

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Archive of SID

Archive of SID



عنوان طرح: تولید آنزیمی سوخت زیستی (بیودیزل) به کمک نانو ذرات مغناطیسی از منابع

مختلف روغنی

کد طرح: ۲۲۰۱-۵۵

واحد سازمانی مجری: پژوهشکده علوم پایه کاربردی

گروه پژوهشی: فیزیک

مسئول اجرای طرح: صبورا اشکوریان، جلیل بدرآقی

ماه و سال اختتام طرح:

خرداد ۱۳۹۵

Archive of SID

مشخصات مسئول و همکاران طرح مطابق پرسشنامه مصوب:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	رتبه	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
۱	صبورا اشکوریان	مسئول	بیوفیزیک	۱۵	۳۶۰
۲	جلیل بدراقی	مسئول	بیوفیزیک	۱۰	۲۴۰
۳	فاطمه ممشلی	همکار	بیوفیزیک	۵	۵۰
۴	اقدس بنایی	همکار	بیوفیزیک	۵	۱۰۰
۵	الهه پورفخرایی	همکار	بیوفیزیک	۵	۵۰

Archive of SID

## چکیده

ایران یکی از بزرگترین تولیدکنندگان نفت جهان است. با این وجود استفاده بی‌رویه از ذخایر نفتی و سوخت‌های فسیلی رایج، علاوه بر کاستن منابع محدود نفتی، موجب آلودگی محیط زیست می‌شوند. از این رو استفاده از سوخت‌های زیستی مورد توجه قرار گرفته است. اما قیمت تمام شده بالای تولید سوخت‌های زیستی به روش‌های موجود، استفاده از آن را دچار محدودیت جدی کرده است. در این پژوهش یکی از جدیدترین روش‌های تولید انرژی از منابع تجدیدپذیر، یعنی تولید بیودیزل به روش آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات، تحقیق می‌شود. بیودیزل از منابع طبیعی و تجدیدپذیر مانند روغن‌های گیاهی، چربی‌های حیوانی، روغن دورریز آشپزی و ... طی فرآیندهای شیمیایی تولید می‌شود. در این طرح ابتدا آنزیم لیپاز قارچی خریداری شده، سپس آنزیم بر روی نانوذره مغناطیسی تثبیت و در نهایت برای تولید بیودیزل از روغن، به عنوان بیوکاتالیست بکاربرده خواهد. استفاده از بیوکاتالیست آنزیمی بجای کاتالیزورهای شیمیایی (اسیدی یا بازی) رایج جهت تولید بیودیزل، علاوه بر کاهش زمان و هزینه‌های تولید، موجب تولید گلیسرین خالص تر به عنوان محصول جانبی می‌گردد. همچنین تثبیت آنزیم بر روی نانوذرات مغناطیسی علاوه بر افزایش طول عمر عملکرد آنزیم، موجب سهولت جداسازی آنزیم از محصولات شده و امکان استفاده مجدد از آنزیم و در نتیجه کاهش هزینه‌های اقتصادی تولید سوخت را فراهم می‌آورد.

## کلیدواژگان:

لیپاز، نانوذرات مغناطیسی، بیودیزل

۱	۱- فصل اول: کلیات
۲	۱-۱ مقدمه
۳	۲-۱ بیان مسأله
۴	۳-۱ اهمیت و ضرورت پژوهش
۶	۴-۱ هدف‌ها و سؤال‌های پژوهش
۷	۲- فصل دوم: منابع مطالعاتی موضوع و مبانی نظری پژوهش
۸	۱-۲ پیشینه پژوهش
۸	۱-۱-۲ بیودیزل
۱۰	۲-۱-۲ بیواتانول
۱۱	۳-۱-۲ بیوگاز
۱۲	۲-۲ پیشینه داخلی
۱۳	۳-۲ پیشینه خارجی
۱۵	۴-۲ خلاصه پیشینه تولید سوخت‌های زیستی
۱۶	۵-۲ مزیت‌های سوخت بیودیزل
۱۸	۶-۲ مشکلات استفاده از بیودیزل
۱۹	۷-۲ بیودیزل B <sub>100</sub>
۲۰	۸-۲ مقایسه بیودیزل و پترودیزل
۲۲	۹-۲ تحلیل پیشینه پژوهش
۳۱	۱-۳-۹-۲ تکنیک جذب
۳۴	۲-۳-۹-۲ تکنیک اتصال کوالانسی
۳۷	۳-۳-۹-۲ تکنیک بدام اندازی
۳۹	۴-۳-۹-۲ تکنیک اتصالات عرضی
۴۰	۵-۳-۹-۲ تثبیت سلول کامل

- ۴۵ ۲-۱۰ مبانی نظری
- ۵۲ ۲-۱۱ نانوذرات مغناطیسی
- ۵۴ ۲-۱۲ منابع تولید بیودیزل
- ۵۸ ۲-۱۳ چارچوب نظری
- ۶۲ ۲-۱۴ فرضیه‌های پژوهش
- ۶۳ ۳- فصل سوّم: مواد و تجهیزات و روشهای پژوهش
- ۶۴ ۳-۱ مواد و دستگاه ها
- ۶۶ ۳-۲-۱-۱ سنتز نانوذرات  $Fe_3O_4$
- ۶۸ ۳-۲-۱-۲ سنتز نانوذرات  $\gamma-Fe_2O_3$
- ۷۲ ۳-۳ بررسی مورفولوژی و زتا پتانسیل نانوذرات مغناطیسی
- ۷۳ ۳-۴ تثبیت آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات مغناطیسی
- ۷۴ ۳-۵ سنجش غلظت پروتئین به روش برادفورد
- ۷۵ ۳-۶ سنجش فعالیت آنزیم لیپاز آزاد و تثبیت شده
- ۷۷ ۳-۷ تولید بیودیزل به روش شیمیایی
- ۸۴ ۳-۸ تولید آنزیمی بیودیزل (آنزیم آزاد و تثبیت شده)
- ۸۶ ۴- فصل چهارم: نتایج حاصل از پژوهش
- ۸۷ ۴-۱ انتخاب منابع روغنی مورد استفاده در تولید بیودیزل و آماده سازی آنها
- ۹۰ ۴-۲ آنالیز مورفولوژیکی نانوذرات سنتز شده
- ۹۳ ۴-۳ سنجش پتانسیل زتای نانوذرات سنتز شده
- ۹۴ ۴-۴ نتایج سنجش میزان پروتئین در محلول آنزیم آزاد و تثبیت شده
- ۹۵ ۴-۵ سنجش فعالیت آنزیم لیپاز آزاد و تثبیت شده
- ۹۷ ۴-۶ سنجش پتانسیل زتای نانوذرات پس از تثبیت آنزیم به روش تکنیک اتصال کوالانسی



۹۹	۷-۴ سنجش پتانسیل زتای نانوذرات پس از تثبیت آنزیم با استفاده از تکنیک جذب
۱۰۱	۸-۴ رآکتور تولیدی بیودیزل
۱۰۱	۹-۴ استخراج محصولات تولید شده به روش شیمیایی
۱۰۴	۱۰-۴ تست الکی تعیین کیفیت بیودیزل (تست کیفی)
۱۰۵	۱۱-۴ تست تعیین کیفیت با استفاده از کروماتوگرافی گازی
۱۰۷	۵- فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری
۱۱۰	فهرست منابع

## فهرست جداول

۱۵	جدول (۱) تولید سوخت زیستی در جهان از سال ۲۰۰۳ تا ۲۰۱۳ (معادل هزارتن)
۲۱	جدول (۲) مقایسه درصد غلظت آلاینده های محیط ناشی از سوخت های B100 و B20 در مقایسه با سوخت دیزل
۲۳	جدول (۳) مشخصات سوخت دیزل نوع دوم و بیودیزل بر اساس استاندارد ASTM
۳۱	جدول (۴) مقایسه آنزیم آزاد و آنزیم تثبیت شده
۳۳	جدول (۵) مقایسه عملکرد تولید بیودیزل با استفاده از لیپاز تثبیت شده با استفاده از روش جذب
۳۶	جدول (۶) مقایسه عملکرد تولید بیودیزل با استفاده از لیپاز تثبیت شده به روش اتصال کووالانسی
۳۸	جدول (۷) مقایسه عملکرد تولید بیودیزل با استفاده از لیپاز تثبیت شده با استفاده از روش به دام انداختن
۴۳	جدول (۸) مقایسه تولید بیودیزل با استفاده از کاتالیزورهای تمام سلولی

## فهرست اشکال و نمودارها

- شکل (۱) استفاده از آهن ربا برای جدا سازی ترکیبات متصل به نانوذرات مغناطیسی ۵
- شکل (۲) تولید جهانی سوخت های زیستی از سال ۲۰۰۳ تا ۲۰۱۳ ۱۶
- شکل (۳) واکنش تولید بیودیزل به روش ترانس استریفیکاسیون ۲۳
- شکل (۵) شماتیک روش های تثبیت آنزیم: (A) روش جذب، (B) روش اتصال کووالانسی، (C) روش بدام اندازی و (D) روش اتصالات عرضی ۴۰
- شکل (۶) مراحل تهیه (A) لیپاز خارج سلولی تثبیت شده و (B) بیوکاتالیست سلول کامل ۴۱
- شکل (۷) فعالیت کاتالیتیکی لیپاز ۴۶
- شکل (۸) مدل پینگ-پنگ بای-بای ۴۷
- شکل (۹) ساختار باز و بسته آنزیم ۴۸
- شکل (۱۰) ساختار A/B-HYDROLASE FOLD ۴۹
- شکل (۱۱) ساختار مثلث کاتالیستی لیپازها ۵۰
- شکل (۱۲) استانهای دارای پتانسیل تولید دانه های روغنی در ایران [۲۰] ۵۶
- شکل (۱۳) محلول اولیه واکنش سنتز نانوذرات ۶۷
- شکل (۱۴) تشکیل نانوذرات ۶۷
- شکل (۱۵) جدا کردن نانوذرات سنتز شده با مگنت ۶۷
- شکل (۱۶) نانوذرات سنتز شده ۶۷
- شکل (۱۷) پوشش دار کردن نانوذرات مغناطیسی با سیلیکا ۷۰
- شکل (۱۸) شستشوی نانوذرات مغناطیسی پوشش دار شد. دو شکل بالا نانوذرات مغناطیسی FE3O4 و دو شکل پایین نانوذرات مغناطیسی FFE2O3 ۷۱
- شکل (۱۹) پروسه سنتی تولید بیودیزل با مراحل آماده سازی اسیدی و بدنبال آن استفاده از کاتالیست آلکالاین. (A) رآکتور (B) جداسازی (سانتریفیوژ یا دکانتور) (D) خالص سازی تولید و ریکاوری الکل ۷۹
- شکل (۲۰) (A) رآکتور؛ (B) جداسازی (سانتریفیوژ یا دکانتور)؛ (C) کاتالیزور آنزیمی و فیلتر؛ (D) الکل ریکاوری ۸۰
- شکل (۲۱) مرحله جداسازی بیودیزل و گلیسرین (محلول تیره رنگ زیرین) ۸۱
- شکل (۲۲) مرحله شستشوی بیودیزل تولیدی ۸۳

- ۸۹ شکل ۲۳) چربی حیوانی
- ۹۱ شکل ۲۴) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی  $FE_3O_4$
- ۹۱ شکل ۲۵) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری  $FE_3O_4$
- ۹۲ شکل ۲۶) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی  $\Gamma-FE_2O_3$
- ۹۲ شکل ۲۷) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری  $\Gamma-FE_2O_3$
- ۹۳ شکل ۲۸) پتانسیل زتای نانوذرات  $FE_3O_4$
- ۹۴ شکل ۲۹) پتانسیل زتای نانوذرات  $\Gamma-FE_2O_3$
- شکل ۳۰) تغییر رنگ محلول های حاوی پروتئین با ۶ غلظت متفاوت از BSA در حضور واکنشگر برادفورد. هرچه میزان پروتئین بیشتر باشد رنگ آبی پررنگ تری مشاهده می شود.
- شکل ۳۱) تغییر رنگ معرف بردفورد به رنگ با تنالیته آبی در حضور آنزیم بخصوص در محل تجمع نانوذرات در انتهای ویال ها به وضوح قابل مشاهده می باشد. رنگ آبی سمت راست محلولی برنرورد شاهد با ۱۰۰ درصد پروتئین است که کاملاً به رنگ آبی در آمده است.
- ۹۵ شکل ۳۲) نتایج سنجش فعالیت آنزیم لیپاز آزاد
- ۹۶ شکل ۳۳) نتایج مربوط به سنجش فعالیت آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات گاما اکسید آهن
- ۹۶ شکل ۳۴) نتایج مربوط به سنجش فعالیت آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات اکسید آهن  $FE_3O_4$
- ۹۷ شکل ۳۵) پتانسیل زتای نانوذرات  $FE_3O_4$  آمین دار شده و متصل به آنزیم لیپاز با تکنیک اتصال کووالان
- ۹۸ شکل ۳۶) پتانسیل زتای نانوذرات  $\Gamma FE_2O_3$  آمین دار شده و متصل به آنزیم لیپاز با تکنیک اتصال کووالان
- ۹۸ شکل ۳۷) پتانسیل زتای نانوذرات  $FE_3O_4$  بدون مدیفیکاسیون و متصل به آنزیم لیپاز با تکنیک جذب
- ۱۰۰ شکل ۳۸) پتانسیل زتای نانوذرات  $\Gamma FE_2O_3$  بدون مدیفیکاسیون متصل به آنزیم لیپاز با تکنیک جذب
- ۱۰۱ شکل ۳۹) رآکتور بچ آزمایشگاهی برای تولید شیمیایی و آنزیمی بیودیزل
- ۱۰۲ شکل ۴۰) مرحله جداسازی بیودیزل و گلیسرین (محلول تیره رنگ زیرین)
- ۱۰۳ شکل ۴۱) مرحله شستشوی بیودیزل تولیدی
- ۱۰۴ شکل ۴۲) بیودیزل های تولید شده از چهار منبع روغنی به روش شیمیایی
- ۱۰۵ شکل ۴۳) نتیجه GC برای بیودیزل حاصل از چربی حیوانی
- ۱۰۵ شکل ۴۴) نتیجه GC برای بیودیزل حاصل از روغن پالم



۱۰۶

شکل ۴۵) نتیجه GC برای بیودیزل حاصل از روغن کلزا

۱۰۶

شکل ۴۶) نتیجه GC برای بیودیزل حاصل از روغن پسماند

Archive of SID

Archive of SID



۱- فصل اول: کلیات

Archive of SID

نفت خام نقش حیاتی در توسعه ی صنعت، حمل و نقل، بخش کشاورزی و برآوردن نیازهای اساسی بشریت دارد اما تقاضای انرژی در دنیا به سبب استفاده ی افراطی از سوخت، به سرعت رو به افزایش است و ذخایر انرژی محدود است. همچنین استفاده از سوخته های فسیلی، موجب افزایش انتشار گازهای گلخانه ای مانند دی اکسید کربن، اکسید نیتروژن، اکسید گوگرد و چندین گاز نامطبوع دیگر شده و در پی آن افزایش گرمایش جهانی<sup>۱</sup> را بدنبال دارد.

بدلیل افزایش گرمایش جهانی و کاهش ذخایر سوخت های فسیلی، در سالهای اخیر، سرمایه گذاری های بسیار زیادی جهت تولید سوخت های زیستی جایگزین، برای سوخت های فسیلی در حال انجام است. زیست توده<sup>۲</sup>، که انواع مختلفی از سوخت های زیستی<sup>۳</sup> از آن قابل استحصال است، نقش بسیار مهمی در میان دیگر منابع انرژی مانند انرژی بادی، انرژی خورشیدی، انرژی زمین گرمایی و غیره دارد.

مسئله مهم موجود در مسیر تولید سوخت های زیستی، تولید محصول هدف با صرف هزینه اقتصادی کمتر و نیز سرعت و کیفیت بالاتر است. لذا محققان در جهت کشف و استفاده از راه های نوین علمی به منظور حل این مسئله گام های بسیاری برداشته اند.

در این پروژه، یکی از جدید ترین روش های تولید بیودیزل (یکی از انواع سوخت زیستی) از طریق کاربرد نانوکاتالیست های زیستی<sup>۴</sup> ارائه خواهد شد. امروزه، استفاده از کاتالیست های زیستی یعنی آنزیم ها بجای کاتالیزورهای شیمیایی، به صورت روزافزون رو به گسترش است. همچنین کاربرد بسترهای مناسب جهت تثبیت آنزیم ها به منظور بهبود عملکرد آنزیم و نیز افزایش طول عمر آنزیم بیش از پیش مورد توجه محققان

---

<sup>1</sup> Global Warming

<sup>2</sup> Biomass

<sup>3</sup> Biofuels

<sup>4</sup> Nanobiocatalyst

قرار گرفته است. در این طرح آنزیم لیپاز در حضور نانوذرات مغناطیسی، به عنوان یک نانوبیوکاتالیست جهت تبدیل روغن به بیودیزل، مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

## ۱-۲ بیان مسأله

تولید و استفاده از سوخت پاک با آلاینده‌گی کمتر علاوه بر فواید اقتصادی کمک شایانی به کاهش آلودگی هوای ناشی از گازهای گلخانه‌ای می‌نماید. اما روش‌های شیمیایی رایج جهت تولید سوخت زیستی بخصوص بیودیزل اغلب زمان‌بر و از نظر کیفیت و هزینه اقتصادی به صرف نبوده و معمولاً خود موجب ایجاد آلودگی در محیط زیست می‌شوند. لذا با تکیه بر روش‌های دوستدار طبیعت محققان شروع به ارائه روش‌های جدید به منظور تولید بیودیزل با استفاده از آنزیم‌ها نموده‌اند که علاوه بر زیست تجزیه پذیر بودن دارای توانایی تولید محصول با کیفیت مطلوب و بدون نیاز به انجام تغییرات و آماده‌سازی‌های خاص بر روی ماده اولیه تولید عمل می‌کنند. اما مشکل اصلی در استفاده از آنزیم‌ها گران بودن آنهاست.

مسئله اصلی در این طرح تولید آنزیمی بیودیزل با صرف هزینه اقتصادی کمتر و نیز سرعت و کیفیت بالاتر است. و محققین بدنبال این موضوع بوده‌اند که آیا با استفاده از روش‌های نوین فناوری نانویی و زیستی و بکارگیری آنها می‌توان نانوبیوکاتالیست موثری جهت استفاده مقرون به صرفه در تولید با کیفیت مطلوب در مقایسه با روش تولید آنزیمی صرف و نیز تولید شیمیایی بیودیزل بدست آورد؟

همچنین با توجه به بررسی منابع مختلف روغنی که می‌تواند به عنوان ماده اولیه تولید سوخت بکار گرفته شود می‌توان منبع مناسبی که از نظر هزینه و کیفیت جهت تولید به روش تولید آنزیمی به صرفه باشد ارائه

داد؟



### ۱-۳ اهمیت و ضرورت پژوهش

بدلیل محدود بودن منابع سوخت فسیلی علاوه بر مشکلات زیست محیطی مشکلات اقتصادی ناشی از کمبود این منابع نیز روز به روز بیشتر احساس می شود. حتی با وجود اینکه کشور ما از بزرگترین تولید کنندگان نفت جهان است، استفاده بی رویه از ذخایر نفتی ممکن است منجر به بروز مشکلات اقتصادی جدی برای خود و آیندگان شود. تولید صنعتی این محصول می تواند علاوه بر کاربرد داخلی، به کشورهای دیگر نیز صادر شود و سبب سودآوری ارزی برای کشور عزیزمان گردد.

آلودگی هوا مشکلی است که این روزها گریبان گیر اکثر کلان شهرهای کشور شده و برنامه ریزی و اقدام سریع برای کاهش میزان آن بیش از پیش ضروری بنظر می رسد. جایگزینی بیودیزل بجای پترودیزل، ۹۵٪ مصرف پترودیزل را کاهش می دهد و جایگزینی ۲۰ درصد از دیزل با بیودزل (B20) این مقدار را ۱۹٪ کاهش می دهد.

یک مزیت مطلوب بیودیزل آن این است که طبیعت دوست و زیست تجزیه پذیر می باشد. تولید بیودیزل و استفاده از آن آغاز یک تحول محلی و جهانی است. تجزیه سریع آن و سیکل بسته CO<sub>2</sub> که در آن اتفاق می افتد یک ارزش اقتصادی عظیمی دارد.

لذا بنظر می رسد به عنوان راهی برای کاهش آلودگی هوا و نیز جلوگیری از کاهش ذخیره سوخت فسیلی کشور و نیز برای دور نماندن از بازار رقابت اقتصادی با کشورهای تولید و عرضه کننده سوخت های زیستی، سرمایه گذاری در این عرصه ضروری می نماید. همچنین به جهت حفظ ذخایر مالی و جلوگیری از هدر رفت سرمایه های اقتصادی در ایران شرکت بهینه سازی مصرف سوخت در اولویت های پژوهشی خود تولید مقرون به صرفه سوخت زیستی را گنجانده است. همچنین وجود مقادیر زیادی از پسماندهای آلوده به مواد روغنی در کارخانجات صنایع غذایی و حتی دور ریز آشپزی و جود مقادیر زیادی از پسماندهای سلولزی حاصل از کارخانجات قند و برنج و امکان استفاده کم هزینه از آنها در تولید سوخت پاک نیاز به انجام چنین پژوهش ها

را بیشتر روشن می کند. تا ضمن رهایی از آلودگی محیط زیست بواسطه این حذف پسماندها به منبعی ارزان جهت تولید مواد با ارزش افزوده دسترسی پیدا کنیم.

معایب روش شیمیایی تولید بیودیزل این است که بسیار کند بوده و دارای مراحل زیادی در پروسه تولید می باشد. همچنین نیاز به مصرف مقادیر زیادی آب برای تولید محصول خالص است. مراحل تولید بیودیزل با استفاده از آنزیم موجب کاهش مراحل مورد نیاز در راکتور خواهد شد. علاوه بر این آنزیم ها در مقایسه با کاتالیست های اسیدی و آلکالاینی رایج بسیار تطبیق پذیرتر هستند. نسبت به تنوع در کیفیت مواد خام منعطف ترند و قادر به تولید بیودیزل در مراحل کمتر با استفاده از انرژی کمتر هستند و میزان پسماند کمتری نیز تولید می کنند.

اخیرا استفاده از نانوذرات مغناطیسی با توجه به خواص مغناطیسی خاص خود که در حضور و یا عدم حضور میدان مغناطیسی دارای عملکرد ویژه هستند در تحقیقات علمی جهت کاربردهای صنعتی بسیار مورد توجه واقع شده اند. استفاده از بستر مغناطیسی برای تثبیت کاتالیزور یک میدان مغناطیسی در مرحله استخراج محصول موجب کاهش هزینه تولید گردیده ضمن کاهش مرحله شستشوی کاتالیزور، امکان استفاده مجدد از آنزیم فراهم می شود. زیرا با استفاده از آهن ربا به روش فیزیکی قابل جمع آوری از مخلوط واکنش می باشند (شکل ۱).



شکل ۱) استفاده از آهن ربا برای جدا سازی ترکیبات متصل به نانوذرات مغناطیسی

#### ۴-۱ هدف‌ها و سؤال‌های پژوهش

هدف از انجام این طرح دست یابی به دانش فنی ساخت نانوبیوکاتالیست حاصل از تثبیت آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات مغناطیسی، به منظور تولید بیودیزل از منابع مختلف روغنی می باشد. اهداف اصلی طرح عبارتند از:

- مطالعه و بررسی انواع منابع مورد استفاده در تولید بیودیزل و انتخاب چهار منبع روغنی
- مطالعه و بررسی کاربرد آنزیم لیپاز در تولید بیودیزل و نحوه عملکرد آنزیم لیپاز و انواع روش های تثبیت آنزیم لیپاز
- تولید نانوبیوکاتالیست
- تولید بیودیزل با استفاده از نانوبیوکاتالیست

به منظور دستیابی به اهداف مطرح شده لازم است به سوالات زیر پاسخ داده شود:

آیا منابع مختلف روغنی تفاوتی در هزینه و روند تولید ایجاد می کنند؟

آیا امکان استفاده از نانوذرات مغناطیسی به عنوان بستر برای تثبیت آنزیم مقدور است؟

آیا آنزیم تثبیت شده در تولید بیودیزل نسبت به آنزیم آزاد مزیت و برتری دارد؟

آیا بیودیزل تولید شده به روش آنزیم از کیفیت مطلوبی برخوردار است؟



۲- فصل دوم: منابع مطالعاتی موضوع و مبانی نظری پژوهش

Archive of SID

## ۱-۲ پیشینه پژوهش

سوخت های زیستی مواد زیست توده ای هستند که مستقیماً به عنوان سوخت جامد به کار می روند یا به سوخت مایع یا گازی تبدیل می شوند که می توانند ذخیره شوند. این انرژی مهار شده می تواند از طریق احتراق در زمان نیاز رها شود.

### ۱-۱-۲ انواع سوخت های زیستی

#### ۱-۱-۱-۲ بیودیزل<sup>۵</sup>

نام بیودیزل اولین بار در آمریکا در سال ۱۹۹۲ بوسیله موسسه ملی توسعه دیزل سوياً<sup>۶</sup> تعیین شد. این مؤسسه پیشگام در تجاری کردن بیودیزل در آمریکا می باشد. از نظر شیمیایی، بیودیزل منو الکیل استری با زنجیره اسید چرب طویل است که از منابع تجدیدپذیر لیپید به وجود می آید. این سوخت می تواند در موتورهای دیزل (اشتعال تراکمی) با اندکی تغییر و یا بدون تغییر و اصلاح در موتور، مورد استفاده قرار گیرد. بیودیزل متیل یا اتیل استر روغنهای گیاهی و حیوانی است. متیل یا اتیل استرها می توانند از روغنهای گیاهان و درختان، چربی حیوانات و یا از روغنها و چربی های پسماند تولید گردند. این روغنها با یک الکل (معمولاً متانول یا اتانول) مخلوط می گردند و یک کاتالیزور مانند هیدروکسید سدیم همراه با آن مورد استفاده قرار می گیرد. نتیجه چنین واکنشی (در دما و فشار تعیین شده) تولید استر و گلیسرین است. گلیسرین محصول جانبی با ارزشی است و در صنایع صابون سازی، تولید مواد غذایی و آرایشی استفاده می گردد [۱]. آزمایشها نشان داده اند که راندمان در هنگام استفاده از بیودیزل در خودروها بسیار شبیه به سوخت دیزل است. در اروپا بیودیزل از روغنهای محصولات کشاورزی تولید و به صورت گسترده ای در انواع خودروهای دیزل استفاده می گردد.

<sup>5</sup> Biodiesel

<sup>6</sup> National SoyDiesel Development Board

بیودیزل یکی از مهمترین سوخت های زیستی است و یک منبع پاک انرژی به عنوان یک جایگزین برای سوخت های دیزل بر پایه نفت می باشد. این سوخت مزایا و معایبی دارد. قابلیت حمل و نقل<sup>۷</sup>، بازده احتراقی بالا<sup>۸</sup>، سولفور و محتوای آروماتیک پایین، عدد ستان<sup>۹</sup> بالا و زیست تجزیه پذیر بودن<sup>۱۰</sup> از مزایای بیودیزل است [۲]. معایب بیودیزل شامل گرانروی بالا، محتوای انرژی پایین تر، نقطه ابری شدن<sup>۱۱</sup> و نقطه ریزش<sup>۱۲</sup> بالا، نشر اکسید نیتروژن بالا، سرعت موتور پایین تر، قیمت بالا و فرسایش موتور می باشد [۳].

نقطه اشتعال<sup>۱۳</sup> بیودیزل بالاتر از سوخت دیزل است. این ویژگی برای انبار کردن و نیز حمل و نقل ایمن سوخت اهمیت دارد. عدد ستان بیودیزل (۵۰~) بالاتر از دیزل است [۴]. بیودیزل دارای محتوای آروماتیک و سولفور نمی باشد و نسبت اکسیژن آن ۱۰-۱۱ درصد جرم می باشد [۵]. عدد ستان، عامل مهمی در تعیین کیفیت سوخت دیزل، بخصوص کیفیت احتراق سوخت دیزل است. به بیان دیگر، این عدد تعیین کننده تمایل احتراق سوخت در هنگام تزریق به موتور است. کیفیت احتراق بیودیزل بوسیله ساختار متیل استر تعیین می شود [۶]. گرانروی نیز یک عامل مهم برای بیودیزل است. گرانروی اغلب نحوه تزریق سوخت را تحت تاثیر قرار می دهد. گرانروی بالا تاثیر منفی بر روی پاشش ریزه سازی<sup>۱۴</sup> ها دارد [۷]. بدلیل داشتن اکسیژن، که حضور یک عامل الکترونگاتیو در آن است، بیودیزل ساختار قطبی تری نسبت به دیزل دارد و به همین دلیل بیودیزل در مقایسه با دیزل، گرانروی بالاتری دارد. بعلاوه محتوای اکسیژن عاملی مسئول ارزش حرارتی پایین تر<sup>۱۵</sup> بیودیزل در مقایسه با دیزل است [۸-۱۰].

<sup>7</sup> Transportability

<sup>8</sup> Combustion efficiency

<sup>9</sup> Cetane Number

<sup>10</sup> Biodegradability

<sup>11</sup> Cloud Point

<sup>12</sup> Pour Point

<sup>13</sup> Flash Point

<sup>14</sup> Spray Atomization

<sup>15</sup> Lower Heating Value

بیودیزل می تواند به صورت خالص و یا به صورت ترکیب با سوخت دیزل در نسبت های معین، به عنوان سوخت و یا روان کننده، مورد استفاده قرار گیرد. رایج ترین ترکیب بیودیزل B2 (۲ درصد بیودیزل، ۹۸ درصد دیزل)، B5 (۵ درصد بیودیزل، ۹۵ درصد دیزل) و B20 (۲۰ درصد بیودیزل و ۸۰ درصد دیزل) است.

## ۲-۱-۱-۲ بیواتانول

بیواتانول<sup>۱۶</sup>، برخلاف بیودیزل، یک سوخت زیستی تک ترکیبی است که ترکیب نهایی آن بر حسب نوع ماده خام، متفاوت نیست. مواد خام محصولات قندی و نشاسته ای هستند، که اساساً از طریق پیش-تیمار، تخمیر توسط مخمرها و سایر میکروپها و تقطیر، مانند هم فرآوری شده و تبدیل به اتانول به عنوان محصول اصلی واکنش می شوند. محصولات قندی اصلی؛ نیشکر و چغندر قند هستند. سورگوم شیرین نیز می تواند به عنوان یک محصول چند کاربردی، که دانه های آن خوراکی هستند و ساقه حاوی قند است، ماده خام مناسبی برای تولید اتانول باشد. محصولات نشاسته ای اصلی؛ ذرت و گندم، سیب زمینی، کاساوا و سورگوم هستند.

در مقایسه با محصولات نشاسته ای، محصولات قندی معمولاً در هر هکتار اتانول بیشتری تولید می کنند. بدلیل اینکه (۱) در مقایسه با محصولات نشاسته ای محصولات قندی مقدار قند بالاتری را در هر هکتار تولید می کنند و (۲) قند می تواند مستقیماً تخمیر شود، درحالیکه پلیمرهای بلند نشاسته باید قبل از اینکه توسط مخمر برای تخمیر اتیلیک تغذیه شوند، هیدرولیز گردند.

اتانول تخمیر شده باید تقطیر شود تا حدی که آب از آن حذف شود تا اتانول بدون آب نهایی مناسب برای مخلوط کردن با بنزین، حاصل شود (کمتر از ۱٪ آب در اقلیم های معتدل). از آنجا که هر دو سوخت بیودیزل و بیواتانول حاوی اکسیژن هستند، در مقایسه با سوخت های فسیلی جایگزین شده قابلیت احتراق بهتری دارند و انتشار آلاینده هایی نظیر منواکسید کربن، هیدروکربن ها و اکسید گوگرد و ذرات را بسته به سوخت زیستی و نوع مخلوط تا نصف، کاهش می دهند [۱۱].

