

تولید دیزل زیستی از روغن کرچک در حضور زیست کاتالیست لیپاز/کلسیم آلزینات: بهینه‌سازی و بررسی اثر دما، مقدار کاتالیست و نسبت متانول به روغن

آرش داودی^۱ مهر^۱، علیرضا شاکری^۲ و محمد براتی^{۳،۴*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشکده‌گان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲. استاد گروه شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشکده‌گان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳. استادیار گروه شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران.

۴. پژوهشکده نانوفناوری، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران.

دریافت: بهمن ۱۴۰۱ بازنگری: اردیبهشت ۱۴۰۲ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۲



10.30495/JACR.2023.1978271.2089



20.1001.1.27835324.1402.17.2.2.8

چکیده

در این مطالعه دیزل زیستی در حضور زیست کاتالیست لیپاز/کلسیم آلزینات از روغن کرچک تهیه شد. آنزیم لیپاز پانکراس بر پایه کلسیم آلزیناتی تثبیت و در واکنش استری شدن روغن کرچک به متیل استرها اسید چرب (FAMES) استفاده شد. پایه کلسیم آلزینات سنتز شده با طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) و روش BET شناسایی شد. همچنین، پس از نشان دادن لیپاز بر آن، محتوای پروتئینی زیست کاتالیست سنتز شده، همچنین، فعالیت آب‌کافتی و زیست کاتالیستی آن در واکنش استری شدن ارزیابی شد. برای بهینه‌سازی واکنش تولید دیزل زیستی، طراحی آزمایش با به کارگیری نرم افزار SAS JMP Pro انجام شد. برای این کار سه عامل دمای واکنش، مقدار کاتالیست و نسبت متانول به روغن در نظر گرفته شد و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) انجام گرفت. نتیجه‌ها نشان داد که بیشترین مقدار دیزل زیستی (۸۶/۹۶٪) در دمای ۴۸/۲ °C با ۰/۳۲ گرم کاتالیست و نسبت متانول به روغن ۰/۵۰ به دست می‌آید. همچنین، مشخص شد که مقادیر بالای هر کدام از این عامل‌ها تاثیر منفی بر بازده تولید دیزل زیستی دارند که دلیل آن به ویژگی‌های ذاتی آنزیم، مانند غیرفعال شدن در دماها و مقادیر متانول بالاتر، همچنین، کلوخگی و تغییر صورت‌بندی در غلظت‌های بالا نسبت داده شد.

واژه‌های کلیدی: دیزل زیستی، زیست کاتالیست، لیپاز، بهینه‌سازی فرایند، روغن کرچک.

زیستی تولیدشده با لیپاز تثبیت شده در مقایسه با لیپاز آزاد نقطه ریزش، نقطه ابری و گرانروی مشابهی داشت و از نظر چگالی در دمای °C ۱۵ و نقطه اشتعال، ویژگی‌های مناسب‌تری را نشان داد [۱۰]. در مطالعه دیگری، لیپاز استخراج شده از قارچ *Lasiodiplodia theobromae* VBE1 بر گرانول‌های کلسیم آلزینات تثبیت و برای تولید دیزل زیستی از روغن نارگیل استفاده شده است. دیزل زیستی در این فرایند بیشتر از نوع متیل استرهای اسید چرب لورات ۴۶/۱٪، میریستات ۲۲/۳٪، پالمیتات ۹/۹٪ و اولئات ۷/۲٪ گزارش شدند [۱۱]. روغن آفتاب‌گردان خوراکی برای تولید دیزل زیستی در حضور لیپاز آزاد و قارچ مولد لیپاز رایزوپوس اوریزیایی^۱ که بر بستری از کلسیم آلزینات تثبیت شده‌اند، در مطالعه‌ای استفاده شده است. در این مطالعه چهار الکل متانول، اتانول، نرمال پروپانول و نرمال بوتانول به‌عنوان حلال و پذیرندهٔ آسیل برای تولید آلکیل استرهای اسید چرب استفاده شد. در میان پذیرنده‌های متفاوت آسیل، متانول بیشترین مقدار تبدیل تری‌گلیسیرید به آلکیل استرهای اسید چرب (۹۴٪) را نشان داد. در مجموع، آنزیم آزاد نسبت به آنزیم تثبیت شده توانایی تبدیل کاتالیستی بهتری با همه گیرنده‌های آسیل نشان داد [۱۲]. در مطالعه دیگری تأثیر پایه‌های متفاوت برای تثبیت شیمیایی سلول‌های ریزجلبک کلرلا و لگاریس بر عامل‌های متفاوت استخراج روغن بررسی شده است. در این مطالعه ریزجلبک، کشت و برداشت و سپس بر پایه‌ای از کلسیم آلزینات، سدیم آلزینات و سدیم کربوکسی متیل سلولز تثبیت شد. برای فرایند استخراج روغن، هپتان به‌عنوان حلال در دماها و زمان‌های متفاوت استخراج استفاده شد. بالاترین مقدار استخراج روغن ۲۵/۱۱٪ در دمای ۳۴۸ کلوین بود. این نتیجه‌ها از این بابت اهمیت دارند که تولید دیزل زیستی را از روغن ریزجلبک که بر پایه‌ها تثبیت شده، امکان‌پذیر نشان داده است [۱۳]. در یک پژوهش مشابه، ریزجلبک کلرلا و لگاریس به‌عنوان یک زیست توده غنی از روغن بر شش پایه تثبیت و از روغن استخراجی آن برای تولید دیزل زیستی استفاده شده است. شش پایه مورد استفاده سدیم آلزینات، سدیم

