تثبیت آنزیم لیپاز بر روی سدیم مونتموریلونیت و مونتموریلونیت اصلاح شده: بررسی فعالیت بیوکاتالیستی لیپازهای تثبیت شده در تولید بیودیزل از پسماند روغن خوراکی

الناز کاظمی، حمیدرضا آقائی*

اصفهان، شهرضا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه شیمی

تاریخ دریافت: ۰۰/۰۳/۰۲ تاریخ تصحیح:۰۰/۰۵/۲۶ تاریخ پذیرش:۰۰/۰۶/۱۱

چکیده

در این مقاله، تثبیت آنزیم لیپاز کاندیدا روگوزا بر روی بستر سدیم مونتموریلونیت (MT) آب دوست و مونتموریلونیت اصلاح شده‌ی (MTS) آب گریز بررسی شده است. MTS آب گریز، با تغییر ماهیت MT آب دوست با سورفکتانت ستریمونیوم برمید تهیه شد. فعالیت آنزیمی لیپاز تثبیت شده بر روی سدیم مونتموریلونیت (LMT) و لیپاز تثبیت شده بر روی مونتموریلونیت اصلاح شده (LMTS)، در تولید بیودیزل از پسماند روغن خوراکی آزمایش شد. فرایند اصلاح بستر و تثبیت آنزیم توسط تکنیک‌های BET، XRD و SEM بررسی شد. اثرات دما، زمان، مقدار آب و نسبت مولی متانول به روغن بر روی راندمان بیودیزل نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که LMTS، عملکرد بسیار بهتری نسبت به LMT دارد. در شرایط بهینه، راندمان بیودیزل تولیدی به وسیله‌ی LMTS حدود ۸۶/۴٪ بود. LMTS پایداری انبارداری خوبی را از خود نشان داد و راندمان بیودیزل تولیدی پس از ۳۰ روز انبارداری در ۴ °C، حدود ۶۴/۲٪ بود، در حالی‌که راندمان بیودیزل تولیدی توسط لیپاز آزاد (FL)، حدود ۵۷/۱٪ بود. علاوه بر این، LMTS در مقایسه با LMT، قابلیت استفاده‌ی مجدد خوبی داشت و پس از ده بار استفاده از آن، راندمان بیودیزل تولید شده حدود ۵۱/۶٪ بود.

کلمات کلیدی: تثبیت آنزیم، مونتموریلونیت اصلاح شده، لیپاز، بیودیزل.

۱-مقدمه

لیپازها (EC 3.1.1.3) به دلیل قدرت زیادی که در کاتالیز واکنش‌ها در محیط‌های غیر آبی و آبی دارند، در بسیاری از واکنش‌های آلی مورد استفاده قرار می‌گیرند. لیپازها برای کاتالیز واکنش‌های متعددی مانند هیدرولیز، استری شدن و تبادل استری استفاده شده‌اند [۱]. لیپازها کاربردهای قابل توجهی در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی دارند. به عنوان مثال، از لیپازها در پخت نان، فرآوری میوه، طعم دادن به پنیر، بهبود عطر و طعم برنج و اصلاح شیر سویا استفاده می‌شود [۲]. متاسفانه، کارایی و پایداری لیپاز و بقیه‌ی آنزیم‌ها می‌تواند تحت تأثیر پارامترهای محیطی قرار بگیرد و پایداری کم آنزیم‌ها در این شرایط، ممکن است بر کاربردهای گسترده‌ی آن‌ها در صنعت تأثیر بگذارد [۳]. بنابراین، برای غلبه بر این مشکلات، باید به دنبال راهی برای بازیافت آنزیم ها و استفاده‌ی مجدد از آن‌ها بود. به بیان دیگر، تبدیل آنزیم ها از یک بیوکاتالیست همگن به یک بیوکاتالیست ناهمگن که به آن تثبیت آنزیم گفته می‌شود، روشی ارزشمند برای افزایش پایداری آنزیم، و امکان استفاده مجدد از آن است.

* **.نویسنده‌ی مسئول:** استادیار گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا haghaei@iaush.ac.ir

تثبیت آنزیم فرآیندی است که طی آن آنزیم به سطح یک ماده‌ی جامد متصل می‌شود. همان‌طور که گفته شد، این روش، ابزاری ارزشمند برای بدست آوردن یک بیوکاتالیست قابل بازیافت و در نتیجه کاهش هزینه‌های استفاده از این ترکیبات نسبتاً گران است [۴]. با این حال، علاوه بر استفاده‌ی مجدد، می‌توان از یک روش تثبیت مناسب برای افزایش عملکرد آنزیم با افزایش پایداری، خلوص و فعالیت استفاده کرد [۵]. تکنیک‌های تثبیت آنزیم را می‌توان به سادگی به دو دسته‌ی روش‌های فیزیکی و شیمیایی تقسیم کرد. تکنیک‌های فیزیکی شامل جذب و به دام انداختن و تکنیک های شیمیایی شامل پیوند کووالانسی با بستر و پیوند عرضی است [۶]. روش‌های فیزیکی ساده هستند و نیازی به عامل‌دار کردن بستر ندارند. علاوه بر این، صورتبندی آنزیمی حفظ شده و فعالیت بیوکاتالیستی نسبتاً زیاد است [۷]. علاوه بر روش تثبیت آنزیم، نوع بستر نیز تأثیر بسزایی بر روی فرایند تثبیت آنزیم دارد [۸]. بستر مناسب برای تثبیت آنزیم باید ارزان و غیر سمی باشد و بر روی فعالیت آنزیم تأثیر منفی نگذارد. همچنین، بسترها باید پایداری شیمیایی و فیزیکی عالی داشته باشند [۹].

به دلیل فعال شدن بین سطحی آنزیم لیپاز بر روی بسترهای آب گریز، معمولاً این گونه بسترها برای تثبیت آنزیم لیپاز استفاده می‌شوند [۱۰]. لیپازها به دو شکل ساختاری وجود دارند: یک ساختار بسته که در آن مکان فعال آنزیم لیپاز توسط یک زنجیره ی پلی پپتیدی به نام درپوش از محیط جدا شده است و یک ساختار باز که در آن مکان فعال آنزیم از طریق جابجا شدن درپوش نمایان می‌شود [۱۱]. در حضور ترکیبات آب گریز مانند بسترهای آب گریز، تعادل بین دو شکل ساختاری لیپاز به سمت ساختار باز تغییر می‌کند. این اتفاق که به عنوان فعال سازی بین سطحی شناخته می‌شود تأثیر بسزایی بر روی خلوص و افزایش فعالیت لیپاز می‌گذارد و تضمین می‌کند که لیپاز همیشه به صورت باز روی بستر تثبیت شود [۱۲].

