Research Article

Agricultural Engineering, 48(3) (2025) 367- 386 ISSN (P): 2588-526X

DOI: 10.22055/agen.2025.49440.1776 ISSN (E): 2588-5944

Optimization of Enzymatic Transesterification in Biodiesel Production

M. Karimi[1*] and F. Dehghan-Nasiri[2]

1. Assistant Professor, Department of Biosystems Engineering, Arak University, Arak, Iran
2. M.Sc. in Food Science and Technology, Systems and Methods Manager, Golnan Puratos Co., Tehran, Iran

Received: 19 April 2025 Accepted: 30 July 2025 *Corresponding Author: m-karimi@araku.ac.ir

Abstract

Introduction: Biodiesel is a renewable, biodegradable, and non-toxic fuel composed of fatty acid methyl esters produced via triglyceride transesterification. This reaction is accelerated by various catalysts, including chemical types (alkali, acid, and solid) and biocatalytic lipase enzymes. Lipase enzymes are particularly favored for their mild reaction conditions, reduced formation of soap byproducts, tolerance toward free fatty acids, ease of product recovery, eco-friendliness, and lower overall energy and raw material demand. However, free enzymes exhibit limited operational stability and high cost, motivating the need for immobilization strategies. Enzyme immobilization enhances catalyst reusability, thermal and pH stability, and specific activity, enabling multiple reaction cycles with minimal activity loss. The process relies on cost-effective supports with ample surface areas and pore structures to maximize enzyme loading and accessibility. Among these, silica/iron oxide magnetic nanoparticles stand out for their rapid separation capabilities under an external magnetic field, which simplifies downstream processing and reduces wastewater generation. Covalent binding methods, such as glutaraldehyde coupling, are employed to securely attach the enzyme to the support, improving overall performance and preventing enzyme leaching.
In this research, we aim to optimize biodiesel production from canola waste cooking oil using response surface methodology and assess the operational stability and reusability of the immobilized lipase under repeated batch cycles.

Materials and Methods: Key reagents—including analytical-grade methanol, tetraethyl orthosilicate (TEOS), ferric and ferrous salts, and glutaraldehyde—along with *Burkholderia cepacia* lipase (≥50 U/mg), were sourced from Sigma-Aldrich. Superparamagnetic mesoporous silica/iron oxide nanoparticles were synthesized via a two‑step approach: iron oxide core formation by coprecipitation, followed by a sol–gel process using TEOS with CTAB as a pore-directing agent. Resulting particles were calcined to remove surfactants, yielding a stable mesoporous shell. These magnetic nanoparticles were used as supports for enzyme immobilization. Lipase was covalently attached using a glutaraldehyde coupling process in phosphate buffer (pH 7.0) at 4 °C, with protein loadings varied between 10 and 40 mg/g support. Immobilization efficiency and activity recovery were determined by Bradford assay and olive oil hydrolysis assays, respectively. Biodiesel production assays were performed by transesterifying pretreated canola waste cooking oil with the immobilized lipase under gentle stirring. Reaction parameters (lipase concentration, methanol-to-oil ratio, temperature, and time) were systematically varied according to a central composite design, and FAME content was quantified by gas chromatography (GC-FID). All experiments were carried out in triplicate to ensure reproducibility.
Results and Discussion: SPION-silica nanoparticles, averaging 90–110 nm with a uniform mesoporous shell (pore diameter ~8 nm), offered a high surface area (~420 m²/g) for enzyme immobilization and pronounced superparamagnetic behavior (saturation magnetization ~45 emu/g). Upon lipase binding, saturation

© 2025 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

magnetization decreased to ~40 emu/g, confirming successful enzyme attachment without compromising magnetic responsiveness. Immobilization efficiency reached up to 78%, with an optimal activity recovery of 68.4% attained at 30 mg enzyme/g support and 12 h coupling time. The RSM-based second-order polynomial model exhibited strong predictive power ($R^2 \approx 0.96$, adjusted $R^2 \approx 0.94$), with significant linear and quadratic effects of lipase concentration, reaction time, methanol-to-oil ratio, and temperature ($p < 0.01$). Interaction terms—particularly between methanol ratio and time—highlighted enzyme inhibition by excess alcohol. Surface response plots revealed that FAME yield increased with enzyme loading (20–40 mg/g) and prolonged reaction time (15–30 h), but declined at methanol/oil ratios above 6:1 and temperatures exceeding 40 °C. Under optimal conditions (36 mg/g lipase, 25 h, 6:1 methanol/oil, 34 °C), the desirability function predicted a maximum biodiesel yield of 92%. Experimentally, three consecutive cycles yielded 92%, 89%, and 84% conversion, indicating only ~8.7% cumulative activity loss after three uses, demonstrating robust reusability for practical applications.

Conclusions: Burkholderia cepacia lipase was successfully immobilized on mesoporous silica/iron oxide magnetic nanoparticles. The immobilized enzyme effectively catalyzed the transesterification of waste cooking oil to produce biodiesel. VSM analysis confirmed that the magnetic properties of the nanoparticles remained largely unchanged after immobilization. Key process variables—immobilized lipase concentration, reaction time, methanol‑to‑oil molar ratio, and temperature—were optimized. A quadratic response surface model, developed using RSM, accurately predicted the biodiesel (FAMEs) yield. The desirability function analysis forecasted a maximum FAMEs content of 92% at optimal conditions. Statistical validation showed the model was both adequate and precise in predicting biodiesel yield. The immobilized lipase demonstrated good reusability, with only an 11% activity loss after three cycles. These findings underscore the potential for scalable, eco-friendly biodiesel production using enzyme‑catalyzed processes. The magnetic recovery of the biocatalyst not only simplifies downstream processing but also contributes to reduced overall production costs. Future work will focus on pilot‑scale trials and the evaluation of long‑term operational stability under continuous-flow conditions to assess commercial feasibility.

Keywords: Biodiesel, Immobilized lipase, Magnetic nanoparticles, Response surface methodology.

مهندسی زراعی (مجله علمی کشاورزی) جلد ۴۸. شماره ۳، ۱۴۰۴

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی ترانس‌استریفیکاسیون آنزیمی توسط لیپاز تثبیت‌شده بر روی نانوذرات مغناطیسی برای تولید بیودیزل

محمود کریمی[1*] و فرشته دهقان نصیری[2]

۱- استادیار گروه مکانیک بیوسیستم، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲- کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، مدیر سیستم ها و روش ها، شرکت گلنان پوراتوس، تهران، ایران

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۳۰

پذیرش نهایی: ۱۴۰۴/۰۵/۰۸

کلمات کلیدی:

بیودیزل،

لیپاز تثبیت شده،

نانوذرات مغناطیسی ،

روش سطح پاسخ

* عهده دار مکاتبات

Email: m-karimi@araku.ac.ir

چکیده

تولید بیودیزل با استفاده از روش ترانس استریفیکاسیون با کاتالیزور لیپاز، در مقایسه با روش‌های متداول شیمیایی و فیزیکی تولید بیودیزل روشی پاک و کارآمد است. در این پژوهش، برای تبدیل روغن پسماند کلزا به بیودیزل، از آنزیم لیپاز Burkholderia cepacian که بر روی نانوذرات مغناطیسی هسته-پوسته سیلیکای متخلخل/اکسید آهن تثبیت شد، استفاده شده است. برای بهینه‌سازی پارامترهای واکنش ترانس استریفیکاسیون، از روش سطح پاسخ (RSM) با طراحی مرکزی مرکب (CCD) استفاده شد. از طریق تحلیل رگرسیون چندگانه، معادله‌ای چندجمله‌ای درجه دوم برای بازده تولید بیودیزل به‌دست آمد. بر مبنای نتایج تابع مطلوبیت، شرایط بهینه واکنش شامل غلظت لیپاز تثبیت‌شده ۳۶٪، زمان واکنش ۲۵ ساعت، نسبت مولی متانول به روغن پسماند کلزا برابر با ۶/۲ و دمای واکنش ۳۴ درجه سلسیوس حاصل شد. بازده پیش‌بینی‌شده برای تولید بیودیزل در شرایط بهینه، ۹۲٪ بود. واکنش ترانس استریفیکاسیون با استفاده از لیپاز تثبیت‌شده در سه چرخه متوالی انجام شد و تنها ٪۱۱ از فعالیت آنزیم در چرخه سوم کاهش یافت. این روش با حذف مراحل خنثی‌سازی شیمیایی و کاهش مصرف انرژی، هزینه‌های تولید را به طور قابل‌توجهی کاهش می‌دهد و به‌دلیل پایداری و کارایی بالای لیپاز تثبیت‌شده، قابلیت بومی‌سازی و توسعه صنعتی دارد. بازیابی مغناطیسی آنزیم پس از هر چرخه واکنش نیز امکان استفاده مجدد آسان را فراهم می‌کند و بدین ترتیب فرآیندی کاملاً سازگار با محیط زیست و اقتصادی را برای تولید بیودیزل ارائه می‌دهد.

مقدمه

سوخت بیودیزل (متیل‌استرهای اسیدهای چرب) به‌دلیل قابلیت تجدیدپذیری، تجزیه‌پذیری زیستی و غیرسمی بودن، بسیار مورد توجه است (۹ و ۲۷) و با توجه به مزایای مذکور در موتورهای دیزلی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷، ۱۸، ۳۳). بیودیزل از طریق واکنش ترانس استریفیکاسیون تری‌گلیسریدها تولید می‌شود و این واکنش معمولاً با استفاده از انواع کاتالیزورها تسریع می‌گردد (۱۹).

در سال‌های اخیر، پژوهش‌های متعددی در زمینه بهینه‌سازی تولید بیودیزل به‌عنوان یک سوخت زیستی پاک و تجدیدپذیر در ایران انجام شده است. ملکی و همکاران[1] (۲۴) در یک مطالعه پتانسیلسنجی، منابع غیرخوراکی تولید بیودیزل در ایران را بررسی کرده و نشان دادند که دانه‌های نوروزک، کرچک و گلرنگ، به دلیل ویژگی‌هایی چون درصد بالای روغن، دوره رشد مناسب و پایداری زیست‌محیطی، گزینه‌های برتری برای تولید پایدار بیودیزل در کشور هستند. در راستای بهبود عملکرد فرآیند تولید، انصاری سامانی و همکاران[2] (۱) با استفاده از یک سامانه نوآورانه ترکیبی از جت پلاسما و فراصوت، توانستند راندمان تولید بیودیزل را به بیش از ۹۳٪ برسانند که مطابق با استانداردهای ASTM نیز بود. همچنین رحیم‌زاده و همکاران[3] (۳۰) در بررسی نقش کاتالیست‌ها در فرآیند ترانس‌استریفیکاسیون، بر اهمیت استفاده از کاتالیست‌های ناهمگن برای کاهش هزینه‌ها، تسهیل بازیابی و بهبود پایداری فرایند تأکید کرده‌اند. این مطالعات، نشان‌دهنده پیشرفت علمی قابل‌توجه ایران در حوزه سوخت‌های زیستی و لزوم حمایت از توسعه صنعتی آن هستند.

