Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:59 +0430 on Sunday June 20th 2021

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی – مولکولی

دوره پنجم، شماره هجدهم، بهار ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

استریفیکاسیون متانول و اولئیک اسید با استفاده از سلول های رایزوپوس اوریزا تثبیت یافته بر لوفا

سمانه ستاری[۱]، هدی خصالی اقطاعی[۱]، فرزانه و هابزاده[۲]*

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

۲. استاد، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

چکیده

سابقه و هدف: تولید بیودیزل به عنوان آلکیل استر اسیدی چرب از سازگاری قابل ملاحظ های با محیط زیست برخوردار است. سلول های رایزوپوس اوریزا تولیدکننده لیپاز درون سلولی (سلول کامل)، قابلیت کاتالیز واکنش ترانس استریفیکاسیون روغن های گیاهی با الکل ها را برای تولید بیودیزل دارا هستند. به منظور بررسی تاثیر تثبیت بر فعالیت آن در واکنش های سنتزی، فعالیت آنزیم لیپاز تولیدی از سلول های آزاد و تثبیت یافته در مدت زمان های مختلف کشت مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: از سلول های رایزوپوس اوریزا تثبیت یافته بر پایه لوفا و یا سلول آزاد استفاده شده است. سنجش فعالیت آبکافت از روش تیترسنجی و سنجش اسید های چرب آزاد با روش کدورت سنجی انجام شده است.

یافته ها: لیپاز درون سلولی نسبت لیپاز به برون سلولی فعالیت بالاتری از خود نشان داد. بیشترین فعالیت درون سلولی از بیوکاتالیست به دست آمده از کشت ۴۸ ساعته حاصل شد. افزودن مرحل های متانول، باعث بهبود پیشرفت واکنش و بازدهی بالاتر شد.

بحث: با تغییر مورفولوژی رشد میکروارگانیسم هنگام تثبیت بر پایه لوفا، تولید لیپاز درون سلولی به میزان قابل توجهی نسبت به سلول آزاد افزایش مییابد. از طرفی، اضافه کردن مرحل های متانول منجر به کاهش اثر بازدارندگی آن بر آنزیم لیپاز شد.

نتیجه گیری: تثبیت سلول، باعث افزایش فعالیت لیپاز درون سلولی می شود. سلول های رایزوپوس اوریزا تثبیت یافته بر پایه های لوفا کاتالیزور مناسبی برای واکنش های سنتزی می باشند.

کلمات کلیدی : متیل اولئات، لیپاز، رایزوپوس اوریزا، لوفا، بیودیزل.

مقدمه

سوخت دیزل کاربرد های گستردهای در صنعت جهانی دارد ولی با توجه به تجدید ناپذیر بودن این منابع و همچنین مشکلات زیست محیطی که آلاینده های ناشی از این سوخت ها ایجاد میکنند، تلاش ها برای یافتن جایگزین های مناسب آغاز گردید (۳، ۱).

بیودیزل، مخلوطی از مونو- آلکیل استرهای منابع لیپیدی است که جایگزینی مناسب برای استفاده در موتورهای تراکم- احتراق (دیزلی) میباشد (۸). با توجه به منابع گیاهی (دانه سویا، آفتابگردان، ذرت، بادام زمینی و کانولا)، جانوری (پیه گاو و چربی خوک) ، میکروبی (جلبکها) و تولید و استخراج چربی ها از این منابع، تولید بیودیزل از سازگاری قابل ملاحظهای با محیط زیست برخوردار است (۴).

ترانس استریفیکاسیون شامل واکنش یک روغن (تری گلیسرید) و یک الکلاست که محصول آن مخلوط استر ها و گلیسرول است. گلیسرول به عنوان محصول جانبی با گرانروی بالا جدا شده و آلکیل استر اسید های چرب (بیودیزل) بدست آمده دارای گرانروی پایین میباشند. هدف اصلی واکنش متانولیز[۱] روغن های گیاهی، کاهش ویسکوزیته روغن می باشد (۳).

