Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 2, 2021 (67-78)

Investigation of Important Fatty Acids in Biofuel Production from Number of Microalgae

Taha A. Kh. Al-Someidae[1*], Yousif J. Al-Shahery[2], Qutaiba Shuaib Al-Nema[3]

[1*,2,3]Department of Biology, College of Education of Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq

E-mail: [2]yousefalshahery@uomosul.edu.iq, [3]dr.qutaibashuaib@uomosul.edu.iq

(Received October 10, 2020; Accepted December 14, 2020; Available online June 01, 2021)

DOI: 10.33899/edusj.2020.128619.1115 © 2020, College of Education for Pure Science, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract

Algae biofuels is considered as an alternative source to fossil fuels. In recent decades, there was a significant increase in the use of energy sources in order to avoid the depletion of traditional sources such as coal and petroleum. The produced fuel from algal oil had important characteristics compared to that from other vegetable crops. This is due to the short life cycle of development, a fast-growing and easy to be developed. In this study, three types of micro-algae *Scendesmus dimorphus*, *Chlorella vulgaris* and *Chlorococcum humicola* were used and grown in in a 5 liter photobioreactor. The dry biomass productivity of the three algae was estimated, and then a chemical analysis of the total fatty was performed to detect their biological contents as well as diagnose the fatty acid. Results showed that *S. dimorphus* produced the highest levels in both biomass, 1.58 g l^{-1} from dry weight and estimation of the total fat indicated *C. vulgaris* has the highest total fat yield, at 29.6 %. Results of fats characterization using (GLC) showed that *S. dimorphus* produced the high percentage of saturated fatty acids for the meristic acid ester (C14: 0) by 47% and the lincoseric acid ester (C24: 0) was 7.194%. In contrast, both *Chlorella vulgaris* and *Chlo. humicola* showed less level of saturated fatty acids. This indicates the suitability of algae oil derived from *S. dimorphus* in the synthesis of fatty acid, a major source in producing biofuels.

Keywords: *S. dimorphus*, *Chlo. humicola*, *C. vulgaris*, Microalgae, Fatty acids, Biofuel.

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 2, 2021 (67-78)

التحري عن الاحماض الدهنية المهمة لإنتاج الوقود الحيوي من عدد من الطحالب الدقيقة

طه عبدالوهاب خميس الصميدعي1*، يوسف جبار الشاهري2 ، قتيبة شعيب النعمة3

*1، 2، 3 قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل

الخلاصة

يُعد وقود الطحالب الحيوي من المصادر الواعدة كبديل عن الوقود الاحفوري، وتحسباً لنفاذ مصادر الطاقة التقليدية كالفحم والبترول فقد ازدادت في العقود الاخيرة الحاجة الملحة للبحث عن مصادر جديدة للطاقة. اتسم الوقود المنتج من الزيت الطحلبي بصفات مهمة ميزته عن الزيت المنتج من المحاصيل النباتية ويعود ذلك لقصر دورة حياة الطحالب وسرعة نموها ولا تحتاج لإراض صالحة للزراعة ويمكن تنميتها في اي مكان. اعتمد في هذه البحث ثلاثة أنواع من الطحالب الدقيقة *Scendesmus dimorphus*، *Chlorella vulgaris* و *Chlorococcum humicola* والتي نميت في مفاعل ضوئي سعة 5 لتر، وقدرت انتاجيتها من الكتلة الحيوية الجافة ثم اجري التحليل الكيميائي لتحديد محتواها الحيوي من الدهون الكلية وتشخيص الاحماض الدهنية. وبينت النتائج ان اعلى إنتاجية للكتلة الحيوية كانت في الطحلب *S. dimorphus* بلغت 1.58 غم لتر$^{-1}$ من الكتلة الحيوية الجافة. في حين أشارت نتائج تقدير الدهون حصول الطحلب *C. vulgaris* على أعلى إنتاجية من الدهون الكلية وقد بلغت 29.6 %. اما فيما يخص نتائج التشخيص باستخدام تقنية GLC فقد وجدت أن أعلى نسبة من الاحماض الدهنية المشبعة من زيت الطحلب *S. dimorphus* كانت لأستر الحامض المرستيك (C14:0) بنسبة 47.105 % وأستر الحامض اللينكوسيريك (C24:0) بنسبة 7.194 %. في حين اظهر الطحلب *C. vulgaris* والطحلب *Chlo. humicola* مستوى اقل من الاحماض الدهنية المشبعة مما يشير الى تفوق الزيت الطحلبي المنتج من الطحلب *S. dimorphus* في انتاج الاحماض الدهنية المهمة في تشكيل الوقود الحيوي.

الكلمات المفتاحية: *S. dimorphus*، *C. vulgaris* ، *Chlo.humicola*، الطحالب الدقيقة، الاحماض دهنية، الوقود الحيوي.

المقدمة Introduction

ازدادت في العقود الاخيرة الحاجة الملحة للبحث عن مصادر جديدة للطاقة تحسبا لنفاذ مصادر الطاقة التقليدية كالفحم والبترول, فضلا عن تأثيرها الواضح والخطير للانبعاثات الكيميائية الغازية الضارة على حياة الكائنات الحية. لهذا تركزت الابحاث العالمية للبحث عن مصادر للوقود صديقة للبيئة واقتصادية التكلفة وقابلة للتجدد. حيث اكتشفت العديد من مصادر الطاقة المتجددة الا ان افضلها واكثرها انتاجا واقلها كلفة وسهولة هو الوقود المنتج من الطحالب لسهولة التعامل مع تلك الكائنات الحية. اذ اعتبر الوقود المنتج من الطحالب الجيل الثالث من الوقود (الوقود الحيوي) بعد الفحم والنفط والوقود الحيوي المنتج من النباتات, وذلك لتميزها عن باقي المصادر الحيوية الاخرى اذ ان الوقود الحيوي المنتج من الذرة ,قصب السكر, بذور اللفت ، فول الصويا والنخيل لا يمكن استخدامها في المحركات المعدلة ولا تنطبق على مواصفات التسويق فضلا عن ذلك تعتبر من المحاصيل الغذائية المهمة للإنسان والتي تتطلب تنافسا على الأراضي الزراعية والمياه العذبة والأسمدة وذات كلفة اقتصادية باهظة [1]. يعتبر وقود الطحالب الحيوي (Algal Biodiesel) من المصادر الواعدة كبديل عن الوقود الاحفوري والحيوي الاخرى والتي يمكن أن تنمو في المياه العذبة أو البحرية والبيئات الاخرى من دون استخدام الأراضي الصالحة للزراعة والتنافس مع الطعام المنتج كغذاء للإنسان او علف للحيوان كما ان لبعض الطحالب إنتاجية عالية من الكتلة الحيوية والزيت الطحلبي [2]. اذ ان كتلة الطحالب المستعملة كمصدر