واکنش ترانس استریفیکاسیون به‌طور متداول توسط کاتالیزورهای شیمیایی مانند بازها (۳۶)، اسیدها (۲۶)، کاتالیزورهای جامد (۱۶) و همچنین آنزیم‌های لیپاز به‌عنوان بیوکاتالیزور (۳۰، ۳۴) کاتالیز می‌شود. استفاده از آنزیم‌ها به‌عنوان کاتالیزور، فناوری نویدبخشی برای سنتز بیودیزل به‌شمار می‌رود، چراکه در مقایسه با روش‌های شیمیایی، این روش نیازمند شرایط واکنشی ملایم، بازیابی آسان محصول، سازگاری با محیط زیست و مواد اولیه کم‌هزینه‌تری است (۳۰).

تثبیت آنزیم روشی مؤثر برای استفاده چندباره از آنزیم‌ها محسوب می‌شود (۲۹). علاوه بر این، تثبیت آنزیم‌ها می‌تواند پایداری، فعالیت و قابلیت استفاده مجدد از آن‌ها را نیز بهبود بخشد (۱۲). در فرآیند تثبیت آنزیم، انتخاب نگهدارنده‌ای مناسب که کم‌هزینه بوده و سطح ویژه بزرگی را فراهم آورد، نقش کلیدی دارد (۱۳).

اخیراً نانوذرات مغناطیسی سیلیکا/اکسید آهن با مزایایی نظیر جداسازی آسان و سریع، به‌عنوان نگهدارنده‌های مناسب برای تثبیت آنزیم معرفی شده‌اند (۱۰). لیپازهای تثبیت‌شده بر روی میکروکره‌های مغناطیسی متخلخل، می‌توانند به‌سرعت از محیط واکنش جداسازی شده و با اعمال میدان مغناطیسی به‌طور مؤثر کنترل شوند. علاوه بر این، روش‌های پیوند کووالانسی نیز به‌طور گسترده‌ای برای تثبیت لیپاز بر روی نگهدارنده‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌این‌ترتیب، مولکول لیپاز می‌تواند از طریق پیوند کووالانسی بین گروه فعال نگهدارنده و باقی‌مانده اسیدآمینه موجود در ساختار لیپاز تثبیت شود (۳۸).

هدف از این تحقیق، بررسی اثر استفاده از کاتالیزور لیپاز تثبیت‌شده بر بازده واکنش ترانس استریفیکاسیون روغن پسماند کلزا می‌باشد. در این مطالعه، بهینه‌سازی تولید بیودیزل و توسعه مدل‌های مرتبط نیز با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) انجام گرفته است. همچنین، استفاده مکرر از لیپاز تثبیت‌شده در واکنش ترانس استریفیکاسیون روغن پسماند کلزا به‌منظور بررسی پایداری آنزیم تثبیت‌شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

1- Maleki Rahimzadeh *et al.*
2- Ansari Samani *et al.*
3- Ansari Samani *et al.*

مواد و روش ها

مواد اولیه

کلرید فریک هگزاهیدرات (۹۸٪)، پلت‌های هیدروکسید سدیم (۹۷٪)، تترااتیل‌ارتوسیلیکات (۹۸٪)، هیدروکسید تترامتیل‌آمونیوم، (۲۵٪)، آمونیوم هیدروکسید (۳۰٪ – ۲۸)، گلوتارآلدئید (۲۵٪ در آب)، کلرید فروس تتراهیدرات (۹۹٪)، هگزادسیل‌تری‌متیل‌آمونیوم برمید، (۹۹٪)، اسید کلریدریک (۳۸٪ تا ۵/۳۶)، متانول، اتانول و آنزیم لیپاز *Burkholderia cepacia* همگی از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شدند.

لیپاز حاصل از *Burkholderia cepacia*، که پیش‌تر با نام لیپاز *Pseudomonas cepacian* نیز شناخته می‌شد، یک آنزیم تجاری در دو شکل محلول و تثبیت‌شده است که به دلیل مقاومت حرارتی و مقاومت بالا در برابر بسیاری از حلال‌ها و الکل‌های زنجیره کوتاه، شناخته‌شده و پرکاربرد است. به دلیل ویژگی‌های ذکرشده، این لیپاز در واکنش‌های ترانس استریفیکاسیون و همچنین سنتز داروهاست بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. روغن پسماند کلزای مورد استفاده از یک رستوران محلی با مجوز رسمی از نهادهای مسئول جمع‌آوری شد. تمام مواد شیمیایی بدون هیچگونه فرآیند تصفیه‌ی اضافی مورد استفاده قرار گرفتند. در کلیه آزمایش‌ها از آب دیونیزه استفاده شد.

تهیه نانوذرات مغناطیسی

نانوذرات هسته-پوسته متخلخل سیلیکا - آهن با خاصیت ابرپارامغناطیسی بر اساس روشی که در پژوهش پیشین شرح داده شده بود (۲۱)، تهیه شدند. برای سنتز آهن ، از روش هم‌رسوبی کلرید فریک هگزاهیدرات (۱۰/۸۱ گرم) و کلرید فروس تتراهیدرات (۳/۹۷ گرم) که از قبل گاززدایی شده و به محیط اسیدی تبدیل شده بودند، در محلول هیدروکسید آمونیوم ۰/۷ مولار استفاده شد. واکنش در یک راکتور فلاسک ته‌گرد تحت هم‌زدن مغناطیسی و جریان مداوم گاز نیتروژن انجام گرفت. محلول حاصل، که به‌عنوان فروفلوئید شناخته می‌شود، تا زمان استفاده بعدی به‌عنوان هسته در سنتز نانوذرات مغناطیسی، در دمای ۴ درجه سلسیوس و تحت اتمسفر نیتروژن نگهداری شد.

نانوذرات هسته-پوسته سیلیکا/اکسید آهن با خاصیت ابرپارامغناطیسی از طریق روش سل-ژل تهیه شدند. در این فرآیند، از تترااتیل‌ارتوسیلیکات به‌عنوان پیش‌ماده و از هگزادسیل‌تری‌متیل‌آمونیوم برمید به‌عنوان عامل پراکندگی، تشکیل‌دهنده حفرات و پوشاننده سطح استفاده شد. پس از تشکیل نانوذرات، آن‌ها با استفاده از آهنربا جدا شده و چندین بار شسته شدند. در نهایت، نانوذرات مغناطیسی در دمای ۷۰ تا ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت در آون خشک شدند و سپس در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۸ ساعت کالسینه شدند. ویژگی‌های مغناطیسی این نانوذرات با استفاده از دستگاه مغناطیس‌سنج نمونه ارتعاشی (VSM) ، مدل۷۳۰۴ LakeShore در دمای اتاق مورد ارزیابی قرار گرفت.

ثبیت آنزیم لیپاز

برای تثبیت آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات مغناطیسی، گروه‌های آمینی اولیه موجود در سطح میکروکره‌ها توسط عامل اتصال‌دهنده گلوتارآلدئید فعال‌سازی شدند تا پیوندی با باقی‌مانده اسیدآمینه آنزیم لیپاز ایجاد شود (۳۵، ۳۹). لیپاز می‌تواند از طریق ایجاد پیوند شیف بین گروه آلدهید گلوتارآلدئید و گروه آمینی انتهایی لیپاز به‌صورت کووالانسی بر روی نانوذرات ابرپارامغناطیسی تثبیت شود.

برای این منظور، ۲ گرم از نانوذرات خشک ابرپارامغناطیسی در ۲۰ سانتی‌متر مکعب محلول گلوتارآلدئید با غلظت ۱۰۰ گرم بر کیلوگرم در بافر فسفات با pH برابر ۷/۵ مجدداً پخش شد و واکنش در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ ساعت ادامه یافت. سپس ذرات فعال‌شده با گلوتارآلدئید توسط یک آهنربای قوی ته‌نشین شده و چندین مرتبه با آب مقطر شسته شدند. نانوذرات مغناطیسی سپس در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به

مدت ۲۴ ساعت در آون خشک و در محیط معمولی تا زمان استفاده بعدی نگهداری شدند.

فرآیند تثبیت آنزیم با پخش مجدد ۲ گرم از نانوذرات فعال‌شده گلوتارآلدئید در ۲۰ سانتی‌مترمکعب از محلول لیپاز با غلظت ۳ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مکعب (بافر فسفات با غلظت ۲۵ مول بر متر مکعب و pH 5/7) تحت هم‌زدن شدید مغناطیسی در دمای ۳۵ درجه سلسیوس آغاز شد. آزمایش‌ها با تغییر غلظت آنزیم لیپاز، دمای واکنش و مدت زمان واکنش انجام گرفت. پس از پایان واکنش تثبیت، لیپاز تثبیت‌شده با استفاده از میدان مغناطیسی خارجی از محلول جدا شد. رسوب حاصل چندین بار با بافر فسفات شسته شد تا تمام لیپازهای باند نشده حذف شوند. آنزیم لیپاز تثبیت‌شده پس از خشک‌کردن از طریق روش لیپولیزاسیون در دمای منفی ۵۰ درجه سلسیوس و فشار ۲۵ کیلوپاسکال به مدت ۴۸ ساعت، برای سنتز بیودیزل از روغن پسماند کلزا آماده مصرف شد. نمایی شماتیک از فرایند سنتز نانوذرات سیلیکا- آهن و تثبیت آنزیم لیپاز در شکل ۱ نمایش داده شده است.

