تشکیل ترکیبات شیمیایی به نام الکیل استر یا بیودیزل می‌شود [۱۰، ۱۴ و ۱۵]. چندین گونه از ریزجلبک‌ها قادر به تجمع مقدار زیادی لیپید در سلول‌های خود بوده که در میان آن‌ها، ریزجلبک تک‌سلولی نانوکروپسیس اوکولاتا^۳، متعلق به خانواده استیگموفیسه^۴ بسیار مورد توجه است [۱۶-۱۹]. این گونه قادر است ۶۵ تا ۷۰ درصد وزن خشک سلولی خود، لیپید ذخیره کند [۲۰-۲۲].

میزان رشد، تولید بیوماس و محتوای لیپید در ریزجلبک‌ها، از عوامل ضروری هستند که در بازدهی لیپید و در نتیجه، کاهش هزینه‌های تولید

1. Kyoto Protocol
2. TAG
3. Nannochloropsis Oculata
4. Eustigmatophyceae

5. Metabolic regulatory mechanisms
6. Nibshiapleacea
7. Stocks

ایجاد خطا می‌شود. یکی از دلایل تفاوت در میزان وزن خشک سلولی در مقالات مختلف، همین موضوع است؛ بنابراین، قبل از آنالیز وزن‌سنجی، برای حذف نمک‌ها، سلول‌های سانتریفیوژ شده مجدداً در ۲۰۰ میلی‌لیتر آمونیوم فرمات (نیم‌مولار تنظیم شده با هیدروکسید سدیم یک مولار) حل شده و دوباره با شرایط ذکر شده سانتریفیوژ می‌شود. سلول‌های ریزجلبک پس از سانتریفیوژ، به مدت چهار ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و وزن آن‌ها روی کاغذ صافی از قبل توزین شده، اندازه‌گیری می‌گردد [۹، ۲۶ و ۲۸]. میزان رشد ویژه ریزجلبک در فاز لگاریتمی، از طریق معادله زیر به دست آمد:

$$\mu = \frac{\ln N_f - \ln N_i}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

که در آن، μ (day^{-1}) میزان رشد ویژه، $\ln N_f$ و $\ln N_i$ به ترتیب، دانسیته سلولی (cell.ml^{-1}) در انتها و ابتدای فاز رشد لگاریتمی و t زمان (روز) است [۷، ۱۴، ۱۵ و ۲۶].

۴.۲ استخراج و تعیین مقدار لیپید سلولی و تری

گلیسرید TAG

با توجه با روش‌های گوناگونی که برای استخراج لیپید از سلول‌های خشک شده ریزجلبک وجود دارد، در این مطالعه، از روش استخراج متانول-کلروفرم (۲/۱، ۷/۷) استفاده شد [۹، ۱۵، ۲۹ و ۳۰]. برای حذف بقایای ریزجلبک، لیپید استخراج شده به وسیله فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر صاف‌سازی گردید و پس از دو بار شست‌وشو با حلال متانول و تبخیرسازی کامل، پس از خشک شدن، آنالیز وزن‌سنجی انجام شد و به صورت درصد وزن خشک سلولی بیان گردید [۲۴]. بازدهی لیپید نیز از طریق معادله زیر محاسبه شد [۵ و ۲۰]:

$$P_{\text{Lipid}} (\text{g.l}^{-1} \text{day}^{-1}) = \frac{C_f \times DCW_f - C_i \times DCW_i}{\text{Time}} \quad (2)$$

که در آن، C_f و DCW_f به ترتیب، مقدار لیپید (گرم به ازای گرم بیوماس سلولی) و بیوماس تولید شده (گرم در لیتر) در انتهای فاز رشد ثابت، C_i و DCW_i به ترتیب، مقدار لیپید (گرم به ازای گرم بیوماس سلولی) و بیوماس تولید شده (گرم در لیتر) در ابتدای فاز رشد ثابت و T زمان بر حسب روز است. پس از تعیین مقدار لیپید، لیپید خشک شده را در ۰/۴ میلی‌لیتر الکل ایزوپروپیل حل کرده و مقدار تری گلیسرید در لیپید، طبق روش لی و همکاران اندازه‌گیری می‌شود [۳۱].

۵.۲ آنالیز و تعیین مشخصات اسید چرب

برای تعیین مشخصات اسید چرب، از روش استریفیکاسیون^۶ مستقیم پیشنهاد شده به وسیله لیپاج و روی استفاده شد [۲۰]. مخلوطی از ۱۰۰

پژوهشکده آبی‌پروری جنوب کشور تهیه شد. این ریزجلبک یوکاریوت^۱ بوده و به علت ساختار ساده خود، به سرعت رشد می‌کند [۲۴]. با توجه به مطالعه‌ای که چن و همکاران انجام دادند و اثر دانسیته سلولی را روی رشد ریزجلبک و ترکیب لیپید تعیین کردند، در مطالعه حاضر، از ریزجلبک با دانسیته سلولی بالا استفاده شد [۹].

