

مروری بر فرایند تولید زیست دیزل به روش آنزیمی

صفورا رضانی، حمیدرضا کریمی نیا، محمدرضا فیاض، جلال شایگان*

تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت

پیام نگار: shayegan@sharif.ir

چکیده

یکی از شاخص‌های مهم در تولید سوخت‌های زیست سازگار قابلیت تجزیه پذیری زیستی، سمیت کمتر و قابلیت تجدید پذیری آن است و زیست‌دیزل یکی از سوخت‌هایی است که حائز چنین خصوصیتی می‌باشد و آن را می‌توان از روغن‌های گیاهی، چربی‌های حیوانی، ضایعات به وجود آمده از تصفیه روغن‌های گیاهی و روغن‌های سرخ شده تولید کرد. از نقطه نظر شیمیایی، زیست‌دیزل به عنوان مونو آلکیل استر اسیدهای چرب شناخته می‌شود. روش رایج جهت تولید زیست‌دیزل، ترانس استری کردن اسیدهای چرب است. در این روش، با استفاده از دو نوع کاتالیزگر شامل کاتالیزگرهای شیمیایی (قلیایی و اسیدی) و آنزیمی، تولید آلکیل استرها صورت می‌گیرد. واکنش آنزیمی که در آن از لیپاز استفاده می‌شود را می‌توان گزینه ای مناسب و زیست سازگار جهت تولید زیست‌دیزل به‌شمار آورد.

در این مقاله علاوه بر بازنگری بر تولید زیست‌دیزل به روش آنزیمی در ابتدا به طور خلاصه دو روش متداول تولید زیست‌دیزل شرح داده شده و سپس مروری بر انواع واکنش‌های آنزیمی موجود مورد استفاده جهت تولید زیست‌دیزل صورت خواهد گرفت.

کلمات کلیدی: زیست‌دیزل، استری کردن، آنزیم، لیپاز

۱- مقدمه

با توجه به مصرف روز افزون منابع تمام شدنی نفتی در دنیا، امروزه یکی از نگرانی‌های بشر، یافتن جایگزینی مناسب برای سوخت‌های فسیلی است. بنابراین، گزینه سوخت‌های تجدید پذیر برای مصارف آینده مورد توجه روز افزون قرار گرفته است. تحقیقات اخیر نشان داده است که زیست‌دیزل می‌تواند جایگزینی مطمئن و پاک برای سوخت‌های به دست آمده از منابع زیرزمینی مانند نفت باشد. به دنبال این موضوع، ترانس استری کردن^۱ زیست‌توده، ضایعات صنعتی و شهری گزینه ای مناسب جهت تولید انرژی مورد نیاز و در

نظر گرفتن جنبه‌های زیست محیطی می‌باشد که روشی ساده‌تر و مؤثرتر جهت تولید محصولات است. ترانس استری شدن، واکنش شیمیایی بین تری‌گلیسیریدها و الکل‌های زنجیره کوتاه است که در حضور کاتالیزگر مناسب، تولید مونو استر می‌کند و مولکول‌های تری‌گلیسیرید بلند و شاخه دار را به مونو استرها و گلیسرین تبدیل می‌نماید. الکل‌های زنجیره کوتاهی که معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارت‌اند از: متانول، اتانول، پروپانول و بوتانول. در این میان، از متانول به دلیل قیمت پایین به صورت تجاری استفاده می‌شود [۱]. در این واکنش، یک کاتالیزگر شیمیایی مانند هیدروکسید سدیم یا پتاسیم و یا یک کاتالیزگر آنزیمی مانند لیپاز

1. Trans-Esterification

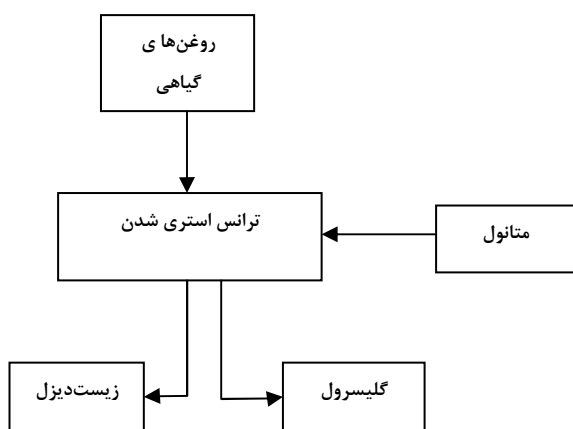
گزارشهایی نیز به طور پراکنده ترانس استری کردن را با الکل نوع دوم بررسی کرده‌اند [۱۹].

۲- تولید زیست‌دیزل

برای تبدیل روغن‌های گیاهی به زیست‌دیزل، به طور عمده از روش استری کردن استفاده می‌شود.

۲-۱ استری کردن^۵

متداول ترین روش تولید زیست‌دیزل، استری کردن روغن‌های گیاهی است. زیست‌دیزل به‌دست آمده از طریق فرایند استری کردن، مخلوطی از مونو آلکیل استرها از اسیدهای چرب بزرگتر می‌باشد. استری کردن، فرایند الکی شدن تری گلیسرید موجود در روغن‌های گیاهی است که منجر به تولید مخلوطی از مونو آلکیل استرها و گلیسرول در طی چند مرحله متوالی می‌شود (شکل (۱)).