<sup>16</sup> Bioethanol

## ۲-۱-۱-۳ بیوگاز

بیوگاز<sup>۱۷</sup> از طریق متانیزاسیون، یعنی تجزیه بی هوازی مواد زیست تخریب پذیر، نظیر پسماندهای جامد شهری و کشاورزی، دوغاب مایع و کود جامد، بوسیله باکتری ها تولید می شود. هرچه محتوای ماده خشک و اسیدهای چرب سوبسترا بیشتر باشد، بیوگاز بیشتری تولید می شود. غیر از تقریباً ۵۵ تا ۷۰٪ متان به عنوان سوخت واقعی، بیوگاز حاوی مقادیر قابل توجهی دی اکسید کربن (۳۰-۴۵٪)، مقادیر کمی سولفید هیدروژن و سایر گازها نظیر آمونیاک است.

بیوگاز کمتر به عنوان سوخت زیستی مورد استفاده در حمل و نقل در نظر گرفته شده است، چون ناوگان خودروی هدف آن به علت محدودیت ذخیره گاز در خودرو، حاشیه ای است. توجه اولیه به بیوگاز باعث توسعه محلی آن به عنوان سوخت برای تولید گرما و برق در نواحی روستایی شده است.

بیوگاز امکان استفاده از مواد خام ارزان و کاهش انتشار گاز گلخانه ای را دارد. علاوه بر آن، بقایای جامد فرآیند می تواند خشک شود و به عنوان کود بکار رود، که محتوای مواد غذایی بالایی دارد و میکروب های بیماریزای آن طی فرآیند تجزیه بخصوص به علت دمای ۳۵ تا بیش از ۵۰ درجه سانتی گراد کشته شده اند. بیوگاز، به عنوان یک سوخت مورد استفاده در حمل و نقل، می تواند توجه بیشتری را در دهه های در پیش رو جلب کند. از میان انواع سوخت های زیستی ذکر شده در بالا، به شرح گسترده تر بیودیزل و نیز بیان روش های تولید آن پرداخته و در ادامه اهمیت استفاده از روش آنزیمی جهت تولید این سوخت مورد بررسی قرار خواهد گرفت [۱۱].

<sup>17</sup> Biogas



## ۲-۲ پیشینه داخلی

در ایران تاکنون چندین طرح تحقیقاتی، مقاله، تالیف و ترجمه کتاب و چند گزارش دولتی و یک ثبت اختراع انجام شده است. این فعالیت ها در زمینه تولید بیودیزل از منابع مختلف روغنی، بررسی چگونگی اشتعال بیودیزل، بررسی چگونگی عملکرد و طراحی موتورهای مصرف کننده بیودیزل، طراحی بررسی و بهینه سازی سیستم ها و فرآیند فرآوری بیودیزل، مقایسه با دیزل و ... انجام شده است. همچنین در دو سال گذشته دو کارخانه کوچک جهت تولید بیودیزل در مشهد و اصفهان افتتاح شده اند که بدلائل پاره ای مشکلات از تولید محصول باز مانده اند. اولین شرکت فعال شده در این عرصه شرکت بیودیزل در کیش است که اکنون اقدامات لازم برای تبدیل دانه های روغنی به سوخت سبز و ساخت راکتورهای لازم را آغاز کرده است.

پژوهشگاه صنعت نفت یکی از مراکز فعال در زمینه بیودیزل در ایران است، پایلوت کاشت گیاه "جاتروفا" در بندرعباس و تولید بیودیزل با استفاده از جلبک از سوی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران در کشور در حال انجام است.

دانشکده مکانیک دانشگاه تربیت مدرس، از جمله مراکز فعال در زمینه تولید سوخت های زیستی و نیز طراحی موتور های مخصوص استفاده از این سوخت هاست. در این دانشکده آزمایشگاه انرژی های تجدیدپذیر خدمات مربوط به تعیین کیفیت سوخت ارائه می دهد.

ستاد زیست فناوری معاونت ریاست جمهوری، در سال ۱۳۹۴ کارگروه سوخت های زیستی را به ریاست آقای دکتر طباطبائی جهت انجام تحقیقات و پذیرش طرح تشکیل داده است. در این کارگروه همچنین برای اولین بار به تدوین استاندارد داخلی برای بیودیزل پرداخته شده است.

یک بخش خصوصی در استان گلستان و سایر دانشگاه ها و مراکز علمی از مراکز فعال در این زمینه هستند.

## ۲-۳ پیشینه خارجی

تجربه در امریکا:

از کارهای بسیار مهمی که دولت آمریکا در مورد صنعت سوخت های زیستی انجام داد وضع قوانینی در حمایت از این صنعت بود. در این راستا دولت آمریکا قوانینی را وضع کرده است که به مزارع کشاورزی برای تولید زیست توده ها یارانه پرداخت شود، قانون دیگر، اعمال محدودیت برای انتشار گازهای گوگردی است که باعث افزایش استفاده از سوخت های زیستی می شود و قانون سیاست های انرژی ۱۹۹۲ که استفاده از سوخت های زیستی به عنوان جایگزین سوخت های فسیلی را در موسسات دولتی تضمین می کند. ارائه ۱۱ مورد مشوق های مالیاتی، ۵ مورد مشوق تولیدی، ۸ مورد مشوق برای توزیع کننده ها و استفاده کننده ها و چندین مورد از قوانین دیگر در ۲۱ ایالت مختلف آمریکا از جمله این حمایتها است.

تجربه در برزیل:

برنامه تولید الکل برزیل اغلب به عنوان مثالی برای توسعه انرژی های تجدید پذیر در نظر گرفته میشود. این برنامه ها در سال ۱۹۷۵ آغاز شد و دارای سه جزء اساسی بود:

۱- تولید کننده نفتی دولتی و توزیع کننده های سوخت های حمل و نقل ملزم به خرید تضمینی مقدار مشخصی از اتانول تولیدی شدند.

۲- بخش های مرتبط با کسب و کار کشاورزی، تشویق به راه اندازی زیر ساخت های تولید اتانول شدند مانند وام های کم بهره و...

۳- اتانول به قیمت ۵۹ درصد قیمت بنزین برای تشویق به مصرف، در جایگاه ها عرضه شد.

این امر شدنی بود چرا که قیمت بنزین توسط دولت تثبیت شده بود. در سال ۱۹۹۰ اتانول جایگزین ۵۰ درصد بنزین مصرفی شد. دو عنصر اساسی در این برنامه نقش آفرینی نمودند یکی ایجاد تقاضا و دوم تلاش برای ایجاد ظرفیت تولید برای پاسخ به تقاضا.

برزیل مثال خوبی برای این مورد است که چگونه سرمایه گذاری در تکنولوژی و ارائه مشوق های صحیح می تواند موجبات رشد سریع یک صنعت (تولید سوخت های زیستی) را امکان پذیر سازد.

نتیجه این که عرضه سوخت های زیستی افزایش یافت و قیمت اتانول به دلیل رسیدن به مقیاس اقتصادی کاهش یافت. همچنین قیمت پایین اتانول باعث کاهش فشار به بازار سوخت های حمل و نقل شد. از تجربه برزیل همه کشورها به خصوص کشورهای دارای شرایط بالقوه تولید شکر می توانند استفاده نمایند.

پیشینه در سایر کشورها:

- در اروپا شرکتهای نفتی ملزم شده اند از سال ۲۰۱۳ به میزان ۱۰٪ بیودیزل را جهت بهبود کیفیت سوخت های مورد مصرف کشور های اروپائی که درموردی میزان گوگرد آنها حتی به ۵۰ ppm نیز نمی رسد استفاده نمایند.
- با توجه به حمایت چند شرکت مرسدس بنز و بایر آلمان و برتیش پترولیوم انگلستان سطح زیر کشت این گیاه در برزیل به ۲۰۰۰۰۰ هکتار و در هندوستان با سرمایه گذاری یک شرکت اسپانیایی به ۶۰۰۰۰۰ هکتار رسیده است.
- شرکت کرایسلر در هند تمام زمینهای نامرغوب آن کشور را زیر کشت برده و ۲۲۰ مرکز تحقیقاتی دانشگاهی برای بهبود کشت جاتروفا در آن کشور ایجاد کرده است.
- شرکت جی ام در غنا سرمایه گذاری عظیمی در تولید جاتروفا کرده اند.
- کوبا برای نخستین بار سوخت زیستی جدیدی را آزمایش کرده که آن را از گیاه "جاتروفا" که یک گیاه گلدار غیرخوراکی است، تولید کرده است. از این سوخت زیستی برای حرکت هزار و ۵۰۰ کیلومتر یک خودرو استفاده شد. بخشی از ۴۰۰ لیتر نخست این سوخت زیستی از این گیاه تهیه شد که با نسبت طرح تولید سوخت بیودیزل، هم اکنون در کشورهای "هند، چین، مصر، تایلند، ویتنام، اندونزی، برزیل، اردن و عربستان" به صورت پایلوت در حال انجام است. ۳۰-۷۰ با دیزل مخلوط شد تا خودروی

تویوتا هیلوکس مدل ۲۰۰۷ را براند. این سوخت بیودیزلی با استفاده از روغن گیاه جاتروفا کارکاس تهیه شده که نوعی گیاه گلدار غیر خوراکی است.

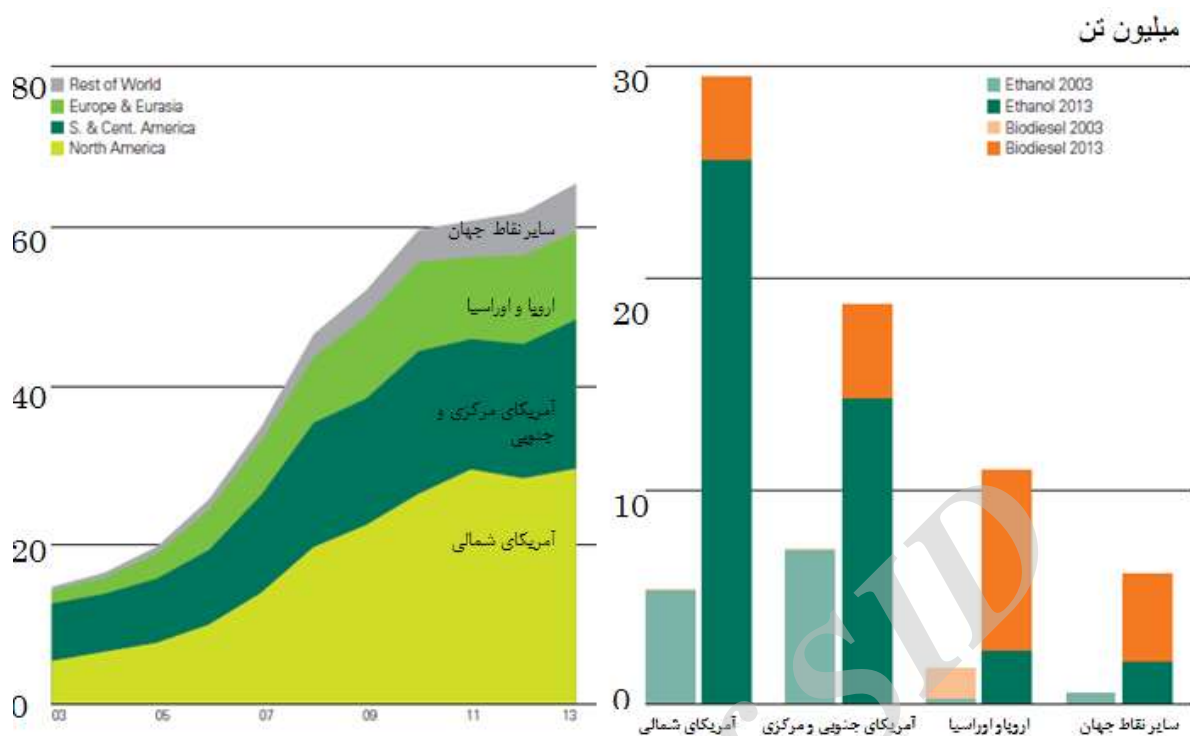
- کشور قطر هم اکنون با همکاری بخش دانشگاهی، شرکت هواپیمایی و وزارت نفت در زمینه تولید بیوفیول و عربستان سعودی با همکاری یک شرکت انگلیسی در زمینه کشت "جاتروفا" در پنج هزار هکتار برای تولید سوخت پاک اقدام کرده است.

## ۲-۴ خلاصه پیشینه تولید سوخت های زیستی

تولید و مصرف سوخت زیستی روز به روز در حال افزایش است. در زیر جدول ۱ و شکل ۲، رشد تولید سوخت زیستی در جهان بین سال های ۲۰۰۳ تا ۲۰۱۳ را ارائه می دهند.

جدول (۱) تولید سوخت زیستی در جهان از سال ۲۰۰۳ تا ۲۰۱۳ (معادل هزارتن) [۱۲]

Thousand tonnes oil equivalent	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Change 2013 over 2012	2013 share of total
US	5226	6374	7478	9746	13456	19149	21697	25568	28518	27270	28440	4.6%	43.5%
Canada	113	114	133	160	461	501	721	746	875	998	1011	1.6%	1.5%
Mexico	-	-	-	-	4	4	4	13	12	14	53	276.9%	0.1%
<b>Total North America</b>	<b>5339</b>	<b>6488</b>	<b>7612</b>	<b>9906</b>	<b>13922</b>	<b>19654</b>	<b>22422</b>	<b>26327</b>	<b>29405</b>	<b>28282</b>	<b>29505</b>	<b>4.6%</b>	<b>45.1%</b>
Argentina	9	9	9	29	272	632	1048	1656	2218	2283	1884	-17.3%	2.9%
Brazil	7068	7154	7835	8729	11323	14093	13962	15575	13197	13547	15783	16.8%	24.2%
Colombia	-	-	14	131	141	143	295	428	536	616	634	3.3%	1.0%
Other S. & Cent. America	151	148	235	515	610	787	606	314	457	458	457	*	0.7%
<b>Total S. &amp; Cent. America</b>	<b>7227</b>	<b>7311</b>	<b>8093</b>	<b>9405</b>	<b>12347</b>	<b>15655</b>	<b>15911</b>	<b>17973</b>	<b>16408</b>	<b>16904</b>	<b>18757</b>	<b>11.3%</b>	<b>28.7%</b>
Austria	26	48	70	105	220	263	354	375	370	370	378	2.5%	0.6%
Belgium	-	-	1	21	140	278	473	536	611	476	660	39.0%	1.0%
Finland	-	1	6	11	51	96	267	363	363	363	363	0.3%	0.6%
France	368	387	439	665	1121	2012	2312	2269	1859	2071	1936	-6.2%	3.0%
Germany	613	890	1525	2488	3181	2720	2728	2888	2825	2888	2615	-9.2%	4.0%
Italy	232	272	340	585	443	617	758	670	456	292	292	0.3%	0.4%
Netherlands	-	6	3	22	80	77	241	385	627	1255	1182	-5.6%	1.8%
Poland	28	6	109	144	96	278	393	421	398	631	664	5.6%	1.0%
Portugal	-	-	1	70	153	145	202	275	293	338	208	-38.3%	0.3%
Spain	173	210	282	251	352	359	958	1267	809	586	674	15.4%	1.0%
Sweden	32	43	48	81	139	171	238	214	212	244	271	11.3%	0.4%
United Kingdom	9	9	39	219	359	276	180	304	253	299	449	50.5%	0.7%
Other Europe & Eurasia	138	165	293	395	491	931	1175	1231	1241	1320	1295	-1.6%	2.0%
<b>Total Europe &amp; Eurasia</b>	<b>1619</b>	<b>2037</b>	<b>3157</b>	<b>5058</b>	<b>6826</b>	<b>8223</b>	<b>10280</b>	<b>11200</b>	<b>10318</b>	<b>11133</b>	<b>10988</b>	<b>-1.0%</b>	<b>16.8%</b>
Total Middle East	-	-	-	-	-	-	-	4	4	4	4	-	*
Total Africa	6	6	6	6	6	11	15	30	23	23	23	-	*
Australia	-	4	20	54	70	111	174	238	335	409	416	1.8%	0.6%
China	396	493	622	846	901	1096	1124	1441	1597	1729	1680	-2.6%	2.6%
India	94	99	114	134	136	155	174	155	192	227	321	42.2%	0.5%
Indonesia	-	-	9	44	216	528	464	718	1104	1388	1608	16.2%	2.5%
South Korea	2	4	9	39	74	141	343	491	308	272	302	11.4%	0.5%
Thailand	-	3	52	80	138	494	618	661	721	994	1251	26.2%	1.9%
Other Asia Pacific	-	-	10	106	196	385	422	317	267	387	492	27.6%	0.8%
<b>Total Asia Pacific</b>	<b>491</b>	<b>604</b>	<b>834</b>	<b>1304</b>	<b>1732</b>	<b>2910</b>	<b>3320</b>	<b>4021</b>	<b>4525</b>	<b>5406</b>	<b>6071</b>	<b>12.6%</b>	<b>9.3%</b>
<b>Total World</b>	<b>14682</b>	<b>16446</b>	<b>19701</b>	<b>25678</b>	<b>34832</b>	<b>46453</b>	<b>51949</b>	<b>59555</b>	<b>60684</b>	<b>61752</b>	<b>65348</b>	<b>6.1%</b>	<b>100.0%</b>
of which: OECD	6960	8522	10779	15021	20780	27899	32897	37946	40014	39737	40813	3.0%	62.5%
Non-OECD	7722	7924	8922	10657	14052	18553	19051	21609	20670	22015	24535	11.7%	37.5%
European Union	1619	2028	3133	5007	6748	8077	10096	11051	10173	10925	10747	-1.4%	16.4%
Former Soviet Union	-	11	22	28	50	130	210	182	159	184	193	5.4%	0.3%



شکل ۲) تولید جهانی سوخت های زیستی از سال ۲۰۰۳ تا ۲۰۱۳ [۱۲]

## ۲-۵ مزیت های سوخت بیودیزل

بیودیزل تجدید پذیر، دارای انرژی کارآمد است و می تواند جایگزین پترودیزل شود. بیودیزل می تواند در بیشتر وسایل و تجهیزات دیزلی با کمی تغییر یا بدون تغییر استفاده شود. این سوخت می تواند از میزان آلودگی جوی یا محیطی کاسته و از آلودگی آگروزی شامل گاز سمی CO بکاهد. بیودیزل غیر سمی و تجزیه پذیر است و مناسب محیط های حساس و یا سر بسته مانند معادن می باشد.

بیودیزل کاربردهای متفاوتی دارد، می توان ۱ تا ۲ درصد بیودیزل را به عنوان مکمل روغنکاری برای دیزل های با سولفور کم (کمتر از ۱۵ ppm) استفاده کرد. بیودیزل می تواند به نسبت ۱ به ۴ با پترودیزل مخلوط شود و برای کاربردهای مختلف در سوخت دیزل استفاده شود (B<sub>20</sub>) و یا می تواند بصورت خالص (B<sub>100</sub>) محتاطانه مورد استفاده قرار گیرد. امروزه تقریباً معمول ترین مخلوط بیودیزلی که استفاده می شود، بیودیزل B<sub>20</sub> است، زیرا از لحاظ هزینه، آلودگی و عملکرد متناسب با دیزل های مرسوم است.

تجهیزاتی که می توانند B<sub>20</sub> استفاده کنند شامل موتورهای اشتعال تراکمی، بویلرها و توربین ها می باشند. برای استفاده از مخلوط های سطح بالا مانند B<sub>50</sub> و B<sub>100</sub> باید تغییراتی در ساختار موتور و سیستم سوخت رسانی انجام گیرد، مثلا استفاده از گرم کن، تغییر در واشرهای پلاستیکی، واشر سر سیلندر و جاهایی که بصورت مستقیم با سوخت در تماس می باشند.

۱- بیودیزل تجدید پذیر است.

۲- بیودیزل میتواند جایگزین سوخت وارداتی شود.

۳- دوام پذیری مناسبی دارد.

۴- بیودیزل آلودگی را کاهش می دهد.

۵- بیودیزل سلامتی انسان را تهدید نمی کند.

۶- بیودیزل سمی نمی باشد.

۷- بیودیزل روانکاری موتور را بهبود می بخشد.

۸- توازن انرژی بالاتری نسبت به اتانول و پترودیزل دارد.

۹- بیودیزل با محیط زیست سازگار است.

۱۰- تولید و استفاده از بیودیزل دارای سود اقتصادی است.

افزایش استفاده از بیودیزل سه سود اقتصادی اصلی بدنبال خواهد داشت: اول آنکه بیودیزل، سبب افزایش تقاضای روغن و در نتیجه منجر به افزایش قیمت فرآوری آن می شود. دوم آنکه کشاورزان، پول بیشتری بابت محصول تولیدی دریافت می کنند و سوم آنکه با حضور امکاناتی که برای تولید انرژی از روغن فراهم می شود، صنایع و درآمد های پایه افزایش می یابد.

دانشگاه میسوری تخمین زده است که تولید ۱۰۰ میلیون گالن بیودیزل می تواند ۸/۳۴ میلیون دلار درآمدهای شخصی را افزایش دهد و بیش از ۶۰۰۰ شغل موقت یا دائمی در مناطق شهری بوجود آورد. یک مطالعه دیگر پیش بینی می کند یک کارخانه تولید ۱۰۰ میلیون سوخت زیستی در فاز تولید، می تواند ۲۵۰ تا ۳۵۹

میلیون دلار به یکباره رشد اقتصادی داشته باشد. در مجموع زیر بنای اقتصاد محلی می تواند با هزینه کردن ۱۴۰ میلیون دلار به رشد اقتصادی ۲۵۰ میلیون دلار برسد. بیش از ۱۰۰ فرصت شغلی جدید می تواند در یکی از کارخانه ها ایجاد شده بیش از ۱۵۰۰ شغل جانبی در ایالت بوجود آمده و درآمد خانوارهای جامعه سالانه می تواند تا ۵۰ میلیون دلار در منطقه افزایش یابد.

## ۲-۶ مشکلات استفاده از بیودیزل

مشکل عمده استفاده از بیودیزل در مقایسه با دیزل فسیلی، جریان پذیری کم آن در هوای سرد است. خصوصیت جریان پذیری در هوای سرد برای بیودیزل و پترودیزل معمولی خیلی مهم است. بر خلاف بنزین، پترودیزل و بیودیزل هر دو با سردتر شدن محیط شروع به انجماد یا تبدیل شدن به حالت ژله ای می کنند. اگر سوخت ژله ای شود، می تواند سبب انسداد فیلتر شده و سرانجام سبب از کار افتادن جریان سوخت از مخزن به موتور شود.

بیودیزل همچنین در اکثر موتورها، سبب افزایش انتشار  $\text{NO}_x$  در هوا می شود. بیودیزل محتویات نیتروژن ندارد و پدیده انتشار بیشتر  $\text{NO}_x$  بدلیل محتوای نیتروژنی سوخت نیست بلکه  $\text{NO}_x$  تولید شده در موتور بدلیل واکنش نشان دادن نیتروژن هوا در دمای بالای احتراق است. همانند پترودیزل محتویات بیودیزل می توانند در انتشار  $\text{NO}_x$  موثر باشند.

وقتی بیودیزل در موتورها اشتعال تراکمی استفاده می شود، انتشار  $\text{NO}_x$  تمایل به افزایش دارد اما وقتی بیودیزل در بویلرها و سیستم های حرارتی استفاده می شود، انتشار  $\text{NO}_x$  تمایل به کاهش دارد. دلیل این انتشار، اختلاف چشم گیر طریقه سوزاندن سوخت در این دو سیستم می باشد. در بویلرها، بیودیزل به صورت شعله آزاد سوزانده می شود ولی در موتور با فشار بالا به درون سیلندر تزریق می شود، در نتیجه اثرات متفاوتی دارد.

## ۷-۲ بیودیزل B<sub>100</sub>

نکات مربوط به ذخیره سازی، جابجا کردن، مخلوط کردن و استفاده کردن از B<sub>100</sub> خیلی متفاوت از B<sub>20</sub> و مخلوط های با درصد کمتر بیودیزل می باشد. اما می توان از اطلاعات مربوط به B<sub>100</sub> برای درک بهتر استفاده از B<sub>20</sub> استفاده کرد. B<sub>100</sub>، از لحاظ خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، شبیه به پترو دیزل می باشد و در برخی موارد می تواند در موتورهای دیزل موجود با کمی تغییر یا بدون تغییر در ساختار موتور یا سیستم سوخت رسانی استفاده شود.

هنگامی که B<sub>100</sub> به عنوان یک سوخت خالص در کاربرد های دیزل استفاده می شود، تفاوت های مهمی بین آن و سوخته های دیزل معمولی وجود دارد که باید در هنگام جابجایی و استفاده از B<sub>100</sub> مورد توجه قرار گیرد. استفاده از B<sub>20</sub> این مشکلات را کم می کند.

نکات مورد توجه در رابطه با B<sub>100</sub>

B<sub>100</sub> حلال خوبی است و می تواند رسوبهای موجود در مخزن سوخت و سیستم سوخت رسانی را در خود حل کند. B<sub>100</sub> در دمای بالاتری نسبت به سوخته های دیزل معمولی یخ می زند که این مسئله باید در جابجایی و استفاده مورد توجه قرار گیرد. B<sub>100</sub> در دمای بین ۳۵ تا ۶۰ درجه فارنهایت، شروع به ابری شدن می کند. به این دلیل به مسیرهای جریان کمتر یا به آب و هوای معتدل تر نیاز دارد. همزمان با ژله ای شدن B<sub>100</sub> ویسکوزیته شروع به افزایش می کند و تا جایی افزایش پیدا می کند که میزان ویسکوزیته خیلی بیشتر از سوخت دیزل معمولی می شود. این امر سبب افزایش تنش در پمپ سوخت و سیستم تزریق سوخت می شود. به دلیل رفتار نامناسب B<sub>100</sub> در هوای سرد مردم بیشتر تمایل به استفاده از مخلوط بیودیزل دارند.

B<sub>100</sub> با بعضی از واشرها و شیلنگ ها سازگاری ندارد. B<sub>100</sub> ممکن است سبب نرمتر شدن و یا تجزیه شدن انواع مشخصی از ترکیبات لاستیکی استفاده شده در واشرها و شیلنگ ها شود (مانند نیتریل و لاستیک های طبیعی). هنگام استفاده از B<sub>100</sub> باید دقت شود، تمام قسمت هایی که در تماس مستقیم با B<sub>100</sub> هستند با این



سوخت سازگار باشند. بعضی از سیستم ها مواد مقاوم در برابر بیودیزل (مانند وایتون) دارند ولی در بیشتر موارد، سیستم ها به دلیل گرانی این مواد، به مواد مقاوم تجهیز نمی شوند. B<sub>100</sub> با بعضی از فلزات و پلاستیک ها سازگاری ندارد. بیودیزل سبب تشکیل لایه های رسوب می شود. اگر زمان زیادی با مس یا آلیاژهای مس (مانند برنج و برنز یا سرب، قلع، روی) در تماس باشد، سبب ایجاد خوردگی در این فلزات می شود. لایه های رسوب، سبب انسداد فیلتر می شوند. پیشنهاد می شود که در سیستم های دیزل از این فلزات استفاده نشود [۱۵].

## ۲-۸ مقایسه بیودیزل و پترودیزل

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی زیادی برای بیودیزل وجود دارد که مقدار زیادی آن را متفاوت از پترودیزل می کند. این خصوصیات مزایایی دارند. بیودیزل به صورت معنی داری گوگرد کمتری نسبت به پترودیزل دارد، همچنین خاصیت روانکاری بالاتری دارد. B<sub>100</sub> های جدیدی که تحت قانون ای پی ای<sup>۱۸</sup> هستند، برای استفاده در سیستم حمل و نقل جاده ای نباید بیشتر از ۱۵ ppm گوگرد داشته باشند. سوخت های دیزل با گوگرد کمتر از ۱۵ ppm، مشکل روانکاری سوخت های دیزل معمولی را ندارند. بیودیزل همچنین ۱۱ درصد وزنی اکسیژن دارد که با مقداری جزیی عدد ستان بالاتر، سبب احتراق کامل شده و آلودگی را کاهش می دهد.

<sup>18</sup> EPA

جدول ۲) مقایسه درصد غلظت آلاینده های محیط ناشی از سوخت های B100 و B20 در مقایسه با سوخت دیزل [۱۳]

B20	B100	نام آلاینده
-%۲۰	-%۶۷	هیدرو کربن های نسوخته
-%۱۲	-%۴۸	منو اکسید کربن
-%۱۲	-%۴۷	ذرات ریز معلق
%۲	%۱۰	NO <sub>x</sub>
-%۲۰	-%۱۰۰	سولفات ها
-%۱۳	-%۸۰	هیدرو کربن های آروماتیکی چند حلقه ای PAH
۰	-%۹۰	nPAH <sup>۱۹</sup>
-%۱۰	-%۵۰	Ozone potential of speciated HC

۱۹

سوخت دیزل برش هایی از نفت خام به رنگ قهوه ای است که شامل اجزای تقطیر شده یا باقی مانده با چگالی نسبی ۰/۸۷ است. سوخت های دیزل براساس نوع استفاده آن ها و نیز براساس یک درجه بندی عددی طبقه بندی می شوند. انجمن آزمون و مواد امریکا<sup>۱۹</sup> این طبقه بندی را به صورت عددی برای سوخت های دیزل از شماره ۱ تا ۶ انجام داده است. سوخت دیزل شماره ۱ برای استفاده در هوای سرد تعریف شده و سوخت نوع دوم که دارای فراریت کم تری است، به عنوان متداول ترین نوع سوخت در خودروها معرفی شده است. در جدول ۳ مشخصات ترمودینامیکی سوخت دیزل نوع دوم و همچنین سوخت بیودیزل با پایه روغن دانه سویا که به عنوان مبنای محاسبات در موتور دیزل مورد استفاده قرار گرفته، ارایه شده است.

<sup>19</sup> Nitrated PAH

<sup>20</sup> ASTM (American Society for Testing & Materials)

جدول ۳) مشخصات سوخت دیزل نوع دوم و بیودیزل بر اساس استاندارد ASTM [۱۳]

مشخصات	واحد	B100	D2
فرمول شیمیایی	-	$C_{18}H_{34}O_2$	$C_{12}H_{26}$
جرم ملکولی	gr	۲۹۶	۱۷۰
اندیس ستان	-	۴۹	۴۵
نقطه اشتعال	$^{\circ}C$	حداقل ۱۳۰	۳۸
آب و رسوبات موجود	% حجمی	حداکثر ۰/۰۵	۰/۰۵
گرانروی جنبشی	$mm^2/s$	۱/۹-۶	۱/۸-۵/۵
خاکستر گوگردی	% mass	حداکثر ۰/۰۲	۰/۵
خوردگی مس	-	حداکثر درجه ۳	حداکثر درجه ۳
ستان	-	حداقل ۴۷	۵۰
نقطه کدر شدن	$^{\circ}C$	-۴-۰	-۶
نقطه ریزش	$^{\circ}C$	۰	-۲۷
نقطه ابری	$^{\circ}C$	۲	-۲۳
کربن باقی مانده	% mass	حداکثر ۰/۰۵	۰/۳۵
چگالی در $15^{\circ}C$	$kg/m^3$	۰/۸۵	۰/۸۷-۰/۸۹

## ۹-۲ تحلیل پیشینه پژوهش

بیودیزل، روغن خام سبزیجات نیست بلکه با فرآیند شیمیایی استریفیکاسیون که گلیسرین را از روغن حذف می نماید، تهیه می گردد. در نتیجه واکنش های شیمیایی ما بین روغن های گیاهی و الکی در حضور کاتالیزور، بیودیزل تولید می شود. در عین حال گلیسرین نیز که در داروسازی و تولید لوازم آرایشی مورد استفاده قرار می گیرد به عنوان یک محصول فرعی این فرآیند، تولید می شود.