للجيل الثالث من الوقود الحيوي ذات إنتاجية أعلى من مصادر الجيل الثاني التي تصل إلى حوالي 30 ضعفاً من الانتاجية لكل وحدة مساحة نفسها، وإنتاجية الطحالب فيها تقدر بحوالي 50 طناً من الوقود الحيوي / هكتار في السنة مقابل 2 طن فقط من الوقود الحيوي هكتار$^{-1}$ في السنة للمادة النباتية الخام المنافسة [4,3]. وان النسبة المئوية لمحتوى الطحالب من الزيوت يشبه جميع المحاصيل الزيتية بالنسبة المئوية من الوزن الجاف لكن الطحالب تتفوق على المحاصيل النباتية الزيتية بالإنتاجية لكل وحدة مساحة نفسها وبالإمكان مضاعفة الإنتاجية نتيجة لقصر دورة حياة الطحالب والتي تتضاعف خلال 24 ساعة مقارنة بطول دورة حياة النباتات[5]. علاوة على ذلك ، فإن عملية إنتاج الوقود الحيوي من الجيل الأول مسؤولة أيضًا عن تدهور البيئة، لذلك تلاشت الحماسة حول الجيل الأول من الوقود الحيوي. كما ركز الباحثون على الجيل الثاني من الوقود الحيوي ولان انتاج الوقود الحيوي يتطلب تقنيات باهظة الثمن ومتطورة، وإنتاج الوقود الحيوي من الجيل الثاني ليس مربحًا للإنتاج التجاري لذلك ركز الباحثون على الجيل الثالث للوقود الحيوي الذي يتكون بشكل رئيسي من الطحالب الدقيقة والإحياء المجهرية [6]. لقد اشار Yamaguchi [7] الى امكانية زيادة انتاج الدهون الى حوالي 34% من الوزن الجاف للطحلب الاخضر *Botryococcus braunii* ووجد ان حوالي 81% منه هو الحامض الدهني Oleic acid والذي يمثل شكلا فريدا من مكونات الدهون الاخرى في الطحلب. فيما ذكر Kais [8] امكانية استخدام الطحالب الدقيقة مثل *Chlorella* و *Botryococcus* لإنتاج الوقود الحيوي السائل لحل ازمة الطاقة، وأظهرت نتائج الدراسة التي قام بها Li [9] كفائه عالية لإنتاج الدهون باستخدام الطحلب الدقيق *Parachlorella kessleri* ، واوضح Ahmed [10] في دراسته امكانية تحويل واسترة الدهون المستخلصة من الطحالب الدقيقة *Chlorella* و *Rhizoclonium* او المزارع المختلطة بينهما الى وقود حيوي ، وعرض

Mohamed و Nedtham [11] في بحثهم امكانية زيادة انتاج الدهون الى 45% من الوزن الجاف في طحلب *Botryococcus* ، كما ركزت دراسة Almutairi [12] على العديد من الظروف والمتغيرات لإنتاج الوقود الحيوي من الطحلب المجهري *Tetraselmis*. لقد اوضحت نتائج Aleikely [13] الى امكانية تحفيز بعض الطحالب المعزولة محليا كجنس *Astrococccus sp.* و *Sendusmus dimorphus* و *Chlorococcum humicola* لإنتاج الوقود الحيوي. وتهدف الدراسة الحالية للكشف عن

مواد وطرائق العمل Materials and Methods

الكائن المجهري وظروف الزراعة : تم الحصول على الطحالب الخضراء الدقيقة قيد الدراسة من عدة مصادر كما في الجدول (1) :

الجدول (1): الاجناس الطحلبية قيد الدراسة.

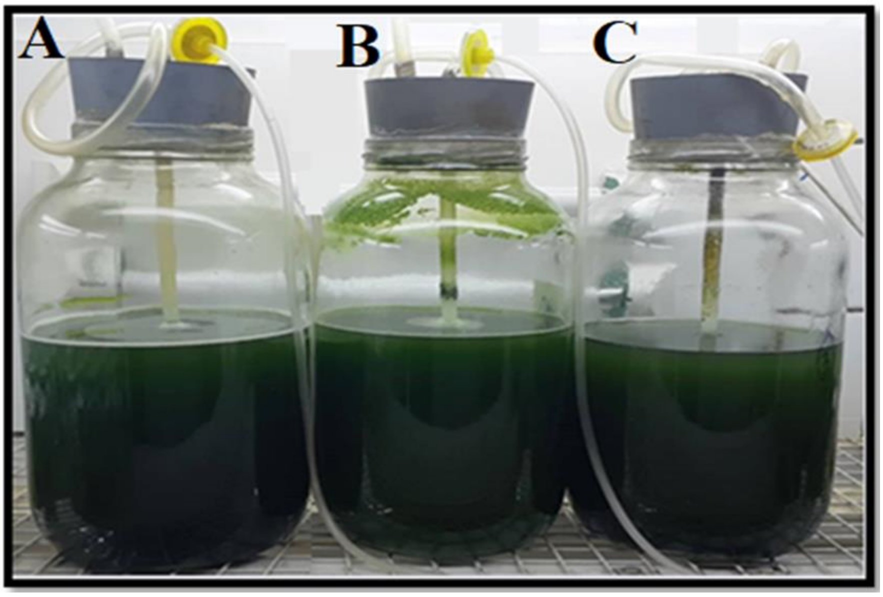
ت	اسم العزلة	المصدر
1	*Scendesmus dimorphus*	مختبر الطحالب كلية العلوم/ جامعه المنصورة/ جمهورية مصر العربية
2	*Chlorella vulgaris*	وحدة بايوتكنلوجيا الطحالب في المركز القومي للبحوث /القاهرة /جمهورية مصر العربية
3	*Chlorococcum humicola*	كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم / جامعة بغداد / العراق

وسط تنمية الطحلب الدقيقة:-

حضر وسط Chu-13 كما مبين في الجدول (2) وضبط الاس الهيدروجيني عند 7.5، ولتحضير اللقاح وزع الوسط الزرعي على دوارق زجاجية مختلفة الاحجام بنسبة حجمية 20% ثم عقمت بجهاز المؤصدة عند درجه حرارة 121 درجة سيليزية وضغط 1 جو [7]. لقحت الاوساط الزرعية بحجم لقاح 5 % (بعمر 6-7 ايام) وبكثافة 4-5 X 10^6 خلية مل$^{-1}$، ثم حضنت في حاضنة هزازة عند درجه حرارة 25 سيليزية ومعدل رج 100 رجة دقيقة$^{-1}$، بينما تم تجهيز المفاعل الضوئي (Photobioreactor) سعة 5 لتر لغرض انتاج الكتلة الحيوية بمصدر هواء خارجي معقم لغرض التهوية والتقليب باستخدام فلتر ملي بور ذو فتحات 0.45 مايكرومتر وباستخدام مضخة هواء صغيرة (شكل 1) وتم تعقيم الوسط بحجم 3 لتر وتلقيح وتحضين المفاعل الضوئي بنفس الشروط المذكورة اعلاه .

الجدول (1): تراكيز المواد الكيميائية للوسط Chu 13.