آدرس نویسنده مسئول : دانشگاه صنعتی امیرکبیر
پست الکترونیکی:*far@aut.ac.ir*
تاریخ دریافت مقاله:۱۳۹۲/۰۷/۲۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۴/۲۲

۱ Methanolysis

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:59 +0430 on Sunday June 20th 2021

برای بهبود سرعت و بازده واکنش تولید بیویزل معمولاً از یک کاتالیست استفاده می شود که میتواند قلیایی، اسیدی، کاتالیست های هتروژن غیرآلی و یا آنزیمی باشد. تولید صنعتی- تجاری بیودیزل عمدتاً توسط کاتالیست های شیمیایی انجام پذیرفته است که خود دارای نقاط ضعف چندی است. در حالیکه تولید بیودیزل توسط کاتالیزور آنزیمی لیپاز از نقاط امتیازی قابل ملاحظ های برخوردار است از جمله آنکه دمای عملیاتی واکنش در مقایسه با روش های شیمیایی در سطح پایینتری است و جداسازی گلیسرول به عنوان یک محصول جانبی واکنش، می تواند با سهولت بیشتری به انجام برسد، همچنین اسید های چرب آزاد و آب موجود در مخلوط واکنش، تداخلی در انجام واکنش ایجاد نمیکنند و میتوانند به طور کامل به استر تبدیل شوند(۳).

لیپاز ها (E.C.۳.۱.۱.۳) گروهی از هیدرولاز ها هستند که در محیط های آبی، بر روی پیوند های کربوکسیل استر موجود در تریآسیل گلیسرول تأثیر گذاشته و منجر به آزاد شدن اسید های چرب و گلیسرول آن ها میشوند (۱۲).

لیپاز از منابع مختلف گیاهی، حیوانی و میکروارگانیسم ها (باکتری وقارچ رشت های) تولید می شود. برای تولید صنعتی آنزیم، میکروارگانیسم ها به دلیل مزایای مختلف از جمله: زمان کوتاه تولید، تطبیق پذیری بالا با شرایط محیط زیستی و آسانی دستکاری ژنتیکی ارجح هستند (۱۵).

مانع اصلی برای تجاری سازی این روش، قیمت لیپاز تولیدی است. آنزیم لیپاز، کاتالیزور بیولوژیکی میباشد و در واکنشی که آن را کاتالیز می کند مصرف نمی شود. در نتیجه اقتصاد فرآیند میتواند با استفاده مجدد از این آنزیم ارتقا پیدا کند. تثبیت آنزیم یکی از روش های مناسب میباشد. این راهکار در بیشتر موارد، پایداری آنزیم را در برابر غیر فعال شدن توسط عواملی مانند دما، pH، دناتورهشدن و مواد تجزیه کننده شیمیایی افزایش میدهد.

همانطور که ذکر شد میکروارگانیسم ها بهدلیل داشتن مزایای فراوان از منابع بسیار مهم آنزیمی هستند. آنزیم تولیدی در قسمت های مختلف سلول میتواند حضور داشته باشد که به طور کلی به دو دسته درون سلولی و خارج سلولی طبقه بندی میشوند (۳). برای استفاده از آنزیم های برون سلولی، نیاز به خالص سازی توسط فرایند هایی است که ممکن است برای استفاده کاربردی پیچیده باشد. همچنین آنزیم هایی که با چنین عملیاتی بازیابی میشوند عموماً ناپایدار و گران هستند. درنتیجه، تحقیقات فراوانی برای استفاده مستقیم از سلول کامل برای کاتالیست زیستی انجام شد هاست. برای استفاده از کاتالیست زیستی سلول کامل در فرم مناسب، سلول ها باید با روشی شبیه کاتالیست های جامد معمولی که قبلاً در واکنش های شیمیایی استفاده میشد، تثبیت شوند. در این روش همزمان با رشد سلول، تثبیت نیز همزمان بر ذرات نگاهدارنده صورت میگیرد و پس از جداسازی می تواند بهصورت مستقیم بهعنوان منبع لیپاز درون سلولی بهکار رود. فعالیت لیپاز درون سلولی سلول های تثبیت یافته چندین برابر سلول های آزاد در کشت غوطهور است، علت این پدیده میتواند تغییر مورفولوژی قارچ و تاثیر آن بر تولید لیپاز باشد. با استفاده از تثبیت سلولی، مورفولوژی قارچ رایزوپوس از حالت رشت های به فرم پلت (دان های) تغییر یافته که موجب افزایش در میزان لیپاز درون سلولی می شود (۱۱).