ماده اولیه دیزل زیستی روغن‌های گیاهی، حیوانی، پسماندهای روغنی و روغن ریزجلبک‌ها است که غنی از اسیدهای چرب آزاد و تری‌گلیسیریدها هستند. فرایند تبدیل روغن به دیزل زیستی بیشتر در حضور کاتالیست‌های ناهمگن شیمیایی (کاتالیست‌های اسیدی، بازی و اکسیدهای فلزی) و زیست‌کاتالیست‌ها انجام می‌شود [۱ تا ۳]. زئولیت‌ها از جمله پرکاربردترین کاتالیست‌های ناهمگن شیمیایی هستند که در فرایندهای تولید دیزل زیستی، هم به‌تنهایی به‌عنوان کاتالیست و هم به‌عنوان پایه برای تثبیت فلزها و اکسیدهای فلزی استفاده شده‌اند. از آنجایی که این ترکیب‌ها قابلیت بسزایی برای اصلاح دارند، در بیشتر موارد پیش از استفاده، به‌منظور اصلاحات سطحی و ایجاد گروه‌های عاملی تیمار می‌شوند [۴ و ۵]. ساختار اصلاح شده ZSM-22 پس از بارگذاری Fe، Zr و Sr به‌عنوان پایه کاتالیست تولید دیزل زیستی به‌کارگرفته شده است. بالاترین بهره تولید دیزل زیستی در حضور Zr-ZMS-22 به‌دست آمده است [۶]. در مطالعه دیگری ساختار اصلاح شده ZSM-8 به‌تنهایی به‌عنوان کاتالیست تولید دیزل زیستی استفاده و شرایط عملیاتی بهینه شده است. نتیجه‌ها نشان داد که بیشترین بهره تولید دیزل زیستی در حضور این کاتالیست ۵۷٪ بود [۷]. یک نوع دیگر کاتالیست در فرایند تولید دیزل زیستی، آنزیم لیپاز است. استفاده از آنزیم به دلیل سرعت بالای واکنش و گزینش‌پذیری بسیار بالا، همواره مورد توجه پژوهشگران حوزه دیزل زیستی بوده است. با این وجود اتلاف این ماده گران‌قیمت در هر بار واکنش یکی از مشکل‌های فرایندهای آنزیمی است. برای برطرف کردن این ایراد، آنزیم بر بسترهای قابل بازیابی تثبیت می‌شود. یکی از بسترهای تثبیت آنزیم در فرایندهای تولید دیزل زیستی گرانول‌های کلسیم آلزینات است [۸ و ۹]. در مطالعه‌ای ویژگی سوخت دیزل زیستی تولیدشده از روغن نخل با استفاده از لیپاز تثبیت شده بر کلسیم آلزینات بررسی شده است. نتیجه‌ها نشان داد که بهره دیزل زیستی تولید شده از لیپاز آزاد و تثبیت شده به ترتیب ۹۶/۹۰ و ۹۴/۴۲٪ بود. همچنین، در این مطالعه ویژگی‌های سوختی دیزل زیستی نیز مطالعه شده است. نتیجه‌ها نشان داد که دیزل

هیدروکلریک اسید (۳۶٪) از شرکت مرک خریداری شدند. حلال‌های مورد استفاده در این مطالعه از شرکت مرک و روغن کرچک از کارگاه پرس دانه‌های روغنی صنعتی امید خریداری شدند.

استخراج روغن

روغن کرچک در دو مرحله استخراج شد. در مرحله اول از پرس سرد تحت فشار بالا استفاده شد. در این مرحله، دما به دقت واپایش شد تا از افزایش ناگهانی دما جلوگیری شود. سپس عصاره به دست آمده برای جداسازی مواد جامد و روغن فیلتر شد. در مرحله دوم، همه باقی مانده جامد (کیک) مرحله اول از طریق استخراج با حلال در استخراج کننده سوکسله در حضور حلال نرمال هگزان در دمای °C ۷۰ به مدت ۵ ساعت تیمار شد. در نهایت حلال نرمال هگزان با دستگاه تبخیرکن چرخان جدا شد و روغن به دست آمده از این مرحله به روغن استخراج شده در مرحله اول افزوده شد.

تثبیت آنزیم بر کلسیم آلزینات

۱۰۰ میلی لیتر محلول آبی سیر سدیم آلزینات حاوی ۰/۲ گرم لیپاز تهیه و قطره قطره به ۲۰۰ میلی لیتر محلول کلسیم کلرید (۲ مولار) در دمای °C ۴ افزوده و بی درنگ گرانول‌های کلسیم آلزینات تشکیل شد. سدیم آلزینات یک پلی ساکارید حاوی یون‌های سدیم است که وقتی در محلولی حاوی یون‌های کلسیم قرار می‌گیرد، تبادل یونی رخ داده و کلسیم به عنوان یک عامل پیوند عرضی^۴ عمل می‌کند و موجب تشکیل بسیار با وزن مولکولی بالاتر می‌شود. برای بهبود استحکام مکانیکی، گرانول‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای °C ۴ نگهداری شدند. سپس با صافش در خلأ از مخلوط جدا و چندین بار با آب یون زوده شسته شدند. پروتئین زیست کاتالیست با روش استاندارد برادفورد اندازه‌گیری و برپاه معادله ۱ محاسبه شد.

