

بررسی اثر دما، آب، حلال آلی و جاذب بر میزان تولید بیودیزل از روغن سویا با استفاده از لیپازهای تثبیت شده بر بستر سیلیکا

محدثه بابکی^۱، صبا قاسمی^{۲*}، پرگل طهماسبی پور^۱، زهره حبیبی^{۱*}

^۱ گروه شیمی آلی و معدنی، دانشکده علوم شیمی و نفت، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۲ گروه شیمی، واحد ایلام، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلام، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده



واژه‌های کلیدی:

تثبیت آنزیم، اتصال کووالانسی،
بیودیزل، روغن سویا،
پایداری حرارتی، سیلیکا

Keywords:

Enzyme immobilization,
Covalent attachment,
Biodiesel, Soybean oil,
Thermal stability, Silica.

دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۹

پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۱۱

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

در این پژوهش، آنزیم‌های *Thermomyces lanuginose lipase (TLL)*، *Rhizomucor miehei lipase (RML)* و *Candida antarctica lipase B (CAL B)* از طریق اتصال کووالانسی بر روی بستر سیلیکای عامل دار شده با گروه‌های اپوکسی تثبیت شدند. بازدهی تثبیت برای این آنزیم‌ها به ترتیب ۹۶٪، ۱۰۰٪ و ۹۶٪ به دست آمد. اتصال گروه‌های عاملی اپوکسید بر روی سطح سیلیکا با استفاده از ترکیب ۳-گلاسیسیدیلوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان انجام شد و با استفاده از طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FT-IR) و آنالیز حرارتی وزنی (TGA) تأیید گردید. اتصال آنزیم به بستر عامل دار شده در بافر فسفات و دمای اتاق انجام گرفت. در بررسی پایداری حرارتی، مشخص شد که مشتقات آنزیمی تثبیت شده نسبت به فرم آزاد، در دماهای بالاتر پایداری بیشتری نشان می‌دهند و فرآیند تثبیت به طور قابل توجهی پایداری حرارتی این آنزیم‌ها را بهبود می‌بخشد. به طور مثال، در دمای ۵۵ درجه سلسیوس، آنزیم آزاد RML پس از ۲ ساعت کاملاً غیرفعال شد، در حالی که فرم تثبیت شده آن ۳۰٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد؛ مشابه آن، CAL B تثبیت شده ۱۰۰٪ از فعالیت خود را در همین دما حفظ نمود. در مرحله بعد، تولید بیودیزل از روغن سویا با استفاده از این آنزیم‌های تثبیت شده مورد ارزیابی قرار گرفت؛ تأثیر عواملی مانند دما، میزان آنزیم، درصد t-بوتانول، میزان آب و سیلیکاژل به عنوان جاذب آب بر راندمان واکنش تولید بیودیزل بررسی گردید. به منظور بررسی معناداری اثر پارامترهای عملیاتی بر راندمان تولید بیودیزل، داده‌های حاصل از آزمایش‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) مورد تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که افزایش دما تا ۵۰ درجه سلسیوس، بهبود قابل توجهی در راندمان تولید بیودیزل ایجاد می‌کند و این دما، به عنوان دمای مؤثر و عملیاتی برای واکنش شناسایی شد. علاوه بر این بیشترین بازدهی تولید بیودیزل با مقدار ۱۳٪ از این مشتقات آنزیمی تثبیت شده نسبت به وزن روغن به دست آمد. سیلیکاژل تأثیر مثبتی بر روند تولید بیودیزل برای هر سه مشتق آنزیمی تثبیت شده نشان داد و بیشترین بازده در مقدار ۳۰٪ از این جاذب آب حاصل گردید.

* عهده دار مکاتبات

+E-mail: Sb.ghasemi@iaui.ac.ir & z_habibi@sbu.ac.ir

ارجاع: محدثه بابکی، صبا قاسمی، پرگل طهماسبی پور، زهره حبیبی، بررسی اثر دما، آب، حلال آلی و جاذب بر میزان تولید بیودیزل از روغن سویا با استفاده از لیپازهای تثبیت شده بر بستر سیلیکا، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۲) ۴۵: ۵۷ تا ۸۰ (۱۴۰۵).

در حضور ۳۰٪ از t -بوتانول بازدهی تولید بیودیزل با استفاده از آنزیم‌های TLL و $CAL B$ تثبیت شده به ۱۰۰٪ رسیده و کامل گردید. این در حالی است که این حلال آلی، عامل اصلاح‌کننده‌ی بسیار مؤثری در واکنش تولید بیودیزل با استفاده از آنزیم RML تثبیت شده نبود و بازده را تنها تا ۷۵٪ افزایش داد. در مرحله نهایی، بررسی تکرارپذیری نشان داد که مشتقات آنزیمی TLL و $CAL B$ تثبیت شده در واکنش ترانس‌استری شدن روغن سویا، پس از چند چرخه استفاده‌ی متوالی، بیش از ۹۰٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کنند که بیانگر پایداری عملیاتی و قابلیت استفاده مجدد آن‌ها در فرآیند تولید بیودیزل است. این مطالعه نشان می‌دهد که به کارگیری مشتقات آنزیمی تثبیت شده بر بستر سیلیکای اصلاح شده، راهکاری مؤثر در تولید بیودیزل پایدار و اقتصادی از روغن سویا می‌باشد و می‌تواند گامی مهم در توسعه فناوری‌های سبز و کاهش آلودگی‌های زیست محیطی باشد.

مقدمه

بحران انرژی و ضرورت سوخت‌های جایگزین

در سال‌های اخیر به کارگیری و مصرف بی‌رویه‌ی منابع انرژی به خصوص سوخت‌های فسیلی، منجر به تخلیه‌ی این منابع عظیم زیرزمینی شده است. به طوری که پیش بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰، تقاضای جهانی انرژی ۵۳ درصد افزایش یابد [۱]. از طرفی دیگر استفاده از این سوخت‌های فسیلی آسیب‌های زیست محیطی زیادی را به دنبال داشته و سلامت بسیاری از زیستگاه‌های حیاتی را در معرض انواع تهدیدهای جدی قرار داده است. در حقیقت کاهش سوخت‌های فسیلی تجدیدنپذیر و خطرات زیست محیطی ناشی از مصرف آنها به‌ویژه انتشار گازهای گلخانه‌ای به یک مسئله حیاتی تبدیل شده و اخیراً سرمایه‌گذاری‌ها و مطالعات گسترده‌ای در راستای تأمین انرژی از منابعی که بتوانند جایگزین مناسب این سوخت‌های فسیلی باشند در کشورهای مختلف جهان صورت گرفته و یا در حال انجام است [۲، ۳]. تولید جهانی سوخت‌های زیستی تحت سلطه ایالات متحده آمریکا و برزیل است. آنها تا سال ۲۰۱۸ حدود ۶۹ درصد از کل سوخت‌های زیستی را تولید می‌کردند و در سال ۲۰۲۲ این مقدار تا ۸۰٪ افزایش یافت [۴، ۵]. در این بین بیودیزل همراه با بیه اتانول به عنوان سوخت‌های زیست تخریب پذیر که بتوانند جایگزین مناسب سوخت‌های فسیلی در موتورهای دیزلی باشند، توجه بسیار زیادی را به خود جلب نموده‌اند.

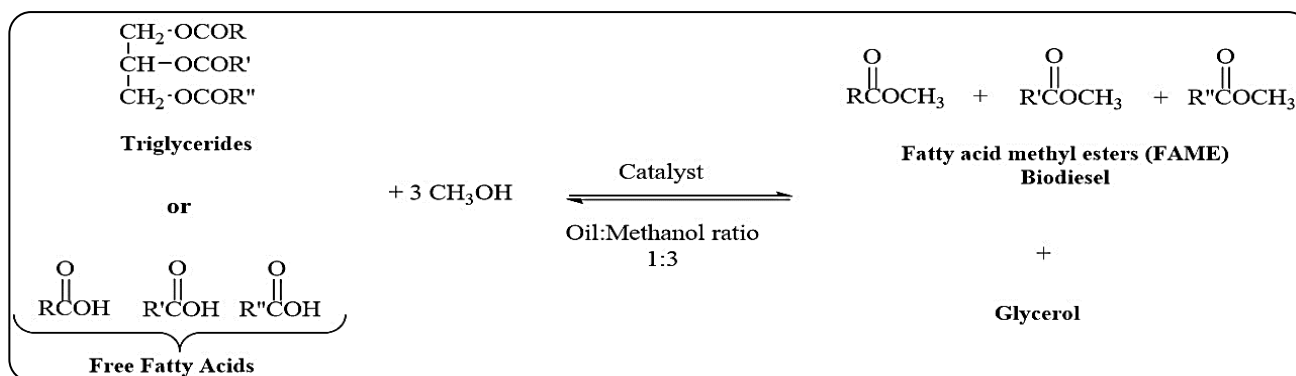
تاریخچه و چالش‌های اولیه تولید بیودیزل

تولید بیودیزل از اوایل قرن بیستم، زمانی که دکتر رادولف دیزل^۱ با موفقیت موتورهای دیزلی معمولی را با استفاده از روغن‌های گیاهی و بدون هیچ گونه اصلاحی به کار انداخت، شروع شد و در دهه‌های ۱۹۳۰ و ۱۹۴۰ استفاده از این روغن‌های گیاهی با محتوای حرارتی بالا

به عنوان سوخت جایگزین در موتورهای دیزلی و به ویژه در موارد اضطراری پرکاربردتر شد. اما با انجام مطالعات گسترده‌تر در این زمینه مشخص شد که استفاده مستقیم از روغن‌های گیاهی و حیوانی به عنوان سوخت دیزل به دلیل جرم مولکولی بزرگ، فراریت کم، پایداری پایین در برابر اکسیداسیون و ویسکوزیته بالا عملکرد موتور را کاهش داده و مشکلات دیگری از جمله تشکیل صمغ و چسبندگی روغن، رسوب زیاد کربن، ساییدگی لاینر موتور، شکست نازل تزریق و ضرورت استفاده از روان کننده‌ی بیشتر را ایجاد می‌کنند [۶-۸]. در راستای غلبه بر این مشکلات و امکان استفاده از این روغن‌ها به عنوان سوخت، روش‌های گوناگونی مورد بررسی قرار گرفت که رایج‌ترین آنها الکل‌دار کردن روغن‌های گیاهی یا همان ترانس‌استری شدن^۲ و تولید بیودیزل می‌باشد. بیودیزل که به صورت آلکیل استر اسیدهای چرب تعریف می‌شود، طی واکنش ترانس‌استری شدن استرهای بلند زنجیر (تری‌گلیسیرید) مشتق شده از روغن‌های مختلف گیاهی، حیوانی، پسماند و جلبک با یک الکل کوتاه زنجیر مانند متانول و اتانول به دست می‌آید. این واکنش برگشت پذیر بوده و محصول جانبی آن که گلیسرول است، در صنایع مختلف غذایی، دارویی و همچنین در تهیه‌ی مواد آرایشی کاربرد دارد [۹، ۱۰]. رایج‌ترین الکل مورد استفاده در این فرآیند، متانول است زیرا علاوه بر اینکه قیمت به نسبت پایینی دارد، متیل استر اسیدهای چرب^۳ (FAME) حاصل از آن مزایای برجسته‌ای مانند وزن مولکولی کمتر تا یک سوم، ویسکوزیته کمتر (تقریباً یک‌هفتم)، نقطه اشتعال کمی پایین‌تر و فراریت بالاتر را نسبت به سایر سوخت‌های تجدیدپذیر جدید از خود نشان می‌دهند. مهم‌ترین متغیرهای مؤثر بر عملکرد بیودیزل در طول ترانس‌استری شدن، دمای واکنش و نسبت مولی الکل به روغن گیاهی هستند (شکل ۱).

(۱) Rudolf Diesel
(۲) Fatty acid methyl ester

(۳) Transesterification



شکل ۱- تولید بیودیزل از واکنش ترانس استری شدن تری گلیسیرید و استری شدن اسیدهای چرب آزاد موجود در روغن با الکل متانول

منابع جهانی بیودیزل و روش‌های تولید

امروزه استفاده از بیودیزل به دلیل کاهش انتشار ذرات معلق، آلودگی کمتر، زیست تخریب پذیری بالا و همین‌طور بهره‌برداری از روغن‌های پسماند خوراکی در کشورهای مختلف جهان امری رایج بوده و از منابع زیستی مختلفی جهت تهیه آن استفاده می‌گردد [۱۱، ۱۲]. به‌عنوان مثال در ایالات متحده آمریکا، ذرت، در برزیل، نیشکر، در اروپا، ذرت، گندم و چغندر قند به‌عنوان ماده اولیه اصلی برای تولید بیواتانول مورد استفاده قرار می‌گیرند. از روغن کلزا و روغن پخت‌وپز نیز به‌طور گسترده‌ای برای تولید بیودیزل استفاده می‌شود. در آرژانتین، برزیل و ایالات متحده مقادیر قابل توجهی از بیودیزل را از دانه سویا و در مالزی و اندونزی از روغن پالم تولید می‌کنند. به علت وسعت کشور چین و محدودیت منابع غذایی، روغن پسماند حاصل از پخت‌وپز و روغن غیر خوراکی جاتروفا به عنوان ماده اولیه تولید بیودیزل مورد استفاده قرار می‌گیرد [۵]. با این حال تولید بیودیزل از این منابع با استفاده از روش ترانس استری شدن واکنشی برگشت پذیر بوده و در غیاب کاتالیست تحت شرایط فوق بحرانی (دما و فشار بالا) به وقوع می‌پیوندد که مصرف بالای انرژی و هزینه‌ی اضافی را به دنبال دارد. بنابراین در راستای بهبود سرعت واکنش و بازده، معمولاً یک کاتالیست با الکل اضافی به سیستم واکنش اضافه می‌شود که تعادل را به سمت تولید محصول تغییر دهد. در این راستا کاتالیست‌های مختلفی از جمله کاتالیست‌های بازی، اسیدی و آنزیمی بصورت همگن و ناهمگن مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۱۳-۱۸].

انواع کاتالیست‌ها در تولید بیودیزل

از کاتالیست‌های بازی بسیار رایج و موثر در فرآیند تولید بیودیزل می‌توان به سدیم و پتاسیم هیدروکسید، متوکسیدها و کربنات‌ها اشاره نمود. اما از آنجایی که روغن‌های گیاهی و روغن‌های سرخ کردنی پسماند حاوی مقادیر کمی اسید چرب آزاد (بیشتر از ۰/۵ درصد) می‌باشند، حضور این کاتالیست‌های بازی منجر به فرآیند صابونی شدن و در نتیجه کاهش بازده و بروز مشکلاتی در فرآوری نهایی محصول می‌گردند و همچنین تولید پساب‌های بازی و مصرف بالای آب را به دنبال دارند.

اسیدهای چرب آزاد موجود در این روغن‌ها باعث غیرفعال‌سازی کاتالیست بازی نیز می‌شوند. در مقابل، ترانس استری شدن روغن‌های گیاهی با محتوای اسید چرب بالا با کاتالیست‌های اسیدی نظیر سولفوریک اسید، فسفریک اسید، هیدروکلریک اسید و سولفونیک اسیدها بهتر انجام می‌شود و بدون تولید صابون است. اما به دلیل خورندگی کاتالیست‌های اسیدی، لزوم شستشوی محصولات برای حذف کاتالیست و نیاز به دمای بالا، در مقیاس صنعتی کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. در برخی موارد به منظور جلوگیری از این مشکلات هر دو کاتالیست اسیدی و بازی را طی دو مرحله مورد استفاده قرار می‌دهند؛ به این ترتیب که ابتدا اسیدهای چرب آزاد را با افزایش کاتالیست اسیدی به متیل استر مربوطه تبدیل می‌کنند و در مرحله دوم به کمک یک کاتالیست بازی تری گلیسریدهای باقی‌مانده به متیل استر تبدیل می‌شوند [۱۹-۲۱]. یکی دیگر از روش‌های بسیار مؤثر جهت غلبه بر این مشکلات استفاده از کاتالیست‌های آنزیمی می‌باشد. برخلاف کاتالیست‌های قلیایی، با استفاده از آنزیم‌ها فرآیند صابونی شدن رخ نمی‌دهد و اسیدهای چرب آزاد و تری‌آسیل گلیسرول‌ها در یک مرحله و بدون نیاز به شستشو به استرهای مربوطه تبدیل می‌شوند که این امر توجه‌کننده اقتصادی بودن این روش است. در حقیقت کاتالیست‌های آنزیمی دوست‌دار محیط زیست بوده و می‌توان با استفاده از آنزیم‌های لیپاز، بیودیزل را با کیفیت بالا، مصرف انرژی کمتر و تحت شرایط ملایم واکنش بدون محصول جانبی تولید نمود [۲۲-۲۴]. در حقیقت آنزیم‌ها زیست کاتالیست‌های سبز طبیعی می‌باشند که بصورت بسیار گزینش‌پذیر و کارآمد عمل می‌کنند. در مقایسه با کاتالیست‌های مرسوم شیمیایی، این کاتالیست‌های زیست تخریب‌پذیر، ویژگی‌های جالبی مثل فعالیت بالا در حلال‌های زیست سازگار نظیر آب، گزینش‌پذیری و عملکرد بالا تحت شرایط ملایم از pH و دما را نشان می‌دهند [۲۵، ۲۶]. آنزیم‌ها به عنوان کاتالیست‌های بسیار مؤثر در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای شیمیایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به‌علاوه پتانسیل بسیار زیادی جهت استفاده در صنعت به‌ویژه در صنایع دارویی و غذایی از خود نشان می‌دهند. توانایی آنها باعث

شده که مطالعات گسترده‌ای در راستای بهبود خواص این کاتالیست های زیستی انجام گردد [۲۷].