شکل ۱- مراحل تولید زیست‌دیزل در طی فرایند استری کردن

گلیسرول که دارای گرانی بالاست از انتهای راکتور جدا می‌شود. سپس مخلوطی از مونوآلکیل استرها به دست می‌آید که مانند سوخته‌های فسیلی دارای گرانی پایینی است و می‌تواند به عنوان جایگزینی برای سوخته‌های فسیلی به کار گرفته شود.

۲-۱-۱ فرایند استری کردن

فرایند استری کردن می‌تواند به روشهای گوناگونی انجام پذیرد که از میان آنها می‌توان به استفاده از کاتالیزگرهای اسیدی، کاتالیزگرهای

مورد نیاز است. زیست‌دیزل را می‌توان از منابع گوناگونی از جمله دانه‌های روغنی مانند دانه‌های ذرت و سویا، از چربی‌های حیوانی و همچنین از روغنهای مصرف شده و دور ریختنی رستوران‌ها استحصال کرد [۲].

زیست‌دیزل را می‌توان به طور خالص در موتورهای دیزلی به کار برد که در این صورت به عنوان سوخت B100 شناخته می‌شود. با وجود این اغلب در اختلاط با سوخت دیزلی با پایه نفتی نیز استفاده می‌شود که در این حالت به صورت BXX نمایش داده می‌شود که XX درصد زیست‌دیزل در اختلاط را نشان می‌دهد. برای مثال، B20 مخلوطی از ۲۰٪ زیست‌دیزل و ۸۰٪ سوخت دیزل بر پایه نفتی است [۳].

در حالی که همه تولیدکنندگان تجاری زیست‌دیزل از فرایند کاتالیزگر قلیایی جهت فرایند ترانس استری کردن استفاده می‌کنند، دیگر روش‌ها که شامل کاتالیزگر اسیدی [۴] و آنزیمی [۵-۸] می‌باشند نیز پیشنهاد می‌شود. استفاده از کاتالیزگر اسیدی جهت پیش تصفیه خوراک با اسیدهای چرب بزرگتر^۱، بسیار مفید است اما سرعت واکنش جهت تبدیل تری گلیسریدها به متیل استرها با این کاتالیزگر بسیار آرام است. آنزیم‌ها بخوبی در روغن‌هایی با محتوای اسیدهای چرب آزاد، فعالیت خود را حفظ می‌کنند اما به دلیل گرانیمت بودن و عدم قابلیت کامل کردن درجه واکنش جهت تولید سوختی با مشخصه‌های ASTM^۲، کمتر از آن استفاده می‌شود [۹]. امروزه استفاده از آنزیم تثبیت شده و همچنین استفاده از چندین آنزیم به طور همزمان، افق تازه‌ای را در زمینه تولید زیست‌دیزل به روش آنزیمی گشوده است [۶-۸].

در مطالعات متعددی، واکنش‌های ترانس استری کردن و اینتراستری کردن^۳ در حضور آنزیم لیپاز در محیطی با حلال آلی یا بدون حلال آلی را بررسی کرده‌اند [۱۰-۱۵]. تحقیقات اخیر در مورد استفاده از لیپاز جهت ترانس استری کردن اسیدهای چرب با وزن مولکولی بالا بر آلکیل استر متمرکز شده است. در گزارشهای متعدد، الکی کردن^۴ روغن آفتابگردان [۱۶]، روغن دانه انگور [۱۷]، روغن سویا و چربی حیوانی [۱۸] بررسی شده است. واکنش‌های الکی کردن، اغلب با استفاده از روغن‌های نوع اول صورت می‌گیرند و

1. Higher Fatty Acid
2. American Society for Testing and Materials
3. Inter-Esterification
4. Alcoholysis

5. Esterification

۶۰°C نیز مناسب است. اما وجود اسیدهای چرب آزاد یا آلودگی با آب و تشکیل صابون، جداسازی در این فرایند را دشوار می‌سازد [۲۱].