$$C_L \frac{C_0 V_0 - C_f V_f}{m_b} \quad (1)$$

آلزینات-کیتوزان، سدیم آلزینات-کاراگینان^۱، سدیم آلزینات-ژلاتین، سدیم آلزینات-کلسیم آلزینات، و سدیم آلزینات-سدیم کربوکسی متیل سلولز بود. با پایه سدیم آلزینات-ژلاتین بالاترین بازده استخراج روغن، ۵۹/۱۴٪ و مقدار دیزل زیستی 0.756 mg.g^{-1} بود. همچنین، روغن استخراج شده از ریزجلبک کلرلا ولگاریس تجزیه و مشخص شد که حاوی پالمیتیک اسید (C16:0)، استئاریک اسید (C18:0)، اولئیک اسید (C18:1)، لینولئیک اسید (C18:2) و لینولنیک اسید (C18:3) است [۱۴]. کپسول (گرانول)‌هایی از کلسیم آلزینات برای قرار گرفتن کاتالیست‌های غیر آنزیمی به منظور تولید دیزل زیستی نیز استفاده شده‌اند. در یک پژوهش، کلسیم اکسید به عنوان کاتالیست تولید دیزل زیستی در گرانول‌های کلسیم آلزینات حبس و برای استری شدن روغن کلزا و تبدیل به متیل استرهای اسید چرب استفاده شد. برای این کار محیط واکنش تحت تابش پرتو نوری با توان ۳/۶ وات قرار گرفت. نتیجه‌ها نشان داد که مقدار تولید دیزل زیستی پس از یک ساعت تابش، ۶۰٪ و پس از ۶ ساعت تابش، ۹۰٪ بود [۱۵]. در این مطالعه آنزیم لیپاز پانکراس^۲ بر گرانول‌های کلسیم آلزینات، به منظور تولید دیزل زیستی تثبیت شد. بهینه‌سازی شرایط فرایند تولید متیل استرهای اسید چرب از روغن کرچک هدف اصلی این پژوهش بود. بدین منظور از نرم‌افزار SAS JMP Pro 16 برای طراحی آزمایش و با روش شناسی سطح پاسخ (RSM^۳) برای تحلیل نتیجه‌ها استفاده شد. شرایط دمای واکنش، مقدار کاتالیست و نسبت متانول به روغن مطالعه شد و بهترین شرایط برای تولید دیزل زیستی به دست آمد.

بخش تجربی

مواد

آنزیم لیپاز پانکراس، سدیم آلزینات و آلبومین سرم گاوی (BSA) از شرکت سیگما-آلد ریچ خریداری شدند. کوماسی برلیانت بلو G-250، سدیم هیدروکسید (۹۹/۹٪) و

1. Carrageenan

2. Porcine pancreatic

3. Response surface methodology (RSM)

4. Cross-linking agent

برابر با ۶/۱ به فراورده افزوده شد. سپس، به مدت ۹۰ ثانیه با مخلوطکن گردابی^۲ به شدت مخلوط شد. پس از آن، مخلوطها به مدت ۲ ساعت رها شدند تا دو فاز بالا و پایین تشکیل شود. فازهای بالایی جمع‌آوری و اسید چرب باقی‌مانده آن‌ها با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۷۱۵ نانومتر با طیف‌نورسنج UV-Vis محاسبه شد.

طراحی آزمایش برای تولید دیزل زیستی

طراحی آزمایش و مدل‌سازی داده‌ها با روش سطح پاسخ (RSM) و نرم‌افزار آماری SAS JMP Pro 14 انجام شد. مدل‌سازی واکنش برای یافتن شرایط بهینه تولید دیزل زیستی انجام شد. برای این منظور، ۳ متغیر دمای واکنش (از ۴۲ تا ۵۲ °C)، مقدار کاتالیست (از ۰/۱ تا ۰/۵ گرم) و نسبت متانول به روغن (از ۰/۱ تا ۱) در نظر گرفته شد. برای هر آزمایش ۲/۰ گرم روغن کرچک و ۵/۰ میلی‌لیتر نرمال هگزان در یک ویال شفاف ۴۰ میلی‌لیتری ریخته شد و واکنش مطابق جدول طراحی آزمایشی انجام شد. اسیدینگی فاز آبی محیط واکنش با استفاده از بافر فسفات خنثی شد. ویال‌ها در یک حمام روغن با دمای معین قرار داده شدند و محتویات ویال‌ها با همزن مغناطیسی هم‌زده شد. پس از پایان واکنش، کاتالیست و گلیسرول تولیدشده با یک گریزانه با دور ۳۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه به صورت فاز زیرین جدا شدند. فاز بالایی جمع‌آوری شد و آب یون‌زدوده به آن افزوده و در دمای ۵۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده شد. مخلوط به مدت ۲ ساعت رها شد تا دو فاز بالا و پایین تشکیل شود. لایه بالایی جمع‌آوری و برای تجزیه به GC-MS فرستاده شد.

شناسایی زیست‌کاتالیست

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (MIRA3)، TESCAN (جمهوری چک) برای مطالعه ریخت‌شناسی سطح زیست‌کاتالیست لیپاز تثبیت‌شده بر کلسیم آلزینات استفاده شد. برای مطالعه گروه‌های عاملی این کاتالیست از طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (Bruker Tensor 27 IR, Germany)

که در آن مقدار لیپاز در هر گرم کلسیم آلزینات خشک، C_L غلظت وزنی اولیه لیپاز $(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ ، V_0 حجم محلول اولیه کلسیم آلزینات (ml)، C_f غلظت وزنی لیپاز در محلول صاف‌شده پس از بارگذاری $(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ ، V_f حجم محلول صاف‌شده (ml) و m_b وزن گرانول‌های خشک کلسیم آلزینات (mg) است.