تثبیت آنزیم

در بین آنزیم‌ها، لیپازها یا تری آسیل گلیسرول هیدرولازها متعلق به دسته‌ی هیدرولازها می‌باشند که هیدرولیز و سنتز آسیل گلیسرول‌های زنجیره بلند را کاتالیست می‌کنند. در حقیقت سوبستراهای طبیعی لیپازها، تری گلیسیریدهای با حلالیت پایین در آب می‌باشند که تحت شرایط نرمال، هیدرولیز آن‌ها به گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد در مرز بین فاز سوبسترای نامحلول و فاز آبی حاوی آنزیم انجام می‌شود. آنها توانایی گسترده‌ای را در انجام واکنش‌های الکولیز، اسیدولیز، آمینولیز و هیدرولیز در مقیاس صنعتی دارا می‌باشند. تولید بیودیزل توسط لیپاز یکی از کاربردهای خیره کننده‌ی این آنزیم به‌شمار می‌آید که برای اولین بار توسط میتلج^۱ گزارش شد. با استفاده از آنزیم لیپاز می‌توان به آسانی بیودیزل و گلیسرول را بازیابی نمود و این آنزیم قادر است بطور همزمان تری گلیسیریدها و اسیدهای چرب را تحت شرایط دمایی پایین و فشار اتمسفر کاتالیست کند [۲۸]. با این وجود استفاده‌ی صنعتی از آنزیم لیپاز و همین‌طور سایر آنزیم‌ها با محدودیت‌هایی نظیر عدم ثبات عملیاتی و شیمیایی، آلودگی محصولات با باقیمانده‌های آنزیمی، هزینه‌ی بالا، بازیابی دشوار و عدم استفاده مجدد از آنزیم روبرو می‌باشد. بنابراین استفاده از آنزیم‌ها برای تجاری‌سازی گسترده بسته به هزینه‌ها محدود شده و پایداری ساختاری آن‌ها در طول واکنش‌های شیمیایی مسئله‌ی بسیار چالش‌برانگیز و مهم است [۲۹]. یکی از روش‌های بسیار کارآمد و مؤثر در راستای رفع این محدودیت‌ها، تثبیت آنزیم می‌باشد؛ تثبیت آنزیم، ثابت کردن یک یا چند آنزیم در یک فضای خاص است که در مرسوم‌ترین حالت آنزیم به یک بستر جامد متصل می‌شود و به حالت ناهمگن در می‌آید. این روش منجر به بهبود راندمان واکنش، افزایش پایداری شیمیایی و حرارتی آنزیم و همین‌طور دسترسی آسان به مکان‌های فعال کاتالیست می‌شود. از همه مهم‌تر اینکه تثبیت آنزیم منجر به جداسازی راحت زیست‌کاتالیست از مخلوط واکنش شده و تولید محصول با خلوص بالا را فراهم می‌آورد که در نتیجه کاهش قابل توجهی در هزینه را به دنبال خواهد داشت و کاربرد صنعتی آنزیم را به‌صورت مداوم و ثابت امکان‌پذیر می‌سازد [۲۷، ۳۰]. با این حال، تثبیت آنزیم علیرغم مزایای فراوان، با محدودیت‌هایی نیز همراه است که در ارزیابی کارایی آن باید مورد توجه قرار گیرد. فرآیند تثبیت معمولاً مستلزم استفاده از بستر، مواد شیمیایی فعال‌کننده و مراحل آماده‌سازی چندگانه است که می‌تواند هزینه نهایی زیست‌کاتالیست را افزایش دهد. علاوه بر این،

برخی از روش‌های تثبیت نظیر اتصال کووالانسی یا محصورسازی آنزیم ممکن است موجب تغییرات ساختاری در آنزیم شده و دسترسی سوبسترا به جایگاه فعال را کاهش دهد که در نهایت به افت فعالیت ویژه یا حتی غیرفعال شدن آن منجر می‌شود. محدودیت‌های انتقال جرم، به‌ویژه در بسترهای متراکم یا نانوبسترها، نیز می‌تواند سرعت واکنش را تحت تأثیر قرار دهد. همچنین احتمال غیرفعال شدن تدریجی آنزیم در طی چرخه‌های استفاده مجدد و دشواری کنترل یکنواختی فرآیند تثبیت از دیگر چالش‌های مطرح در این حوزه به‌شمار می‌رود [۲۷، ۲۹].

تا به امروز روش‌های مختلفی برای تثبیت آنزیم‌های لیپاز و استفاده از آن‌ها به‌عنوان کاتالیست‌های ناهمگن در تولید بیودیزل به کار گرفته شده است. به عنوان مثال، شی و هو/نگ^۲ کامپوزیت‌های مغناطیسی $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIL-100}(\text{Fe})$ را با ساختار هسته-پوسته سنتز نمودند. بستر مغناطیسی حاصل را جهت تثبیت آنزیم *Candida rugosa lipase* (CRL) به روش اتصال کووالانسی مورد بررسی قرار دادند. میزان کارایی آنزیم تثبیت شده بر روی این بستر، ۸۳٪/۱ و بازیابی فعالیت آن به میزان ۶۳٪/۵ گزارش شده است. زیست کاتالیست به‌دست آمده در تولید بیودیزل از روغن سویا مورد ارزیابی قرار گرفت که حداکثر بازدهی تولید بیودیزل با استفاده از این زیست کاتالیست، ۹۲٪/۳ در نسبت مولی ۴:۱ از متانول به روغن و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس گزارش شده است [۳۱]. شایان ذکر است که در این تحقیق متانول طی سه مرحله به واکنش اضافه شده است. ضمن اینکه زیست کاتالیست حاصل پس از پنج بار استفاده‌ی مجدد، حدود ۸۳٪/۶ از فعالیت اولیه خود را حفظ نموده است (جدول ۱، مورد ۱). در پژوهش دیگری، سلول کامل قارچی *Aspergillus oryzae* که به‌طور مهندسی شده قادر به تولید مقدار زیادی از آنزیم CAL B می‌باشد، بر روی بستری از جنس فوم پلی‌اورتان رشد داده شد. سلول کامل قارچی تثبیت شده پس از لیوفیلیزه شدن، به‌عنوان کاتالیست در فرآیند تولید بیودیزل از روغن سویا و پالم مورد استفاده قرار گرفت [۳۲]. در این سیستم، روغن سویا و پالم ابتدا توسط آنزیم CRL هیدرولیز گردید و سپس اسیدهای چرب حاصل به‌وسیله‌ی کاتالیست r-CAL B به متیل استر تبدیل شدند. نتایج نشان داد که r-CAL B قادر است تنها با یک مرحله افزودن متانول و بدون نیاز به افزودن تدریجی متانول یا آب، بازدهی بیش از ۹۰٪ متیل استر در مدت زمان ۶ ساعت ایجاد کند (جدول ۱، مورد ۲). ژنگ^۳ و همکاران در سال ۲۰۲۰، آنزیم TLL که آنزیمی با پایداری دمایی بالا می‌باشد را از طریق اتصال عرضی و کووالانسی بر روی رزین‌های ماکرومخلخل تثبیت نموده و سپس برای تولید بیودیزل از روغن سویا مورد استفاده قرار دادند که با بازدهی ۹۸٪ همراه بوده است (جدول ۱، مورد ۳) [۳۳].

(۱) Mittelbach
(۳) Zheng

(۲) Xie and Huang

جدول ۱- شرایط تثبیت آنزیم‌های مختلف جهت تولید بیودیزل

مورد	آنزیم لیپاز	روش تثبیت	بستر مورد استفاده	بازده بیودیزل (%)	شرایط مطلوب واکنش	مرجع
۱	<i>Candida rugosa</i> lipase	اتصال کووالانسی	Fe ₃ O ₄ @MIL-100(Fe)	۹۲/۳	بیشترین بازده در نسبت مولی ۴:۱ از متانول به روغن سویا و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس گزارش شده است.	Xie and Huang, 2019
۲	<i>Candida antarctica</i> lipase B	جذب سطحی	پلی‌یورتان اصلاح شده	۹۰	در نسبت ۱/۵:۱ از روغن پالم یا سویا به متانول، ۰/۵ گرم آب، دمای ۳۰ درجه و مدت زمان ۴۸ ساعت واکنش انجام شده است.	Adachi et al., 2013
۳	<i>Thermomyces</i> Lanuginosus lipase	اتصال عرضی و تثبیت کووالانسی	رزین ماکرومتخلخل	۹۸	واکنش با مقدار ۱۰ گرم از روغن سویا، ۴ میلی‌لیتر متانول، در دمای ۵۰ درجه به مدت ۸ ساعت در حلال t-بوتانول انجام شده است.	Zheng et al., 2020
۴	<i>Rhizomucor Miehei</i> lipase	ان-کپسوله کردن	چارچوب آلی-فلزی ZIF-8	۹۵	در نسبت مولی ۴:۱ از روغن سویا به اتانول، ۲۰ درصد جرمی ایزواکتان، ۹ درصد جرمی آب، دمای ۴۵ درجه و مدت زمان ۲۴ ساعت بیشترین بازده به‌دست آمده است.	Adnan et al., 2018
۵	<i>Rhizopus oryzae</i> lipase	کووالانسی	رزین آنیونی آمبرلیت IRA-93	۹۰/۵	از روغن سویا و متانول با نسبت ۴/۸:۱ در دمای ۳۷ درجه و مدت زمان ۱۲ ساعت استفاده شده است.	Wang et al., 2010
۶	<i>Pseudomonas fluorescens</i> lipase	کووالانسی	کربن نانوتیوب‌های عامل‌دار شده با گروه‌های آمینی	۹۹	بیشترین بازدهی تولید بیودیزل در نسبت مولی ۵:۱ از روغن آفتابگردان به اتانول، ۵۰۰ میکرولیتر ایزواکتان، دمای ۳۰ درجه و مدت زمان ۴ ساعت گزارش شده است.	Bartha-Vári et al., 2020

هدف پژوهش حاضر

در مطالعات بیان شده در بخش قبل، علی‌رغم گزارش بازده‌های قابل توجه در تولید بیودیزل، عمدتاً بر طراحی بسترهای پیچیده نظیر چارچوب‌های آلی-فلزی، نانوکامپوزیت‌های مغناطیسی و رزین‌های اختصاصی متمرکز بوده‌اند که تهیه آن‌ها مستلزم مراحل سنتزی چندگانه، مواد اولیه گران‌قیمت و شرایط عملیاتی خاص است؛ موضوعی که کاربرد صنعتی و مقیاس‌پذیری آن‌ها را با چالش اقتصادی مواجه می‌کند. از سوی دیگر، در اغلب این پژوهش‌ها هر آنزیم به‌صورت جدا و بر روی یک بستر خاص بررسی شده و مطالعه‌ای نظام‌مند و مقایسه‌ای میان لیپازهای متداول و در دسترس صنعتی نظیر RML، CAL B و TLL تحت شرایط یکسان واکنشی گزارش نشده است. در سال‌های اخیر سلیکا به دلیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی شاخص خود، توجه گسترده‌ای را در زمینه‌ی تثبیت آنزیم به‌دست آورده است. این ماده به‌واسطه سطح ویژه بسیار بالا، ساختار متخلخل قابل تنظیم و حضور گروه‌های فعال سطحی مانند سیلانول، امکان بارگذاری زیاد آنزیم و ایجاد برهم‌کنش‌های پایدار را فراهم می‌کند. پایداری حرارتی و شیمیایی قابل‌توجه سلیکا سبب می‌شود که آنزیم تثبیت‌شده در شرایط عملیاتی دشوار نیز دوام بیشتری داشته باشد. افزون بر این، قابلیت اصلاح‌پذیری سطح موجب می‌شود روش‌های مختلفی مانند

در پژوهش دیگری، آنزیم RML در چارچوب آلی-فلزی ZIF-8 که از فلز روی و لیگاند‌های ایمیدازولی تهیه می‌شود محصور گردید [۳۴]. لیپاز کپسوله‌شده (RML@ZIF-8) بازیابی فعالیت بی‌سار بالا — حدود ۲۶ برابر بیشتر از آنزیم آزاد — نشان داد. این نانوکاتالیست زیستی در واکنش ترانس‌استری شدن روغن سویا در حضور ایزواکتان عملکرد چشمگیری را نشان داد و در شرایط عملیاتی مطلوب، بازده ۹۵/۶٪ بیودیزل را ایجاد نمود (جدول ۱، مورد ۴). وانگ^۱ و همکاران، لیپاز نو ترکیب *Rhizopus oryzae* را از طریق اتصال کووالانسی بر روی رزین آنیونی Amberlite IRA-93 تثبیت نموده و سپس کارایی زیست کاتالیست حاصل را در تولید بیودیزل در یک سامانه فاقد حلال بررسی کردند [۳۵]. نتایج نشان داد که حضور رزین آنیونی به‌عنوان حامل آنزیم، باعث افزایش مهاجرت آسیل در واکنش ترانس‌استری شدن با متانول شده و در نتیجه بازده تولید بیودیزل را حدود ۴ تا ۸ درصد بهبود می‌دهد. بالاترین بازده تولید بیودیزل ۹۰/۵ درصد، گزارش شده است (جدول ۱، مورد ۵). از جالب‌ترین نتایج می‌توان به تثبیت آنزیم *Pseudomonas fluorescens* lipase به روش کووالانسی بر روی کربن نانوتیوب‌های فعال شده با گروه آمینی اشاره نمود که در تهیه بیودیزل از روغن آفتابگردان مورد استفاده قرار گرفته و با بازدهی ۹۹٪ همراه بوده است (جدول ۱، مورد ۶) [۳۶].

(۱) Wang

جدول ۲- آنالیز روغن سویا

اسیدهای چرب آزاد (%)	رطوبت (%)	وزن مولکولی	عدد صابونی شدن
۱۰/۱۱	۰/۰۷	۸۷۵/۵	۱۹۱/۸۹

جدول ۳- درصد مهمترین اسیدهای چرب موجود در روغن سویا

اسید چرب	درصد (%)	اسید چرب	درصد (%)	اسید چرب	درصد (%)
اولئیک اسید	۲۱/۷۳	لوریک اسید	۰/۱	استئاریک اسید	۴/۵۱
لینولئیک اسید	۵۲/۲۳	میریسیتیک اسید	۰/۰۷	لیگنوسریک اسید	۰/۱۶
پالمیتیک اسید	۱۰/۸۴	آرشدیک اسید	۰/۳۸	سایر اسیدهای چرب	۱۰/۷

آنزیم CAL B (۱۷۷۰ U/g) از شرکت نووزیم و روغن سویا از شرکت کشت و توسعه دانه‌های روغنی دریافت گردید. ترکیب ۳-گلاسیدیلوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان از شرکت آکروس تهیه گردید. سایر مواد شیمیایی نیز به صورت تجاری در دسترس قرار گرفتند.

آنالیز روغن

درجه صابونی‌شدن، میزان رطوبت، درصد و پروفایل اسیدهای چرب روغن سویا قبل از استفاده تعیین شد. شایان ذکر است، عدد صابونی شدن، مقدار KOH لازم بر حسب میلی گرم برای صابونی کردن یک گرم از روغن می‌باشد که معیاری برای محاسبه وزن مولکولی روغن است. مقدار آب موجود در روغن بر اساس روش تیتراسیون کارل فیشر تعیین گردید. نتایج بدست آمده در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

مشخصات دستگاه‌ها

فعالیت آنزیم‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر Eppendorf مدل BioPhotometer plus مورد بررسی قرار گرفت. دستگاه کروماتوگرافی گازی Thermo-Quest-Finnigan مجهز به ستون RTX-1 و دتکتور FID برای بررسی میزان درصد تبدیل بیودیزل استفاده گردید.

آماده سازی بستر سیلیکا

خشک کردن سیلیکا

به منظور فعال سازی سطحی بستر، ابتدا مقدار ۱ گرم سیلیکا به ۳۰۰ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک ۵٪ اضافه گردید و توسط همزن مغناطیسی هم زده شد. بعد از دو ساعت، سوسپانسیون حاصل صاف گردید و سپس با آب مقطر شست‌وشو داده شد تا ذرات سیلیکا به خوبی جدا شوند. در مرحله‌ی بعد به ذرات سیلیکا محلول ۲۵٪ اسید سولفوریک و ۱۵٪ آب اکسیژنه اضافه گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط حاصل توسط همزن مغناطیسی هم زده شد. پس از صاف کردن و شست‌وشوی مجدد با آب مقطر و به منظور فعال سازی گروه‌های سیلانول سطحی، ذرات سیلیکای حاصل به مدت ۸ ساعت در کوره با دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند [۳۷].

جذب فیزیکی، اتصال کووالانسی و محصورسازی برای تثبیت آنزیم‌ها به کار گرفته شود، بدون آنکه ساختار طبیعی آنزیم به طور قابل توجهی دچار تخریب شود. همچنین بی اثر بودن شیمیایی و قیمت مناسب سیلیکا، آن را به گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای صنعتی و مقیاس بالا تبدیل کرده است [۳۷، ۲]. با توجه به مزایای گفته شده، در پژوهش حاضر سه آنزیم لپاز RML، CAL B و TLL بر روی بستر سیلیکا، که طی یک مرحله با استفاده از ۳-گلاسیدیلوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان (3-GPTMS) اصلاح شده است، به روش کووالانسی تثبیت گردید و استفاده از آن‌ها به عنوان زیست کاتالیست در تهیه ی بیودیزل از روغن سویا مورد بررسی قرار گرفت. برخلاف مطالعات پیشین حییبی و همکاران که تمرکز آن‌ها بر روغن کلزا بوده است، در مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی اثر روغن بر روند تولید بیودیزل و کارایی مشتقات تثبیت شده‌ی آنزیمی، از روغن سویا استفاده شده است. روغن سویا از نظر فراوانی تولید، بعد از روغن کلزا بیشترین سطح زیر برداشت را در کشور دارد. بر همین اساس استفاده از این روغن به عنوان منبعی برای تولید بیودیزل می‌تواند از لحاظ زیست محیطی و اقتصادی اهمیت به سزایی داشته باشد [۳۷، ۲]. به این منظور اثر پارامترهای مختلف مانند دما، آب، حلال آلی و جاذب سیلیکاژل بر بازدهی تولید بیودیزل از این روغن نیز ارزیابی شد. انتخاب سه لپاز RML، CAL B و TLL بر اساس شواهد متعدد مطالعات پیشین انجام شده است که کارایی بالای این آنزیم‌ها را در سنتز بیودیزل نشان داده‌اند. لپاز RML به دلیل عملکرد مناسب در برابر اسیدهای چرب بلند زنجیر، یکی از گزینه‌های مؤثر در ترانس استری شدن روغن‌های گیاهی است. لپاز TLL به عنوان یکی از فعال ترین لپازهای تجاری، بازده بالایی در حضور حلال‌های آلی و حتی در سامانه‌های بدون حلال دارد. در مقابل، CAL B به سبب پایداری بالا، تحمل مناسب نسبت به الکل‌ها و سازگاری گسترده با انواع بسترهای تثبیت، یکی از پرکاربردترین لپازها در بیوکاتالیست‌های صنعتی و تولید بیودیزل محسوب می‌شود [۳۴، ۳۲]. مجموعه این ویژگی‌ها، همراه با تفاوت‌های ساختاری و عملکردی هر سه آنزیم، فرصت مناسبی برای مقایسه رفتار آنها بر روی یک بستر اصلاح شده یکسان فراهم می‌کند.

