تولید سوخت بیودیزل ازسوبستراهای روغن زیتون و متانول با استفاده از لیپاز سویه بومی *Pseudomonas* sp.

کبری علیجانی پور*[۱]، ناصر قائمی[۲]، نور امیرمظفری[۳]، کتایون داستان[۴]

۱و ۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

۳- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه میکروبشناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵

(*عهده‌دار مکاتبات- sepideh_alijany@yahoo.com)

چکیده

محدودیت منابع و کاهش سریع سوخت‌های فسیلی، افزایش قیمت‌های نفت خام و نگرانی‌های محیطی دلایل مختلفی برای بررسی استفاده از روغن‌های گیاهی به عنوان سوخت جایگزین هستند. بیودیزل می‌تواند از روغن‌های گیاهی به وسیله ترانس استریفیکاسیون با متانول / اتانول به دست آید. ترانس استریفیکاسیون می‌تواند به طور شیمیایی یا آنزیمی انجام شود. واکنش ترانس استریفیکاسیون با استفاده از روغن زیتون به عنوان جانشین ارزان برای تری گلیسیرید و الکل زنجیره کوتاه (متانول) به وسیله لیپاز آزاد سویه *Pseudomonas* انجام شد. استر اسید چرب زنجیره‌دراز، که محصول این واکنش است بیودیزل نام دارد و می‌تواند به عنوان سوخت دیزلی استفاده شود که تولید سولفور اکسید نمی‌کند و دود را به حداقل می‌رساند. آنزیم لیپازی که از سویه بومی جنس *Pseudomonas* استخراج شده بود، برای واکنش ترانس استریفیکاسیون استفاده شد. این سویه با بیشترین تولید آنزیم از نمونه‌های مختلف خاک استان گیلان جدا گردید. آنزیم لیپاز با رشد در محیط کشت GYP به مدت ۴۸h در $37^{\circ}C$ تولید و فعالیت لیپاز ترشحی با روغن زیتون تحریک شد. نیمه عمر آنزیم بیش از ۲ روز بود. برای تولید بیودیزل روغن زیتون و متانول به نسبت ($molmol^{-1}$) ۱:۴ استفاده شدند. به مخلوط ۲ml از محلول آنزیمی اضافه شد و سپس در انکوباتور شیکردار با دمای $40^{\circ}C$ با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۱۲h قرار داده شد. تشکیل میتل استرها با کروماتوگرافی ستونی آنالیز شد که محصول نهایی بیودیزل بیش از ۷۰ ٪ بود.

کلمات کلیدی: بیودیزل، ترانس استریفیکاسیون، روغن زیتون، متانول، لیپاز.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بیودیزل، متیل یا اتیل استرهای اسید چرب زنجیره دراز حاصل از واکنش ترانس استریفیکاسیون بین روغن‌های گیاهی یا چربی‌های حیوانی و الکل‌های زنجیره کوتاه مثل متانول و اتانول است، که به عنوان سوخت دیزلی جایگزین فرآورده‌های نفت خام تولید می‌شود (۱۲-۲).

محدود شدن منابع سوخت فسیلی قیمت نفت خام را افزایش داده است و نگرانی‌های زیادی به علت کاهش سریع سوخت فسیلی به وجود آمده است. استفاده از منابع تجدیدپذیر یکی از زمینه‌های پژوهشی مورد توجه در جوامع صنعتی است . یکی از این منابع تهیه سوخت‌های مناسب قابل جایگزینی برای سوخت‌های فسیلی می‌باشد که از این میان بیودیزل (اتیل / متیل استرهای اسیدهای چرب) یک راه حل مناسب به نظر می‌رسد. از طرفی بیودیزل‌ها خاصیت آلوده‌کنندگی کمتری داشته و میزان کمتری از سرطان زاهای بالقوه و احتمالی را تولید می‌کند. بیودیزل سولفور اکسید تولید نمی‌کند و ذرات دوده را در مقایسه با وجود یکی از مشتقات نفت خام به $\frac{۱}{۳}$ کاهش می‌دهد . به دلیل این مزیت‌های محیطی، سوخت بیودیزل می‌تواند جانشین سوخت دیزلی متداول باشد(۵ و ۸).

بیودیزل به دو صورت شیمیایی و آنزیمی تولید می‌شود. در حال حاضر بیودیزل به صورت شیمیایی با استفاده از روغن گیاهی در اروپا و آمریکا تولید می‌گردد (۵، ۸ و ۱۲). در روش شیمیایی با واکنش ترانس استریفیکاسیون به وسیله روغن و الکل در حضور یک اسید یا باز قوی، بیودیزل و گلیسرول تولید می‌شود. ترانس استریفیکاسیون کاتالیز شده با باز سریع‌تر بوده و خورندگی کمتری نسبت به واکنش کاتالیز شده با اسید دارد. بنابراین هیدروکسیدهای قلیایی متداولترین کاتالیزورهای استفاده شده هستند. هر چند اگر ماده خام دارای میزان زیادی اسید چرب آزاد باشد ، افزودن قلیا باعث کاهش اسید چرب آزاد به شکل صابون‌های نامحلول آن‌ها می‌شود که این امر محصول نهایی استر را کاهش می‌یابد و قلیاها مصرف می‌شوند. در این حالت، یک واکنش کاتالیز شده با اسید می‌تواند جانشین شود که نیاز به دمای بالاتر و زمان طولانی‌تری نسبت به واکنش کاتالیز شده با باز دارد (۱۰).