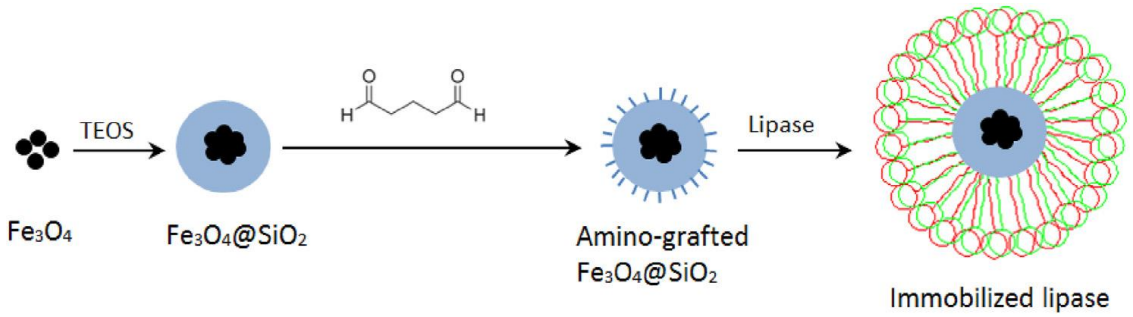
برای تعیین میزان آنزیم، از محلول رویی (سوپرناتانت) استفاده شد که با روش برادفورد و استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد انجام گرفت (۱). مقدار آنزیم تثبیت‌شده با کم کردن مقدار آنزیم غیرتثبیت‌شده از کل آنزیم مصرفی برای فرآیند تثبیت محاسبه شد. بازده تثبیت آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات ابرپارامغناطیسی طبق رابطه زیر تعیین گردید:

$$q = \frac{(Ci - Cf)V1}{CiV2} \quad (۱)$$

که در آن q درصد بازده تثبیت آنزیم، C_i و C_f به‌ترتیب غلظت اولیه آنزیم لیپاز و غلظت نهایی لیپاز در محلول رویی پس از تثبیت (بر حسب میلی‌گرم بر سانتی‌متر مکعب)، V_1 حجم محلول پس از تثبیت و V_2 حجم اولیه محلول تثبیت آنزیم است (بر حسب سانتی‌متر مکعب).

سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت هیدرولیتیکی لیپاز آزاد و تثبیت‌شده بر روی نانوذرات مغناطیسی از طریق هیدرولیز با روغن زیتون اندازه‌گیری شد (۵، ۳۸). به ۴ سانتی‌متر مکعب امولسیون روغن زیتون و ۵ سانتی‌متر مکعب از بافر فسفات (۰/۰۲۵ مول بر دسی‌متر مکعب و pH ۷/۵) مقدار مشخصی از لیپاز آزاد یا تثبیت‌شده افزوده شد و واکنش هیدرولیز در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. سپس تیتراسیون اسیدهای چرب آزادشده با محلول ۰/۰۵ مول بر دسی‌متر مکعب سدیم هیدروکسید و در حضور شناساگر فنول‌فتالئین انجام شد. یک واحد فعالیت لیپاز، مقدار آنزیمی تعریف می‌شود که بتواند در شرایط آزمایش، یک میلی‌مول اسید چرب را در هر دقیقه آزاد کند (۳۸). درصد بازیابی فعالیت آنزیم پس از تثبیت، نسبت بین فعالیت لیپاز تثبیت‌شده به کل فعالیت آنزیم اضافه‌شده در محلول اولیه تثبیت در نظر گرفته شد.



شکل (۱) شماتیک فرآیند سنتز و تثبیت آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات هسته-پوسته سیلیکا- آهن متخلخل ابرپارامغناطیسی

Figure (1) Schematic of the lipase immobilization on superparamagnetic mesoporous silica-SPION core-shell

واکنش ترانس استریفیکاسیون آنزیمی

در اولین مرحله از واکنش ترانس استریفیکاسیون آنزیمی، روغن پسماند کلزا توسط فیلتر کاغذی تحت خلأ فیلتر شد تا ناخالصی‌های آن حذف گردد. سپس روغن تصفیه‌شده در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌صورت مداوم در حضور ۱٪ اسید فسفریک با غلظت ۸۵٪ هم زده شد، مخلوط حاصل برای حذف کامل کلوئیدها و آب موجود در روغن پسماند کلزا سانتریفیوژ گردید.

واکنش‌های ترانس استریفیکاسیون در فلاسک‌های درب‌دار ۵۰ سانتی‌متر مکعبی، در دستگاه انکوباتور لرزان انجام شد. یک مخلوط واکنشی معمولی شامل ۵ گرم روغن پسماند کلزا، غلظت‌های از پیش تعیین‌شده‌ای از لیپاز تثبیت‌شده، ان-هگزان، آب، و افزودن متانول به‌صورت سه مرحله‌ای (با مقدار مساوی و در فواصل زمانی یکسان در هر مرحله) بود. پس از طی زمان از پیش تعیین‌شده برای واکنش، مخلوط‌های واکنشی به‌دقت توسط جداسازی مغناطیسی فیلتر شدند. متانول اضافی هر نمونه با استفاده از دستگاه تقطیر دورانی تحت فشار کاهشی حذف شد، و سپس نمونه‌ها برای اندازه‌گیری محتوای متیل‌استرهای اسید چرب (FAMEs) در دمای محیط نگهداری شدند.

آزمایش‌ها با تغییر متغیرهای آزمایشی شامل غلظت لیپاز تثبیت‌شده(x_1) ، زمان واکنش(x_2) ، نسبت مولی متانول به روغن پسماند کلزا (x_3) و دمای واکنش (x_4)انجام شدند. علاوه بر این، مشخص است که لیپاز نوعی آنزیم خاص است که در مرز بین فاز آبی و آلی عمل می‌کند. آب باعث افزایش سطح بین‌فازی موجود برای لیپاز می‌شود. فعال‌سازی لیپاز بستگی به آشکارسازی و بازسازی بخش فعال مولکول آنزیم دارد که نیاز به حضور مرز روغن-آب دارد (۱۵). بنابراین، تأثیر محتوای آب در مخلوط واکنش بر فعالیت لیپاز تثبیت‌شده با افزودن عمدی مقادیر مختلف آب به سیستم واکنش ارزیابی شد.

سنجش FAMEs

محتوای FAMEs در نمونه‌های آزمایشی با استفاده از کروماتوگرافی گازی (Shimadzu GC-2010) مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله هیدروژنی در دانشگاه فردوسی مشهد تحلیل شد. جداسازی با استفاده از ستون مویین DB-1HT (۳۰ متر × ۰/۲۵ میلی‌متر) انجام شد. کروماتوگرافی گازی بر مبنای غلظت‌های مختلف متیل سالیسیلات، متیل پالمیتات، متیل استئارات، متیل اولئات، متیل لینولئات، متیل لینولنات کالیبره شد. دمای ورودی نمونه ۳۷۰ درجه سلسیوس و دمای آشکارساز ۳۷۵ درجه سلسیوس تنظیم شد. دمای ستون به‌صورت منظم افزایش یافت؛ ابتدا در ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه نگه داشته شد، سپس با نرخ ۱۰ درجه سلسیوس در دقیقه به ۳۶۰ درجه سلسیوس افزایش یافت و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۶۰ درجه سلسیوس نگه داشته شد. نیتروژن با فشار پیش‌ستون ۱۰۰ کیلوپاسکال به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. محتوای FAMEs در نمونه‌های آزمایشی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$X(\%) = \frac{m\,FAME}{mWCO} \times 100\% \qquad (۲)$$

که در آن X محتوایFAME ، m_{FAME} وزن FAME محاسبه‌شده با روش کالیبراسیون داخلی، m_{WCO} وزن روغن پسماند کلزا است (۷).

طراحی و بهینه‌سازی آزمایش‌ها

فرآیند تثبیت آنزیم برای ارتقا کیفیت و بهبود کارایی در سنتز بیودیزل، نیاز به بهینه‌سازی دارد. استفاده از ابزارهای پیشرفته تحلیل داده‌های غیرخطی مانند روش سطح پاسخ (RSM) در بیوتکنولوژی محیطی و مهندسی بیوشیمی به طور گسترده ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. تحلیل سطح پاسخ، که شامل طراحی فاکتوریل و تحلیل

رگرسیون است، عوامل مؤثر را ارزیابی کرده و مدل‌هایی برای مطالعه تعاملات و انتخاب شرایط بهینه متغیرها برای یک پاسخ مطلوب ایجاد می‌کند (۲۲، ۲۴).

در این پژوهش، RSM برای بررسی تأثیر متغیرهای آزمایشی شامل غلظت لیپاز تثبیت‌شده(x_1) ، زمان واکنش(x_2) ، نسبت مولی متانول به روغن پسماند کلزا (x_3)و دمای واکنش (x_4) بر بازده بیودیزل استفاده شد. آزمایش‌ها بر اساس طراحی مرکزی مرکب چرخشی (RCCD) با پنج سطح برای هر یک از چهار متغیر مستقل طراحی شدند. تعداد کل آزمایش‌ها در RCCD با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$N=2^n +2n + n_0 \qquad (۳)$$

که در آن N تعداد کل آزمایش‌ها، n تعداد متغیرهای آزمایش و n_0 تعداد نقاط مرکزی است. تعداد کل آزمایش‌ها ۲۷ بود که شامل ۸ نقطه فاکتوریل (2^n = 16)، ۶ نقطه محوری (2^n = 8) و ۶ نقطه مرکزی (n_0 = 6) (۳).

در طراحی RCCD ، هر متغیر آزمایشی در سه سطح مختلف (۱+ ، ۰، ۱-) و دو نقطه محوری ($\pm\alpha$) در امتداد هر محور مختصات در دو سوی مقابل مبدا طراحی شده است. این نقاط در فاصله‌ای برابر با نیم‌قطر قطری از هایپرکیوب طراحی فاکتوریال قرار دارند و مقادیر حدی جدید (کم و زیاد) برای هر عامل به این طراحی افزوده شده‌اند (۲۰). مقدار α که برای پایداری و استحکام طراحی اهمیت دارد، برابر ۲ محاسبه شده است. جدول ۱ محدوده و سطوح متغیرهای آزمایش بررسی‌شده در این مطالعه را به صورت واقعی و کدگذاری‌شده خلاصه می‌کند.