بخش تجربی

مواد مصرفی

جهت انجام این پژوهش، ترکیبات تترا اتیل اورتوسیلیکات (TEOS)، تری اتیل آمین، سیلیکاژل آبی و حلال‌های مورد استفاده از شرکت مرک خریداری شدند. مشتقات استری، سیلیکاژل با مش ۷۰-۲۳۰ و اندازه ذرات ۰/۶۳-۰/۲ میلی متر و آنزیم‌های لپاز TLL (۱۲۸۰ U/g) و RML (۲۰۵۰ U/g) از شرکت سیگما تهیه شدند.

اصلاح سطحی بستر سیلیکا

برای اصلاح سطحی بستر سیلیکا، ابتدا ۱ گرم از سیلیکای فعال شده به همراه ۰/۱۵ میلی لیتر تری اتیل آمین به بالن حاوی ۵۰ میلی لیتر تولوئن خشک افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد. به منظور اپوکسی دار کردن سطح بستر به مخلوط واکنش یک میلی لیتر ۳-گلاسیسیدیلوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان اضافه شد. سپس واکنش به مدت چهار ساعت تحت شرایط رفلاکس در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس و جو آرگون انجام شد. بستر عامل دار شده صاف و با کلروفرم شستشو داده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا خشک گردد. برای اطمینان از اتصال گروه های عاملی بر روی بسترها، آنالیز FT-IR با استفاده از روش قرص سازی با KBr انجام گرفت [۳۷].

تعیین مقدار گروه های اپوکسی موجود بر سطح بستر

به منظور تعیین مقدار گروه های اپوکسی متصل به بستر، ۱/۵ میلی لیتر سدیم تیوسولفات ۱/۳ مولار به ۲۰۰ میلی گرم از بستر عامل دار شده با گروه های اپوکسی اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت هم زده شد. در نتیجه ی انجام این واکنش، گروه های هیدروکسیل آزاد می شدند. در مرحله ی بعد گروه های هیدروکسیل آزاد شده در محیط واکنش با اسید کلریدریک ۰/۱ مولار تیترو گردید و با محاسبه حجم اسید مصرف شده، میزان گروه های اپوکسی متصل شده بر سطح بسترها به دست آمد [۳۸].

تثبیت کوالانسی آنزیم لیپاز بر روی بستر سیلکای عامل دار شده با گروه های اپوکسی

به ۱ گرم از بستر سیلیکای اصلاح شده ی سطحی با گروه های اپوکسی، ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات (۲۵ mM, pH=7) حاوی ۱۰ میلی گرم آنزیم لیپاز اضافه گردید. به منظور بررسی فعالیت آنزیمی، ۵۰ میکرو لیتر از محلول حاوی آنزیم به عنوان شاهد برداشته شد. مخلوط واکنش به مدت ۲۴ ساعت در شیکر هم زده شد. به منظور محاسبه ی مقدار آنزیم تثبیت شده بر روی بستر، از محلول فوقانی در زمان های مختلف نمونه برداری صورت گرفت. در نهایت مخلوط واکنش فیلتر شده و محلول رویی آن جهت تعیین میزان اتصال آنزیم به بستر جداسازی و جمع آوری شد و سپس آنزیم تثبیت شده بر روی بستر چندین بار با بافر فسفات جهت حذف آنزیم هایی که روی سطح بستر اتصال نیافته اند، شست و شو داده شد. مقدار آنزیم تثبیت شده به بستر از طریق تست بردفورد^۱ در طول موج ۶۲۰ nm با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه گیری شد [۳۹].

بازده تثبیت آنزیم بر روی بستر مطابق با معادله زیر تعیین می گردد.

$$\text{Immobilization yield (\%)} = \left[\frac{P_0 - P_1}{P_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

که در این معادله P_0 مقدار کل آنزیم موجود در محلول اولیه مورد استفاده برای فرآیند تثبیت و P_1 مقدار آنزیم باقیمانده در محلول رویی است. این اختلاف بر مقدار کل آنزیم اولیه تقسیم و سپس حاصل در ۱۰۰ ضرب شد تا بازده تثبیت (بر حسب درصد) به دست آید.

تعیین فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم های لیپاز در حالت آزاد و تثبیت شده بر روی بستر سیلیکا از طریق اندازه گیری پارا-نیترو فنول حاصل از هیدرولیز پارا-نیترو فنیل بوتیرات (p-NPB) با روش اسپکترومتری در طول موج ۳۴۸ نانومتر تعیین شد. برای انجام این آزمایش، محلول واکنش تشکیل شده از آنزیم مورد نظر و استاندارد پارا نیترو فنیل بوتیرات (محلول ۰/۴ میلی مولار پارا نیترو فنیل بوتیرات در استونیتریل) در بافر سدیم فسفات (۲۵ میلی مولار با pH = 7) تهیه گردید. مخلوط واکنش در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در ترموبلاک شیکردار هم زده شد. پس از جداسازی آنزیم تثبیت شده از مخلوط واکنش، میزان جذب نوری محلول روئی در طول موج مورد نظر اندازه گیری شد. یک واحد لیپاز معادل مقدار آنزیمی است که بتواند در مدت یک دقیقه یک میکرومول پارا نیترو فنول را آزاد نماید.

آزمایش واجذب آنزیم

برای اطمینان از اتصال کوالانسی آنزیم بر روی بستر، به ۵۰۰ میلی گرم از آنزیم تثبیت شده (۱۰ میلی گرم به ازای یک گرم بستر سیلیکا-اپوکسی)، محلول یک مولار NaCl و ساکارز لورات ۰/۵٪ اضافه و به مدت ۲۴ ساعت هم زده شد. بعد از این بازه زمانی، جهت تعیین مقدار آنزیم های تثبیت شده بر روی بستر به روش جذب سطحی، از محلول رویی تست بردفورد به عمل آمد.

بررسی پایداری حرارتی آنزیم های آزاد و مشتقات تثبیت شده بر روی بستر

جهت بررسی اثر تثبیت بر میزان پایداری حرارتی آنزیم، فعالیت کاتالستی آنزیم تثبیت شده بر روی سطح بستر در مقایسه با فرم آزاد آن در دماهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و فعالیت آنزیم به صورت نسبی گزارش گردید. در این راستا آنزیم در حالت آزاد (یک میلی گرم پروتئین در یک میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۲۵ میلی مولار با pH=7) و تثبیت شده (۱۲۵ میلی گرم در هر میلی لیتر از بافر سدیم فسفات) به مدت ۲۴ ساعت در دماهای ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ درجه سلسیوس انکوبه گردید و سپس فعالیت باقیمانده ی آن ها با اندازه گیری جذب ناشی از هیدرولیز پارا نیترو فنیل بوتیرات اندازه گیری شد. تمام آزمایش ها در این پژوهش سه بار تکرار شدند تا میزان تغییر پذیری نتایج مشخص گردد.

(۱) Bradford assay

قرار داده شد. فعالیت واکنش اول به عنوان ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و فعالیت واکنش‌های بعدی نسبت به آن محاسبه گردید.

آنالیز و محاسبه‌ی راندمان واکنش

میزان تبدیل روغن سویا به متیل استر (بیودیزل)، با تزریق نمونه‌ها به دستگاه کروماتوگرافی گازی مطابق با استاندارد EN 14103 تعیین گردید. به این منظور، نمونه‌برداری در فواصل زمانی مشخصی از مخلوط واکنش صورت گرفت و به منظور جداسازی آنزیم تثبیت شده، نمونه‌ی مورد نظر سانتریفیوژ گردید. سپس حجم مشخصی از محلول فوقانی نمونه توزین شد و پس از افزایش استاندارد داخلی متیل لورات (با حجم و غلظت کاملاً مشخص) و n-هگزان (۰/۵ میلی لیتر برای همه نمونه‌ها) جهت تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی آماده شد. مقدار ۲ میکرولیتر از این نمونه، به دستگاه تزریق گردید. گاز حامل نیتروژن با سرعت جریان ۱/۲ میلی لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. دمای ستون به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰ سلسیوس ثابت نگه داشته شد و سپس با سرعت ۱۰ سلسیوس بر دقیقه تا دمای ۳۰۰ سلسیوس افزایش یافت. در این دما به مدت ۳ دقیقه ثابت شد. دمای محل تزریق و دمای آشکارساز به ترتیب ۲۲۰ و ۲۵۰ درجه سلسیوس ثبت گردید. مقدار کل بیودیزل تولید شده در مخلوط واکنش با مقایسه‌ی زمان بازداری متیل استرهای استاندارد و سطح زیر پیک آن‌ها، محاسبه شد. محاسبه‌ی مقدار بیودیزل بدست آمده با استفاده از معادله ۲، انجام گردید.

$$C = \frac{\sum A - A_{IS}}{A_{IS}} \times \frac{C_{IS} \times V_{IS}}{m} \times 100 \quad (2)$$

در این معادله، A کل سطح زیر پیک و A_{IS} سطح زیر پیک استاندارد داخلی را نشان می‌دهد. به علاوه C_{IS} غلظت استاندارد داخلی بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر، V_{IS} حجم آن بر حسب میلی لیتر و m جرم نمونه بر حسب میلی گرم می‌باشد.

نتیجه‌ها و بحث

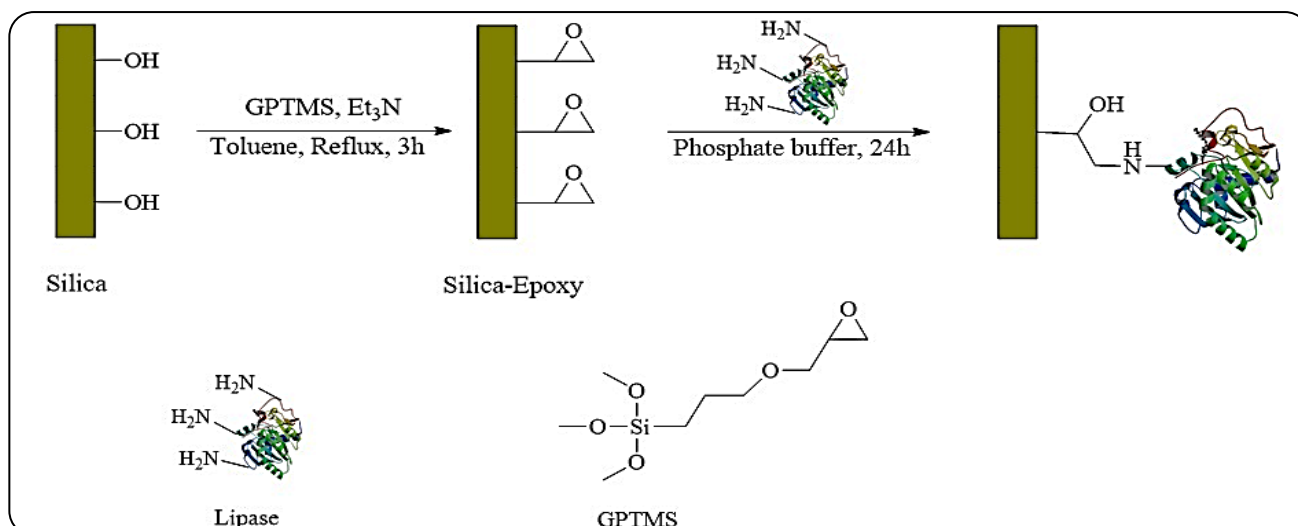
در پژوهش حاضر با توجه به اهمیت بیودیزل، تولید آن از روغن سویا که یکی از دانه‌های روغنی با سطح زیر کشت فراوان در ایران می‌باشد با استفاده از کاتالیست‌های آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه کاربرد صنعتی آنزیم به شکل آزاد با محدودیت‌هایی نظیر هزینه‌ی بالا، پایداری پایین آنزیم در محیط واکنش و همچنین عدم امکان استفاده‌ی مجدد از کاتالیست روبه‌رو می‌باشد. آنزیم را با استفاده از روش‌های مختلف بر روی بسترهای گوناگون متصل می‌کنند و آن را به شکل تثبیت شده مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از روش‌های تثبیت، اتصال کووالانسی آنزیم به بستر است که

تولید بیودیزل از روغن سویا با استفاده از مشتقات آنزیمی تثبیت شده بر روی سیلیکای عامل‌دار شده با گروه‌های اپوکسی

در راستای تولید بیودیزل، آنزیم تثبیت شده بر روی بستر سیلیکا به ظرفی با گنجایش ۱۰ میلی لیتر که حاوی ۲/۲ گرم روغن سویا بود ریخته شد و به آن ۳۰۰ میکرو لیتر متانول اضافه گردید. شایان ذکر است که جهت جلوگیری از غیر فعال شدن آنزیم، افزایش متانول طی سه مرحله صورت گرفت. به منظور بررسی اثر دما بر روی بازده، واکنش تولید بیودیزل در دو دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این به منظور بررسی اثر مقدار آنزیم مورد نیاز در تولید بیودیزل، واکنش با مقادیر مختلفی از مشتقات آنزیمی تثبیت شده (۱۳، ۲۰، ۲۶، ۳۲ و ۳۹ درصد) در نسبت مولی ۳ به ۱ از روغن به متانول انجام شد. در هر مورد مخلوط واکنش با دور ثابت ۲۵۰ rpm و به مدت ۹۶ ساعت هم زده شد. از مخلوط واکنش در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های حاصل بعد از سانتریفیوژ و جداسازی آنزیم، توزین و با مقدار مشخصی از استاندارد داخلی و n-هگزان مخلوط شدند. سپس مخلوط به دست آمده به کروماتوگرافی گازی تزریق گردید. از آنجایی که پیک مربوط به متیل لورات در طیف کروماتوگرافی گازی با فاصله خوبی از پیک محصولات ظاهر می‌گردید، این ترکیب استری به عنوان استاندارد داخلی انتخاب شد. به منظور اطمینان از اینکه انجام واکنش ترانس استری شدن روغن سویا با متانول تنها ناشی از حضور آنزیم‌های تثبیت شده است، واکنش کنترل (شاهد) نیز اجرا شد. در این آزمایش، تمامی واکنش‌گرها شامل روغن و متانول بدون افزودن آنزیم تثبیت شده در همان شرایط عملیاتی مورد استفاده قرار گرفتند. لازم به ذکر است که داده‌های حاصل از آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ تحلیل گردید. تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) برای بررسی تأثیر پارامترهای درصد t-بوتانول، مقدار آنزیم، آب و درصد جاذب بر راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده

برای تعیین تکرارپذیری آنزیم‌های تثبیت شده بر روی بستر، چرخه‌های متعددی از واکنش ترانس استری شدن روغن سویا با متانول توسط آنزیم در شرایط یکسان مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، پس از انجام واکنش متانولیز در دمای ۵۰ درجه‌ی سلسیوس و با غلظت ۱۳ درصد وزنی از مشتق آنزیمی، لیپاز تثبیت شده به وسیله سانتریفیوژ (با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) جدا و سه مرتبه با n-هگزان شست و شو داده شد. در ادامه، زیست کاتالیست به مدت ۲۴ ساعت در دسیکاتور قرار گرفت تا خشک گردد. پس از این مرحله، مجدداً در مخلوطی از سوبسترای تازه



شکل ۲- نمای شماتیک فرایند تثبیت آنزیم لیپاز با استفاده از روش اتصال کووالانسی بر روی بستر سیلیکای اصلاح شده با گروه‌های اپوکسی

جدول ۴ - کاهش جرم ناشی از بخش آلی در طیف TGA

نمونه	جرم بخش آلی از دست‌رفته (گرم)	بخش آلی	جرم بخش آلی (گرم)
سیلیکا-اپوکسی	۰/۰۵۹		۱۱۵

و اتصال گروه‌های اپوکسی بر سطح سیلیکا است. به علاوه در این طیف، پیک مربوط به گروه‌های CH_2 آلیفاتیک معرف نیز قابل مشاهده بود [۴۴]. در طیف TGA مربوط به سیلیکای عامل‌دار شده با گروه‌های اپوکسی، کاهش وزنی معادل با تقریباً ۸ درصد جرم ماده‌ی اولیه در محدوده‌ی دمایی ۲۲۰ تا ۳۵۰ درجه سلسیوس ملاحظه می‌شود. این کاهش وزن که پیش‌تر نیز در کارهای تحقیقاتی دکتر حبیبی و همکاران گزارش شده است [۴۴، ۴۵]، به‌خوبی بیان‌کننده‌ی تجزیه و خروج گروه‌های آلی متصل شده بر سطح بستر سیلیکا می‌باشد. از آنجا که مقدار گروه‌های آلی در ترکیبات سیلیکایی معمولاً کم است، بخش آلی، تنها جرم کوچکی از کل بستر عامل‌دار شده را تشکیل می‌دهد. با این تکنیک میزان کمی گروه‌های اپوکسی وارد شده بر سطح بستر نیز تخمین زده شد. کاهش وزنی که در ناحیه مشخص دمایی، در بستر عامل‌دار شده صورت می‌گیرد، تعیین‌کننده‌ی میزان عامل‌دار شدن بستر می‌باشد؛ میزان این کاهش با مقدار گروه‌های آلی متصل شده به سطح بستر رابطه‌ی مستقیم دارد. بنابراین می‌توان با اندازه‌گیری مقدار کاهش جرم، مقدار گروه‌های اپوکسی متصل شده بر سطح بستر را بر حسب میلی‌مول مطابق با روابط زیر محاسبه نمود (جدول ۴)

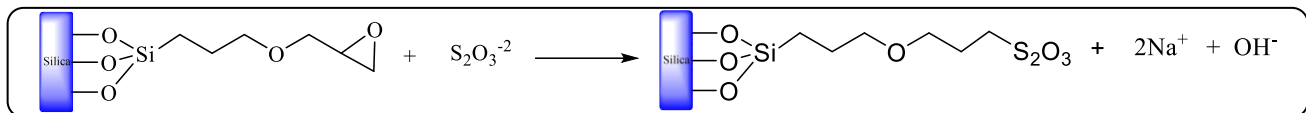
$$\text{جرم بخش آلی از دست رفته} = M \times \frac{\Delta W}{100}$$

که در این رابطه، M جرم اولیه‌ی سیلیکای عامل‌دار شده در آنالیز TGA، و Δw درصد کاهش وزن بخش آلی می‌باشد.