برای تولید بیودیزل، واکنش استریفیکاسیون نیز علاوه بر واکنش ترانساستریفیکاسیون به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. اولئیک اسید در روغن های گیاهی و روغن های ضایعاتی به میزان قابل توجهی وجود دارد، به طور مثال ۳۰-۱۹٪ در روغن سویا، ۶۷-۳۶٪ در روغن بادامزمینی، ۵۶-۳۵٪ در روغن کانولا و ۶۰-۲۰٪ در روغن آفتابگردان. بنابراین بررسی واکنش اولئیک اسید و متانول برای تولید بیودیزل دارای اهمیت بالایی است (۱۶).

روش کار

مواد

اولئیک اسید و ایزواکتان از شرکت (Carlo (Italy خریداری شدند. روغن زیتون به صورت محلی تهیه شد و متانول و سایر مواد مورد نیاز برای تهیه محیط های کشت و سنجش فعالیت از شرکت-Merck (Ger many) خریداری شدند.

میکروارگانیسم و محیط کشت

تمامی آزمایش ها با رایزوپوس اوریزا PTCC۵۱۷۴ انجام شد و از مرکز منطق های کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران تهیه شد. این میکروارگانیسم روی اسلنت حاوی ۴٪ پتیتودکستروز آگار[۱] و ۲٪ آگار با استفاده از لوپ تلقیح شد و به مدت ۷ شبانهروز در دمای ۲۴°C قرار گرفت (۱۳). سپس به مقدار مشخصی به ارلن مایر mL۲۵۰ دارای mL۵۰ محیطکشت مایع، تلقیح شد (ترکیبدرصد این محیط در جدول۱ ذکر شده است که pH آن روی ۵٫۶ تنظیم می شود). این محیط ها تحت دمای ۳۰°C و دور rpm۱۵۰ به مدت زمان های کشت متفاوت (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) در شیکر انکوباتور قرار گرفتند تا در سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گیرند. پس از اتمام زمان محیط کشت، با استفاده از فیلتر، توده سلولی از محیط کشت جدا و با روش مشخص و ذکر شده در مراجع مورد شستشو قرار گرفت (۵). توده سلولی به منظور خشک شدن به مدت ۴۸ ساعت در آون خلأ در دمای محیط نگهداری شد.

---

۱ potato dextrose agar (PDA)

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:59 +0430 on Sunday June 20th 2021

ترکیبات مورد استفاده	میزان مورد نیاز (گرم)
پلی پپتون	۷۰,۰۰
نیترات سدیم	۱,۰۰
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	۱,۰۰
منیزیم سولفات ۷ آبه	۰,۵
روغن زیتون	۳۰,۰۰

جدول ۱- ترکیبات موجود در محیط کشت مایع رایزوپوس اوریزا در یک لیتر آب مقطر (۵)

سنجش فعالیت ویژه آنزیم

فعالیت آنزیم برحسب سرعت اولیه واکنش تعیین شده است. سرعت اولیه واکنش، از شیب منحنی تغییرات غلظت اولئیک اسید برحسب زمان در زمان های ابتدایی واکنش که بازدارندگی مشاهده نمی شود، محاسبه می شود. در این مطالعه فعالیت آنزیم برحسب واحد U که برابر با ۱μmol اسید چرب آزاد بر زمان (برحسب دقیقه) است، گزارش شده است. برای محاسبه فعالیت ویژه، U محاسبه شده بر جرم توده زیستی و یا میلی لیتر محلول محیط کشت تقسیم شده است.

سنجش فعالیت آبکافتی آنزیم لیپاز

فعالیت آنزیم در واقع سرعت اولیه واکنش (بیشترین سرعت تبدیل محصول) در مراحل اولیه تبدیل (۵-۲۰٪) میباشد (۶). بررسی فعالیت آبکافتی برای آنزیم لیپاز متصل به غشا سلولی (درون سلولی) و محیط کشت (برون سلولی) در محیطی شامل g۲ روغن زیتون، mL۹ بافر استات M۰.۱ با pH=۵.۶، mL۱ کلسیم کلرید M۰.۰۵ در ظرف mL۵۰ با درب پیچی انجام شده است. آنزیم تثبیت یافته بر یک قطعه بیوکاتالیست و یا mg۱۰۰ از توده زیستی حاصل از کشت آزاد برای سنجش فعالیت آبکافت درون سلولی و mL۱محلول محیط کشت برای سنجش فعالیت هیدرولیز برون سلولی مورد استفاده قرار گرفت هاند. این محلول ها بهمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰°C با دور ۱۵۰ rpm قرار گرفتند. در نهایت از روش تیترسنجی با سود M۰.۱ برای تعیین میزان اسید چرب استفاده شده است. تمامی مراحل ذکر شده برای نمونه کنترل بدون آنزیم نیز به صورت همزمان انجام شده است (۵).