ت	المادة	التركيز النهائي ملغم لتر$^{-1}$	الحجم المضاف بالمل لتحضير واحد لتر
1	KNO_3	400	10
2	K_2HPO_4	80	10
3	$CaCL_2$	107	10
4	$MgSO_4.7H_2O$	200	10
5	Citric acid	100	10
6	Ferric citrate	20	10
7	Micro elements العناصر الصغرى		
	H_3BO_3	5.720	1
	$CoCl_2$	0.020	1
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.440	1
	$CuSO_4.5H_2O$	0.160	1
	$NaMoO_4$	0.084	1
	$MnCl_2$	3.620	1
8	قطرة من حامض الكبريتيك بتركيز 0.072 عياري لتر$^{-1}$		1 قطرة



الشكل (1): المفاعل الضوئي سعة 5 لتر بعد التلقيح بالطحالب والنمو بعمر 25 يوم، A: مزرعة الطحلب *Scendesmus*، B: مزرعة الطحلب *Chlorella*، C: مزرعة الطحلب *Chlorococcum*.

حصاد خلايا الطحالب :-

استخدمت في هذا البحث طريقتي الترسيب بالجاذبية مدعومة بطريقة الطرد المركزي عند 9000 دورة دقيقة$^{-1}$ لمدة 5 دقائق لترسيب ما تبقى من الخلايا الطحلبية في الوسط الزرعي [14].

تقدير الدهون الكلية :

اعتمد في هذا البحث مزيج الهكسان / الأيزوبروبانول (2/3 ح / ح) والوقت المستخدم للاستخلاص هو 7.5 ساعة (450 دقيقة) باستخدام الاستخلاص بالوجبة الواحدة [15]. تم فصل المزيج باستخدام قمع فصل ثم نقلت الطبقة العضوية العلوية الحاوية للدهون إلى قنينة زجاجية نظيفة وجافة موزونة مسبقا (W1)، وتم تبخير العينة في فرن الهواء الساخن عند 80 درجة مئوية لمدة 50 دقيقة، ثم سجل وزن القنينة مرة أخرى (W2) بعد التجفيف، وتم حساب ناتج الدهن عن طريق طرح W1 من W2 [16].

الحصول على الأحماض الدهنية بشكلها الحر:-

تم الحصول على الاحماض الدهنية بشكل حر من خلال أجراء عملية الصوبنة للدهون الكلية في وسط قاعدي وفقاً لطريقة Arthur [17] .

تحضير المثيل استر (الاسترة) Esterification :-

أضيفت مجموعة المثيل إلى الحامض الدهني المفصول بعملية الصوبنة للتحويل إلى حالة اقل قطبية وجعله أكثر قابلية للتطاير عند استعمال تقنية الـ GLC حسب طريقة Loury [18].

تشخيص الاحماض الدهنية باستخدام جهاز كروماتوكرافيا الغاز- السائل (GLC) :-

تم اجراء تشخيص الاحماض الدهنية المفصولة من الطحالب الدقيقة قيد الدراسة في المختبرات البحثية لوزارة العلوم والتكنلوجيا / دائرة البيئة والمياه، باستخدام جهاز الـ GC ياباني المنشأ موديل 2010 من شركة Shimadzu. وتم حساب النسبة المئوية لكل حامض دهني في العينة من خلال المعادلة الأتية:-

$$\text{النسبة المئوية للحامض الدهني} = \frac{\text{مساحة الحامض الدهني المفصول}}{\text{المجموع الكلي لمساحات العينة}} \times 100$$

النتائج والمناقشة Results and discussion

الحصاد وأنتاج وتقدير الكتلة الحيوية لأنواع الطحالب الدقيقة:-

تم حصاد الخلايا بطريقتي الترسيب بالجاذبية والطرد المركزي وجمعت الكتلة الحيوية الرطبة بعد الحصاد وجففت ثم طحنت لغرض زيادة المساحة السطحية للمعاملات اللاحقة. وقيست الكتلة الحيوية لكل طحلب (الجدول 3). بينت العديد من الدراسات أهمية حصاد الطحالب بإزالة كميات كبيرة من الماء من المزرعة لزيادة التركيز للكتلة الحيوية من خلال الترسيب اعتمادًا على حجم الطحالب الدقيقة [19]، وكان الغرض من ضبط ظروف النمو إنتاج أكبر كمية من الكتلة الحيوية التي ممكن أن تتراكم عندها الدهون، وبينت النتائج أن فترة التحضين (25) المعتمدة كانت مناسبة لتصل الخلايا في نموها الى طور الثبات والتي أعطت كتلة حيوية جيدة، وقد وظف عدد من الباحثين هذه الفترة الزمنية للوصول الى أعلى كتلة حيوية، فقد بين Bagchi [20] أن أعلى كتلة حيوية للطحلب الدقيق *S. obliquus* وأعلى قيم للدهون الكلية تم الحصول عليها عند فترة النمو ما بين 22–27 يوم من تحضين الطحلب في البرك المفتوحة. فيما حصل Mohamed وNedtham [11] على أعلى قيمة لكل من الكتلة الحيوية والدهون عند دراسة تأثير عدة عوامل على نمو الطحلب الدقيق *Botryococcus braunii* عند 25 يوماً من التحضين. وبينت النتائج أن أكبر قيمة للكتلة الحيوية الجافة كانت للطحلب الدقيق *S. dimorphus* وبلغت 1.58 غم لتر$^{-1}$، في حين أن الكتلة الحيوية الجافة للطحلب الدقيق *Chlo. humicola* كانت 1.39 غم لتر$^{-1}$، في حين كانت الكتلة الحيوية الجافة في ادناها في الطحلب الدقيق *C. vulgaris* 0.91 غم لتر$^{-1}$. ومقارنة بدراسة سابقة للباحث Ferro [21] عند استخدامهم لمياه الصرف الصحي كوسط لتنمية الطحالب *S. obliquus* و *Scenedesmus sp.* تشير هذه الدراسة الى أن الوسط Chu13 أكثر دعماً لنمو وتكاثر للطحلب *S. dimorphus* لاحتوائه العديد من العناصر الكبرى والصغرى مقارنة بمياه الصرف الصحي. الا أن نتائج دراسة Debowski [22] اظهرت انها أعلى في انتاج الكتلة الحيوية مما تم الحصول عليه في دراستنا الحالية في الطحلبين *S. dimorphus* و*C. vulgaris* من خلال اعتمادهم الهضم اللاهوائي لمياه الصرف الناتجة عن منتجات الألبان كوسط لزراعة الطحالب الدقيقة *Scenedesmus sp.* و*Chlorella sp.* اذ كانت الكتلة الحيوية التي حصلوا عليها 1.999 غم لتر$^{-1}$ خلال 26 يوم من التحضين. لقد اظهرت الدراسة الحالية نتائج مقاربة نوعا ما لما حصل عليه Ferro [21] من الكتلة الحيوية للطحلب *C. vulgaris* والتي بلغت 1.15 غم لتر$^{-1}$. اهتمت الكثير من الدراسات بالطحالب الخضراء الدقيقة ذات القدرة العالية لإنتاج الكتلة الحيوية، وهي أكثر الكائنات الواعدة بالمقارنة مع إنتاج الكتلة الحيوية للكائنات الحية الأخرى، فإن إنتاج الطحالب أقل تكلفة فضلا عن سرعة نموها للغاية وأكثرها اقتصادية، علاوة على ذلك يتم تنقية المياه الملوثة من خلال استزراع الطحالب. وتعتبر الكتلة الحيوية لانواع طحلبية معينة غنية