۲.۲ شرایط کشت

ریزجلبک در محیط کشت والن^۲ و در آب شبیه‌سازی شده دریا (که از حل کردن نمک دریایی در آب استریل شده به دست آمد) کشت داده شد. تمامی آزمایش‌ها با سه بار تکرار و در فایکولب مجهز به تنظیم دما و شدت نور و در ارلن مایر ۲ لیتری انجام شد. در این مطالعه، برای بررسی اثر دما بر بازدهی لیپید، کشت ریزجلبک در هفت دمای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. با توجه به مطالعه بانرجی و همکاران [۲۶] و نیز سن و همکاران [۲۷]، شدت نور

$7.0 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$ با سیکل روشنایی ۱۲ ساعته و میزان شوری محیط کشت، ۲۵ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شد. همچنین، برای دستیابی به راندمان بیشتر، با توجه به مطالعه چپو و همکاران [۱۴] از جریان هوای حاوی ۲٪ دی‌اکسید کربن که ابتدا در آب اشباع شده، پس از عبور از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر، به منظور هوادهی استفاده شد. برای جلوگیری از هرگونه آلودگی در تمامی مراحل آزمایش، محیط کشت و ظروف در اتوکلاو و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. تلقیح استوک جلبکی به ظروف حاوی محیط کشت نیز در زیر لامپ UV انجام شد.

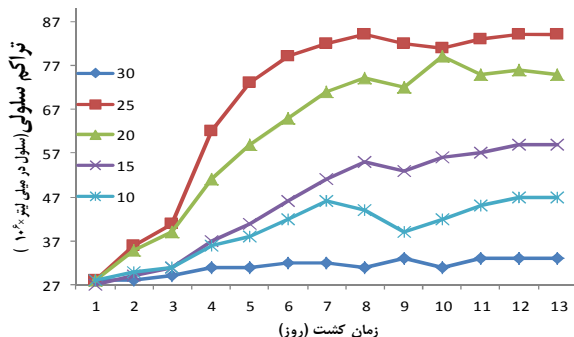
۳.۲ ارزیابی میزان رشد و بیوماس تولیدی ریزجلبک

برای تعیین میزان رشد ریزجلبک، به‌طور روزانه، از هر تیمار سه نمونه برداشته شد و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل شیمادزو^۳، دانسیته نوری در ۶۸۰ نانومتر قرائت گردید و با نتایج حاصل از شمارش سلولی مستقیم، به وسیله لام نئوبار^۴ مطابقت داده شد [۱۴]. نتایج حاصل از هر روز، به صورت انحراف معیار \pm میانگین گزارش شد. برای تعیین وزن خشک بیوماس ریزجلبک، یک گرم بیوماس تر از محیط کشت برداشت نموده و طبق روش مارتین-فرناندز^۵، به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵ درجه سانتی‌گراد با ۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شد [۱۵]. بیوماس ریزجلبک‌های دریایی تحت تأثیر مقدار نمک جذب شده روی سطح سلول و مقدار آب درون سلولی است که در تخمین میزان بیوماس، باعث

1. Eukaryote
2. Walne
3. Shimadzu
4. Neobar
5. Martinez-Fernandez

6. Esterification

گوناگون، در شکل (۱) نشان داده شده است. در دمای ۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد، هیچ گونه افزایشی در تعداد سلول‌های ریزجلبک مشاهده نشد. در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی گراد، سلول‌های ریزجلبک پس از یک روز، وارد فاز لگاریتمی شدند و بیشترین میزان رشد سلولی در انتهای فاز رشد ثابت، در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی گراد مشاهده شد. در دمای ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی گراد، سلول‌های ریزجلبک پس از سه روز و از ابتدای روز چهارم، وارد فاز رشد لگاریتمی شدند. همچنین، نتایج به دست آمده نشان داد در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، سلول‌های ریزجلبک رشد بسیار کمی داشته‌اند. با توجه به شکل (۱)، بیشترین میزان رشد سلولی در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی گراد مشاهده شد. نتایج حاصل از آزمون واریانس یک طرفه نشان می‌دهد اختلاف بین میزان رشد سلولی در ماه‌های متفاوت معنادار است ($P > 0.05$). انجام آزمون توکی نیز مؤید این است که آن‌ها در گروه‌های همگن واقع نشده‌اند و میزان رشد در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی گراد، اختلاف معناداری با دمای ۱۰ درجه سانتی گراد ($p = 0.001$) و دمای ۱۵ درجه سانتی گراد ($p = 0.000$) و دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی گراد ($p = 0.043$) ($p = 0.001$) دارد. بین دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی گراد با یکدیگر، اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد ($p = 0.599$). همچنین، بین دمای ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی گراد ($p = 0.725$) نیز اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد.