روش کدورت سنجی برای سنجش اسید های چرب آزاد

برای سنجش اسید های چرب آزاد روش کدورت سنجی توسط محلول نمک های مس (۲) مورد استفاده قرار گرفت و در محاسبه بازده واکنش تولید متیلاستر بهکار گرفتهشد.

در ابتدا منحنی استاندارد اولئیک اسید برای غلظت های μmol ۵-۵۰ اولئیک اسید رسم شد و از محلول استات مس- پیریدین بهعنوان معرف استفاده شده است (۲). اولئیک اسید با غلظت های مشخص، در mL ۵ ایزواکتان حل و mL۱محلول معرف به آن اضافه شده است. این محلول بهمدت ۹۰ ثانیه با استفاده از دستگاه ورتکس میکسر به شدت هم زده می شود. سپس جذب این محلول ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۱۵ نانومتر خوانده می شود و مقدار میکرومول اسید چرب باقیمانده در محلول که با استات مس تشکیل کمپلکس داده، در مقابل ایزواکتان که فاقد اسید چرب است سنجیده می شود و منحنی استاندارد برای غلظت های مختلف بر حسب جذب خوانده شده، رسم می شود (۹). برای بررسی بازده تولید متیل استر در واکنش استریفیکاسیون نیز مشابه همین ترتیب عمل شده است.

واکنش سنتز متیل اولئات

واکنش اولئیک اسید و متانول با حجم کلی mL۳ در ظرف mL۲۰ با درب پیچی با کاتالیزوری قطع های بیوکاتالیست (رایزوپوس اوریزا تثبیت یافته) انجام شده است. تاثیر پارامتر های مختلف مانند زمان انجام واکنش و افزودن مرحل های متانول بر بازده تولید متیل استر و سرعت واکنش مورد بررسی قرار گرفته است.

تمامی آزمایش ها با دو بار تکرار و خطای کمتر از ۵٪ گزارش شد هاند.

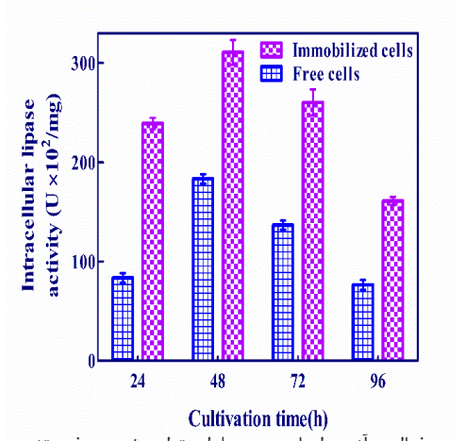
نتایج

فعالیت آبکافت سیستم آنزیمی (بیوکاتالیست سلولی)

برای بررسی آنزیم لیپاز درون سلولی تولید شده، سنجش فعالیت سلول تثبیت یافته و سلول آزاد انجام شده است که نتایج آن در شکل۱ ارائه شد هاست.

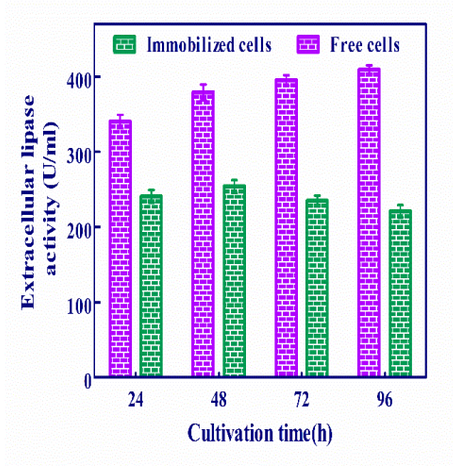
با توجه به شکل۱، فعالیت هیدرولیز درون سلولی در سلول تثبیت شده نسبت به سلول آزاد به طور قابل توجهی افزایش داشته است که این امر بیانگر بهبود فعالیت لیپاز درون سلولی در اثر تثبیت و افزایش نگهداشت آنزیم لیپاز توسط توده سلولی است (۵). با افزایش زمان کشت سلول از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، فعالیت هیدرولیز در هر دو فرم آزاد و تثبیت یافته افزایش یافته است. این درحالی است که افزایش بیشتر از این در زمان کشت، باعث کاهش فعالیت آنزیم شد هاست.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:59 +0430 on Sunday June 20th 2021