دومین روش متداول جهت تولید زیست‌دیزل استفاده از کاتالیزگر اسیدی به جای قلیایی است. هر نوع اسید معدنی می‌تواند به عنوان کاتالیزگر مورد استفاده قرار گیرد. متداول ترین اسیدها سولفوریک اسید و سولفونیک اسید می‌باشند. با وجود امکان دست یابی به بازدهی بالا، این اسیدها باعث ایجاد خوردگی و آسیب رسانی به تجهیزات می‌شوند و سرعت فرایند نیز کاهش می‌یابد [۲۲]. الکی کردن تری گلیسریدها^۳ توسط کاتالیزگر اسیدی را می‌توان با تولید الکیل استرها که در کاربردهای مختلف قدیمی و برای بازارهای بزرگ در تولید صنعتی زیست‌دیزل از آنها استفاده شده است، انجام داد. در این روش، می‌توان بر بعضی از نواقص کاتالیزگرهای قلیایی سنتی که برای تولید الکیل استرها به کار می‌آیند فایده شاد. بزرگترین نقص کاتالیزگرهای قلیایی خاصیت بازدارندگی آنها برای استری شدن اسیدهای چرب آزاد^۴ است. این اسیدهای چرب آزاد که در حدود ۰/۳٪ وزنی روغن سویا می‌باشند و غلظت بالایی از چربی‌های زاید را به خود اختصاص داده‌اند در نتیجه آبکافت روغن با آب ایجاد شده است. اسیدهای چرب آزاد با قلیاهای محلول واکنش می‌دهند و طی مکانیسم واکنش صابونی شدن به صابون تبدیل می‌شوند. صابونها تشکیل امولسیون می‌دهند و به سختی می‌توان متیل استرها^۵ را بازیابی کرد. صابونی شدن باعث مصرف کاتالیزگر قلیایی و کاهش بازدهی محصول می‌شود. استفاده از کاتالیزگرهای قلیایی نیازمند این است که واکنشگرهای روغن، خشک شوند و شامل کمتر از ۰/۳٪ وزنی اسیدهای چرب آزاد باشند.

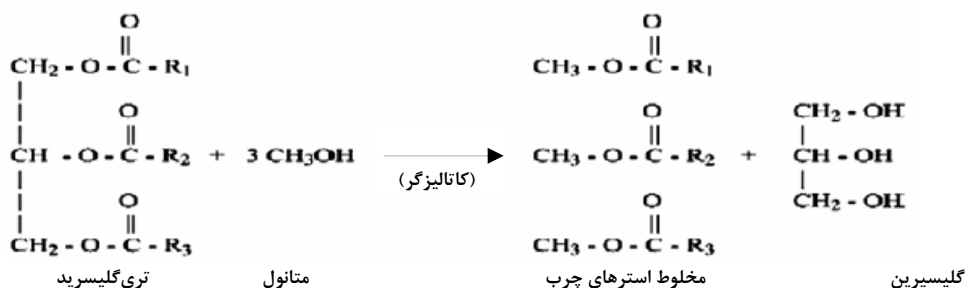
قلیایی و کاتالیزگرهای زیستی اشاره کرد. واکنش عمومی در شکل (۲) نشان داده شده است.

فرایند ترانس استری کردن را حتی می‌توان بدون کاتالیزگر انجام داد، که در این حالت، افزایش دمای قابل ملاحظه ای باید اعمال شود. بازدهی در دمای پایینتر از ۳۵۰°C بسیار پایین است و دما را باید افزایش داد. اما در دمای بالا تر از ۴۰۰°C تجزیه حرارتی استر اتفاق می‌افتد [۲۰].

۲-۱-۲ ترانس استری کردن روغن‌های گیاهی با استفاده از اسید یا قلیا

جورینگ^۱ پیشنهاد کرد که از روغن‌های دارای گرانیوی بالا، به طور مستقیم و بلند مدت در موتورهای دیزلی استفاده شود. استفاده از این روغن‌های گیاهی به طور مستقیم منجر به اتمایز شدن ضعیف سوخت و مخلوط شدن نا کارآمد آن با هوا و سوختن ناقص آن می‌شود. مشکل رسوب کردن روغن‌ها بر روی تزریق کننده و سیلندر را می‌توان از طریق استری کردن روغن جهت کاهش گرانیوی و حذف گلیسرول رفع کرد [۲].

در فرایند قلیایی، از هیدروکسید سدیم یا هیدروکسید پتاسیم به عنوان کاتالیزگر به همراه متانول و اتانول استفاده می‌شود. در ابتدا در طی فرایند، در واکنش کاتالیزگر با الکل، آلوکوسی^۲ تشکیل می‌شود و سپس آلوکوسی با روغن‌های گیاهی واکنش می‌دهد و زیست‌دیزل و گلیسرول تولید می‌گردد. گلیسرول، چگالتر است و در کف ظرف می‌نشیند و زیست‌دیزل به این ترتیب می‌تواند جداسازی شود. این فرایند، بازدهی بالایی دارد و خوردندگی کمتری در مقایسه با فرایندهای دیگر ایجاد می‌کند و سرعت واکنش در دمای پایین



شکل ۲- واکنش کلی ترانس استری کردن

1. Goering 2. Alkoxy 3. Triglyceride 4. Free Fatty Acid 5. Methyl Esters

استرها توسط نوردینی^{۱۰} به دست آمده است. شیمادا^{۱۱} ترانس استری شدن روغن زائد را با اضافه کردن مرحله‌ای متانول با استفاده از لیپاز تثبیت شده سی. آنتراکتیکا گزارش کرده که موفق به تبدیل ۹۰٪ روغن به اسید چرب متیل استر شده است. همین روش برای متانولی کردن روغن ماهی تن^{۱۲} نیز به کار رفته است.