با ایجاد پیوند قوی، احتمال جدا شدن آنزیم و ورود آن به محیط واکنش یا محصولات را به حداقل رسانده و آلودگی‌های ناشی از آنزیم را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. همچنین این اتصالات قوی، باعث کم شدن ارتعاشات آنزیم و تغییرات صورت‌بندی آن می‌شود، در نتیجه پایداری آنزیم به صورت قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد [۴۰، ۴۱]. بنابراین در پژوهش حاضر نیز تثبیت سه آنزیم لیپاز TLL، RML و CAL B بر روی بستر سیلیکای اصلاح شده با گروه‌های اپوکسی از طریق اتصال کووالانسی مورد بررسی قرار گرفت و از آن‌ها به عنوان زیست‌کاتالیست در واکنش تولید بیودیزل از روغن سویا استفاده شد. شکل ۲ شمایی از نحوه تثبیت آنزیم را نشان می‌دهد: سطح همگن و پایداری حرارتی، مکانیکی و شیمیایی سیلیکا باعث شده که به‌عنوان بستر جهت تثبیت آنزیم بسیار مورد توجه قرار بگیرد [۴۲، ۴۳]. به علاوه، قیمت پایین، دسترسی آسان و اصلاح شیمیایی راحت سطح سیلیکا، از دیگر عوامل مؤثر در انتخاب این ترکیب شیمیایی به‌عنوان بستر در پژوهش حاضر می‌باشد که به منظور اتصال کووالانسی آنزیم‌های لیپاز، سطح آن با عامل اپوکسی‌دار کننده‌ی ۳-گلیسی‌دی‌لوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان عامل‌دار گردید.

مشخصه‌یابی بستر سیلیکای عامل دار شده

اتصال گروه‌های اپوکسی بر روی سطح سیلیکا با استفاده از طیف سنجی تبدیل فوریه فروسخ (FT-IR) و آنالیز توزین حرارتی (TGA) تأیید گردید که این آنالیزها در پژوهش‌های قبلی انجام شده توسط حبیبی و همکاران گزارش شده و قابل مشاهده می‌باشند [۴۴، ۴۵]. در حقیقت عدم حضور پیک پهن مربوط به گروه‌های هیدروکسیل در ناحیه 3400 cm^{-1} در طیف IR سیلیکای عامل دار شده با گروه‌های اپوکسی، نشان دهنده‌ی واکنش موفق گروه‌های هیدروکسیل با معرف ۳-گلیسی‌دی‌لوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان



شکل ۳ - واکنش گروه‌های اپوکسی با سدیم تیوسولفات

جدول ۵ - تعداد گروه‌های اپوکسی موجود بر روی یک گرم بستر (بر حسب میکرو مول)

بستر	طبق تکنیک TGA	طبق روش تیتراسیون
سیلیکا-اپوکسی	۵۱۳	۳۷۷

جدول ۶ - میزان فعالیت آنزیمی مشتقات تثبیت شده بر بستر سیلیکا

آنزیم	راندمان تثبیت ^a	فعالیت ویژه ^b
CAL B تثبیت شده	۹۶	۱۵۱۰
RML تثبیت شده	۹۶	۱۷۰۰
TLL تثبیت شده	۱۰۰	۱۲۳۰

^a راندمان تثبیت بر اساس درصد آنزیم آزاد تثبیت شده بر روی بستر تعریف می‌شود.
^b فعالیت ویژه (U/g lipase) به عنوان میکرو مول *p*-NPB هیدرولیز شده در هر دقیقه به ازای یک گرم از پروتئین تثبیت شده تعریف می‌شود.

بررسی میزان تثبیت آنزیم و فعالیت مشتقات تثبیت شده‌ی آنزیمی بر روی بستر سیلیکای عامل‌دار شده با گروه‌های اپوکسی

تثبیت کوالانسی سه آنزیم لیپاز CAL B، RML و TLL بر روی بستر سیلیکای عامل دار شده با 3-GPTMS در بافر فسفات ۲۵ میلی مولار (pH=۷) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج در جدول ۶ نشان داده شده است. راندمان تثبیت ۱۰۰٪ برای آنزیم TLL محاسبه گردید و آنزیم‌های CAL B و RML نیز با بازدهی قابل توجهی (۹۶٪) به بستر مورد نظر متصل شدند.

در مورد هر سه آنزیم، میزان آنزیم تثبیت شده بر روی بستر، تقریباً ۱۰ میلی گرم در هر گرم بستر عامل‌دار شده محاسبه گردید. ضمن اینکه در آزمایش واجذب، برای هر سه مشتق تثبیت شده با این روش، هیچ‌گونه جدا شدن آنزیمی از بستر در مرحله شستشو مشاهده نگردید که مؤید پیوند پایدار کوالانسی می‌باشد. فعالیت ویژه و میزان تثبیت نیز برای هر سه آنزیم اندازه‌گیری گردید. همان‌طور که در جدول ۶ نشان داده شده است در مقایسه با آنزیم آزاد (فعالیت آن‌ها در بخش تجربی گزارش شده است)، فعالیت آنزیم تثبیت شده کاهش یافته که این امر دور از انتظار نمی‌باشد. زیرا فرآیند تثبیت می‌تواند منجر به دور از دسترس قرار گرفتن برخی از سایت‌های فعال آنزیم و در نتیجه کاهش فعالیت آن گردد. علاوه بر فرآیند تثبیت، نوع و ساختار بستر نیز می‌تواند بر روی فعالیت آنزیم اثر بگذارد [۴۶].

بررسی پایداری حرارتی آنزیم‌های تثبیت شده بر روی بستر سیلیکای اصلاح شده‌ی سطحی

یکی از دلایل مهم تثبیت آنزیم، افزایش پایداری حرارتی آن به منظور استفاده در صنعت است. تثبیت سه آنزیم لیپاز ذکر شده بر بستر سیلیکا

جهت محاسبه میلی مول گروه‌های اپوکسی متصل شده به بستر سیلیکا، از روش زیر استفاده شد. با توجه به جدول بالا و براساس نمودار TGA، یک گرم از سیلیکای عامل‌دار شده با گروه‌های اپوکسی، حاوی ۰/۵۹ گرم ترکیب آلی می‌باشد. گروه‌های موجود بر روی سطح بستر بر اساس رابطه زیر محاسبه شده است:

$$\text{تعداد مول گروه‌های موجود بر روی سطح بستر} = \frac{\text{جرم از دست رفته}}{\text{جرم بخش آلی}}$$

$$۵۱۳ \text{ میکرومول} \rightarrow \text{مول} \times ۱۰^{-۴} = ۵/۱۳ \div ۰/۵۹$$

اما با توجه به وابستگی این روش به دما و احتمال حضور آلودگی و ناخالصی در ترکیب، این روش از دقت بالایی برخوردار نبوده و بنابراین جهت محاسبه‌ی مقدار گروه‌های اپوکسی متصل شده به بستر، روش تیتراسیون شیمیایی نیز مورد استفاده قرار گرفت [۳۸]. در روش تیتراسیون شیمیایی به‌منظور تعیین مقدار گروه‌های اپوکسی متصل‌شده بر سطح نانوذرات سیلیکا، ابتدا نمونه‌ی عامل‌دارشده در تماس با محلول استاندارد سدیم تیوسولفات قرار گرفت. تیوسولفات به‌عنوان یک نوکلئوفیل با حلقه اپوکسید وارد واکنش شده و سبب گشایش حلقه و تولید گروه‌های هیدروکسیل استوکیومتری می‌گردد (شکل ۳). تیوسولفات اضافی (مصرف‌نشده) در محلول باقی می‌ماند.

در مرحله‌ی بعد مقدار هیدروکسیل تولیدشده با استفاده از تیتراسیون برگشتی با محلول HCl استاندارد خنثی می‌شود تا pH ثابت بماند. مقدار HCl مصرف‌شده برای حفظ pH ثابت دقیقاً با تعداد گروه‌های هیدروکسیل متناسب است. بنابراین با محاسبه‌ی مقدار HCl مصرف‌شده می‌توان به تعداد گروه‌های هیدروکسیل و در نتیجه به تعداد گروه‌های اپوکسی موجود بر سطح بستر دست یافت. اگر m جرم نمونه (گرم) باشد، مقدار گروه‌های اپوکسی بر حسب میلی مول در هر گرم نمونه به صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$n_{\text{epoxy}} = n_{\text{HCl}} = \frac{C_{\text{HCl}} \times V_{\text{HCl}}}{m}$$

$$V_{\text{HCl}} = \text{حجم HCl مصرف‌شده (L)}$$

$$n_{\text{epoxy}} = \text{تعداد مول اپوکسی در نمونه}$$

$$C_{\text{HCl}} = \text{نرمالیه یا مولاریته (mol/L) HCl}$$

نتایج محاسبه‌ی تعداد گروه‌های اپوکسی موجود در سطح سیلیکا با استفاده از هر دو روش در جدول ۵ خلاصه شده است.

پایداری در مقایسه با فرم آزاد است. همچنین در دمای ۵۵ درجه، فرم تثبیت شده ۳۰٪ از فعالیت خود را پس از ۲۴ ساعت حفظ می‌نماید، در حالی که فرم آزاد در همان دما طی ۲ ساعت به‌طور کامل غیرفعال می‌شود؛ بنابراین فرآیند تثبیت، بیش از ۱۲ برابر افزایش در مدت زمان پایداری را در این شرایط ایجاد کرده است. آنزیم تثبیت شده RML بعد از ۱۵ ساعت انکوباسیون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، توانست ۱۵٪ از فعالیت خود را حفظ کند و مدت زمان بیشتر منجر به غیرفعال سازی کامل آن گردید که با آنچه که قبلاً توسط این گروه گزارش شده است، همخوانی دارد [۲، ۴۴]. عوامل متعددی می‌توانند ثبات صورت‌بندی یک ساختار پروتئینی (که بر اساس تفاوت انرژی آزاد فرم‌های باز و بسته تعریف می‌شود)، را تحت تأثیر قرار دهند. به هر حال افزایش پایداری حرارتی مشتق تثبیت شده نسبت به فرم آزاد آنزیم را می‌توان به صلب شدن ساختار آن در نتیجه اتصال به بستر نسبت داد که از تاگشایی^۱ آن در محیط جلوگیری کرده و مانع از کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد [۴۷].

نتایج حاصل از واکنش ترانس‌استری شدن روغن سویا با متانول با استفاده از مشتقات آنزیمی تثبیت شده بر روی بستر سیلیکای عامل‌دار شده

بررسی شرایط مؤثر

در ادامه‌ی این تحقیق، مشتقات تثبیت شده‌ی آنزیمی جهت واکنش ترانس‌استری شدن روغن سویا با متانول مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آزمون شاهد نشان داد که در غیاب آنزیم، هیچ تبدیلی رخ نمی‌دهد؛ بنابراین نقش کاتالیستی آنزیم در انجام واکنش تأیید شد. علاوه بر این مشخص گردید که راندمان واکنش ترانس‌استری شدن روغن سویا با متانول توسط این مشتقات آنزیمی، تحت تأثیر عوامل مختلفی است که برای تعیین شرایط عملیاتی مطلوب، بررسی هر کدام از آن‌ها امری ضروری می‌باشد؛ از جمله‌ی این عوامل می‌توان به مقدار مناسب آنزیم، دمای واکنش، مقدار مناسب متانول مصرفی و آب مورد استفاده در محیط واکنش اشاره نمود. به‌علاوه در اکثر موارد استفاده از اصلاح‌کننده‌هایی نظیر t-بوتانول و جاذب سطحی نیز می‌تواند راندمان واکنش را بهبود ببخشند. به همین دلیل در این تحقیق سعی شده است که تأثیر این موارد در روند انجام واکنش تولید بیودیزل از روغن سویا مورد بررسی قرار گیرد که در ادامه، این موضوع به‌طور جامع و با جزئیات تشریح خواهد شد.

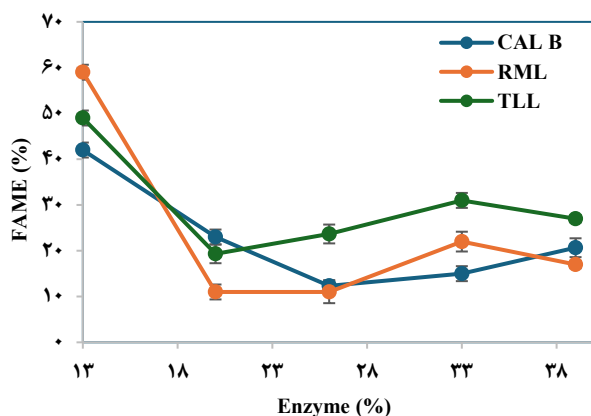
یکی از عامل‌های مؤثر در راندمان تولید بیودیزل، تعیین مقدار مناسب متانول مصرفی در محیط واکنش جهت انجام واکنش‌های ترانس‌استری شدن می‌باشد. در صورتی آنزیم لیپاز بهترین عملکرد را در تولید بیودیزل دارد که سوبستراها به‌خوبی در یکدیگر حل شوند. از آنجایی که الکل‌های کوتاه زنجیر مانند متانول، حلالیت پایینی را در روغن‌ها دارند به همین دلیل با افزایش آنها به محیط روغنی،

منجر به افزایش پایداری حرارتی آن‌ها گردید که قبلاً در کار تحقیقاتی حبیبی و همکاران نیز گزارش شده است [۲]. در دمای ۴۵ سلسیوس، هر دو فرم آزاد و تثبیت شده‌ی آنزیم CAL B بر روی سیلیکای عامل‌دار شده با گروه اپوکسی، کاملاً فعالیت خود را حفظ می‌نمایند. اما در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، آنزیم آزاد CAL B تنها ۷۲٪ از فعالیت اولیه‌ی خود را حفظ می‌کند در حالی که مشتق تثبیت شده‌ی آن می‌تواند ۱۰۰٪ فعالیت اولیه خود را در این دما حفظ کند؛ یعنی پایداری آنزیم تثبیت شده در این دما حدود ۱/۴ برابر بیشتر از فرم آزاد است. افزایش دما به ۵۵ درجه سلسیوس و انکوبه کردن نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در این دما، تفاوت پایداری حرارتی را بسیار برجسته‌تر می‌کند. در این شرایط، آنزیم آزاد ۷۹٪ از فعالیت خود را از دست می‌دهد (و تنها ۲۱٪ فعالیت باقی می‌ماند)، در حالی که مشتق تثبیت شده تمام فعالیت اولیه‌ی خود را حفظ می‌کند. به بیان دیگر، پایداری حرارتی فرم تثبیت شده در این دما حدود ۴/۷ برابر بیشتر از آنزیم آزاد است. این مقایسه‌ی کمی، اثر قابل توجه تثبیت آنزیم بر بهبود پایداری حرارتی آن را به‌وضوح نشان می‌دهد. در دمای ۶۰ سلسیوس، آنزیم آزاد تقریباً ناپایدار بوده و حدود ۹۰٪ از فعالیت اولیه خود را از دست می‌دهد؛ ولی مشتق تثبیت شده در این دما می‌تواند تقریباً ۳۰٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ کند که نشان‌دهنده افزایشی سه‌برابری در پایداری حرارتی نسبت به فرم آزاد است. در مورد آنزیم آزاد TLL، پایداری حرارتی در دماهای بالاتر از ۵۰ درجه سلسیوس به‌طور محسوسی کاهش می‌یابد؛ به‌طوری که در دمای ۵۵ درجه بیش از ۵۰٪ از فعالیت اولیه خود را از دست می‌دهد. در مقابل، مشتق تثبیت شده‌ی آن بر بستر سیلیکا در همین دما تقریباً ۹۰٪ از فعالیت اولیه را حفظ می‌کند. این بدین معناست که پایداری آنزیم تثبیت شده نسبت به فرم آزاد آن، تقریباً ۱/۸ برابر بهبود یافته است. همچنین در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، آنزیم آزاد تنها ۳۰٪ از فعالیت خود را حفظ می‌کند، در حالی که آنزیم تثبیت شده حدود ۵۰٪ فعالیت نشان می‌دهد؛ یعنی پایداری حرارتی آن بیش از ۱/۶ برابر افزایش یافته است. این نتایج بیانگر بهبود قابل توجه راندمان و پایداری حرارتی آنزیم پس از فرآیند تثبیت‌سازی است. در بررسی اثر تثبیت بر پایداری حرارتی فرم آزاد و مشتق تثبیت شده‌ی آنزیم RML، مشخص شد که این آنزیم در دمای ۴۵ درجه سلسیوس در حالت آزاد تقریباً پایدار است و حدود ۹۰٪ از فعالیت خود را بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در این دما حفظ می‌نماید. با این حال، با افزایش دما پایداری آن به‌شدت کاهش می‌یابد؛ به‌طوری که در دمای ۵۰ درجه تنها ۱۵٪ از فعالیت اولیه آن باقی می‌ماند و در ۵۵ درجه سلسیوس پس از ۲ ساعت کاملاً غیرفعال می‌شود. در مقابل، فرم تثبیت شده‌ی RML، پایداری حرارتی بسیار بالاتری نشان می‌دهد. این مشتق تثبیت شده در دمای ۵۰ درجه، ۶۲٪ از فعالیت اولیه را حفظ می‌کند که نشان‌دهنده‌ی افزایش بیش از ۴ برابری

(۱) Unfolding

جدول ۷ - نتایج تحلیل واریانس یک طرفه اثر مقدار آنزیم تثبیت شده بر بستر سیلیکای عامل دار شده بر راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا

مجموع مربعات (Sum of Squares)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (Mean Square)	F	مقدار p (Sig.)
بین گروه‌ها	۴	۴۰۷/۵۶۷	۹۸/۶۰۵	۰/۰۰۰
درون گروه‌ها	۱۰	۴۱/۱۳۳		
مجموع کل	۱۴			
بین گروه‌ها	۴	۱۲۱۲/۰۰۰	۲۴۲/۴۰۰	۰/۰۰۰
درون گروه‌ها	۱۰	۵/۰۰۰		
مجموع کل	۱۴			
بین گروه‌ها	۴	۳۹۳/۶۶۷	۹۰/۸۴۶	۰/۰۰۰
درون گروه‌ها	۱۰	۴۳/۳۳۳		
مجموع کل	۱۴			



شکل ۴ - بررسی اثر مقدار آنزیم تثبیت شده بر راندمان واکنش تولید بیودیزل از روغن سویا در دمای ۵۰ °C. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n=3$) گزارش شده‌اند.