یک مدل چندجمله‌ای درجه دوم تجربی، توسعه‌یافته توسط RSM ، بازده واکنش را به‌عنوان تابعی از متغیرهای آزمایشی و تعاملات آن‌ها مطابق معادله زیر مرتبط می‌کند:

$$Y = \beta 0 + \sum_{i=1}^{4} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{4} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{3} \sum_{j=i+1}^{4} \beta_{ij} x_i x_j \qquad (4)$$

که در آن **Y** پاسخ پیش‌بینی‌شده، $\mathbf{x_i}$ متغیر آزمایشی iام، $\mathbf{b_0}$ عرض از مبدأ، $\mathbf{b_i}$ ضریب مدل مرتبه اول، $\mathbf{b_{ii}}$ ضریب درجه دوم برای متغیر i ام، و $\mathbf{b_i}$ ضریب اثر متقابل بین متغیرهای i و j می‌باشد. پارامترهای ضریب مدل توسعه‌یافته با استفاده از روش رگرسیون خطی چندگانه بر پایه روش حداقل مربعات برآورد شده‌اند و به‌صورت آماری از طریق تحلیل واریانس (ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین مدل توسعه‌یافته به‌صورت کیفی از طریق مقدار ضریب تبیین (R^2) با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹,۲ تحلیل شد.

جدول (۱) محدودیت‌های متغیرهای فرآیند و سطوح مربوطه برای RCCD

Table (1) Constraints of process variables and the respective levels for RCCD.

متغیرها Variables	کدها Symbol coded	محدوده و سطوح Range and levels				
		-2	-1	0	1	2
غلظت آنزیم (٪) Enzyme concentration (%)	X_1	5	15	25	35	45
زمان واکنش (ساعت) Reaction time (h)	X_2	5	10	15	20	25
متانول/ نسبت مولی پسماند روغن خوراکی Methanol/WCO molar ration (mol/mol)	X_3	4:1	5:1	6:1	7:1	8:1
دما (°C) Temperature (°C)	X_4	25	30	35	40	45

تحلیل تابع مطلوبیت (DFA) یکی از رایج‌ترین روش‌ها در صنعت برای بهینه‌سازی فرآیندهایی با پاسخ‌های چندگانه است. روش RSM یک استراتژی متوالی است که به ما امکان نزدیک شدن به ناحیه بهینه و تحلیل مؤثر پاسخ را می‌دهد، در حالی که روش تابع مطلوبیت، تکنیکی مفید برای تحلیل آزمایش‌هایی است که در آن‌ها پاسخ باید بهینه‌سازی شود. کارایی روش‌های RSM و DFA در بهینه‌سازی پارامترهای آزمایشی برای زبری سطح به اثبات رسیده است. بهینه‌سازی تک‌پاسخه تعیین می‌کند که چگونه پارامترهای ورودی بر مطلوبیت یک پاسخ خاص تأثیر می‌گذارند، در حالی که بهینه‌سازی عددی نقطه‌ای را می‌یابد که تابع مطلوبیت را بیشینه می‌سازد. تنظیم وزن یا اهمیت می‌تواند ویژگی‌های یک هدف را تغییر دهد. در روش تابع مطلوبیت، نوع هدف برای هر پاسخ باید یکی از پنج حالت زیر باشد: هیچ ، بیشینه، کمینه ، هدف خاص یا در یک بازه مشخص.

DFA پاسخ را به تابع مطلوبیتی تبدیل می‌کند که مقدار آن در بازه بین $0 < d < 1$ قرار می‌گیرد. اگر مقدار مطلوبیت برابر با ۱ شود، آنگاه متغیر پاسخ در مقدار هدف یا مطلوب خود قرار دارد، و اگر متغیر پاسخ خارج از بازه قابل قبول باشد، مقدار تابع مطلوبیت به صفر خواهد رسید (۱۴). در این پژوهش، هدف از پاسخ، رسیدن به بیشترین مقدار ممکن است. متغیر پاسخ به تابع مطلوبیت **d** تبدیل می‌شود که به صورت زیر تعریف شده است:

معادله ۵:

$$d = \begin{cases} 1 & y < T \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^r & T \le y \le U \\ 0 & y > U \end{cases}$$

که در آن U حد بالای مشخصات، T مقدار هدف، y پاسخ مورد نظر و r وزن می‌باشد.

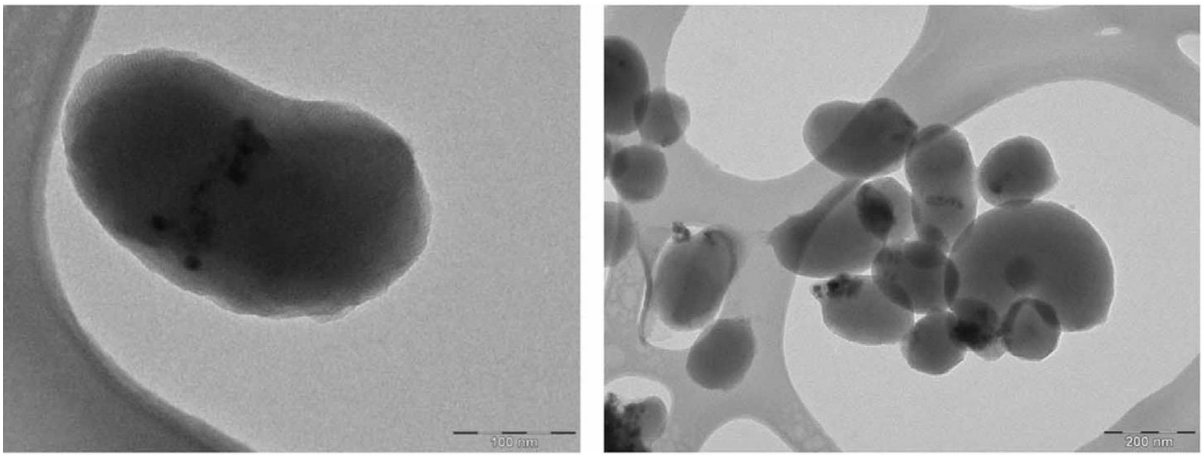
آزمون قابلیت استفاده مجدد

به‌منظور ارزیابی پایداری لیپاز تثبیت‌شده، لیپاز تثبیت‌شده استفاده‌شده توسط یک آهنربای قوی جدا شده، با بافر فسفات (۰/۰۰۳ مول بر دسی‌متر مکعب فسفات، pH ۶، ۰/۱ مول بر دسی‌متر مکعب NaCl) و تر-بوتانول شسته شده و در نهایت از روش خشک کردن انجمادی خشک شد. پس از بازیابی لیپاز تثبیت‌شده، این لیپاز در واکنش بعدی با سوبستراهای تازه برای سنتز بیودیزل مجددا مورد استفاده قرار گرفت. شرایط واکنش‌های مربوط به آزمون قابلیت استفاده مجدد لیپاز تثبیت‌شده، برای تمام متغیرهای تجربی در مقدار صفر کدگذاری‌شده تنظیم شده بود.

نتایج و بحث

ویژگی‌های ذرات مغناطیسی

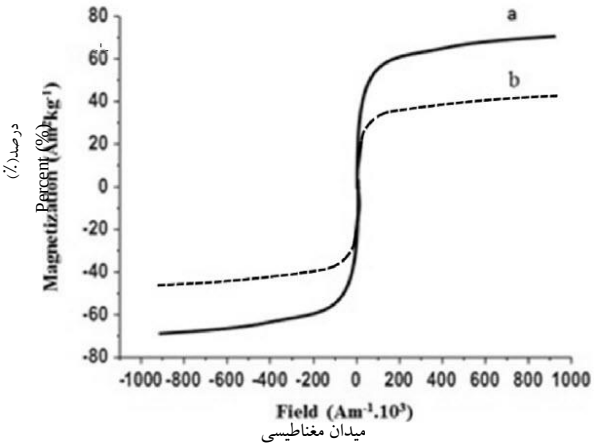
تصاویر میکروگراف معمولی برای نانوذرات آهن در شکل ۲ نشان داده شده‌اند. نانوذرات آهن دارای اندازه متوسط حدود ۲۰ نانومتر هستند و اندازه متوسط نانوذرات هسته-پوسته حدود ۱۰۰ نانومتر است. ساختار متخلخل سیلیکا نیز در شکل ۲ قابل مشاهده است. نانوذرات به‌راحتی در آب پراکنده می‌شوند و خواص سوپرپارامغناطیسی آن‌ها از ایجاد هیسترزیس مغناطیسی جلوگیری می‌کند، که می‌تواند منجر به تجمع آن‌ها شود. اندازه کوچک و ساختارهای متخلخل سیلیکا سطح فعال آن‌ها را برای تثبیت و جذب افزایش می‌دهند.



شکل (۲) تصاویر از نانوذرات آهن. نقاط تیره نشان‌دهنده نانوذرات آهن هستند که در داخل سیلیکا متخلخل قرار گرفته‌اند. ساختار متخلخل پوسته سیلیکا در لبه‌ها قابل مشاهده است.

Figure (2) TEM images of SPION-silica NPs. The dark dots show the SPIONs which are embedded inside porous silica. The porous structure of the silica shell can be noticed on the edges.

خواص مغناطیسی نانوذرات Fe_3O_4 سنتز شده و نانوذرات هسته-پوسته آهن متخلخل با لیپاز تثبیت‌شده با استفاده از تکنیک VSM ارزیابی شدند. اندازه‌گیری‌ها در دمای اتاق انجام شدند. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، آهنربایش اشباع برای لیپاز تثبیت‌شده ۴۵/۶۹ آمپر متر مربع بر کیلوگرم بود، در حالی که برای نانوذرات Fe_3O_4 خالص آهنربایش اشباع به ۶۸/۱۴ آمپر متر مربع بر کیلوگرم رسید. هیسترزیس بسیار ضعیف تأیید می‌کند که نانوذرات مغناطیسی تقریباً سوپرپارامغناطیسی هستند که ویژگی‌ای بسیار مهم برای حامل‌های مغناطیسی است. همچنین می‌توان مشاهده کرد که بعد از تثبیت لیپاز، لحظه آهنربایش نانوذرات Fe_3O_4 به‌طور جزئی کاهش یافته است. خاصیت مغناطیسی نانوذرات هسته-پوسته آهن یک مزیت قابل توجه برای تثبیت آنزیم در مقایسه با پشتیبانی‌های غیرمغناطیسی است. به دلیل حفظ مقدار بالای آهنربایش اشباع، لیپاز تثبیت‌شده که در واکنش‌های ترانس استریفیکاسیون نمونه‌های آزمایشی استفاده می‌شود، می‌تواند به‌راحتی با استفاده از میدان مغناطیسی از مخلوط واکنش جدا شود. علاوه بر این، حرکت لیپاز تثبیت‌شده در راکتور می‌تواند با استفاده از دستگاه‌های دائمی مغناطیسی خارجی به‌طور مؤثری کنترل شود.