ترانس استری شدن آنزیمی روغن پنبه دانه با استفاده از لیپاز تثبیت شده سی. آنتراکتیکا به عنوان کاتالیزگر در حلال (تی- بوتانول)^{۱۳} توسط رویون^{۱۴} مورد مطالعه قرار گرفته است. مواد چسبنده موجود در روغن‌ها ممکن است باعث خاصیت باز دارندگی واکنش الکی شدن شوند که به علت دخالت در واکنش‌های مولکول‌های لیپاز با سوبسترات‌ها توسط فسفولیپیدهای موجود در مواد چسبنده روغن‌ها صورت می‌گیرد. روغن سویای خام را توسط لیپاز تثبیت شده سی. آنتراکتیکا نمی‌توان ترانس استری کرد. واتانابه^{۱۵} از روغن صمغ زدایی شده^{۱۶} به عنوان سوبسترات برای واکنش ترانس استری شدن به منظور کمینه کردن این مشکل و دستیابی موثر به تبدیل ۹۳/۸ درصد روغن به زیست‌دیزل استفاده کرد. دو^{۱۷}، روغن سویا را با استفاده از متیل استات در حضور (نووزیم-۴۳۵) ترانس استری کرده است. گلیسرول در روغن نا محلول است و به آسانی بر سطح لیپاز تثبیت شده جذب می‌شود و اثرات منفی بر روی فعالیت لیپاز می‌گذارد. آنها پیشنهاد کردند که از متیل استات به جای الکل جهت تولید زیست‌دیزل استفاده شود. در این صورت، گلیسرولی در فرایند تولید نمی‌شود. این واکنش در شکل (۳) نشان داده شده است [۱].

کاتالیزگرهای ناهمگن مانند زیرکونیای بی‌ریخت^{۱۸}، تیتانیوم^{۱۹}، آلومینیم^{۲۰} و پتاسیم داپد زیرکونیاس^{۲۱} نیز به عنوان کاتالیزگر در فرایند استری کردن روغن‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. شکل‌های (۴) و (۵)، تفاوت‌های عملیات پایین دستی لازم برای تولید زیست‌دیزل در روشهای قلیایی و آنزیمی را نشان می‌دهد.

در مقابل، کاتالیزگر اسیدی می‌تواند برای مقدار زیادی اسید چرب آزاد به کار رود و معمولاً جهت استری شدن اسیدهای چرب آزاد در روغن‌ها و چربی‌های خوراک قبل از الکی کردن اسیدهای چرب آزاد به متیل استرها، توسط کاتالیزگر بازی به کار گرفته می‌شوند. با وجود اینکه با این روش می‌توان مشکل اسیدهای چرب آزاد را حل کرد باعث اضافه شدن یک واکنش اضافی و یک مرحله خالص سازی می‌شود که زمان هر نوبت^۱، قیمت کاتالیزگر و تولید ضایعات را افزایش می‌دهد.

۲-۱-۳ ترانس استری شدن آنزیمی روغن‌های گیاهی

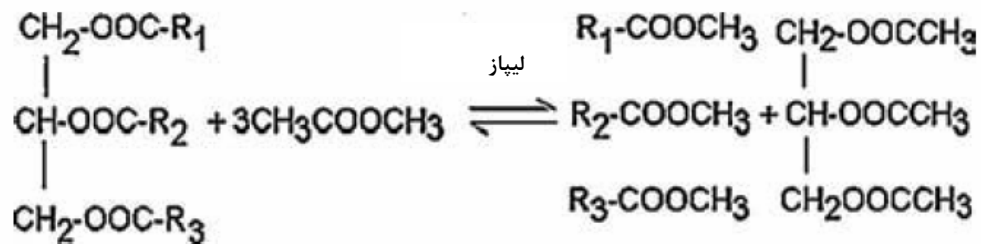
ترانس استری کردن آنزیمی تری گلیسریدها توسط لیپاز، گزینه مناسبی جهت جایگزینی با فرایندهای شیمیایی تولید زیست‌دیزل است. این فرایند، در مقابل فرایندهای شیمیایی، دارای مزایای زیست سازگاری، انتخاب پذیری و واکنش پذیری مناسب، که فقط با اختلاط واکنشگرها انجام پذیر است، عدم نیاز به دماهای بالا و امکان جداسازی آسان محصولات می‌باشد [۱].

ادا^۲ متانولی کردن^۳ تعدادی از روغن‌ها با استفاده از زیست کاتالیزگر را گزارش کرده که سلولهای رایزوسپوس اوریزا^۴ را بر روی ذرات پایه متخلخل تثبیت می‌کند. خوزه^۵ گزارش کرد که آنزیم لیپاز، آلکیل استرهای اسیدهای چرب روغن پنبه دانه^۶ را با استفاده از الکل‌های نوع اول و نوع دوم در حضور یک آنزیم تثبیت شده از کندیدا آنتراکتیکا^۷ که با نام تجاری (نووزیم-۴۳۵)^۸ معروف است در محیط عاری از حلال، تبدیل می‌کند. تحت همان شرایط با الکل‌های نوع اول و نوع دوم، زنجیره کوتاه روغن پنبه دانه را به استرها ی مربوطه تبدیل می‌نماید.