شکل (۱): میزان رشد ریزجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا در رژیم دمایی گوناگون

۳-۲. اثر دما بر بیوماس و لیپید تولیدی

مطابق شکل (۲)، نتایج حاصل از اثر دما بر تولید بیوماس در ریزجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا در انتهای فاز رشد ثابت نشان داد که در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، بیشترین بیوماس توسط ریزجلبک ساخته شده و در دمای ۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی گراد، به علت عدم رشد کافی ریزجلبک، مقدار بیوماس نهایی با مقدار اولیه تفاوتی ندارد. نتایج حاصل

میلی گرم ریزجلبک لیوفیلیزه^۱ شده و ۸ میلی لیتر هیدروکسید پتاسیم، به مدت سه دقیقه به وسیله سونیکاتور^۲ به هم زده شد. برای صابونی شدن، مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه، تا دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و سپس در دمای اتاق سرد گردید. جهت استریفیکاسیون، ۸ میلی لیتر از اسید هیدروکلریک ۰/۷ نرمال در متانول و BF_3/CH_3OH به نسبت ۱۴٪ (v/v) به مخلوط اضافه شده و مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه تا دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. پس از سرد شدن در دمای اتاق، برای جلوگیری از امولسیفیکاسیون^۳، ۲ میلی لیتر محلول اشباع کلرید سدیم به آن اضافه شد. با اضافه کردن مقداری ان-هگزان، متیل استر اسیدهای چرب^۴ استخراج گردید. متیل استر اسیدهای چرب در لایه هگزان، به وسیله گاز کروماتوگرافی استاندارد مجهز به ستون کاپیلاری^۵ و دتکتور یونیازسیون شعله^۶ آنالیز شد. نیتروژن با میزان ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه، به عنوان گاز حامل استفاده شد. دما طبق برنامه از ۱۳۰ درجه سانتی گراد تا ۱۸۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۰ درجه سانتی گراد در دقیقه افزایش یافت و پس از آن، با سرعت ۲ درجه سانتی گراد در دقیقه، به ۲۱۰ درجه سانتی گراد رسید. دمای اینجکتور^۷ و دتکتور نیز به ترتیب، در دمای ۲۲۰ و ۲۵۰ درجه سانتی گراد نگه داشته شد [۷].

۲.۶. تعیین اندیس یدی

طبق استاندارد اروپایی^۸، کیفیت روغن ریزجلبک به دست آمده برای تولید بیودیزل، از طریق اندازه گیری اندیس یدی^۹ تعیین شد [۲].

۲.۷. آنالیز آماری

در این مطالعه، اطلاعات به دست آمده با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه^{۱۰} آنالیز و جهت تعیین تفاوت آماری موجود در بین تیمارها از آزمون توکی^{۱۱} استفاده شد. سطح معناداری نیز ۰/۰۵ در نظر گرفته شد [۱۷ و ۳۲].

۳. یافته‌ها

۳-۱. اثر دما بر میزان رشد سلولی

میزان رشد سلولی ریزجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا در رژیم دمایی

1. Lyophilization
2. Sonication
3. Emulsification
4. FAMES
5. Capillary
6. FID
7. Injector
8. EN14111
9. Iodine value
10. One-way Anova
11. Tukey

جدول (۱): ترکیب اسیدهای چرب تولیدی توسط نانوکلوپسیس اوکولاتا در دمای ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی گراد و در انتهای فاز رشد ثابت ریزجلبک

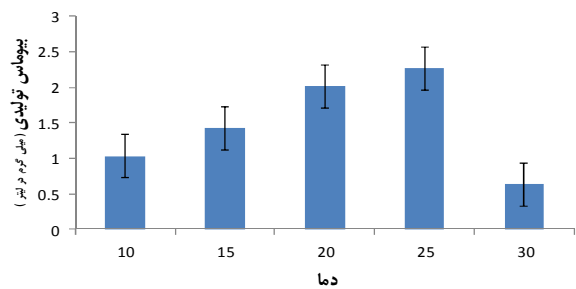
اسید چرب	نام علمی	دمای ۱۵	دمای ۲۰	دمای ۲۵
C14:0	Myristic acid	۲/۱۶±۰/۰۴	۶/۰۲±۰/۰۳	۶/۱۷±۰/۱۹
C16:0	Palmitic acid	۲۸/۶۶±۰/۸۴	۳۳/۵۷±۰/۸۵	۳۹/۹۳±۰/۰۹
C16:1n-7	Palmitoleic acid	۳۵/۱۷±۰/۲۹	۳۴/۹۲±۰/۱	۲۹/۵۶±۰/۴۱
C18:0	Stearic acid	۱/۸۷±۰/۰۱	۱/۸۷±۰/۰۰	۱/۸۶±۰/۰۰
C18:1n-9	Oleic acid	۵/۵۳±۰/۱۳	۴/۰۷±۰/۰۵	۴/۱۳±۰/۰۱