## ۲-۹-۱ روش شیمیایی تولید بیودیزل

روش تولید بیودیزل استری شده یا آلکیل استر کاملاً شناخته شده می باشد. سه راه اساسی برای تولید بیودیزل از روغن ها و چربی ها وجود دارد :

۱. ترانس استریفیکاسیون روغن توسط الکل با استفاده از کاتالیزور

۲. استریفیکاسیون مستقیم با کاتالیزور اسیدی روغن توسط متانول

۳. تبدیل روغن به اسیدهای چرب و سپس تبدیل به آلکیل استرها با کاتالیزور اسیدی

در بیشتر موارد بیودیزل تبدیل شده به روش واکنش های بر مبنای کاتالیزور تهیه می شود، بدلیل اینکه این روش به چندین جهت اقتصادی تر می باشد:

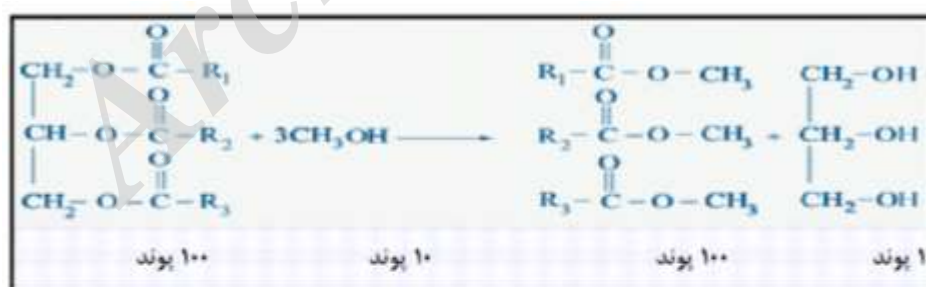
۱. انجام فرآیند در دما و فشار پایین.

۲. تبدیل بالا ( ۹۸٪ ) با کمترین مقدار واکنش های جانبی و زمان واکنش.

۳. تبدیل مستقیم به بیودیزل (متیل استر) بدون مراحل میانی.

۴. عدم نیاز به مواد سمی برای تولید بیودیزل.

معمولترین واکنش تولید بیودیزل، یعنی واکنش شیمیایی ترانس استریفیکاسیون در ادامه آورده شده است.



شکل ۳) واکنش تولید بیودیزل به روش ترانس استریفیکاسیون [۱۴]

همانطور که مشاهده می شود طی این واکنش مقدار ۱۰۰ پوند چربی یا روغن گیاهی با ۱۰ پوند از یک الکل با زنجیره کوتاه که توسط ROH مشخص می شود (معمولا متانول و برخی اوقات اتانول)، در حضور کاتالیزور (معمولا هیدروکسید سدیم یا پتاسیم) واکنش داده و ۱۰ پوند گلیسرین و ۱۰۰ پوند بیودیزل به عنوان محصول واکنش تولید گردیده است. R1، R2 و R3 نشان دهنده زنجیره های اسیدهای چرب می باشند که متصل به اسید پالمیتیک، استئاریک، اولئیک و لینولئیک ترکیبات روغن و چربی ها می باشند.

### مخزن انجام واکنش

مخلوط الکل/کاتالیزور و روغن یا چربی در یک مخزن واکنش در بسته، وارد می شوند و واکنش ترانس استریفیکاسیون در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد انجام می شود.

باید در مقدار آب و اسیدهای چرب آزادی که همراه روغن یا چربیهای ورودی وارد می شوند دقت شود. اگر سطح اسید چرب آزاد یا سطح آب خیلی زیاد باشد ممکن است با تشکیل صابون، مشکلاتی را برای جداسازی گلیسرین ایجاد کند. برای ساختن اتیل/متیل استر، اتانول/متانول باید تا حد ۹۹٪ خالص باشد و محتوای آب آن کمتر از ۱٪ باشد.

### جداسازی

هنگامی که واکنش کامل شود، دو محصول عمده وجود دارد: گلیسرین و بیودیزل. هر کدام نیز مقدار قابل توجهی الکل اضافه که در واکنش استفاده می شود، دارند. مخلوط واکنش یافته بعضی مواقع اگر لازم باشد باید بوسیله کاتالیزور اسیدی یا بازی خنثی شود. فاز گلیسرین بسیار چگالتر از فاز بیودیزل می باشد و بوسیله یک دکانتر، گلیسرین به طریق گرانشی از ته ظرف جدا می شود.

### حذف الکل

هنگامی که فازهای گلیسرین و بیودیزل از هم جدا شوند، الکل اضافه در هر کدام نیز باید حذف شود که این کار توسط یک فرآیند تبخیر ناگهانی یا توسط تقطیر انجام می شود. در سیستم های دیگر قبل از آنکه گلیسرین و استرها از یکدیگر جدا شوند، الکل جداسازی شده و مخلوط خنثی می شود. در هر مورد، الکل با

استفاده از تجهیزات تقطیر بازیافت می شود و دوباره استفاده می شود. باید مواظب بود که در الکل بازیافتی آب جمع نشود.

### شستشوی بیودیزل

بیودیزلی که توسط فرآیند ذکر شده تولید می شود، در برخی از تجهیزات گرمازا یا وسایل روشنایی و احتمالاً بجای سوخت در موتور دیزل استفاده می شود. بیشتر ناخالصی ها شامل ذرات فیلتر نشده، متانول و گلیسرین بر روی لایه گلیسرول قرار می گیرد. از آنجا که فرآیند شستشوی بیودیزل وقت گیر است، در برخی منابع از بیودیزل شسته نشده در موتور استفاده شده است. در این صورت، آب موجود در بیودیزل می تواند رشد میکروارگانیزم ها را افزایش دهد و باعث فاسد شدن سوخت گردد. همچنین متانول واکنش نداده موجود در سوخت بیودیزل شسته نشده، می تواند باعث احتراق زودرس شده و اجزای موتور را فرسوده کند. کاتالیزور هیدروکسید سدیم باقی مانده در سوخت نیز، سبب فرسایش اجزای موتور می شود. تا موقعی که هیدروکسید سدیم و متانول در بیودیزل شسته نشده وجود دارند، باعث تخریب اجزای موتور می گردند و سبب تشکیل دوده و رسوب می گردند. یکی دیگر از دلایل شستشوی بیودیزل، احیای متانول می باشد زیرا این ماده گران قیمت است و احیای آن باعث صرفه جویی در هزینه ها می شود.

سه روش برای شستن بیودیزل وجود دارد:

۱- شستن به روش مخلوط کردن<sup>۲۱</sup>

۲- شستشو به روش مه پاشی<sup>۲۲</sup>

۳- شستشو به روش حباب سازی<sup>۲۳</sup>

فرآیند شستشوی بیودیزل شامل مخلوط کردن آن با آب است، آب از الکل سنگین تر است و الکل اضافی هیدروکسید سدیم و صابون معلق را جذب می کند. بعد از شستشو و ته نشینی، آب به همراه ناخالصی ها جدا

<sup>21</sup> Agitation Washing

<sup>22</sup> Mist Washing

<sup>23</sup> Bubble Washing

می شود. عملیات شستشو باید چندین بار تکرار شود. اولین آبی که از ته ظرف جدا می شود شیری رنگ است و آخرین آب جدا شده از بیودیزل زلال است. هیدروکسید سدیم اضافی در بیودیزل وقتی با آب ترکیب می شود تشکیل صابون می دهد و می تواند براحتی جدا شود. بسته به روشی که استفاده می شود سیکل شستشو تکرار می شود. اولین شستشو شامل ساکن کردن مخلوط، برای به حداقل رساندن تشکیل صابون که وقت زیادی را برای ته نشین شدن می گیرد، می باشد.

شستشو به روش مخلوط کردن شامل به حرکت در آوردن آب در داخل بیودیزل، رها کردن تا ته نشین شدن آن و سپس جدا کردن آن می باشد.

شستشو به روش مه پاشی شامل پاشیدن ذرات ریزآب بر روی سطح بیودیزل می باشد که در این فرآیند قطرات ریز آب به علت چگالی بیشتر ته نشین می شوند و ضمن عبور از بیودیزل ناخالصی های آنرا میگیرند. در شستشو به روش حباب سازی لایه ای از آب را در زیر بیودیزل قرار می دهند و با ایجاد حباب بوسیله حباب ساز، حباب از بین بیودیزل عبور کرده و در طی بالا رفتن و پایین آمدن ناخالصی های بیودیزل را جدا می کند.

### استاندارد های بیودیزل

استانداردها امور حیاتی برای تولیدکنندگان، تهیه کنندگان و مصرف کنندگان بیودیزل می باشند. برای ارزیابی ایمنی و آلودگی های محیطی بیودیزل به استاندارد مراجعه می شود. استاندارد برای بهبود عملکرد وسایل نقلیه که از بیودیزل استفاده می کنند، بسیار لازم است. در واقع استاندارد پیش نیازی برای معرفی و دستور تجاری سازی این سوخت می باشد. در سال ۹۷ کمیسیون اروپا به کمیته استاندارد سازی اروپا دستور داد که برای پیشرفت استانداردها و روش های آزمون و ارزیابی بیودیزلی که به عنوان سوخت موتور و یا در سیستم های گرمایشی مصرف می شوند، استانداردهایی را تعریف کند.

استاندارد اروپایی بیودیزل اکنون بصورت بین المللی تایید شده و در کنار استاندارد آمریکایی بیودیزل، بصورت راهنمایی هایی برای فعالیت های استانداردسازی سایر کشورها استفاده می شوند. برای مثال استرالیا برای

بهبود استاندارد در خصوص بیودیزل، از استانداردهای اروپایی جهت گرفته است. کشورهایی که در امر تولید و مصرف بیودیزل فعالیت دارند برای بهبود عملکرد، استانداردهایی را برای این سوخت تعریف می کنند و این استانداردها با توجه به منابع اولیه سوخت بیودیزل در کشورهای مختلف متفاوت است. در استاندارد سازی بیودیزل موارد بسیاری را می توان در نظر گرفت، این موارد در حالت کلی عبارتند از:

- میزان استر
- چگالی
- ویسکوزیته
- نقطه اشتعال
- نقطه ریزش
- میزان گوگرد
- و غیره

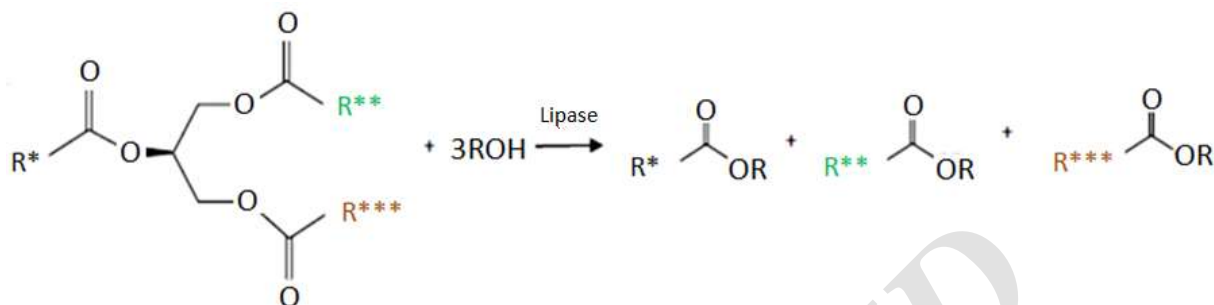
#### کاربرد آنزیم در تولید بیودیزل

واکنش ترانس استریفیکاسیون می تواند تحت تاثیر چندین عامل مانند نسبت مولی الکل، کاتالیست، حضور آب، اسید چرب های آزاد در نمونه های روغنی، دما، زمان و سرعت همزن قرار دارد. در این زمینه، شناخت عوامل تاثیر گذار بر فرآیند، به جهت تولید بیودیزل مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست، بسیار مهم می باشد.

به منظور تسریع سرعت واکنش، فرآیند ترانس استریفیکاسیون در حضور کاتالیزور انجام می شود. بنابراین تولید بیودیزل با استفاده از کاتالیست های شیمیایی یا آنزیمی انجام می شود. در مقایسه با واکنش های شیمیایی، واکنش های آنزیمی بدلیل توانایی تولید محصول با کیفیت بالا، ساده تر شدن مرحله جداسازی محصولات، شرایط واکنش ملایم و معتدل و امکان استفاده مجدد از کاتالیست، بسیار جذاب تر هستند. اگرچه



کاتالیست های شیمیایی سرعت واکنش و تبدیل بالاتری دارند. لیپاز<sup>۲۴</sup> کاتالیست آنزیمی مهمی است که واکنش های استریفیکاسیون و ترانس استریفیکاسیون برای تولید متیل استرها (بیودیزل) را کاتالیز می کند. شکل ۴ واکنش ترانس استریفیکاسیون آنزیمی را نشان می دهد [۲۱].



شکل ۴ واکنش ترانس استریفیکاسیون آنزیمی [۱۴].

در اینجا روش آنزیمی تولید بیودیزل بررسی می شود و بخصوص استفاده از آنزیم لیپاز در تولید بیودیزل و عوامل تاثیر گذار بر عملکرد آنزیم لیپاز در واکنش، به تفصیل بیان خواهد شد.

## ۲-۹-۲ کاربرد لیپازها در تولید بیودیزل

کاربردهای بیوتکنولوژیکی بر پایه زیست کاتالیست ها<sup>۲۵</sup> توجه زیادی را به خود جلب کرده اند. لیپازها (تری گلیسرول آسیل هیدرولازها<sup>۲۶</sup>، EC 3.1.1.3) بدلیل داشتن ویژگی های بارز بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، زیست کاتالیست های مهمی هستند. لیپازها آنزیم های هیدرولاز کننده ای هستند که می توانند در کاربردهای متنوع صنعتی برای انجام واکنش های الکلیز، اسیدولیز، آمینولیز و هیدرولیز استفاده شوند. تولید بیودیزل، یکی از کاربردهای اعجاب انگیز لیپاز است. اولین بار تولید بیودیزل با کاتالیست آنزیمی توسط میشلباخ<sup>۲۷</sup> [۱۵] گزارش

<sup>24</sup> Lipase

<sup>25</sup> Biocatalyst

<sup>26</sup> Triacylglycerol Acylhydrolases

<sup>27</sup> Mittelbach

شده است. ترانس استریفیکاسیون با کاتالیست لیپازی در دو مرحله رخ می دهد، که شامل هیدرولیز باند استری و استریفیکاسیون با سوبسترای دوم است. یک مکانیسم پینگ - پونگ بای بای<sup>۲۸</sup> بطور معمول برای انجام مطالعات سینتیکی ترانس استریفیکاسیون کاتالیز آنزیمی، استفاده می شود.

لیپازها می توانند از بسیاری از گونه های گیاهی (papaya latex, oat seed lipase, and castor seed lipase)، گونه های حیوانی (pig's and human pancreatic lipases) گونه های باکتریایی، قارچ های رشته ای و مخمر جداسازی شوند. برای تولید آنزیم صنعتی معمولا میکروارگانیسم ها بدلیل زمان تولید مثل و تکثیر کوتاه تر، ترجیح داده می شوند. از دیگر مزایای میکروارگانیسم ها می توان راندمان بالای تبدیل سوبسترا به محصول، تطبیق پذیری بالا نسبت به شرایط محیطی، سادگی در دستورزی ژنتیکی آنها و در شرایط کشت آنها را بر شمرد. اگرچه لیپاز های حاصل از منابع مختلف قادر به کاتالیز واکنش های شبیه به هم هستند، لیپاز های باکتریایی و قارچی بیشترین استفاده را در تولید بیودیزل دارند مانند *Candida*، *Aspergillus niger*، *Pseudomonas antarctica*، *Candida rugosa*، *Chromodacterium viscosum*، *MuCOriehei*، *Pseudomonas cepacia*، *Streptomyces Rhizopus oryzae*، *Photobacterium lipolyticum*، *Pseudomonas fluorescens*، *Thermomyces lanuginose* sp. و [۱۶]. خصوصیات لیپازها اهمیت زیادی در انتخاب محل مصرفشان دارد.

لیپازها براساس ویژگی هایشان می توانند به سه گروه لیپازهای مختص ۱،۳، لیپازهای مختص اسید چرب و لیپازهای غیراختصاصی تقسیم شوند. بطور خاص، لیپازهای مختص ۱،۳ که اسیدهای چرب را از موقعیت ۱ و ۳ یک گلیسرول آزاد کرده و باند استری را در این موقعیت ها هیدرولیز می کنند مانند *Aspergillus niger*، *MuCOriehei* و *Rhizopus oryzae* واکنش های ترانس استریفیکاسیون را بطور موثر کاتالیز می کنند. در لیپازها همچنین اختصاص به سوبسترا، یک عامل حیاتی در تولید بیودیزل بشمار می آید چراکه نقش مهمی در انتخاب آنزیم مناسب بر اساس ترکیب مواد خام، بوسیله توانایی تشخیص ویژگی های ساختاری زنجیره های آسید بر عهده دارد. لیپازهای *Pseudomonas fluorescens*، *Candida rugosa*، *Candida Antarctica* و

<sup>28</sup> Ping-Pong Bi Bi Mechanism

Candida cylindracea با نشان دادن هر دو ویژگی اختصاصی برای سوبسترا و اختصاص برای جایگاه وسیع، برای واکنش ترانس استریفیکاسیون مناسبند [۱۷].

## ۲-۹-۳ تثبیت آنزیم لیپاز و بررسی روش های مختلف آن

تثبیت آنزیم ها<sup>۲۹</sup>، که توجه بسیار زیادی را به خود جلب کرده است، برای اولین بار در سال ۱۹۷۱ در کنفرانس مهندسی آنزیم<sup>۳۰</sup> گزارش شد [۱۸]. در طول دهه گذشته، اصلاح شیمیایی<sup>۳۱</sup>، اصلاح فیزیکی<sup>۳۲</sup> و تکنیک های بیان ژن<sup>۳۳</sup> برای دستیابی به لیپازهای فعالتر، انتخابگرتر، مقاوم تر و به صرفه تر از نظر اقتصادی توسعه یافته اند. تثبیت یک روش اصلاح است که می تواند بدین صورت اتصال آنزیم بر روی یک ماده ساپورت جامد نامحلول تعریف شود. با تثبیت لیپازهای موثرتر و با پایداری دمایی بالاتر بدست می آید همچنین لیپاز ها می توانند مورد استفاده مجدد در واکنش قرار بگیرند. بعلاوه، استفاده مجدد از لیپاز یک راه حل ممکن برای کاهش هزینه بالای آنزیم هاست و آنها را برای کاربرد در مقیاس صنعتی مناسب می سازد. مقایسه آنزیم های آزاد و آنزیم های تثبیت شده در جدول ۴ نمایش داده شده است. روش های تثبیت آنزیم می توانند به روش های جذب<sup>۳۴</sup>، اتصال کووالان<sup>۳۵</sup>، بدام اندازی<sup>۳۶</sup> و اتصال متقاطع<sup>۳۷</sup> دسته بندی شوند. انتخاب روش و ماده ساپورت یک عامل مهم در دستیابی به یک لیپاز موثر است. نتایج مطالعات مقایسه ای خاطر نشان می کند که مولکولهای لیپاز یکسان بعد از تثبیت بر روی ساپورت های مختلف، می تواند فعالیت کاتالیتیکی متفاوتی از خود نشان دهند [۱۹].

<sup>29</sup> Immobilization of Enzymes

<sup>30</sup> Enzyme Engineering Conference

<sup>31</sup> Chemical Modification

<sup>32</sup> Physical Modification

<sup>33</sup> Gene Expression Techniques

<sup>34</sup> Adsorption

<sup>35</sup> Covalent Bonding

<sup>36</sup> Entrapment

<sup>37</sup> Cross-Linking

جدول ۴) مقایسه آنزیم آزاد و آنزیم تثبیت شده [۲۰]

ویژگی ها	آنزیم آزاد	آنزیم تثبیت شده
قیمت	بالا	پایین
بهره وری <sup>۳۸</sup>	پایین	بالا
فعالیت	ناپایدار	پایدار
قابلیت استفاده مجدد و بازیافت <sup>۳۹</sup>	غیر ممکن	ممکن
تحمل نسبت به درجه حرارت، pH	پایین	بالا
جداشدن از سوپسترا	سخت	آسان
جداشدن از محصول	سخت	آسان

#### ۲-۹-۳-۱ تکنیک جذب<sup>۴۰</sup>

جذب، چسبیدن لیپاز بر روی سطح جاذب بوسیله نیروهای ضعیف، مانند واندوالس<sup>۴۱</sup>، واکنش های یونی و هیدروفوب<sup>۴۲</sup> یا نیروهای انتشار<sup>۴۳</sup> است [۲۱]. تثبیت از طریق روش جذب، مخلوط کردن یک محلول آبی آنزیم با ماده حامل در یک دوره زمانی و شستشوی آنزیم اضافی از آنزیم های تثبیت شده بر روی حامل پس از طی زمان است. سطح جذب به شدت وابسته به pH، دما و قدرت یونی است. روش جذب بدلیل مزایای تجاری و سادگی آن بیشترین روش بکارگرفته شده در کنار سایر روش هاست. مزایای جذب شامل شرایط آماده سازی آسان و ملایم، هزینه پایین، عدم نیاز به افزودنی های شیمیایی، امکان بازیافت حامل و استفاده مجدد از آن و فعالیت بالا می باشد.

<sup>38</sup> Efficiency

<sup>39</sup> Reusability and recovery

<sup>40</sup> Adsorption technique

<sup>41</sup> van der Waals

<sup>42</sup> ionic and hydrophobic interactions

<sup>43</sup> dispersion forces

انواعی حامل های مختلف در تثبیت لیپازها استفاده شده اند. رزین آکرلیک، سلیت، پلی پروپیلن و غشاهای پارچه ای بطور گسترده ای به عنوان حامل استفاده شده اند. برخی نتایج گزارش شده از آنزیم های تثبیت شده بر اساس تکنیک های جذب، که در تولید بیودیزل استفاده شده اند در جدول ۵ خلاصه شده اند. همانطور که در جدول دیده می شود معمولاً بیودیزل بدست آمده با استفاده از آنزیم های حاصل از روش جذب بیش از ۸۵ درصد است. نووزایم <sup>۴۴</sup>۴۳۵ یک لیپاز تجاری است که بوسیله تثبیت لیپاز *Candida antarctica* بر روی رزین آکرلیک بدست آمده است و یک کاتالیست خوب است که بهره بیودیزل بیش از ۹۰ درصد با روغن گیاهی یا روغن آشپزی به عنوان خوراک <sup>۴۵</sup> دارد. لیپاز تجاری شده دیگر تحت عنوان لیپاز -99 *Candida sp.* 125 تثبیت شده بر روی غشای پارچه ای است که می تواند روغن خوک، پسماند و گیاهی را با بهره محصول بالایی بیش از ۸۷ درصد را کاتالیز کند [۲۲]. در کنار مزایای بالای تثبیت بوسیله روش جذب، مشکل اصلی روش این است که بدلیل اندرکنش های ضعیف بین آنزیم و بستر، دفع یا از دست دادن لیپاز از حامل اتفاق می افتد.

---

<sup>44</sup> Novozym 435

<sup>45</sup> Feedstock

جدول ۵) مقایسه عملکرد تولید بیودیزل با استفاده از لیپاز تثبیت شده با استفاده از روش جذب [۲۰]

منبع لیپاز	حامل	منبع روغن/اسید الکل	حد اکثر عملکرد (%)
<b>Burkholderia sp. C20</b>	Alkyl-functionalized Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -SiO <sub>2</sub>	روغن زیتون	۹۲ (تبدیل)
<b>Candida antarctica</b>	Acrylic resin	روغن سویا	۹۲ (بازده)
<b>Candida antarctica</b>	Acrylic resin	روغن سویا و شلغم روغنی	۹۸/۴ (تبدیل)
<b>Candida antarctica</b>	Acrylic resin	روغن سویا و شلغم	>۹۵ (تبدیل)
<b>Candida antarctica B</b>	Granular activated carbon	پالم	۱۰۰ (تبدیل)
<b>Candida sp</b>	Textile membrane	چربی خوک	۸۷/۴ (بازده)
<b>Candida sp</b>	Textile (Cotton) membrane	Salad	۹۶ (تبدیل)
<b>Candida sp</b>	Textile membrane	سیبوس برنج خام	۸۷/۴ (بازده)
<b>Candida rugosa and Pseudomonas fluorescens</b>	Acurel	پالم	۸۹ (بازده)
<b>Chromoacterlum visCOsum</b>	Celite-545	جاتروفا	۹۲ (بازده)
<b>Geobacillus thermocatenulatus</b>	Poly-hydroxybutyrate beads	Babassu	۱۰۰ (بازده)
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	Celite	روغن سویا	۸۰ (بازده)
<b>Pseudomonas cepacia</b>	Celite	جاتروفا	۹۸ (بازده)
<b>Pseudomonas cepacia</b>	Electrospun polyacrylonitrile fibers	شلغم روغنی	۹۴ (تبدیل)
<b>Pseudomonas cepacia</b>	Polystyrene	Sapium sebiferum	۹۶/۲۲ (بازده)
<b>Pseudomonas cepacia</b>	Ceramic beads	روغن پسماند	۴۰ (بازده)

۹۰ > (تبدیل)	۱- پروپانول	تری گلیسرید تریولئین	Porous kaolinite particle	<b>Pseudomonas fluorescens</b>
۵۸	متانول	دانه سویا	Polypropylene powder	<b>Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas cepacia</b>
۳۷ (بازده)				
۹۲/۸ (بازده)	متانول	پسماند	Resin D4020	<b>Penicillium expansum</b>
-	اتانول	پوسته زیتون	Hydrophilic resins	<b>RhizomuCO<sub>r</sub> miehei</b>
۹۱/۰۸ (بازده)	متانول	پسماند آشپزخانه	Silica	<b>RhizomuCO<sub>r</sub> miehei</b>
۹۴ (بازده)	متانول	پسته چینی	Macroporous resin HPD-400	<b>Rhizopus oryzae</b>
۹۶ (تبدیل)	متانول	شلغم روغنی	Mg-Al hydrotalcite	<b>Saccharomyces cerevisiae</b>
۹۵ (بازده)	متانول	پسماند آشپزی	Hydrotalcite	<b>Thermomyces lanuginosus (Lipozyme TL IM)</b>

## ۲-۳-۹-۲ تکنیک اتصال کوالانسی

روش دیگر تکنیک اتصال کوالانسی است که در واقع شکل گیری پیوند کوالانسی بین گروه های آلدهید سطح ساپورت و باقیمانده<sup>۴۶</sup> اسید آمینه های فعال روی سطح آنزیم است. ساپورت های بسیار متنوعی همانند مواد غیر ارگانیک، پلیمرهای طبیعی (آگاروز<sup>۴۷</sup>، چیتین<sup>۴۸</sup> و چیتو سان<sup>۴۹</sup>)، پلیمرهای مصنوعی (پلی پتیدهای هیدروفوب، الیاف نایلون) و یوپرجیت<sup>۵۰</sup> ساخته شده از کوپلیمریزاسیون N,N-متیل-بیس (متاکریل آمید)<sup>۵۱</sup>،

<sup>46</sup> Residue

<sup>47</sup> agarose

<sup>48</sup> chitin

<sup>49</sup> chitosan

<sup>50</sup> Eupergit®

<sup>51</sup> N,N'-methylenebis-(methacrylamide)

گلیسیدیل متاکریلات<sup>۵۲</sup>، آلایل گلیسیدیل اتر و متیل آکریل آمید<sup>۵۳</sup> برای تثبیت لیپاز با روش اتصال کووالانس استفاده شده اند. مزیت اصلی روش اتصال کووالانسی بدست آمدن پایداری دمایی و عملکردی آنزیم بدلیل اندرکنش های قوی میان لیپاز و حامل است [۲۲]. مقایسه تولید بیودیزل با استفاده از لیپاز تثبیت شده از طریق روش اتصال کووالانسی در جدول ۶ خلاصه شده است. چیتوسان بدلیل توانایی چسبیدن و تشکیل غشا، مقاومت مکانیکی بالا و سهولت شکل گیری فیلم های خنثی از نظر گرمایی و شیمیایی نامحلول در آب، یک حامل موفق به عنوان یک پلیمر طبیعی است. یک روش برای تثبیت لیپاز *Candida rugosa* بر روی میکروسفیرهای چیتوسان مغناطیسی به جهت ترانس استریفیکاسیون روغن سویا گزارش شده است. آنزیم تثبیت شده بدلیل تبدیل خوب روغن سویا و فعال ماندن در طول چهار دوره، به عنوان یک بیوکاتالیست موثر برای واکنش ترانس استریفیکاسیون تعیین شده بود [۲۳].

با استفاده از دو لیپاز با خصوصیت موقعیت مکمل بجای یک لیپاز، یک روش جدید برای تولید به صرفه بیودیزل ارائه شد. لیپاز حاصل از *Rhizopus orizae* و *Candida rugosa* به صورت کووالانسی به سیلیکا که برای تولید بیودیزل از روغن خام کانولا استفاده می شد، پیوند شدند. تحت شرایط بهینه، سرعت تبدیل روغن کانولا خام صمغ زدایی شده به متیل استر اسیدهای چرب ۸۸/۹ درصد بود که بیشتر از تبدیل حاصل از مخلوط آنزیم آزاد می باشد (۸۴/۲۵) [۲۴].

<sup>52</sup> glycidyl methacrylate

<sup>53</sup> allyl glycidyl ether and methacrylamide



جدول ۶) مقایسه عملکرد تولید بیودیزل با استفاده از لیپاز تثبیت شده به روش اتصال کووالانسی [۲۰]

منبع لیپاز	حامل	منبع روغن/اسید	الکل	حداکثر عملکرد(%)
<b>Burkholderia cepacia</b>	Niobium Oxide (Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Babassu	اتانول	۷۴/۱۳
<b>Burkholderia cepacia</b>	Polysiloxane-Polyvinyl Alcohol (SiO <sub>2</sub> -Pva)	Babassu	اتانول	۱۰۰
		پیه گاو		۸۹/۷ (بازده)
<b>Candida rugosa</b>	Chitosan Microspheres	دانه سویا	متانول	۸۷ (تبدیل)
<b>Candida rugosa</b>	Chitosan Powder	شلغم روغنی خلط روغن	متانول	۹۵ (تبدیل)
<b>Enterobacter aerogenes</b>	Silica	جاتروفا	متانول	۹۴ (بازده)
<b>Porcine pancreatic</b>	Chitosan Beads	سالیکورینا	متانول	۵۵ (تبدیل)
<b>Pseudomonas fluorescens</b>	Toyoparl Af-Amino-650m Resin	Babassu	اتانول	۹۴/۹ (بازده)
<b>Rhizopus oryzae</b>	Resin Amberlite Ira-93	پسته چینی	متانول	۹۲ (بازده)
<b>Rhizopus oryzae</b>	Polystyrene Polymer(Amberlite Ira-93)	دانه سویا	متانول	۹۰/۰۵ (بازده)
<b>Rhizopus Orizae +Candida rugosa</b>	Silica	-	متانول	>۹۸ (تبدیل)
<b>Rhizopus Orizae +Candida rugosa</b>	Silica	کلزا خام	متانول	۸۸/۹ (تبدیل)
<b>Thermomyces lanuginosus</b>	Olive Pomace	Pomace	متانول	۹۳ (بازده)
<b>Thermomyces</b>	Polyglutaraldehyde	کلزا	متانول	۹۷ (بازده)

			Activated Styrene-Divinylbenzene COPolymer	<b>lanuginosus</b>
۱۰۰ (بازده)	اتانول	پالم	Toyopearl Af-Amino-650m Resin	<b>Thermomyces lanuginosus</b>
۹۰ (بازده)	متانول	کلزا	Polyurethane Foam	<b>Thermomyces lanuginosus</b>
۱۰۰ (تبدیل)	اتانول	دانه سویا	Aldehyde-Lewatit	<b>Thermomyces lanuginosus</b>
۹۰ (تبدیل)	متانول	دانه سویا	Magnetic Fe3O4 Nano-Particles	<b>Thermomyces lanuginosus</b>

### ۲-۳-۹-۳ تکنیک بدام اندازی

این روش بر اساس گیرانداختن لیپاز در بین یک شبکه پلیمری است که آنزیم را نگه می دارد اما به سوبسترا و محصول اجازه عبور می دهد. به عبارت ساده این روش مخلوط کردن یک آنزیم با یک محلول پلیمری و سپس برقراری اتصال عرضی پلیمر برای شکل گیری یک ساختار شبکه ای که آنزیم را بدام می اندازد، می باشد. از آنجا که بدام اندازی روشی سریع و ارزان است و می تواند تحت شرایط معتدل انجام شود، اغلب در کاربردهای صنعتی کاربرد دارد. بدام اندازی را می توان به سه دسته بدام اندازی ژلی یا رشته ای و میکرو کپسوله کردن، تقسیم کرد. تعدادی از ساپورت ها مانند آلژینات، سلیت، کاراگینان، رزین ها، پلیمرهای آکرلیک و غیره مورد بررسی قرار گرفته اند. برخی حامل های استفاده شده برای بدام اندازی و تولید بیودیزل در جدول ۷ فهرست شده اند. از آنجا که ساپورت به عنوان یک سد نقش ایفا می کند، یک مشکل روش بدام اندازی، مشکل انتقال جرم است در نتیجه لیپاز تنها برای سوبستراهای با وزن مولکولی پایین موثر است [۲۵].