برابر با ۰/۰۰۰ است که نشان می‌دهد تفاوت‌های مشاهده شده در داده‌ها به‌طور آماری معنادار هستند و فرضیه صفر (که می‌گوید هیچ تفاوتی بین گروه‌ها وجود ندارد) رد می‌شود. این به معنای آن است که مقدار آنزیم تثبیت شده تأثیر معناداری بر راندمان تولید بیودیزل دارد. مقادیر F در هر سه گروه نیز مقادیر بسیار بالایی را نشان می‌دهد: برای CAL B برابر با ۹۸/۶۰۵، برای RML برابر با ۲۴۲/۴۰۰ و برای TLL برابر با ۹۰/۸۴۶ است. این مقادیر نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل توجه بین گروه‌ها است و نشان می‌دهند که واریانس بین گروه‌ها به‌طور چشمگیری بیشتر از واریانس درون گروه‌ها است، که به نوبه خود تأثیر آنزیم تثبیت شده را بر راندمان تولید بیودیزل تأیید می‌کند. همچنین برای آنزیم RML تثبیت شده، مقدار F برابر با ۲۴۲/۴۰۰ و با سطح معناداری $p < 0.001$ به‌دست آمد که حاکی از بیشترین حساسیت راندمان واکنش نسبت به تغییر مقدار آنزیم در مقایسه با دو آنزیم دیگر است (جدول ۷). بنابراین واکنش تولید بیودیزل از روغن سویا با مقدار ۱۳٪ از این مشتقات آنزیمی تثبیت شده انجام شد. شکل ۴ نمودار راندمان واکنش تولید بیودیزل در دمای ۵۰ درجه سلسیوس را برحسب مقدار آنزیم نشان می‌دهد.

محیط واکنش دو فاز می‌گردد که در غلظت‌های متوسط منجر به غیر فعال شدن آنزیم و در نتیجه کاهش راندمان تولید بیودیزل خواهد شد. بنابراین در واکنش تولید بیودیزل با استفاده از آنزیم لیپاز، به حداقل نسبت استوکیومتری از متانول نیاز است که تبدیل کامل تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها به متیل استر اسیدهای چرب مربوط به خود را موجب شود. در حقیقت واکنش ترانس‌استری شدن با متانول به‌طور قابل توجهی با افزودن بخشی از متانول در آغاز فرایند آنزیمی کاهش می‌یابد و غیر فعال شدن آنزیم با افزایش الکل‌های قطبی کوتاه زنجیر از عمده‌ترین مشکلات واکنش‌های آنزیمی است. با توجه به اینکه در مطالعات پیشین انجام شده توسط نویسندگان حاضر در تولید بیودیزل از روغن کلزا با استفاده از این مشتقات آنزیمی، نسبت مؤثر روغن به متانول ۳:۱ بدست آمده است [۲]، در تحقیق حاضر نیز واکنش ترانس‌استری شدن روغن سویا با نسبت مولی ۱ به ۳ از روغن به متانول مورد بررسی و با مقادیر مختلف از آنزیم تثبیت شده بر روی بستر به مدت ۹۶ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تعیین مقدار مناسب آنزیم مورد نیاز، واکنش تولید بیودیزل از روغن سویا با مقادیر مختلف از آنزیم تثبیت شده روی بستر سیلیکای عامل دار شده (۱۳، ۲۰، ۲۶، ۳۲ و ۳۹ درصد) مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده از پایداری حرارتی این مشتقات آنزیمی، واکنش‌ها در دمای ۵۰ درجه سلسیوس انجام شدند. نتایج نشان داد که در مقدار ۱۳٪ از آنزیم (۳۰ میلی گرم آنزیم تثبیت شده و ۲/۲ g روغن) بیشترین بازده تبدیل به‌دست می‌آید و افزایش مقدار آنزیم در محیط واکنش، نه تنها منجر به بهبود راندمان واکنش نمی‌گردد، بلکه باعث کاهش آن نیز می‌شود. این کاهش بازده می‌تواند به دلیل افزایش ویسکوزیته محیط، محدودیت انتقال جرم و کاهش چرخش متناسب و آسان مگنت در طی واکنش رخ دهد. مقادیر کمتر از ۱۳٪ آنزیم نیز راندمان کمی را موجب گردید، که با مطالعات انجام شده در مقالات مختلف همخوانی داشت [۲]. نتایج تحلیل واریانس (ANOVA) یک طرفه برای بررسی تأثیر مقدار آنزیم تثبیت شده بر راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا نشان‌دهنده تفاوت‌های معناداری بین گروه‌ها است. مقدار p برای هر سه آنزیم تثبیت شده (CAL B و RML، TLL) برابر با ۰/۰۰۰ است که نشان می‌دهد تفاوت‌های مشاهده شده در داده‌ها به‌طور آماری معنادار هستند و فرضیه صفر (که می‌گوید هیچ تفاوتی بین گروه‌ها وجود ندارد) رد می‌شود. این به معنای آن است که مقدار آنزیم تثبیت شده تأثیر معناداری بر راندمان تولید بیودیزل دارد. مقادیر F در هر سه گروه نیز مقادیر بسیار بالایی را نشان می‌دهد: برای CAL B برابر با ۹۸/۶۰۵، برای RML برابر با ۲۴۲/۴۰۰ و برای TLL برابر با ۹۰/۸۴۶ است. این مقادیر نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل توجه بین گروه‌ها است و نشان می‌دهند که واریانس بین گروه‌ها به‌طور چشمگیری بیشتر از واریانس درون گروه‌ها است، که به نوبه خود تأثیر آنزیم تثبیت شده را بر راندمان تولید بیودیزل تأیید می‌کند. همچنین برای آنزیم RML تثبیت شده، مقدار F برابر با ۲۴۲/۴۰۰ و با سطح معناداری $p < 0.001$ به‌دست آمد که حاکی از بیشترین حساسیت راندمان واکنش نسبت به تغییر مقدار آنزیم در مقایسه با دو آنزیم دیگر است (جدول ۷). بنابراین واکنش تولید بیودیزل از روغن سویا با مقدار ۱۳٪ از این مشتقات آنزیمی تثبیت شده انجام شد. شکل ۴ نمودار راندمان واکنش تولید بیودیزل در دمای ۵۰ درجه سلسیوس را برحسب مقدار آنزیم نشان می‌دهد.

در واکنش تولید بیودیزل به جای متانول وارد واکنش شوند [۴۸، ۵۴]. با توجه مطالب ذکر شده، در تحقیق حاضر نیز اثر t-بوتانول به عنوان یک حلال آلی بر روند واکنش ترانس استری شدن روغن سویا با متانول با استفاده از سه مشتق آنزیمی ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. شایان ذکر است که t-بوتانول حلالی با قیمت مناسب و فراریت بالا می باشد.

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می شود، سه مشتق تثبیت شده رفتارهای متفاوتی را در برابر درصدهای مختلف از این حلال از خود نشان می دهند. در واکنش کاتالیست شده با مشتق تثبیت شده از آنزیم CALB، نتایج بسیار خوبی با افزایش الکل t-بوتانول حاصل شد؛ افزودن ۱۰٪ t-بوتانول به محیط واکنش، موجب افزایش قابل توجه راندمان از مقدار اولیه ۳۳٪ به ۶۲٪ شد؛ به عبارت دیگر، راندمان واکنش حدود ۲۹ درصد (تقریباً ۱/۹ برابر) افزایش یافت. همچنین با افزایش بیشتر غلظت t-بوتانول، روند بهبود راندمان ادامه داشت. تا جایی که در حضور ۳۰٪ از t-بوتانول، راندمان کامل (۱۰۰٪) حاصل گردید. در واکنش کاتالیست شده با TLL نیز افزایش t-بوتانول تاثیر مثبتی بر بازدهی واکنش گذاشت. به طوریکه افزایش ۳۰٪ از t-بوتانول، راندمان واکنش را از ۳۸٪ اولیه به ۹۸٪ رساند. اما افزایش بیشتر t-بوتانول به محیط، اثر نامطلوبی داشت و منجر به کاهش راندمان تا ۴۱٪ گردید؛ این می تواند به دلیل رقیق شدن محیط باشد. در مورد آنزیم RML، راندمان اولیه تولید بیودیزل در غیاب t-بوتانول ۵۶٪ بود. با افزودن ۲۰٪ t-بوتانول، راندمان واکنش به ۶۹٪ افزایش یافت؛ بنابراین، بازده فرایند به میزان ۱۳ درصد (معادل افزایش حدود ۲۳٪ نسبت به مقدار اولیه) بهبود پیدا کرد. با افزایش بیشتر t-بوتانول اثر نامطلوبی مشاهده گردید و مقدار راندمان واکنش کاهش یافت. بنابراین، t-بوتانول نمی تواند عامل اصلاح کننده ی بسیار مؤثری در واکنش تولید بیودیزل از روغن سویا با استفاده از آنزیم RML تثبیت شده بر بستر سیلیکای عامل دار شده باشد. در پژوهشی مشابه، آنزیم های CALB و RML بر سطح سیلیکای مزوپوروس SBA-15 تثبیت شدند و عملکرد گلیسرولیز آن ها در حضور حلال های مختلف مانند t-بوتانول، t-پنتانول و n-هگزان بررسی گردید. نتایج به طور کلی با یافته های تحقیق حاضر همسو بود: آنزیم CALB تثبیت شده در حضور حلال های نسبتاً قطبی t-بوتانول و t-پنتانول فعالیت بالایی نشان داد، در حالی که RML@SBA-15 در این حلال ها فعالیت پایینی از خود نشان داد.

پاسخ متفاوت لپازها به حلال های آلی، به ساختار و ویژگی های ذاتی آنها به ویژه به نحوه ی عملکرد بخش الیگوپپتیدی آبگریز این آنزیم ها وابسته است. این بخش متحرک از لپاز که جایگاه فعال آنزیم را در محیط آبی می پوشاند، "lid" یا درپوش نامیده می شود. سطح داخلی درپوش هیدروفوب و سطح بیرونی آن هیدروفیل است. در مورد آنزیم RML، افزودن مقادیر کم t-بوتانول انعطاف پذیری

جدول ۸- نتایج واکنش تولید بیودیزل از روغن سویا با استفاده از مشتقات آنزیمی تثبیت شده در دو دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس

آنزیم تثبیت شده روی بستر سیلیکا	راندمان تولید بیودیزل از سویا در دمای ۴۰ سلسیوس	راندمان تولید بیودیزل از سویا در دمای ۵۰ سلسیوس
CALB	۱۴٪	۳۳٪
RML	۳۰٪	۳۸٪
TLL	۵۰٪	۵۶٪

بررسی دمای مؤثر

به منظور بررسی اثر دما بر راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا با استفاده از مشتقات آنزیمی تثبیت شده، واکنش در دو دمای ۴۰ و ۵۰ درجه ی سلسیوس و در نسبت مولی ۱ به ۳ از روغن به متانول انجام گرفت و نتایج نشان داد که با افزایش دما تا ۵۰ سلسیوس، بازدهی واکنش تولید بیودیزل بهبود می یابد.

همانطور که از جدول ۸ مشاهده می شود، برای هر سه مشتق آنزیمی تثبیت شده، افزایش دما تأثیر مثبتی بر راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا داشته است. بنابراین دمای ۵۰ سلسیوس به عنوان دمای مؤثر واکنش انتخاب گردید. شایان ذکر است که آنزیم TLL تثبیت شده عملکرد بهتری را در تولید بیودیزل از روغن سویا نسبت به دو مشتق تثبیت شده ی دیگر نشان می دهد.

بررسی اثر t-بوتانول در روند تولید بیودیزل با استفاده از مشتقات آنزیمی تثبیت شده

بر اساس نتایج تحقیقات انجام گرفته بر روی عوامل مؤثر در بهبود راندمان واکنش تولید بیودیزل از روغن با استفاده از آنزیم لپاز، مشخص شده است که الکل های نوع سوم مانند t-آمیل الکل و t-بوتیل الکل، می توانند بر روند انجام این واکنش ها اثر مثبتی داشته باشند [۴۸-۵۱]. این الکل ها به دلیل قطبیت متوسط خود قادرند با حل کردن متانول و گلیسرول، از اثرات بازدارندگی متانول بر آنزیم جلوگیری کنند. در واقع، این الکل ها از یک سو با افزایش انحلال پذیری متانول، مانع غیرفعال شدن آنزیم در غلظت های بالای متانول شده و از سوی دیگر با انحلال محصول جانبی گلیسرول، از جذب آن توسط بستر و کلوخه شدن مشتق تثبیت شده ی آنزیم جلوگیری می کنند. در حقیقت یکی از دلایل رایج غیرفعال شدن آنزیم در سیستم های بدون حلال، اتصال این محصول جانبی به سطح آنزیم می باشد. همچنین مشخص شده است که t-بوتانول می تواند منجر به بازیابی آنزیم غیرفعال شده در حضور الکل های سبک همچون متانول گردد [۵۲]. این حلال با بهبود انتقال جرم میان فاز روغن، متانول و آنزیم، سینتیک واکنش را تسریع کرده و بازده کلی فرآیند را افزایش می دهد. با این حال، استفاده از t-بوتانول در غلظت های بالا به دلیل انحلال قابل توجه روغن و متانول در آن، رقیق سازی محیط واکنش، کاهش برخورد مؤثر بین سوبسترا و آنزیم و در نتیجه کاهش بازده را به دنبال خواهد داشت [۵۳]. نکته قابل توجه نوع سوم بودن الکل های مورد نظر می باشد که به علت ممانعت فضایی، نمی توانند

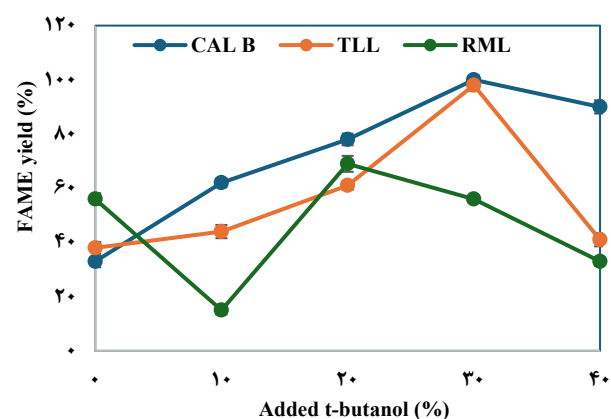
جدول ۹- نتایج تحلیل واریانس یک طرفه اثر میزان t-بوتانول بر راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا برای آنزیم‌های CALB، RML و TLL
تثبیت شده بر بستر سیلیکای عامل‌دار شده

آنزیم	مجموع مربعات (Sum of Squares)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (Mean Square)	F	مقدار p (Sig.)
CAL B	بین گروه‌ها	۴	۲۰۷۲/۴۰۰	۳۳۴/۲۵۸	۰/۰۰۰
	درون گروه‌ها	۱۰	۶/۲۰۰		
	مجموع کل	۱۴			
RML	بین گروه‌ها	۴	۱۸۶۰/۹۰۰	۲۵۸/۴۵۸	۰/۰۰۰
	درون گروه‌ها	۱۰	۷/۲۰۰		
	مجموع کل	۱۴			
TLL	بین گروه‌ها	۴	۱۳۹۴/۱۰۰	۲۲۴/۸۵۵	۰/۰۰۰
	درون گروه‌ها	۱۰	۶/۲۰۰		
	مجموع کل	۱۴			

مقادیر بالای F نشان می‌دهد که تفاوت‌ها بین گروه‌ها نسبت به واریانس درون گروه‌ها به‌طور قابل توجهی بیشتر است و اثر معنادار t-بوتانول بر راندمان تولید بیودیزل را تأیید می‌کند. همچنین، میانگین مربعات بین گروه‌ها برای همه آنزیم‌ها به‌طور قابل توجهی بیشتر از میانگین مربعات درون گروه‌ها می‌باشد که به‌روشنی تأثیر میزان t-بوتانول بر راندمان تولید بیودیزل را نشان می‌دهد. در مجموع حساسیت CAL B نسبت به حضور این حلال بیشترین و RML متوسط می‌باشد، در حالی که TLL نسبت به تغییرات درصد t-بوتانول کمتر واکنش نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که تغییرات مشاهده شده در راندمان واکنش ناشی از خطای تصادفی نبوده و مربوط به اثر واقعی t-بوتانول بر فعالیت آنزیم‌ها می‌باشد و شدت پاسخ هر آنزیم با ویژگی‌های ساختاری آن، به‌ویژه ساختار درپوش (lid) و دسترسی به جایگاه فعال، ارتباط مستقیم دارد (جدول ۹).

نتایج حاصل از واکنش ترانس‌استری شدن روغن سویا با متانول در حضور درصدهای مختلف آب با استفاده از مشتقات آنزیمی تثبیت شده

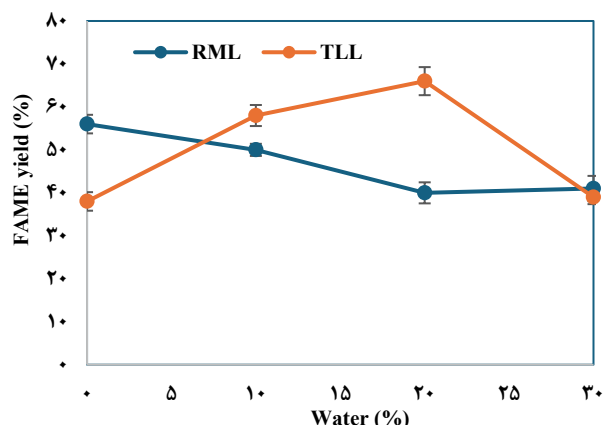
یکی دیگر از پارامترهای اصلاح‌کننده راندمان تولید بیودیزل، آب می‌باشد. آب با ایجاد سطح مناسب، شرایط را برای فعالیت آنزیم لیپاز مهیا می‌کند؛ مکانیسم مولکولی کاملاً متفاوت آنزیم‌های لیپاز نسبت به سایر هیدرولازها، سبب ویژگی‌های بی‌نظیری در لیپازها شده است. در حقیقت آنزیم لیپاز محلول در آب می‌باشد و به میزان مشخصی از آب برای حفظ صورت‌بندی خود نیاز دارد. آب نقش مهمی را در فعالیت کاتالستی و همچنین پایداری آن ایفا می‌کند و میزان ناکافی آب احتمالاً باعث غیرفعال شدن آنزیم لیپاز می‌گردد. از طرفی دیگر سوبستراهای لیپاز که اغلب ترکیبات لیپیدی می‌باشند در آب نامحلول‌اند و یک سیستم دوفازی را با آب تشکیل می‌دهند و غلظت آنها در آب نقش تعیین‌کننده‌ای را در فعالیت آنزیم ایفا می‌کند. لیپازها تقریباً هیچ فعالیتی را در غلظت‌های پایین از سوبستراهای لیپیدی، زمانی که به صورت مونومری می‌باشند از خود نشان نمی‌دهند. وقتی که غلظت سوبسترا در محیط آبی به حدی برسد که حلالیت آن محدود گردد و یک فاز ثانویه آلی (چربی دوست) را با حلال آبی تشکیل دهد،



شکل ۵- اثر میزان t-بوتانول بر روی واکنش تولید بیودیزل از روغن سویا. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n=3$) گزارش شده‌اند.