شکل (۳) منحنی‌های مغناطش در دمای اتاق برای (a) Fe_3O_4 نانوذرات سیلیکا (b) آهن -با لیپاز تثبیت‌شده.

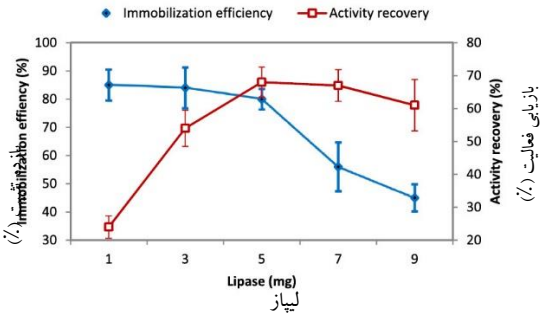
Figure (3) Room temperature magnetization curves for a) Fe3O4 and b) SPION-Silica NPs with bound lipase.

بازده و بازیابی فعالیت برای تثبیت لیپاز

لیپاز با استفاده از گروه آلدئید گلوتارآلدئید به عنوان عامل فعال‌سازی بر روی نانوذرات هسته-پوسته آهن متخلخل تثبیت شد. برای تعیین میزان مناسب لیپاز جهت تثبیت، از وزن‌های مختلف لیپاز در بازه ۱ تا ۹ میلی‌گرم برای تثبیت روی ۲۰۰ میلی‌گرم نانوذرات هسته-پوسته آهن متخلخل استفاده شد. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، با افزایش

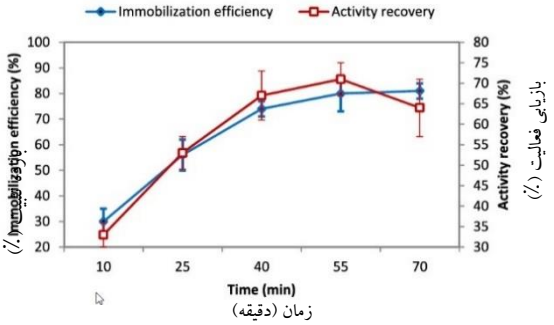
میزان لیپاز از ۱ تا ۵ میلی‌گرم، بازده تثبیت به آرامی از ۸۵/۳٪ به ۷۰/۸٪ کاهش یافت. این در حالیست که این بازده با افزایش لیپاز از ۵ تا ۹ میلی‌گرم، با سرعت قابل توجهی کاهش نشان داد. اگرچه در غلظت پایین لیپاز، میزان لیپاز باند شده بیشتر شد، اما فعالیت آنزیم به طور قابل توجهی کاهش نشان داد. حداکثر میزان بازیابی فعالیت که معادل ۶۸/۴٪ می باشد، در غلظت ۵ میلی‌گرم لیپاز در ۲۰۰ میلی‌گرم نانوذرات آهن متخلخل حاصل شد. پس از آن با افزایش غلظت لیپاز تا ۹ میلی‌گرم، کمی کاهش نشان داد.

شکل ۵ بازده تثبیت و بازیابی فعالیت را به عنوان تابعی از زمان نشان می‌دهد. مطابق این شکل، در مقدار ثابت لیپاز به میزان ۵ میلی‌گرم و افزایش زمان تثبیت از ۱۰ تا ۴۰ دقیقه، بازده تثبیت از ۳۰/۷٪ به ۷۴/۳٪ افزایش یافت. در حالیکه با افزایش زمان تثبیت به بیش از ۴۵ دقیقه، بازده تثبیت روی نانوذرات هسته–پوسته آهن متخلخل تقریبا ثابت ماند؛ این به دلیل آن است که تثبیت در مراحل اولیه به سرعت انجام می‌شود و با افزایش زمان تثبیت، سطح ذرات مغناطیسی از لیپاز اشباع می‌گردد. علاوه بر این، همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، بازیابی فعالیت لیپاز تثبیت‌شده با افزایش زمان تثبیت افزایش می‌یابد و بیشترین بازیابی فعالیت در زمان ۵۵ دقیقه حاصل شده است. با افزایش بیشتر زمان تثبیت، بازیابی فعالیت کاهش می‌یابد. بنابراین، زمان بهینه تثبیت لیپاز بر روی نانوذرات هسته–پوسته آهن متخلخل برای تثبیت لیپاز بر روی ذرات مغناطیسی Fe_3O_4 ۵۵ دقیقه می‌باشد.



شکل (٤) تأثیر میزان لیپاز بر بازده تثبیت و بازیابی فعالیت.

Figure (4) Effect of lipase content on the immobilization efficiency and activity recovery.



شکل (٥) تأثیر زمان تثبیت بر بازده تثبیت و بازیابی فعالیت، در حالی که میزان لیپاز ثابت ٥ میلی‌گرم است

Figure (5) Effect of immobilization time on the immobilization efficiency and activity recovery, at a constant lipase amount of 5 mg.

توسعه معادله مدل رگرسیون

ماتریس طراحی کامل و نتایج به‌دست‌آمده از بازده ترانس‌استریفیکاسیون کاتالیز شده توسط لیپاز تثبیت‌شده در جدول ۲ خلاصه شده است. همانطور که در جدول نشان داده شده است، بسته به شرایط آزمایش، بازده FAME بین ۵۰٪ تا ۸۵٪ متغیر بوده است. تحلیل رگرسیون چندگانه داده‌های آزمایشی، مدلی چندجمله‌ای از مرتبه دوم مبتنی بر واحدهای کدگذاری‌شده را به صورت معادله توسعه داد:

(۶)

$$Y = 73.71 + 5.91 \times x_1 + 8.85x_2 + 0.87x_3 + 0.61x_4 - 2.31x_1^2 + 1.06x_1x_2 - 1.04x_1x_4 - 1.46x_2^2 - 1.61x_3^2 - 1.57x_4^2$$

علامت مثبت در عبارات نشان‌دهنده تأثیر هم‌افزا بر بازده سنتز بیودیزل و علامت منفی نشان‌دهنده تأثیر معکوس است. بر اساس مدل توسعه‌یافته توسط روش سطح پاسخ (RSM) ، بازده ترانس‌استریفیکاسیون تحت تأثیر عبارات خطی و درجه دوم چهار متغیر آزمایشی قرار داشت.

معادله رگرسیون و ضریب تبیین (R^2) برای بررسی تناسب مدل تعریف شده با RSM ارزیابی شدند. مدل دارای ضریب تبیین (R^2) برابر با ۰/۹۵۶۳ بود که نشان‌دهنده تأثیر بالای متغیرهای آزمایشی در نمایش بازده سنتز است. مقدار ضریب تبیین تعدیل‌شده ($R^2 = 0.9533$) نیز بسیار بالا بوده و از اهمیت مدل حمایت می‌کند و نشان‌دهنده همخوانی مناسب بین پاسخ‌های پیش‌بینی‌شده و واقعی است (۱۳). علاوه بر این،

مقدار نسبتاً پایین ضریب تغییرات (CV = 1.55%) دقت و قابلیت اطمینان بهتر آزمایش‌های انجام‌شده را نشان می‌دهد. بنابراین، با توجه به مقدار بالای همبستگی و مقدار پایین CV در مدل توسعه‌یافته، می‌توان نتیجه گرفت که همخوانی و دقت خوبی بین بازده FAME های پیش‌بینی‌شده و تجربی در این مدل رگرسیونی وجود دارد.

آنالیز آماری مبتنی بر ANOVA برای مدل مربعی مبتنی بر RSM در جدول ۳ خلاصه شده است. آزمون F فیشر (F_model = 162.97) با مقدار احتمال بسیار پایین (۰,۰۰۰۱) نشان‌دهنده اهمیت بسیار بالای مدل رگرسیون است به‌طوری که تنها با احتمال ۰/۰۱ درصد مقدار مدل F به دلیل نویز در آزمایش‌ها رخ می دهد. علاوه بر این، مقدار عدم تناسب F برابر با ۱,۳۶ نشان می‌دهد که عدم برازش نسبت به خطای خالص معنی‌دار نیست.

جدول (۲) ماتریس بازده‌های بیودیزل در مقادیر تجربی و پیش‌بینی‌شده توسط مدل روش سطح پاسخ

Table (2) Experimental design matrix and the yields of biodiesel in experimental values and predicted by RSM model.

آزمایش Run	متغیرهای کدداده شده Coded process variables				بازده آزمایشی Experimental yield (%)	بازده پیش بینی شده Predicted yield (%)	باقی مانده Residuals (%)
	کاتالیست Catalyst (%)	زمان Time (h)	نسبت مولی Molar ratio (mol/mol)	دما Temperature (°C)			
1	-1	-1	-1	-1	50.24	50.55	0.62
2	-1	-1	-1	1	54.81	53.83	1.78
3	-1	-1	1	-1	52.60	52.30	0.57
4	-1	-1	1	1	56.41	55.58	1.46
5	-1	1	-1	-1	66.57	66.13	0.67
6	-1	1	-1	1	70.68	69.41	1.80
7	-1	1	1	-1	68.59	67.88	1.03
8	-1	1	1	1	70.76	71.16	0.56
9	1	-1	-1	-1	62.44	62.33	0.18
10	1	-1	-1	1	61.99	61.45	0.87
11	1	-1	1	-1	62.57	64.08	2.42
12	1	-1	1	1	63.02	63.20	0.29
13	1	1	-1	-1	81.43	82.14	0.88
14	1	1	-1	1	81.63	81.26	0.45
15	1	1	1	-1	84.31	83.89	0.50
16	1	1	1	1	82.12	83.01	1.08
17	-2	0	0	0	50.99	52.66	3.28
18	2	0	0	0	77.47	76.29	1.53
19	0	-2	0	0	50.05	50.18	0.25
20	0	2	0	0	85.21	85.57	0.42
21	0	0	-2	0	64.43	65.53	1.70
22	0	0	2	0	69.64	69.03	0.88
23	0	0	0	-2	66.74	66.22	0.78
24	0	0	0	2	67.62	68.63	1.48
25	0	0	0	0	74.40	73.72	0.92
۲۶	0	0	0	0	74.17	73.72	0.60
۲۷	۰	0	0	0	72.58	73.72	1.57

جدول (۳) تحلیل واریانس (ANOVA) مدل مربعی سطح پاسخ برای بازده بیودیزل.