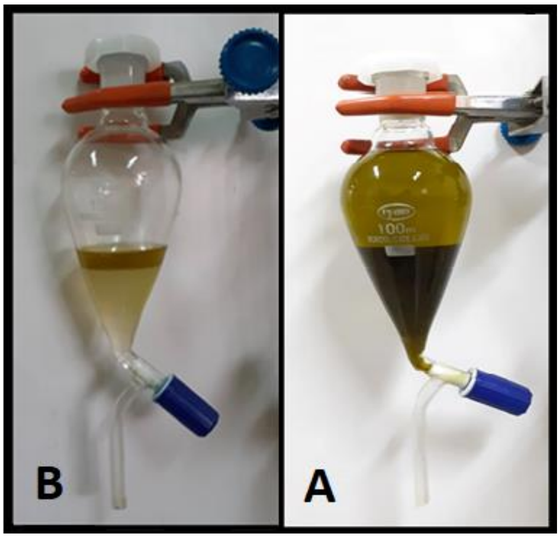
بالسكريات والبروتينات والدهون، وتُعد مصدراً جيداً للمنتجات الحيوية المتنوعة وخزين غذائي للأغذية والأعلاف والوقود الحيوي، وتعتمد كمية ونوعية الكتلة الحيوية الطحلبية لمنتجات معينة على الأنواع والسلالات وكذلك الظروف البيئية للزراعة [23]. فيما أشار العديد من الباحثين الى اعتبار الطحالب الدقيقة كائنات حية تنتج مجموعة متميزة من المركبات الكيميائية والبيولوجية كالكربوهيدرات والبروتينات والدهون[24] .

الجدول (3): الكتلة الحيوية الجافة والمحتوى الدهني الكلي للطحالب الدقيقة المدروسة.

ت	اسم الطحلب	الكتلة الحيوية الجافة غم لتر$^{-1}$	الدهون الكلية %
1	*S. dimorphus*	1.58	23.4
2	*C. vulgaris*	0.91	29.6
3	*Chlo. humicola*	1.39	24.2

تقدير محتوى الدهون الكلية لأنواع الطحالب الدقيقة:-

فصلت الدهون الكلية عن المكونات الكيميائية الاخرى لخلايا الطحالب بقمع الفصل باستخدام خليط المذيبات العضوية الهكسان / الأيزوبروبانول كما في الشكل (2)، وبينت نتائج تقدير الدهون الكلية (الجدول 4) ان اعلى محتوى دهني (0.296 غم لتر$^{-1}$) للطحالب المدروسة كان في الطحلب *C. vulgaris* والذي شكل حوالي 29.6 % من الوزن الجاف لخلايا الطحلب، في حين بلغ المحتوى الدهني (0.242 غم لتر$^{-1}$) للطحلب *Chlo. humicola* والذي شكل حوالي 24.2 % من الوزن الجاف للطحلب. في حين جاء بالمرتبة الثالثة الطحلب *S. dimorphus* بقيمة المحتوى الدهني (0.234 غم لتر$^{-1}$) في خلاياه والتي تشكل حوالي 23.4 % من الوزن الجاف.



الشكل (2): فصل الدهون الكلية وفصل الاحماض الدهنية بشكل حر،

A : فصل الدهون الكلية عن المكونات الكيميائية الاخرى،

B : فصل الدهون الحرة بطريقة الصوبنة

وقد بينت الدراسات أن من مزايا استخدام الطحالب لإنتاج الوقود الحيوي هي القدرة في السيطرة عليها من خلال تراكم وإفراز الوقود الحيوي عن طريق تغيير ظروف النمو أو التمثيل الغذائي [12]، وان انتاج زيوت الطحالب الدقيقة وحاصل إجمالي محتوى الدهون وتكوين الأحماض الدهنية وإنتاجية الكتلة الحيوية طوال الزراعة أمر بالغ الأهمية [25]. اذ بينت نتائج الدراسة الحالية أن كمية الدهون التي تم الحصول عليها من الطحلب *S. dimorphus* كانت جيدة نوعا ما مقارنة لما حصل عليه في دراسة Chng [26] التي وجدت أن نسبة الدهون الكلية في الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *S. dimorphus* كانت نسبة 14 %. كما أظهرت

النتائج التي حصل عليها Al-Hisenawe [27] من تنمية الطحلب *S. obliqus* التي لم تتجاوز 13% فقط من الدهون الكلية. أما فيما يتعلق بالدهون الكلية المنتجة من الطحلب الدقيق *C. vulgaris* قيد الدراسة فقد أظهرت النتائج أنها كانت جيدة (29.6 %) مقارنة بما حصلت عليه دراسة Kusumaningrum وZainuri [24] عند تحليلهم لمكونات الخلايا الجافة للطحلب *C. vulgaris* والتي بلغت 4.65 % فقط من الدهون، وما حصل عليه Bi وHe [28] في دراستهم من نسبة للدهون الكلية 17.14%، ويعتمد ذلك على ظروف التغذية والنمو، ومن خلال نتائج الدراسة الحالية للدهون الكلية التي ظهرت أعلى من نظيراتها ووصول النمو إلى مرحلة الطور الثابت في الطحلب الدقيق *C. vulgaris* فان طول فترة الحضانة تلعب ذلك دوراً مهما في بناء الزيوت وبالأخص الدهون الثلاثية المهمة لإنتاج الوقود الحيوي، الا أنه لا يمكن استخدام جميع سلالات الطحالب الدقيقة لإنتاج الكتلة الحيوية أو لإنتاج الدهون ويعتمد ذلك على محتواها الدهني لذلك تركز العديد من الدراسات على الطحالب الدقيقة لتحديد إمكاناتها في إنتاج الدهون [29]. وأظهرت النتائج الدهون الخاصة بالطحلب *Chlo. humicola* بأنها مرتفعة كثيراً عن دراسة Santhoshkumar [23] عند تحليلهم للخصائص الكيميائية في الكتلة الحيوية للطحلب *Chlo. humicola* وظهرت أنها تحتوي 13 % من الدهون فقط. وكذلك كانت مرتفعة عن النتائج التي حصل عليها Uma [30] والتي أوضحت بأن طحلب *Chlo. humicola* يحتوي من الدهون على نسبة 14.26 % فقط، وقد يرجع السبب في ذلك الى أن المذيبات العضوية غير القطبية والمذيبات العضوية القطبية التي أُضيفت إلى خلايا الطحالب الجافة في الطحلب *Chlo. humicola* قيد الدراسة كانت مهمة لضمان استخلاص كامل لجميع الدهون المتعادلة، سواء في تشكيل قطيرات الدهون الحرة في سايتوبلازم الخلية أو تشكيل المعقدات المرتبطة بالغشاء والتي تحققت خلال دراسات سابقة في استخراج الدهون من الطحلب *Chlorococcum sp.* [15].