بخش الیگوپپتیدی آنزیم را کمی افزایش داده و دسترسی روغن به جایگاه فعال را بهبود می‌بخشد و بنابراین باعث افزایش راندمان واکنش از ۵۶٪ به ۶۹٪ می‌گردد. با این حال، افزایش بیش از حد t-بوتانول با اختلال در ثبات ساختار lid و کاهش دسترسی سوبسترا، باعث کاهش راندمان می‌شود. در مقابل، آنزیم CAL B دارای درپوشی نسبتاً کوچک و پایدار می‌باشد که به راحتی تحت تأثیر حلال‌های آلی قرار نمی‌گیرد و محل فعال آنها در معرض سوبسترا قرار دارد. بنابراین، افزودن ۳۰٪ t-بوتانول به CAL B باعث افزایش راندمان تا ۱۰۰٪ می‌شود، زیرا این حلال ضمن افزایش حلالیت سوبسترا و کاهش اثر مهار آب، توانایی این آنزیم را برای تعامل با روغن بهبود می‌بخشد بدون اینکه ساختار فعال آن را مختل سازد. این تفاوت‌ها نشان‌دهنده نقش مهم ساختار درپوش در پاسخ لیپازها به حلال‌های آلی و انتخاب مناسب حلال برای بررسی شرایط عملیاتی مطلوب در واکنش بیودیزل است [۵۵].

تحلیل آماری با استفاده از ANOVA نشان داد که درصد t-بوتانول تأثیر معنادار آماری بر راندمان تولید بیودیزل برای هر سه آنزیم دارد ($p < 0.05$). مقادیر F برابر با ۳۳۴/۲۵۸ برای CALB، ۲۵۸/۴۵۸ برای RML و ۲۲۴/۸۵۵ برای TLL به‌دست آمد.



شکل ۶ - نمودار بررسی اثر میزان آب بر روی واکنش ترانس استری شدن روغن سویا با متانول. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n=3$) گزارش شده‌اند.

نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه برای آنزیم‌های RML و TLL نشان داد (برای هر دو آنزیم، مقدار p برابر با ۰/۰۰/۰ است) تغییر مقدار آب تأثیر معناداری بر راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا دارد. مقدار F برای RML برابر با ۲۱/۸۴۴ و برای TLL برابر با ۶۴/۹۷۲ است که در هر دو مورد مقدار بالای F نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل توجه بین گروه‌ها است. این نتایج تأیید می‌کنند که واریانس بین گروه‌ها به‌طور قابل توجهی بیشتر از واریانس درون گروه‌ها است، که نشان‌دهنده تأثیر قابل ملاحظه مقدار آب بر راندمان تولید بیودیزل و همین‌طور حساسیت بیشتر TLL نسبت به تغییرات مقدار آب است. می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات مشاهده‌شده در راندمان واکنش ناشی از اثر واقعی مقدار آب بر فعالیت آنزیم‌ها بوده و ناشی از خطای تصادفی نمی‌باشد. بنابراین مقدار آب یک عامل مؤثر و تعیین‌کننده در عملکرد این سیستم‌های آنزیمی محسوب می‌شود (جدول ۱۰).

نتایج حاصل از واکنش ترانس استری شدن روغن سویا با متانول در حضور درصدهای مختلف از جاذب آب

یکی از واکنش‌های مرسوم که در طول فرآیند تولید بیودیزل با استفاده از کاتالیست‌های آنزیمی اتفاق می‌افتد، استری شدن اسیدهای چرب آزاد موجود در روغن با متانول می‌باشد که در نتیجه‌ی انجام این واکنش، آب به عنوان یک محصول جانبی تولید می‌گردد. آب تولید شده در این مرحله می‌تواند باعث تجمع آنزیم‌ها شده و اثرات مخربی را بر فعالیت کاتالیستی آنها داشته باشد [۵۸]. به‌طور کلی مقدار آب مناسب، زمانی حاصل می‌شود که منجر به ایجاد تعادل میان حداقل هیدرولیز و حداکثر واکنش ترانس استری شدن گردد [۵۹، ۶۰]. از آنجا که ۱/۱۰٪ از روغن سویای استفاده شده در این تحقیق را اسیدهای چرب آزاد تشکیل می‌دهند، لذا بررسی اثر جاذب آب هم به عنوان یک عامل مؤثر بر روند واکنش مورد توجه قرار گرفت.

فعالیت آنزیم به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. در حقیقت لیپازها، سوبستراها را در غلظت‌های پایین‌تر از نقطه‌ی بحرانی^۱ هیدرولیز نمی‌کنند. ولی در غلظت‌های بیشتر از این حد، فعالیت بالائی را از خود نشان می‌دهند. به‌طور کلی ویژگی مشترک بسیاری از لیپازها این است که هنگام اتصال به سطح هیدروفوب یک سوبسترا، فعال می‌شوند که این پدیده را "فعال شدن مرزی"^۲ می‌نامند. طبق تحقیقات انجام شده، آنزیم آزاد محلول در آب خالص و در غیاب سیستم دوفازی غیرفعال باقی می‌ماند که دلیل آن را به نحوه‌ی عملکرد بخش الیگوپپتیدی آبگریز آنزیم‌های لیپاز مرتبط دانسته‌اند. در آب خالص، جایگاه فعال با این بخش متحرک پوشیده می‌شود. در این حالت آنزیم غیرفعال است. وقتی که آنزیم در یک سیستم دوفازی آب و روغن قرار می‌گیرد α -هلیکس-lid- به سمت عقب تا شده، سایت فعال آن باز شده و آنزیم به فرم فعال خود نوآرایی می‌کند. بنابراین واکنش‌های هیدرولیز و ترانس استری شدن چربی‌ها با لیپازها بهتر است در سیستم‌های دوفازی انجام شوند و میزان حلال آب، غلظت سوبسترا و نسبت بین این دو در میزان فعالیت آنزیم بسیار حیاتی است [۵۴، ۵۶، ۵۷]. با توجه به مطالب ذکر شده، عامل دیگری که اثر آن بر بازده و کارایی آنزیم‌های لیپاز تثبیت شده در تولید بیودیزل از روغن سویا مورد بررسی قرار گرفت، تعیین مقدار مناسب آب در انجام این واکنش بود که مقدار آن از ۱۰ تا ۳۰ درصد وزنی نسبت به وزن سوبسترا (روغن) تغییر داده شد. شکل ۶ روند اثر میزان آب بر راندمان واکنش تولید متیل استر اسیده‌های چرب با گذشت زمان را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه در پژوهش دیگری که توسط حبیبی و همکاران در زمینه‌ی بررسی اثر آب بر میزان تولید بیودیزل از روغن کلزا انجام گرفت [۵۱]، مشخص گردید که افزایش هر غلظتی از آب منجر به غیرفعال شدن CAL B و حذف اثر کاتالیستی آن می‌شود، از بررسی دوباره‌ی اثر آب در واکنش کاتالیست شده با CAL B خودداری شد و تأثیر حضور آب بر فعالیت آنزیم و در نتیجه روند واکنش تولید بیودیزل از روغن سویا فقط در مورد آنزیم‌های تثبیت شده‌ی RML و TLL مورد بررسی قرار گرفت.

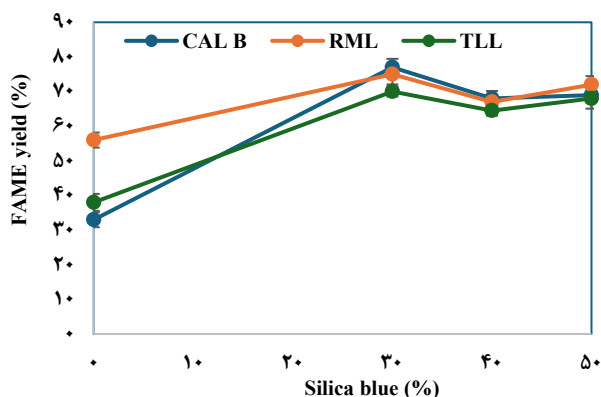
همانطور که در شکل ۶ آمده است، با افزایش آب تا ۲۰٪ به محیط واکنش کاتالیست شده با آنزیم TLL تثبیت شده بر سطح بستر سیلیکا، راندمان واکنش به‌تدریج بهبود می‌یابد، به‌طوری‌که در حضور ۲۰٪ از آب، راندمان تولید بیودیزل از ۳۸٪ اولیه به ۶۶٪ رسید. اما افزایش بیشتر آب، نتیجه‌ی نامطلوبی داشت و بازده را تا حدود ۴۰٪ کاهش داد. در واکنش کاتالیست شده با RML، نتایج رضایت بخشی حاصل نشد و افزایش آب به محیط سبب کاهش راندمان گردید. به‌طوری‌که با افزایش ۲۰٪ از آب به محیط واکنش، بازده‌ی تولید بیودیزل از ۵۶٪ (بدون حضور آب) به ۴۰٪ کاهش یافت. بنابراین برای این کاتالیست، افزایش آب نمی‌تواند اصلاح‌کننده‌ی مناسبی باشد.

(۱) The critical micellar concentration

(۲) Interfacial activation

جدول ۱۰- نتایج تحلیل واریانس یک طرفه اثر میزان آب بر راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا برای آنزیم‌های RML و TLL تثبیت شده بر بستر سیلیکای عامل‌دار شده

آنزیم	مجموع مربعات (Sum of Squares)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (Mean Square)	F	مقدار p (Sig.)
RML	بین گروه‌ها	۳	۱۷۴/۷۵۰	۲۱/۸۴۴	۰/۰۰۰
	درون گروه‌ها	۸	۸/۰۰۰		
	مجموع کل	۱۱			
TLL	بین گروه‌ها	۳	۵۸۴/۷۵۰	۶۴/۹۷۲	۰/۰۰۰
	درون گروه‌ها	۸	۹/۰۰۰		
	مجموع کل	۱۱			



شکل ۷- اثر میزان سیلیکاژل آبی به عنوان جاذب آب بر روی واکنش ترانس‌استریفیکاسیون روغن سویا با متانول. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n=3$) گزارش شده‌اند.

در مقایسه با شرایط بدون جاذب حدود ۱/۳۴ برابر افزایش یافت. بنابراین در مورد این دو آنزیم نیز مقدار ۳۰٪ به عنوان مقدار مناسب جاذب تعیین گردید. نتایج آماری نشان داد که میزان سیلیکاژل آبی به عنوان جاذب آب تأثیر معناداری بر راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا برای هر سه آنزیم تثبیت شده دارد ($p < 0.001$). برای سه آنزیم CAL B، RML و TLL مقادیر F به ترتیب ۱۵۳/۴۳۳، ۲۳/۲۲۲ و ۹۴/۶۱۱ به دست آمد که این مقادیر بالا نشان دهنده تفاوت‌های چشمگیر بین گروه‌ها و تأثیر سیلیکاژل آبی بر راندمان تولید بیودیزل است. اگر چه شدت این تفاوت‌ها در مورد آنزیم CAL B بسیار برجسته است، اما در مورد دو آنزیم RML و TLL نیز تفاوت‌های معناداری وجود دارد که نشان می‌دهند تغییرات راندمان واکنش ناشی از اثر واقعی مقدار سیلیکا بر فعالیت آنزیم‌ها بوده و بنابراین میزان سیلیکا یکی از عوامل مؤثر در عملکرد سیستم‌های آنزیمی مورد بررسی محسوب می‌شود (جدول ۱۱).

در حقیقت سیلیکاژل به عنوان جاذب آب در محیط، سبب حذف آب حاصل از واکنش استری شدن اسیدهای چرب آزاد با متانول شده و از انجام واکنش برگشتی تبدیل استر به اسید جلوگیری به عمل می‌آورد. جدول ۱۲ شرایط عملیاتی مطلوب تولید بیودیزل از روغن سویا را با استفاده از سه مشتق تثبیت شده CAL B، RML و TLL روی بستر سیلیکای عامل‌دار شده با گروه‌های اپوکسی در دمای ۵۰ درجه‌ی سلسیوس و در حضور اصلاح کننده‌های مختلف نشان می‌دهد.

در حقیقت جاذب‌ها می‌توانند به طور مؤثری غلظت آب درون سیستم را کنترل کنند و راندمان تولید متیل استر را بهبود بخشند [۵۱، ۶۱]. با توجه به مطالعات انجام گرفته در این زمینه توسط زونگ و همکاران، مشخص شده که سیلیکاژل آبی جاذب بهتری نسبت به مولکولار سیو است [۶۱]. بنابراین در تحقیق حاضر نیز سیلیکاژل آبی به عنوان جاذب واکنش ترانس‌استری شدن روغن سویا با متانول با استفاده از مشتقات آنزیمی تثبیت شده بر روی بستر سیلیکای عامل‌دار شده مورد بررسی قرار گرفت. سیلیکاژل آبی مطابق مطالعات قبلی در ابتدا به محیط واکنش افزوده شد زیرا حضور آب در مقادیر بالا، منجر به واکنش هیدرولیز استرها در رقابت با واکنش ترانس‌استری شدن می‌شود. این جاذب همچنین از جذب بیش از حد آب توسط بستر آنزیم و کاهش عملکرد آنزیم‌ها نیز جلوگیری می‌کند [۶۲]. سیلیکاژل آبی به طور موثر رطوبت اضافی را از محیط جذب نموده و شرایط مناسبی را در راستای عملکرد بهتر آنزیم به ویژه در فرآیند تولید بیودیزل ایجاد می‌کند. در حقیقت در فرآیندهای آنزیمی که به میزان کمی آب نیاز دارند، حضور سیلیکاژل آبی باعث بهبود عملکرد و افزایش راندمان واکنش می‌شود. همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌گردد، با افزایش سیلیکاژل آبی به عنوان جاذب، راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا در مورد هر سه آنزیم بهبود می‌یابد. در واکنش کاتالیست شده با مشتق تثبیت شده آنزیم CAL B، بازده تولید بیودیزل در غیاب سیلیکاژل ۳۳٪ بود؛ اما با افزایش تدریجی جاذب، راندمان نیز افزایش یافت و در حضور ۳۰٪ سیلیکاژل به بیشترین مقدار خود یعنی ۷۷٪ رسید. این مقدار بیانگر افزایش حدود ۴۴ درصد و بیش از ۲/۳ برابر بهبود راندمان نسبت به شرایط بدون جاذب است. افزایش بیشتر سیلیکاژل از ۳۰٪ نه تنها اثر مثبتی بر راندمان تولید نداشت، بلکه سبب کاهش نسبی راندمان نیز شد؛ بنابراین ۳۰٪ به عنوان مقدار مناسب انتخاب گردید. این کاهش راندمان در مقادیر بالا جاذب می‌تواند ناشی از جذب متانول توسط جاذب باشد که منجر به کاهش بازدهی می‌شود [۶۱]. نتایج مشابهی برای آنزیم‌های TLL و RML نیز به دست آمد. بازده واکنش در غیاب سیلیکاژل برای TLL برابر ۳۸٪ به دست آمد که با افزودن ۳۰٪ جاذب تا ۷۰٪ افزایش یافت. برای RML نیز بازده بدون حضور جاذب ۵۶٪ بود که در حضور این مقدار از سیلیکاژل به ۷۵٪ رسید؛ یعنی راندمان آن

جدول ۱۱- نتایج تحلیل واریانس یک طرفه اثر میزان سیلیکاژل آبی به عنوان جاذب آب بر راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا برای آنزیم‌های CAL B، RML و TLL تثبیت شده بر بستر سیلیکای عامل‌دار شده

آنزیم	مجموع مربعات (Sum of Squares)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (Mean Square)	F	مقدار p (Sig.)
CAL B	بین گروه‌ها	۳	۱۱۵۰/۷۵۰	۱۵۳/۴۳۳	۰/۰۰۰
	درون گروه‌ها	۸	۷/۵۰۰		
	مجموع کل	۱۱			
RML	بین گروه‌ها	۳	۲۰۹/۰۰۰	۲۳/۲۲۲	۰/۰۰۰
	درون گروه‌ها	۸	۹/۰۰۰		
	مجموع کل	۱۱			
TLL	بین گروه‌ها	۳	۶۸۸/۱۸۸	۹۴/۶۱۱	۰/۰۰۰
	درون گروه‌ها	۸	۷/۰۶۳		
	مجموع کل	۱۱			

درصد بالای اسید لینولئیک (۵۲/۲۳٪) و ویژگی‌های فیزیکی مشابه، ممکن است در واکنش‌ها با مشکلاتی مواجه شود، زیرا اسید لینولئیک به دلیل پیوندهای دوگانه بیشتر حساس‌تر است. با این وجود در مقایسه با مطالعات قبلی انجام شده توسط حبیبی و همکاران، که از روغن کلزا استفاده کرده بودند، نتایج این مطالعه نشان داد که روغن سویا نیز می‌تواند به عنوان یک منبع بسیار مناسب و در دسترس‌تر در مقایسه با روغن کلزا برای تولید بیودیزل مورد استفاده قرار گیرد. به‌طور خلاصه، شرایط عملیاتی مطلوب برای تولید بیودیزل از روغن سویا در حضور آنزیم CAL B تثبیت شده شامل ۳۰٪-t بوتانول و ۳۰٪ جاذب آب می‌باشد. برای مشتق تثبیت شده‌ی TLL نیز بیشترین بازده در ۳۰٪-t بوتانول، ۳۰٪ جاذب آب و ۲۰٪ آب به‌دست آمد. در مورد آنزیم RML، این مقادیر برابر با ۲۰٪-t بوتانول و ۳۰٪ جاذب آب تعیین شد. لازم به ذکر است افزایش آب تأثیر مثبتی در راندمان تولید بیودیزل برای این آنزیم نداشت و افزایش بیشتر t-بوتانول باعث کاهش کاهش کارایی آن شد. همچنین مقادیر مناسب کاتالیست مصرفی، دما و نسبت متانول به روغن برای هر سه آنزیم به‌ترتیب برابر با ۱۳٪، ۵۰ درجه سلسیوس و ۳:۱ تعیین گردید.