بستر مورد استفاده در این مطالعه برای تثبیت آنزیم لیپاز، مونتموریلونیت اصلاح شده است. مونتموریلونیت یک خاک رس غیر سمی فراوان و ارزان است که از پایداری حرارتی عالی و مساحت سطح خوبی برخوردار است [۱۳, ۱۴]. مونتموریلونیت خاک رس لایه ای است که دارای بار سطحی منفی می‌باشد و علاوه بر مولکول های آب، کاتیون‌هایی مانند سدیم، پتاسیم و کلسیم برای توازن بار در بین لایه‌ها و روی سطح آن وجود دارند [۱۵]. سطوح داخلی و بیرونی مونتموریلونیت مملو از گروه‌های OH است که توانایی آن را برای جذب ترکیبات مختلف تقویت می‌کند. نکته‌ی بسیار مهم آن است که کاتیون‌های سطحی و بین لایه‌ای مونتموریلونیت را می‌توان با کاتیون‌های دیگری مانند سورفکتانت‌های کاتیونی جایگزین کرد [۱۶]. جذب یک سورفکتانت کاتیونی مانند ستریمونیوم برمید در سطح خارجی و لایه های داخلی مونتموریلونیت، می‌تواند ویژگی‌های آب دوستی آن‌را تغییر دهد [۱۷]. چنانچه مونتموریلونیت با محلولی از سورفکتانت ستریمونیوم برمید در زیر غلظت بحرانی مایسل سورفکتانت تبادل کاتیونی انجام دهد، مبادله‌ی کاتیون‌های سطحی و داخلی مونتموریلونیت با ستریمونیوم کاتیون، باعث ایجاد مونتموریلونیت اصلاح شده (MMT) می‌شود و آن‌را به یک بستر آب گریز که برای تثبیت لیپاز مناسب است بدل می‌کند [۱۸].

همان‌طور که گفته شد، لیپازها برای کاتالیز واکنش‌های متعددی استفاده می‌شوند که یکی از این واکنش‌ها، واکنش تبادل استری بین الکل‌ها و تری گلیسیریدها برای تولید آلکیل استر اسیدهای چرب و گلیسرول است. هنگامی که از الکل‌های کوچک مانند متانول یا اتانول استفاده می‌شود، به محصول تولید شده بیودیزل می‌گویند [۱۹]. بیودیزل در مقایسه با سوخت‌های فسیلی مقدار اکسیژن زیادتری دارد، به دلیل نداشتن گوگرد آلودگی بسیار کمتری ایجاد می‌کند، غیر سمی است، گازهای گلخانه‌ای کمتری مانند کربن مونوکسید تولید می‌کند و یک منبع تجدیدپذیر انرژی به شمار می‌رود [۲۰, ۲۱]. بیودیزل معمولاً از روغن‌های خوراکی مانند روغن آفتابگردان و روغن سویا بدست می‌آید که استفاده از این روغن‌ها می‌تواند هزینه‌ی تولید بیودیزل را افزایش دهد [۲۲]. برای حل این مشکل، برخی از مواد بی‌ارزش مانند پسماند روغن‌های خوراکی، می‌توانند ماده اولیه‌ی مناسبی برای تولید بیودیزل باشند. سالانه میلیون‌ها تن پسماند روغن‌های خوراکی تولید می‌شود که ورود این پسماندها به سیستم‌های فاضلاب خانگی یا صنعتی ممکن است مشکلات جدی زیست محیطی ایجاد کند [۲۳]. بنابراین، مدیریت پسماند روغن‌های خوراکی و تبدیل آن به بیودیزل ممکن است مشکلات زیست محیطی را حل کرده و هزینه‌های مواد اولیه را کاهش دهد [۲۴].

کاتالیزگرهای مختلفی مانند کاتالیزگرهای اسیدی و بازی و همچنین بیوکاتالیست‌های آنزیمی در ساخت بیودیزل به کار می‌روند [۲۵]. استفاده از کاتالیزگرهای اسیدی و بازی مشکلات متعددی را ایجاد می‌کند. برای استفاده از کاتالیزگرهای اسیدی به دمای بالا و زمان واکنش طولانی و برای استفاده از کاتالیزگرهای بازی به روغن‌های با درجه خلوص بالا با حداقل مقدار آب و اسیدهای چرب آزاد نیاز است [۲۶]. در مقایسه، تولید بیودیزل با لیپاز از طریق یک فرآیند سازگار با محیط زیست، مزایای زیادی دارد از جمله تولید بیودیزل در دمای پایین‌تر در حضور آب و اسیدهای چرب آزاد و تولید محصولی با خلوص بالاتر [۲۷].

در این مقاله، تثبیت آنزیم لیپاز کاندیدا روگوزا بر روی بستر سدیم مونتموریلونیت (MT) و مونتموریلونیت اصلاح شده با سورفکتانت ستریمونیوم برمید (MTS) بررسی شد. فعالیت بیوکاتالیستی لیپاز تثبیت شده بر روی سدیم مونتموریلونیت (LMT) و لیپاز تثبیت شده بر روی مونتموریلونیت اصلاح شده (LMTS) در تولید بیودیزل از پسماند روغن خوراکی آزمایش شد. اثرات دما، زمان، مقدار آب و نسبت مولی متانول به روغن بر روی راندمان بیودیزل بررسی و با لیپاز آزاد مقایسه شد. پارامترهای مختلفی مانند پایداری در طول انبارداری و قابلیت استفاده مجدد از بیوکاتیست‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۲-بخش تجربی

۲-۱-مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده

لیپاز کاندیدا روگوزا و مونتموریلونیت از سیگما (آمریکا) خریداری شدند. ستریمونیوم برومید، سدیم کلرید، متانول، اتانول و هگزان از مرک (آلمان) خریداری شدند. پس‌ماند روغن خوراکی نیز از چند مغازه‌ی فست‌فودی در شهر اصفهان جمع‌آوری شد. ترکیب درصد اسیدهای چرب موجود در پسماند روغن خوراکی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- درصد وزنی اسیدهای چرب موجود در پسماند روغن خوراکی

نام اسید چرب	تعداد کربن	تعداد پیوند دوگانه	درصد وزنی
میریستیک اسید	۱۴	۰	۱/۲
پالمیتیک اسید	۱۶	۰	۲۱/۶
پالمیتولئیک اسید	۱۶	۱	۸/۷
استئاریک اسید	۱۸	۰	۴/۰
اولئیک اسید	۱۸	۱	۴۷/۵
لینولئیک اسید	۱۸	۲	۱۴/۲
لینولنیک اسید	۱۸	۳	۱/۳
سایر اسیدهای چرب	۲۰-۲۲	۰-۱	۱/۵

۲-۲-دستگاه‌های مورد استفاده

ایزوترم‌های جذب نیتروژن توسط دستگاه تجزیه‌گر مساحت سطح Quantachrome Autosorb ™ iQ ساخت کشور آمریکا مورد بررسی قرار گرفت. الگوی پراش اشعه ایکس XRD نمونه‌ها توسط دستگاه D8 ADVANCE ساخت کشور آلمان اندازه‌گیری شد. تصاویر SEM نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی مدل Seron AIS2100 ساخت کشور کره جنوبی به دست آمد. طیف GC-MS نمونه‌ها به وسیله دستگاه Agilent 5973 ساخت کشور آمریکا گرفته شد.

۲-۳-تهیه بستر سدیم مونتموریلونیت و مونتموریلونیت اصلاح شده

برای تهیه‌ی MT و جایگزین کردن کاتیون‌های موجود در ساختار مونتموریلونیت با سدیم، سوسپانسیونی از مونتموریلونیت در محلول یک مولار سدیم کلرید تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق با هم‌زن مکانیکی هم زده شد. سپس MT تهیه شده با صاف کردن تحت خلا صاف و با اتانول شستشو داده شد تا عاری از وجود یون‌های کلرید شود. عدم وجود یون کلرید با $AgNO_3$ تأیید شد. در نهایت، سدیم مونتموریلونیت به دست آمده در دمای اتاق خشک گردید.