فعالیت آب‌کافتی آنزیم

واکنش آب‌کافت ۳،۲،۱-تری استوکسی‌پروپان (تری‌استین^۱) برای تعیین فعالیت آنزیم آزاد تثبیت‌شده انجام شد. برای این کار محلول‌هایی با اسیدینگی خنثی ($\text{pH} = 7.0$) از ۲/۰ گرم تری‌استین، ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و بافر فسفات ۱/۰ مولار تهیه شد و تا زمانی که نامیزه تری‌استین تشکیل شود، هم زده شد. سپس مقادیر مشخصی از لیپاز آزاد و تثبیت‌شده برای انجام واکنش آب‌کافت به صورت جداگانه به این محلول‌ها افزوده شد. استیک اسید فراورده این واکنش است و pH محیط را کاهش می‌دهد. مخلوط به دست‌آمده به طور پیوسته با محلول NaOH ۰/۰۱ مولار تیترا شد. فعالیت زیست‌کاتالیست بر پایه این تعریف که یک واحد فعالیت لیپاز، مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزادسازی ۱ میکرومول استون در دمای ۳۷ °C در هر دقیقه است، محاسبه شد.

فعالیت آنزیم در واکنش استری‌شدن

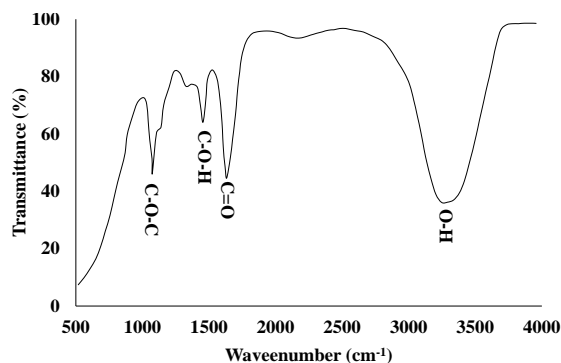
یک واکنش الکل‌زیمی برای ارزیابی فعالیت استری‌سازی زیست‌کاتالیست‌ها انجام شد. مقدار معینی از لیپاز آزاد (۰/۰۲۲۵ گرم) و مقدار معادل آن لیپاز تثبیت‌شده به یک محلول نرمال هگزان ۱۰ میلی‌لیتری حاوی ۰/۶۳۱ میلی‌لیتر اولئیک اسید افزوده شد. سپس نرمال بوتانول تا نسبت مولی الکل به اولئیک اسید ۱:۱ برسد، افزوده شد. زمان واکنش ۴ ساعت و دمای واکنش ۳۷ °C بود. عملکرد واکنش بر پایه مقدار اسیدهای چرب آزاد باقی‌مانده محاسبه شد. برای این منظور، پس از پایان واکنش، ۲ میلی‌لیتر معرف مس (II) پیریدین استات (محلول در آب) با غلظت ۵ درصد وزنی-حجمی و pH

1. Triacetin

2. Vortex mixer

تولید دیزل زیستی از روغن کرچک در حضور زیست کاتالیست ...

است و قله ظاهر شده در 1074 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه اتری C-O-C موجود در ساختار آلزینات است [۱۶].



شکل ۲ طیف FTIR کلسیم آلزینات سنتز شده

ویژگی‌های بافتی کلسیم آلزینات با روش BET بررسی شد. نتیجه‌های این آزمون نشان داد که حجم کل حفره‌ها، مساحت سطح BET و میانگین قطر حفره‌ها برای کلسیم آلزینات سنتز شده به ترتیب برابر با $0.239 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ، $17 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ و 5.62 بوده است. همچنین، بررسی محتوای پروتئینی برای ارزیابی مقدار بارگذاری آنزیم بر زیست کاتالیست تهیه شده (لیباز/کلسیم آلزینات) با روش بردفورد (Bradford's method) انجام گرفت. نتیجه‌ها نشان داد که آنزیم به اندازه 31.95 درصد بر پایه کلسیم آلزینات نشسته است. مقدار فعالیت آب‌کافتی آنزیم و فعالیت آنزیم در واکنش استری شدن به ترتیب 32.47 و $38.3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ بود.

تولید دیزل زیستی

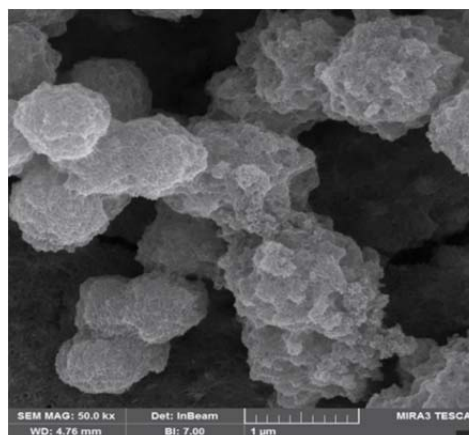
اثرات دمای واکنش، مقدار کاتالیست و نسبت متانول به روغن، همچنین برهم‌کنش‌های آن‌ها با روش RSM در نرم‌افزار SASJMP پیش‌بینی شد. برپایه جدول طراحی آزمایشی، ۱۶ آزمایش انجام شد و بازده تولید دیزل زیستی با محاسبه‌های مدل‌سازی گزارش شد. معادله ریاضی پیش‌بینی - شده برای تولید دیزل زیستی (FAMEs) به شرح زیر است:

استفاده شد. ویژگی بافتی کلسیم آلزینات سنتز شده (مساحت سطح، حجم حفره‌ها و اندازه حفره‌ها) با روش BET (BELSORP-mini، ژاپن) تعیین شد.