بررسی استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده

تکرارپذیری آنزیم یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش‌روی به‌کارگیری آنزیم‌ها در مقیاس صنعتی به‌شمار می‌رود، زیرا امکان استفاده‌ی مجدد از زیست‌کاتالیست نقش تعیین‌کننده‌ای در کاهش هزینه‌ها و افزایش توجیه‌پذیری اقتصادی فرآیند دارد. به‌منظور ارزیابی تکرارپذیری آنزیم‌های تثبیت‌شده بر روی بستر سیلیکای عامل‌دار شده، چرخه‌های متعددی از فعالیت این مشتقات آنزیمی در واکنش ترانس‌استری شدن روغن سویا، تحت شرایط عملیاتی یکسان، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمون برای دو آنزیم CAL B و TLL در شکل ۸ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، مشتق تثبیت‌شده‌ی CAL B پایداری بسیار مطلوبی را در طی چرخه‌های متوالی نشان می‌دهد؛

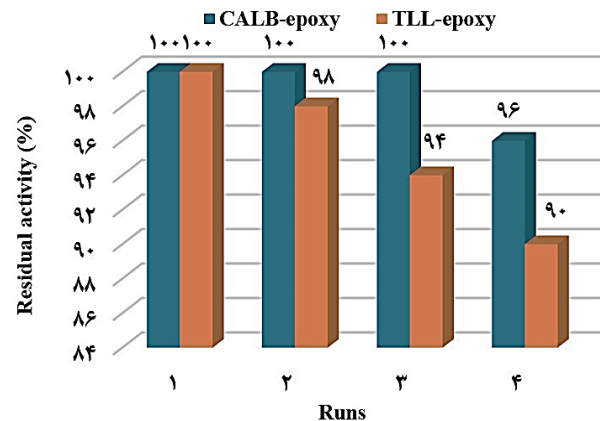
جدول ۱۲- شرایط عملیاتی مطلوب برای تولید بیودیزل از روغن سویا با استفاده از مشتقات آنزیمی تثبیت شده بر بستر سیلیکای عامل‌دار شده (۵۰°C)

ردیف	کاتالیست	شرایط عملیاتی مطلوب	راندمان واکنش
۱	مشتق تثبیت شده TLL	جاذب آب (۳۰٪)	۱۰۰٪
۲	مشتق تثبیت شده RML	t-بوتانول (۲۰٪) جاذب آب (۳۰٪)	۷۰٪ ۷۵٪
۳	مشتق تثبیت شده CAL B	t-بوتانول (۳۰٪)	۱۰۰٪

همان‌طور که در جدول ۱۲ مشاهده می‌شود، راندمان تولید بیودیزل از روغن سویا با استفاده از آنزیم RML تثبیت شده حتی در حضور اصلاح‌کننده‌ها نیز کامل نمی‌گردد. مقایسه‌ی نتایج به‌دست آمده از این تحقیق با آنچه که توسط حبیبی و همکاران در تولید بیودیزل از روغن کلزا با استفاده از این مشتق آنزیمی گزارش شده است، نشان می‌دهد که میزان کارایی این مشتق تثبیت شده‌ی آنزیمی در تولید بیودیزل از روغن سویا نسبت به روغن کلزا کاهش یافته است و نوع روغن در میزان کارایی این آنزیم تأثیر گذار می‌باشد [۲، ۵۱]. برخلاف RML، زمانی که از آنزیم‌های CAL B و TLL تثبیت شده روی بستر سیلیکای عامل‌دار شده با گروه‌های اپوکسی استفاده شد، نتایج بسیار مطلوبی در حضور اصلاح‌کننده‌ها به‌دست آمد و بازده واکنش به‌طور کامل حاصل شد. این نتایج با آنچه که در مورد تولید بیودیزل از روغن کلزا با استفاده از این مشتقات آنزیمی گزارش شده است، یکسان می‌باشد که نشان‌دهنده اهمیت نوع آنزیم و کارایی بالای این دو آنزیم در تولید بیودیزل از این روغن‌ها می‌باشد [۲، ۵۱]. در حقیقت ترکیبات شیمیایی روغن‌های گیاهی تأثیر زیادی بر بازده تولید بیودیزل دارند. روغن کلزا، با درصد بالای اسید اولئیک (۵۸/۸۳٪) و وزن مولکولی ۸۷۹/۹، بازده بالایی در فرآیندهای ترانس‌استری شدن دارد، زیرا اسید اولئیک یک اسید چرب غیراشباع تک پیوندی است که واکنش‌پذیری بهتری نسبت به اسیدهای چرب با درجه‌ی غیراشباعی بیشتر مثل لینولئیک اسید دارد. در مقابل، روغن سویا با

استفاده شده است با محدودیت‌های فراوانی همراه می‌باشند. به‌عنوان مثال، در روش اتصال عرضی به دلیل کاهش دسترسی سوبسترا به سایت فعال آنزیم، فعالیت کاتالستی کاهش یافته و در نتیجه بازده واکنش کم می‌شود در روش جذب سطحی نیز به دلیل برهم‌کنش‌های ضعیف بین آنزیم و بستر، احتمال جدا شدن آنزیم وجود دارد که می‌تواند موجب کاهش فعالیت، آلودگی محصول و دشوار شدن فرآیند جداسازی آنزیم از مخلوط واکنش شود [۶۵]. در پژوهشی دیگر، آنزیم TLL نیز با روش تثبیت کووالانسی بر روی نانومگنت‌های عامل‌دار شده با گروه‌های آمینی تثبیت شده و بازده تولید بیودیزل برای این کاتالیست ۹۰٪ گزارش شده است [۶۶]. در حالی که در تحقیق حاضر، بازده بیودیزل با استفاده از مشتق TLL تثبیت‌شده بر بستر سیلیکا به ۱۰۰٪ رسید. این افزایش راندمان بیانگر نقش مثبت بستر سیلیکا در بهبود فعالیت و پایداری آنزیم TLL است. بستر سیلیکا علاوه بر سازگاری بالا با آنزیم، از ویژگی‌هایی چون در دسترس بودن، قابلیت عامل‌دار شدن راحت و استحکام مکانیکی بالا برخوردار است که نسبت به بسترهای به‌کاررفته در مطالعات پیشین مزیت محسوب می‌شود [۶۷]. علاوه بر نوع بستر و روش تثبیت، نتایج این تحقیق نشان داد که تنظیم شرایط عملیاتی مانند دما، نوع حلال و درصد جاذب آب نیز تأثیر قابل‌توجهی بر افزایش راندمان تولید بیودیزل دارد. در مجموع، یافته‌ها نشان می‌دهند که تلفیق روش تثبیت کووالانسی بر بستر سیلیکا با انتخاب شرایط عملیاتی مطلوب می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مؤثر و پایدار برای دستیابی به بازده بالا در فرآیندهای تولید بیودیزل مورد استفاده قرار گیرد.

با وجود مزایای بیان شده برای روش تثبیت کووالانسی همچون افزایش پایداری آنزیم تثبیت شده، این روش با چالش‌هایی نیز همراه است. یکی از مهمترین چالش‌ها کاهش فعالیت آنزیم تثبیت شده می‌باشد، زیرا تشکیل پیوندهای کووالانسی ممکن است در نواحی نزدیک به سایت فعال آنزیم یا از چند قسمت مختلف انجام شود که موجب تغییر در ساختار سه‌بعدی آنزیم و محدودیت در دسترسی به سایت فعال شود. این تغییرات می‌تواند فعالیت آنزیم را کاهش داده یا حتی متوقف کند [۶۸]. از دیگر محدودیت‌های روش تثبیت کووالانسی پیچیده بودن فرآیند تثبیت، هزینه زیاد برای تهیه و آماده‌سازی بستر، نیاز به کنترل دقیق pH و دما است که جذابیت اقتصادی استفاده صنعتی را کاهش می‌دهد. کاهش سرعت و در نتیجه افزایش زمان واکنش نیز از دیگر محدودیت‌های احتمالی تثبیت کووالانسی است که می‌تواند ناشی از محدودیت در دسترسی سوبسترا به سایت فعال یا کاهش انعطاف‌پذیری مولکولی آنزیم باشد [۶۹].



شکل ۸ - پروفایل تکرارپذیری فعالیت آنزیم‌های CAL B و TLL تثبیت‌شده بر بستر سیلیکای عامل‌دار شده در واکنش ترانس‌استری شدن روغن سویا. مقادیر نشان‌دهنده درصد فعالیت باقی‌مانده نسبت به چرخه اول می‌باشند

به‌طوری‌که این آنزیم پس از سه چرخه‌ی متوالی، تمام فعالیت اولیه خود را حفظ نموده و تنها در چرخه‌ی چهارم، کاهش اندکی در فعالیت آن مشاهده گردید و فعالیت نسبی آن به ۹۶٪ رسید. این افت ناچیز نشان‌دهنده‌ی استحکام پیوند کووالانسی آنزیم با بستر و مقاومت بالای آن در برابر شرایط واکنش می‌باشد. در مورد مشتق تثبیت شده‌ی آنزیم TLL نیز نتایج حاکی از تکرارپذیری مناسب این زیست‌کاتالیست است. این آنزیم پس از چهار بار استفاده‌ی متوالی، همچنان ۹۰٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود. هرچند کاهش فعالیت در چرخه‌های متوالی برای TLL نسبت به CAL B محسوس‌تر است (۹۸٪، ۹۴٪ و ۹۰٪ به‌ترتیب در چرخه‌های دوم تا چهارم)، اما این میزان افت فعالیت همچنان قابل‌قبول بوده و کارایی مناسب آنزیم را برای کاربردهای چندباره نشان می‌دهد. کاهش ناچیز فعالیت آنزیم تثبیت‌شده در چرخه‌های متوالی می‌تواند به عواملی نظیر مسدود شدن سایت فعال آنزیم، تغییرات جزئی در ساختار فضایی آن و یا تجمع محصولات جانبی بر سطح بستر نسبت داده شود. با این حال، حفظ بخش عمده‌ای از فعالیت اولیه پس از چندین چرخه‌ی واکنشی، بیانگر پایداری بالای آنزیم‌های تثبیت‌شده و کارآمدی روش تثبیت کووالانسی بر بستر سیلیکای عامل‌دار شده می‌باشد.

مقایسه‌ای بین نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات پیشین در جدول ۱۳ ارائه شده است. در این پژوهش‌ها که از روش‌هایی مانند اتصال عرضی برای تثبیت آنزیم CAL B [۶۳] و یا جذب سطحی [۶۴] برای تثبیت آنزیم CRL استفاده شده است، بازده تولید بیودیزل حاصل از آنها به‌ترتیب ۶۷/۸۷ و ۸۷/۹ گزارش شده است. این در حالی است که در مطالعه حاضر راندمان تولید بیودیزل با استفاده از آنزیم CAL B تثبیت شده بر روی بستر سیلیکا ۱۰۰٪ به‌دست آمده است. این روش‌ها در مقایسه با روش تثبیت کووالانسی که در این تحقیق از آن

جدول ۱۳ - مقایسه مطالعه حاضر با مطالعات قبلی

مورد	لیپاز	نوع تثبیت	بستر مورد استفاده	دما (°C)	حلال	بازده بیودیزل تولید شده (%)	مرجع
۱	<i>Candida antarctica</i> lipase B	اتصال عرضی و جذب سطحی	نانو مگنت پوشش دار شده با تانیک اسید	۴۰	بدون حلال	۶۷/۸۷	[۶۳]
۲	<i>Candida rugosa</i> lipase	جذب سطحی	نانوگل های پلی دوپامین مزوپور	۴۰	بدون حلال	۸۷/۹	[۶۴]
۳	<i>Thermomyces</i> <i>Lanuginosus</i> lipase	کوالانسی	نانومگنت عامل دار شده با گروه های آمین	۵۰	بدون حلال	۹۰	[۶۶]
	Lipase NS81006	کوالانسی	سیلیکا پوشش دار شده با نانومگنت و عامل دار شده با گروه آمین	۵۰	بدون حلال	۷۶	[۷۰]
۵	<i>Rhizomucor Miehei</i> lipase	کوالانسی	سیلیکا عامل دار شده با گروه اپوکسید	۵۰	t-بوتانول	۷۵	تحقیق حاضر
۶	<i>Thermomyces</i> <i>Lanuginosus</i> lipase	کوالانسی	سیلیکا عامل دار شده با گروه اپوکسید	۵۰	t-بوتانول	۱۰۰	تحقیق حاضر
۷	<i>Candida antarctica</i> lipase B	کوالانسی	سیلیکا عامل دار شده با گروه اپوکسید	۵۰	t-بوتانول	۱۰۰	تحقیق حاضر

نتیجه گیری

در این مطالعه همچنین قابلیت استفاده مجدد از مشتقات CAL B و TLL طی چهار چرخه بررسی شد. نتایج نشان داد که هر دو زیست کاتالیست پایداری عملیاتی مناسبی دارند، به طوری که CAL B حدود ۹۶٪ و TLL حدود ۹۰٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ کردند. در مقایسه با مطالعات قبلی انجام شده توسط حبیبی و همکاران، که از روغن کلزا استفاده کرده بودند، نتایج این مطالعه نشان داد که روغن سویا نیز می تواند به عنوان یک منبع بسیار مناسب و در دسترس تر در مقایسه با روغن کلزا برای تولید بیودیزل مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، برخی محدودیت ها و چالش ها نیز وجود دارد که نیاز به توجه دارند. یکی از مهم ترین محدودیت ها، تأثیر غیرقابل پیش بینی برخی متغیرها مانند t-بوتانول در واکنش های کاتالیست شده با RML بود که افزایش قابل توجهی را در راندمان به دنبال نداشت و آنزیم RML تثبیت شده حتی در حضور اصلاح کننده ها نتوانست بازده کامل واکنش را ارائه دهد، که نشان دهنده حساسیت آن به شرایط واکنش است. همچنین فرآیند تثبیت و استفاده از اصلاح کننده ها ممکن است هزینه و پیچیدگی عملیاتی را افزایش دهد و نیازمند بررسی اقتصادی و شرایط عملیاتی مطلوب در مقیاس صنعتی است. این تحقیق نشان می دهد که استفاده از آنزیم های تثبیت شده بر بستر سیلیکای اصلاح شده با گروه های اپوکسی، می تواند راهکار سبز و مؤثری برای بهبود فرآیند تولید بیودیزل باشد و می تواند نقش مهمی در کاهش وابستگی به سوخت های فسیلی و کاهش آلودگی های زیست محیطی ایفا کند.

مطالعات آینده

با توجه به اهمیت روزافزون بیودیزل به عنوان جایگزینی پایدار برای سوخت های فسیلی و نتایج به دست آمده از این پژوهش، انجام مطالعات تکمیلی در آینده ضروری به نظر می رسد. اگرچه

در این پژوهش، با هدف توسعه فرآیند تولید بیودیزل پایدار و اقتصادی از روغن سویا، سه آنزیم لیپاز RML، CAL B و TLL بر روی بستر سیلیکای اصلاح شده با گروه های اپوکسی به روش کوالانسی تثبیت گردید که بازدهی تثبیت برای این آنزیم ها به ترتیب ۹۶٪، ۱۰۰٪ و ۹۶٪ به دست آمد. فرآیند تثبیت باعث بهبود قابل توجهی در پایداری حرارتی آنزیم ها شد و این امر امکان استفاده از آنزیم ها را در دماهای بالاتر و در شرایط صنعتی فراهم می کند. بررسی های تجربی در کنار نتایج تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که به کارگیری این آنزیم های تثبیت شده، در کنار اصلاح شرایط واکنش مانند دما، درصد t-بوتانول، میزان آب و جاذب های سطحی، می تواند راندمان تولید بیودیزل را به شکل قابل توجهی افزایش دهد. نتایج تحلیل واریانس (ANOVA) به طور معناداری ($p < 0.05$) نشان داد که مقدار آنزیم تثبیت شده یکی از عوامل تعیین کننده در راندمان تولید بیودیزل است و در میان آنزیم های بررسی شده، TLL بیشترین حساسیت را نسبت به تغییر میزان آنزیم نشان داد که بیانگر نقش تعیین کننده میزان آنزیم در واکنش ترانس استری شدن است. همچنین، در حضور ۳۰٪ t-بوتانول، راندمان تولید بیودیزل با استفاده از مشتقات CAL B و TLL کامل گردید، در حالی که افزایش بیشتر این حلال اثر منفی بر بازده داشت. تحلیل آماری نشان داد حساسیت سیستم نسبت به تغییرات درصد t-بوتانول در CAL B بیشتر از دو آنزیم دیگر است که بیانگر وابستگی بالاتر عملکرد این آنزیم به شرایط واکنش می باشد. از سوی دیگر، حضور ۳۰٪ سیلیکاژل به عنوان جاذب آب در محیط واکنش در مورد هر سه آنزیم منجر به بهبود راندمان تولید بیودیزل گردید بر اساس نتایج آماری، CAL B و TLL در مقایسه با RML وابستگی بیشتری به میزان جاذب نشان دادند که می تواند ناشی از تفاوت در رفتار بین سطحی و دسترسی پذیری جایگاه فعال آن ها باشد.

در این راستا، انجام آزمایش‌ها در مقیاس‌های بزرگ‌تر و شرایط عملیاتی نزدیک به صنعت، به‌منظور ارزیابی عملکرد سیستم، پایداری زیست‌کاتالیست و برآورد اولیه هزینه‌های عملیاتی، به‌عنوان بخشی از تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود.

قدردانی

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی که حمایت مالی پروژه را عهده‌دار بودند.