جدول ۷) مقایسه عملکرد تولید بیویزل با استفاده از لیپاز تثبیت شده با استفاده از روش به دام انداختن [۲۰]

منبع لیپاز	حامل	منبع روغن/اسید	الکل	حداکثر عملکرد (%)
<b>Burkholderia cepacia</b>	K-Carrageenan	پالم	متانول	۱۰۰ (تبدیل)
<b>Burkholderia cepacia</b>	Phyllosilicate Sol-Gel	پیه و گریس	اتانول	۹۴ (بازده)
<b>Burkholderia cepacia</b>	Mtms-Based Silica Monolith COated With Butyl-Substituted Silicates	جاتروفا	۹۵	(بازده)
<b>Candida antarctica</b>	Celite®	تریولئین	متانول	۶۰ (تبدیل)
<b>Candida rugosa</b>	Calcium Alginate Matrix	پالم	اتانول	۸۳ (بازده)
<b>Candida rugosa</b>	Activated Carbon	پالم	اتانول	۸۵ (تبدیل)
<b>Pseudomonas cepacia</b>	Sol-Gel	دانه سویا	متانول	۶۷ (تبدیل)
<b>Pseudomonas fluorescens</b>	Mtcc 103 Alginate	جاتروفا	متانول	۷۲ (بازده)
<b>Burkholderia cepacia</b>	Silica Aerogels	دانه های آفتابگردان	-	۵۶ (تبدیل)
<b>Burkholderia cepacia</b>	K-Carrageenan	پالم	متانول	۱۰۰ (تبدیل)
<b>Candida antarctica</b>	Silica Aerogels	دانه های آفتابگردان	متانول	۹۰ (تبدیل)

## ۲-۹-۳-۴ تکنیک اتصالات عرضی

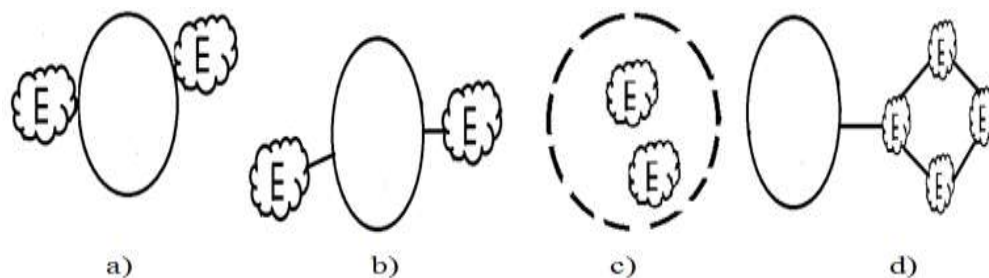
اتصالات عرضی روشی دیگر برای تثبیت است که می توان آن را اینگونه تعریف کرد؛ اندرکنش یک شبکه سه بعدی بین آنزیم، مواد جفت شده و حامل است. مزیت این روش بدست آوردن لیپازهای پایدار بدلیل اندرکنش بین لیپاز و حامل است. به بیان دیگر، شرایط اتصالات عرضی شدید است و لیپاز تثبیت شده فعالیت کمتری نشان می دهد.

تشکیل آب با استریفیکاسیون محتوای اسید چرب آزاد بالا در روغن دور ریز آشپزی در حضور الکل، موجب توده ای شدن<sup>۵۴</sup> لیپاز شده و میزان اثر بیوکاتالیست را کاهش می دهد. از این رو، لیپاز آزاد *Geotrichum sp.* کاتالیست مناسبی برای ترانس استریفیکاسیون روغن پسماند آشپزی نمی باشد. یان و همکاران [۲۶]، یک روش اصلاح برای تهیه *Geotrichum sp.* اتصال عرضی داده شده گزارش کرده اند. لیپاز بدست آمده پایداری pH و مقاوم به حرارت در مقایسه با آنزیم آزاد نشان داده است. بازده بیودیزل مربوطه نیز برای ترانس استریفیکاسیون روغن پسماند آشپزی با متانول ۸۵ درصد بوده است. نشان داده است که لیپازهای اتصال عرضی داده شده در شرایط دناتورده شدن<sup>۵۵</sup>، پایداری بیشتری نسبت به آنزیم های آزاد از خود نشان می دهند. این آنزیم سپس برای کاتالیز روغن *madhuca indica* که بدلیل داشتن محتوای بالای اسید چرب آزاد، انجام روش های ترانس استریفیکاسیون شیمیایی بر روی آن سخت است، مورد استفاده قرار گرفت. نتیجه حاصل تبدیل ۹۲ درصدی بعد از ۲/۵ ساعت زمان بوده است.

تثبیت لیپاز *Candida rugosa* و *Alcaligenes spp.* با استفاده از تکنیک اتصال عرضی نشان داده است که آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد از فعالیت بالاتری برخوردار است. همه روش های ذکر شده در بالا در شکل ۵ به صورت شماتیک ارائه شده است.

<sup>54</sup> Agglomeration

<sup>55</sup> Denaturing conditions



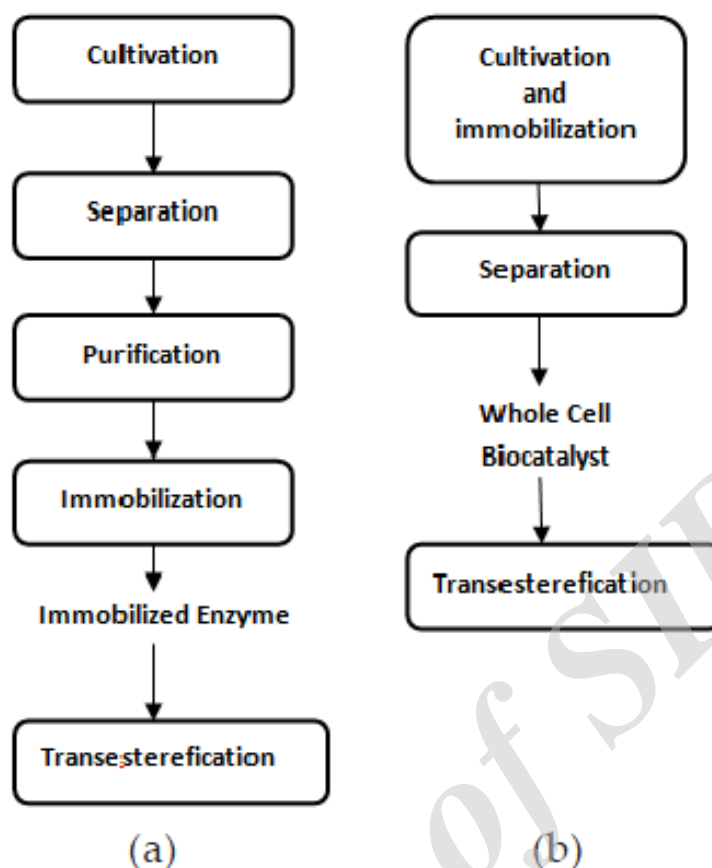
شکل ۵) شماتیک روش های تثبیت آنزیم: (a) روش جذب، (b) روش اتصال کووالانسی، (c) روش بدام اندازی و (d) روش اتصالات

عرضی

## ۲-۹-۳-۵ تثبیت سلول کامل<sup>۵۶</sup>

استفاده از لیپاز برای تولید سوخت در حجم بالا، به طور قابل توجهی با وجود هزینه های بالای لیپاز محدود شده است. استفاده از سلول های میکروبی مانند قارچ ها، باکتری ها و سلول های مخمرها حاوی لیپاز درون سلولی به جای لیپاز خارج سلولی (لیپاز آزاد یا تثبیت شده) یک روش آسان تر و کم هزینه تر برای تولید بیودیزل به روش آنزیم است. در مقایسه با فرایندهای آنزیمی مرسوم، استفاده از سلول های کامل پایداری عملکردی بالایی را فراهم می کند و از انجام روش های پیچیده جداسازی، تصفیه و تثبیت سازی جلوگیری می کند [۲۷ و ۲۸]. مراحل تهیه معمول برای تثبیت لیپاز خارج سلولی و آنزیم های سلول کامل در شکل ۶ نمایش داده شده است. ذرات ساپورت زیست توده برای تثبیت سلول کامل استفاده می شود.

<sup>56</sup> Whole cell immobilization



شکل ۶) مراحل تهیه (a) لیپاز خارج سلولی تثبیت شده و (b) بیوکاتالیست سلول کامل

Aspergilluse و Rhizopus بیشترین مورد استفاده را به عنوان بیوکاتالیست تمام سلولی دارند. بان و همکاران [۲۹]، اولین بار سلول های *Rhizopus oryzae* IFO4697 تثبیت شده (یک لیپاز مختص موقعیت ۱،۳) را به عنوان بیوکاتالیست تمام سلولی درون ذرات ساپورت زیست توده برای تولید بیودیزل استفاده کردند و ۹۱/۱ درصد محتوای متیل استری بدست آمد که نتیجه مشابه نتیجه بدست آمده در استفاده از لیپاز خارج سلولی بود. تحقیقات بسیاری بر روی استفاده از سلول های کامل برای کاتالیز واکنش ترانس استریفیکاسیون انجام شده است که در جدول ۸ خلاصه شده اند.

یک روش که در آن از تیمار اتصالات عرضی گلوترآلدهید<sup>57</sup> کاتالیست سلول کامل برای متانولیز روغن سویا استفاده شده است توسط سان و همکاران [۳۰] ارائه شده است. تیمار اتصالات عرضی گلوترآلدهید مقاومت بالاتری نسبت به متانول داشته و فعالیت کاتالیتیکی بالاتری دارد (با نسبت متانول به روغن ۳). همچنین یک استراتژی جدید اضافه کردن متانول به صورت اضافه کردن تدریجی و مرحله به مرحله مقادیر مختلف متانول (۱/۰، ۱/۲، ۱/۵ و ۲/۰ مول معادل روغن) در هر ۲۴ ساعت پیشنهاد شده است. بیشترین بازده متیل استری می تواند بعد از گذشت ۲۴ ساعت و با اضافه کردن ۱/۲ مول، ۱/۵ مول و ۱/۲ مول متانول در ۰، ۸ و ۱۴ ساعت تا ۹۴/۱ درصد بدست آید. به طور کلی فرآیندهای کاتالیز شده توسط سلول کامل کند تر از فرآیندهای کاتالیز شده توسط لیپاز خارج سلولی است. سان و همکاران [۳۰]، همچنین گزارش کرده اند که زمان واکنش می تواند با استفاده از این روش کاهش یابد. بدیهی است که این روش کاهش قابل توجهی در هزینه تولید بیودیزل بدنبال دارد.

---

<sup>57</sup> Glutaraldehyde

جدول ۸) مقایسه تولید بیودیزل با استفاده از کاتالیزورهای تمام سلولی [۲۰]

منبع لیپاز	حامل	منبع روغن/اسید	الکل	حداکثر فعالیت (%)
<i>Aspergillus niger</i>	BSP <sup>sa</sup>	روغن پسماند	متانول	۸۶/۴ (بازده)
<i>Aspergillus niger</i>	Polyurethane BSP <sup>sa</sup>	پالم	متانول	>۹۰ (بازده)
<i>Aspergillus niger</i>	BSP <sup>sa</sup>	پالم	متانول	۸۷ (بازده)
<i>Aspergillus niger</i>	BSP <sup>sa</sup>	دانه سویا	متانول	۹۸ (تبدیل)
<i>A. oryzae</i> carrying r-CALBb	BSP <sup>sa</sup>	پالم	متانول	۸۵
		دانه سویا		۹۰ (تبدیل)
<i>Aspergillus oryzae</i> expressing r-FHL <sup>c</sup>	BSP <sup>sa</sup>	شلغم روغنی	متانول	۹۶
			اتانول	۹۴
			۱-پروپانول	۹۶
			۱-بوتانول	۹۷ (بازده)
<i>Escherichia coli</i> BL21	-	شلغم روغنی	متانول	۹۷/۷ (تبدیل)
<i>Rhizopus chinensis</i> CCTCC M201021	-	دانه سویا	متانول	>۸۶ (بازده)
<i>Rhizopus oryzae</i> displaying Pichia pastoris	-	دانه سویا	متانول	۸۳/۱۴ (بازده)
<i>Rhizopus oryzae</i> IFO 4697	BSP <sup>sa</sup>	شلغم روغنی تصفیه شده	متانول	۶۰
		شلغم روغنی خام، شلغم روغنی اسیدی		۶۰
				۷۰ (بازده)
<i>Rhizopus oryzae</i> IFO 4697	BSP <sup>sa</sup>	دانه سویا	متانول	۹۰ (بازده)
<i>Rhizopus oryzae</i> IFO 4697	BSP <sup>sa</sup>	دانه سویا	متانول	۸۵ (بازده)
<i>Rhizopus oryzae</i> IFO4697	-	دانه سویا	متانول	۷۱ (تبدیل)
<i>Rhizopus oryzae</i> IFO 4697 and <i>Aspergillus</i>	BSP <sup>sa</sup>	دانه سویا	متانول	۱۰۰ (تبدیل)



oryzae niaD300 (COmbined use)				
۹۷ (تبدیل)	متانول	دانه سویا (محتوای اسید چرب ۵/۵ درصد)	-	<b>Rhizopus oryzae</b> ATCC 24563
۷۲ (بازده)	متانول	دانه سویا	BSPsa	<b>Rhizopus oryzae IFO</b> 4697
۹۰ (تبدیل)	متانول	دانه سویا	Polyurethane foam BSPsa	<b>Rhizopus oryzae</b>
۸۰ (تبدیل)	متانول	جاتروفا	BSPsa	<b>Rhizopus oryzae</b>
۸۶ (تبدیل)	متانول	دانه سویا	-	<b>Rhizopus oryzae IFO</b> 4697
۸۳	متانول	شلغم روغنی	BSPsa	<b>Rhizopus oryzae</b>
۷۹	اتانول			
۹۳	۱- پروپانول			
۶۹ (بازده)	۱- بوتانول			
۹۷ (بازده)	متانول	چربی	-	<b>Serratia marcescens</b> YXJ-1002

aBSPs: Biomass support particles

br-CALB: *Candida antarctica* lipase B

cr-FHL: *Fusarium heterosporum* lipase

بیوکاتالیست های تمام سلولی یک راه صنعتی کردن تولید بیودیزل است اما بازده انتقال جرم محدود محصول و بستر مانع تحقیقات بیشتر است.

## ۲-۱۰ مبانی نظری

### ۲-۱۰-۱ نحوه عملکرد آنزیم های لیپاز

آنزیم های لیپاز خانواده مهمی از آنزیم ها هستند که بطور گسترده در واکنش های مختلفی استفاده می شوند. نام سیستماتیک لیپازها، گلیسرول استر هیدرولاز<sup>۵۸</sup> و شماره سیستماتیک آن EC 3.1.1.3 می باشد. طبیعت گزینش پذیر لیپازها در انتخاب محیط و مواد شیمیایی باعث شده است که از این آنزیم در جداسازی داروهای کایرال، اصلاح چربی، سنتز جایگزین های کره کاکائو، سوخته های زیستی، ساخت محصولات آرایشی و تقویت طعم استفاده وسیعی شود.

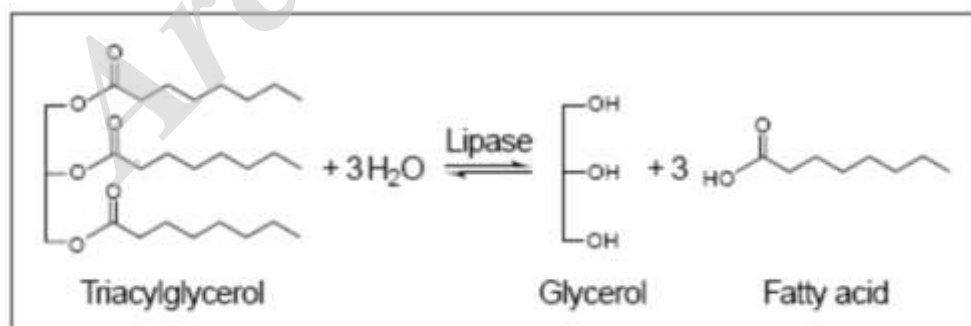
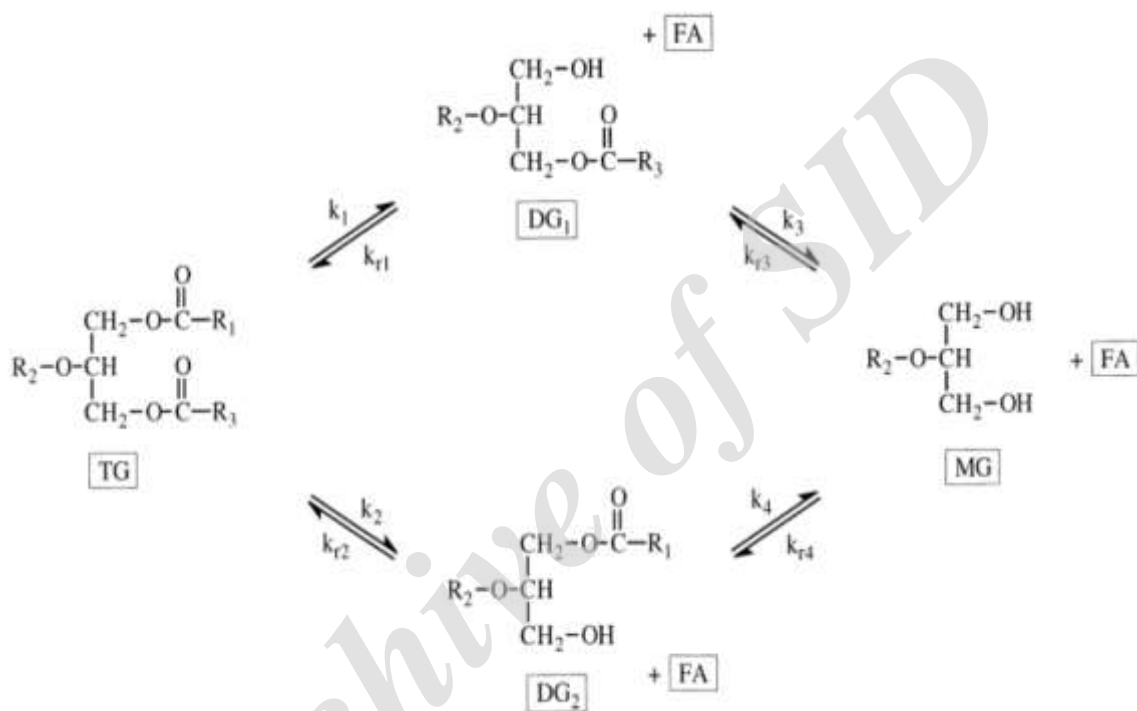
کاربرد وسیع این آنزیم نسبت به سایر آنزیم ها مربوط به گستره وسیع سوبستراهایی که می پذیرد (مانند تری گلیسیریدها، استرهای آلیفاتیک، آلیسیکلیک، بایسیکلیک و آروماتیک) و نیز پایداری نسبی آن در حلال های آلی است. بنابر این لیپازها با توجه به سیستم حلال استفاده شده می توانند در فعالیت هیدرولیز یا سنتز استر فعالیت کنند.

### ۲-۱۰-۲ مکانیسم عمل آنزیم های لیپاز

لیپازها در محیط آلی برای انجام اغلب واکنشهای مهم از جمله هیدرولیز، استریفیکاسیون، ترانس و اینتر استریفیکاسیون مناسبند. منظور از محیطهای آلی، سیستمهای عاری از حلال مانند روغن ها می باشد. لیپازها پیوند استری بین آسیل و گلیسرول را هیدرولیز می کنند. با تغییر جایگاه اسید های چرب در ساختمان تری آسیل گلیسرول ها (ترانس استریفیکاسیون) می توان ویژگی های فیزیکی آن را تغییر داد و در جهت تولید روغن با ایزومر ترانس پایین استفاده نمود. ترانس استریفیکاسیون آنزیمی با استفاده از لیپازها انجام می شود و بسته به شدت هیدرولیز، محصولات تولیدی شامل اسید چرب آزاد، منوآسیل گلیسرول، دی آسیل گلیسرول و گلیسرول می باشد. واکنش هیدرولیز تعادلی و برگشت پذیر بوده و بنابراین لیپازها قادر به انجام واکنش برگشت یعنی سنتز می باشند (شکل ۷). این آنزیم تحت شرایط طبیعی هنگامی که محلول باشد

<sup>58</sup> Glycerol Ester Hydrolase

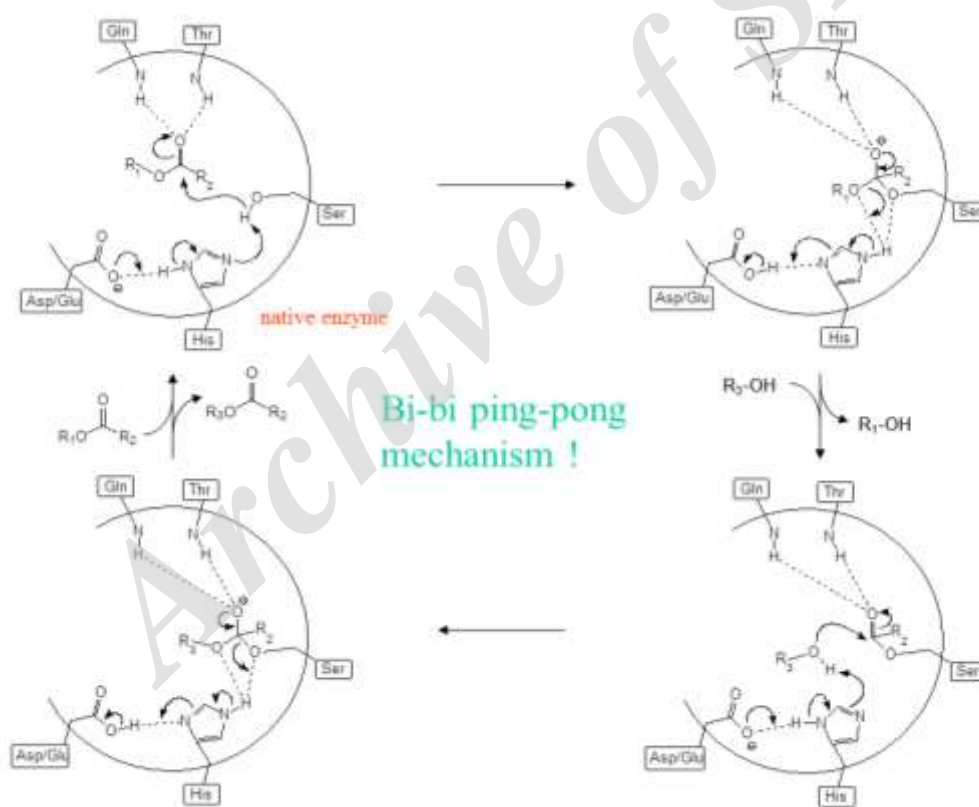
هیدرولیز باندهای استری را در سطح بین فاز سوبسترای نامحلول و فاز آبی کاتالیز می کند. در اینجا سوبسترا می تواند هر نوع تری گلیسیریدی باشد. تحت شرایط خاص آزمایشگاهی که آب حضور نداشته باشد، واکنش معکوس توسط این آنزیم ها منجر به استریفیکاسیون و تشکیل گلیسیریدها از اسیدهای چرب و گلیسرول و همچنین اینتراستریفیکاسیون می شود. برخی دانشمندان از واکنش برگشت جهت سنتز تری آسید گلیسرول ها استفاده کنند.



شکل ۷) فعالیت کاتالیتیکی لیپاز

توانایی لیپازها در کاتالیز کردن واکنش‌ها از دو ویژگی عمده آنها منشاء می‌گیرد :

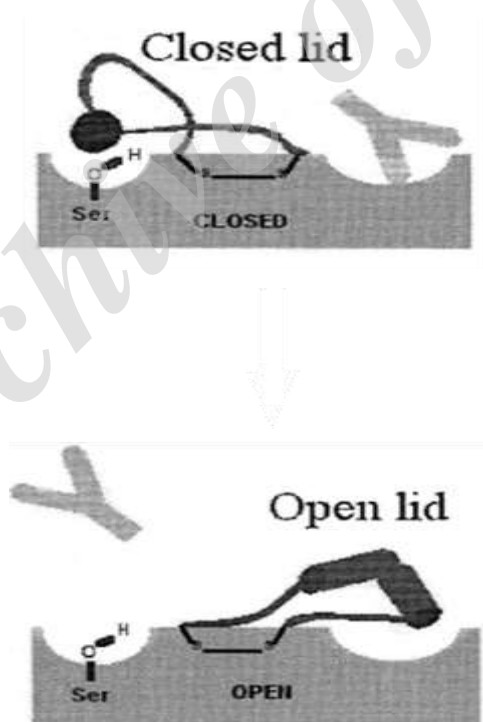
۱- ساختار جایگاه فعال این دسته از آنزیمها شامل سه اسید آمینه است که مثلث کاتالیستی نامیده می‌شود. در اثر برهمکنش آنها یک کمپلکس لیپاز- اسیدچرب تشکیل می‌شود. در مرحله دوم واکنش یک ملکول آب وارد می‌شود، اسید چرب آزاد شده و لیپاز به موقعیت اولیه خود باز می‌گردد و به این ترتیب چرخه هیدرولیز تری گلیسرید تکمیل می‌گردد. این مدل، مدل Bi-Bi Ping-Pong نامیده می‌شود (شکل ۸). همچنین کمپلکس لیپاز- اسیدچرب می‌تواند با مونو و دی گلیسرید واکنش دهد و بترتیب تولید دی و تری گلیسرید نماید.



شکل ۸) مدل پینگ-پنگ-بای-بای

۲- لیپازها بوسیله پدیده ای بنام “interfacial activation” یا فعالیت حدواسط مشخص می گردند. ورودی جایگاه فعال، وقتی که آنزیم در آب حل می شود مسدود می گردد. در فصل مشترک بین آب و یک فاز غیر قطبی جایگاه فعال باز شده و به سوبستراها اجازه ورود می دهد. بنابراین در یک سیستم قطبی و غیر قطبی لیپازها در رابطه با سوبستراهای موجود در فاز غیر قطبی بسیار فعال هستند در حالی که فعالیت آنها بر روی سوبستراهای فاز قطبی پایین است.

اغلب لیپازها یک ساختار الیگو پپتید آلفاهلیکال دارند که جایگاه فعال آنزیم را می پوشاند و آن را برای سوبسترا غیر قابل دسترس می سازد. در غیاب یک حد واسط هیدروفوب، جایگاه فعال از محیط واکنش مجزا بوده و آنزیم در اصطلاح در کانفورماسیون<sup>۵۹</sup> بسته است. در حضور حدواسط هیدروفوب (مانند یک قطره روغن) آنزیم تغییر کانفورماسیون داده و جایگاه کاتالیتیکی خود را در معرض فاز هیدروفوب قرار می دهد که آن را کانفورماسیون باز می نامند (شکل ۹).



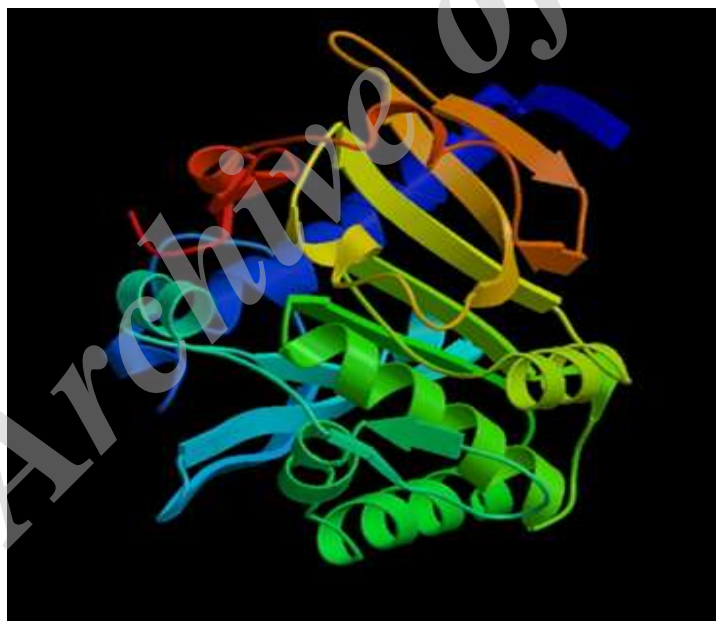
شکل ۹) ساختار باز و بسته آنزیم

<sup>59</sup> conformation

## ۲-۱۰-۳ ساختار آنزیم های لیپاز

اولین ساختار x-ray کریستالوگرافی شده از لیپاز در دو حالت باز و بسته در سال ۱۹۹۰ بدست آمد و ویژگی منحصر به فرد این آنزیم را به نمایش گذاشت. ساختار سه بعدی این آنزیم نشان می دهد که فعالسازی حدواسط آن می بایست بدلیل حضور یک لوپ پپتیدی آمفیفیلک باشد که روی جایگاه فعال آنزیم را در محلول، درست مثل یک سرپوش یا زبانه می پوشاند. وقتی که این زبانه یا سرپوش در تماس با یک حدواسط آب/لیپید قرار می گیرد دستخوش یک بازآرایی آرایش می شود که جایگاه فعال را در دسترس سوبسترا قرار می دهد.

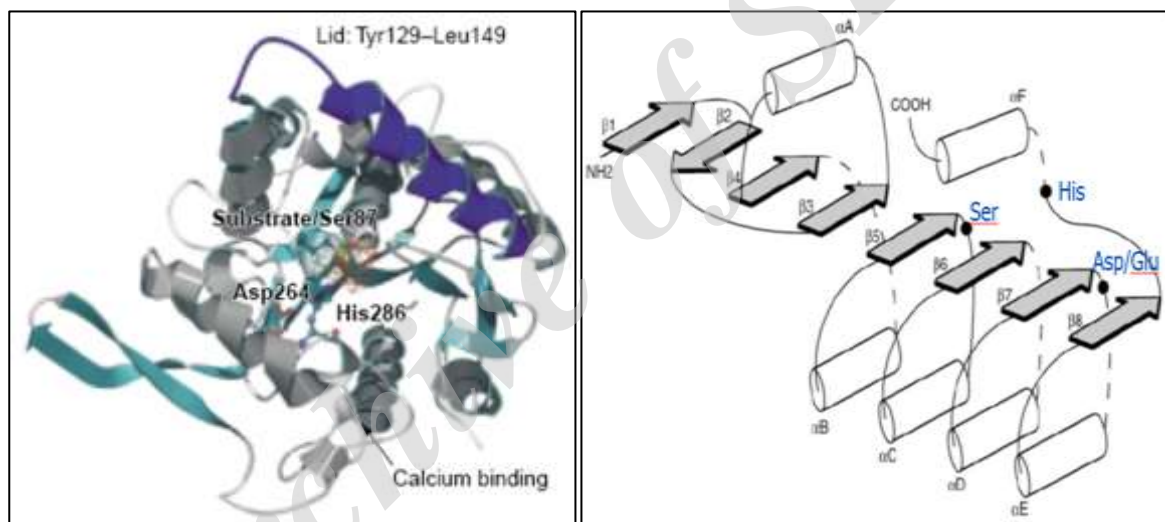
لیپاز ها اعضای خانواده  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold با یک ساختار مشترک متشکل از یک توالی ویژه آلفا هلیکال و رشته بتا هستند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰ ساختار  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold

این آنزیم ها پیوندهای استری را بوسیله یک مثلث (سه تایی) کاتالیتیکی، متشکل از یک باقی مانده سرین هسته دوست فعال شده بوسیله یک پیوند هیدروژنی در ارتباط با هیستیدین و آسپاراتات یا گلوتامات، هیدرولیز می کند (شکل ۱۱).