۴. بحث

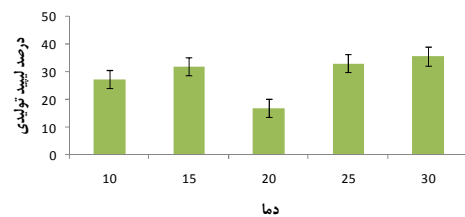
۴.۱. اثر دما روی میزان رشد سلولی

دما به عنوان یکی از عوامل حساس روی رشد ریزجلبک و فاکتور مهم در تعیین محدوده کشندگی سلول هاست که از طریق تغییر میزان واکنش های شیمیایی و پایداری ترکیبات سلولی روی فیزیولوژی سلول ریزجلبک اثر می گذارد [۷ و ۳۳]. در این مطالعه، از رژیم دمایی متفاوتی جهت کشت ریزجلبک استفاده شده؛ دما نیز به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شده است. تعداد سلول های اغلب ریزجلبک ها در مقابل افزایش دما در فاز رشد لگاریتمی تا رسیدن به دمای بهینه افزایش می یابند و پس از آن، رشد سلولی ثابت می ماند [۳۴]. در مطالعه حاضر، مطابق شکل ۱، از دمای ۱۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد همراه با افزایش دما، دانسیته سلولی نیز افزایش یافت و به حداکثر میزان خود در ۲۵ درجه سانتی گراد رسید. ابورز و همکاران دمای بهینه جهت رشد نانوکلوپسیس اوکولاتا را ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتی گراد معرفی کردند [۳۵]. ساکنیک و همکاران در مطالعه ای که روی نانوکلوپسیس اسپروژا انجام دادند، دمای بهینه رشد را ۲۵ درجه سانتی گراد به دست آوردند [۳۶]. ویگن و همکاران نیز در مطالعه ای روی نانوکلوپسیس سالینا، دمای بهین رشد را ۲۳ درجه سانتی گراد به دست آوردند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد [۳۴]. همچنین بررسی میزان رشد ویژه در رژیم دمایی مورد مطالعه نشان می دهد که بیشترین میزان رشد ویژه در فاز رشد لگاریتمی، مربوط به دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بوده و برابر 0.1569 day^{-1} می باشد. میزان رشد ویژه برای دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، برابر 0.1388 day^{-1} ، دمای ۱۵ درجه سانتی گراد برابر 0.1016 day^{-1} و برای دمای ۱۰ درجه سانتی گراد برابر 0.0645 day^{-1} است. در مطالعه ای که مونتویا و همکاران روی نانوکلوپسیس اوکولاتا انجام دادند، با کاهش دما از ۲۰ به ۱۵ درجه سانتی گراد، میزان رشد ویژه از 0.13 day^{-1} به 0.06 day^{-1} کاهش یافت. همچنین، با افزایش دما به ۲۵ درجه سانتی گراد، میزان رشد ویژه به 0.07 day^{-1} کاهش یافت که

از آزمون واریانس یک طرفه نشان می دهد اختلاف بین بیوماس تولیدی در دماهای مختلف معنادار است ($P = 0.000$). انجام آزمون توکی نیز مؤید این است که آن ها در گروه های همگن واقع نشده اند. همچنین مطابق شکل (۳)، در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و در انتهای فاز رشد ثابت بر خلاف تولید بیوماس زیاد، درصد تبدیل بیوماس به لیپید کمترین و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، برخلاف رشد و تولید بیوماس بسیار کم، بیشترین درصد تبدیل بیوماس به لیپید مشاهده شد. در این مطالعه، نتایج حاصل از آزمون واریانس یک طرفه نشان می دهد لیپید تولیدی در فاز رشد ثابت و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، به طور معناداری با سایر دماها متفاوت بوده است ($P = 0.000$). کمترین میزان لیپید در این دما مشاهده شده (۱۶/۹۳ درصد) و بیشترین میزان تبدیل بیوماس به لیپید، در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد مشاهده شده است.



شکل ۲: بیوماس تولیدی ریزجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا در رژیم دمایی گوناگون



شکل ۳: لیپید تولیدی ریزجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا در رژیم دمایی گوناگون

۳-۳. ترکیب اسید چرب

در جدول (۱)، نتایج حاصل از تعیین کیفیت اسیدهای چرب تولید شده در دمای ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی گراد و در انتهای فاز رشد ثابت که به وسیله گاز کروماتوگرافی اندازه گیری شده، آمده است.