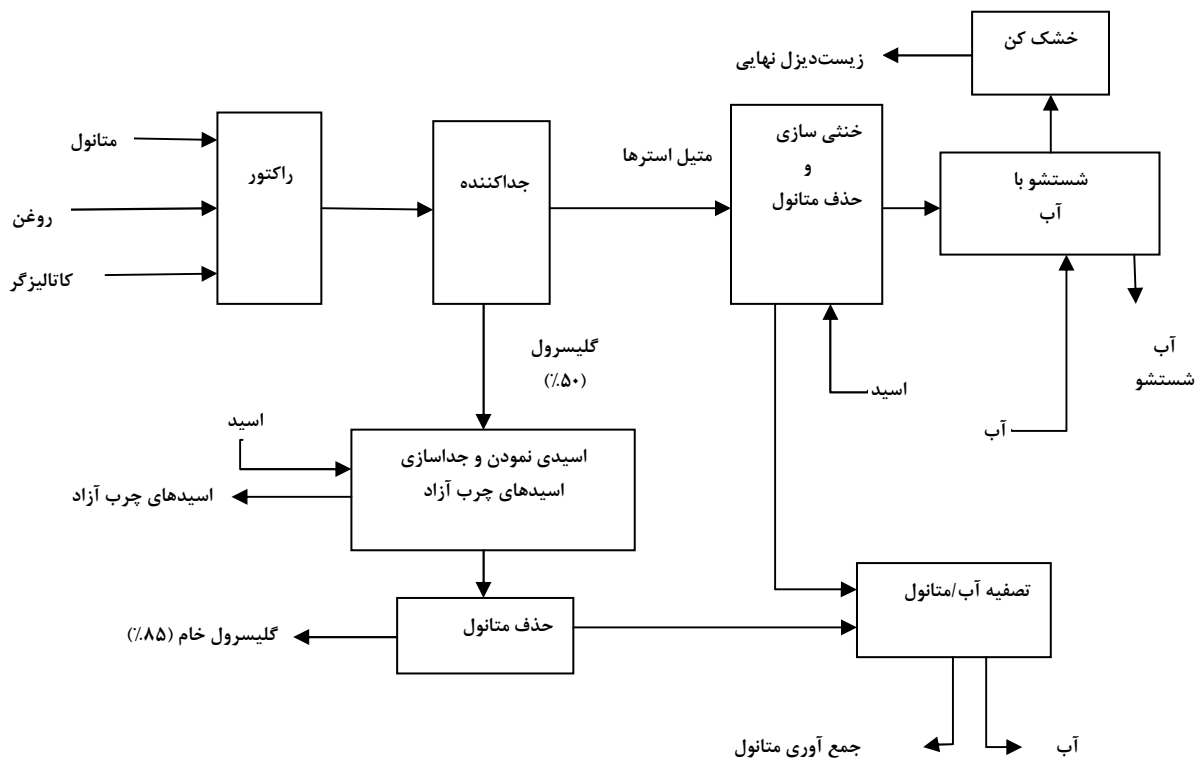
الکی شدن روغن سویا با اتانول و متانول با استفاده از چندین نوع لیپاز مورد مطالعه قرار گرفته است. لیپاز تثبیت شده از سودوموناس سپاسیا^۹ جهت سنتز کردن آلکیل استرها بسیار موثر است که درصد تبدیلی معادل ۶۷٪ و ۶۵٪ مولی به ترتیب برای متیل استرها و اتیل

10. Nouredini
11. Shimada
12. Tuna
13. T-Butanol
14. Royon
15. Watanabe
16. Degummed
17. Du
18. Amorphous Zirconia
19. Titanium
20. Aluminium
21. Potassium-Doped Zirconias

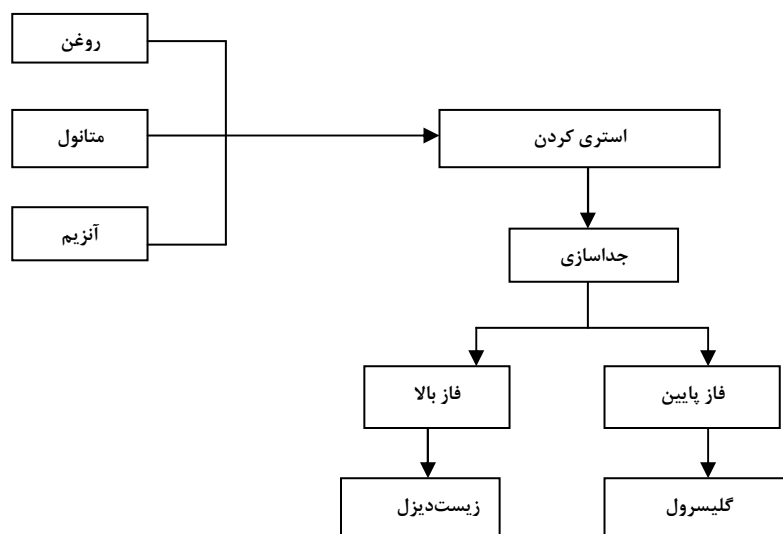
1. Batch
2. Oda
3. Methylation
4. Rhizopus oryzae
5. Kose
6. Cottonseed
7. Candida Antarctica
8. Novozyme 435
9. Pseudomonas Cepacia