روش دوم، یک روش آنزیمی است که واکنش ترانس استریفیکاسیون کاتالیز شده با آنزیم لیپاز است. ترانس استریفیکاسیون شیمیایی از نظر زمان واکنش پر بازدهی است؛ هر چند که روش شیمیایی برای سنتز بیودیزل از تری گلیسرید معایبی مانند مشکل در بازیابی گلیسرول، اختلال در واکنش به واسطه محتوای بالای اسید چرب (که منجر به تشکیل صابون می‌شود)، نیاز به تصفیه فاضلاب قلیایی، نیاز به جمع‌آوری کاتالیزور دارد. در مقایسه استفاده از بیوکاتالیزورها ، تمام این مشکلات را حل می‌کند (۲، ۵، ۶، ۸ و ۱۰). بنابراین مطالعات زیادی با استفاده از آنزیم لیپاز، انجام شد. نقطه ضعف رایج با استفاده از فرآیندهای آنزیمی، قیمت بالای آنزیم است. به هر حال، تولید سوخت بیودیزل با روش آنزیمی، به صورت صنعتی، به دلیل قیمت

Archive of SID

www.SID.ir

بالای کاتالیزور آنزیمی انجام نشده است (۵ و ۱۰). به منظور استفاده از آنزیم، فرآیند تثبیت باید با استفاده از روش مناسبی انجام شود. این امر بازیابی کردن بیوکاتالیزور و بنابراین قیمت کمتر آن را موجب می‌شود (۱۰).

در این مطالعه لیپاز ارزان به عنوان بیوکاتالیزور که از گونه *Pseudomonas* استخراج شد، استفاده شد. ترانس استریفیکاسیون آنزیمی روغن زیتون با متانول و در نتیجه میزان تولید بیودیزل بررسی گردید. به خاطر محدودیت امکانات آزمایش تثبیت لیپاز انجام نشد و تمام آزمون‌ها توسط لیپاز آزاد انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و تشخیص باکتری‌های تولیدکننده لیپاز

باکتری مورد مطالعه یک سویه *Pseudomonas* مولد آنزیم لیپاز است که از خاک شهر رودبار جدا گردید. بدین ترتیب که پس از جداسازی بیش از صد نمونه مختلف از باکتری‌ها و تشخیص جنس و گونه آن‌ها بر اساس تست‌های تشخیصی و افتراقی استاندارد، برای تشخیص فعالیت لیپازی آن‌ها به محیط نوترینت آگار حاوی ۰/۴٪ معرف ویکتوریا بلو منتقل شدند. ابتدا پودر معرف به همراه ۲٪روغن زیتون به محیط کشت اضافه و اتوکلاو شد. رنگ محیط کشت به دلیل وجود معرف رنگی، آبی می‌شود (۱). در مرحله بعد نمونه باکتری‌های ایزوله شده بر روی محیط کشت خالص به محیط افتراقی حاوی معرف، انتقال داده شده و پلیت‌های کشت شده به مدت ۷۲-۴۸ در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. نمونه‌های لیپاز مثبت رنگ محیط را از آبی به قرمز تغییر خواهند داد و این تغییر رنگ به دلیل تغییر اسیدیته محیط در نتیجه هیدرولیز لیپیدهای محیط به اسیدهای چرب می‌باشد (۱). بیش از نیمی از باکتری‌ها دارای فعالیت لیپازی مثبت بودند. در نهایت نسبت قطر هاله به قطر کلونی بر حسب mm برای هر باکتری اندازه‌گیری شد.

بدین ترتیب از آنزیم لیپاز سویه زنده سودوموناس جدا شده برای کاتالیز واکنش ترانس استریفیکاسیون استفاده شد. روغن زیتون به عنوان سوبسترای تری گلیسیرید مورد استفاده قرار گرفت و متانول به عنوان الکل زنجیره کوتاه به کار رفت. محیط تولیدی GYP برای تولید بهینه لیپاز استفاده گردید (۱و ۱۲).

کشت در سیستم غوطه‌ور

قبل از کشت باکتری‌ها در محیط کشت تولیدی لازم است بیشترین تعداد سلول را در شرایط فیزیولوژیک داشته باشیم. به این منظور از محیط پیش کشت استفاده می‌شود. ۳ لوپ از هر کلونی از لوله کشت به ۵۰ml محیط پیش کشت در ارلن به حجم ۲۵۰ml منتقل و سپس در انکوباتور شیکر دار با دمای ۳۷°C و دور ۱۵۰rpm قرار داده شد. این محیط حاوی ترکیبات زیر بر حسب g/l است: پپتون (۱۰) عصاره مخمر (۵) کلرید کلسیم (۵) KH_2PO_4 (۳) سولفات منیزیم (۱) گلوکز (۲۰) و روغن زیتون (۲۰ml). بدین ترتیب پس از ۲۴ ساعت بیشترین بیوماس سلولی که در فاز لگاریتمی