حاصل در این مطالعه نشان می‌دهد بیشترین میزان تبدیل بیوماس به لیپید در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد است. ساکنیک و همکاران در مطالعه‌ای که روی ریزجلبک نانوکروپسیس اسپروژا^۳ انجام دادند، دمای بهینه تولید لیپید را ۳۲ درجه سانتی‌گراد به دست آوردند [۳۶]. در مطالعه‌ای که مونتویا و همکاران [۲۴] روی نانوکروپسیس اوکولاتا انجام دادند، با افزایش دمای کشت از ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، مقدار لیپید نانوکروپسیس اوکولاتا از ۷/۹ درصد به ۱۴/۹ درصد افزایش یافت. در این مطالعه نیز با افزایش دما از ۲۰ به ۲۵ درجه سانتی‌گراد، مقدار لیپید از ۱۶/۹۳ درصد به ۳۳/۱۹ درصد افزایش یافت. در مطالعه‌ای که ایواموتو وانو روی گونه رودوترولا گراسیلیس^۴ انجام دادند، با افزایش دمای کشت از ۲۷ درجه سانتی‌گراد به ۳۵ درجه سانتی‌گراد، مقدار لیپید کاهش یافت. این کاهش نشان می‌دهد تأثیر دما بر تولید لیپید در گونه‌های مختلف یکسان نیست [۳۸]. افزایش تجمع لیپید همراه با افزایش سن کشت (رسیدن به فاز رشد ثابت) به علت تبدیل انرژی فتوسنتتیک به تولید لیپید، به جای تقسیم سلولی است [۱۵]. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تولید بیوماس سلولی بیشتر توسط ریزجلبک، دلیل بر تولید لیپید بیشتر نیست؛ بنابراین، محتوای لیپید یا مقدار بیوماس به تنهایی، معیار مناسبی برای بازدهی لیپید ریزجلبک نیست و باید با استفاده از معادله (۲)، نقش هر دو عامل را در کنار یکدیگر در نظر گرفت [۱۶]. بازدهی لیپید در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برابر $1.1647 \text{ g.l}^{-1}\text{day}^{-1}$ ، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برابر $1.394 \text{ g.l}^{-1}\text{day}^{-1}$ ، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد برابر $1.395 \text{ g.l}^{-1}\text{day}^{-1}$ ، در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد برابر $1.3841 \text{ g.l}^{-1}\text{day}^{-1}$ و در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد برابر $1.206 \text{ g.l}^{-1}\text{day}^{-1}$ است. نتایج حاصل از بازدهی لیپید در دماهای گوناگون نشان می‌دهد که حداکثر بازدهی لیپید در دمای ۲۵، ۲۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد بوده و به طور معناداری، بیشتر از بازدهی لیپید در دمای ۱۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد است. همچنین تفاوتی بین دمای ۲۵، ۲۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد از نظر بازدهی لیپید مشاهده نمی‌شود و با نتایج مونتویا و همکاران روی نانوکروپسیس اوکولاتا مطابقت دارد [۲۴]. در مطالعه‌ای که رودولفسی [۱۵] روی نانوکروپسیس اوکولاتا انجام دادند، بازدهی لیپید در ۲۵ درجه سانتی‌گراد برابر ۰/۰۴۹ گرم در لیتر در روز و در مطالعه هرلیمان و همکاران روی نانوکروپسیس اسپروژا در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد برابر ۰/۰۲ گرم در لیتر در روز حاصل شد [۱۵].

با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد [۲۴]. در مطالعه چیو و همکاران، پس از ۶ تا ۸ روز کشت جلبک نانوکروپسیس اوکولاتا در محیط کشت F/2، در شدت نور $300 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$ و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، میزان رشد ویژه به 0.571 day^{-1} رسید [۱۴]. بانرجی و همکاران نیز با کشت نانوکروپسیس اوکولاتا در محیط کشت والن در شدت نور $150 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$ و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد توانستند به میزان رشد 0.04 day^{-1} دست یابند [۲۶]. علت تفاوت میزان رشد ویژه در بین مطالعات انجام شده، تفاوت در نوع کشت، شدت نور، محیط کشت قبلی ریزجلبک، نوع فتوبیوراکتور^۱ و میزان شوری محیط کشت مورد مطالعه است [۱۵ و ۱۸].

۲-۴. اثر دما روی بیوماس تولیدی

ریزجلبک‌ها ارگانسیم‌های تک‌سلولی فتوسنتتیک^۲ بوده که جهت تولید بیوماس از انرژی نوری و دی اکسید کربن استفاده کرده و راندمان فتوسنتتیک بیشتری نسبت به گیاهان دارند [۲۳]. جهت تولید اقتصادی بیودیزل از ریزجلبک، بیوماس نیز همانند مقدار لیپید، نقش مهمی دارد [۱۱]. در این مطالعه، مطابق شکل (۲)، بیشترین مقدار بیوماس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در فاز رشد ثابت (برابر ۲/۲۶۶۷ گرم در لیتر) به دست آمد. چیو و همکاران پس از ۶ تا ۸ روز کشت نانوکروپسیس اوکولاتا در محیط کشت F/2 و استفاده از ۲ درصد دی اکسید کربن در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، توانستند به بیوماس تولیدی برابر ۱/۲۷۷ گرم در لیتر برسند [۱۴]. در مطالعه‌ای که چیاهونگ سو و همکاران انجام دادند، در کشت ناپیوسته و تک‌مرحله‌ای ریزجلبک نانوکروپسیس اوکولاتا در محیط کشت والن و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در طی رشد لگاریتمی غلظت بیوماس به حدود ۰/۵۸ گرم در لیتر رسید و در فاز رشد ثابت غلظت بیوماس به ۰/۶۵۴ گرم در لیتر افزایش یافت [۲۰]. بانرجی و همکاران نیز توانستند از کشت نانوکروپسیس اوکولاتا در محیط کشت والن و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، به غلظت بیوماس ۱/۶ گرم در لیتر دست یابند [۲۶].