شکل ۳- فرایند تولید زیست‌دیزل با استفاده از استات در حضور لیپاز



شکل ۴- تولید زیست‌دیزل به روش قلیایی [۲۳]

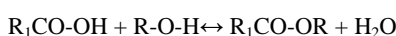


شکل ۵- تولید زیست‌دیزل به روش آنزیمی [۲۴]

۳- انواع روش‌های استری کردن آنزیمی

۳-۱ استری کردن مستقیم

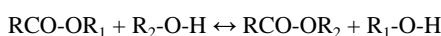
برای افزایش بازدهی تولید، آب باید حذف شود. حذف آب با استفاده از روش‌های شیمیایی امکان‌پذیر است اما برای آماده سازی زیست‌دیزل رایج نیست.



آب+استر آلکیلی اسید چرب ↔ الکل + اسید چرب

۳-۲ الکی کردن

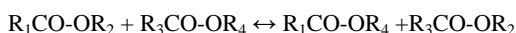
در واکنش‌های کاتالیز شده توسط قلیا، گلیسرول تولیدی باید حذف شود و همچنین در واکنش‌های اسیدی و بازی، خنثی‌سازی، لازم به نظر می‌رسد. اما در صورت استفاده از کاتالیزگر آنزیمی، این مرحله ساده تر انجام می‌شود.



گلیسرول + (استر آلکیل اسید چرب) ۳ ↔ TAG + 3CH₃OH

۳-۳ تعویض (استر-استر)

در این فرایند، هیچگونه گلیسرولی تولید نمی‌شود و بسیار ساده می‌توان متیل یا آلکیل استر را بازیافت کرد. تری استیل گلیسرول ایجاد شده می‌تواند به عنوان تثبیت‌کننده در صنایع عطرسازی یا به عنوان حلال در رنگ‌های اولیه به کار رود [۲۴].



تری‌استیل گلیسرول + (متیل استر) ۳ ↔ TAG + ۳ (متیل استات)

در واکنش‌های قبل، R₁، R₂، R₃ و R₄ نماینده زنجیره آلکیلی یا الکل می‌باشند. این واکنش‌ها با فرض تبدیل کامل سوبسترات‌ها به محصول، نوشته شده‌اند. تمام واکنش‌های فوق به طور کامل بازگشت پذیر می‌باشند.

در ادامه به مرور برخی از کارهای صورت گرفته در زمینه تولید آنزیمی زیست‌دیزل پرداخته می‌شود.

پیروزی و همکاران^۱ (۲۰۰۷) فرایند الکی شدن آنزیمی روغن سویا

را مورد بررسی قرار دادند. آنها این واکنش را ابتدا در حضور حلال اکتان و سپس در غیاب این حلال انجام دادند و از آزمایش‌های خود این طور نتیجه‌گیری کردند که در صورت انجام واکنش در حضور حلال (در نسبت‌های مولی الکل به روغن مختلف) میزان درصد تبدیل بیشتر از مقدار آن در محیط عاری از حلال است (در نسبت‌های مولی ۱:۱، ۲:۱، ۳:۱، درصد تبدیل بالای ۹۵٪ به دست آمد). این موضوع خصوصاً در نسبت‌های بالاتر مولی بیشتر نمایان می‌گردد [۲۵].

دوسات و همکاران^۲ (۲۰۰۲) واکنش استری کردن روغن آفتابگردان در مجاورت بوتانول را مورد مطالعه قرار دادند و بر اساس آن، یک مدل ساده شده بر اساس مکانیسم پینگ پونگ دو سوبسترای^۳ ارائه کردند. بر اساس تحقیق آنها واکنش استری کردن در حضور حلال، به درصد تبدیل بالاتری (۹۵٪) در مقایسه با حالت عاری از حلال (۶۵٪) منتهی می‌شود [۲۶]. هر چند باید در نظر داشت که انجام واکنش در غیاب حلال، دارای مزیت‌های خاص خود می‌باشد که از جمله آنها می‌توان به از بین رفتن هزینه حلال و همچنین هزینه‌های موجود برای جداسازی محصول پایین دستی و افزایش سرعت واکنش الکی کردن در اثر افزایش غلظت روغن و متانول اشاره کرد [۲۶-۲۵].

رودریگز و همکاران^۴ (۲۰۰۸) واکنش استری کردن روغن سویا را در مجاورت اتانول و سه نوع آنزیم، در محیط عاری از حلال انجام دادند و سپس میزان ثبات آنزیم را در تعداد مراحل مختلف و شستشوی آنها را با حلال‌های گوناگون مورد بررسی قرار دادند. آنها مشاهده کردند که برای هر سه مورد از انواع آنزیم، میزان تولید به ازای نسبت‌های مولی گوناگون و همچنین دماهای مختلف، در ابتدا افزایش، و سپس، کاهش پیدا می‌کند و به این ترتیب، برای نسبت مولی الکل به روغن و دما، مقادیر بهینه‌ای قابل استحصال می‌باشند. هر چند میزان تولید به علت صورت گرفتن واکنش استری کردن در محیط عاری از حلال، حداکثر، بین ۵۰ تا ۶۰ درصد است [۲۷].