برای تهیه‌ی MTS، یک گرم از MT در ۱۰۰ mL از محلول ستریمونیوم برمید که غلظتی پایین‌تر از غلظت بحرانی مایسل داشت (۵×۱۰^{-۴} مولار) ریخته شد و این مخلوط، ۴۸ ساعت در دمای اتاق بهم زده شد تا MTS آب گریز با سورفکتانت تک لایه تهیه شود. سپس، MTS صاف و با آب مقطر شستشو داده شد و در دمای اتاق خشک گردید. شایان ذکر است که غلظت بحرانی مایسل ستریمونیوم برمید ۱×۱۰^{-۳} مولار است و چنانچه محلول ستریمونیوم برمید، غلظتی بالاتر از غلظت بحرانی مایسل داشته باشد مونتموریلونیت با سورفکتانت دو لایه تهیه شود که خصلت آب دوست دارد.

۲-۴-تثبیت آنزیم لیپاز

برای تثبیت لیپاز روی MT و MTS، ۱ گرم از هر بستر در ۱۰ mL محلول لیپاز تهیه شده در بافر فسفات با pH 7 (مقدار بهینه‌ی ۱۰ $mg\ mL^{-1}$ برای MT و ۸ $mg\ mL^{-1}$ برای MTS) ریخته شد. این مخلوط به منظور تثبیت لیپاز به مدت ۸ ساعت به آرامی در

دمای ۲۵ °C هم زده شد. پس از انجام تثبیت، بیوکاتالیست‌های تهیه شده یعنی LMT و LMTS سانتریفیوژ، با آب مقطر شسته و در دمای اتاق تحت خلأ خشک شدند.

۲-۵-تولید بیودیزل

برای تهیه‌ی بیودیزل، ۰/۱ گرم از LMT یا LMTS به یک بالن ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵ mL هگزان به عنوان حلال اضافه شد. سپس مخلوطی از متانول و پسماند روغن خوراکی و آب در نسبت‌های بهینه به بالن افزوده شد و مخلوط واکنش در زمان و دمای بهینه هم زده شد. پس از انجام واکنش، بیوکاتالیست از طریق سانتریفیوژ جدا شد و مخلوط واکنش برای جداسازی فاز، به داخل یک قیف جدا کننده حاوی ۱۰ mL هگزان منتقل شد [۲۸]. پس از جداسازی فاز، لایه‌ی بالایی تقطیر و بیودیزل بدست آمده توسط دستگاه GC-MS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. متیل استر اسیدهای چرب با مقایسه‌ی طیف جرمی آن‌ها با کتابخانه‌ی دستگاه شناسایی شدند [۲۹, ۳۰] و مقدار آن‌ها بر اساس روش موجود در استاندارد EN 14103 با استفاده از متیل هپتادکانوات به عنوان استاندارد داخلی اندازه‌گیری شد [۳۱]. فعالیت FL در تولید بیودیزل نیز با توجه به شرایط فوق برای مقایسه با LMT و LMTS اندازه‌گیری شد.

۲-۶-اندازه گیری پایداری و قابلیت استفاده مجدد

LMT و LMTS همراه با FL به مدت یک ماه در دمای ۴ °C انبارداری شدند و فعالیت آن‌ها به طور متناوب بررسی شد. برای اندازه‌گیری قابلیت استفاده‌ی مجدد، LMT و LMTS ده بار برای کاتالیز کردن واکنش تولید بیودیزل مورد استفاده قرار گرفتند. پس از هر بار استفاده، بیوکاتالیست‌های تثبیت شده از مخلوط واکنش جدا و با بافر فسفات شستشو داده شدند. سپس، واکنش برای چرخه‌ی بعدی تکرار و فعالیت باقیمانده طبق بخش ۲-۵ اندازه‌گیری شد.

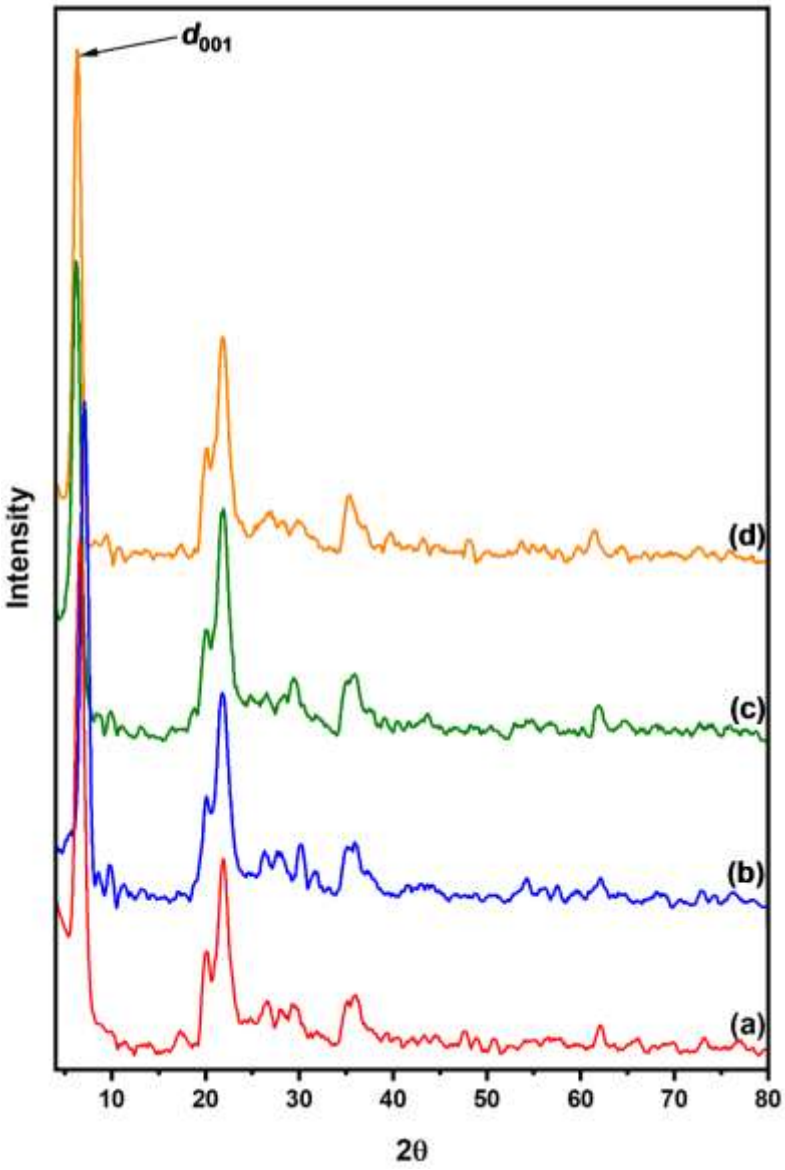
۳-بحث و نتیجه‌گیری

۳-۱-بررسی ساختار بستر و بیوکاتالیست‌های تثبیت شده

ساختار MT، MTS، LMT، و LMTS از طریق طیف‌های XRD، اندازه‌گیری BET و تصاویر SEM بررسی و تأیید شد.