۳-۴. اثر دما روی بازدهی لیپید

فاکتورهای محیطی مانند دما، نور، pH، شوری و مواد مغذی محیط کشت، نه تنها روی فتوسنتز و تولید سلول‌های ریزجلبک تأثیر می‌گذارند، بلکه روی الگو، مسیر و فعالیت متابولیسم سلولی و در نتیجه، ترکیب سلولی نیز تأثیر می‌گذارند [۲۳]. دما به عنوان یکی از عوامل مؤثر روی مقدار لیپید در سلول و مقدار اسید چرب در لیپید است. نتایج

3. Nannochloropsis sp
4. Rhodtorulagracilis

1. Photobioreactor
2. Photosynthetic

۴-۴. اثر دما بر ترکیب اسید چرب جهت تولید بیودیزل

ویژگی مهم تولید چربی توسط میکروارگانیسم‌ها، امکان تغییر ترکیب اسید چرب به وسیله تغییر شرایط کشت است. دما یکی از فاکتورهای تأثیرگذار روی ترکیب اسید چرب است [۳۸]. گونه‌های ریزجلبک دارای خواص روغنی، می‌توانند راه‌های سنتز بیولوژیکی لیپید را به سمت تشکیل و تجمع لیپیدهای خنثی سوق دهند [۳۲]. روغن ریزجلبک به شکل تری گلیسرید قابل تبدیل به بیودیزل بوده و روغن‌های گیاهی که اغلب جهت تولید بیودیزل استفاده می‌شوند، عمدتاً ۱۶ و ۱۸ کربن دارند [۶ و ۳۲]. در مطالعه اولوفسون و همکاران روی ریزجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا، اسیدهای چرب مناسب جهت تولید بیودیزل اسید مایرستیک، اسید پالمیتیک، اسید پالمیتوئیک، اسید استئاریک و اسید اولئیک معرفی شدند که بیش از ۴۵-۷۸ درصد کل اسیدهای چرب را تشکیل می‌دهند [۸]. با توجه به جدول (۱)، در مطالعه حاضر، این ترکیبات بیش از ۷۰-۸۰ درصد ترکیب اسید چرب در دمای ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد را تشکیل داده‌اند. همچنین در تمامی دماهای مورد مطالعه، اسید پالمیتیک و اسید پالمیتوئیک بیش از ۶۰-۷۰ درصد اسیدهای چرب را تشکیل می‌دهند که با مطالعه هولتون و همکاران مطابقت دارد [۳۳]. مطالعه هو و جائو نیز نشان داد که اسید پالمیتیک و اسید پالمیتوئیک، ترکیب اصلی تری گلیسرید در نانوکلوپسیس اسپروژا است [۱۶].

تری گلیسرید در گونه نانوکلوپسیس شامل اسیدهای چرب اشباع و اسیدهای چرب غیر اشباع تک پیوندی بوده و در واکنش سلول ذخیره می‌شوند [۸ و ۳۲]. اغلب ریزجلبک‌ها مقدار کمی تری گلیسرید در طی فاز رشد لگاریتمی، در خود تجمع می‌کنند، اما بخش اعظم آن می‌تواند در فاز رشد ثابت تجمع یابد [۸]. به همین دلیل، در مطالعه حاضر، آنالیز ترکیب اسید چرب در فاز رشد ثابت ریزجلبک انجام شد. با توجه به جدول (۱)، مقدار تری گلیسرید در انتهای فاز رشد ثابت به ترتیب، در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد، برابر ۷۳/۳۹ درصد بوده و به طور معناداری، کمتر از مقدار تری گلیسرید در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد (برابر ۸۰/۴۵ درصد اسید چرب) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (برابر ۸۱/۶۵ درصد اسید چرب) است. تری گلیسرید در برخی گونه‌ها می‌تواند به ۴۰ تا ۷۰ درصد وزن کل بیوماس برسد [۳۲]. در مطالعه وانگ و تونگ وانگ درباره نانوکلوپسیس اسپروژا، مقدار تری گلیسرید، ۴۱/۱ درصد اسید چرب به دست آمد [۳۹].