نوردینی و همکاران^۵ (۲۰۰۵) واکنش استری کردن روغن دانه سویا با متانول و اتانول و در مجاورت لیپاز تولیدی از گونه‌های زیستی را مورد آزمایش قرار دادند [۲۸]. مشخص شد که در شرایط عملیاتی

2. Dossat et al.
3. Ping Pong bi bi
4. Rodrigues et al.
5. Nouredini et al.

1. Pirozzi et al.

واکنش اضافه می‌شود. آنها مشاهده کردند که با افزایش میزان لیپاز، مقدار تولید تا حد بهینه (۷۳٪) افزایش و سپس کاهش می‌یابد. از آنجایی که الکل‌های زنجیره کوتاه سبب از کار افتادگی زودرس آنزیم می‌شوند. اضافه کردن الکل در چند مرحله مانع این اتفاق می‌شود و به این ترتیب، بازدهی واکنش به نحو چشمگیری بهبود پیدا می‌کند. اثر افزایش نسبت مولی مانند کارهای قبلی تا یک مقدار بهینه (۱:۶) سبب بهبود بازدهی تولید (۸۵/۸٪) می‌شود و پس از آن به دلیل اثر بازدارندگی الکل، موجب کاهش می‌شود. مشاهده شد که اثر افزایش آب به میزان مناسب، سبب افزایش چشمگیر بازدهی به میزان ۹۰٪ می‌شود. بازه تغییرات دمای صورت گرفته در این تحقیق از ۳۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس را در برمی‌گیرد و دمای ۴۰ درجه سلسیوس باعث تولید بیشینه ۸۵/۸٪ می‌شود. مجدداً تاکید می‌شود که علیرغم عدم استفاده از حلال، به دلیل اضافه شدن مرحله ای الکل، میزان محصول در این تحقیق، نسبتاً بالا است [۲۸].

مورریا و همکاران^۴ (۲۰۰۷) واکنش استری کردن روغن نخل را در مجاورت اتانول با استفاده از لیپاز تولیدی از گونه‌های مختلف، جهت یافتن بهترین گونه مورد بررسی قرار دادند که از میان آنها می‌توان به گونه‌های کاندیدا آنتارسیتا^۵ و پورسین پانکراتیک^۶ اشاره کرد. از میان گونه‌های مورد بررسی، سودوموناس فلوروسنس^۷ تولیدکننده لیپازی است که استفاده از آن در واکنش استری کردن منجر به استحصال بالاترین تبدیل (۹۸٪) می‌شود. این درصد تبدیل طی مدت ۲۴ ساعت به دست آمد و مقدار تولید متوسط در طول آن مدت، ۲۳/۸۷ گرم بر لیتر بر ساعت می‌باشد [۳۰].

ماتاسولی و همکاران^۸ (۲۰۰۹) واکنش استری کردن روغن نخل را در مجاورت اتانول و متانول مورد بررسی قرار دادند. آنها اثر تغییر نسبت مولی، تغییر دما، اضافه کردن مرحله ای الکل و تغییر نوع الکل و آنزیم مورد استفاده برای تولید زیست‌دیزل را مورد بررسی قرار دادند. از آنجایی که در صورت تبدیل کامل روغن به زیست‌دیزل، حداقل نسبت مولی الکل به روغن باید به نسبت استوکیومتری آنها یعنی ۳:۱ باشد، چون واکنش استری کردن یک

مشابه، بازدهی تولید محصول با استفاده از لیپاز تولیدی از گونه سی. سپاسیا، بیشترین مقدار است. سپس با استفاده از این آنزیم، اثر افزایش مقدار آنزیم، دما، غلظت الکل، آب و سینتیک تولید مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس این تحقیق، با افزایش میزان آنزیم، میزان تولید در ابتدا با نرخ شدیدی افزایش پیدا کرد و با افزایش بیشتر آنزیم مقدار تولید محصول، ثابت ماند (حداکثر میزان درصد تبدیل در صورت استفاده از لیپاز تثبیت شده ۶۵٪ و در صورت استفاده از لیپاز تثبیت نشده ۴۱٪ است). همچنین مشاهده کردند که با افزایش دما میزان تولید تا ۶۳٪ در دمای ۳۵ درجه سلسیوس افزایش، و سپس، کاهش می‌یابد. آنها به این نتیجه رسیدند که میزان نسبت مولی الکل به روغن بهینه است و مقدار نسبت مولی ۷/۵ برای متانول به روغن منجر به استحصال بازدهی بیشینه ۶۷٪ و نسبت مولی بهینه ۱۵/۲۵ برای اتانول، منجر به استحصال بازدهی ۶۵٪ می‌شود. اضافه کردن آب به مخلوط واکنش منجر به ایجاد سطح مشترک فاز (آلی/آبی) می‌شود و از آنجایی که فعالیت لیپاز عموماً با افزایش سطح مشترک افزایش می‌یابد، اضافه کردن آب در تولید محصول می‌تواند موثر واقع شود و بر اساس این تحقیق مشاهده شد که در غلظت‌های بسیار کم آب، میزان تولید، به دلیل کم بودن فعالیت آنزیم، به شدت پایین است. اما به تدریج با زیاد شدن غلظت آب، بازدهی به مقدار بیشینه ۶۲٪ برای متانول و ۶۵٪ برای اتانول می‌رسد. همان‌طور که مشاهده می‌شود به دلیل صورت گرفتن تمام واکنش‌های تحقیق یاد شده در محیط عاری از حلال، بازدهی تولید، حداکثر به ۶۰ تا ۷۰ درصد می‌رسد [۲۷].