نتیجه‌ها و بحث

شناسایی زیست کاتالیست

برای ریخت‌شناسی سطح گرانول‌های کلسیم آلزینات، یک میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی به کار گرفته شد. شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گرانول‌های بسیار کروی با قطرهای بین 50 نانومتر تا 1 میکرومتر را نشان می‌دهد. همچنین، تخلخل سطحی برای همه گرانول‌ها مشاهده می‌شود.



شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی کلسیم آلزینات تهیه شده

شکل ۲ طیف FTIR مربوط به کلسیم آلزینات سنتز شده را نشان می‌دهد. در این شکل قله پهن 3200 تا 3600 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی پیوند O-H موجود در ساختار آلزینات است. قله تیز 1632 cm^{-1} مربوط به گروه ارتعاش کششی C=O در گروه عاملی کربوکسیلیک در آلزینات است. قله ظاهر شده در 1454 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی C-O-H

$$\begin{aligned}
 \text{FAMES yiled (\%)} = & 86.65 + 1.716 \left(\frac{T - 47}{5} \right) + 0.538 \left(\frac{C - 0.3}{0.2} \right) - 1.269 \left(\frac{MO - 0.55}{0.45} \right) - 3.38 \left(\frac{T - 47}{5} \right)^2 \\
 & - 0.46 \left(\frac{T - 47}{5} \right) \left(\frac{C - 0.3}{0.2} \right) - 1.89 \left(\frac{C - 0.3}{0.2} \right)^2 + 0.019 \left(\frac{T - 47}{5} \right) \left(\frac{MO - 0.55}{0.45} \right) \\
 & - 0.27 \left(\frac{C - 0.3}{0.2} \right) \left(\frac{MO - 0.55}{0.45} \right) - 5.85 \left(\frac{M - 0.55}{0.45} \right)^2
 \end{aligned}$$

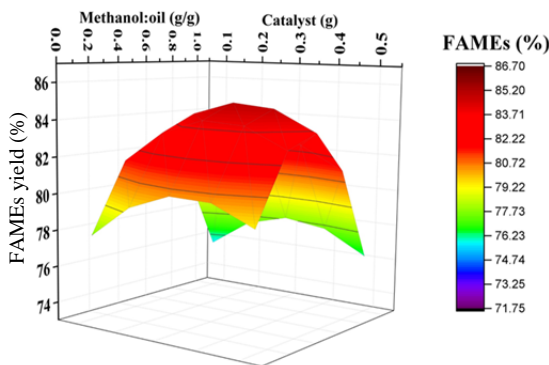
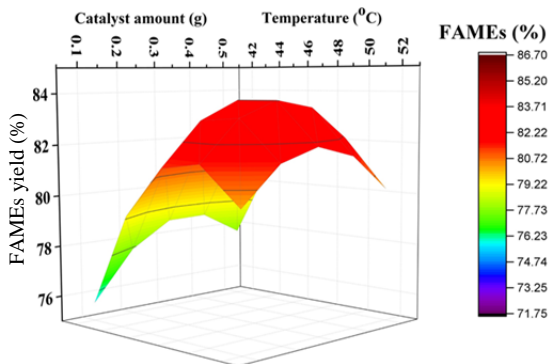
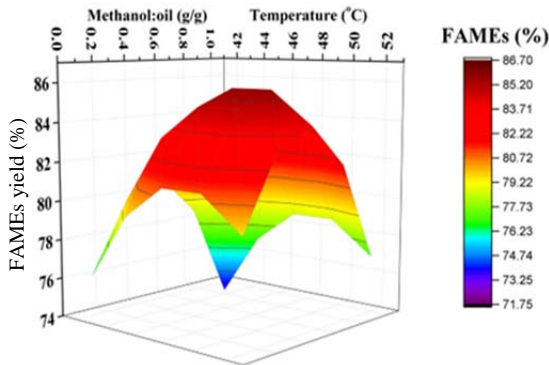
دارد. در حضور این نانوزیست کاتالیست، ۷۱/۱۹٪ دیزل زیستی در شرایط بهینه آزمایشی °C ۴۵ به مدت ۲۴ ساعت و نسبت حجمی روغن به متانول ۱ به ۳ در حضور ۸/۶ میلی گرم کاتالیست به دست آمد [۱۹]. از ساختار سه بعدی گرافن اکسید مغناطیسی نیز برای تثبیت آنزیم لیپاز برای تولید دیزل زیستی استفاده شده است. گزارش شده است که چنین ساختاری تأثیر بسزایی در بهبود ویژگی مقاومتی آنزیم در برابر گرما داشته و توانسته است تا °C ۱۰ ویژگی‌های پایداری گرمایی آنزیم را بهبود دهد. همچنین، مشخص شده است که فعالیت آنزیم در مخلوط واکنش پس از ۵ دوره بازایی تغییر چندانی نداشته است. شرایط بهینه برای تولید دیزل زیستی در حضور این نانوزیست کاتالیست، دمای °C ۴۵ و مدت زمان واکنش ۲۴ ساعت بود [۲۰].