استاندارد EN14214 نیز جهت تعیین کیفیت بیودیزل، محدودیت کمتر از ۱۲ درصد را برای ترکیب اسید لینولئیک قائل شده که این ترکیب در مطالعه حاضر در تمامی دماها، کمتر از یک درصد اسیدهای چرب است [۴۰].

۴-۵. اندیس ید

جهت تعیین کیفیت روغن به دست آمده از ریزجلبک، مطابق استاندارد اروپایی^۱ از اندیس ید استفاده شد. مطابق استاندارد، اندیس ید به دست آمده از روغن ریزجلبک جهت تعیین کیفیت بیودیزل، باید کمتر از $120 \text{ gI}_2/100\text{g}$ باشد که در این مطالعه، برای دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد، $56 \text{ gI}_2/100\text{g}$ به دست آمد. در مطالعه ژوویا و اولیورا [۲] این عدد برای نانوکلوپسیس اسپروژا برابر ۵۲، برای نئوکلروسیس اولیوندا^۲ برابر ۱۰۲، برای دونالیا ترئولکتا^۳ ۱۲۱ و برای سندسموس ابلیکوس^۴ این مقدار $69 \text{ gI}_2/100\text{g}$ به دست آمد.

۵. نتیجه‌گیری

میزان تولید بیوماس و لیپید در سلول، به تنهایی نمی‌تواند معیار مناسبی جهت انتخاب ریزجلبک برای تولید اقتصادی بیودیزل باشد. با وجودی که بیشترین بازدهی لیپید نانوکلوپسیس اوکولاتا در دمای ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد، نتایج آنالیز اسید چرب در سه دمای مذکور نشان داد مقدار تری گلیسرید به طور معناداری، در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد، نسبت به دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر است؛ بنابراین، دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، مناسب‌ترین محدوده دمایی جهت بازدهی لیپید و تولید بیودیزل، از ریزجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق زیر نظر مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری این دانشگاه انجام شده است. بدین وسیله از مساعدت‌های آنان که هموارکننده انجام این پژوهش بوده، سپاسگزار می‌کنم.