Table (3) Analysis of variance (ANOVA) of response surface quadratic model for yield of biodiesel.

منبع Source	ضریب Coefficient value	مجموع مربعات Sum of square	درجه آزادی DF	مقدار P P-Value
مدل Model		2924.31	14	<0.0001
عدد ثابت Constant	-149.93			
X_1	2.16	837.92	1	<0.0001
X_2	2.99	1878.51	1	<0.0001
X_3	20.18	18.39	1	0.0026
X_4	5.04	8.67	1	0.0231
X_1X_1	-0.02	113.88	1	<0.0001
X_1X_2	0.02	17.91	1	0.0028
X_1X_3		0.15	1	0.7413
X_1X_4	-0.02	17.33	1	0.0032
X_2X_2	-0.06	45.51	1	<0.0001
X_2X_3		0.01	1	0.7397
X_2X_4		1.04	1	0.3842
X_3X_3	-1.61	55.25	1	<0.0001
X_3X_4		1.10	1	0.3731
X_4X_4	-0.06	52.79	1	<0.0001
باقی مانده Residual		15.38	12	
عدم تناسب Lack of fit		13.42	10	0.4950
خطای خالص Pure error		1.96	2	
همبستگی کل Cor. total		2939.69	26	

تعاملات بین متغیرهای فرآیندی

تعاملات بین متغیرهای مستقل تأثیر قابل توجهی بر بازده FAME ها داشت (جدول ۳). بنابراین، به جای بررسی تک‌تک متغیرها (همانطور که در روش‌های مرسوم انجام می‌شود)، تعاملات بین متغیرهای مستقل ارزیابی شدند که از اهمیت زیادی برای یک مطالعه بهینه‌سازی جامع برخوردار است.

نمودارهای سطح به عنوان نمایش گرافیکی معادلات رگرسیون در شکل‌های a۶ تا d۶ نشان داده شده‌اند. همانطور که در شکل ۶ a مشاهده می‌شود، افزایش هر یک از این دو متغیر باعث افزایش بازده می‌شود بطوریکه بالاترین بازده بیودیزل در بیشترین غلظت لیپاز تثبیت‌شده و زمان واکنش به دست آمد. مقدار FAME ها با افزایش لیپاز تثبیت‌شده افزایش یافت، زیرا هرچه لیپاز بیشتری در دسترس باشد، مولکول‌های سوبسترا بیشتر به مرکز فعال لیپاز جذب می‌شوند (۴). اما نرخ افزایش FAME ها با افزایش میزان آنزیم از ۲۵٪ به ۳۵٪ کاهش یافت. این پدیده به این واقعیت نسبت داده می‌شود که در زمانی که میزان آنزیم کمتر از ۲۵٪ بود، مقدار روغن پسماند کلزا بیش از حد بوده و با افزایش میزان آنزیم تا سطح کافی (بین ۲۵٪ تا ۳۵٪) این افزایش محدود شد. همچنین مقدار FAME ها با افزایش زمان واکنش افزایش یافت؛ با این حال، با افزایش زمان واکنش، نرخ افزایشFAME ها کاهش یافت. این روند ممکن است به دلیل تأثیر محدودیت‌های انتقال جرم بر نرخ واکنش باشد (۴۰). نرخ‌های پایین‌تر تبدیل بیودیزل در مراحل پایانی واکنش ممکن است ناشی از انتقال جرم ناکافی به دلیل حلالیت متقابل پایین

متانول و روغن پسماند کلزا باشد؛ که عمدتاً به دلیل تشکیل گلیسرول در جریان واکنش رخ می‌دهد و حلالیت و انتقال جرم را به‌طور پیوسته محدود می‌کند (۳).

به دلیل برگشت‌پذیری واکنش ترانس‌استریفیکاسیون، متانول باید به میزان مازاد نسبت استوکیومتری (یعنی نسبت مولی متانول به روغن برابر با ۳:۱) استفاده شود. علاوه بر این، متانول به عنوان مهارکننده لیپاز شناخته شده است؛ بنابراین، میزان بالای متانول در واکنش می‌تواند به‌طور قابل توجهی فعالیت لیپاز را کاهش دهد. از این رو، پژوهشگران معمولاً از استراتژی اضافه‌کردن تدریجی متانول استفاده می‌کنند (۴۱). همانطور که در شکل ۶ b مشاهده می‌شود، مقدار FAME ها با افزایش نسبت مولی متانول به روغن پسماند کلزا افزایش یافت و سپس زمانی که این نسبت از ۶ به ۹ افزایش یافت، کاهش پیدا کرد. در نسبت‌های مولی کمتر از ۶ برای متانول به روغن پسماند کلزا، تعامل مثبت بین نسبت متانول به روغن پسماند کلزا و میزان لیپاز تثبیت‌شده در تبدیل بیودیزل حاصل شد. در نسبت ثابت ۶ برای متانول به روغن پسماند کلزا، مقدار FAME با افزایش میزان لیپاز به طور قوی‌تری افزایش یافت نسبت به همان افزایش میزان آنزیم در شرایطی که نسبت متانول به روغن پسماند کلزا برابر با ۴ بود. در مقابل، در نسبت‌های مولی بیشتر از ۶ برای متانول به روغن پسماند کلزا، تعامل منفی بین این عوامل مشاهده شد؛ به این معنا که با افزایش نسبت متانول از ۶ به ۸، تأثیر مثبت میزان آنزیم بر تبدیل بیودیزل کاهش می‌یابد.

همانطور که در شکل ۶ c نشان داده شده است، فعالیت لیپاز با افزایش دما از ۲۵ درجه سلسیوس به ۳۵ درجه سلسیوس با شیب تند افزایش یافت. متانول و ان هگزان در دماهای بالای ۶۰ درجه سلسیوس تبخیر می‌شوند و دمای بالاتر تأثیر منفی بر پایداری حرارتی آنزیم و عمر مصرفی آن دارد. با این حال به نظر می‌رسد دمای بین ۳۵ تا ۴۰ درجه سلسیوس برای فرآیند ترانس‌استریفیکاسیون آنزیمی مناسب‌ترین باشد (۷، ۳۷).

همانطور که در شکل ۶ d نشان داده شده است، با افزایش زمان واکنش، بازده بیودیزل افزایش می‌یابد. اما با افزایش زمان واکنش، نرخ افزایش تبدیل بیودیزل کاهش یافت که می‌تواند به دلیل انتقال جرم ناکافی در مراحل پایانی واکنش به علت حلالیت متقابل پایین الکل و روغن باشد (۲۳). اثرات و تعامل متغیرها بر بازده بیودیزل از طریق شکل ۶ قابل درک‌تر می باشد و با توجه به اطلاعات به‌دست‌آمده از نمودارهای سطحی و مدل توسعه‌یافته توسط RSM ، امکان انجام تحلیل بهینه‌سازی برای تعیین شرایط بهینه جهت دستیابی به حداکثر بازده بیودیزل وجود دارد.

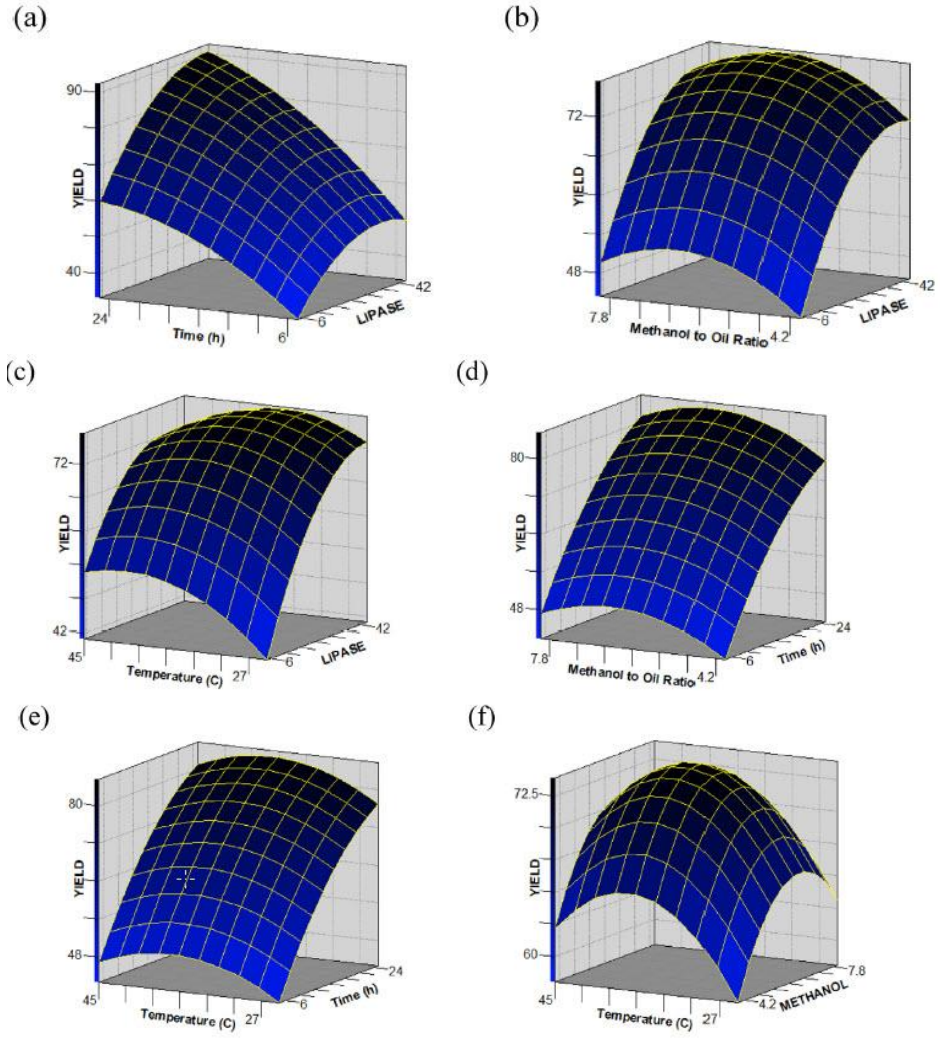
تحلیل بهینه‌سازی

هدف از بهینه‌سازی یافتن شرایط آزمایش شامل غلظت لیپاز تثبیت‌شده، زمان واکنش، نسبت مولی متانول به روغن پسماند کلزا و دمای واکنش است که بیشترین بازده بیودیزل را به همراه داشته باشد. تحلیل تابع مطلوبیت در روند بهینه‌سازی به‌کار گرفته شد. برای پاسخ تولید بیودیزل، مقدار $Y(min) = 48$ ٪ و $Y(max) = 92$٪ که به عنوان مقادیر حداقل و حداکثر پاسخ در نظر گرفته شده بودند، برای بهینه‌سازی انتخاب شدند. بر اساس مطالعات Derringer (۱۴)، مقدار ثابت r توسط کاربر مشخص می‌شود. اگر $r < 1$ باشد، مطلوبیت d ابتدا با شروع افزایش Y به سرعت افزایش می‌یابد و سپس با نزدیک شدن Y به $Y(max)$ صاف می‌شود. مقدار $r = 1$ انتخاب شد زیرا در عمل مشاهده شد که دستیابی به بازده ۹۲٪ امکان پذیر می‌باشد.