XRD روشی مفید برای توصیف ساختار مواد و اندازه‌گیری فاصله‌ی بین لایه‌های آن‌ها است [۳۲-۳۵]. طیف‌های XRD برای MT، MTS، LMT، و LMTS (شکل ۱) نشان می‌دهد که MT (شکل a) بازتابشی را در $2\theta = 6/6^\circ$ با $d_{001} = 1/34$ nm نشان می‌دهد که این مقادیر، پس از اصلاح با سورفکتانت و تبدیل به MTS (شکل c) به $2\theta = 6/2^\circ$ با $d_{001} = 1/42$ nm تغییر می‌کنند. نتایج XRD نشان می‌دهد که مولکول‌های سورفکتانت توانسته‌اند به فضای بین لایه‌ای راه پیدا کرده و در نتیجه مقدار فضای بین لایه‌ای را زیاد کنند [۱۸]. پس از تثبیت آنزیم و تشکیل LMT (شکل b) و LMTS (شکل d)، مقدار فضای بین لایه‌ای نه تنها افزایش نمی‌یابد، بلکه اندکی هم کاهش پیدا می‌کند. مقدار d_{001} برای LMT حدود ۱/۲۴ nm و برای LMTS حدود ۱/۳۸ nm به

ترتیب در ۲θ = ۷/۱° و در ۲θ = ۶/۴° است. این موضوع به خوبی ثابت می‌کند که آنزیم لیپاز نتوانسته است وارد فضای بین لایه‌ای شود و تنها بر سطح خارجی بسترها تثبیت شده است [۱۲]. کاهش اندازه‌ی فضای بین لایه‌ای ممکن است به دلیل فشار ناشی از تثبیت لیپاز بر روی لایه‌ها و یا خروج آب یا مولکول‌های سورفکتانت از فضای بین لایه ای باشد [۹].



شکل ۱- تصاویر XRD مربوط به (a) MT، (b) LMT، (c) MTS و (d) LMTS.

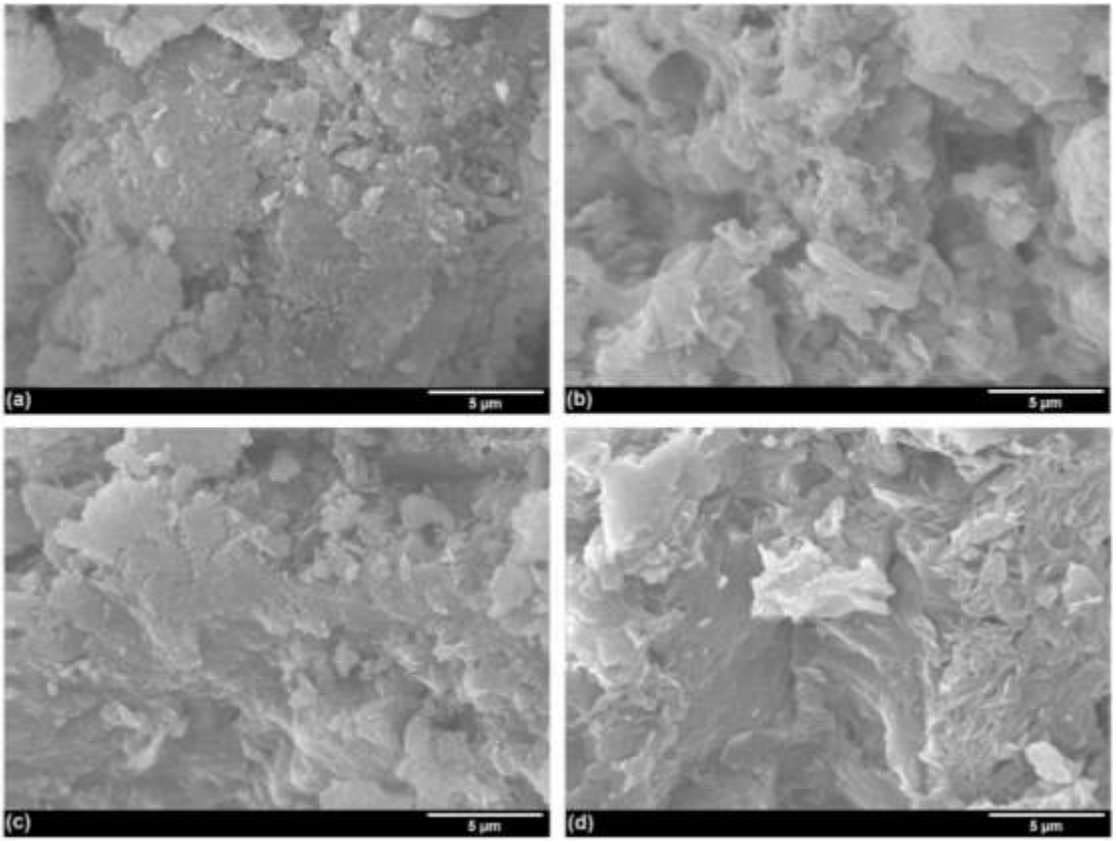
از روش BET برای محاسبه‌ی مساحت سطح مؤثر، حجم و اندازه‌ی حفره‌های مواد توسط جذب مولکول‌های N_2 استفاده می‌شود، زیرا این پارامترها بر فعالیت آنزیم تثبیت شده تأثیر زیادی دارند [۳۵-۳۸]. مساحت سطح مؤثر، حجم و اندازه‌ی حفره‌های MT، MTS، LMT، و LMTS در جدول ۲ نشان داده شده است. مساحت سطح مؤثر MT حدود ۵۳ $m^2 g^{-1}$ می‌باشد که این عدد، پس از اصلاح با سورفکتانت ستریمونیوم برمید و تبدیل به MTS به ۴۴ $m^2 g^{-1}$ کاهش می‌یابد. علاوه بر این، حجم حفره‌های MT که ۰/۱۱۳ $cm^3 g^{-1}$ است نیز پس از اصلاح با سورفکتانت و تبدیل به MTS به ۰/۱۰۰ $cm^3 g^{-1}$ کاهش پیدا می‌کند [۱۷]. اشغال

سطح و همچنین فضای بین لایه‌ای MT، کاهش مساحت سطح مؤثر و حجم حفره‌های آن را به دنبال دارد. پس از تثبیت آنزیم و تشکیل LMT و LMTS، مساحت سطح مؤثر و حجم حفره‌ها باز هم کاهش می‌یابد که این موضوع نشان‌دهنده‌ی تثبیت آنزیم می‌باشد. کاهش اندازه‌ی حفره در تبدیل MT به MTS، نشان‌دهنده‌ی ورود سورفکتانت به فضای بین لایه‌ای است که در مطابقت بسیار خوبی با داده‌های XRD است. همچنین، اندازه‌ی حفره پس از تثبیت آنزیم تغییر محسوسی نمی‌کند که این موضوع به خوبی ثابت می‌کند که آنزیم لیپاز نتوانسته است وارد فضای بین لایه‌ای شود [۳۹].

مورفولوژی سطح مواد و تغییرات آن‌ها در هنگام اصلاح سطح با روش SEM قابل ارزیابی است [۴۰-۴۳]. ساختار میکروسکوپی MT، MTS، LMT، و LMTS با استفاده از تصاویر SEM بررسی شد. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، MT ساختاری پوسته پوسته را نشان می‌دهد که لایه‌های آن تجمع کمی دارند (شکل a) [۴۴]. این ساختار پس از اصلاح با سورفکتانت و تبدیل به MTS (شکل c) تجمع بیشتری پیدا کرده است و لایه‌های آن بیشتر به هم چسبیده‌اند [۴۵]. تثبیت آنزیم و تشکیل LMT (شکل b) و LMTS (شکل d)، به وضوح مورفولوژی سطح را تغییر می‌دهد. در تصاویر SEM آنزیم‌های تثبیت شده، ساختارهای پوسته‌ای دوباره دیده می‌شوند، اما این بار تجمع‌های بزرگ‌تری را با اندازه‌ی ذرات بیشتر تشکیل می‌دهند. شواهد نشان می‌دهد که ساختارهای فشرده با یک لایه سفید کم رنگ در اطراف ذرات، متعلق به لیپاز تثبیت شده است [۴۶].