شکل۱- مقایسه فعالیت آنزیم لیپاز درون سلولی تولید شده به فرم تثبیت یافته و آزاد (انجام آزمایش ها با دو مرتبه تکرار)

جهت بررسی آنزیم لیپاز برون سلولی تولید شده، سنجش فعالیت محیط کشت به دست آمده از سلول تثبیت یافته و یا سلول آزاد انجام شده است که نتایج آن در شکل۲ ارائه شده است.



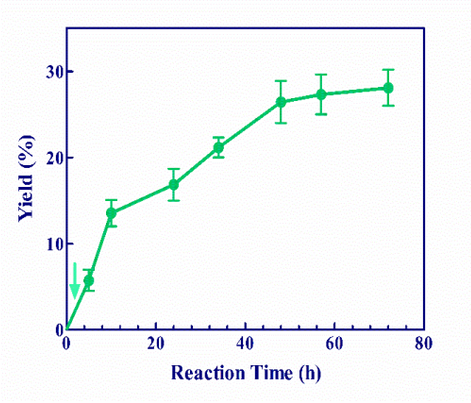
شکل ۲- مقایسه فعالیت آنزیم لیپاز برون سلولی تولید شده به فرم تثبیت یافته و آزاد (انجام آزمایش ها با دو مرتبه تکرار)

فعالیت هیدولیز خارج سلولی تاییدی است بر آنچه که در فعالیت درون سلولی مشاهده شده است و فعالیت محیط کشت به دست آمده از کشت آزاد نسبت به تثبیت شده، دارای فعالیت بالاتری است. در فرم آزاد ترشح آنزیم لیپاز تولیدی به محیط کشت با افزایش زمان کشت، افزایش یافته است. در حالیکه فرم تثبیت یافته فعالیت خارجی نسبتاً ثابتی داشته است.

واکنش اولئیک اسید و متانول

اثر مدت زمان واکنش بر تولید متیلاستر

پیشرفت واکنش استریفیکاسیون در مدت زمان انجام واکنش مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این بررسی در شکل۳ ارائه شده است. بازده واکنش پس از گذشت ۴۸ ساعت حدود ۳۰٪ است و به تعادل میرسد. بنابراین افزایش زمان انجام واکنش به ۷۲ ساعت نیز تغییری در پیشرفت واکنش ندارد.



شکل ۳- پیشرفت واکنش استریفیکاسیون طی گذشت زمان در C۳۰°، rpm۱۵۰با نسبت مولی ۱:۱ واکنش‌دهنده ها، یک قطعه بیوکاتالیست (انجام آزمایش ها با دو مرتبه تکرار)

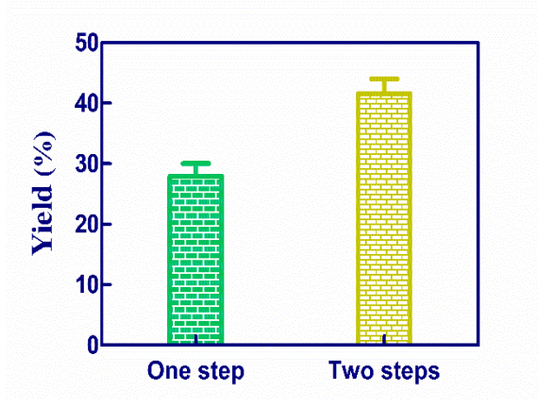
اثر اضافه نمودن مرحل های متانول بر پیشرفت واکنش

غلظت بالای متانول (متانولی که در روغن حل نمی شود)، می تواند به طور جدی باعث دناتوره شدن برگشت ناپذیر لیپاز شود که پروتئین ها را ناپایدار میسازد و آنزیم را از نیاز ضروری آن به آب محروم میسازد (۱۲). برای جلوگیری از غیرفعال شدن لیپاز توسط غلظت بالای متانول موجود در محیط واکنش، افزودن مرحل های متانول توسط شیمادا[۲] و همکارانش گزارش شده است (۱۴)، [۷].