کلاهِک، لید یا سرپوش یک توالی پپتیدی آلفا هلیکس آمفیفیلیک است که در حالت بسته خود دسترسی به سوبسترا را محدود می کند. بعد از باز شدن سرپوش یک سطح بزرگ هیدروفوب در معرض قرار می گیرد که با سوبسترای هیدروفوب پیوند می شود. بازدارنده های هیدروفوب مانند آلکیل فوسفونات، سیکلوآلکیل فوسفونات یا آلکیل سولفونات با این بخش واکنش می دهند.



شکل ۱۱) ساختار مثلث کاتالستی لیپازها

با اینکه توالی اسید آمینه در لیپاز های بدست آمده از گونه های مختلف شباهت کمی به هم دارند اما همگی از شباهت ساختاری و عملکردی بالایی برخوردارند. با وجود این شباهت ها، وجود تنوع در ساختار جایگاه اتصال سوبسترا ممکن است بر روی ویژگی های کاتالیتیکی، دما و پایداری لیپاز در یک محلول موثر باشد.

## ۲-۱۰-۴ pH بهینه فعالیت و مقاومت حرارتی آنزیم های لیپاز

لیپازها مقاومت زیادی در  $pH=6-7$  نشان داده اند. و اکثرا قادرند در  $pH$  اسیدی و قلیایی تا ۸ مقاومت نشان دهند. لیپازهای خارج سلولی قلیایی از *Rhizopus sp* و *A. niger*, *Chromobacterium viscosum* در  $pH$  اسیدی فعال و لیپاز از *P. nitroreducens* در  $pH=11$  فعال هستند. لیپازهای میکروبی به حرارت مقاوم هستند در حالیکه لیپازهای لوزالمعده فعالیت خود را در ۴۰ درجه سانتیگراد از دست می دهند. لیپازهای *A. niger*, *R. japonicus*, *C. viscosum* در ۵۰ درجه سانتیگراد مقاوم هستند در حالیکه لیپازهای حاصل از میکروارگانسیم های *Thermotolerant H. lanuginosa* و *P. sp. nitroreducens* به ترتیب در ۶۰ و ۷۰ درجه مقاوم هستند. بنابراین مقاومت حرارتی لیپازها متفاوت است.

## ۲-۱۰-۴ فعال سازی و غیر فعال سازی آنزیم های لیپاز

فعالیت لیپاز نیازی به کوفاکتور ندارد. ولی کاتیونهای دو ظرفیتی نظیر کلسیم فعالیت آنزیم را تحریک می کند و فرمولاسیون نمک های کلسیم با اسیدهای چرب زنجیر بلند لازم می باشد. یونهای قلع، جیوه و نیکل به شدت از فعالیت لیپاز ممانعت می کنند و نیز یونهای روی، منیزیم، EDTA و SDS اثر بازدارندگی جزئی بر فعالیت آن دارد. همچنین غیر فعال سازی آنزیم بوسیله افزودن اوره افزایش می یابد.



## ۲-۱۱ نانوذرات مغناطیسی

خواص مغناطیسی مواد نتیجه ممان‌های مغناطیسی حاصل از الکترون‌هاست. هر الکترون در یک اتم دارای ممان مغناطیسی است، که از دو منبع ایجاد می‌شود: یکی مربوط به حرکت اوربیتالی الکترون حول هسته است و دیگری ناشی از چرخش الکترون به دور محور خودش که حرکت اسپینی نامیده می‌شود. بنابراین هر الکترون در یک اتم با ممان‌های اوربیتالی و اسپینی می‌تواند به طور دائم مانند آهنربای کوچکی عمل نماید.

می‌دانیم که همه مواد در مقیاس نانو، خواصی متفاوت از خود بروز می‌دهند. مواد مغناطیسی نیز از این قاعده مستثنی نیستند. در واقع، خاصیت مغناطیسی از جمله خواصی است که به مقدار بسیار زیادی به اندازه ذره وابسته است. به عنوان مثال، در مواد فرومغناطیس وقتی اندازه ذره از یک حوزه مغناطیسی منفرد کوچک‌تر گردد، پدیده سوپرپارامغناطیس به وقوع می‌پیوندد. نانوذرات سوپرپارامغناطیس می‌توانند کاربردهای بالقوه زیادی در فروسیال‌ها، تصویرسازی‌های رنگی، سردسازی مغناطیسی، سم‌زدایی از سیال‌های بیولوژیکی، انتقال کنترل شده داروهای ضد سرطان، ام‌آر‌آی<sup>۶۰</sup> و جداسازی‌های سلولی مغناطیسی داشته باشند.

هر ماده مغناطیس در حالت توده، از حوزه‌های مغناطیسی تشکیل شده است. هر حوزه حاوی هزاران اتم است که در آن جهت چرخش الکترون‌ها یکسان و ممان‌های مغناطیسی به صورت موازی جهت یافته‌اند. اما جهت چرخش الکترون هر حوزه با حوزه‌های دیگر متفاوت است. هرگاه، یک میدان مغناطیسی بزرگ، تمام حوزه‌های مغناطیسی را هم‌جهت کند، تغییر فاز مغناطیسی رخ داده و مغناطش به حد اشباع می‌رسد.

هر چه تعداد حوزه‌ها کم‌تر باشد، نیرو و میدان کمتری نیز برای هم‌جهت ساختن حوزه‌ها مورد نیاز است، و چنانچه ماده‌ای تنها دارای یک حوزه باشد، بنابراین نیازی به هم‌جهت کردن آن با دیگر حوزه‌ها نخواهد بود. از آنجا که قطر این حوزه‌ها در محدوده یک تا چند هزار نانومتر است، هر ذره‌ای که تنها شامل یک حوزه باشد، می‌تواند نانوذره به شمار رود. نانوذرات مغناطیسی دارای تعداد حوزه‌های کمی هستند و مغناطش آن‌ها ساده‌تر می‌باشد. از طرف دیگر، بر اساس قانون دوم ترمودینامیک "بی نظمی در یک سیستم منزوی، در یک فرآیند

<sup>60</sup> MRI

خودبخودی، افزایش می‌یابد". بنابراین، موادی که از حالت طبیعی خارج می‌شوند، تمایل شدیدی برای برگشت به وضعیت طبیعی خود دارند و مغناطش مثالی در این مورد است. اما چون نانوذرات مغناطیسی نیاز به نیروی زیادی برای مغناطش ندارند، خیلی از حالت طبیعی فاصله نمی‌گیرند و پس از مغناطیس شدن تمایل چندانی برای از دست دادن خاصیت مغناطیسی و بازگشت به وضعیت اولیه را ندارند.

در سال‌های اخیر نانوذرات مغناطیسی<sup>۶۱</sup> (اغلب بر پایه اکسید آهن)، بدلیل ویژگی‌های چند گانه خود مانند زیست‌سازگاری، خاصیت سوپر پارامغناطیسی، سایز کوچک و سمیت پایین مورد توجه قرار گرفته‌اند. این نانوذرات اغلب متشکل از عوامل مغناطیسی مانند آهن، نیکل، کبالت و اکسید آنها مانند مگنتیت<sup>۶۲</sup>، ماگماتیت<sup>۶۳</sup> و کبالت فریت<sup>۶۴</sup> هستند. این ذرات از خود خاصیت سوپر پارامغناطیسی نشان می‌دهند که در غیاب میدان مغناطیسی آن خاصیت را ندارند. این ذرات دارای ابعادی هستند که آنها را قابل مقایسه با ابعاد ویروس‌ها (۲۰۰-۵۰۰ نانومتر)، پروتئین‌ها (۵-۵۰ نانومتر) و ژن‌ها (با عرض ۲ و طول ۱۰-۱۰۰ نانومتر) می‌کند. سطح وسیع نانوذرات همچنین آنها را برای اتصال دادن عوامل زیستی بر روی آنها گزینه مناسبی می‌سازد [۳۱].

این ذرات در تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (ام.آر.آی)، بیوسنسور ها و نیز به عنوان حامل دارو های ضد سرطان بکار برده شده‌اند. همچنین بدلیل داشتن منطقه سطحی بزرگ ویژه<sup>۶۵</sup> و جداسازی راحت آنها از محیط بوسیله یک آهن ربا، این ذرات در کاربردهای آنزیم کاتالیزی، بکاربرده شده‌اند. استراتژی معمول تثبیت لیپاز بر روی نانوذرات مغناطیسی، بر اساس پیوند سطحی از طریق لینکرهای با وزن مولکولی پایین یا پلیمرهای حاوی گروه‌های عاملی چون اپوکسی یا آمین، که لیپاز با آنها از طریق روش‌های پیوند کوالانت واکنش می‌دهد، می‌باشد.

<sup>61</sup> Magnetic nano particles(MNPs)

<sup>62</sup> Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

<sup>63</sup> Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

<sup>64</sup> Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>CO

<sup>65</sup> High specific surface area

الحاق نانوذرات به ماکرومولکول های زیستی مانند پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک با دو رویکرد صورت می گیرد:

۱- اتصالات مستقیم کوالان

۲- برهمکنش غیر کوالان بین ذرات و مولکول های زیستی.

اتصال نانوذرات به سطح پروتئین غالباً از طریق اسیدهای آمینه سیستمین سطح پروتئین صورت می گیرد. اتصالات غیر کوالان غالباً به صورت اندرکنش های الکتروستاتیک و آبگریز می باشد.

## ۲-۱۲ منابع تولید بیودیزل

بیش از ۳۵۰ نوع محصول حاوی روغن شناسایی شده است. روغنهای خوراکی (روغن آفتابگردان، نارگیل، سویا، کلزا، ذرت، زیتون و بادام زمینی) و روغنهای غیرخوراکی (روغن تنباکو، سبوس برنج، پالم، پنبه دانه، ماهویا، کرچک، کائوچو، شلغم روغنی، کتان، کائولا، جلبک دریایی و روغن مصرف شده)، از مهمترین منابع تولید بیودیزل هستند. ۹۵٪ بیودیزل از روغنهای خوراکی تهیه می شود که این مسئله، نیازمند مصالحه بین بحران غذا و تهیه سوخت است. روغنهای گیاهی و حیوانی ۱۰ تا ۱۷ برابر از سوخت دیزل متداول، گرانروی بیشتری دارند که با ترانس استریفیکاسیون این روغنها، می توان سوخت بیودیزل که دارای گرانروی نزدیک به سوخت دیزل باشد، بدست آورد. روغنهای تجدیدپذیر، بسته به منطقه آب و هوایی به طور گسترده ای، از دانه های گیاهی به دست می آیند. کلزا در اروپای شمالی وکانادا، سویا در آمریکا، روغن پالم، نارگیل و آفتابگردان در نواحی استوایی، مورد استفاده قرار می گیرند. ایرلند نیز روغنهای سرخ کردنی و چربی های حیوانی را بکار می برد. در بین چربی های حیوانی چربی گاو، روغن ماهی، چربی خوک، پیه اردک، گاو و خوک، به عنوان روغنهای تجدیدپذیر در نظر گرفته می شوند. روغنهای خوراکی مانند سویا، آفتابگردان، کلزا و پالم، به عنوان مواد اولیه اصلی در تولید بیودیزل در سراسر جهان استفاده می شوند. روغن کلزا، در بدو پیدایش بیودیزل به عنوان بالاترین میزان ماده اولیه، شناخته شد و اکنون نیز با دارا بودن ۸۰٪ منبع ماده اولیه، در رتبه اول قرار دارد. پس

از آن آفتابگردان با ۱۰٪ و به دنبال آنها نیز روغن سویا قرار دارد. مواد اولیه ای نیز ظهور کرده اند که پتانسیل تولید روغن اولیه برای بیودیزل در آنها وجود دارد مانند: خردل، شاهدانه، کرچک، بادام زمینی، نارگیل، پنبه، ذرت، سبوس برنج، قهوه، تنباکو، انگور، جلبک و روغن دورریز گیاهی. در بین مواد اولیه غیر خوراکی برای تولید بیودیزل، روغن جلبک از اهمیت ویژه ای برخوردار است. بهترین منبع برای تولید بیودیزل ریزجلبک می باشد که بالاترین میزان تولید را برای بیودیزل داراست و می تواند تا ۲۵۰ برابر سویا در یک هکتار، تولید روغن داشته باشد. ریزجلبک منبع بالقوه و اقتصادی بیودیزل است، زیرا دارای تولید بالا بوده و نیازی به زمین زراعی یا آب سالم ندارد. روغن موجود در جلبک می تواند تا ۸۰٪ وزن خشک آن برسد. دانه های روغنی، به منظور کاهش گرانروی و بهتر شدن خواص اشتعال و سیلان، تصفیه و پاکسازی می شوند. سپس می توانند یا به عنوان روغن گیاهی خالص (B100) و یا با ترکیب شدن با دیزل در نسبت های مختلف به کار برده شود. محققان روغن های گیاهی فرآوری شده و خام مختلفی مانند روغن آفتابگردان، روغن پنبه، روغن کلزا، روغن سویا و روغن پالم را آزمایش کردند [۳۲-۳۴].

## ۲-۱۲-۱ پتانسیل تولید بیودیزل در ایران

در ایران اغلب روغن حاصل از دانه های گیاهی در تولید انرژی و سوخت، استفاده نمی شود و دلیل آن نیز این است که بیش از ۹۰٪ روغن خوراکی که به مصرف مردم می رسد وارداتی است. دانه های روغنی همه ساله از مزارع ایران برداشت می شود. حدود یک میلیون هکتار مزرعه در ۲۰ استان کشور پتانسیل تولید دانه های روغنی را دارند (شکل ۱۲) [۳۵].



شکل ۱۲) استانهای دارای پتانسیل تولید دانه های روغنی در ایران [۳۵]

تولید بیودیزل از دانه های روغن خوراکی بطور ایده آل، توانایی جایگزینی حدود ۲٪ از سوخت دیزل مصرفی کشور را برخوردار است. ۲٪ بیودیزل با ۹۸٪ (B<sub>2</sub>) سوخت دیزل میتواند بطور بهینه در موتور با پاشش مستقیم استفاده شود، زیرا این میزان ترکیب نیاز به تغییرات چندانی در موتور ندارد.

کشور ایران با توجه به وسعت و تنوع آب و هوایی به طور حتم می تواند از بزرگترین تولید کنندگان این سوخت باشد هرچند کارهای صورت گرفته در این زمینه بیشتر به بخش تحقیق محدود شده است. پتانسیل تولید بیودیزل از دانه های روغنی در ایران در جدول ۹ نمایش داده شده است.

جدول ۹) پتانسیل تولید بیودیزل از دانه های روغنی در ایران [۳۵]

تولید بیودیزل (تن در سال)	محتوی روغن (%)	میزان تولید (تن)	مساحت زیر کشت (هکتار)	دانه های روغنی
۱۴۲۷۵۶	۴۰	۳۵۶۸۹۰	۱۶۹۱۶۰	کلزا
۳۴۷۶۴	۲۰	۱۷۸۸۱۸	۷۴۹۹۳	سویا
۶۲۵۹۳	۲۰	۳۱۲۹۶۶	۱۲۴۵۲۴	پنبه
۱۷۱۸۴	۵۰	۳۴۳۶۸	۴۰۰۰۰	کنجد
۱۲۲۶۸	۲۰	۶۱۳۳۸	۹۵۰۴۴	زیتون
۱۰۶۱۰	۵۰	۲۱۲۲۱	۲۳۹۸۰	آفتاب-گردان
۱۴۵۸	۳۲	۴۵۵۷	۴۶۲۲	گلرنگ
۴۴۷۲۶	۵۵	۸۱۳۲۰	۵۰۴۹۶	بادام زمینی
۲۳۶۱۲۹	۱۰	۲۳۶۱۲۹۸	۳۰۶۹۲۵	ذرت
۷	۷۰	۱۰	۳	نارگیل
۱۴۸۷۱۸	۶۰	۲۴۷۸۶۳	۱۶۹۶۰۷	گردو
۹۸۳۹	۵۵	۱۷۸۸۸	۹۴۷۶	فندق
۷۲۱۰۵۲		۳۶۷۸۵۴۰	۱۰۶۸۸۳۱	کل

## ۱۳-۲ چارچوب نظری

### ۱-۱۳-۲ روش های سنتز نانوذرات مغناطیسی

از روش های شیمیایی بسیاری برای تولید نانوذرات مغناطیسی می توان استفاده کرد: همرسوبی، میکروامولسیون<sup>۶۶</sup>، سل-ژل<sup>۶۷</sup>، واکنش سونوشیمیایی<sup>۶۸</sup>، واکنش های هیدروترمال<sup>۶۹</sup>، هیدرولیز و پیرولیز پیشران<sup>۷۰</sup>، تزریق جریان<sup>۷۱</sup> و پاشش الکتریکی<sup>۷۲</sup>. تولید نانوذرات مغناطیسی به دلیل ماهیت کلوئیدی آنها فرآیند پیچیده ای است. نخستین مشکل شیمیایی، تعریف شرایط آزمایشگاهی است که منجر به ایجاد ذراتی با توزیع یک به یک از دانه های مغناطیسی در محدوده مناسب می گردد. دومین مسئله بحرانی انتخاب شرایط تکرار پذیر به گونه ای است که بدون نیاز به هیچ گونه فرآیند خالص سازی پیچیده مانند سانتریفیوژ کردن<sup>۷۳</sup>، کروماتوگرافی<sup>۷۴</sup>، جداسازی مغناطیسی<sup>۷۵</sup> یا گرادیان میدان جریان<sup>۷۶</sup>، قابلیت صنعتی شدن را داشته باشد.

در این طرح به منظور تولید نانوذرات  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  از روش همرسوبی استفاده شده است. روش همرسوبی از جمله آسان ترین مسیرها برای دست یابی به ذرات مغناطیسی است. مزیت اصلی فرآیند همرسوبی این است که تعداد نانوذرات تولید شده زیاد می باشد. اما کنترل توزیع اندازه ذره به دلیل اینکه تنها عوامل کینتیکی رشد بلور را تنظیم می کند محدود است. اکسیدهای آهن ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  یا  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) معمولا از این طریق سنتز می شوند. دانش فنی تولید نانوذرات اکسید آهن در پژوهشکده علوم پایه کاربردی بدست آمده

<sup>66</sup> microemulsion

<sup>67</sup> sol-gel

<sup>68</sup> sono-chemical reactions

<sup>69</sup> hydrothermal reactions

<sup>70</sup> hydrolysis and thermolysis of precursors

<sup>71</sup> flow injection

<sup>72</sup> electrospray

<sup>73</sup> ultracentrifugation

<sup>74</sup> chromatography

<sup>75</sup> magnetic filtration

<sup>76</sup> flow field gradient

است و در این طرح از این دانش به منظور سنتز نانوذرات مورد نیاز استفاده شده است. پس از سنتز نانوذرات ذکر شده به منظور بدست آوردن اطلاعات مورفولوژیکی نانوذرات این مواد بوسیله میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM مورد مطالعه قرار گرفتند.

## ۲-۱۳-۲ حفاظت/پوشش دار کردن نانو ذرات مغناطیسی

اگرچه پیشرفتهای قابل توجهی در سنتز نانو ذرات مغناطیسی وجود دارد، پایدار نگه داشتن این ذرات برای مدت زمان طولانی بدون توده ای شدن یا رسوب کردن یک مسئله مهم می باشد. پایداری از الزامات تعیین کننده تقریباً برای هرگونه کاربرد نانو ذرات مغناطیسی می باشد. مخصوصاً فلزات خالص نظیر آهن، کبالت و نیکل و آلیاژهای آنها خیلی به هوا حساس می باشند. بنابراین مشکل اصلی در کاربرد فلزات خالص یا آلیاژها از ناپایداری آنها نسبت به اکسیداسیون در هوا ناشی شده و قابلیت حساسیت به اکسیداسیون برای ذرات کوچک بیشتر می شود.

به نظر می رسد که یک روش ساده، حفاظت با یک لایه غیر قابل نفوذ می باشد، بطوریکه اکسیژن نتواند به سطح ذرات مغناطیسی برسد. اغلب پایدار کردن و حفاظت ذرات بسیار به هم مرتبط هستند.

اغلب حفاظت کردن منتج به نانو ذرات مغناطیسی با ساختار هسته-پوسته می شود، یعنی نانو ذرات مغناطیسی بی روکش بعنوان هسته با پوسته پوشیده شده و هسته از محیط اطراف ایزوله میشود. روشهای اعمالی روکش کردن تقریباً به دو گروه اصلی می تواند تقسیم شود: روکش کردن با پوسته های آلی شامل پایدار کننده های سطحی و پلیمرها یا روکش کردن با ترکیبات غیر آلی شامل سیلیکا، کربن، فلزات با ارزش نظیر جیوه، طلا یا اکسیدازها که می توانند با اکسیداسیون آرام پوسته خارجی نانوذرات ایجاد شوند یا با ته نشینی اضافی نظیر  $Y_2O_3$ . نانوذرات مغناطیسی نیز می توانند درون شبکه ای فشرده، معمولاً پلیمر، سیلیکا یا کربن پراکنده/تعبیه شده و تشکیل کامپوزیت بدهند که این کار از توده ای شدن و اکسیداسیون جلوگیری می کند یا حداقل آن را به مینیمم می رساند.



## ۲-۱۳-۳ پوشش دهی سیلیکا

پوسته سیلیکا فقط از هسته های مغناطیسی حفاظت نمی کند بلکه علاوه بر آن از تماس مستقیم هسته مغناطیسی با عاملهای اضافی متصل شده به سطح سیلیکا حفاظت کرده و بنابراین از برخوردهای ناخواسته جلوگیری میکند. برای مثال اتصال مستقیم مولکولهای رنگ به نانو ذرات اغلب منجر به فروکش شدن خاصیت لومینسانس میشود. برای جلوگیری از این مشکل پوسته سیلیکا ابتدا بر روی هسته مغناطیسی پوشیده شده و سپس مولکولهای رنگ بر روی پوسته سیلیکا پیوند داده میشوند. روکش کردن سیلیکا مزایای متعددی دارد که از پایداری آنها تحت شرایط آبی (حداقل اگر pH خیلی پایین باشد)، اصلاح سطح آسان و کنترل آسان برخوردهای درون ذره در محلول و درون ساختار بواسطه تنوع ضخامت پوسته ناشی می شوند. ضخامت پوشش می تواند با تغییر غلظت آلومینا و نسبت تتراهیدروسیلان (TEOS) در آب تنظیم شود. سطح نانو ذرات مغناطیسی روکش شده با سیلیکا هیدروفیل بوده و به آسانی با دیگر گروههای عاملی اصلاح می شوند. سیال های مغناطیسی در دسترس تجاری می توانند بطور مستقیم با پوسته های سیلیکا با هیدرولیز TEOS پوشش داده شوند. از آنجا که سطح اکسید آهن میل ترکیبی قوی به سیلیکا دارد هیچ آغازگری برای بالا بردن رسوب و چسبندگی سیلیکا به نانوذرات لازم نیست. بدلیل دارا بودن بارهای منفی در پوسته سیلیکا این نانو ذرات مغناطیسی پوشش داده شده بدون نیاز به اضافه کردن دیگر پایدار کننده های سطحی در آب قابلیت پخش مجدد را دارند. در این طرح از پوش سیلیکا با استفاده از ماده تترااتیل اورتو سیلیکات (TEOS) به منظور حفاظت از نانوذرات مغناطیسی استفاده شده است.

## ۲-۱۳-۳ عامل دار کردن نانو ذرات مغناطیسی پوشش داده شده

همانطور که ذکر شده است، پوسته حفاظتی نه تنها از نانو ذرات مغناطیسی در برابر تخریب جلوگیری می نماید، بلکه همچنین می تواند برای عامل دار کردن بیشتر با اجزای خاص نظیر نمونه های فعال کاتالیتیکی، داروهای متنوع، قسمتهای پیوندی ویژه یا دیگر گروههای عاملی بکار رود. جداسازی آسان و جایگزینی کنترل شده این نانو ذرات مغناطیسی عامل دار شده بوسیله میدان مغناطیسی خارجی کاربرد آنها را بعنوان پایه کاتالیست، در فرآیندهای تثبیت آنزیم و ساختن سیستمهای زیست الکتروکاتالیتک قابل کنترل، امکانپذیر می سازد. سرگورینو-مکریا و همکارانش سنتز نانو ذرات اکسید آهن، پوشش داده شده با پوسته سیلیکا که متعاقبا با نانو ذرات طلا عامل دار شده بود را گزارش کردند. پخش کننده های آبی نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن با پوسته سیلیکا بوسیله پروسه استبر پوشش داده شده بود. یک روش دیگر برای عامل دار کردن نانو ذرات مغناطیسی مبادله لیگاند می باشد که در آن نانو ذرات مغناطیسی سنتز شده در فاز آلی می توانند به حالت محلول در آب تبدیل شوند. روتلو و همکارانش گزارش کردند که نانو ذرات اکسید آهن پراکنده شده در محلول تولوئن می توانند کاملا به محلول آبی تحت همزدن با اکتا(تترا متیل آمونیوم-) پلی هیدرال سیلسسکیوکزان الیگومری منتقل شوند. که در این طرح از ماده ان (۲-آمینو اتیل)-۳-آمینو تری متوکسی سیلان (EDS) به منظور آمین دار کردن نانوذرات استفاده شده است.

## ۲-۱۳-۴ فعال کردن نانو ذرات عاملدار شده و تثبیت آنزیم

پس از عاملدار کردن نانوذرات مغناطیسی نیاز به استفاده از مواد فعال کننده مانند گلوترآلدئید به منظور ایجاد حالت فعال برای گروه عاملی آمین قرار گرفته شده بر روی نانوذرات می باشد. سپس آنزیم پروتئینی لپاز قادر به انجام واکنش کووالانس با نانوذرات عاملدار شده بوده و بدین صورت تثبیت آنزیمی به روش کوالان انجام خواهد پذیرفت.

## ۱۴-۲ فرضیه‌های پژوهش

برای انجام این طرح فرایض زیر مطرح می باشد:

- از میان منابع روغنی خوراکی و غیر خوراکی گیاهی و حیوانی می توان منبعی مناسب برای تولید سوخت زیستی در ایران ارائه داد.
- از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن و گاما اکسید آهن می توان به عنوان بستر تثبیت آنزیم استفاده کرد.
- تثبیت آنزیم بر روی نانوذرات امکان استفاده چندباره از آنزیم را فراهم می سازد.
- آنزیم تثبیت شده عملکرد بهتری نسبت به آنزیم آزاد خواهد داشت.
- بیودیزل تولیدی از کیفیت مطلوبی برخوردار خواهد بود.



۳- فصل سوم: مواد و تجهیزات و روشهای پژوهش

Archive of SID

### ۳-۱ مواد و دستگاه ها

- روغن کلزا
- روغن پالم
- روغن پسماند گیاهی
- چربی حیوانی
- آب مقطر
- آب دیونیزه
- اتانول
- تولوئن
- سولفات آهن ۷ آب
- کلرید آهن ۶ آب
- آمونیاک
- اسید کلریدریک
- p- نیتروفنیل پالمیتات
- تترااتیل اورتو سیلیکات (TEOS)
- متانول
- ان (۲-آمینو اتیل)-۳-آمینو تری متوکسی سیلان (EDS)
- اسید استیک
- گلو تار آلدئید
- بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار

- بافر تریس ۵۰ میلی مولار
- آنزیم لپاز از گونه ریزوپوس اوریزایی از شرکت سیگما
- پروتئین BSA (Albumin Bovine)
- واکنشگر برادفورد
- ایزوپوپانول
- ایزوبوتانول
- تریتون x-100
- عربیک گام

#### دستگاه ها

- ترازوی دیجیتالی (g) (0.0001) (Shimadzu AEU-Z10، ژاپن)
- اسپکتروفوتومتر (WPA مدل lightwave S2000 UV/visible spectrophotometer)
- یخچال ۴ درجه سانتی گراد Vestfrost
- فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد SAMSUNG مدل SFR-A15NFA
- فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد WiseCryo
- اتوکلاو (Wise Clave مدل MAC-47)
- شیکر انکوباتور (LabTech، کره جنوبی)
- دستگاه گاز کروماتوگرافی (Shimadzu مدل GC-15A)
- سمپلر (SOCOREX مدل ACURA 825)
- میکروسانتریفوژ (SIGMA مدل 1-14)
- هود شیمیائی (ایران)
- Heater Block مدل NF 47001 شرکت ندای فن
- بورت
- هاون چینی جهت پودر کردن نانوذرات
- بن ماری

- قیف جدا کننده
- دستگاه FESEM ( کمپانی هیتاچی)
- دستگاه TEM ( کمپانی هیتاچی)
- دستگاه DLS

## ۲-۲ روش ها

### ۱-۲-۳ سنتز نانوذرات مغناطیسی

در این طرح از روش هم‌رسوبی جهت سنتز نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن استفاده شد. علت انتخاب این روش هزینه پایین، زمان کم مورد نیاز و میزان زیاد تولید نانوذرات به نسبت مواد اولیه می باشد.

#### ۱-۱-۲-۳ سنتز نانوذرات $Fe_3O_4$

مقادیر ۱۹/۲ گرم سولفات آهن ۷ آبه و ۳۷/۳۰ گرم کلرید آهن ۶ آبه در ۱۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر، در بشر ۵ لیتری ریخته شده و بر روی هیتر استیرر دار با مگنت ۵ سانتی متری به سرعت حل شدند. تا ۱۵۰۰ میلی لیتر محلول ۰/۰۴۶ مولار نسبت به سولفات آهن و ۰/۰۹۲ مولار نسبت به کلرید آهن تهیه شود. در ادامه ابتدا pH محلول اندازه گیری شد (۱/۸۳). سپس جهت جلوگیری از زیاد شدن زمان واکنش، به کمک دو بورت که در کنار هم چیده شده بودند، افزایش آمونیاک ۴ مولار به آرامی انجام شد. همچنین برای جلوگیری از اتصال قطرات افزوده شده در اثر کند بودن شدت هم خوردن واکنش، بورت ها طوری تنظیم شدند که قطرات هر دو بورت در مرکز دوران مگنت وارد شوند و همچنین قطرات به صورت متوالی چکیده شوند.



شکل ۱۴) تشکیل نانوذرات



شکل ۱۳) محلول اولیه واکنش سنتز نانوذرات



شکل ۱۶) نانوذرات سنتز شده



شکل ۱۵) جدا کردن نانوذرات سنتز شده با مگنت

با افزایش حدود ۷۵۰ میلی لیتر آمونیاک ۴ مولار در مدت ۳ ساعت pH مخلوط واکنش به ۱۰/۲۵ رسید. واکنش متوقف شد و مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق بهم زده شد. در ادامه در مدت زمان ۵۵ دقیقه با افزایش ۱۸۵ میلی لیتر اسید کلریدریک به کمک دو بورت، pH مخلوط واکنش به ۳ رسید.



نانوذرات تولید شده به کمک آهنربا ته نشین و چندین بار با آب مقطر شستشو شدند تا به pH خنثی برسد و در نهایت رسوبات حاصل از این واکنش به مدت یک شب در آون با دمای ۱۰۰ درجه خشک شد.

### ۲-۱-۲-۳ سنتز نانوذرات $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

مقادیر ۱۹/۲ گرم سولفات آهن ۷ آب و ۳۷/۳۰ گرم کلرید آهن ۶ آب در ۱۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر، در بشر ۵ لیتری ریخته شده و بر روی هیتر استیرر دار با مگنت ۵ سانتی متری به سرعت حل شدند. تا ۱۵۰۰ میلی لیتر محلول ۰/۰۴۶ مولار نسبت به سولفات آهن و ۰/۰۹۲ مولار نسبت به کلرید آهن تهیه شود. در ادامه ابتدا pH محلول اندازه گیری شد (۱/۸۳). سپس جهت جلوگیری از زیاد شدن زمان واکنش، به کمک سه بورت که بصورت مثلثی چیده شده بودند، افزایش آمونیاک ۴ مولار به آرامی و مشابه آزمایش قبل انجام شد. همچنین برای جلوگیری از اتصال قطرات افزوده شده در اثر کند بودن شدت هم خوردن واکنش، بورت ها طوری تنظیم شدند که اولاً قطرات هر سه بورت در مرکز دوران مگنت وارد شوند، ثانیاً قطرات به صورت متوالی چکیده شوند. با افزایش حدود ۷۵۰ میلی لیتر آمونیاک ۴ مولار در مدت ۳ ساعت pH مخلوط واکنش به ۱۰/۲۵ رسید. واکنش متوقف شد و مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق بهم زده شد. در ادامه در مدت زمان ۵۵ دقیقه با افزایش ۱۸۵ میلی لیتر اسید کلریدریک به کمک ۳ بورت، pH مخلوط واکنش به ۳ به رسید. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. در ادامه جهت تبدیل محصولات سنتز شده به نانوذرات گاما اکسید آهن، مخلوط واکنش به کمک کمپرسور هوا و در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت هوادهی شد. در نهایت چندین بار با آب مقطر شستشو شد. رسوبات ته نشین شده در آون با دمای ۱۰۰ درجه خشک شده و حدود ۲۰ گرم محصول از هر راکتور بدست آمد.