تولید آنزیمی بیودیزل به دلیل زیست‌تخریب‌پذیر بودن زیست‌کاتالیست و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی رویکردی سبز محسوب می‌شود، اما ارزیابی جامع پایداری این فرآیند نیازمند انجام ارزیابی چرخه حیات^۱ می‌باشد. در مطالعات آینده، LCA می‌تواند به‌منظور بررسی مصرف انرژی، منابع طبیعی و اثرات زیست‌محیطی فرآیند تولید بیودیزل با استفاده از آنزیم‌های تثبیت‌شده و مقایسه آن با روش‌های متداول تولید بیودیزل و سوخت‌های فسیلی انجام گیرد. علاوه بر این، یکی از گام‌های اساسی برای کاربرد صنعتی نتایج این تحقیق، بررسی مقیاس‌پذیری فرآیند تولید بیودیزل آنزیمی است.

مراجع

- [1] Wan Osman W.N.A., Rosli M.H., Mazli W.N.A., Samsuri S., [Comparative Review of Biodiesel Production and Purification](#), *Carbon Capture Sci. Technol.*, **13**: 100264 (2024).
- [2] Babaki M., Yousefi M., Habibi Z., Brask J., Mohammadi M., [Preparation of Highly Reusable Biocatalysts by Immobilization of Lipases on Epoxy-Functionalized Silica for Production of Biodiesel from Canola Oil](#), *Biochem. Eng. J.*, **101**: 23-31 (2015).
- [3] Osman A.I., Mehta N., Elgarahy A.M., Al-Hinai A., Al-Muhtaseb A.H., Rooney D.W., [Conversion of Biomass to Biofuels and Life Cycle Assessment: A Review](#), *Environ. Chem. Lett.*, **19**: 4075-118 (2021).
- [4] Tudge S.J., Purvis A., De Palma A., [The Impacts of Biofuel Crops on Local Biodiversity: A Global Synthesis](#), *Biodivers. Conserv.*, **30**: 2863-83 (2021).
- [5] Jeswani H.K., Chilvers A., Azapagic A., [Environmental Sustainability of Biofuels: A Review](#), *Proc. Math. Phys. Eng. Sci.*, **476**: 20200351 (2020).
- [6] Zahan K.A., Kano M., [Biodiesel Production from Palm Oil, Its By-Products, and Mill Effluent: A Review](#), *Energies*, **11**: 2132 (2018).
- [7] Venkatesan M., Vikram C.J., Naveenchandran P., [Performance and Emission Analysis of Pongamia Oil Methyl Ester with Diesel Blend](#), *Middle East J. Sci. Res.*, **12**: 1758-1765 (2012).
- [8] Adewale P., Dumont M.J., Ngadi M., [Recent Trends of Biodiesel Production from Animal Fat Wastes and Associated Production Techniques](#), *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **45**: 574-588 (2015).
- [9] Vilas Bôas R.N., Mendes M.F., [A Review of Biodiesel Production from Non-Edible Raw Materials Using the Transesterification Process with a Focus on Influence of Feedstock Composition and Free Fatty Acids](#), *J. Chil. Chem. Soc.*, **67**: 5433-44 (2022).
- [10] Topi D., [Transforming Waste Vegetable Oils to Biodiesel, Establishing of a Waste Oil Management System in Albania](#), *SN Appl. Sci.*, **2**: 513 (2020).

[۱۱] سعیدی، مجید؛ صفری پور، مریم؛ بلاغی، ابراهیم، تولید سوخت زیستی به روش پیرولیز با استفاده از کاتالیست‌های

برپایه زئولیت و چار زیستی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۲) ۴۳: ۱۱۳ تا ۱۳۱ (۱۴۰۳).

(۱) Life Cycle Assessment

[۱۲] کهنسال، کمیل؛ سلیمی، محمد؛ سماکچی، سها؛ توسلی، احمد؛ بزرگ، علی، تولید سوخت زیستی مایع از ریز جلبک نانو کلروپسیس در فرایند مایع سازی هیدروترمال با استفاده از کاتالیست‌های پایه کربنی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی/ایران، ۴۲(۱): ۳۵۱ تا ۳۵۹ (۱۴۰۲).

- [13] Naagar M., Chalia S., Thakur P., Sridhara S.N., Thakur A., Sharma P.B., [Nanoferrites Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production from Soybean and Canola Oil: A Review](#), *Environ. Chem. Lett.*, **19**: 3727-46 (2021).
- [14] Faruque M.O., Razzak S.A., Hossain M.M., [Application of Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production from Microalgal Oil—A Review](#), *Catalysts*, **10**: 1025 (2020).
- [15] Welter R.A., Santana H.S., Gaziola de la Torre L., Barnes M.C., Taranto O.P., Oelgemöller M., [Biodiesel Production by Heterogeneous Catalysis and Eco-friendly Routes](#), *ChemBioEng Rev.*, **10**: 86-111 (2023).
- [16] De Lima A.L., Ronconi C.M., Mota C.J.A., [Heterogeneous Basic Catalysts for Biodiesel Production](#), *Catal. Sci. Technol.*, **6**: 2877-2891 (2016).
- [17] Raza M., Ali L., Inayat A., Rocha-Meneses L., Ahmed S.F., Mofijur M., Jamil F., Azimoh C.L., [Sustainability of Biodiesel Production Using Immobilized Enzymes: A Strategy to Meet Future Bio-Economy Challenges](#), *Int. J. Energy Res.*, **46**: 19090-108 (2022).
- [18] Ben Bacha A., Alonazi M., Alharbi M.G., Horchani H., Ben Abdelmalek I., [Biodiesel Production by Single and Mixed Immobilized Lipases Using Waste Cooking Oil](#), *Molecules*, **27**: 8736 (2022).
- [19] Wang B., Wang B., Shukla S.K., Wang R., [Enabling Catalysts for Biodiesel Production via Transesterification](#), *Catalysts*, **13**: 740 (2023).
- [20] Maheshwari P., Haider M.B., Yusuf M., Klemes J.J., Bokhari A., Beg M., Al-Othman A. Kumar R. Jaiswal A.K., [A Review on Latest Trends in Cleaner Biodiesel Production: Role of Feedstock, Production Methods, and Catalysts](#), *J. Clean. Prod.*, **355**: 131588 (2022).
- [21] Monika, Banga S., Pathak V.V., [Biodiesel Production from Waste Cooking Oil: A Comprehensive Review on the Application of Heterogenous Catalysts](#), *Energy Nexus*, **10**: 100209 (2023).
- [22] Kalita P., Basumatary B., Saikia P., Das B., Basumatary S., [Biodiesel as Renewable Biofuel Produced via Enzyme-Based Catalyzed Transesterification](#), *Energy Nexus*, **6**: 100087 (2022).
- [23] Lv L., Dai L., Du W., Liu D., [Progress in Enzymatic Biodiesel Production and Commercialization](#), *Processes*, **9**: 355 (2021).
- [24] Aljawish A., Millares M., Froidevaux R., [Clean and Sustainable Methods to Remove Free Fatty Acids from Biodiesel Produced from Used Cooking Oil Through Enzymatic Ethanolysis](#), *Biomass Bioenergy*, **194**: 107611 (2025).
- [25] Nadar S.S., Rathod V.K., [Magnetic-Metal Organic Framework \(Magnetic-MOF\): A Novel Platform for Enzyme Immobilization and Nanozyme Applications](#), *Int. J. Biol. Macromol.*, **120**: 2293-2302 (2018).
- [26] Winkler C.K., Schrittwieser J.H., Kroutil W., [Power of biocatalysis for organic synthesis](#), *ACS Cent. Sci.*, **7**: 55-71 (2021).

- [27] Zdarta J., Meyer A.S., Jesionowski T., Pinelo M., [A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility](#), *Catalysts*, **8**(2): 92 (2018).
- [28] Hama S., Noda H., Kondo A., [How Lipase Technology Contributes to Evolution of Biodiesel Production Using Multiple Feedstocks](#), *Curr. Opin. Biotechnol.*, **50**: 57-64 (2018).
- [29] Sirisha V.L., Jain A., Jain A., [Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes](#), *Adv. Food Nutr. Res.*, **79**: 179-211 (2016).
- [30] Facin B.R., Melchior M.S., Valério A., Oliveira J.V., Oliveira, D.b.d., [Driving Immobilized Lipases as Biocatalysts: 10 Years State of the Art and Future Prospects](#), *Ind. Eng. Chem. Res.*, **58**(14): 5358-5378 (2019).
- [31] Xie W., Huang M., [Enzymatic Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase on Core-Shell Structured Fe₃O₄@MIL-100\(Fe\) Composites](#), *Catalysts* **9**(10): 850 (2019).
- [32] Adachi D., Hama S., Nakashima K., Bogaki T., Ogino C., Kondo A., [Production of Biodiesel from Plant Oil Hydrolysates Using An *Aspergillus Oryzae* Whole-Cell Biocatalyst Highly Expressing *Candida Antarctica* Lipase B](#), *Bioresour. Technol.*, **135**: 410-416 (2013).
- [33] Zheng J., Wei W., Wang S., Li X., Zhang Y., Wang Z., [Immobilization of Lipzyme TL 100L for Methyl Esterification of Soybean Oil Deodorizer Distillate](#), *3 Biotech*, **10**: 51 (2020).
- [34] Adnan M., Li K., Xu L., Yan Y. [X-Shaped ZIF-8 for Immobilization *Rhizomucor Miehei* Lipase via Encapsulation and Its Application Toward Biodiesel Production](#), *Catalysts*, **8**: 96 (2018).
- [35] Wang Y.D., Shen X.Y., Li Z.L., Li X., Wang F., Nie X.A., Jiang J.C., [Immobilized Recombinant *Rhizopus Oryzae* Lipase for the Production of Biodiesel in Solvent Free System](#), *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **67**: 45-51 (2010).
- [36] Bartha-Vári J.H., Moisă M.E., Bencze L.C., Irimie, F.D., Paizs, C., Toşa M.I., [Efficient Biodiesel Production Catalyzed by Nanobioconjugate of Lipase from *Pseudomonas Fluorescens*](#), *Molecules*, **25**: 651 (2020).
- [37] Shahedi M., Yousefi M., Habibi Z., Mohammadi M., Ashabi M.A., [Co-Immobilization of *Rhizomucor Miehei* Lipase and *Candida Antarctica* Lipase B and Optimization of Biocatalytic Biodiesel Production from Palm Oil Using Response Surface Methodology](#), *Renew. Energy*, **141**: 847-857 (2019).
- [38] Sundberg L., Porath J., [Preparation of Adsorbents for Biospecificaffinity Chromatography: I. Attachment of Group-Containing Ligands to Insoluble Polymers by Means of Bifunctional Oxiranes](#), *J. Chromatogr. A*, **90**: 87-98 (1974).
- [39] Bradford M.M., [A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding](#), *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254 (1976).
- [40] Mateo C., Abian O., Fernandez-Lorente G., Pessela B.C.C., Grazu V., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente., [Multi-Point Covalent Immobilization of Enzymes on Supports Activated with Epoxy Groups: Stabilization of Industrial Enzymes](#), *Methods Mol Biol*. **2100**: 109-17 (2020).
- [41] Fan X., Zhai S., Xue S., Zhi L., [Enzyme Immobilization using Covalent Organic Frameworks: From Synthetic Strategy to COFs Functional Role](#), *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **16**: 40371-90 (2024).
- [42] Lakhani P., Bhandari D., Modi C.K., [Silica-Supported Ionic Liquids as Versatile Catalysts: A Case Study](#), *J. Mol. Liq.*, **408**: 125306 (2024).

- [43] Tadesse M., Liu Y., [Recent Advances in Enzyme Immobilization: The Role of Artificial Intelligence, Novel Nanomaterials, and Dynamic Carrier Systems](#), *Catalysts*, **15**: 571 (2025).
- [44] Mohammadi M., Habibi Z., Dezvarei S., Yousefi M., Ashjari M., [Selective Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids by Hydrolysis of Fish Oil Using Immobilized and Stabilized *Rhizomucor Miehei* Lipase Preparations](#), *Food Bioprod. Process.*, **94**: 414-421 (2015).
- [45] Mohammadi M., Gandomkar S., Habibi Z., Yousefi M., [One Pot Three-Component Reaction for Covalent Immobilization of Enzymes: Application of Immobilized Lipases for Kinetic Resolution of rac-Ibuprofen](#), *RSC Adv.*, **6**: 52838-49 (2016).
- [46] Ashkan Z., Hemmati R., Homaei A., Dinari A., Jamlidoost M., Tashakor A., [Immobilization of Enzymes on Nanoinorganic Support Materials: An Update](#), *Int. J. Biol. Macromol.*, **168**: 708-721 (2021).
- [47] Singh R.K., Tiwari M.K., Singh R., Lee J.-K., [From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes](#), *Int. J. Mol. Sci.*, **14**: 1232-77 (2013).
- [48] Xia S., Lin J., Sayanjali S., Shen C., Cheong L.-Z., [Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel: A Critical Review on Feedstock, Enzyme Carrier and Process Factors](#), *Biofuels Bioprod. Biorefining*, **18**: 291-309 (2024).
- [49] Sundaramahalingam M.A., Amrutha C., Sivashanmugam P., Rajeshbanu J., [An Encapsulated Report on Enzyme-Assisted Transesterification with an Allusion to Lipase](#), *3 Biotech.* **11**: 481 (2021).
- [50] Zheng Y., Quan J., Ning X., Zhu L.-M., Jiang B., He Z.-Y., [Lipase-Catalyzed Transesterification of Soybean Oil for Biodiesel Production in *t*-Amyl Alcohol](#), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**: 41-6 (2009).
- [51] Babaki M., Yousefi M., Habibi Z., Mohammadi M., Brask J., [Effect of Water, Organic Solvent and Adsorbent Contents on Production of Biodiesel Fuel from Canola Oil Catalyzed by Various Lipases Immobilized on Epoxy-Functionalized Silica as Low Cost Biocatalyst](#), *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **120**: 93-99 (2015).
- [52] Li L., Du W., Liu D., Wang L., Li Z. [Lipase-Catalyzed Transesterification of Rapeseed Oils for Biodiesel Production with a Novel Organic Solvent as the Reaction Medium](#), *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **43**: 58-62 (2006).
- [53] Talukder M.M.R., Wu J.C., Van Nguyen T.B., Fen N.M., Melissa Y.L.S. [Novozym 435 for Production of Biodiesel from Unrefined Palm Oil: Comparison of Methanolysis Methods](#), *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **60**, 106-112 (2009).
- [54] Taher H., Al-Zuhair S., Al-Marzouqi A.H., Haik Y., Farid M.M., [A Review of Enzymatic Transesterification of Microalgal Oil-Based Biodiesel using Supercritical Technology](#), *Enzyme Res.*, **2011**: 468292 (2011).
- [55] Chen W., Kou M., Lin S., Zhong N., [Effects of Solvents on the Glycerolysis Performance of the SBA-15 Supported Lipases](#), *J. Oleo Sci.*, **70(3)**: 385-395 (2021).
- [56] Fernandez-Lorente G., Cabrera Z., Godoy C., Fernandez-Lafuente R., Palomo J.M., Guisan J.M., [Interfacially Activated Lipases Against Hydrophobic Supports: Effect of the Support Nature on the Biocatalytic Properties](#), *Process Biochem.*, **43**: 1061-1067 (2008).
- [57] Nelson L.A., Foglia T.A., Marmer W.N., [Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel](#), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**: 1191-1195 (1996).

- [58] Zaks A., Klibanov A.M., [The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media](#), *J. Biol. Chem.*, **263**: 8017-8021(1988).
- [59] Gog A., Roman M., Tosa M., Paizs C., Irimie F.D., [Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification – Current State and Perspectives](#), *Renew. Energy*, **39**: 10-16 (2012).
- [60] Yücel Y., [The Enzymatic Production of Biodiesel from Pomace Oil Using Immobilized *Thermomyces lanuginosus*](#) *Energy Sources A: Recovery Util. Environ. Eff.*, **3**: 370-375 (2013).
- [61] Li N.-W., Zong M.-H., Wu H., [Highly Efficient Transformation of Waste Oil to Biodiesel by Immobilized Lipase from *Penicillium Expansum*](#), *Process Biochemistry.*, **44**: 685-688 (2009).
- [62] Wang L., Du W., Liu D., Li L., Dai N., [Lipase-Catalyzed Biodiesel Production from Soybean Oil Deodorizer Distillate with Absorbent Present in *t*-Butanol System](#), *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **43**: 29-32 (2006).
- [63] Mehde A.A., Mehdi W.A., Severgün O., Cakar S., Özacar M., [Lipase-Based on Starch Material as a Development Matrix with Magnetite Cross-Linked Enzyme Aggregates and Its Application](#), *Int. J. Biol. Macromol.*, **120**: 1533-1543 (2018).
- [64] Wan D., Yan C., Zhang Q., [Facile and Rapid Synthesis of Hollow Magnetic Mesoporous Polydopamine Nanoflowers with Tunable Pore Structures for Lipase Immobilization: Green Production of Biodiesel](#), *Ind. Eng. Chem. Res.*, **58**: 16358-16369 (2019).
- [65] Maghraby Y.R., El-Shabasy R.M., Ibrahim A.H., Azzazy H.M.E.S., [Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications](#), *ACS omega*, **8**: 5184-5196 (2023).
- [66] Xie W., Ma N., [Immobilized Lipase on Fe₃O₄ Nanoparticles as Biocatalyst for Biodiesel Production](#), *Energy Fuels*, **23**: 1347-1353 (2009).
- [67] Zucca P., Sanjust E., [Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms](#), *Molecules*, **19**: 14139-14194 (2014).
- [68] Prabhakar T., Giaretta J., Zulli R., Rath R.J., Farajikhah S., Talebian S., Dehghani F., [Covalent Immobilization: A Review from an Enzyme Perspective](#), *Chem. Eng. J.*, **503**: 158054 (2025).
- [69] Hassan M.E., Zhu X., de Souza E.F., Elnashar M.M., Lu, F., [Enzyme Immobilization Advances: a Key to Unlocking Renewable Bioenergy Potential](#), *Green Chem.*, **27**: 11289-11311 (2025).
- [70] Thangaraj B., Jia Z., Dai L., Liu D., Du W., [Lipase NS81006 Immobilized on Functionalized Ferric-Silica Magnetic Nanoparticles for Biodiesel Production](#), *Biofuels*, **11**: 811-819 (2017).