مقایسه کارهای مشابه با پژوهش حاضر که در آن‌ها آنزیم لیپاز برای تولید دیزل زیستی استفاده شده است، نشان می‌دهد که شرایط بهینه دمایی برای زیست کاتالیست لیپاز/کلسیم آلزینات تا °C ۵/۸ نسبت به زیست کاتالیست‌های دیگر ارتقا یافته است. از آنجایی که آنزیم‌ها ماهیت پروتئینی دارند، در برابر دما بسیار حساس بوده و صورت‌بندی^۱ بیشتر آن‌ها در بازه دمایی ۴۰ تا ۵۰°C تغییر پیدا می‌کند. این موضوع موجب کاهش فعالیت آن‌ها می‌شود، در حالی که بیشتر واکنش‌های شیمیایی در دماهای بالاتر، بهتر انجام می‌شوند. بنابراین، چنانچه آنزیم به گونه‌ای اصلاح شود که بتواند در دماهای بالاتر (هرچند اندک) فعال بماند، تأثیر مثبت بیشتری بر تولید فراورده‌های مورد نظر خواهد داشت. بهتر بودن شرایط دمایی فعالیت آنزیم در حضور زیست کاتالیست لیپاز/کلسیم آلزینات

شرایط بهینه برای تولید بیشترین مقدار دیزل زیستی (۸۶/۹۶٪)، دمای °C ۴۸/۲، مقدار کاتالیست ۰/۳۲ گرم و نسبت متانول به روغن ۰/۵۰ بود. برپایه همین نتیجه‌ها نمودارهای دو بعدی و سه بعدی تغییرهای دیزل زیستی تولیدی با این سه عامل استخراج شد. شکل ۳ نمودار پیش‌بینی رفتار عامل‌های دما، مقدار کاتالیست و نسبت متانول و روغن را به صورت تک به تک در نمودارهای دو بعدی نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است برای هر سه عامل منحنی‌ها دارای یک مقدار بیشینه هستند که بیانگر، بهترین مقدار عامل مربوط برای تولید بیشینه مقدار دیزل زیستی است. در روند تغییرهای فراورده با دما، پیش‌بینی شده است که ابتدا یک افزایش و سپس کاهش وجود خواهد داشت. افزایش مقدار فراورده با افزایش دما می‌تواند به دلیل بهبود سرعت واکنش در دماهای بالاتر باشد. کاهش مقدار آن با افزایش دما را می‌توان به غیر فعال شدن آنزیم در دماهای بالاتر نسبت داد.

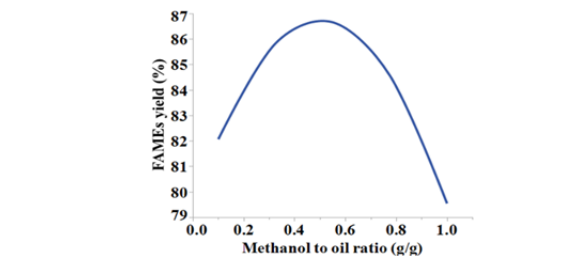
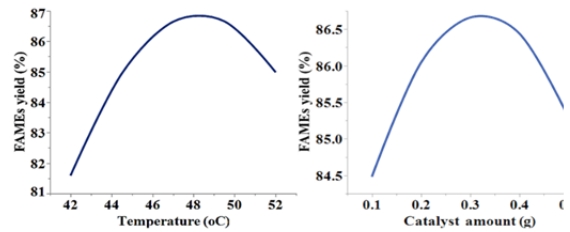
آنزیم لیپاز برای تبدیل انواع روغن‌ها به دیزل زیستی استفاده شده است. شرایط بهینه برای فعالیت آنزیم تثبیت شده بستگی به فعالیت آن در حالت آزاد، ویژگی‌های محتوای مخلوط واکنش (از نظر اسیدینگی، حضور گونه‌های مختل‌کننده فعالیت آنزیم و...) و پایه‌ای که آنزیم بر روی آن نشانده شده است، دارد [۱۷]. در مطالعه‌ای به منظور تولید دیزل زیستی از روغن زیتون، لیپاز بر پایه‌ای از نانوذره‌های مغناطیسی سیلیکا نشانده شد. در چنین شرایطی ۸۴/۶٪ دیزل زیستی در شرایط دمای °C ۴۰، به مدت زمان ۱۲ ساعت و نسبت حجمی روغن به متانول ۳ به ۱ انجام گرفت [۱۸]. در مطالعه دیگری برای تولید دیزل زیستی از روغن ریزجلبک، لیپاز بر پایه‌ای از گرافن اکسید کم‌لایه ابرپارامغناطیس نشانده شد. نتیجه‌ها نشان داد که پایه تأثیر بسیار مهمی بر پایداری آنزیم در شرایط مخلوط واکنش

۴۸٫۲ °C، مقدار کاتالیست ۰٫۳۲ گرم و نسبت متانول به روغن ۰٫۵۰ است.



شکل ۴ نمودارهای سه بعدی تغییرهای بازده واکنش با شرایط مورد مطالعه

می‌تواند به دلیل ساختار بسیار کلسیم‌آلژینات باشد که به صورت زنجیره‌های درهم‌تنیده آنزیم لیپاز را در خود به‌سان یک عایق گرمایی حبس می‌کند. افزون‌بر آن، از آنجایی که این بسیار قابلیت جذب مایعات بالایی دارد، واکنشگرهای واکنش (تری‌گلیسریدها و اسیدهای چرب آزاد) به خوبی به آنزیم دسترسی پیدا می‌کنند و در نتیجه تبدیل آن‌ها به دیزل زیستی مختل نمی‌شود [۲۱].