Archive of SID

www.SID.ir

هستند، حاصل شد. محیط تولید، محیط نهایی برای تولید آنزیم است. لذا 5ml از محیط پیش کشت به 50ml از محیط تولید در ارلنی به حجم 250ml تلقیح گردید و در انکوباتور شیکردار با دمای 37°C و دور 150rpm قرار داده شد (1و 12). محیط تلقیح شده به مدت 72-48 ساعت انکوبه شد. این محیط حاوی ترکیبات زیر بر حسب g/l می‌باشد: گلوکز (20) پپتون (10) عصاره مخمر (10) سولفات منیزیم (0/3) سولفات مس (0/1) KCl (0/0015) و روغن زیتون (20ml) (1 و 12).

تهیه محلول آنزیمی

پس از طی مدت انکوباسیون محیط تولید پس از تقسیم در لوله‌های استریل به مدت 15 دقیقه با دور 3000g سانتریفیوژ شد. بدین ترتیب محلول رویی به عنوان محلول آنزیمی استفاده شد (12).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی به روش کمی

سنجش کمی فعالیت آنزیمی لیپاز با تیراسیون اسیدهای چرب آزاد شده از روغن زیتون توسط یک قلیا انجام می‌شود. به عبارت دیگر فعالیت لیپاز از طریق اندازه‌گیری تیتر بر پایه هیدرولیز روغن زیتون به عنوان سوبسترای تری گلیسرید تعیین می‌شود (1، 5، 12 و 13). بدین ترتیب امولسیونی شامل روغن زیتون (4ml) بافر اسید سیتریک 0/05M (5ml) و محلول آنزیمی(1ml) تهیه شد. این مخلوط به مدت 15 دقیقه با همزن مغناطیسی یکنواخت شده و ترکیب امولسیون به دست آمده به مدت 30 دقیقه در انکوباتور شیکردار با دمای 40°C انکوبه می‌شود. واکنش با افزودن متانول 95٪ (10ml) پس از انکوباسیون پایان می‌یابد (13). سپس اسیدهای چرب آزاد شده با 0/1M NaOH تیتر می‌شود. برای نشان دادن نقطه خنثی شدن کامل از معرف رنگی یا اندیکاتور فنل فتالئین به میزان 0/09٪ به محلول امولسیون داخل ارلن اضافه شد. ترکیب امولسیون به عنوان تیتراند به همراه فنل فتالئین در ارلن و 0/1M NaOH به عنوان تیترانت در بورت ریخته شد. در حالی که ارلن به صورت دورانی گردانده می‌شود، شیر بورت هم کم کم باز می‌گردد. در صورت مشاهده تغییر رنگ که نشانگر خاتمه زمان تیتراسیون است، شیر بورت بسته می‌شود. طبق این روش یک واحد آنزیمی (لیپاز) میزانی از آنزیم است که 1 µmol از اسیدهای چرب آزاد را در یک دقیقه آزاد می‌کند (1، 6، 12 و 13). بدین ترتیب نمونه‌های منتخب بر اساس این روش با هم مقایسه و بهترین سویه که طبق روش‌های افتراقی و تشخیصی سودوموناس آئروژینوزا بود، انتخاب شد.

اندازه‌گیری پایداری آنزیم پس از استخراج

محلول آنزیمی استخراج شده در زمان‌های مختلف 24 تا 120 ساعت در یخچال نگهداری و فعالیت آنزیمی آن‌ها در روزهای متوالی به طریق تیتراسیون اندازه‌گیری شد (1).

Archive of SID

www.SID.ir

واکنش ترانس استریفیکاسیون آنزیمی

تولید بیودیزل در یک ارلن مایر ۲۵۰ ml با استفاده از روغن زیتون و متانول به نسبت مولی ۱:۴ در حضور ۷-۶٪ (۲ml) محلول آنزیمی انجام شد. این مخلوط در یک انکوباتور با دمای ۴۰°C در همزن دائمی با ۲۰۰ rpm به مدت ۱۲ h انکوبه شد.

پس از زمان انکوباسیون نمونه در ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، تا مقدار فوق العاده کم گلیسرول حاصل از واکنش ترانس استریفیکاسیون رسوب کند و محلول رویی که شامل میتل استرهای مختلف یا همان بیودیزل است، به دست آید. آنالیز کیفی تولید متیل استرها با استفاده از آنزیم آزاد لیپازسودوموناس به وسیله کروماتوگرافی ستونی از سوپرناتانت انجام شد و نتایج به صورت نمودار نشان داده شد. برای جداسازی کیفی محصول از ستون سیلیکاژل ۴۶mm-۱۸ و سیستم‌های حلال هگزان-دی اتیل اتر (۹۵:۵v/v) استفاده گردید (۵، ۶ و۷).

بهینه‌سازی تولید بیودیزل

اثر زمان در تولید بیودیزل

اثر زمان روی تولید بیودیزل از روغن زیتون در زمان‌های مختلف ۳۰ h-۶ مطالعه شد. نتایج حاصل بررسی و به صورت نمودار ثبت شد.