### ۳-۲-۲ روش سنجش پتانسیل زتای نانوذرات سنتز شده

پس از سنتز نانوذرات و بررسی مورفولوژیکی آنها بوسیله میکروسکوپ الکترونی، به منظور کسب اطلاع از میزان بار سحی اولیه نانو ذرات آزمایش سنجش پتانسیل زتا انجام شد. در این مرحله میزان ۲ میکروگرم از هرکدام از نانوذرات در ۱ میلی لیتر از بافر فسفات ۱ میلی مولار با pH مساوی ۷/۴ به مدت زمان ۱۵ دقیقه سونیکه شده و سپس در دستگاه DLS مورد آزمایش قرار گرفت.

### ۳-۲-۳ پوشش دار کردن نانوذرات به وسیله سیلیکا

مقدار ۷۵ میلی گرم نانوذرات مغناطیسی سنتز شده در ۵ میلی لیتر تولوئن به صورت سوسپانسیون درآمد و در محلولی حاوی ۸۰ میلی لیتر اتانول، ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه و ۲/۵ میلی لیتر آمونیاک مخلوط شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۳۵۰ دور در دقیقه در دمای اتاق شیک شد و سپس ۱ میلی لیتر از تترااتیل اورتو سیلیکات به صورت قطره قطره در مدت زمان ۳۰ دقیقه به مخلوط اضافه شد و بعد از هم زدن در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت، نانوذرات حاصله با استفاده از آهن ربا جدا شد و چندین بار با آب مقطر و اتانول شستشو داده شد.



شکل ۱۷) پوشش دار کردن نانوذرات مغناطیسی با سیلیکا

Archive of SID



شکل ۱۸) شستشوی نانوذرات مغناطیسی پوشش دار شد. دو شکل بالا نانوذرات مغناطیسی  $Fe_3O_4$  و دو شکل پایین نانوذرات

مغناطیسی  $\gamma Fe_2O_3$

### ۳-۲-۴ عاملدار کردن نانوذرات

به منظور آمین دار کردن نانوذرات از ان-(۲- آمینو اتیل)-۳-آمینو پروپیل تری متوکسی سیلان(EDS) استفاده شد. مقدار ۵ میلی گرم از نانوذره در ۴/۶ میلی لیتر اتانول پراکنده شد، سپس ۲۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱۰۰ میکرولیتر استیک اسید و ۱۰۰ میکرولیتر EDS به نانوذرات در حال مخلوط شدن اضافه شد. پس از گذشت یک ساعت از انجام واکنش محصول نهایی بوسیله آهن ربا جمع آوری و در بافر ۱۰۰ میلی مولار فسفات سدیم (pH=۷/۴) به صورت سوسپانسیون درآمد در حالیکه غلظت نانوذره نهایی ۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

### ۳-۲-۵ فعال کردن نانوذرات به وسیله گلو تار آلدئید

مقدار ۲۰ میکرولیتر از گلو تار آلدئید (۰.۲۵٪) به یک میلی گرم (۵۰۰ میلی لیتر) از نانوذرات آمین دار شده اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۶۰ دور در دقیقه مخلوط شد. بعد از گذشت یک ساعت نانوذرات بوسیله یک آهن ربا از محلول جدا شده و نانوذرات برای حذف کامل گلو تار آلدئید اضافی ۵ بار با بافر فسفات شستشو داده شد.

### ۳-۳ بررسی مورفولوژی و زتا پتانسیل نانوذرات مغناطیسی

نانوذرات سنتز شده به صورت خام پس از حل شدن در بافر فسفات و سونیکه شدن در دمای محیط به مدت ۲۰ دقیقه خشک شده و برای انجام مطالعه مورفولوژیکی با استفاده از میکروسکوپ SEM و TEM استفاده شدند. این مطالعه پس از تثبیت آنزیم بر روی نانوذرات نیز بار دیگر تکرار شد تا تغییرات مورفولوژیکی حاصل از تثبیت بررسی شود.

از تکنیک سنجش پتانسیل زتا با استفاده از دستگاه DLS به منظور تائید انجام اتصال آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات پس از انجام هر دو تکنیک جذب و اتصال کوالانس بهره گرفته شده است. بدین منظور تست زتا یکبار بلافاصله پس از سنتز نانوذرات و بار دیگر پس از انجام تثبیت آنزیم بر روی نانوذرات انجام شده و تغییر و یا عدم تغییر در بار سطحی نانوذرات معرف انجام و یا عدم انجام تثبیت و یا انجام تثبیت ضعیف خواهد بود.

### ۳-۴ تثبیت آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات مغناطیسی

#### ۳-۴-۱ تثبیت آنزیم لیپاز با استفاده از تکنیک اتصال کوالانسی

۰/۵ میلی لیتر از محلول آنزیم (۲ میلی گرم بر میلی لیتر) به منظور تثبیت کوالانسی مولکول آنزیم به نانوذرات اصلاح یافته اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون نمونه نهایی با استفاده از آهن ربا جمع آوری شده و با بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH مساوی ۷/۴ شسته شده و سپس برای استفاده در مراحل بعدی به منظور تولید بیودیزل به صورت محلول در بافر فسفات مذکور در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

#### ۳-۴-۲ تثبیت آنزیم لیپاز با استفاده از تکنیک جذب

این روش بدون انجام هیچ گونه مدیفیکاسیون خاصی بر روی نانوذرات و فقط از راه جذب فیزیکی از طریق همجوار قرار دادن نانوذره و آنزیم برای مدت زمان انکوباسیون مشخص، انجام شد. مقدار ۳۰ میلی گرم از نانوذرات در ۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار سونیکه شد. محلول حاصل به لیپاز با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شده و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت به آرامی شیک شد. در انتهای انکوباسیون پس از جمع آوری نانوذرات متصل به آنزیم با استفاده از آهن ربا و ۳ بار شستشو با بافر فسفات، نانوذرات حاصل در ۵ میلی لیتر بافر فسفات حل شده و در دمای ۴ درجه نگهداری شد.

### ۳-۴-۳ سنجش پتانسیل زتای نانوذرات پس از تثبیت آنزیم به هر دو روش

پس از تثبیت آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات به منظور تایید اتصال آنزیم بر روی نانوذرات، آزمایش سنجش پتانسیل زتا انجام شد. در این مرحله میزان ۲ میکروگرم از هرکدام از نانوذرات در ۱ میلی لیتر از بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH مساوی ۷/۴ به مدت زمان ۱۵ دقیقه سونیکه شده و سپس در دستگاه DLS مورد آزمایش قرار گرفت.

### ۳-۵ سنجش غلظت پروتئین به روش برادفورد

سنجش پروتئین به روش برادفورد یک روش رنگ سنجی سریع، ساده، دقیق و حساس است که برای اندازه گیری غلظت پروتئین در محلول به کار می رود. این روش در سال ۱۹۷۶ توسط ماریون ام برادفورد ارائه گردید.

اساس روش برادفورد بر تشکیل کمپلکس بین رنگ آبی کماسی G-250 و پروتئین های موجود در محلول استوار است. رنگ آبی کماسی به سه شکل وجود دارد: فرم کاتیونی که قرمز رنگ است، فرم خنثی که سبز رنگ است و فرم آنیونی که آبی رنگ می باشد. در شرایط اسیدی، عمدتاً رنگ، پروتونه و به فرم کاتیونی قرمز رنگ می باشد و در طول موج ۴۷۰ نانومتر بیشترین جذب را دارا است. اما زمانی که رنگ به پروتئین متصل می شود به فرم پایدار غیر پروتونه ی آبی رنگ تبدیل شده و در ۵۹۵ نانومتر دارای بیشترین جذب می باشد. در واقع اتصال رنگ به پروتئین و تشکیل کمپلکس رنگ- پروتئین باعث جابه جایی ماکزیمم جذب از ۴۷۰ نانومتر به ۵۹۵ نانومتر می شود. بنابراین اندازه گیری میزان جذب در ۵۹۵ نانومتر متناسب با غلظت پروتئین حاضر در محلول خواهد بود. با توجه به مطالعات صورت گرفته بر روی پلی آمینو اسیدهای ساختگی یا سنتتیک، ظاهراً رنگ آبی کماسی G-250 در درجه ی اول به واحدهای اسید آمینه بازی (به ویژه آرژینین و لیزین) و آروماتیک متصل می شود.

در اینجا برای بدست آوردن میزان پروتئین موجود در محلول آنزیم لیپاز آزاد و نیز سنجش میزان پروتئین لود شده بر روی نانوذرات و در نتیجه میزان آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات پس از انجام واکنش تثبیت با استفاده از روش برادفورد ابتدا منحنی استاندارد به شرح زیر رسم شد. برای بدست آوردن غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر از پروتئین استاندارد مقدار ۲ میلی گرم از BSA (Albumin Bovine) را در ۱۰۰۰ ماکرولیت آب دوبار تقطیر حل کرده سپس از محلول حاصل مقدار ۵۰ ماکرولیت را در ۹۵۰ ماکرولیت آب مقطر حل کرده تا سرانجام محلولی با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر حاصل شود. جهت درست کردن غلظت های مورد نیاز برای رسم منحنی استاندارد برادفورد، ۶ غلظت به طریقه زیر درست شد:

BSA	0 $\mu$ L	20 $\mu$ L	40 $\mu$ L	60 $\mu$ L	80 $\mu$ L	100 $\mu$ L
آب	100 $\mu$ L	80 $\mu$ L	60 $\mu$ L	40 $\mu$ L	20 $\mu$ L	0 $\mu$ L

بر روی حجم های فوق مقدار ۱۰۰۰ ماکرولیت از واکنشگر برادفورد ریخته و در دستگاه طیف سنج در ۵۹۵ نانومتر جذب آن ها خوانده شده و منحنی استاندارد رسم شد. برای سنجش میزان پروتئین موجود تثبیت شده بر روی نانوذرات ابتدا روش بالا را برای پروتئین مقدار آنزیم اولیه لود شده بر روی نانوذرات و سپس برای محلول رویی که پس از تثبیت بعد از جدا کردن آنزیم های تثبیت شده بر روی نانوذرات به کمک مگنت بدست آمده اند، انجام می دهیم. از تفاضل غلظت های بدست آمده غلظت آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات بدست می آید.

### ۳-۶ سنجش فعالیت آنزیم لیپاز آزاد و تثبیت شده

فعالیت آنزیم لیپاز در بافر فسفات و در حضور سوبسترای اختصاصی آنزیم بنام p- نیتروفنیل پالمیتات با استفاده از طیف سنجی UV-Visible و بررسی جذب در ناحیه ۴۱۰ نانومتر انجام شد. در روش طیف سنجی UV-Visible در اثر برخورد پرتو الکترومغناطیس با ماکرومولکول حیاتی، می توان اطلاعات ساختمانی و



عملکردی و دینامیک مولکول‌های حیاتی را در محیط آبی بدست آورد. اساس آن جذب نور توسط مولکول‌ها و وابستگی طول موج‌هایی که به ساختمان و محیط اطراف مولکول، جذب و باز جذب شده است، می‌باشد.

فعالیت لیپاز آزاد بوسیله هیدرولیز p- نیتروفنیل پالمیتات (pNPP) در بافر فسفات (pH 7/4) اندازه گیری شد. بدین منظور محلول A حاوی ۶۲/۲۹ میلی گرم p- نیتروفنیل پالمیتات محلول در ۱۰ میلی لیتر ایزوپروپانول و محلول B حاوی ۰/۱ درصد وزنی حجمی عربیک گام، ۰/۴ درصد وزنی حجمی تریتون x-100 و ۱۰ میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار pH 7/4 آماده شد. سپس محلول سوبسترا از مخلوط کردن ۱ حجم از محلول A با ۹ حجم از محلول B مخلوط شده و در کووت دستگاه تا دمای ۴۰ درجه سانتیگراد گرم شده و به آن ۱۵ ۰/ میلی لیتر از محلول آنزیم لیپاز آزاد ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بافر تریس pH 4/7 اضافه شده و بلافاصله جذب آن در ۴۱۰ نانومتر خوانده شد. محلول شاهد حاوی تمام اجزای محلول واکنش منهای آنزیم می‌باشد. بجای آنزیم از همان مقدار آب مقطر استفاده می‌شود.

هنگام سنجش فعالیت آنزیم لیپاز تثبیت شده تمام مراحل بالا تکرار شده و بجای آنزیم لیپاز آزاد، آنزیم تثبیت شده در واکنش بکار برده شد. در این آزمایش تشکیل ماده p- نیتروفنول (pNP) تولید شده در مخلوط است که با استفاده از دستگاه طیف سنج در ۴۱۰ نانومتر اندازه گرفته می‌شود.

### ۳-۷ تولید بیودیزل به روش شیمیایی

#### ۳-۷-۱ مواد اولیه و آماده سازی اولیه

روغن خوراکی کانولا، چربی حیوانی، روغن غیر خوراکی پالم و پسماند آشپزخانه به عنوان ۴ منبع روغنی برای تولید بیودیزل بکار برده شده اند. روغن های خوراکی کانولا و غیر خوراکی پالم بدون نیاز به آماده سازی خاصی بطور مستقیم در تولید بکار برده شده اند. روغن پسماند آشپزخانه پس از عبور دادن از صافی جهت جداسازی ذرات باقیمانده غذا در آنها به منظور خروج آب اضافی تا دمای ۶۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شده اند. چربی حیوانی نیز پس از خورد کردن به قطعات ریز بر روی حرارت قرار داده شده و سپس روغن مایع آن از قسمت های جامد باقیمانده خارج شده و مجدداً به منظور خروج آب اضافی از سیستم تا دمای ۶۰ درجه سانتیگراد حرارت دهی شده است.

#### ۳-۷-۲ طراحی رآکتورهای تولید بیودیزل

بطور معمول سه نوع رآکتور برای تولید بیودیزل استفاده می شود:

- رآکتور بچ (batch reactors)، فرآیند بچ ارزان است، نیاز به سرمایه و زیرساخت های اولیه سرمایه گذاری بسیار کمی دارد. انعطاف پذیر است و به کاربر اجازه تغییر در نوع مواد اولیه، ترکیب، و کمیت ها را می دهد. اشکال عمده این روش بهره وری پایین، تنوع زیاد در کیفیت محصول، و نیاز داشتن به کاربردی و انرژی بیشتر است.
- رآکتور جریان نیمه پیوسته (semi-continuous-flow reactors)، فرآیند نیمه پیوسته شبیه به پروسه بچ است بجز اینکه شروع فرآیند توسط یک واکنش با حجم کوچکی از حجم ظرف انجام خواهد شد و پس از آن همچنان به اضافه کردن مواد ادامه داده می شود تا ظرف پر شود. در این فرآیند کار فشرده است و معمولاً استفاده نمی شود.

- رآکتور جریان پیوسته (continuous-flow reactors)، در تولید تجاری مقیاس بزرگ فرآیندهای تبادل استری پیوسته بیش از فرآیندهای بیج ترجیح داده می شوند زیرا این فرآیند منجر به تولید محصول با کیفیت ثابت با صرف سرمایه و هزینه های عملیاتی کم به ازای هر واحد از محصول میشود. رایج ترین نوع رآکتور پیوسته جریان رآکتور تانک - همزندان است. انواع دیگر از رآکتور با جریان پیوسته نیز استفاده تجاری می شوند، از آن جمله رآکتور مافوق صوت و رآکتور فوق بحرانی است. این روش جایگزین می تواند سرعت واکنش را بالا ببرد.

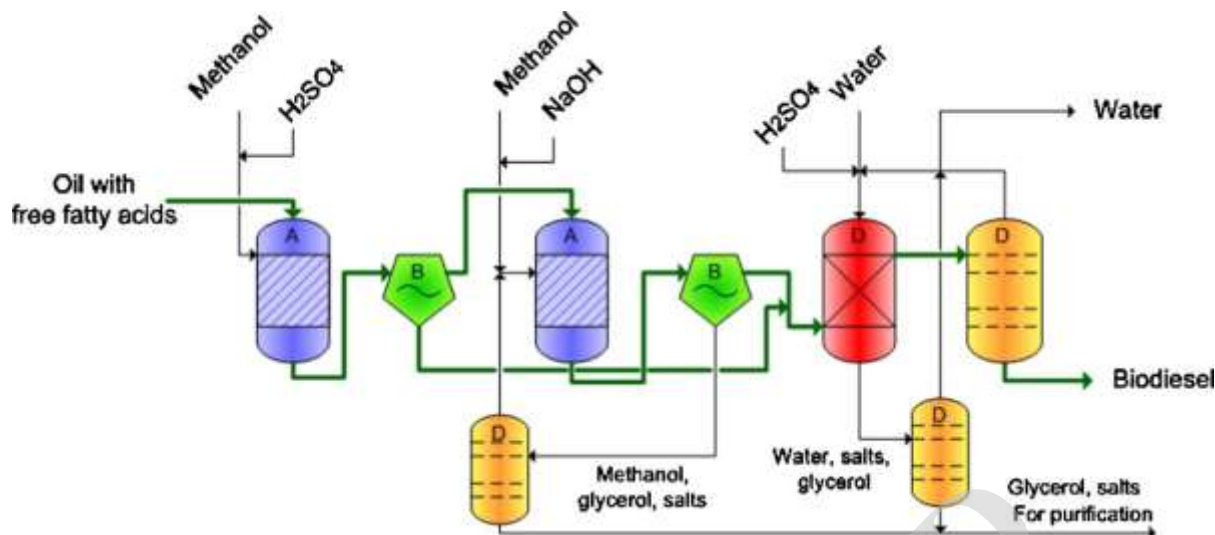
در این طرح رآکتور انتخابی ما رآکتور بیج می باشد زیرا علاوه بر ارزان بودن امکان کنترل و تغییر مواد اولیه و خروجی را نیز داریم که لازمه انجام طرح بوده است.

رآکتور بیج شامل اجزای ساده ای چون یک مخزن است که بوسیله یک محرک یا همزن مجهز شده است. مخزن با واکنش دهنده ها (در این مورد روغن، الکل، و کاتالیزور شیمیایی، آنزیم آزاد یا متصل به نانوذرات) پر شده است، و همزن آن (مگنت درون محلول) برای مدت زمان مشخصی کار می کند. پس از سپری شدن زمان مورد نیاز محتویات رآکتور خارج شده و وارد فرآیند های دیگر می شوند.

مشخصه اصلی یک رآکتور بیج این است که با ریختن مواد اولیه واکنش شروع شده موجب می شود آن مواد واکنش دهند و سپس پس از طی زمانی خاص با تولید محصولات به پایان می رسد. پس یک رآکتور بیج شامل انواع مختلفی از مواد خواهد بود بسته به این که در چه زمانی از آن نمونه برداری شود.

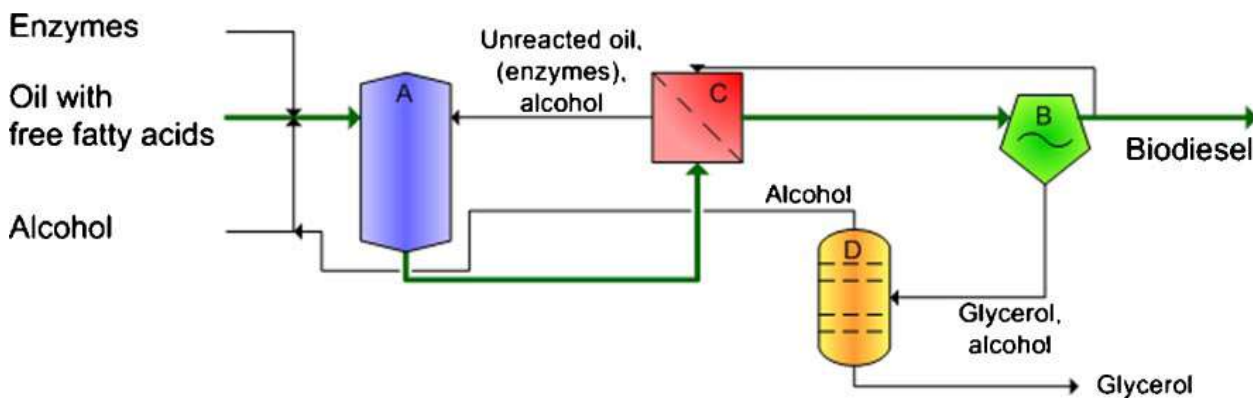
رآکتورهای بیج به طور کلی در پروژه های تولید بیودیزل کوچک استفاده می شوند. نقطه ضعف فرآیندهای بیج این است که برای افزایش تولید، ممکن است افزایش اندازه فیزیکی رآکتور متناسب با مقدار مواد (با خرید رآکتور دیگری، برای مثال) لازم باشد.

بطور شماتیک رآکتور سنتی تولید بیودیزل در صنعت در شکل ۱۹ خلاصه شده است.



شکل ۱۹) پروسه سنتی تولید بیودیزل با مراحل آماده سازی اسیدی و بدنبال آن استفاده از کاتالیست آلکالاین. (A) رآکتور (B) جداسازی (ساتریفیوژ یا دکانتور) (D) خالص سازی تولید و ریکاوری الکل

رآکتور شماتیک تولید آنزیمی بیودیزل نیز در شکل ۲۰ ارائه شده است. مراحل تولید بیودیزل با استفاده از آنزیم موجب کاهش مراحل مورد نیاز در رآکتور خواهد شد. آنزیم ها در مقایسه با کاتالیست های اسیدی و آلکالاینی رایج بسیار تطبیق پذیرتر هستند. نسبت به تنوع در کیفیت مواد خام منعطف ترند و قابلیت استفاده مجدد دارند. قادر به تولید بیودیزل در مراحل کمتر با استفاده از انرژی کمتر هستند و میزان پسماند کمتری تولید می کنند. قادر به ارتقا سیستم جداسازی محصول هستند و قادر به تولید گلیسرول با کیفیت بالاتر هستند. رآکتور بیچ آزمایشگاهی استفاده شده در طرح در شکل ۶ نمایش داده شده است.



شکل ۲۰) (A رآکتور؛ B جداسازی (سانتریفیوژ یا دکانتور)؛ C کاتالیزور آنزیمی و فیلتر؛ D الکل ریکاوری

### ۳-۷-۳ تولید بیودیزل در رآکتور

۲۰۰ میلی لیتر از متانول با ۱/۰۶ گرم KOH به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شد تا محلول شفاف بدست آید. محلول متوکسید پتاسیم آماده شده به طور جداگانه به هر یک از منابع روغنی اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در رآکتور آزمایشگاهی (مخزنی با درب بسته) ریخته شد. واکنش در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و در مدت زمان انجام ۸ ساعت انجام شد. در تمام مدت انجام واکنش مخلوط به آرامی شیک شده است.

### ۴-۷-۳ جداسازی محصولات

هنگامی که واکنش کامل شود، دو محصول عمده وجود دارد: گلیسرین و بیودیزل. هر کدام نیز مقدار قابل توجهی الکل اضافه دارند که در واکنش استفاده می شوند. مخلوط واکنش یافته در روش تولید کاتالیز شیمیایی بعضی مواقع اگر لازم باشد باید بوسیله کاتالیزور اسیدی یا بازی خنثی شود. فاز گلیسرین بسیار چگالتر از فاز بیودیزل می باشد و بوسیله یک دکانتور گلیسرین را به طریق گرانشی از ته ظرف جدا می شود.



شکل (۲۱) مرحله جداسازی بیودیزل و گلیسرین (محلول تیره رنگ زیرین)

### حذف الکل

هنگامی که فازهای گلیسرین و بیودیزل از هم جدا شوند، الکل اضافه در هر کدام نیز باید حذف شود که این کار توسط یک پروسه تبخیر ناگهانی یا توسط تقطیر انجام می شود. در سیستم های دیگر الکل جداسازی می شود و مخلوط خنثی می شود. قبل از آنکه گلیسرین و استرها از یکدیگر جدا شوند. در هر مورد، الکل با استفاده از تجهیزات تقطیر بازیافت می شود و دوباره استفاده می شود. باید مواظب بود که در الکل بازیافتی آب جمع نشود.

### ۳-۷-۴ شستشوی بیودیزل

در روش شیمیایی بیودیزل تولید شده دارای مواد اضافی می باشد. بیشتر ناخالصی ها بر روی لایه گلیسرول قرار می گیرد و شامل ذرات فیلتر نشده، متانول و گلیسرین هستند. همچنین آب موجود در بیودیزل میتواند رشد میکروارگانیسم ها را افزایش دهد و باعث فاسد شدن سوخت گردد. متانول واکنش نداده در سوخت

بیودیزل میتواند باعث احتراق زود رس شده و اجزای موتور را فرسوده کند. یکی دیگر از دلایل شستشوی بیودیزل احیای متانول می باشد زیرا این ماده گران قیمت است و احیای آن باعث صرفه جویی در هزینه ها می شود.

روش های شستشو

سه روش برای شستن بیودیزل وجود دارد:

۱- شستن به روش مخلوط کردن (Agitation Washing)

۲- شستشو به روش مه پاشی (Mist Washing)

۳- شستشو به روش حباب سازی (Bubble Washing)

فرآیند شستشوی بیودیزل شامل مخلوط کردن آن با آب است، آب از الکل سنگین تر است و الکل اضافی هیدروکسید پتاسیم و صابون معلق را جذب میکند. بعد از شستشو و ته نشینی، آب به همراه ناخالصی ها جدا می شود. عملیات شستشو باید چندین بار تکرار شود. اولین آبی که از ته ظرف جدا میشود شیری رنگ است و آخرین آب جدا شده از بیودیزل زلال است. هیدروکسید پتاسیم اضافی در بیودیزل وقتی با آب ترکیب می شود تشکیل صابون می دهد و میتواند براحتی جدا شود.

در اینجا از روش مخلوط کردن جهت شستشوی بیودیزل تولیدی استفاده شده است. در این روش به آرامی دو مقدار مساوی از آب و بیودیزل شسته نشده را با هم مخلوط کرده و مدتی ساکن نگه داشته ایم تا ته نشین شود. این عمل چند بار تکرار می شود تا آب زلال گردد و در انتها بیودیزل از بالای آب بوسیله دکانتور جدا می شود.



شکل (۲۲) مرحله شستشوی بیودیزل تولیدی



### ۳-۸ تولید آنزیمی بیودیزل (آنزیم آزاد و تثبیت شده)

#### ۳-۸-۱ تولید در رآکتور بچ آزمایشگاهی

مخلوط آغازین واکنش شامل روغن و متانول با نسبت مولی ۱:۲ و ۲۰ u آنزیم لیپاز آزاد یا تثبیت شده می باشد. در هر دور روش تولید به کمک آنزیم آزاد و آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات در این مرحله مخلوط واکنش وارد مخزن حاوی منبع روغنی شده و واکنش جهت تولید بیودیزل در شرایط مناسب آزمایشگاهی از نظر دما و pH به سمت تولید محصول هدایت خواهد شد. در اینجا از یک مخزن دردار به عنوان رآکتور بچ تولید سوخت استفاده می شود. درون مخزن دماسنج و همزن و ورودی و خروجی مواد اولیه و نیز محصولات تولید شده قرار داده شد. واکنش ترانس استریفیکاسیون آنزیمی در دمای بهینه فعالیت آنزیم ۵۴ درجه سانتیگراد و pH ۷/۴ انجام شده و در بازه های زمانی مناسب از مخزن نمونه برداری شده و میزان تولید محصولات برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم سنجیده می شود.

#### ۳-۸-۲ استخراج محصولات و تعیین کیفیت بیودیزل تولید شده

پس از پایان واکنش نمونه ها ابتدا در مجاورت میدان مغناطیسی یک آهن ربا قرار گرفته تا آنزیم متصل به نانوذرات از محلول جدا شود. در مخلوط حاوی آنزیم آزاد با کمک سانتریفیوژ با دور مخصوص رسوب پروتئین ها از سیستم جدا می شود. سپس مخلوط حاصل در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند تا گلیسرول تولیدی رسوب کرده و از بیودیزل جدا شود. از آنجا که آنزیم تثبیت شده در اتصال به نانوذرات مغناطیسی است با استفاده از یک میدان مغناطیسی به راحتی از بیودیزل تولیدی جدا خواهد شد. استفاده از این روش موجب افزایش پایداری آنزیم شده و در مرحله استخراج محصول موجب کاهش هزینه تولید گردیده امکان استفاده مجدد از آنزیم را فراهم می آورد.

در تولید بیودیزل به کمک آنزیم ها فعالیت لیپاز در مخلوط های دارای متانول بیش از مقدار معادل  $M \ 1/5$ ، بازداشته می شود. بنابر این نیاز است که متانول را به صورت مرحله به مرحله به سیستم تولید اضافه کنیم تا از ممانعت متانولی جلوگیری کنیم. در این تحقیق متانول در سه مرحله زمانی به سیستم تولید بیودیزل وارد شد.

### ۳-۸-۳ تعیین کیفیت بیودیزل شیمیایی و آنزیمی (تست الکلی)

۲۵ میلی لیتر از بیودیزل تولید شده در روش شیمیایی در ۲۲۵ میلی لیتر از متانول حل شد. بیودیزل تولید شده باید در متانول بطور کامل حل شود. وجود رسوب به معنی وجود ناخالصی در بیودیزل است. برای انجام تست برای بیودیزل های تولید شده در روش آنزیمی حجم بیودیزل و الکل به ۱ دهم کاهش یافت.

### ۴-۸-۳ تعیین کیفیت بیودیزل شیمیایی و آنزیمی (استفاده از دستگاه GC)

در این مرحله نمونه ها با کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد سنجش محتوای متیل استر موجود در محصول سنجیده می شوند. این بخش از آزمایشگاه ابتدا با کمک دستگاه GC دارای ستون غیر اختصاصی به منظور برآورد اولیه کیفیت محصولات بررسی شده و سپس با توجه به لزوم تایید کیفیت محصول تولیدی در طرح از طرف مرجع زی صلاح مربوطه و منطبق بر مصوبه شورای محترم بررسی به منظور استفاده از دستگاه GC دارای ستون اختصاصی بیودیزل به مرکز تحقیقات انرژیهای تجدیدپذیر دانشکده مکانیک دانشگاه تربیت مدرس ارسال شده است. همچنین تست های سنجش نقطه اشتعال و تعیین ویسکوزیته بیودیزل تولیدی نیز در آن مرکز انجام می پذیرد. نتایج مربوط به این بخش هنوز از طرف آن مرکز به پژوهشکده ارسال نشده و نیاز به زمانی حدود دو هفته دارد.