تشخيص الاحماض الدهنية في الطحالب المدروسة بتقنية كروماتوكرافيا الغاز–السائل (GLC):

يظهر الشكل (2) طبقة الاحماض الدهنية الحرة التي تم الحصول عليها بطريقة الصوبنة والفصل بقمع الفصل، واعتمدت النتائج التي تم الحصول عليها في تشخيص استرات الاحماض الدهنية الحرة بتقنية GLC في الطحالب المدروسة باستخدام مخططات تحليل استرات للأحماض الدهنية القياسية (الملحق 1) المأخوذة بنفس ظروف الجهاز وبالاعتماد على نسبة ظهور الاحماض ومساحاتها في العينات المشخصة، ومقارنة زمن احتجاز كل استر دهني مع زمن احتجاز استر الدهون القياسية في المخطط القياسي والمساحة المئوية وزمن احتجاز استرات الاحماض الدهنية المفصولة من الطحالب قيد الدراسة. فقد لوحظ ان المحتوى الخلوي لطحلب *S. dimorphus* يحتوي نسب من استرات الاحماض الدهنية والمبينة في الجدول (4) والملحق (2)، حيث ظهرت أسترات الاحماض الدهنية المشبعة بنسبة 58.52 % بينما الاحماض الدهنية غير المشبعة بنسبة 1.583%. أولت الكثير من الدراسات بالأحماض الدهنية الحرة والتي تُعتبر العنصر الاساسي والمؤثر لاحتراق الوقود الحيوي، حيث يختلف تركيبها عند تحويل الزيوت ذات المصدر النباتي أو الطحلبي الى الوقود الحيوي، وتختلف تلك الأحماض الدهنية فيما تحتويه من عدد ذرات الكربون والتي تتراوح بين C8–C22 ذرة، فضلاً عن الاختلاف بين أن تكون مشبعة أو غير مشبعة، والتي تختلف بخواصها الفيزيائية في نقطة الانصهار ودرجة الغليان [31]. وتظهر من نتائج الدراسة الحالية احتواء دهون الطحلب *S. dimorphus* على نسبة عالية من أسترات الحوامض الدهنية المشبعة ذات سلسلة من 14 ذرة كاربون وعدد من أسترات الاحماض الدهنية غير المشبعة وكمية ضئيلة جداً من أسترات الأحماض الدهنية الأحادية عدم التشبع والتي تشير الى أهمية طول سلسلة ذرات الكاربون في الحوامض الدهنية المكونة للزيت الطحلب. فقد بينت دراسة Tsavatopoulou [32] أنه يجب أن يكون لطول الجليسريدات الأكثر ملاءمة لإنتاج الوقود الحيوي طول سلسلة ما بين C14 وC22 ودرجة منخفضة من أسترات الحوامض الدهنية عديمة التشبع وهي أكثر الاسترات شيوعاً التي يتم تصنيعها بواسطة طحالب المياه العذبة، وتأتي هذه النتائج متقاربة جزئياً لما حصل عليه Unpaprom [33] لأسترات الأحماض الدهنية الرئيسة Fatty Acid Methyl Ester (FAME) في العزلة *S. acuminatus* التي تم تنميتها في مفاعل حيوي ضوئي اذ وجدوا وفرة للحوامض الدهنية ذات ذرات الكاربون C16 وC18 وساهم أستر الحامض البالميتيت (C16:0) والبالميتوليت (C16:1) والستيريك (C18:0) والاوليك (C18:1) واللينوليت (C18:2)

واللينولينت (C18:3) بنسبة عالية من إجمالي محتوى FAME، بخلاف احتواء الطحلب قيد الدراسة على أعلى نسبة من أستر المايرستيت (C14:0) وهو من أسترات الأحماض الدهنية المشبعة المهمة في انتاج الوقود الحيوي. وقد بين Bagchi [20] في دراستهم الى أن تحديد محتويات الدهون في الوقود الحيوي المنتج من الطحلب *S. obliquus* GA 45 خلال التغيرات الموسمية قد ارتفع فيه المحتوى الكلي من الأحماض الدهنية غير المشبعة المتعددة poly-unsaturated fatty acid (PUFA) الى الحد الأقصى خلال الأشهر الدافئة مما يشير الى تأثير الحرارة في تحفيز انتاج الاحماض الدهنية المحتوى الكلي من الأحماض الدهنية غير المشبعة المتعددة، كما أشارت الدراسة الى أن الكمية العالية من الأحماض الدهنية المشبعة (بنسبة 85 %) والموجودة في زيت الطحالب تنتج وقوداً حيويا نوعياً، وأن التغييرات الموسمية خلال فصول السنة كان لها تأثير ملحوظ في نسب الاحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة تبعا لتغير الظروف الجوية.

الجدول (5) استرات الاحماض الدهنية المفصولة بتقنية GLC المنتج من طحلب *S. dimorphus*

ت	الحامض الدهني	عدد ذرات الكربون	مساحة الحامض الدهني (%)	الحامض الدهني (%)	زمن احتجاز الحامض الدهني (دقيقة)	زمن احتجاز الحامض الدهني القياسي (دقيقة)
1	Hexanoic (caproic)acid	C6:0	0.2941	2.036	7.094	6.015
2	Myristic acid	C14:0	6.8052	47.105	15.255	15.578
3	Myristoleic acid	C14:1	0.1964	1.359	16.341	16.098
4	Palmatic acid	C16:0	0.0792	0.547	17.574	17.785
5	Stearic acid	C18:0	0.2368	1.639	19.818	20.731
6	Linoleic acid	C18:2	0.0323	0.224	22.815	21.959
7	Lignoceric acid	C24:0	1.0392	7.193	29.322	29.456
مجموع مساحات الاحماض الدهنية في العينة			8.6832	60.103	ألاحماض الدهنية الكلية (%)	
مجموع مساحات المتبقيات في العينة			5.7638	39.896	المتبقيات (%)	
المجموع الكلي لمساحات العينة			14.447	99.999	الدهن الكلي للعينة (%)	

أما المحتوى الدهني الخلوي للطحلب *C. vulgaris* فقد فتم تشخيص عدد من استرات الاحماض الدهنية والمبينة في الجدول (5) والملحق (3) اذ ظهرت استرات الاحماض الدهنية المشبعة بنسبة 26.94% بينما كانت استرات الاحماض الدهنية الغير مشبعة بنسبة 13.178%، ومن هذه النتائج تبين أن النسبة الأكبر التي تم الحصول عليها من أسترات الاحماض الدهنية كانت لصالح الاحماض الدهنية المشبعة في طحلب *C. vulgaris* وكان في مقدمتها أستر الحامض الدهني الحاوي على 16 ذرة كاربون ونسبة قليلة من أسترات الاحماض الدهنية المشبعة الاخرى، بينما ظهرت نسبة أسترات الاحماض الدهنية الاحادية عديمة التشبع قليلة جداً. ويعزى ظهور أستر البالمتيت الحاوي على 16 ذرة كاربون بنسبة عالية مقارنة ببقية الأسترات المشبعة وغير المشبعة الى التوافق في النتائج التي توصل اليها العديد من الدراسات التي تشير الى أن أستر البالميتيت (C16:0) من الأسترات المهمة في الطحالب الدقيقة. فقد أكد Stansell [34] أن محتوى الدهون المستخدمة لإنتاج الوقود الحيوي يتكون أساساً من أسترات الأحماض الدهنية (C16:0) و (C18:1). كما ذكر Nautiyal [35] أن المكون الرئيس الموجود من بين أسترات الأحماض الدهنية للطحالب الدقيقة هو البالمتيت (C16: 0) وبنسبة حوالي 35 %. وهي مقاربة لدراسة Kusumaningrum و Zainuri [24] التي أكدت وجود أسترات الاحماض الدهنية C18–C16 في زيوت الطحلب *C. vulgaris* اضافة لوجود أسترات الحوامض C22–C20 المشبعة وغير المشبعة والعديدة عدم التشبع، كما ظهرت النتائج متوافقة لما أشار اليه Hempel [36] بأن هناك تركيزاً منخفضاً للغاية من أسترات الحامض اللينوليت (C18:2) واللينولينت (C18:3) وبلغت 1.41% و 0.19 % في دهون الطحلب *Chlorella sp.* على التوالي.