اثر دما در تولید بیودیزل

دمای واکنش یک پارامتر مهم در کاتالیز آنزیمی است. دماهای بالاتر می‌تواند ترانس استریفیکاسیون سریع‌تری را موجب شوند اما دمای خیلی بالا منجر به دناتوره شدن آنزیم می‌شود. برای یافتن دمای اپتیمم واکنش، دماهای واکنش از ۵۰°C – ۳۰ در این سری از آزمون‌ها بررسی شدند و زمان واکنش همان زمان بهینه انکوباسیون بود. برای هر دمایی نتایج حاصل بررسی و به صورت نمودار ثبت شد.

اثر نسبت مولی روغن زیتون/متانول

واکنش متانولیزیز در نسبت‌های مولی مختلف روغن/ متانول انجام شد. حجم روغن ثابت و حجم متانول تغییر کرد نسبت‌های ۱:۱، ۱:۲، ۱:۳، ۱:۴، ۱:۵ و ۱:۶بررسی شدند.

اثر میزان آنزیم (محلول آنزیمی)

اثر میزان متفاوت آنزیم در روند واکنش بررسی شد و تأثیر مقادیر ۱ml، ۲ml، ۳ml، ۴ml در مقدار محصول واکنش مطالعه و نتایج به صورت نمودار ثبت گردید.

نتایج

میزان تولید آنزیم لیپاز در محیط تولید طی مدت ۴۸ ساعت در انتهای فاز لگاریتمی به ماکزیمم مقدار خود می‌رسد (شکل ۱).

ماندگاری و پایداری لیپاز یک پارامتر مهم در یک فرآیند صنعتی است که مستقیماً قیمت را تحت تأثیر قرار می‌دهد. آنزیم لیپاز استخراج شده پس از ۲ روز ماندگاری، فعالیت خود را حفظ کرد (شکل ۲).

واکنش ترانس استریفیکاسیون در مدت زمان

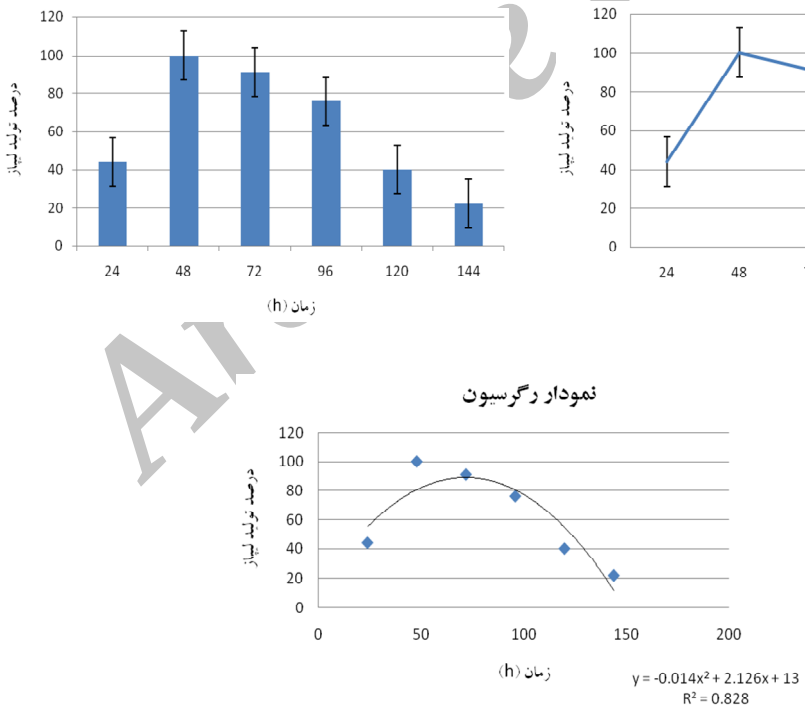
Archive of SID
www.SID.ir

انکوباسیون ۱۲h به حالت تعادل رسیده و بیودیزل به میزان ۷۰٪ به دست آمد و تولید پس از این زمان کاهش یافت و افزایش بیشتر در زمان واکنش اثری در تولید بیودیزل نداشت (شکل ۳).

سرعت واکنش به شدت تحت تاثیر دمای واکنش قرار می‌گیرد. در طول واکنش ترانس استریفیکاسیون، تولید بیودیزل ادامه پیدا کرد و به طور یکنواخت تا دمای ۴۰°C افزایش یافت و دماهای بیشتر از ۴۰°C منجر به کاهش محصول شد. به دلیل اینکه لیپاز آزاد در این واکنش استفاده می‌شود، دماهای بالا منجر به دناتوره شدن آنزیم می‌گردد. بنابر این دمای بهینه جهت تولید بیودیزل دمای ۴۰°C می‌باشد که در کروماتوگرافی ستونی این میزان معادل ۷۱٪ بود (شکل ۴).

برای تولید بیودیزل در نسبت‌های مولی مختلف روغن زیتون/متانول نشان داد که با افزایش نسبت مولی روغن زیتون/متانول تولید بیودیزل نیز افزایش می‌یابد و ماکزیموم تولید بیودیزل در نسبت مولی ۱:۴ به میزان ۷۰٪ به دست آمد و با افزایش نسبت مولی، تولید کاهش یافت (شکل ۵).