ب هاین ترتیب متانول با نسبت مولی ۱ به ۱ (نسبت به اولئیک اسید) در یک و دو مرحله به واکنش اضافه شد (در ۱مرحل های: اضافهنمودن ۱ مول متانول در لحظه صفر، ۲مرحل های: اضافهنمودن ۰٫۵ مول در لحظه صفر و ۲۴ ساعت). نتایج این بررسی در شکل ۴ آمد هاست. افزودن یک باره متانول در زمان صفر منجر به بازدهی حدود ۳۰ درصد پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان واکنش می شود، درحالیکه افزودن همان میزان متانول ولی در دو مرحله بازدهی را به حدود ۴۳ درصد افزایش میدهد. درنتیجه در بازده واکنش را افزایش خواهد داد. مشابه این نتیجه توسط مرجع (۱۰) گزارش شد هاست که در واکنش استریفیکاسیون اولئیک اسید در حضور بیوکاتالیست رایزوپوس اوریزا با افزودن مراحل، بازدهی واکنش افزایش مییابد.

۲ Shimada et al.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:59 +0430 on Sunday June 20th 2021



شکل ۴- تاثیر اضافه‌نمودن مرحل های متانول بر بازده واکنش استریفیکاسیون پس از گذشت ۴۸ ساعت. در شرایط C۳۰°، rpm۱۵۰،نسبت مولی ۱:۱ واکنش‌دهنده ها، یک قطعه بیوکاتالیست و بدون حضور حلال (انجام آزمایش ها با دو مرتبه تکرار)

بحث

فعالیت لیپاز تولیدی از سلول های آزاد و تثبیت یافته برای بررسی تاثیر تثبیت میکروارگانیسم بر فعالیت آنزیم لیپاز مقایسه شده است. نتایج این بررسی نشان داد که با تغییر مورفولوژی رشد میکروارگانیسم هنگام تثبیت بر پایه لوفا، تولید لیپاز درون سلولی به میزان قابل توجهی نسبت به سلول آزاد افزایش مییابد. این درحالی است که فعالیت لیپاز برون سلولی در سلول های آزاد نسبت به سلول تثبیت یافته دارای مقدار بیشتری است. تشکیل فرم دان های در حالت سلول تثبیت یافته از ترشح آنزیم به محیط کشت جلوگیری می کند و با حفظ لیپاز در درون سلول باعث افزایش فعالیت کاتالیزوری آنزیم لیپاز درون سلولی می شود. این نتایج مشابه نتایج گزارش شده توسط فوکودا[۳] و همکارانش بود که از پایه پلی اورتان فوم برای تثبیت رایزوپوس اوریزا استفاده کرده بودند (۵).

تاثیر مدت زمان کشت سلول بر فعالیت آنزیم لیپاز در دو فرم آزاد و تثبیت یافته بررسی شده است. بیشترین فعالیت آبکافت درون سلولی توسط سلول تثبیت یافته حاصل از کشت ۴۸ ساعته به دست آمد (U ۳.۱۹۶ ب هازای میلیگرم سلول تثبیتشده). در کشت به فرم آزاد نیز سلول ۴۸ ساعته دارای بیشترین فعالیت آبکافت درون سلولی بود (U ۱.۸۶۷ ب هازای میلیگرم سلول تثبیتشده). علیرغم روند مشاهدهشده در فعالیت لیپاز درون سلولی، فعالیت لیپاز برون سلولی در دو محیط تقریباً ثابت بود و تغییر قابل ملاحظ های مشاهده نشد. با توجه به نتایج به دست آمده از این بخش، سلول تثبیت یافته حاصل از کشت ۴۸ ساعته بهعنوان کاتالیزور واکنش اولئیک اسید و متانول مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی مدت زمان انجام واکنش و بهتعادل رسیدن آن، نشان داد که پس از گذشت ۴۸ ساعت از انجام واکنش، بازدهی تن ها حدود ۳۰٪ حاصل می شود و با افزایش زمان واکنش به ۷۲ ساعت تغییری در بازدهی واکنش مشاهده نمی شود. اضافه کردن مرحل های متانول بهمنظور کاهش اثر بازدارندگی آن بر آنزیم لیپاز انجام شد. افزودن دو مرحله ای متانول در مقایسه با افزودن یک مرحل های، باعث افزایش بازده واکنش از ۳۰٪ به ۴۳٪ شده است.