الجدول (5): استرات الاحماض الدهنية المفصولة بتقنية GLC المنتج من طحلب *Chlorella vulgaris*

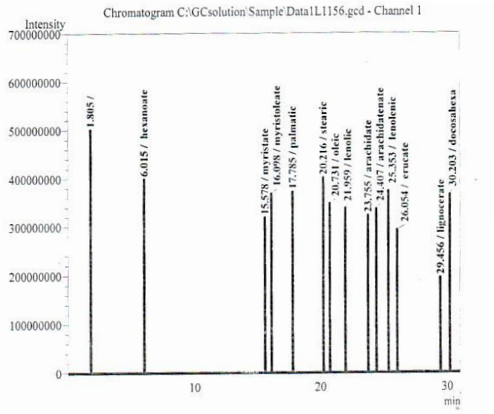
ت	الحامض الدهني	عدد ذرات الكربون	مساحة الحامض الدهني (%)	الحامض الدهني (%)	زمن احتجاز الحامض الدهني (دقيقة)	زمن احتجاز الحامض الدهني القياسي (دقيقة)
1	Caproic acid	C 6:0	0.0953	0.4170	7.090	6.015
2	Myristic acid	C 14:0	0.0444	0.1950	15.485	15.578
3	Palmatic acid	C 16:0	5.9227	25.906	17.154	17.785
4	Stearic acid	C 18:0	0.0355	0.1550	20.026	20.216
5	Linoleic acid	C 18:2	0.0213	0.0930	21.690	21.959
6	Arachidic acid	C 20:0	0.0260	0.1140	23.644	23.755
7	Arachidonic acid	C 20:4	2.9916	13.085	24.269	42.407
8	Lignoceric acid	C 21:0	0.0346	0.1510	29.343	29.456
مجموع مساحات الاحماض الدهنية في العينة			9.1714	40.116	الاحماض الدهنية الكلية (%)	
مجموع مساحات المتبقيات في العينة			13.6904	59.883	المتبقيات (%)	
المجموع الكلي لمساحات العينة			22.8618	99.999	الدهن الكلي للعينة (%)	

فيما بينت أسترات الاحماض الدهنية المشخصة للطحلب *Chlo. humicola* والمبينة في الجدول (6) والملحق (4) ظهور استرات الاحماض الدهنية المشبعة بنسبة 47.71% بينما كانت نسبة الاحماض الدهنية الغير مشبعة الظاهرة 28.44%. وتشير هذه النتائج ان نسبة أسترات الاحماض الدهنية المشبعة في طحلب*Chlo. humicola* تشكل النسبة الأكبر من مجموع الأحماض الدهنية الكلية، كما ظهرت نسبة قليلة من أسترات الأحماض الدهنية أحادية ومتعددة عدم التشبع كان في مقدمتها أستر الحامض الدهني غير المشبع الحاوي على 18 ذرة كاربون مع نسبة ضئيلة جداً من أسترات الأحماض الدهنية غير المشبعة الأخرى. كما وجدت دراسة Santhoshkumar [23] أن اجمالي نسب الأحماض الدهنية في طحلب *Chlo. humicola* بلغت 70 % منها أحماض دهنية أحادية متشبعة، و17.4 % من أحماض دهنية أحادية عديمة الشبع و2.12 % من أحماض دهنية غير مشبعة متعددة. واظهرت نتائج الدراسة الحالية أن هناك نسبة عالية من أستر الحامض الدهني المشبع الاركيديت (C20:0) والذي يقع ضمن حدود ذرات الكاربون المهمة في أنتاج الوقود الحيوي. وقد بينت دراسة Harwati [37] أن محتوى الدهون العالي وتركيب الأحماض الدهنية يجعل من سلالة *Chlorococcum sp.* مورداً مهما للوقود الحيوي. وبينت دراسة Karemore [38] أن الزيوت التي تحتوي على نسبة عالية من الأحماض الدهنية المشبعة لها استقرار تأكسدي جيد مما يساعد في عملية لتخزين أطول، ولا يمكن استخدام الوقود الحيوي المشتق من هذه الزيوت في المناطق الباردة لأنه ستكون له خاصية ضعف نقطة توصيل بسبب البرودة، ولذلك يمكن استخدام زيت الطحلب *Chlo. infusionium* كمادة أولية لإنتاج الوقود الحيوي في المناطق الحارة والاستوائية، وإن للمحتوى العالي للوقود الحيوي المنتج من أستر البالميتيك (C16:0) يعطي استقراراً عالياً وعدداً أكبر من Cetane Number (CN) وذلك لأن الأحماض الدهنية المشبعة ذات عدد ذرات الكربون C12–C22 والتي تستخرج منها أسترات الحامض الدهني تعمل على زيادة في عدد Cetane وهو مؤشر لضمان سرعة حدوث احتراق الوقود الحيوي والضغط اللازم للاشتعال وهو عامل مهم في تحديد نوعية الوقود من خلال تكوين الدخان الأبيض الأقل ضرراً وتقليل المستوى المرتفع لانبعاثات أكاسيد النيتروجين وتحسين استقرار الوقود الحيوي [32].

الجدول (6): استرات الاحماض الدهنية المفصولة بتقنية GLC المنتج من طحلب ***Chlo. humicola***

زمن احتجاز الحامض الدهني القياسي (دقيقة)	زمن احتجاز الحامض الدهني (دقيقة)	الحامض الدهني (%)	مساحة الحامض الدهني (%)	عدد ذرات الكربون	الحامض الدهني	ت
6.015	6.110	0.8990	0.1003	C 6:0	Caproic acid	1
15.578	15.074	0.0340	0.0037	C 14:0	Myristic acid	2
16.098	16.594	0.0740	0.0083	C 14:0	Myristoleic acid	3
17.785	17.439	7.4280	0.8282	C 16:0	Palmatic acid	4
20.216	20.112	0.0310	0.0035	C 18:0	Stearic acid	5
21.959	22.142	28.371	3.1636	C 18:2	Linoleic acid	6
25.353	24.970	0.0530	0.0059	C 18:3	Linolenic acid	7
23.755	23.284	36.205	4.0372	C 20:0	Arachidic acid	8
24.407	24.175	0.1530	0.0170	C 20:4	Arachidonic acid	9
26.045	26.831	0.0143	0.0016	C 22:1	Erucic acid	10
29.456	29.341	0.0404	0.0045	C 24:0	Lignoceric acid	11
الاحماض الدهنية الكلية (%)		73.302	8.1740	مجموع مساحات الاحماض الدهنية في العينة		
المتبقيات (%)		26.697	2.9770	مجموع مساحات المتبقيات في العينة		
الدهن الكلي للعينة (%)		99.999	11.151	المجموع الكلي لمساحات العينة		