1. EN14111
2. Neochlorisoleabundans
3. Dunaliellatertiolecta
4. Scenedesmusobliquus

- [1] Taylor, R., J. Rand, and G. Caldwell, "Treatment with Algae Extracts Promotes Flocculation, and Enhances Growth and Neutral Lipid Content in *Nannochloropsis oculata*—a Candidate for Biofuel Production", *Marine Biotechnology*, vol. 14, No. 6, pp. 774-781, 2012.
- [2] Gouveia, L. and A. Oliveira, "Microalgae as a raw material for biofuels production", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 36, No. 2, pp. 269-274, 2009.
- [3] Xiaodong, D., L. Yajun, and F. Xiaowen, "Effects of selective medium on lipid accumulation of chlorellas and screening of high lipid mutants through ultraviolet mutagenesis", *African Journal of Agricultural Research*, vol. 16, No. 16, pp. 3768-3774, 2011.
- [4] Rajasri, Y., S. Ramgopal R, and C.S. Rao, "Lipid Accumulation Studies In *Chlorella Pyrenoidosa* Using Customized Photobioreactor- Effect of Nitrogen Source, Light Intensity and Mode of Operation", *International Journal of Engineering Research and Applications*, vol. 2, No. 3, pp. 2446-2453, 2012.
- [5] Li, Y., et al., "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 81, No. 4, pp. 629-636, 2008.
- [6] Griffiths, M. and S.L. Harrison, "Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production", *Journal of Applied Phycology*, vol. 21, No. 5, pp. 493-507, 2009.
- [7] Xin, L., H. Hong-ying, and Z. Yu-ping, "Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature", *Bioresource Technology*, vol. 102, No. 3, pp. 3098-3102, 2011.
- [8] Olofsson, M., et al., "Seasonal Variation of Lipids and Fatty Acids of the Microalgae *Nannochloropsis oculata* Grown in Outdoor Large-Scale Photobioreactors", *Energies*, vol. 5, No. 5, pp. 1577-1592, 2012.
- [9] Chen, Y., et al., "Effects of initial population density (IPD) on growth and lipid composition of *Nannochloropsis* sp", *Journal of Applied Phycology*, vol. 24, No. 6, pp. 1623-1627, 2012.
- [10] Karampudi, S. and K. Chowdhury, "Effect of Media on Algae Growth for Bio-Fuel Production", *Notulae Scientia Biologicae*, vol. 3, No. 3, pp. 33-41, 2011.
- [11] Nigam, S., P.R. Monika, and S. Rupali, "Effect of Nitrogen on Growth and Lipid Content of *Chlorella pyrenoidosa*", *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, vol. 7, No. 3, pp. 124-129, 2011.
- [12] Banskota, A., et al., "Mono- and digalactosyldiacylglycerols: potent nitric oxide inhibitors from the marine microalga *Nannochloropsis granulata*", *Journal of Applied Phycology*, vol. No. pp. 1-9, 2012.
- [13] Lee, S.J., B.D. Yoon, and H.M. Oh, "Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*", *Biotechnology Techniques*, vol. 12, No. 7, pp. 553-556, 1998.
- [14] Chiu, S.-Y., et al., "Lipid accumulation and CO2 utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO2 aeration", *Bioresource Technology*, vol. 100, No. 2, pp. 833-838, 2009.
- [15] Huerlimann, R., d.N. Rocky, and H. Kirsten, "Growth, Lipid Content, Productivity, and Fatty Acid Composition of Tropical Microalgae for Scale-Up Production", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 107, No. 2, pp. 245-256, 2010.
- [16] Hu, H. and K. Gao, "Response of Growth and Fatty Acid Compositions of *Nannochloropsis* sp. to Environmental Factors Under Elevated CO2 Concentration", *Biotechnology Letters*, vol. 28, No. 13, pp. 987-992, 2006.
- [17] Durmaz, Y., "Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation", *Aquaculture*, vol. 272, No. 1-4, pp. 717-722, 2007.
- [18] Spolaore, P., et al., "Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 81, No. 6, pp. 1049-1056, 2006.
- [19] Sandnes, J.M., et al., "Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production", *Journal of Applied Phycology*, vol. 17, No. 6, pp. 515-525, 2005.
- [20] Su, C.-H., et al., "Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process", *Journal of Applied Phycology*, vol. 23, No. 5, pp. 903-908, 2011.
- [21] Simionato, D., et al., "Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation", *Bioresource Technology*, vol. 102, No. 10, pp. 6026-6032, 2011.
- [22] Takagi, M., et al., "Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 54, No. 1, pp. 112-117, 2000.
- [23] Huang, X., et al., "Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*)", *Journal of Applied Phycology*, vol. No. pp. 1-9, 2012.
- [24] Converti, A., et al., "Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production", *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 48, No. 6, pp. 1146-1151, 2009.
- [25] Srinivas, R. and C. Ochs, "Effect of UV-A Irradiance on Lipid Accumulation in *Nannochloropsis oculata*", *Photochemistry and Photobiology*, vol. 88, No. pp. 684-689, 2012.
- [26] Banerjee, S., et al., "Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory conditions", *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, No. 8, pp. 1375-1383, 2011.
- [27] Sen, B., et al., "Studies on growth of marine microalgae in batch cultures: III. *Nannochloropsis Oculata* (Eustigmatophyceae)", *Asian journal of plant science*, vol. 4, No. 6, pp. 642-644, 2005.
- [28] Zhu, C.J. and Y.K. Lee, "Determination of biomass dry weight of marine microalgae", *Journal of Applied Phycology*, vol. 9, No. 2, pp. 189-194, 1997.
- [29] Wan, M., et al., "The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 91, No. 3, pp. 835-844, 2011.
- [30] Xin, L., et al., "Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp", *Bioresource Technology*, vol. 101, No. 14, pp. 5494-5500, 2010.
- [31] Xin, L., et al., "Enhancement effect of ethyl-2-methyl acetoacetate on triacylglycerols production by a freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1", *Bioresource Technology*, vol. 101, No. 24, pp. 9819-9821, 2010.
- [32] Pal, D., et al., "The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 90, No. 4, pp. 1429-1441, 2011.
- [33] Kleinschmidt, M. and V.A. McMahon, "Effect of Growth Temperature on the Lipid Composition of *Cyanidium caldarium* I. Class Separation of Lipids", *Plant physiology*, vol. 46, No. 2, pp. 286-289, 1970.
- [34] Wagenen, j., et al., "Effects of Light and Temperature on Fatty Acid Production in *Nannochloropsis Salina*", *Energies*, vol. 5, No. pp. 731-740, 2012.
- [35] Abu-Rezq, T., et al., "Optimum production conditions for different high-quality marine algae", *Hydrobiologia*, vol. 403, No. 0, pp. 97-107, 1999.
- [36] Suenik, A., O. Zmora, and Y. Carmeli, "Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp", *Aquaculture*, vol. 117, No. 3, pp. 313-326, 1993.
- [37] Solovchenko, A., et al., "Stress-Induced Changes in Optical Properties, Pigment and Fatty Acid Content of *Nannochloropsis* sp.: Implications for Non-destructive Assay of Total Fatty Acids", *Marine Biotechnology*, vol. 13, No. 3, pp. 527-535, 2011.
- [38] Eebo, L. and H. Iwamoto, "Effects of Cultivation Temperature on Fatty Acid Composition in *Rhodotorula gracilis*", *Acta chemica scandinavica*, vol. 20, No. pp. 439-443, 1996.
- [39] Wang, G. and T. Wang, "Characterization of Lipid Components in Two Microalgae for Biofuel Application", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 8, No. 1, pp. 135-143, 2012.
- [40] European Standard EN 14214, "Automotive fuels—fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines—requirements and test methods 2004.