شکل ۳ تغییرهای بازده دیزل زیستی نسبت به دما، مقدار کاتالیست و نسبت متانول به روغن

مقدار کاتالیست نیز ابتدا یک روند افزایشی و سپس روند کاهشی به خود گرفته است. کاهش مقدار دیزل زیستی در مقادیر بالاتر کاتالیست می‌تواند به دلیل تجمع کلسیم آلژینات و در نتیجه درهم‌رفتن و کلوخگی آنزیم باشد. نسبت متانول به روغن نیز در مقادیر بالا موجب کاهش بازده واکنش شده است که دلیل آن غیرفعال شدن آنزیم در مقادیر متانول بالاست [۲۲]. شکل ۴ نمودارهای سه‌بعدی تغییرهای بازده واکنش با شرایط را نشان می‌دهد. در این نمودارها که مستخرج از مدل ارائه شده واکنش است، تاثیر هم‌زمان دما-نسبت متانول به روغن، دما-مقدار کاتالیست و مقدار کاتالیست-نسبت متانول به روغن بر روند تولید دیزل زیستی نشان داده شده است. در همه موارد روند تغییرها بیانگر وجود یک نقطه بهینه در بازدهای در نظر گرفته شده است. شرایط بهینه واکنش به صورت دمای

که برای هر سه مورد دما، مقدار کاتالیست و نسبت متانول به روغن، در مقادیر پایین افزایش و در مقادیر بالا کاهش بازده تولید دیزل زیستی اتفاق می‌افتد. دلیل این رفتار به حساسیت‌های ذاتی آنزیم، مانند غیرفعال شدن در دماها و مقادیر متانول بالاتر نسبت داده شد. شرایط بهینه برای تولید بیشترین مقدار دیزل زیستی (۸۶/۹۶٪)، دمای °C ۴۸٫۲، مقدار کاتالیست ۰/۳۲ گرم و نسبت متانول به روغن ۰/۵۰ بود.

نتیجه‌گیری

زیست‌کاتالیست لیپاز/کلسیم آلزینات برای استفاده در فرایند تولید دیزل زیستی از روغن کرچک سنتز و مشخصه‌یابی شد. برای درک بهتر تاثیر شرایط دما، مقدار کاتالیست و نسبت متانول به روغن کرچک در بازده فراورده، طراحی آزمایش انجام شد، معادله ریاضی و نمودارهای پیش‌بینی تغییرهای بازده فراورده با عامل‌های موردنظر استخراج شد. نتیجه‌ها نشان داد

مراجع

- [1] Maleki F, Torkaman R, Torab-Mostaedi M, Asadollahzadeh M. Optimization of grafted fibrous polymer preparation procedure as a new solid basic catalyst for biodiesel fuel production from palm oil. *Fuel*. 2022; 1;329:125015. doi: **10.1016/j.fuel.2022.125015**
- [2] Nayab R, Imran M, Ramzan M, Tariq M, Taj MB, Akhtar MN, Iqbal HM. Sustainable biodiesel production via catalytic and non-catalytic transesterification of feedstock materials—A review. *Fuel*. 2022;328:125254. doi: **10.1016/j.fuel.2022.125254**
- [3] Arachchige US, Miyuranga KV, Thilakarathne D, Jayasinghe RA, Weerasekara NA. Biodiesel-alkaline transesterification process for methyl ester production. *Nature Environment and Pollution Technology*. 2021;20(5):1973-80. doi: **10.46488/NEPT.2021.v20i05.013**
- [4] Razuki A, Kaus NH, Sagadevann S, Salaeh S, Ibrahim ML, Abdullah MM. Revolutionizing biodiesel production: A breakthrough synthesis and characterization of bismuth ferrite nanocatalysts for transesterification of palm and waste cooking oil. *Fuel*. 2023;346:128413. doi: **10.1016/j.fuel.2023.128413**
- [5] Ramos JL, Valdivia M, García-Lorente F, Segura A. Benefits and perspectives on the use of biofuels. *Microbial Biotechnology*. 2016;9(4):436-40. doi: **10.1111/1751-7915.12356**
- [6] Haghighi M, Fereidooni M. Synthesis and modification of ZSM-22 zeolite surface by Fe, Zr and Sr metals and studying their catalytic properties in biodiesel production reaction. *Journal of Applied Research in Chemistry* [Persian]. 2022;15(4):133-48. doi: **10.30495/jarc.2022.689175**
- [7] Motamed Sabzevar A, Emamverdi S, Niknam Shahrak M, Ghahremaninezhad M. Investigation and optimization of biodiesel production in the presence of zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) nano-structure by response surface method. *Journal of Applied Research in Chemistry* [Persian]. 2020;13(4):85-99.
- [8] Abdulmalek SA, Yan Y. Recent developments of lipase immobilization technology and application of immobilized lipase mixtures for biodiesel production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2022;16(4):1062-94. doi: **10.1002/bbb.2349**
- [9] Tan Z, Bilal M, Li X, Ju F, Teng Y, Iqbal HM. Nanomaterial-immobilized lipases for sustainable recovery of biodiesel—A review. *Fuel*. 2022;316:123429. doi: **10.1016/j.fuel.2022.123429**
- [10] Kareem SO, Falokun EI, Balogun SA, Akinloye OA, Omeike SO. Improved biodiesel from palm oil using lipase immobilized calcium alginate and *Irvingia gabonensis* matrices. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2020;9:1-8. doi: **10.1186/s43088-020-00084-6**
- [11] Venkatesagowda B, Ponugupaty E, Barbosa-Dekker AM, Dekker RF. The purification and characterization of lipases from *Lasiodiplodia theobromae*, and their immobilization and use for biodiesel production from coconut oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2018;185:619-40. doi: **10.1007/s12010-017-2670-6**