جدول ۲- مساحت سطح مؤثر، حجم و اندازه‌ی حفرات برای MT، MTS، LMT، و LMTS.

نمونه	مساحت سطح مؤثر ($m^2\ g^{-1}$)	حجم حفره ($cm^3\ g^{-1}$)	اندازه‌ی حفره (nm)
MT	۵۳	۰/۱۱۳	۸/۵
LMT	۳۴	۰/۰۷۶	۸/۹
MTS	۴۴	۰/۱۰۰	۱۱/۲
LMTS	۱۳	۰/۰۳۸	۱۱/۶

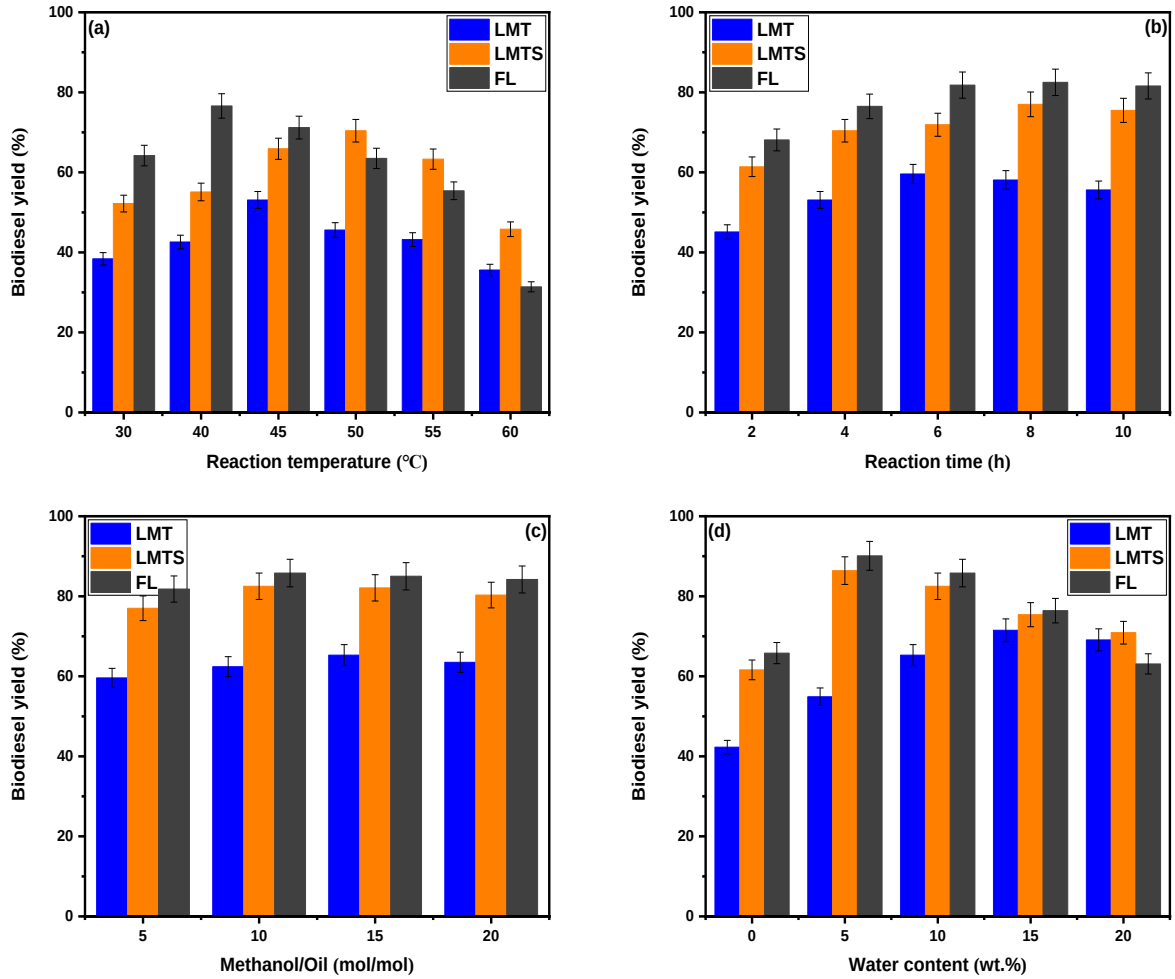


شکل ۲- تصاویر SEM مربوط به (**a**) MT، (**b**) LMT، (**c**) MTS و (**d**) LMTS.

۳-۲-بهینه سازی واکنش تولید بیودیزل

اثرات زمان واکنش، دمای واکنش، نسبت مولی متانول به پسماند روغن خوراکی و مقدار آب بر راندمان بیودیزل در شکل ۳ نشان داده شده است.

اثر دما بر راندمان بیودیزل در محدوده‌ی دمایی ۳۰-۶۰ °C برای لیپازهای آزاد و تثبیت شده اندازه‌گیری شد (شکل a). دمای بالا نه تنها فرکانس برخورد بین واکنش‌دهنده ها را بهبود می‌بخشد، بلکه باعث کاهش ویسکوزیته‌ی محیط واکنش نیز می‌شود [۴۷, ۴۸]. دمای بهینه‌ی واکنش برای LMT، LMTS و FL به ترتیب ۴۵، ۵۰ و ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. دمای بهینه‌ی واکنش برای آنزیم‌های تثبیت شده، ممکن است از دمای بهینه‌ی واکنش برای آنزیم آزاد بیشتر باشد. دلیل این موضوع افزایش مقاومت گرمایی آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد است [۴۹]. از طرف دیگر، دسترسی سوبسترا به آنزیم آزاد راحت تر است و واکنش آن، در دماهای کمتری انجام می‌شود. با افزایش دمای واکنش تا دمای بهینه، راندمان تولید بیودیزل نیز افزایش می‌یابد (برای LMT، LMTS و FL به ترتیب ۵۳/۱٪، ۷۰/۴٪ و ۷۶/۶٪)، اما راندمان بیودیزل در دماهای بالاتر، به دلیل تخریب ساختار پروتئین و غیرفعال شدن لیپاز کاهش پیدا می‌کند [۵۰]. شایان ذکر است که راندمان بیودیزل برای LMT و LMTS در دمای ۶۰ °C بیشتر از راندمان بیودیزل برای FL است. این نتایج تأیید می‌کنند که لیپازهای تثبیت شده مقاومت گرمایی بیشتری نسبت به لیپازهای آزاد دارند [۵۱].