نتیجه گیری

برای بررسی عملکرد آنزیم لیپاز در واکنش سنتزی تولید متیل استر، فعالیت آبکافتی دو حالت تثبیت شده و فرم آزاد سلول، مورد آزمایش قرار گرفت. تثبیت سلول های رایزوپوس اوریزا بر پایه لوفا، منجر به حفظ لیپاز در درون سلول و افزایش فعالیت کاتالیزوری آنزیم لیپاز درون سلولی می گردد.

متانول نقشی دوگانه در این واکنش ایفا می کند، از طرفی به عنوان یک واکنش دهنده اولیه عمل می کند و افزایش آن منجر به افزایش سرعت واکنش می شود و از طرفی دیگر نیز نقش بازدارنده بر آنزیم لیپاز دارد. به این ترتیب، افزودن دو مرحله ای متانول به محیط واکنش، بازدهی را تا حدود ۱۳٪ افزایش داد.

سپاسگزاری

از دانشگاه صنعتی امیرکبیر برای همکاری در این پروژه تشکر و قدردانی می شود.

۳ Fukuda et al.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:59 +0430 on Sunday June 20th 2021

منابع

(1) Abdullah, Z., et al., Critical technical areas for future improvement in biodiesel technologies. Environ Res Lett, 2007; 2.

(2) Duncombe, W.G., The Colorimetric Micro-Determination of Long-Chain Fatty Acids. Biochem J, 1963; 88: p. 7-10.

(3) Fukuda H., et al., Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. J Biosci Bioeng, 2001; 92: p. 405-416.

(4) Gog A., et al., Biodiesel production using enzymatic transesterification: Current state and perspectives. Renewable Energy, 2012; 39: p. 10-16.

(5) Hama S., et al., Lipase Localization in Rhizopus oryzae Cells Immobilized within Biomass Support Particles for Use as Whole-Cell Biocatalysts in Biodiesel-Fuel Production. J Biosci Bioeng, 2006; 101: p. 328-333.

(6) Hasan F., et al., Methods for detection and characterization of lipases: A Comprehensive review. Biotechnol Adv, 2009; 27: p. 782-798.

(7) Kaieda M., et al., Biodiesel Fuel Production from Plant Oil Catalyzed by Rhizopus oryzae Lipase in a Water- Containing System without an Organic Solvent. J Biosci Bioeng, 1999; 88: p. 627-631.

(8) Knothe G. Historical perspectives on vegetable oil-based diesel fuels. Inform, 2001; 12: p. 1103-1107.

(9) Kwon D.Y., et al., A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. JAOCS, 1986; 63: p. 89-92.

(10) Li W., et al., Rhizopus oryzae Whole-Cell-Ctalyzed Biodiesel Production from Oleic Acid in tert-Butanol Medium. Energy Fuels, 2008; 22: p. 155-158.

(11) Nakashima T., et al., Cell Aggregation as a Trigger for Enhancement of Intracellular Lipase Production by a Rhizopus Species. J Ferment Bioeng, 1990; 70: p. 85-89.

(12) Reis P., et al., Lipases at interfaces: A review. Adv Colloid Interface Sci, 2009; 147-148: p. 237-250.

(13) Salleh A.B., et al., Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic Rhizopus oryzae and factors affecting their production. CAN J Microbiol, 1993; 39: p. 978-981.

(14) Shimada Y., et al., Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized Candida Antarctica Lipase. JAOCS, 1999; 76: p. 789-793.

(15) Yücel S.A., et al., Lipase Applications in Biodiesel Production, chapter 8.

(16) Zhang L.X., et al., The Synthesis of Methyl Oleate Catalyzed by Phosphotungstic Acid Immobilized on the Functionalized Palygorskite. Energy Sources Part A, 2012; 34: p. 1037–10.