- [12] Bharathiraja B, Jayamuthunagai J, Praveenkumar R, Jayakumar M, Palani S. The kinetics of interesterification on waste cooking oil (sunflower oil) for the production of fatty acid alkyl esters using a whole cell biocatalyst (*Rhizopus oryzae*) and pure lipase enzyme. *International Journal of Green Energy*. 2015;12(10):1012-7. doi: **10.1080/15435075.2014.882339**
- [13] Sepian NR, Yasin NH, Zainol N. The feasibility of immobilized *Chlorella vulgaris* cultivated in palm oil mill effluent for lipid and fatty acid methyl ester production. *Materials Today: Proceedings*. 2022;57:1071-7. doi: **10.1016/j.matpr.2021.09.373**
- [14] Rushan NH, Yasin NH, Said FM, Ramesh N. Immobilised *Chlorella vulgaris* as an alternative for the enhancement of microalgae oil and biodiesel production. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*. 2020;15(2):379-89. doi: **10.9767/bcrec.15.2.6905.379-389**
- [15] Furusawa T. Biodiesel fuel production using CaO-loaded alginate capsules. *Journal of the Japan Petroleum Institute*. 2017;60(4):170-85. doi: **10.1627/jpi.60.170**
- [16] Mirzaie Z, Reisi-Vanani A, Barati M. Polyvinyl alcohol-sodium alginate blend, composited with 3D-graphene oxide as a controlled release system for curcumin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;50:380-7. doi: **10.1016/j.jddst.2019.02.005**
- [17] Sampaio CS, Angelotti JA, Fernandez-Lafuente R, Hirata DB. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;215:434-49. doi: **10.1016/j.ijbiomac.2022.06.139**
- [18] Esmi F, Nematian T, Salehi Z, Khodadadi AA, Dalai AK. Amine and aldehyde functionalized mesoporous silica on magnetic nanoparticles for enhanced lipase immobilization, biodiesel production, and facile separation. *Fuel*. 2021;291:120126. doi: **10.1016/j.fuel.2021.120126**
- [19] Nematian T, Shakeri A, Salehi Z, Saboury AA. Lipase immobilized on functionalized superparamagnetic few-layer graphene oxide as an efficient nanobiocatalyst for biodiesel production from *Chlorella vulgaris* bio-oil. *Biotechnology for Biofuels*. 2020;13:1-5. doi: **10.1186/s13068-020-01688-x**
- [20] Nematian T, Shakeri A, Salehi Z, Saboury AA, Dalai AK. The effect of 3D structure preparation method on lipase/3DMGO biocatalytic parameters and catalytic performance in transesterification of microalgae bio-oil. *Catalysis Today*. 2022;404:105-16. doi: **10.1016/j.cattod.2022.05.012**
- [21] Saei AA, Beusch CM, Sabatier P, Wells JA, Gharibi H, Meng Z, Chernobrovkin A, Rodin S, Näreoja K, Thorsell AG, Karlberg T. System-wide identification and prioritization of enzyme substrates by thermal analysis. *Nature Communications*. 2021;12(1):1296. doi: **10.1038/s41467-021-21540-6**
- [22] Najjar A, Hassan EA, Zaber mawi N, Saber SH, Bajrai LH, Almuhayawi MS, Abujamel TS, Almasaudi SB, Azhar LE, Moulay M, Harakeh S. Optimizing the catalytic activities of methanol and thermotolerant *Kocuria flava* lipases for biodiesel production from cooking oil wastes. *Scientific Reports*. 2021;11(1):13659. doi: **10.1038/s41598-021-93023-z**

Biodiesel production from castor oil in the presence of lipase/calcium alginate biocatalyst: Optimizing and evaluation of temperature, catalyst amount, and methanol to oil ratio effects

A. Davoodimehr¹, A. Shakeri², M. Barati^{3,4,*}

1. M.Sc. Student of Applied Chemistry Department, School of Chemistry, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.
2. Professor of Applied Chemistry Department, School of Chemistry, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. Assistant Prof. of Applied Chemistry Department, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran.
4. Institute of Nano Science and Nano Technology, University of Kashan, Kashan, Iran.

Abstract: In this study, biodiesel was produced from castor oil in the presence of lipase/calcium alginate biocatalyst. *Porcine pancreatic* lipase was immobilized on calcium alginate and used in the esterification of castor oil to fatty acid methyl esters (FAMES). The synthesized calcium alginate was characterized using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, field emission scanning electron microscopy (FESEM), and Brunauer-Emmett-Teller (BET) analysis. Also, after lipase immobilization, the protein content of the synthesized biocatalyst, as well as the hydrolysis activity and the esterification activity were evaluated. In order to optimize the reaction of biodiesel production, the design of the experiment was carried out using SAS JMP Pro software. For this purpose, three factors of reaction temperature, amount of catalyst and ratio of methanol to oil were considered and data analysis was done using response surface methodology (RSM). The results showed that the highest biodiesel yield (86.96%) was obtained at a temperature of 48.2 °C, the ratio of methanol to oil of 0.50, and in the presence of 0.32 g catalyst. It was also found that high amounts of each of these factors have negative effect on the efficiency of biodiesel production, which is due to the inherent characteristics of the enzyme, including inactivation at higher temperatures and high methanol amounts, as well as coagulation and conformational changes in the high catalyst concentrations.

Keywords: Biodiesel, Biocatalyst, Lipase, Process optimization, Castor oil.