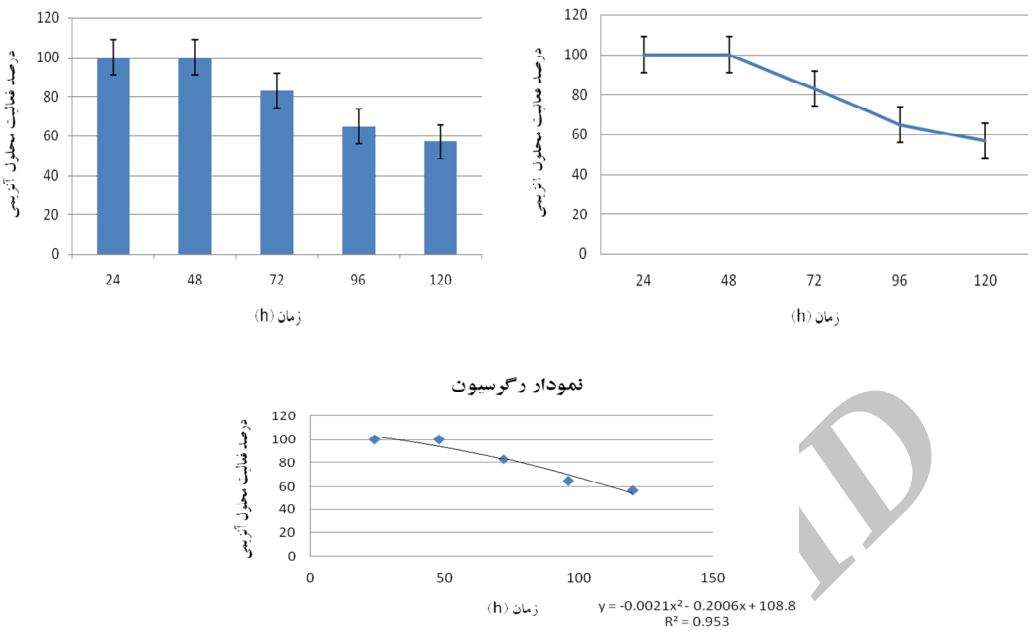
پس از استفاده از مقادیر مختلف محلول آنزیمی بهترین نتیجه زمانی به دست آمد که از ۲ml و ۳ml محلول آنزیمی استفاده شد و میزان تولید بیودیزل ۷۰٪به دست آمد (شکل ۶).



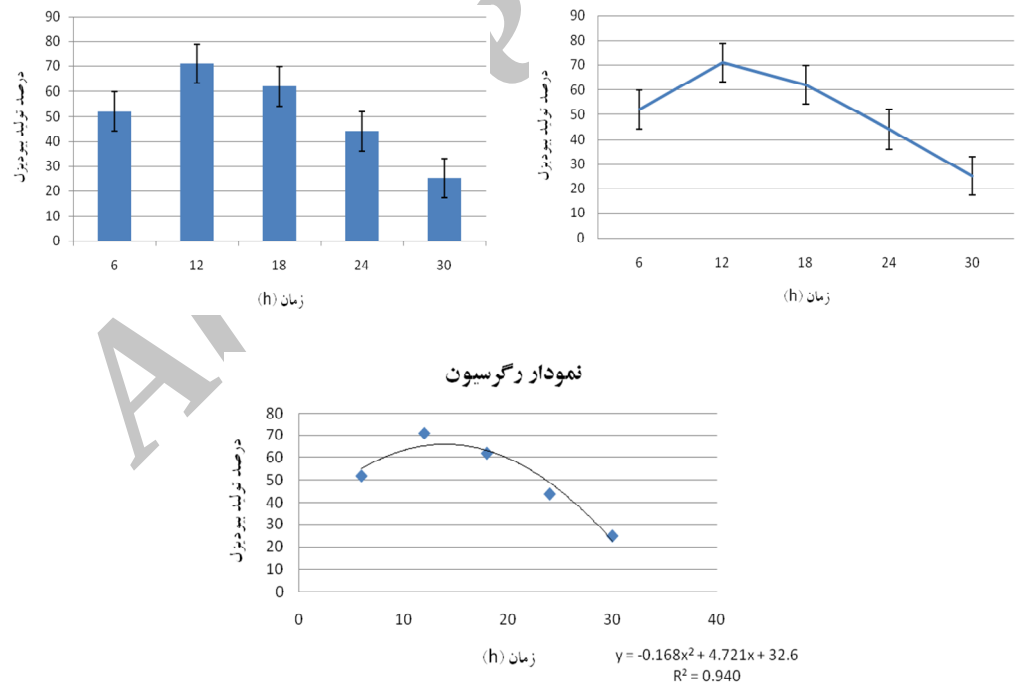
شکل ۱: تولید آنزیم بر حسب زمان در باکتری آزاد