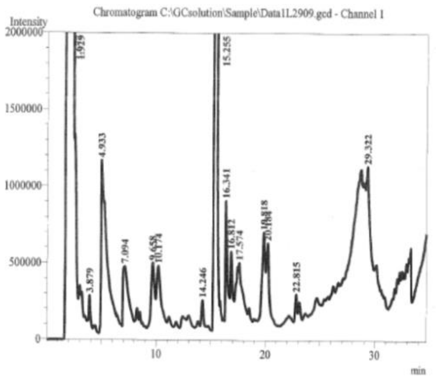
الملحق Supplement :



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret.Time	Area	Area%	Height	Name
1	1.805	485875396	10.1104	7137892	
2	6.015	396752962	8.2559	9239989	hexanoate
3	15.578	313963825	6.5332	8865725	myristate
4	16.098	355729926	7.4022	3478495	myristoleate
5	17.785	367192392	7.6408	3031610	palmatic
6	20.216	389004967	8.0947	0436786	stearic
7	20.731	336512155	7.0024	9217179	oleic
8	21.959	331276170	6.8934	4482742	lenolic
9	23.755	319297295	6.6441	6814879	arachidate
10	24,407	329730751	6.8612	7025272	arachidatenate
11	25.353	359544562	7.4816	7369289	lenolenic
12	26.054	281740343	5.8626	5040260	erucate
13	29,456	186982250	3.8908	7105543	lignocerate
14	30.203	352097753	7.3267	3105229	docosahexa
Total		4805700747	100.0000	2350890	

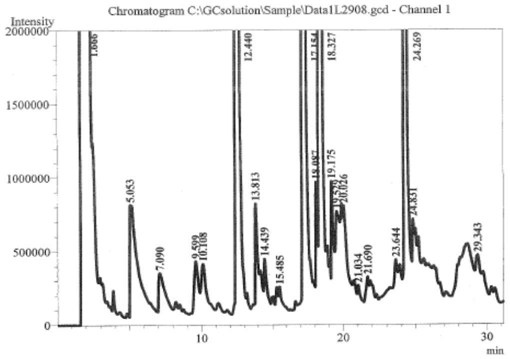
الملحق (1) أستوات الاحماض الدهنية القياسية المشخصة بتقنية.GLC



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret.Time	Area	Area%	Height	Name
1	1.677	3560043704	85.5528	0154644	
2	1.929	187700179	4.5107	3474607	
3	3.879	1394195	0.0335	173662	
4	4.933	20057699	0.4820	1041912	
5	7.094	12239951	0.2941	383761	
6	9.658	7446645	0.1790	382443	
7	10.174	9154193	0.2200	360899	
8	14.246	1922005	0.0462	165662	
9	15.255	283177657	6.8052	9286096	
10	16.341	8173650	0.1964	771479	
11	16.812	3590282	0.0863	367936	
12	17.574	3295045	0.0792	176560	
13	19.818	9855005	0.2368	552949	
14	20.184	8588630	0.2064	485865	
15	22.815	1342175	0.0323	142597	
16	29.322	43242053	1.0392	578679	
Total		4161223068	100.0000	8499751	

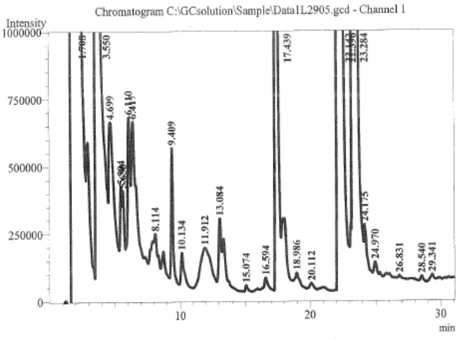
الملحق (2): أستوات الاحماض الدهنية المفصولة من والمشخصة ***S. dimorphes***الخلايا الجافة لطحلب باستخدام تقنية .GLC



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret.Time	Area	Area%	Height	Name
1	1.666	3485303157	77.1382	7195611	
2	5.053	24491202	0.5420	756145	
3	7.090	4304747	0.0953	236090	
4	9.599	6061584	0.1342	331764	
5	10.108	5494358	0.1216	286565	
6	12.440	300649259	6.6541	2814342	
7	13.813	5534473	0.1225	648384	
8	14.439	2307368	0.0511	231809	
9	15.485	2004003	0.0444	114473	
10	17.154	267601749	5.9227	8792524	
11	18.087	5499543	0.1217	694154	
12	18.327	258524558	5.7218	8833233	
13	19.175	4560214	0.1009	628615	
14	19.529	2124111	0.0470	208115	
15	20.026	1602206	0.0355	148260	
16	21.034	589592	0.0130	69961	
17	21.690	960658	0.0213	92388	
18	23.644	1175302	0.0260	129224	
19	24.269	135166784	2.9916	5152428	
20	24.831	2743655	0.0607	260781	
21	29.343	1562736	0.0346	115187	
Total		4518261259	100.0000	7740053	

الملحق (3): أسترات الاحماض الدهنية المفصولة والمشخصة *C. vulgaris* من الخلايا الجافة لطحلب باستخدام تقنية GLC.



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret.Time	Area	Area%	Height	Name
1	1.708	4068557928	88.8495	0399914	
2	3.550	73248771	1.5996	3139330	
3	4.699	13111721	0.2863	521337	
4	5.504	2052862	0.0448	244151	
5	5.650	1871632	0.0409	223694	
6	6.110	4592971	0.1003	410264	
7	6.417	3542200	0.0774	294371	
8	8.114	1168900	0.0255	75054	
9	9.409	4375566	0.0956	482551	
10	10.134	1107052	0.0242	101117	
11	11.912	941702	0.0206	38957	
12	13.084	1672264	0.0365	169557	
13	15.074	170030	0.0037	18559	
14	16.594	377913	0.0083	32021	
15	17.439	37924252	0.8282	2779820	
16	18.986	272960	0.0060	25713	
17	20.112	161675	0.0035	12881	
18	22.142	144865801	3.1636	3700303	
19	22.396	32764457	0.7155	2563831	
20	23.284	184883868	4.0375	4365174	
21	24.175	778201	0.0170	81283	
22	24.970	268699	0.0059	29322	
23	26.831	74266	0.0016	8971	
24	28.540	164208	0.0036	15720	
25	29.341	207644	0.0045	16269	
Total		4579157543	100.0000	9750164	

الملحق (4): أسترات الاحماض الدهنية المفصولة من *Chlo. humicola* والمشخصة الخلايا الجافة لطحلب باستخدام تقنية GLC.