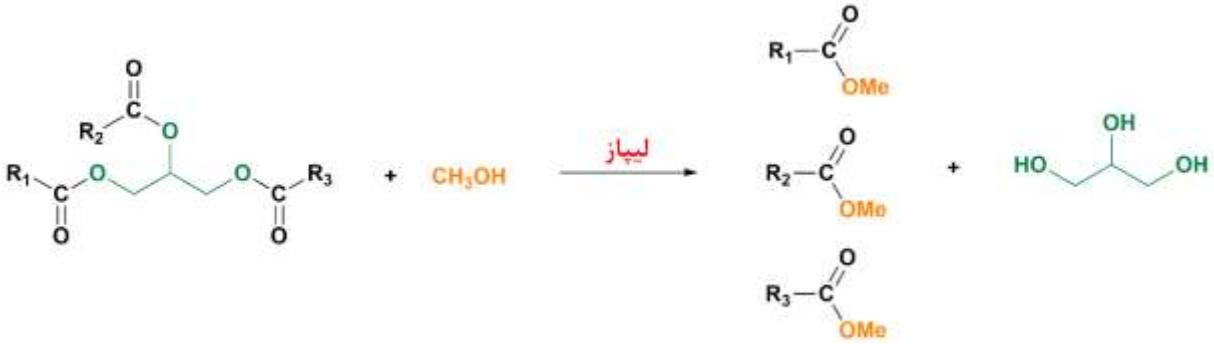
شکل ۳- بهینه سازی شرایط واکنش برای تولید بیودیزل: (a) بهینه سازی دمای واکنش، (b) بهینه سازی زمان واکنش، (c) بهینه سازی نسبت مولی متانول / پسماند روغن خوراکی و (d) بهینه سازی درصد وزنی آب.

واکنش تبادل استری تری گلیسیرید با متانول یک واکنش چند مرحله ای است که ابتدا تری گلیسیرید را به دی‌گلیسیرید و سپس به مونوگلیسیرید، گلیسرول و بیودیزل تبدیل می‌کند (طرح ۱). بنابراین، دادن زمان کافی برای اطمینان از اتمام موفقیت آمیز واکنش، لازم به نظر می‌رسد [۵۲، ۵۳]. اثر زمان واکنش بر تولید بیودیزل در محدوده‌ی ۱۰-۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل b). زمان بهینه‌ی واکنش برای LMT، LMTS و FL به ترتیب ۶، ۸ و ۶ ساعت بود. با افزایش زمان واکنش، راندمان تولید بیودیزل نیز افزایش می‌یابد و به ترتیب برای LMT، LMTS و FL به ۵۹/۶٪، ۷۷/۰٪ و ۸۱/۸٪ می‌رسد. در زمان‌های بیشتر، افزایش قابل توجهی در راندمان تولید بیودیزل مشاهده نمی‌شود. به این دلیل که ممکن است آب و گلیسرول تولید شده بر روی سطح بستر جذب شده و تولید بیودیزل را متوقف کنند [۵۴].

در واکنش تبادل استری برای تولید بیودیزل، نسبت استوکیومتری متانول به تری گلیسیرید ۳ به ۱ است (طرح ۱)، اما با توجه به برگشت پذیر بودن واکنش تبادل استری، برای پیشبرد واکنش به سمت تولید بیودیزل به مقدار بیشتری از متانول نیاز است [۴۶]. راندمان بیودیزل تولید شده برای نسبت مولی متفاوت متانول به پسماند روغن خوراکی در محدوده‌ی ۲۰-۵ مورد بررسی

قرار گرفت (شکل c). نسبت مولی بهینه‌ی متانول به پسماند روغن خوراکی برای LMT، LMTS و FL به ترتیب ۱۵، ۱۰ و ۱۰ است. با افزایش نسبت مولی متانول به پسماند روغن خوراکی تا مقدار بهینه، راندمان بیودیزل نیز افزایش می‌یابد (برای LMT، LMTS و FL به ترتیب ۶۵/۳٪، ۸۲/۵٪ و ۸۵/۸٪)، اما در نسبت‌های مولی بالاتر، راندمان تولید بیودیزل اندکی کم می‌شود. همان‌طور که گفته شد به دلیل برگشت پذیر بودن واکنش تبادل استری، برای پیشبرد واکنش به سمت تولید بیودیزل به مقدار بیشتری از متانول نیاز است. با این وجود، غلظت بالای الکل‌های کوچک مانند متانول برای آنزیم لیپاز مضر است و ممکن است ساختار فعال این آنزیم را غیرفعال کنند [۵۵]. همچنین، در غلظت‌های بالای متانول، حلالیت محصول جانبی واکنش، یعنی گلیسرول در متانول زیاد و در نتیجه، جداسازی آن دشوارتر می‌شود. ممکن است گلیسرول اضافه در محیط واکنش، جهت واکنش تبادل استری را به سمت واکنش دهنده‌ها برگرداند و راندمان تولید بیودیزل را کم کند [۵۶].

در واکنش تبادل استری و تولید بیودیزل، مقدار آب تأثیر زیادی بر فعالیت و پایداری لیپاز دارد، به ویژه هنگامی که واکنش در محیط آلی انجام می‌شود. آنزیم لیپاز در مرز مشترک بین فازهای آلی و آبی عمل می‌کند. بنابراین، افزودن مقدار مناسب آب برای حفظ فعالیت لیپاز و تقویت ناحیه‌ی مشترک بین فازهای آلی و آبی ضروری است [۵۷]. راندمان بیودیزل تولید شده برای درصدهای وزنی متفاوت آب نسبت به وزن پسماند روغن خوراکی، در محدوده‌ی ۲۰-۰ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شکل d). درصد وزنی بهینه‌ی آب برای LMT، LMTS و FL به ترتیب ۱۵، ۵ و ۵ درصد است.با افزایش درصد وزنی آب تا مقدار بهینه، راندمان بیودیزل نیز افزایش می‌یابد (برای LMT، LMTS و FL به ترتیب ۷۱/۵٪، ۸۶/۴٪ و ۹۰/۱٪)، اما با افزایش مقدار آب، راندمان تولید بیودیزل اندکی کم می‌شود. از آن‌جا که لیپاز واکنش هیدرولیز استر را نیز کاتالیز می‌کند، آب اضافی ممکن است بیودیزل تولید شده را هیدرولیز کرده و جهت واکنش را به سمت واکنش‌دهنده‌ها جابجا کند [۵۸] (طرح ۱).



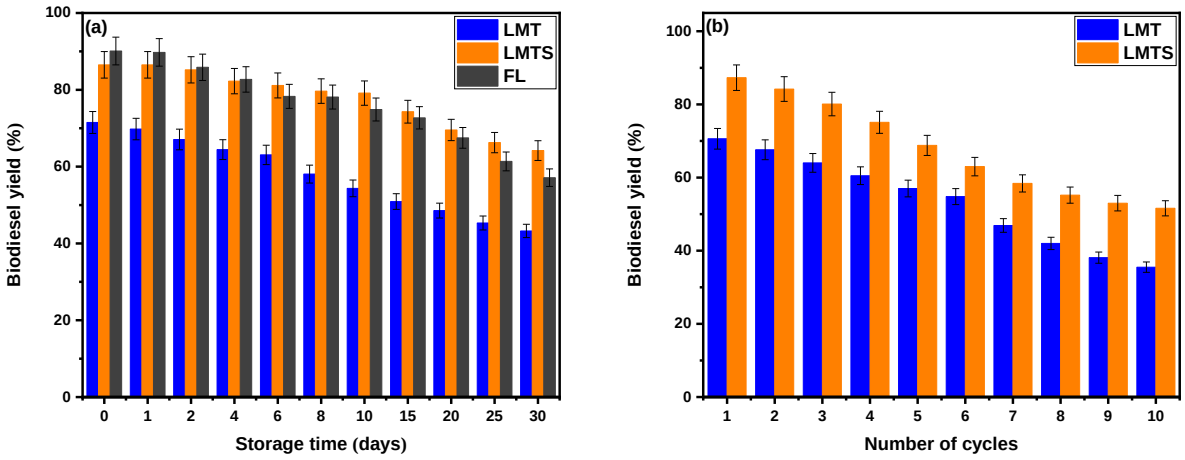
طرح ۱- واکنش تبادل استری متانول با پسماند روغن خوراکی در حضور لیپاز.