پروفایل پیش‌بینی طراحی به‌کاررفته در این مطالعه برای ترکیب تنظیمات عوامل در شکل ۷ (نرم‌افزار SAS ، نسخه ۹,۲) نشان داده شده است. از نمودار مشخص است که حداکثر بازده بیودیزل براساس بهینه‌سازی متغیرهای آزمایشی توسط DFA با بازدهی تا ۹۲٪ به‌دست آمده است. متغیرهای طراحی متناظر با حداکثر مقدار تابع هدف شامل غلظت لیپاز تثبیت شده، زمان واکنش، نسبت مولی متانول به روغن پسماند کلزا و دمای واکنش به ترتیب برابر با ۳۶٪، ۲۵ ساعت، ۶/۲ و ۳۴ درجه سلسیوس تنظیم شدند.

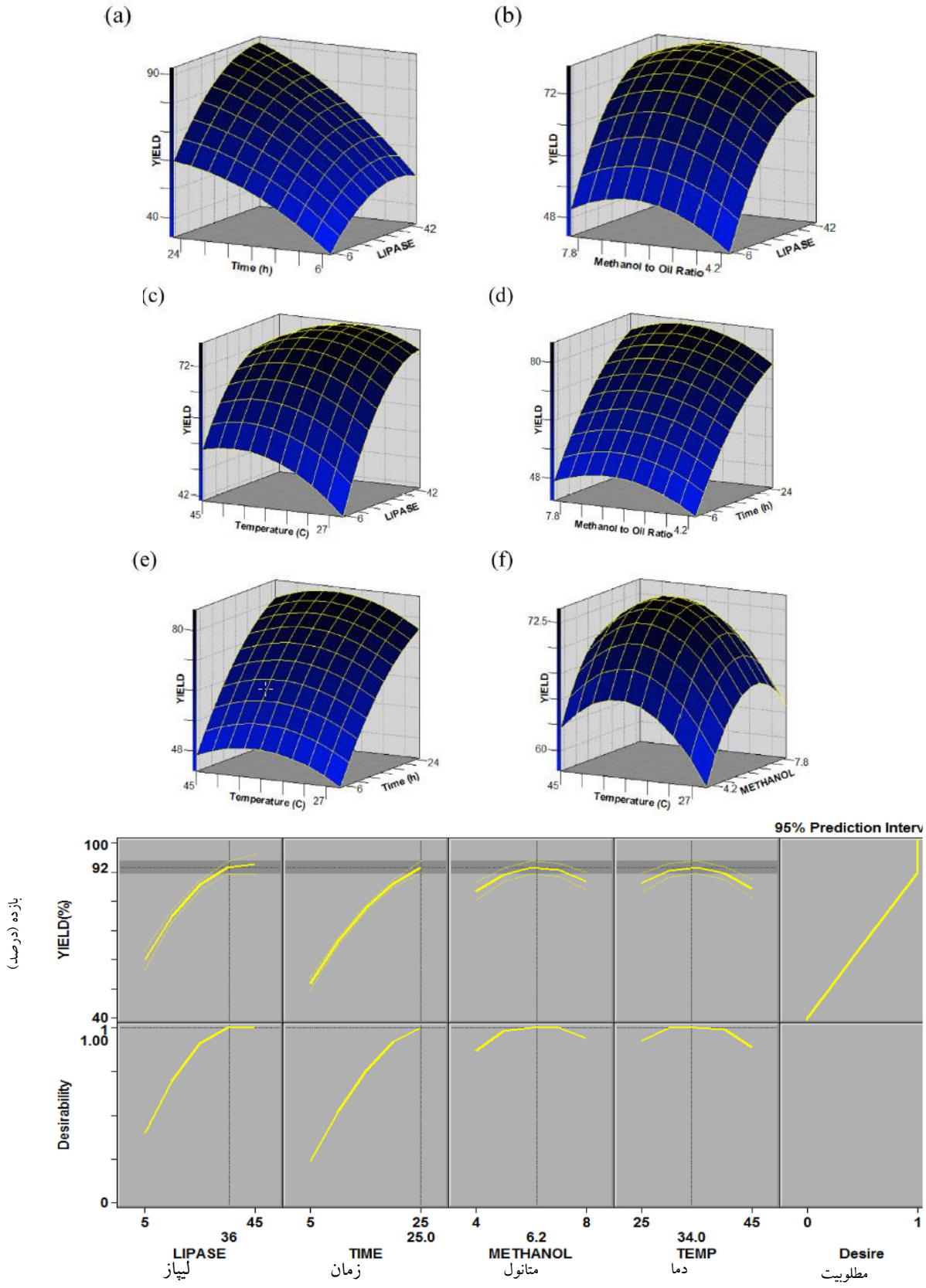
تأثیر متغیرهای طراحی بر تابع هدف در نقاط بهینه در شکل ۷ نشان داده شده است. در هر نمودار، تأثیر یکی از متغیرهای آزمایشی بر بازده واکنش در حالی که سایر عوامل در نقطه بهینه ثابت نگه داشته شده‌اند، نمایش داده شده است.

همانطور که در نمودار مشاهده می‌شود، مقدار تابع هدف (تولید بیودیزل) با افزایش هر دو غلظت لیپاز تثبیت‌شده و زمان واکنش افزایش یافت، در حالی که با افزایش نسبت مولی متانول به روغن پسماند کلزا و دمای واکنش ابتدا افزایش یافته و سپس کاهش یافت. شایان ذکر است که در نزدیکی نقطه بهینه، شیب منحنی مربوط به غلظت لیپاز تثبیت‌شده به طور ناگهانی کاهش یافت اما منحنی مربوط به زمان واکنش با شیب تند به سمت نقطه بهینه نزدیک شد. این پدیده نشان می‌دهد که در شرایط بهینه، در صورت ادامه یافتن زمان واکنش بیش از ۲۵ ساعت، بازده واکنش می‌تواند به‌طور قابل توجهی افزایش یابد.



شکل (٦) سطوح پاسخ: الف) غلظت کاتالیزور و زمان واکنش، ب) غلظت کاتالیزور و نسبت مولی متانول/روغن، ج) غلظت کاتالیزور و دمای واکنش، د) زمان واکنش و نسبت مولی متانول/روغن، ه) زمان واکنش و دمای واکنش، و) نسبت مولی متانول/روغن و دمای واکنش بر تولید بیودیزل.

Figure (6) Surface plot of the effect of a) catalyst concentration and reaction time, b) catalyst concentration and methanol/oil molar ratio, c) catalyst concentration and reaction temperature, d) reaction time and methanol/oil molar ratio, e) reaction time and reaction temperature and f) methanol/oil molar ratio and reaction temperature on biodiesel production.



شکل (۷) پروفایل پیش‌بینی طراحی آزمایش برای ترکیب تنظیمات عوامل.

Figure (7) The prediction profiler of the experiment design for combination of the factor settings.

قابلیت استفاده مجدد لیپاز تثبیت‌شده

قابلیت استفاده متعدد از بیوکاتالیزورها، منجر به کاهش قابل توجه هزینه سنتز بیودیزل می‌شود. شرایط واکنش‌های ترانس‌استریفیکاسیون بر روی کد صفر برای تمام متغیرهای آزمایشی تنظیم شد. نتایج آزمایش نشان داد که تبدیل روغن پسماند کلزا به FAME ها برای نمونه‌ها به ترتیب پس از ۱، ۲ و ۳ چرخه برابر با ۷۴٪، ۷۱٪ و ۶۶٪ به‌دست آمد. این نشان می دهد که لیپاز تثبیت شده حاصل دارای قابلیت استفاده مجدد قابل قبولی است که برای کاربرد در سنتز بیودیزل مطلوب می باشد. کاهش فعالیت ممکن است به تغییرات ساختاری لیپاز، مسدود شدن سایت های فعال لیپاز یا کاهش تدریجی لیپاز تثبیت شده در طول فرآیندهای واکنش نسبت داده شود.