Archive of SID

www.SID.ir

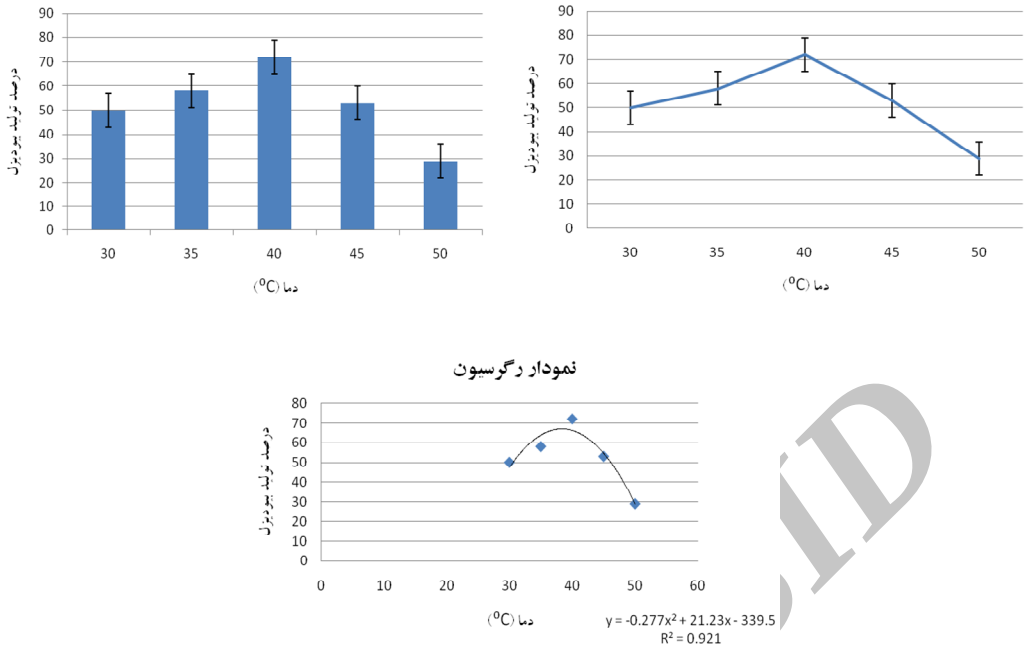


شکل۲: پایداری آنزیم در دمای ۴°c

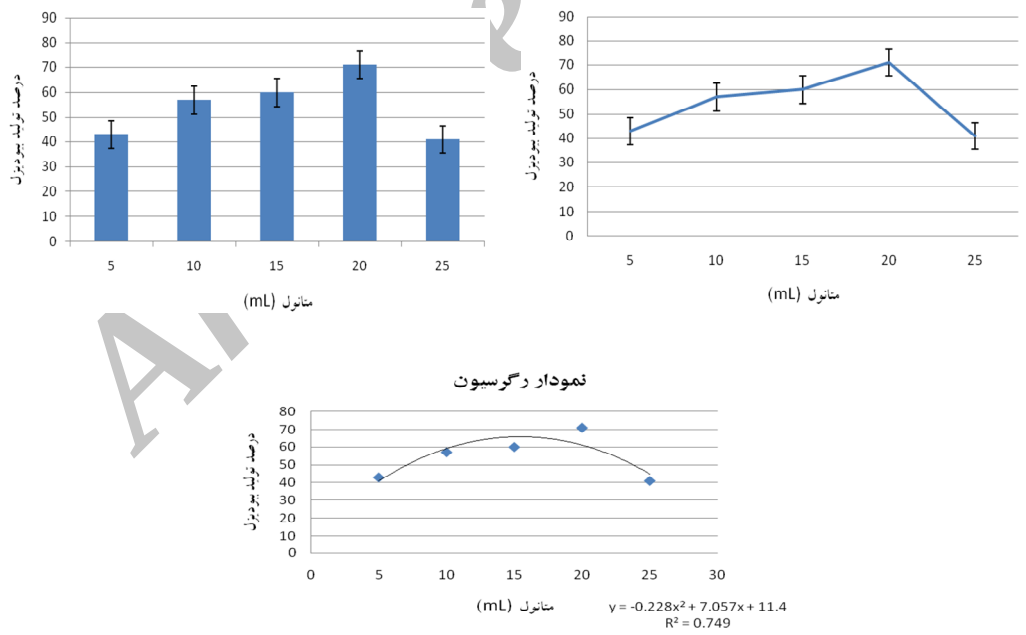


شکل ۳: اثر زمان در تولید بیودیزل

Archive of SID
www.SID.ir



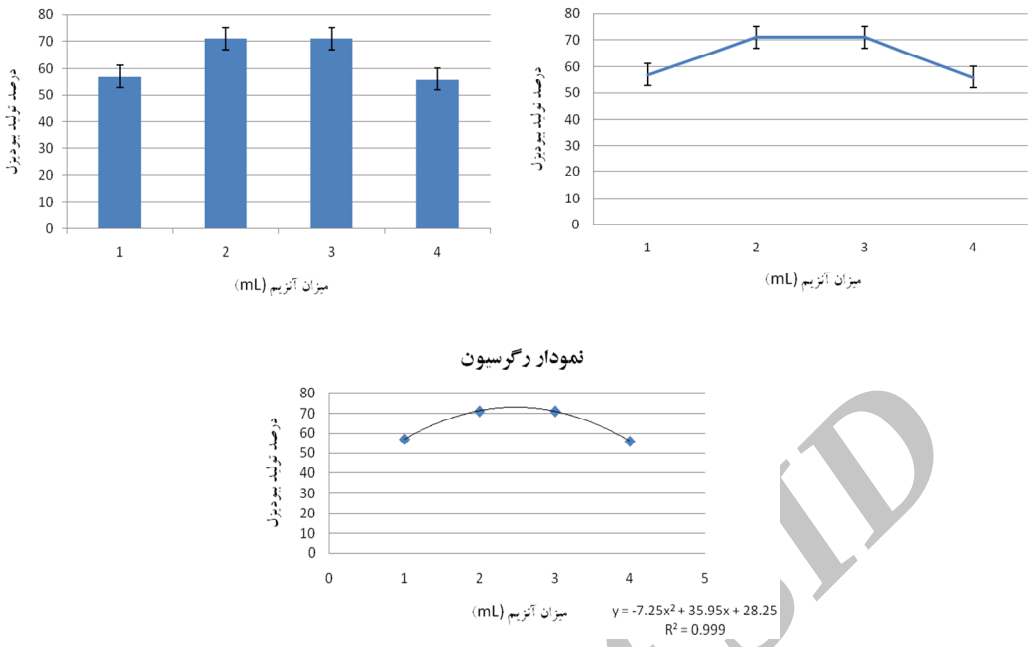
شکل۴: اثر دما در تولید بیودیزل



شکل ۵: اثر نسبت مولی روغن زیتون/ متانول در تولید بیودیزل

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۶: اثر میزان محلول آنزیمی در تولید بیودیزل

بحث

نسبت مولی روغن زیتون و متانول اگر از ۱:۴ تجاوز کند، تولید محصول کاهش می‌یابد. که احتمالاً به دلیل این است که لیپاز به خاطر توکسیسیته متانول دناتوره می‌شود به عبارت دیگر لیپاز در حضور متانول اضافی غیر فعال می‌گردد. غیر فعال شدن لیپاز توسط محققان دیگر هم مشاهده شد (۱۰). و در نسبت مولی کمتر از ۱:۴ احتمالاً غلظت متانول کمتر از حد موردنیاز است. و غلظت کم سوبسترا میزان محصول را کاهش می‌دهد. سرعت واکنش به شدت تحت تأثیر دمای واکنش قرار می‌گیرد. اما دمای خیلی بالا منجربه دناتوره شدن آنزیم می‌شود همچنین مقدار اضافی آنزیم هیچ کمکی به پیشرفت واکنش نمی‌کند.

طبق نتایج دمای ۴۰°C دمای مناسبی برای تولید بیودیزل بود و استفاده از روغن زیتون و متانول در حضور آنزیم آزاد لیپاز منجر به تولید ۷۰٪محصول شد. در مطالعه‌ای که توسط Shweta Shah و همکاران انجام شد با استفاده از روغن جاتروفا و متانول در حضور آنزیم آزاد لیپاز ۶۲٪ محصول استری در دمای ۴۰°C به مدت ۸ ساعت بدست آوردند. بنابراین تولید محصول در این پروژه امیدوار کننده به نظر می‌رسد. تثبیت آنزیم کروموباکتریوم ویسکوزوم منجربه تولید ۹۲٪ بیودیزل شد (۱۱). بنا براین انتظار می‌رود که با تثبیت آنزیم لیپاز این سویه نتیجه بسیار بهتری حاصل شود.

Kim و همکارانش با استفاده از روغن سویا و متیل استات (به جای متانول) در حضور آنزیم تثبیت شده لیپاز به ۴۷٪ بیودیزل دست یافتند. واکنش ترانس استریفیکاسیون توسط این محققان در شرایط دمایی ۴۰°C و ۱۲ h انکوباسیون با نسبت مولی ۱:۳ روغن به الکل و ۴٪ لیپاز تثبیت

Archive of SID
www.SID.ir

شده Novozyme 435 انجام شد. که نتیجه آن در مقایسه با تحقیق ما جای تأمل دارد. همین محققان با افزودن ۳۰٪ Novozyme به مخلوط واکنش با نسبت مولی ۱:۱۲ از روغن سویا به متیل استات در ۴۰°C توانستند به ۹۲٪ محصول دست یابند که آنزیم بسیار بیشتری استفاده کردند (۶).

در مطالعه Iso و همکاران واکنش ترانس استریفیکاسیون را با استفاده از روغن کاجیره و لیپاز آزاد *Pseudomonas fluorescens* و استفاده از ۱-پروپانول به عنوان سوبسترا انجام دادند. واکنش در ۲۵ ساعت کامل شد و ۹۰٪ محصول استری به دست آمد. در حالی که نسبت مولی روغن به الکل ۱:۴ بود و از ۶٪ لیپاز آزاد استفاده شده بود. این نتیجه خوب حاصل از کار این محققان احتمالاً به دلیل استفاده از الکل ۱-پروپانول است که نسبت به متانول دارای خاصیت توکسیسیته و بازدارنده نیست (۵).