۳-۳- اندازه گیری انبارداری و قابلیت استفاده‌ی مجدد

نتایج حاصل از انبارداری آنزیم‌های تثبیت شده و آزاد و همچنین قابلیت استفاده‌ی مجدد از آنزیم‌های تثبیت شده در شکل ۴ نشان داده شده است.

انبارداری آنزیم‌های تثبیت شده، اهمیت بسیار زیادی در تولید بیوکاتالیست‌ها دارد و می‌تواند موفقیت آمیز بودن فرایند تثبیت را ارزیابی کند [۵۹]. برای اندازه گیری پایداری آنزیم‌ها در طول انبارداری، راندمان بیودیزل برای LMT، LMTS و FL به مدت ۳۰ روز اندازه‌گیری شد (شکل a). پس از ۳۰ روز، راندمان بیودیزل برای LMT، LMTS و FL به ترتیب ۴۳/۳٪، ۶۴/۲٪ و ۵۷/۱٪ بود. همان‌طور که مشخص است، کاهش در راندمان بیودیزل برای LMTS کمتر از FL بوده است. معمولاً در طول انبارداری، آنزیم‌های تثبیت شده پایداری بیشتری نسبت به آنزیم‌های آزاد دارند. برهمکنش مناسب‌تر بین لیپاز و بستر MTS، پایداری بیشتری را برای LMTS ایجاد کرده و از مولکول‌های لیپاز در برابر تغییرات ساختاری محافظت می‌نماید [۶۰].

یکی از مهم‌ترین قابلیت‌های کاتالیست‌های ناهمگن و آنزیم‌های تثبیت شده، امکان استفاده مجدد از آن‌ها است که این قابلیت برای کاتالیست‌های همگن و آنزیم‌های آزاد وجود ندارد و باعث می‌شود که فرایند از لحاظ اقتصادی قابل قبول باشد [۶۱]. به منظور بررسی قابلیت استفاده مجدد از LMT و LMTS در تولید بیودیزل، این دو بیوکاتالیست برای ۱۰ بار در واکنش تولید بیودیزل استفاده شدند (شکل b). پس از ۵ بار استفاده، راندمان بیودیزل تولید شده برای LMT و LMTS به ترتیب ۵۷/۰٪ و ۶۸/۸٪ بود. راندمان بیودیزل تولید شده برای LMT و LMTS پس از ۱۰ بار استفاده، حدود ۳۵/۵٪ و ۵۱/۶٪ بود. پس از هر چرخه، برای هر دو بیوکاتالیست کاهشی در راندمان تولید بیودیزل مشاهده می‌شود که این کاهش احتمالاً به دلیل غیرفعال شدن آنزیم به دلیل شستشوی مکرر، استفاده مجدد از آنزیم در یک چرخه جدید، غیرفعال شدن لیپاز به دلیل تماس طولانی مدت با متانول و هگزان و واجذب آنزیم از روی بستر به ویژه در مورد LMT باشد [۶۲].



شکل ۴- (a) مقایسه‌ی انباداری LMT، LMTS و FL و تأثیر آن بر راندمان بیودیزل و (b) قابلیت استفاده مجدد از LMT و LMTS.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، تثبیت آنزیم لیپاز بر روی بستر MT آب دوست و MTS آب گریز بررسی شد. MTS آب گریز، با تغییر ماهیت MT آب دوست با سورفکتانت ستریمونیوم برمید تهیه و فعالیت آنزیمی لیپازهای تثبیت شده بر روی این دو بستر یعنی LMT و LMTS در تولید بیودیزل از پسماند روغن خوراکی آزمایش شد. نتایج نشان داد که LMTS، عملکرد بسیار بهتری نسبت به

LMT دارد. دمای بهینه‌ی واکنش برایLMT، LMTS و FL به ترتیب ۴۵، ۵۰ و ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. زمان بهینه‌ی واکنش برایLMT، LMTS و FL به ترتیب ۶، ۸ و ۶ ساعت بود. نسبت مولی بهینه‌ی متانول به پسماند روغن خوراکی برایLMT ، LMTS و FL به ترتیب ۱۵، ۱۰ و ۱۰ بود. همچنین، درصد وزنی بهینه‌ی آب برایLMT، LMTS و FL به ترتیب ۱۵، ۵ و ۵ درصد بود. در شرایط بهینه، راندمان بیودیزل تولیدی به وسیله LMTS حدود ۸۶/۴٪ بود. LMTS پایداری انبارداری خوبی را از خود نشان داد و راندمان بیودیزل تولیدی پس از ۳۰ روز انبارداری در ℃ ۴ حدود ۶۴/۲٪ بود، در حالی‌که راندمان بیودیزل تولیدی توسط لیپاز آزاد (FL) حدود ۵۷/۱٪ بود. علاوه بر این، LMTS در مقایسه با LMT، قابلیت استفاده‌ی مجدد خوبی داشت و پس از ده بار استفاده از آن، راندمان بیودیزل تولید شده حدود ۵۱/۶٪ بود.

۵-مراجع

[1] G. Brahmachari, *Lipase-Catalyzed Organic Transformations: A Recent Update*, in: G. Brahmachari (Ed.) Biotechnology of Microbial Enzymes, Academic Press, 2017, 325.

[2] P. Vaishnav and A.L. Demain, *Industrial Biotechnology*, in: T.M. Schmidt (Ed.) Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition), Academic Press, Oxford, 2019, 665.

[3] C. Escamilla-Alvarado, J.A. Pérez-Pimienta, T. Ponce-Noyola and H.M. Poggi-Varaldo, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **92** (2017) 906.

[4] V. Sóti, S. Lenaerts and I. Cornet, *J. Biotechnol.* **270** (2018) 70.

[5] R.A. Sheldon and S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 6223.

[6] J. Liu, R.-T. Ma and Y.-P. Shi, *Anal. Chim. Acta* **1101** (2020) 9.

[7] T. Jesionowski, J. Zdarta and B. Krajewska, *Adsorption* **20** (2014) 801.

[8] D.-M. Liu and C. Dong, *Process Biochem.* **92** (2020) 464.

[9] S. Mortazavi and H. Aghaei, *Int. J. Biol. Macromol.* **164** (2020) 1.

[10] G. Fernandez-Lorente, J. Rocha-Martín and J.M. Guisan, *Immobilization of Lipases by Adsorption on Hydrophobic Supports: Modulation of Enzyme Properties in Biotransformations in Anhydrous Media*, in: J.M. Guisan, J.M. Bolivar, F. López-Gallego, J. Rocha-Martín (Eds.) Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols, Springer US, New York, NY, 2020, pp. 143.

[11] R.A. Wahab, N. Elias, F. Abdullah and S.K. Ghoshal, *React. Funct. Polym.* **152** (2020) 104613.

[12] H. Aghaei, M. Ghavi, G. Hashemkhani and M. Keshavarz, *Int. J. Biol. Macromol.* **162** (2020) 74.

[13] B.R. Prado and J.R. Bartoli, *Appl. Clay Sci.* **160** (2018) 132.

[14] S. Khostavan, M. Fazli, A. Omrani, M. Ghorbanzadeh Ahangari and Y. Rostamian, *Appl. Chem.* **14** (2019) 35.