۴- فصل چهارم: نتایج حاصل از پژوهش

Archive of SID

#### ۴-۱ انتخاب منابع روغنی مورد استفاده در تولید بیودیزل و آماده سازی آنها

##### ۴-۱-۱ روغن های گیاهی

روغن های خوراکی مانند سویا، آفتابگردان، پالم، ذرت، کتان، کانولا و زیتون بطور گسترده در ترانس استریفیکاسیون آنزیمی استفاده شده اند. در کشورهای پیشرفته روغن های خوراکی بیش از ۹۵ درصد از مواد اولیه تولید بیودیزل را تشکیل می دهند به این دلیل که بیودیزل تولید شده از این روغن ها شباهت بسیار زیادی به دیزل بر پایه نفت خام دارد. همچنین، کشور و آب و هوای آن، درصد روغن و بازده در هر هکتار عوامل موثر در انتخاب مواد اولیه برای تولید سوخت است. به عنوان مثال، روغن کلزا غالب تولید اتحادیه اروپا، روغن سویا غالب تولید ایالات متحده و آمریکای لاتین و روغن پالم عمدتاً در آسیا مورد استفاده قرار می گیرند. روغن های غیر خوراکی به دلیل از جمله اجزای سمی به مصرف خوراک انسان را نمی رسند. بنابراین روغن غیر خوراکی با محصولات غذایی در رقابت نیست. از این رو، روغن های گیاهی غیر خوراکی مواد اولیه جایگزین برای تولید بیودیزل می باشند. باباسو<sup>۷۷</sup>، جاتروفا کارکاس<sup>۷۸</sup>، نیم<sup>۷۹</sup>، پولانگا<sup>۸۰</sup>، کارانجا<sup>۸۱</sup>، دانه درخت کائوچو<sup>۸۲</sup>، ماهوا<sup>۸۳</sup>، تنباکو، درخت کتان ابریشمی و غیره منابع روغن های گیاهی غیر خوراکی هستند. جاتروفا یکی از مواد اولیه مورد توجه در میان انواع دانه های روغنی است چرا که از نظر علمی توسعه یافته و دارای بازده بیودیزل بالاتر و تولید محصول بیشتری می باشد. روغن خام جاتروفا حاوی ۱۴ درصد اسید چرب آزاد است که برای تولید بیودیزل با کاتالیزور های آلکالاینی بسیار زیاد است. از طرفی محتوای بالای اسیدهای چرب در فرآیند تولید بیودیزل به روش آنزیمی مشکلی ایجاد نمی کند. در کنار جاتروفا ۲۶ گونه از روغن های متیل

<sup>77</sup> Babassu(Orbinya martiana)

<sup>78</sup> Jatropha curcas (Linnaeus)

<sup>79</sup> neem (Azadiracta indica)

<sup>80</sup> polanga (Calophyllum inophyllum)

<sup>81</sup> inophyllum),karanja (Pongamia pinnata)

<sup>82</sup> rubber seed tree (Hevea brasiliensis)

<sup>83</sup> mahua (Madhuca indica and Madhuca longifolia)

استر اسید چرب شامل *Pongamia pinnata* و *Calophyllum inophyllum* ، *Azadirachta indica* ، تولید بیودیزل مناسب شناخته شده اند، که با استاندارد بیودیزل اروپا، آلمان و امریکا تطابق زیادی دارند. مدی و همکاران تبدیل روغن خام کارانجا و جاتروفا را از طریق تثبیت نووزایم<sup>۸۴</sup>۴۳۵ به بیودیزل با بازده به ترتیب ۹۰ و ۹۲/۷ درصد گزارش کرده اند].

در این طرح روغن خوراکی پالم و روغن کلزا به عنوان منابع خوراکی ارزان قیمت و در دسترس انتخاب شدند. این روغن ها به صورت خالص خریداری شده اند، لذا نیازی به آماده سازی اولیه نداشتند.

#### ۴-۱-۲ چربی ها / روغن های پسماند

به طور کلی، در سراسر جهان تنها نیمی از روغن های خوراکی غیر قابل مصرف به عنوان خوراک دام و یا به عنوان ماده خام برای روان کننده ها و رنگ ها بازیافت می شوند و بقیه در محیط زیست باقی می ماند. از این رو استفاده از چربی یا روغن پسماند برای تولید بیودیزل اهمیت زیادی در کاهش و بازیافت روغن پسماند، در پاک سازی محیط زیست و کاهش ریسک سلامت بوجود آمده بوسیله روغن پسماند دارد و هزینه تولید بیودیزل را پایین می آورد. روغن دور ریز آشپزی، چربی حیوانات، گریس زرد، گریس قهوه ای بدست آمده از گریس زرد اکسید شده یا گریس پسماند بازیافت شده از لوله کشی ها و لجن زباله یا استوک صابون گرفته شده از فرآیند تصفیه روغن های گیاهی بیشترین منابع از روغن های پسماند استفاده شده در تولید بیودیزل بوده اند. انتخاب کاتالیست برای استفاده در تولید بیودیزل اغلب تحت تاثیر مقدار محتوای اسید چرب آزاد در منابع مختلف است. واکنش لیپاز-کاتالیز یک روش مورد اعتماد برای تبدیل روغن پسماند - که حاوی درصد بالایی از اسید چرب آزاد است و نیز محتوای بسیار زیاد آب دارد- به بیودیزل با بازده بالا می باشد.

در این طرح از روغن پسماند آشپزی تهیه شده از رستوران دانشکده حقوق دانشگاه شهید بهشتی به عنوان منبع روغن پسماند آشپزی استفاده می شود. وجود ناخالصی مانند آب یا فسفاتید ها و یا رنگدانه ها می تواند

<sup>84</sup> Novozyme 435

تبدیل تری گلیسیرید به استر را از مسیر اصلی خود خارج نماید. لذا فیلتراسیون روغن جهت جداسازی ذرات معلق و انواع دیگر ناخالصی ها انجام گرفته و پس از صاف شدن و زدودن مواد غذایی اضافی موجود در روغن به منظور حذف آب اضافی موجود، روغن تا دمای ۶۰ درجه حرارت داده شده و سپس تا دمای ۳۷ درجه سانتیگراد خنک گردید.

چربی حیوانی استفاده شده در این طرح **پیه گاوی** تهیه شده از قصابی می باشد. از آنجا که چربی های حیوانی بسیار ویسکوز بوده و نیز متشکل از انواع اسیدهای چرب اشباع می باشند در دمای محیط به صورت جامد دیده می شوند. لذا قبل از استفاده در تولید بیودیزل نیاز به حرارت دهی و تبدیل حالت آن به مایع دارد.



شکل (۲۳) چربی حیوانی

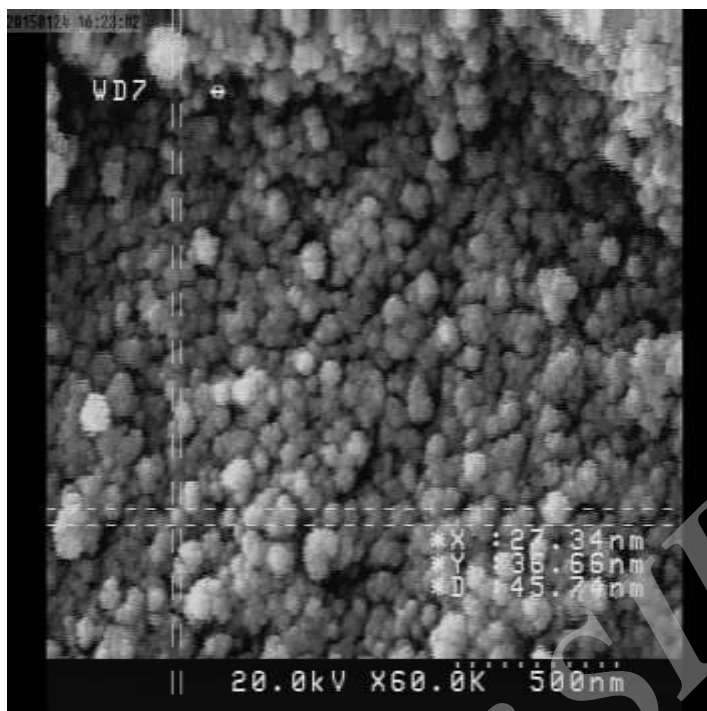
#### ۴-۲ آنالیز مورفولوژیکی نانوذرات سنتز شده

برای آنالیز سایز از دستگاه های میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۸۵</sup> SEM و میکروسکوپ الکترونی عبوری<sup>۸۶</sup> TEM استفاده شد. هر دو نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  و  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  در میکروسکوپ SEM دارای شکل کروی و ابعاد آنها در بازه ۲۰ تا ۵۰ نانومتری مشاهده می شود. مطالعه SEM علاوه بر اینکه نشان دهنده تشکیل نانوذرات در ابعاد نانویی است، تجمع یافتگی نانوذرات را به دلیل افزایش زیاد سطح به حجم در آنها را نیز نشان می دهد. چرا که ابعاد کم این نانوذرات موجب تجمع یافتگی یا آگلومره شدن آنها در برخی از نقاط و نمایش آنها با قطر بیشتر شده است. زیرا اندازه بسیار کم باعث افزایش زیاد نیروی جاذبه سطحی در نانو ذرات می شود. همچنین به دلیل خاصیت مغناطیسی قوی و اندازه بسیار کوچک آنها ذرات بسیار ریز به صورت به هم چسبیده مشاهده می شوند.

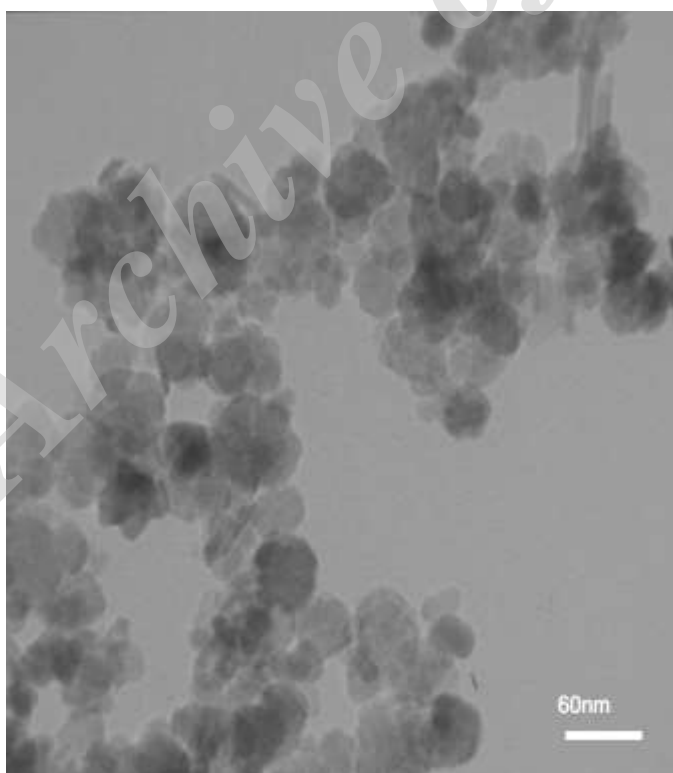
به دلیل وجود این ویژگی تجمع یافتگی و نیز به منظور بررسی دقیقتر اندازه و شکل آنها، نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM نیز بررسی شده اند. در شکل اندازه استاندارد برای نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ۶۰ نانومتر و برای نانوذره  $\gamma\text{Fe}_3\text{O}_4$  ۴۰ نانومتر (شکل ۲۵-۲۷) گذاشته شده است که با استفاده از آن می توان حدود اندازه نانو ذرات را تخمین زد. همچنین مشاهده می شود که قسمت های تیره تر نشان دهنده تجمع ذرات می باشد و در برخی قسمت ها وجود لکه های روشن و تیره در کنار هم نشانه قرار گرفتن یک ذره در زیر قسمتی از ذره دیگر و تیره تر کردن آن قسمت می باشد.

<sup>85</sup> scanning electron microscope

<sup>86</sup> transmission electron microscope

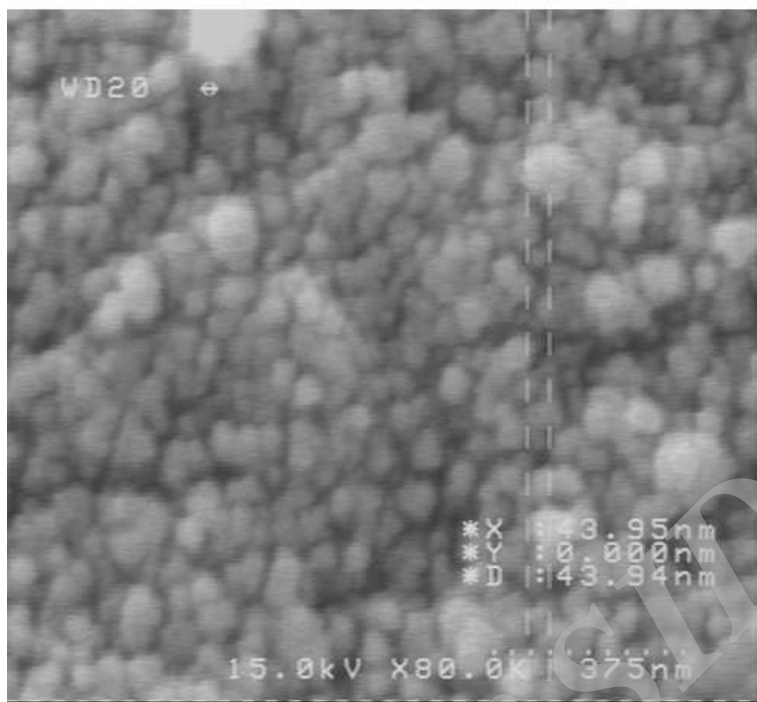


شکل ۲۴) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی  $Fe_3O_4$

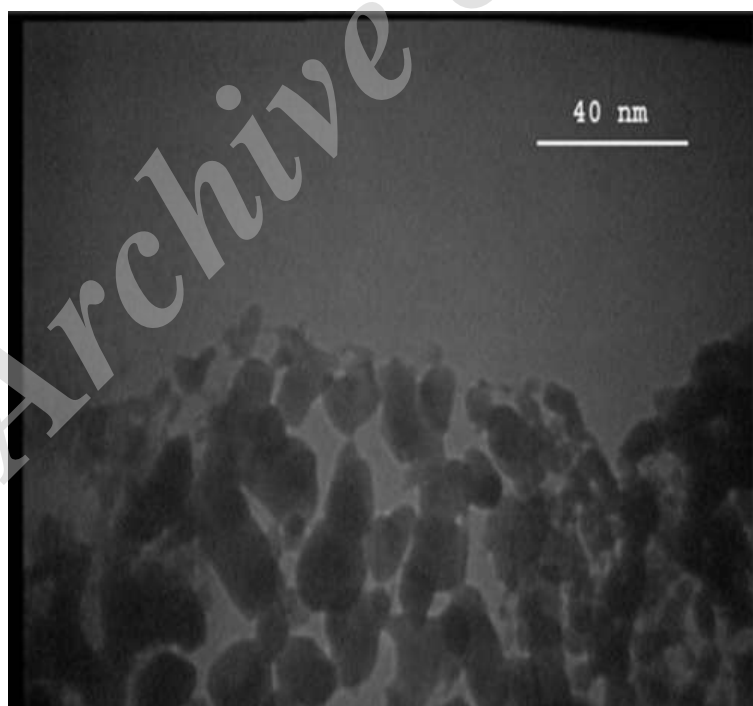


شکل ۲۵) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری  $Fe_3O_4$





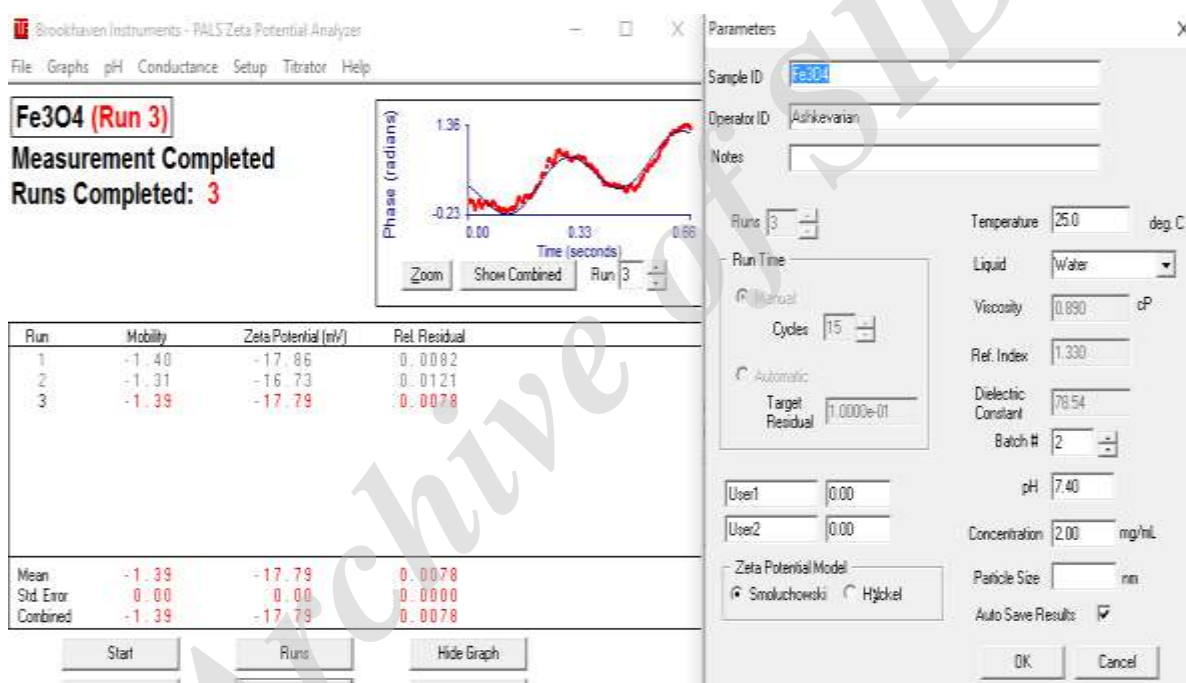
شکل ۲۶) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>



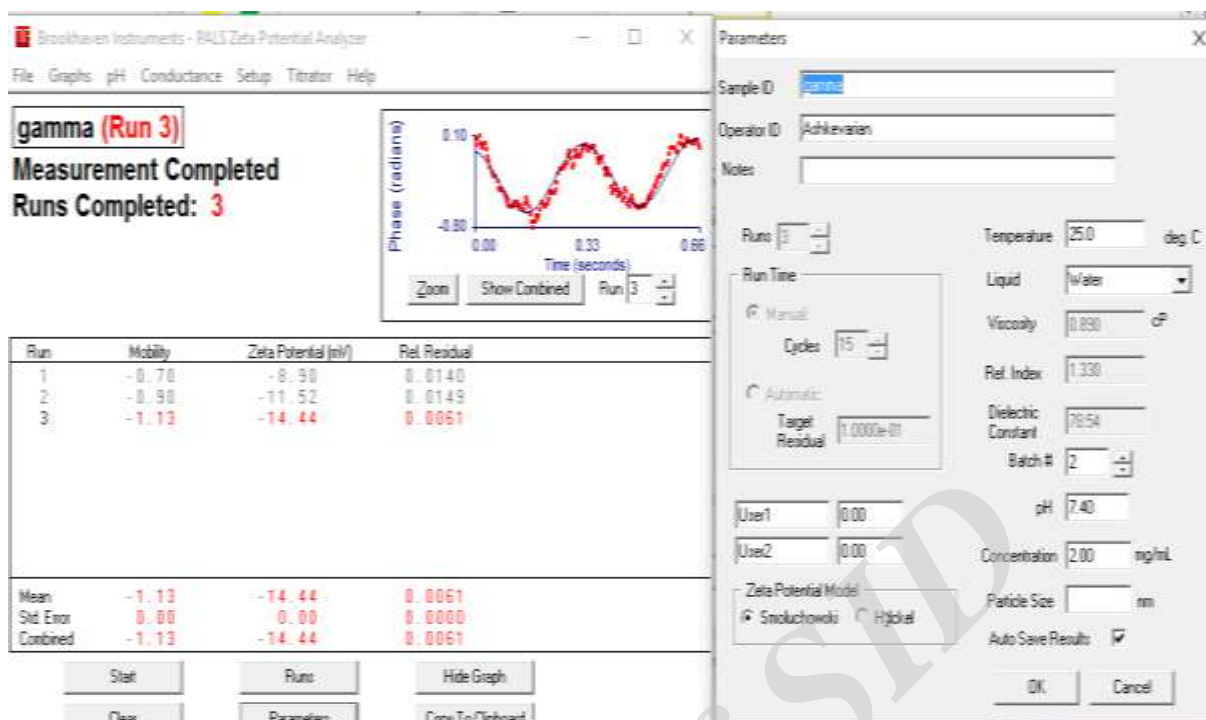
شکل ۲۷) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

### ۳-۴ سنجش پتانسیل زتای نانوذرات سنتز شده

با بررسی بار سطحی نانوذرات سنتز شده پتانسیل زتای نانوذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> با انجام آزمایشی با سه بار تکرار در دستگاه DLS بطور میانگین ۱۷- میلی ولت بدست آمد. این آزمایش برای نانوذرات  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> نیز انجام شده و مقدار پتانسیل زتای آن بطور میانگین ۱۴- میلی ولت بدست آمده است. محیط نرم افزاری دستگاه DLS در حالت اندازه گیری پتانسیل زتا، پارامترهای بکار برده شده در آزمایش و نتایج بدست آمده در شکل های زیر نمایش داده شده اند.



شکل ۲۸ پتانسیل زتای نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>



شکل ۲۹) پتانسیل زتای نانوذرات  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

#### ۴-۴ نتایج سنجش میزان پروتئین در محلول آنزیم آزاد و تثبیت شده



شکل ۳۰) تغییر رنگ محلول های حاوی پروتئین با ۶ غلظت متفاوت از BSA در حضور واکنشگر برادفورد. هرچه میزان پروتئین

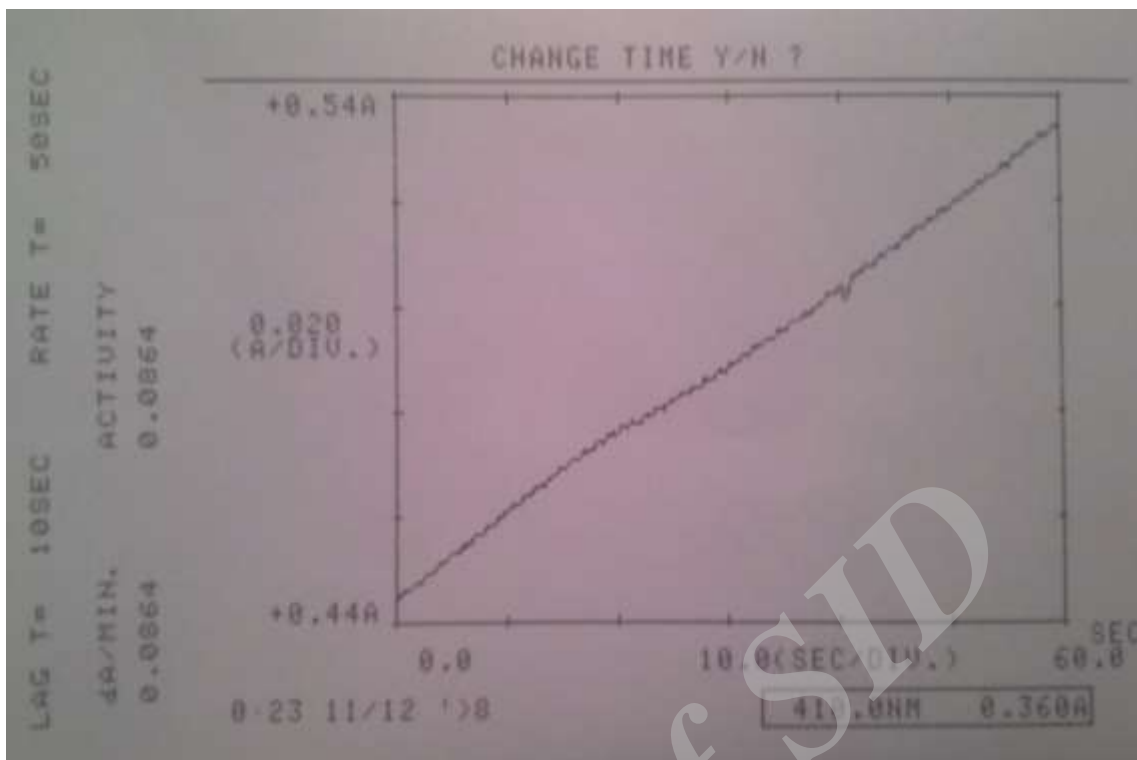
بیشتر باشد رنگ آبی پررنگ تری مشاهده می شود.



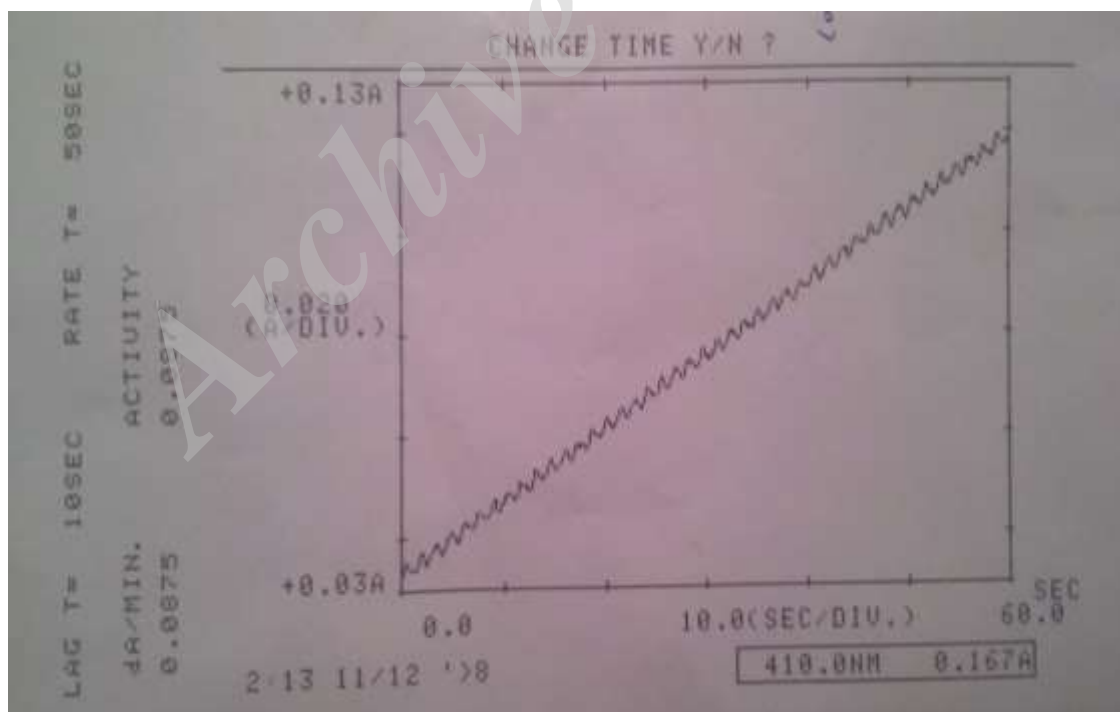
شکل ۳۱) تغییر رنگ معرف بردفورد به رنگ با تنالیته آبی در حضور آنزیم بخصوص در محل تجمع نانوذرات در انتهای ویال ها به وضوح قابل مشاهده می باشد. رنگ آبی سمت راست محلولی برثفورد شاهد با ۱۰۰ درصد پروتئین است که کاملاً به رنگ آبی در آمده است.

#### ۴-۵ سنجش فعالیت آنزیم لیپاز آزاد و تثبیت شده

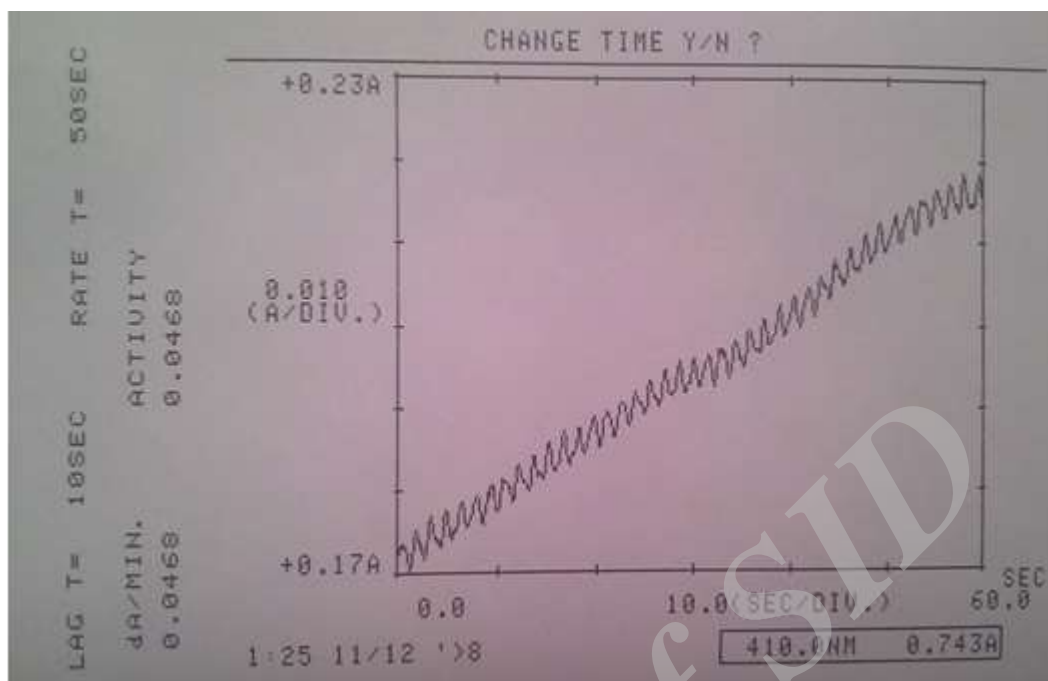
سنجش فعالیت آنزیم لیپاز تثبیت شده با استفاده از روش سنجش فعالیت ذکر شده برای آنزیم آزاد انجام شد. هر واحد از فعالیت لیپاز به این صورت تعریف شد؛ مقداری از آنزیم که بتواند در هر دقیقه ۱ میکرومول از p-نیترفنول را در شرایط سنجش آنزیمی تولید نماید. مقدار فعالیت لیپاز در اینجا ۳۵ یونیت می باشد.