نتیجه‌گیری

لیپاز Burkholderia cepacia با موفقیت بر روی نانوذرات هسته-پوسته مغناطیسی سیلیکا/اکسید آهن متخلخل تثبیت شد. لیپاز تثبیت‌شده به عنوان یک بیوکاتالیزور برای ترانس‌استریفیکاسیون روغن پسماند کلزا با متانول به منظور تولید سوخت بیودیزل استفاده شد. تحلیل‌های VSM نشان داد که خواص مغناطیسی نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 پس از تثبیت لیپاز تغییر قابل توجهی نداشته‌اند. به منظور دستیابی به حداکثر مقدار FAME ها، غلظت لیپاز تثبیت‌شده، زمان واکنش، نسبت مولی متانول به روغن پسماند کلزا و دمای واکنش به عنوان متغیرهای اصلی طراحی در نظر گرفته شدند و یک تابع هدف برای مسئله پیشنهاد شد. یک معادله سطح پاسخ مربعی که توسط RSM توسعه یافته بود، به‌طور موفقیت‌آمیزی برای بررسی مدل‌سازی و تعامل متغیرها بر بازده بیودیزل با استفاده از داده‌های تجربی مبتنی بر طراحی مرکب مرکزی ایجاد شد. مدل ریاضی توسعه‌یافته اعتبارسنجی شد و ثابت گردید که از نظر آماری برای پیش‌بینی مقدار FAME ها کافی و دقیق می‌باشد. روش تابع مطلوبیت حداکثر مقدار FAME برابر با ۹۲٪ را در شرایط غلظت لیپاز تثبیت‌شده ۳۶٪، زمان واکنش ۲۵ ساعت، نسبت مولی متانول به روغن پسماند کلزا برابر با ۶/۲ و دمای واکنش ۳۴ درجه سلسیوس پیش‌بینی کرد. اگرچه زمان واکنش در مقایسه با روش ترنس استریفیکاسیون با استفاده از کاتالیست های شیمیایی بیشتر است اما باید توجه داشت که کاتالیست های شیمیایی برای روغن پسماند که حاوی آب است مناسب نمی باشد چرا که واکنش را به سمت تولید صابون می برد و عملکرد تولید بیودیزل به شدت کاهش می یابد. در تبدیل آنزیمی روغن پسماند کلزا به بیودیزل، لیپاز تثبیت‌شده بر روی ذرات مغناطیسی در چرخه سوم ۱۱٪ از فعالیت خود را از دست داد که این امر امکان بازیابی و استفاده مجدد آن را فراهم ساخت.

References

1. Ansari Samani M., Hosseinzadeh Samani B., Ghasemi-Varnamkhasti M., Rostami S., and Ebrahimi R. 2023. Design, construction and evaluation of a washing machine with water circulation system for agricultural tuber products. Journal of Researches in Mechanics of Agricultural Machinery, 29: 55-68 (in Persian with English abstract) https://doi.org/10.22034/jrmam.2023.14230.650

2. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

3. Batistella, L., Lerin, L.A., Brugnerotto, P., Danielli, A.J., Trentin, C.M., Popiolski, A., Treichel, H., Oliveira, J.V., de Oliveira, D. 2012. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system. Ultrasonics Sonochemistry, 19: 452-458. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.11.018

4. Bhattacharya, S., Banerjee, R. 2008. Laccase mediated biodegradation of 2, 4-dichlorophenol using response surface methodology. Chemosphere, 73: 81-85. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.005

5. Cho, S.W., Rhee, J.S. 1993. Immobilization of lipase for effective interesterification of fats and oils in organic solvent. Biotechnology and Bioengineering, 41: 204-210. https://doi.org/10.1002/bit.260410206

6. Cervero, J.M., Alvarez, J.R., Luque, S. 2014. Novozym 435-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl esters from soybean oil for biodiesel production. Biomass and Bioenergy, 61: 131-137. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.12.005

7. Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P., Wang, X. 2009. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. Energy Conversion and Management, 50: 668-673. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.10.011

8. Deng, J. Lu, L., Zhao, R., Zhang, R., Wang, F., Tan, T. 2010. Pretreatment of immobilized Candida sp. 99-125 lipase to improve its methanol tolerance for biodiesel production. Journal of molecular catalysis. B, Enzymatic, 62: 15-18. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.08.002

9. Ferrero, G.O., S_anchez Faba, E.M., Rickert, A.A., Eimer, G.A. 2020. Alternatives to rethink tomorrow: biodiesel production from residual and non-edible oils using biocatalyst technology. Renewable energy, 150: 128-135. https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.12.114

10. Guo, Z., Sun, Y. 2004. Characteristics of immobilized lipase on hydrophobic superparamagnetic microspheres to catalyze esterification. Biotechnology Progress, 20: 500-506. https://doi.org/10.1021/bp034272s

11. Gharat, N., Rathod. V.K. 2013. Enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate. Rathod Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 88: 36-40. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.11.007

12. Hilal, N., Kochkodan, V., Nigmatullin, R., Goncharuk, V., Al-Khatib, L. 2006. Lipase immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: comparison of various approaches to membrane preparation. Journal of Membrane Science, 268: 198-207. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.06.039

13. Hong, J., Gong, P., Xu, D., Dong, L., Yao, S. 2007. Stabilization of a-chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel. Journal of Biotechnology, 128: 597-605. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.11.016

14. Hu, Z., Cai, M., Liang, H.H. 2008. Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from Radix Bupleuri. Separation and Purification Technology, 61: 266-275. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.11.016

15. Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., Shrestha, S. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 16: 53-58. https://doi.org/10.1016/S1381-1177(01)00045-5

16. Jothiramalingam, R., Wang, M.K. 2009. Review of recent developments in solid acid, base, and enzyme catalysts (heterogeneous) for biodiesel production via transesterification. Industrial & Engineering Chemistry Research, 48: 6162-6172. https://doi.org/10.1016/S1381-1177(01)00045-5

17. Khoobbakht, G., Najafi, G., Karimi, M., Akram, A. 2016. Optimization of operating factors and blended levels of diesel, biodiesel and ethanol fuels to minimize exhaust emissions of diesel engine using response surface methodology. Applied Thermal Engineering, 99: 1006-1017. https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2015.12.143

18. Khoobbakht, G., Karimi, M., Kheiralipour, K. 2019. Effects of biodiesel-ethanol-diesel blends on the performance indicators of a diesel engine: a study by response surface modeling. Applied Thermal Engineering, 148: 1385-1394. https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2018.08.025

19. Khoobbakht, G., Kheiralipour, K., Rasouli, H., Rafiee, M., Hadipour, M., Karimi, M. 2020. Experimental exergy analysis of transesterification in biodiesel production. Energy, 196: 117092. https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117092

20. Karimi, F., Rafiee, S., Taheri-Garavand, A., Karimi. M. 2012. Optimization of an air drying process for Artemisia absinthium leaves using response surface and artificial neural network models. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 43: 29-39. https://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.04.005

21. Karimi, M., Keyhani, A., Akram, A., Rahman, M., Jenkins, B., Stroeve, P. 2013. Hybrid response surface methodology-genetic algorithm optimization of ultrasound assisted transesterification of waste oil catalysed by immobilized lipase on mesoporous silica/iron oxide magnetic core-shell nanoparticles. Environmental Technology, 34: 2201-2211. https://doi.org/10.1080/09593330.2013.837939

22. Li, W., Du, W., Liu, D. 2007. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 45: 122-127. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.01.002

23. Li, X.P., Zhao, G.Q., Guan, Y.J., Ma. M.X. 2009. Optimal design of heating channels for rapid heating cycle injection mold based on response surface and genetic algorithm. Materials & Design, 30: 4317-4323. https://doi.org/10.1016/j.matdes.2009.04.016

24. Maleki M., Mohseni Roudbari S., Fakhroleslam M., and Zarei G. 2021. Potential assessment of non-edible sources for biodiesel production in Iran. Journal of Applied researches of chemical – polymer, 5:17-36 (in Persian with English abstract) http://arcpe.modares.ac.ir/article-38-47377-en.html

25. Modi, M.K., Reddy, J., Rao, B., Prasad. R. 2007. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. Bioresource Technology, 98: 1260-1264. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.006

26. Ma, F., Hanna, M.A. 1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology, 70: 1-15. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00025-5

27. Nelson, L.A., Foglia, T.A., Marmer. W.N. 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. Journal of the American Oil Chemists' Society, 73: 1191-1195 https://doi.org/10.1007/BF02523383

28. Oni, B.A., Oluwatosin, D. 2020. Emission characteristics and performance of neemseed (Azadirachta indica) and Camelina (Camelina sativa) based biodiesel in diesel engine. Renewable Energy, 149: 725-734. https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.12.012

29. Park, E.Y., Sato, M., Kojima, S. 2008. Lipase-catalyzed biodiesel production from waste activated bleaching earth as raw material in a pilot plant. Bioresource Technology, 99: 3130-3135. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.059

30. Rahimzadeh H., Tabatabaei M., Arjmand M., Vafajo L., and Mirzajanzadeh M. 2015. Investigation of the Role of Various Catalysts in Biodiesel Fuel Production Processes, 76: 80-100 (in Persian) https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.059

31. Ranganathan, S.V., Narasimhan, S.L., Muthukumar, K. 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. Bioresource Technology, 99: 3975-3981. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.060

32. Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas. V. 2005. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. Journal of Biotechnology, 29: 291-299. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.04.009

33. Torkian Boldaji, M., Ebrahimzadeh, R., Kheiralipour, K., Borghei, A.M. 2011. Effect of some BED blends on the equivalence ratio, exhaust oxygen fraction and water and oil temperature of a diesel engine. Biomass and Bioenergy, 35: 4099-4106. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.055

34. Tran, D.T., Yeh, K.L., Chen, C.L., Chang, J.S. 2012. Enzymatic transesterification of microalgal oil from Chlorella vulgaris ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized Burkholderia lipase. Bioresource Technology, 108: 119-127. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.145

35. Ting, W.J., Tung, K.Y., Giridhar, R., Wu, W.T. 2006. Application of binary immobilized Candida rugosa lipase for hydrolysis of soybean oil. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 42: 32-38. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.06.009

36. Vyas, A.P., Verma, J.L., Subrahmanyam, N. 2010. A review on FAME production processes. Fuel, 89: 1-9. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.08.014

37. Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., Tominaga, Y. 2000. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized Candida antarctica lipase. Journal of the American Oil Chemists' Society, 77: 355-360. https://doi.org/10.1007/s11746-000-0058-9

38. Xie, W., Ma, N. 2010. Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. Biomass and Bioenergy, 34: 890-896. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.01.034

39. Xie, W., Wang, J. 2012. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. Biomass and Bioenergy, 36: 373-380. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.11.006

40. Yu, D., Tian, L., Wu, H., Wang, S., Wang, Y., Ma, D., Fang. X. 2010. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. Process Biochemistry, 45: 519-525. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.012

41. Yaakob, Z., Mohammad, M., Alherbawi, M., Alam, Z., Sopia. K. 2013. Overview of the production of biodiesel from Waste cooking oil. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 18: 184-193. https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.10.016

42. Zhou, Y.T., Nie, H.L., Branford-White, C., He, Z.Y., Zhu. L.M. 2009. Removal of Cu 2þ from aqueous solution by chitosan-coated magnetic nanoparticles modified with a-ketoglutaric acid. Journal of Colloid and Interface Science, 330 : 29-37. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.10.026