همانطور که از نتایج بر می‌آید استفاده از متانول در واکنش با نسبت مولی ۱:۴ به تولید ۷۰٪ بیو دیزل انجامید. در تحقیقی که Nie و همکاران انجام دادند به ۹۳٪ بیودیزل دست یافتند در حالی که از روغن سالاد و متانول با نسبت مولی ۱:۳ و ۲۰٪ لیپاز تثبیت شده گونه‌ای از کاندیدا استفاده کردند و واکنش در ۴۰°C به بهترین میزان تولید در مدت ۱۰h رسید. در این تحقیق همان طور که گفته شد لیپاز تثبیت شده دمای اپتیمم کمی داشت و در ۷۰°C کاهش محصول به وضوح مشخص بود. بنابراین بیشترین محصول در ۴۰°C به دست آمد (۹).

Devanesan و همکارانش با استفاده از سلول تثبیت شده *Pseudomonas fluorescens* با ژل آلژینات روی روغن جاتروفا و متانول به ۷۵-۷۰٪ میتل استر (بیودیزل) دست یافتند به این دلیل که بتوانند علاوه بر آنزیم خارج سلولی لیپاز، از آنزیم داخل سلولی آن هم استفاده کنند. واکنش آن‌ها در زمان ۴۸h در دمای ۴۰°C با نسبت مولی ۱:۳ روغن به متانول و pH=۷ کامل شد. بنابراین نتیجه حاصل از پروژه ما نسبت به آن نتیجه بسیار بهتری است و نیاز به کار بیشتری دارد. بنابراین با تثبیت سلول در یک بستر مناسب می‌توان به محصول بیشتری دست یافت هر چند که با مطالعه تحقیقات مختلف نشان داده شد که با تثبیت آنزیم به نتایج بهتری می‌توان دست پیدا کرد (۲).

در یک محیط آلی، لیپاز آزاد به میزان فراوانی تجمع می‌یابد. بنابراین بیشتر جایگاه‌های فعالیت یک آنزیم محدود می‌شود. توضیح اینکه وقتی آنزیم تثبیت می‌شود، موثرتر می‌گردد که بخاطر محدودیت امکانات آزمایش، آزمون نشد.

سپاسگزاری

در پایان از جناب آقای دکتر آسمار به دلیل تلاش برای فراهم نمودن امکانات آزمایشگاه تحقیقاتی و سرکار خانم اندیش به جهت همکاری‌های بیدریغشان تشکر می‌نماییم.

منابع

1. Alan, C., Lanser, L., Manthey, K., Ching, T., Hou, 2002. Regioselectivity of New Bacterial Lipase Determined by Hydrolysis of Triolein, Current Microbiology, Vol. 44, PP. 336-337.

Archive of SID

www.SID.ir

2. Devanesan, M. G., Viruthagiri, T. and Sugumar, N., 2007. Transesterification of JatropHa Oil Using Immobilized *Pseudomonas fluorescens*, African Jouranal of Biotechnolgy, Vol. 6, PP. 2497-500.
3. Fangrui, Ma. and Milford, A. H., 1999. Biodiesel production a review, Bioresource Technology, Vol. 70, PP. 1-8.
4. Gerpen, J. V., 2000. Biodiesel and Fuel Quality, JAOCS, Vol. 76(7), PP. 789-790.
5. Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T. and Shrestha, S., 2001. Production of Biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol. 16, PP. 53-58.
6. Kim, S. J., Jung, S. M., Park, Y. C. and Park, K., 2007. Lipase catalyzed Transesterification of Soybean Oil Using Ethyl Acetate, an Alternative Acyl Acceptor, Biotechnology and Bioprocess Engineering, Vol. 12, PP. 441-443.
7. Knoth, G., 2001. Analytical Methods used in the production and fuel Quality Assessment of Biodioesel, American Society of Agricultural Engineers, Vol. 44(2), PP. 193-198.
8. Kouker, G. J., 1987. Specific and sensitive plate Assay for Bacterial Lipases, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 53 No. 1, PP. 211-213.
9. Nie, K., Xie, F., Wang, F. and Tan, T., 2006. Lipase catalyzed methanolysis of produce biodiesl: Optimization of the biodiesel production, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol. 43, PP. 142-145.
10. Ozgul, S. and Selma, Y., 1996. Fatty acids ethyl esters from rice bran oil by in-situ esterification as a biodiesel fuel, J. Am. Oil Chem. Soc, Vol. 62, PP. 1-2.
11. Shah, S., Sharma, S. and Gupta, M. N., 2004. Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of JatropHa Oil, Energy and Fuels, Vol. 18, PP. 154-158.
12. Walz, R., 2000. Standards for Biodiesel Analysis, J. Am. Oil Chem. Soc, Vol. 77(5), PP. 489-491.
13. Wickhan, M., Garrood, M., Leney, J. D. G., Wilson, P. and Fillery, T. A., 1998. Modification of a pHospHolipids stabilized emulsion interface by bile salt: effect pancreatic Lipase activity, Journal of lipid research, Vol. 39, PP. 623-626.
14. Yong, J. G., Wang, Y. H., Yong. B, Mainda, G. and Guo, Y., 2006. Degumming of vegetable Oil by a New Microbial lipase, Food Technol. Biotechnol, Vol. 44(1), PP. 101-103.

Archive of SID

www.SID.ir