شکل ۳۲) نتایج سنجش فعالیت آنزیم لیپاز آزاد



شکل ۳۳) نتایج مربوط به سنجش فعالیت آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات گاما اکسید آهن



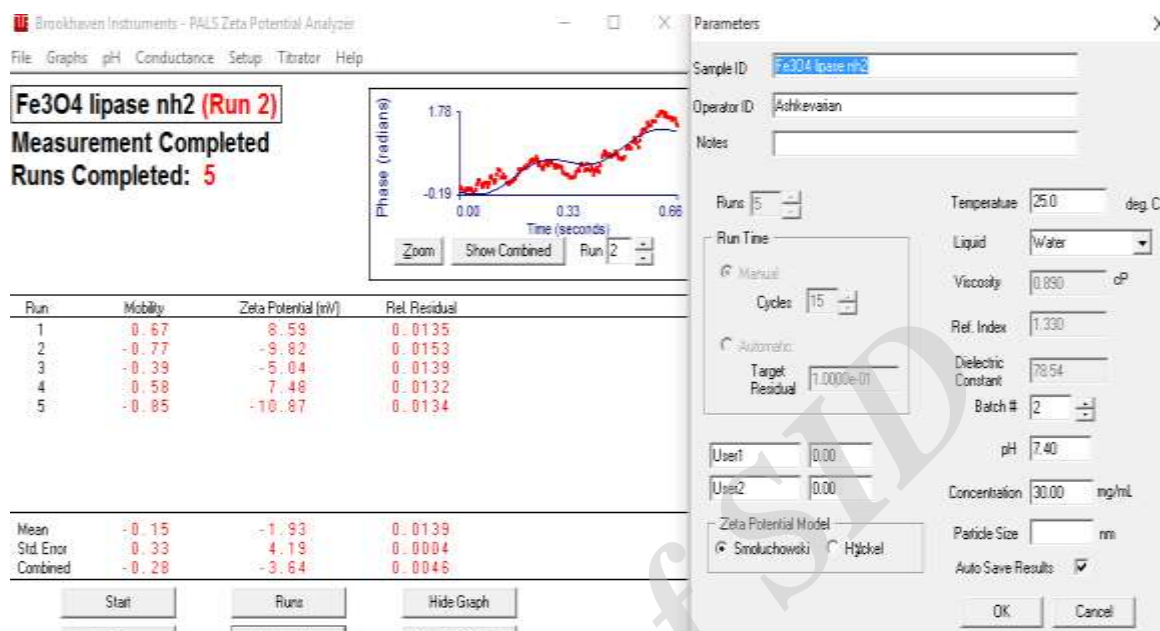
شکل ۳۴) نتایج مربوط به سنجش فعالیت آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات اکسید آهن Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

#### ۴-۶ سنجش پتانسیل زتای نانوذرات پس از تثبیت آنزیم به روش تکنیک اتصال کوالانسی

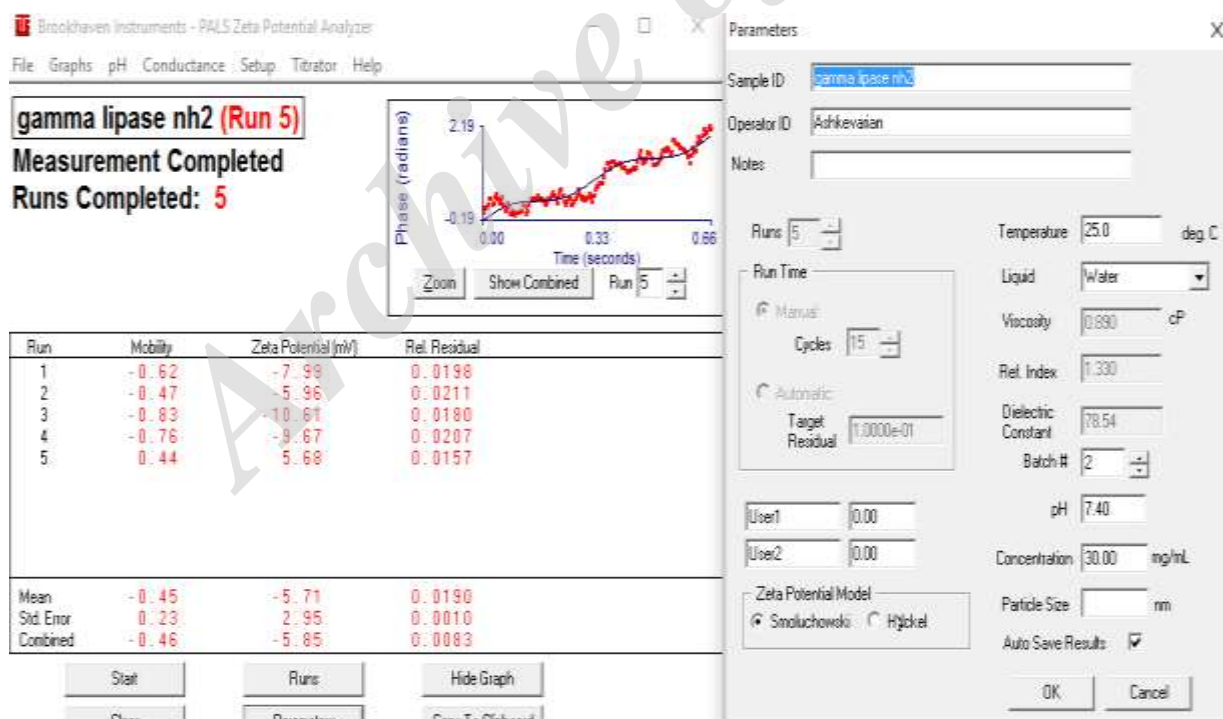
امروزه یکی از دقیق ترین راه های تایید انجام مراحل تثبیت بر روی نانوذرات مقایسه تغییرات بار سطحی نانوذرات قبل و پس از انجام تثبیت می باشد. در اینجا پس از انجام تثبیت آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات مغناطیسی بررسی پتانسیل زتای نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> با انجام آزمایشی با ۵ بار تکرار در دستگاه DLS بطور میانگین ۱- میلی ولت بدست آمد. این آزمایش برای نانوذرات  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> که بر روی آنها آنزیم لیپاز تثبیت شده بود نیز انجام شده و مقدار پتانسیل زتای آن بطور میانگین ۵- میلی ولت بدست آمده است. محیط نرم افزاری دستگاه DLS در حالت اندازه گیری بار سطحی و پتانسیل زتا، پارامترهای بکار برده شده در آزمایش و نتایج بدست آمده در شکل های زیر نمایش داده شده اند.

در مورد هر دو نانوذره نتایج حاصل از بررسی پتانسیل زتا نشان دهنده وجود تغییرات در بار سطحی نانوذرات بوده و این موضوع به منظور تایید اتصال پروتئین بر روی نانوذره است. زیرا آنزیم با برقراری اتصال کوالان با

سطح نانوذرات موجب ایجاد تغییر در سطح نانو ذرات شده است و این موضوع با استفاده از دستگاه DLS تحقیق شده است.



شکل ۳۵) پتانسیل زتای نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  آمین دار شده و متصل به آنزیم لیپاز با تکنیک اتصال کووالان



شکل ۳۶) پتانسیل زتای نانوذرات  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  آمین دار شده و متصل به آنزیم لیپاز با تکنیک اتصال کووالان

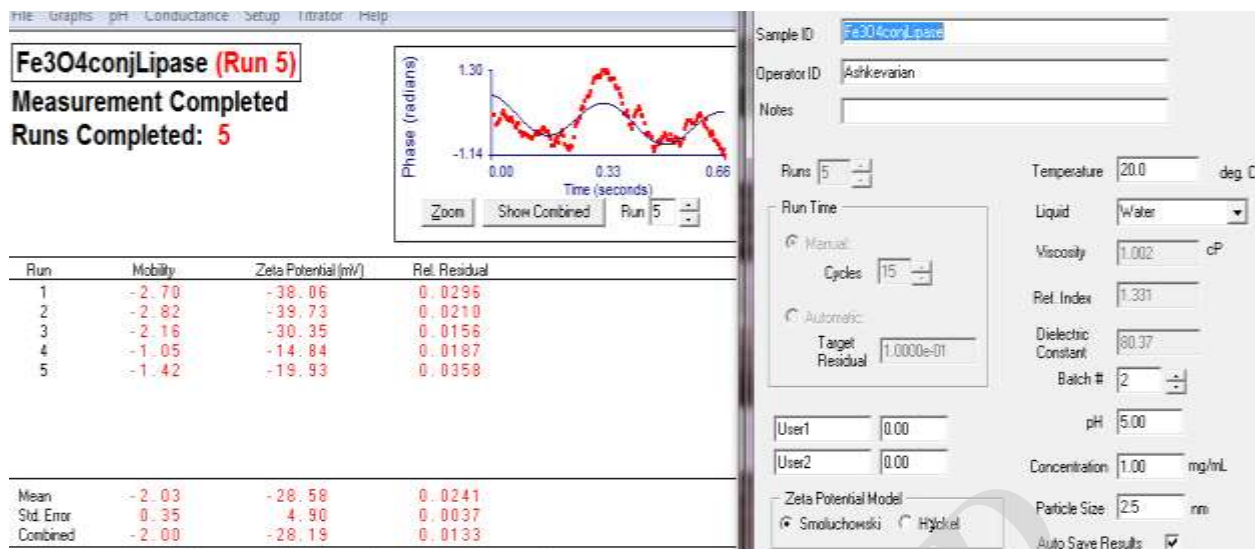
#### ۴-۷ سنجش پتانسیل زتای نانوذرات پس از تثبیت آنزیم با استفاده از تکنیک جذب

پس از انجام تثبیت آنزیم لیپاز با استفاده از تکنیک جذب بر روی نانوذرات مغناطیسی بررسی پتانسیل زتای نانوذرات  $Fe_3O_4$  با انجام آزمایشی با ۵ بار تکرار در دستگاه DLS بطور میانگین  $28/58$  - میلی ولت بدست آمد. این آزمایش برای نانوذرات  $\gamma-Fe_2O_3$  که بر روی آنها آنزیم لیپاز تثبیت شده بود نیز انجام شده و مقدار پتانسیل زتای آن بطور میانگین  $28/38$  - میلی ولت بدست آمده است. محیط نرم افزاری دستگاه DLS در حالت اندازه گیری بار سطحی و پتانسیل زتا، پارامترهای بکار برده شده در آزمایش و نتایج بدست آمده در شکل های زیر نمایش داده شده اند.

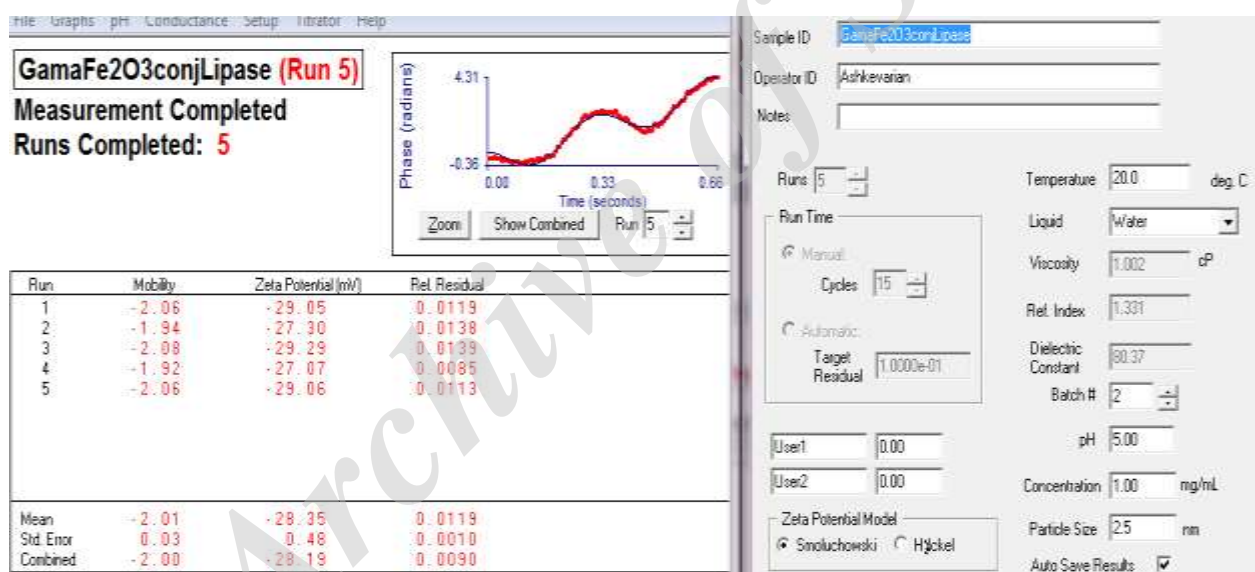
در مورد هر دو نانوذره نتایج حاصل از بررسی پتانسیل زتا تغییرات معنی داری را در بار سطحی نانوذرات نشان نمی دهد و این موضوع تائید اتصال پروتئین بر روی نانوذره را نیاز مند انجام تست های بیشتر نشان می دهد. زیرا آنزیم با برقراری اتصال غیر کوالان و ضعیف با سطح نانوذرات موجب ایجاد تغییر بسیار اندک و خارج از گستره دقت دستگاه انجام داده است و یا اینکه بدلیل اتصالات ضعیف در هنگام شستشو از دست رفته است.

این موضوع تثبیت آنزیم لیپاز به روش اتصال کوالانس را برای کاربردهای صنعتی روش کارآمد تری معرفی می کند. زیرا با وجود مقدار بسیار اندک ۲ میلی گرم بر میلی لیتر از آنزیم در محلول واکنش در تثبیت کوالان تغییرات زیادی در بار سطحی مشاهده شد که نشان دهنده میزان بارگیری زیاد نانوذره از آنزیم لیپاز بوده است.





شکل ۳۷) پتانسیل زتای نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> بدون مدیفیکاسیون و متصل به آنزیم لیپاز با تکنیک جذب



شکل ۳۸) پتانسیل زتای نانوذرات  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> بدون مدیفیکاسیون متصل به آنزیم لیپاز با تکنیک جذب

#### ۴-۸ راکتور تولیدی بیودیزل



شکل ۳۹) راکتور بیچ آزمایشگاهی برای تولید شیمیایی و آنزیمی بیودیزل

#### ۴-۹ استخراج محصولات تولید شده به روش شیمیایی

هنگامی که واکنش کامل شود، دو محصول عمده وجود دارد: گلیسیرین و بیودیزل. هر کدام نیز مقدار قابل توجهی الکل اضافه دارند که در واکنش استفاده می شوند. فاز گلیسیرین بسیار چگالتر از فاز بیودیزل می باشد و بوسیله یک دکانتور گلیسیرین به طریق گرانشی از ته ظرف جدا می شود.



شکل ۴۰) مرحله جداسازی بیودیزل و گلیسیرین (محلول تیره رنگ زیرین)

Archive of SID



شکل (۴۱) مرحله شستشوی بیودیزل تولیدی

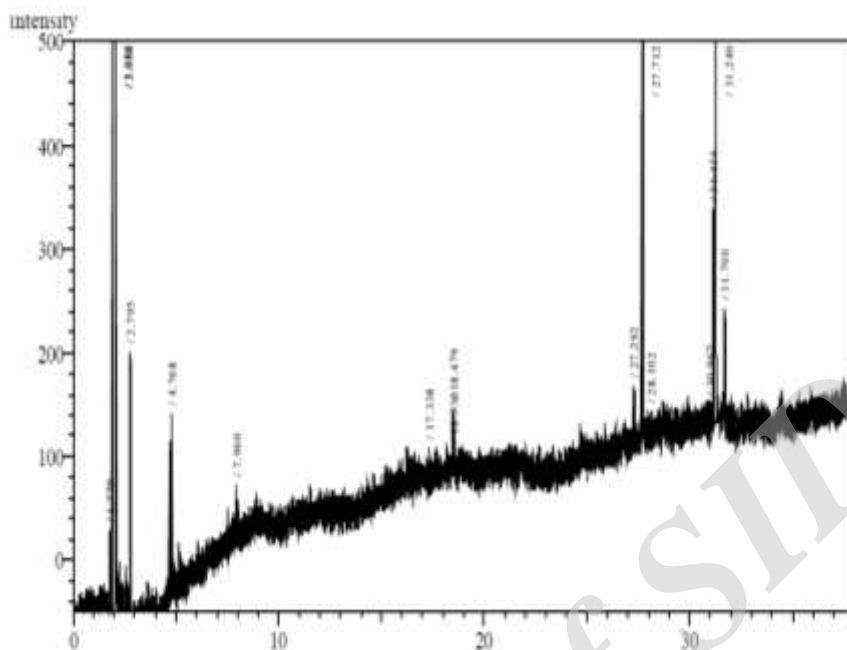


شکل ۴۲) بیودیزل های تولید شده از چهار منبع روغنی به روش شیمیایی

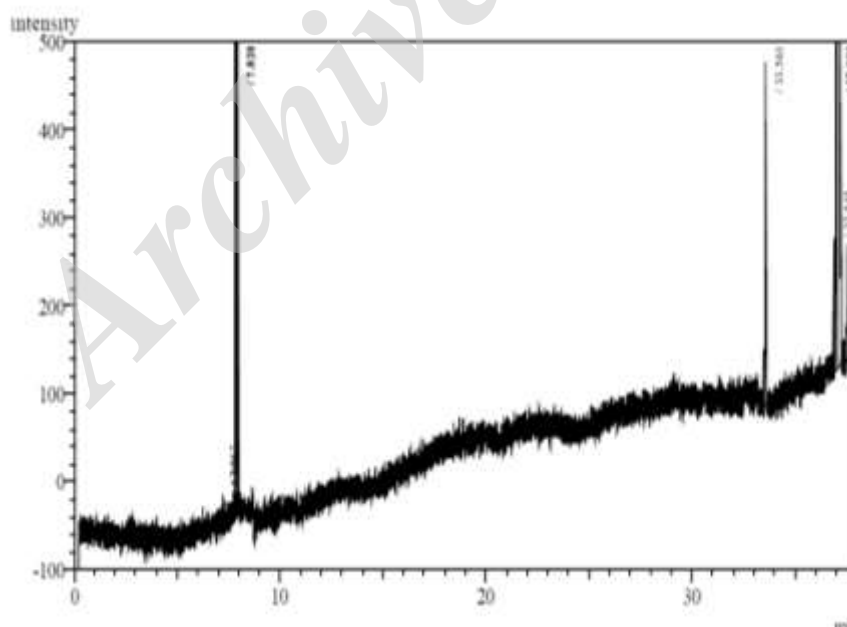
#### ۴-۱۰ تست الکلی تعیین کیفیت بیودیزل (تست کیفی)

۲۵ میلی لیتر از بیودیزل تولید شده در هر یک از مراحل بالا در ۲۲۵ میلی لیتر از متانول حل شد. بیودیزل تولید شده باید در متانول بطور کامل حل شود. وجود رسوب به معنی وجود ناخالصی در بیودیزل است. برای انجام تست برای بیودیزل های تولید شده در روش آنزیمی حجم بیودیزل و الکل به ۱ دهم کاهش یافت. در این قسمت نمونه های تولید شده همگی بدون رسوب و یا با مقدار بسیار ناچیز و قابل چشم پوشی بوده اند.

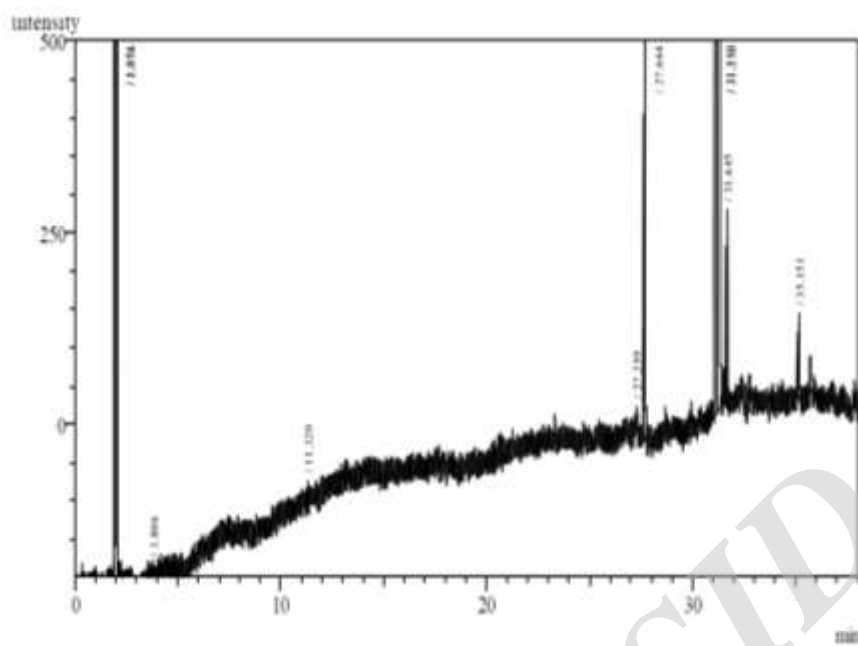
۴-۱۱ تست تعیین کیفیت با استفاده از کروماتوگرافی گازی



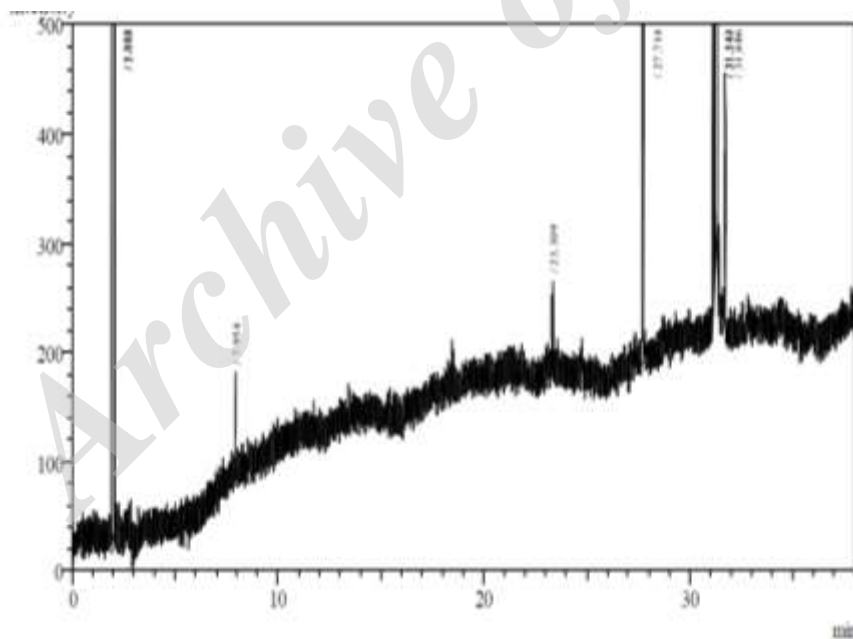
شکل (۴۳) نتیجه GC برای بیودیزل حاصل از چربی حیوانی



شکل (۴۴) نتیجه GC برای بیودیزل حاصل از روغن پالم



شکل ۴۵) نتیجه GC برای بیودیزل حاصل از روغن کلزا



شکل ۴۶) نتیجه GC برای بیودیزل حاصل از روغن پسماند

## ۵- فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

نتایج مربوط به قسمت تعیین کیفیت با دستگاه GC دارای ستون اختصاصی بیودیزل در مرکز تحقیقات بیوانرژی هنوز بدست محققین این طرح نرسیده است لذا بحث و نتیجه گیری نهایی و قابل گزارش به صورت مقاله و ارسال در گزارش در دسترس نبوده است. البته با توجه به نتایج بدست آمده تا این مرحله از کار اهداف اصلی طرح که مطالعه و بررسی انواع منابع مورد استفاده در تولید بیودیزل و انتخاب ۴ منبع روغنی، تولید نانوبیوکاتالیست با استفاده از تثبیت آنزیم بر روی نانوذرات مغناطیسی و تولید بیودیزل با استفاده از نانوبیوکاتالیست محقق شده اند.

هدف اصلی تحقیقات رسیدن به بیودیزلی است که از نظر قیمت قابل مقایسه سایر منابع متعارف انرژی باشد. از این منظر، انتخاب مواد اولیه، که بیش از ۷۵-۸۰٪ از هزینه های کلی تولید بیودیزل را شامل می شود، یک مرحله حیاتی برای اطمینان از تولید بیودیزل با صرفه تر است. انواع مواد اولیه با طیف متنوع از روغن های گیاهی خوراکی و غیر خوراکی روغن، روغن حیوانی، روغن ضایعات، روغن میکروبی و روغن ریز جلبک ها را می توان برای ترانس استریفیکاسیون آنزیمی مورد استفاده قرار داد.

در این طرح محتوای اسید چرب موجود در چهار روغن انتخابی سنجیده شده و پس از بررسی محتوای متیل استر و اسید چرب آزاد موجود در بیودیزل تولیدی از آنها (که نتایج مربوط به تست آنها در مرکز تحقیقات بیوانرژی در حال انجام است) می توان به مقرون به صرفه بودن یا نبودن آنها اشاره داشت.



## پیشنهاد ها

### منبع روغنی

علاقتمندی نسبتا زیادی در استفاده از روغن جلبک (میکرو یا ماکرو) برای سنتز بیودیزل وجود دارد. چرا که این روغن ها در کنار چربی های حیوانی مواد خام ارزانی بوده و نیز نرخ رشد سریع و میزان تولید بالایی در مقایسه با جنگل های معمول، محصولات کشاورزی، محتوای لیپید بالا، تحمل نسبت به کیفیت پایین آب، نیاز به مصرف زمین کوچک ۴۹ تا ۱۳۲ برابر کمتر در مقایسه با محصولات کلزا یا ذرت دارند. نیاز به زمین کوچک این مزیت رو به همراه دارد که میزان رقابت در استفاده از خاک را در برابر سایر محصولات پرورش یافته در خاک بویژه محصولات مورد نیاز انسان کاهش می دهد. با این حال هنوز هم مشکلاتی در استفاده از جلبک برای تولید بیودیزل وجود دارد. سرمایه گذاری قابل توجه در توسعه فن آوری و مهارت های فنی برای بهینه سازی برداشت ریز جلبک ها و فرآیندهای استخراج روغن از آنها، برای استفاده از منابع ارزان CO<sub>2</sub> برای غنی سازی فرهنگی مورد نیاز است. جلبک حاوی ۲۰-۴۰ درصد روغن است. تحقیقات زیادی بر روی استفاده از روغن میکرو جلبک ها در تولید بیودیزل انجام گرفته است. بنظر می رسد که روغن میکرو جلبک ها پتانسیل بالایی در تولید صنعتی بیودیزل داشته باشند. تبدیل آنزیمی روغن ریز جلبک به بیودیزل در مایع یونی اولین بار توسط لای همکاران گزارش شده است.

در این طرح، علاوه بر چهار منبع روغنی انتخاب شده محققان تصمیم بر استفاده از روغن جلبک موجود در پژوهشکده که حاصل کار پژوهشی اعضای گروه فیزیولوژی پژوهشکده علوم پایه کاربردی می باشد، داشتند اما بدلیل حجم اندک موجود و نیز زمان بر بودن پروسه کشت مجدد جلبک و پروسه استخراج روغن و ننگجیدن آن در محدوده زمانی طرح حاضر، موفق به تولید بیودیزل از این منبع نشده ایم. لذا پیشنهاد می شود با توجه به وجود پتانسیل کشت جلبک در حوزه های آبی ایران و نیز وجود دانش فنی کشت و استخراج روغن از آن در طرح های بعدی از این منبع استفاده شود.

## بیورآکتور پیوسته

رآکتور جریان پیوسته (continuous-flow reactors)، در تولید تجاری مقیاس بزرگ فرآیندهای تبادل استری پیوسته بیش از فرآیندهای بچ ترجیح داده می شوند زیرا این فرآیند منجر به تولید محصول با کیفیت ثابت با صرف سرمایه و هزینه های عملیاتی کم به ازای هر واحد از محصول میشود. رایج ترین نوع رآکتور پیوسته جریان رآکتور تانک - همزن دار است. انواع دیگر از رآکتور با جریان پیوسته نیز استفاده تجاری می شوند، از آن جمله رآکتور مافوق صوت و رآکتور فوق بحرانی است. این روش جایگزین می تواند سرعت واکنش را بالا ببرد.

پیشنهاد می شود جهت بالا بردن مقیاس تولید در طرح بعدی به طراحی و استفاده از رآکتور پیوسته مناسب پرداخته شود. در این طرح های اولیه ای به منظور استفاده از رآکتور پیوسته صورت گرفت اما بدلیل محدودیت زمانی و مالی ادامه کار و رسیدن به پارامترهای دقیق تولیدی در این نوع رآکتور متوقف شده و بر طبق تعهد طرح از رآکتور بچ آزمایشگاهی بهره برده شده است.

## استفاده از بسترهای نانویی با ظرفیت بالاتر

استفاده از نانوذرات مغناطیسی و بکاربری نیروی فیزیکی برای جداسازی کاتالیزور از مخلوط واکنش ایده موفق بوده است اما با توجه به اهمیت میزان در دسترس بودن هرچه بیشتر آنزیم به عنوان کاتالیزور پیشنهاد می شود از نانومواد دیگری که امکان لود مقدار بیشتر آنزیم بر روی آنها وجود دارد استفاده شود. برای مثال نانولوله های کربنی می توانند با نانوذرات مغناطیسی، مغناطیسی شده و علاوه بر بهره بردن از خاصیت مغناطیسی این نانومواد از خاصیت ظرفیت بالای لود نانولوله ها نیز بهره برد.

- [1] Bryan R. Moser, Biodiesel production, properties, and feedstocks, *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant* 2009, 45:229–266
- [2] Demirbas A. Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engine. London: Springer Publishing CO.; 2008.
- [3] Demirbas A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management* 2009; 50: 14–34.
- [4] Demirbas M F, Balat M. Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: a global perspective. *Energy Conversion and Management*. 2006; 47: 2371–81.
- [5] Chetri A B, Watts K C, Islam M R. Waste Cooking oil as an alternate feedstock for biodiesel production. *Energies* 2008; 1: 3–18.
- [6] Bamgboye A I, Hansen A C. Prediction of cetane number of biodiesel fuel from the fatty acid methyl ester (FAME) composition. *Int Agrophys* 2008; 22: 21–9.
- [7] Balat M, Balat H. A critical review of biodiesel as a vehicular fuel. *Energy Conversion and Management*, 2008; 49: 2727–41.
- 234 Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications
- [8] Kulkarni BM, Bujar BG, Shanmukhappa S. Investigation of acid oil as a source of biodiesel. *Indian J Chem Tech* 2008; 15: 467–71.
- [9] Gerpen JV, Shanks B, Pruszko R, Clements D, Knothe G. Biodiesel Production Technology. National Renewable Energy Laboratory. CO, USA; 2004.
- [10] Capehart B L. Encyclopedia of energy engineering and technology. CRC Press, Taylor & Francis LLC; 2007.
- [11] Cécile Bessou, Greenhouse gas emissions of biofuels, Improving Life Cycle Assessments by taking into account local production factors, Ph.D. Thesis, Agronomy & Environment; 2009.
- [12] BP Statistical Review of World Energy, 63rd edition, June 2014.
- [14] Van Gerpen J., Shanks B., Pruszko R., Clements D. & Knothe G., 2004, Van Gerpen J., Shanks B., Pruszko R., Clements D. & Knothe G., Biodiesel Production Technology, National Renewable Energy Laboratory, 2004.



- [15] Mittelbach M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1990;67:168-170.
- [16] Ribeiro B D, De Castro A M, COelho M A Z, Freire D M G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. *Enzyme Research* 2011;1-16.
- [17] Antczak M S, Kubiak A, Antczak T, Bielecki S. Enzymatic biodiesel synthesis – Keyfactors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy* 2009; 34:1185–1194.
- [18] Hartmeier W. *Immobilized Biocatalysts: An Introduction*. Springer-Verlag, Berlin;1988.
- [19] Costa S A, Azevedo H S, Reis R L. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine .Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications*, CRC Press LLC; 2005.
- [20] Yücel et al, *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*, 2013.
- [21] Jegannathan KR, Abang S, Poncelet D, Chan ES, Ravindra P. Production of biodiesel using immobilized lipase-a critical review. *Crit Rev Biotechnol* 2008; 28(4):253–264.
- [22] Tan T, Lu J, Nie K, Deng L, Wang F, Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances* 2010; 28: 628–634.
- [23] Xie W, Wang J. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. *Biomass and Bioenergy* 2012; 3 6: 373-380.
- [24] Jang M G, Kim D K, Park S C, Lee J S, Kim S W. Biodiesel production from crude canola oil by two-step enzymatic processes. *Renewable Energy* 2012; 42: 99-104.
- [25] Murty V R, Bhat J, Muniswaran P K A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2002; 7: 57-66.
- [26] Yan J, Yan Y, Liu S, Hu J, Wang G, Preparation of cross-linked lipase-COated microcrystals for biodiesel production from waste COoking oil. *Bioresource Technology* 2011; 102 : 4755–4758.
- [27] Fukuda H, Hama S, Tamalampudi S, Noda H. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends in Biotechnology* 2008;26:12. 240 *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*
- [28] Li W, Du W, Liu D, Yao Y. Study on factors influencing stability of whole cell during biodiesel production in solvent-free and tert-butanol system. *Biochemical Engineering Journal* 2008; 41:111–115.

- [29] Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, Kondo A, Fukuda H. Whole-cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem. Eng. J.* 2001; 8:39–43.
- [30] Sun T, Du W, Liu D, Dai L. Improved catalytic performance of GA cross-linking treated *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell for biodiesel production. *Process Biochemistry* 2010; 45: 1192–1195.
- [31] Tartaj, P, Morales, M.P, Veintemillas-Verdaguer, S, Teresita Gonzalez-Carreno, T, Carlos Serna, J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003, 36, R182–R197.
- [32] Nielsen P M, Brask J, Fjerbaek L. Enzymatic biodiesel production: Technical and eCONomical CONsiderations. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008; 110: 692–700.
- [33] Mohibbe A M, Amtul W, Nahar N M. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass Bioenergy* 2005; 29: 293–302.
- [34] Modi M K, Reddy J R C, Rao B V S K, Prasad R B N. Lipase-catalyzed mediated CONversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresour Technol* 2007; 98: 1260–4.

[35] رضا جانزاده گلوگاه، مریم محمدی مقانکی، برات قبادیان، پتانسیل سنجی تولید بیودیزل در ایران، دومین کنفرانس سالانه انرژی پاک، کرمان، ۲۱ تیر ماه ۱۳۹۱.