الاستنتاجات Conclusions

اظهرت الدراسة الحالية نجاحاً في تنمية الطحالب الدقيقة *S. dimorphus* ، *C. vulgaris* و *Chlo. humicola* باستخدام مفاعل ضوئي محلي الصنع سعة 5 لتر وبواقع 3 لتر من الوسط الزرعي بعد 25 يوماً من التحضين، وانتاج كتلة حيوية جيدة في الوسط Chu 13 وبلغت اقصاها 1.58 غم لتر $^{-1}$ في الطحلب *S. dimorphus*. كما تم الكشف عن نسب متفاوتة من الدهون الكلية في الكتلة الحيوية الجافة للطحالب قيد الدراسة، والتحري عن أسترات لأحماض دهنية متنوعة في الدهون الكلية للطحالب والتي كانت افضلها في الطحلب الدقيق *S. dimorphus* اذ كانت نسبة استرات الاحماض الدهنية 58.52 % بينما الاحماض الدهنية غير المشبعة بنسبة 1.583% والتي تمثل قيمة جيدة من الاحماض الدهنية في تركيب الوقود الحيوي مقارنة بنسب استرات الاحماض الدهنية في الطحالب الاخرى قيد الدراسة وتشير هذه النسبة لأهمية زيادة نسب استرات الاحماض الدهنية المشبعة التي ترفع من عدد Cetane وهو مؤشر مهم لضمان سرعة حدوث احتراق الوقود الحيوي وهو عامل مهم في تحديد نوعية الوقود من خلال تكوين الدخان الأبيض الأقل ضرراً وتقليل المستوى المرتفع لانبعاثات أكاسيد النيتروجين وتحسين استقرار الوقود الحيوي.

الشكر والتقدير:-

نتقدم بخالص الشكر والعرفان لرئاسة جامعة الموصل لدعمها المتواصل للباحثين والسماح لنا بالعمل في مختبرات الجامعة.

المصادر References

[1] Kotasthane, T.. Mar. Sci. Res. & Dev. 7(2) (2017).
[2] Williams, P.J.L., Laurens, L.M.L. . Ene. Env. Sci. 3, 554–590 (2010).
[3] Chisti,Y.. Biotechnol Advances. 25(3), 294-306 (2007).
[4] Bansal, B. K. and Sharma, M. P. Renew. and Sust. Ene. Rev., 9 (4) 363– 378(2005).
[5] Mata, T.M, Antonio A., Martina, N. and S. Caetano. Renew. and Susta. Ene. Rev. 14: 217–232(2010).

[6] Alam, F., Mobin, S. and H. Chowdhury. Proc. Eng. 105: 763 – 768. (2015).
[7] Yamaguchi,K.;Nakano,H.;Murakami,M.;Kansu,S.;Nakayama,O.;Kanda,M.;Na kmura, A. and Iwamoto, H . Agric. Biol. Chem. 51 :493-498.(1987).
[8] Kais, Md. I., Chowdhury, F. I.and Shahriar, K. F. .World Renew. Ene. Cong. 8-13 May ,Sweden. Bioen. Tech. (2011).
[9] Li, X., Pribyl, P., Bisova, K., Kawano, S. and Cepak, V. . Biotech. and Bioeng., 110(1) (2018).
[10] Ahmed, F., Khan, A. U. and Yasar, Abdulllah. Afri. J. Env. Sci. Tech.7 (6):358-364 (2013).
[11] Mohamed, S. and Nedtham, A. A. .J of Albaath Univ. 37(6) 103-125 (2015). (In Arabic)
[12] Almutairi, A. PhD. Thesis Dept. of Biology and Biotechnology.. Univ. of Sheffield, UK. (2015).
[13] Alekeli. T.M. A. PhD. Thesis. College of Education. for Pure Sciences. Ibn Al Haitham . Baghdad, Iraq (2016) (In Arabic).
[14] Rios, S.. Thesis. Department d'Enginyeria Química. Univ. Roviral Virigli. Tarragona: T 540-2014 (2012).
[15] Halim, R.; Danquah, M. K. and Webley, P. A. J. Biotech. Advan., 30 (3), 709-732 (2012).
[16] Yadavalli,R.;Rao,R.S. and Rao,C.S. Inter. J. Eng. Res. Appl.. 2 (3) 2446-2453 (2012).
[17] Arthur, I. Vogel. Practical Organic Chemistry Including Qualitative Organic Analysis, 3rd ed., p.445 (1972).
[18] Loury, MA . Rev. France. Corps. Gras., 14: 383-9 (1967).
[19] Pugliese, A.; Biondi, L. and Bartocci, P. Ferm.6(46)(2020).
[20] Bagchi, S. K.; Patnaik, R.; Sonkar, S.; Koley, S.; Rao, P. S. and Mallick, N. . Renew. Ene., 139, 976–987 (2019).
[21] Ferro, L.; Gentili, F. G. and Funk, C. . Algal Res. 32, 44–53(2018).
[22] Debowski, M. ; ´nski, M. Z. ; Kisielewska, M. ; Kazimierowicz , J.; Dudek, M. ; Swica, I. and Rudnicka, A.. Proc., 8(5) 1-14 (2020).
[23] Santhoshkumar, K.; Prasanthkumar S. and J. G. . J. Plant Stud., 5(1) p.48 (2016).
[24] Kusumaningrum, H. P. and Zainuri, M. . J. of Foo. Proc. Tech. 9(1)1-5 (2018).
[25] Rosenberg, J. N.; Kobayashi, N.; Barnes, A.; Noel, E. A.;. Betenbaugh, M. J. and Oyler, G. A. Plos. One., 9(4) (2014).
[26] Chng, L. M.; Lee, K. T. and Chan, D. J. C. Ene. Con. Manag. 141, 410–419. (2016).
[27] Al-Hisenawy, S. H. A. MSc. Thesis. Biology Dept. College. of Sciences. Univ. of Thi-Qar. Iraq (2016). (In Arabic)
[28] Bi, Z, and He B. B. .America Soc. Agri. Biol. Eng., 56, 1529-1539 (2013).
[29] Ngoc, L. D. B.; Adenan, M. F.; Bato, B. A.; Mansor, N. and Mahadzir, S. . Inter. J. of Chem.l Eng. and Appl. 4(4) 262–265(2013).
[30] Uma, R. ;Sivasubramanian V. and Devaraj, S. N. Indian. J. Pharm. Sci. Res., 5(1) 19–22(2015).
[31] Abo-Alnaja, H.. Acad. Publishing Library. Egyp. joint stock company. The Arab Republic of Egypt. (2011) (In Arabic)
[32] Tsavatopoulou, V. D.; Aravantinou, A. F. and Manariotis, I. D. J. Chem. Tech. Biotech. 95, 2421–2429 (2020).
[33] Unpaprom, Y.; Tipnee, S. and Rameshprabu, R. . Int. J. Sustain. Green. Energy., 4(1) 1–6(2015).
[34] Stansell, G. R.; Gray, V. M. and Sym, S. D. J. Appl. Phyco., 24, 791-801(2012).
[35] Nautiyal, P.; Subramanian K. A. and Dastidar M.G. Fuel Proc. Tech., 120, 79–88(2014).
[36] Hempel, N.; Petrick, I. and Behrendt, F. J. Appl. Phyco., 24, 1407-1418. (2012).
[37] Harwati, T. U.; Willke, T. and Vorlop, K. D.. Biores. Tech. 121, 54–60 (2012).
[38] Karemore, A.; Pal, R. and Sen, R.. Algal Res. 2(2) 113–121 (2013).