[15] C. Zhou, D. Tong and W. Yu, *7 - Smectite Nanomaterials: Preparation, Properties, and Functional Applications*, in: A. Wang, W. Wang (Eds.) Nanomaterials from Clay Minerals, Elsevier, 2019, pp. 335.

[16] S. Elhami and N. Mohmedi, *Appl. Chem.* **11** (2016) 59.

[17] M.E. Sedaghat, M. Ghiaci, H. Aghaei and S. Soleimanian-Zad, *Appl. Clay Sci.* **46** (2009) 131.

[18] M. Ghiaci, H. Aghaei, S. Soleimanian and M.E. Sedaghat, *Appl. Clay Sci.* **43** (2009) 308.

[19] A. Ghaffari Nazifi and M. Behzad, *Appl. Chem.* **14** (2019) 155.

[20] N.H. Razak, H. Hashim, N.A. Yunus and J.J. Klemeš, *J. Cleaner Prod.* **316** (2021) 128090.

[21] S. Belyani, M. Behzad and F. Tamaddon, *Appl. Chem.* **8** (2013) 15.

[22] N. Azyzi and M. Lashkaryzadeh, *Appl. Chem.* **6** (2011) 53.

[23] D. Singh-Ackbarali, R. Maharaj, N. Mohamed and V. Ramjattan-Harry, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24** (2017) 12220.

[24] M. Mohadesi, B. Aghel, M. Maleki and A. Ansari, *Fuel* **263** (2020) 116659.

[25] T.M.I. Mahlia, Z.A.H.S. Syazmi, M. Mofijur, A.E.P. Abas, M.R. Bilad, H.C. Ong and A.S. Silitonga, *Renewable Sustainable Energy Rev.* **118** (2020) 109526.

[26] J. Guo, S. Sun and J. Liu, *Fuel* **267** (2020) 117323.

[27] H. Gong, L. Gao, K. Nie, M. Wang and T. Tan, *Renewable Energy* **154** (2020) 270.

[28] H. Zhang, T. Liu, Y. Zhu, L. Hong, T. Li, X. Wang and Y. Fu, *Renewable Energy* **145** (2020) 1246.

[29] Z. Habibi, M. Yousefi, H.R. Aghaie, P. Salehi, S. Masoudi and A. Rustaiyan, *J. Essent. Oil Res.* **20** (2008) 1.

[30] Z. Habibi, H.R. Aghaie, R. Ghahremanzadeh, S. Masoudi and A. Rustaiyan, *J. Essent. Oil Res.* **18** (2006) 503.

[31] D.N. Thoai, S. Photaworn, A. Kumar, K. Prasertsit and C. Tongurai, *Energy Procedia* **138** (2017) 536.

[32] M. Mehrali-Afjani, A. Nezamzadeh-Ejhieh and H. Aghaei, *Chem. Phys. Lett.* **759** (2020) 137873.

[33] L. Khazdooz, A. Zarei, T. Ahmadi, H. Aghaei, N. Nazempour, L. Golestanifar and N. Sheikhan, *React. Kinet. Mech. Catal.* **122** (2017) 229.

[34] N. Pourshirband and A. Nezamzadeh-Ejhieh, *J. Mol. Liq.* **335** (2021) 116543.

[35] A. Zarei, A.R. Hajipour, L. Khazdooz and H. Aghaei, *Synlett* **2010** (2010) 1201.

[36] M. Ghiaci, R.N. Esfahani and H. Aghaei, *Catal. Commun.* **10** (2009) 777.

[37] H. Aghaei and M. Ghiaci, *React. Kinet. Mech. Catal.* **131** (2020) 233.

[38] M. Ghiaci, R.J. Kalbasi, M. Mollahasani and H. Aghaei, *Appl. Catal. A* **320** (2007) 35.

[39] M. Ghiaci, H. Aghaei, S. Soleimanian and M.E. Sedaghat, *Appl. Clay Sci.* **43** (2009) 289.

[40] A. Zarei, L. Khazdooz, H. Aghaei, M.M. Gheisari, S. Alizadeh and L. Golestanifar, *Tetrahedron* **73** (2017) 6954.

[41] N. Raeisi-Kheirabadi, A. Nezamzadeh-Ejhieh and H. Aghaei, *Microchem. J.* **162** (2021) 105869.

[42] N. Raeisi-Kheirabadi, A. Nezamzadeh-Ejhieh and H. Aghaei, *Iran. J. Catal.* **11** (2021) 181.

[43] M. Ghiaci, M.E. Sedaghat, H. Aghaei and A. Gil, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84** (2009) 1908.

[44] H. Yan and Z. Zhang, *Colloids Surf. A* **611** (2021) 125824.

[45] H. Aghaei, A. Yasinian and A. Taghizadeh, *Int. J. Biol. Macromol.* **178** (2021) 569.

[46] M. Khozeymeh Nezhad and H. Aghaei, *Renewable Energy* **164** (2021) 876.

[47] M. Ghiaci, R.J. Kalbasi and H. Aghaei, *Catal. Commun.* **8** (2007) 1843.

[48] A. Zarei, L. Khazdooz, A.R. Hajipour and H. Aghaei, *Dyes Pigm.* **91** (2011) 44.

[49] X. Cao, H. Xu, F. Li, Y. Zou, Y. Ran, X. Ma, Y. Cao, Q. Xu, D. Qiao and Y. Cao, *Renewable Energy* **171** (2021) 11.

[50] C. Miao, H. Li, X. Zhuang, Z. Wang, L. Yang, P. Lv and W. Luo, *RSC Adv.* **9** (2019) 29665.

[51] H. Suo, L. Xu, C. Xu, X. Qiu, H. Huang and Y. Hu, *J. Colloid Interface Sci.* **553** (2019) 494.

[52] D.-T. Tran, J.-S. Chang and D.-J. Lee, *Appl. Energy* **185** (2017) 376.

[53] A.P.S. Bonakdar, A. Sadeghi, H.R. Aghaei, K. Beheshtimaal, S.M.R. Nazifi and A.R. Massah, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **46** (2020) 371.

[54] E. Séverac, O. Galy, F. Turon, C.A. Pantel, J.-S. Condoret, P. Monsan and A. Marty, *Enzyme Microb. Technol.* **48** (2011) 61.

[55] M. Lotti, J. Pleiss, F. Valero and P. Ferrer, *Biotechnol. J.* **10** (2015) 22.

[56] J.M. Encinar, A. Pardal, N. Sánchez and S. Nogales, *Energies* **11** (2018).

[57] J. Patchimpet, B.K. Simpson, K. Sangkharak and S. Klomklao, *Renewable Energy* **153** (2020) 861.

[58] Y.J. Jo, O.K. Lee and E.Y. Lee, *Bioresour. Technol.* **158** (2014) 105.

[59] G.E.A. Awad, A.F. Ghanem, W.A. Abdel Wahab and M.I. Wahba, *Int. J. Biol. Macromol.* **148** (2020) 1140.

[60] B.P. Dwivedee, S. Soni, R. Bhimpuria, J.K. Laha and U.C. Banerjee, *Int. J. Biol. Macromol.* **133** (2019) 1299.

[61] L. Khazdooz, A. Zarei, T. Ahmadi, H. Aghaei, L. Golestanifar and N. Sheikhan, *Res. Chem. Intermed.* **44** (2018) 93.

[62] J. Amoah, S.-H. Ho, S. Hama, A. Yoshida, A. Nakanishi, T. Hasunuma, C. Ogino and A. Kondo, *Biochem. Eng. J.* **105** (2016) 10.