دیزگه و کسکینلر^۱ (۲۰۰۸) روش جدیدی را برای تثبیت لیپاز بر روی کف آبدوست پلی اورتان^۲ به دست آوردند و سپس با استفاده از آنزیم در این محیط، نسبت به تولید زیست‌دیزل با استفاده از روغن کانولا و متانول اقدام کردند. برای دست یافتن به بازدهی بالاتر در سیستم آنزیم تثبیت شده، مقدار پی‌اچ^۳ بهینه برابر شش تشخیص داده شد. سپس در این پی‌اچ، به بررسی آثار دما، مقدار آنزیم، نسبت مولی الکل به روغن و مقدار آب بر روی میزان تولید پرداختند [۲۹]. نکته شایان ذکر این است که در این تحقیق، بر خلاف کارهای بررسی شده قبلی، الکل در چند مرحله به محیط

4. Moreri et al.
5. *Candida Antartica*
6. *Porcine Pancreatic*
7. *Pseudomonas Fluorescens*
8. Matassoli et al.

1. Dizge and Keskinler
2. Hydrophilic Polyurethane Foams
3. pH

بدون حلال، بالاتر است اما تولید متیل استرها با متانول بدون حضور حلال ناچیز است [۳۲].

نلسون^۴ (۱۹۹۶) با استفاده از آزمایشهایی در مقیاس نیمه صنعتی دریافت که سی. آنتراکتیکا با الکل‌های نوع دوم مانند ایزو پروپانول و ۲-بوتانول (در حدود ۸۰٪) مناسب است و آنزیم ام. میهی برای الکل‌های با زنجیره کوتاه (در حدود ۹۵٪) مانند متانول، اتانول، پروپانول و بوتانول در حضور حلال هگزان، مناسب است [۳۳].

- لیپاز درون سلولی

بازدهی فرایند با استفاده از لیپاز درون سلولی (همه سلول‌ها تثبیت می‌شوند) به طور قابل ملاحظه ای در مقایسه با لیپاز برون سلولی که نیازمند مرحله خالص سازی پیچیده ای قبل از تثبیت سازی می‌باشد، افزایش می‌یابد. لیپاز درون سلولی توسط ماتسوموتو^۵ (۲۰۰۱) با تثبیت سلولهای آر. اوریزایی و نفوذ ناپذیر کردن آن توسط هوای خشک ایجاد شد. سپس جهت تولید متیل استر از طریق متانولی کردن مرحله ای روغن‌های گیاهی در سیستم فاقد حلال و دارای آب استفاده شد. محتوای متیل استر در مخلوط واکنش بعد از ۱۶۵ ساعت در دمای ۳۷°C، ۷۱٪ وزنی گزارش شد. در ادامه، جدولی ارائه شده است که دربرگیرنده کارهای مهم صورت گرفته در زمینه تولید آنزیمی زیست‌دیزل می‌باشد.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

تولید زیست‌دیزل به دو روش آبکافت و استری کردن قابل انجام است. تحقیقات نشان می‌دهند که از میان دو روش فوق، روش استری کردن بهتر قابل اجراست. هر چند امروزه غالباً برای تولید زیست‌دیزل از استری کردن به روش قلیایی استفاده می‌شود، اما استری کردن به روش آنزیمی نیز به دلیل داشتن برخی مزایا در مقایسه با روش قلیایی مورد توجه است و هم‌اکنون تحقیقات زیادی بر روی آن انجام می‌شود که نتایج تعدادی از آنها در این مقاله مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس این یافته‌ها، در تمامی موارد، افزایش میزان الکل (به صورت افزایش نسبت الکل به روغن) تا حد بهینه، موجب افزایش تولید می‌شود و افزایش بیشتر آن به دلیل آسیب‌رسانی مولکول‌های الکل به آنزیم و اختلال در فعالیت آن، سبب کاهش محصول می‌گردد. همچنین افزایش دما تا حد بهینه

واکنش برگشت پذیر است، با افزایش نسبت مولی، میزان محصول افزایش می‌یابد. با تغییر نسبت مولی از ۳:۱ به ۶:۱ افزایش در میزان محصول مشاهده گردید (درصد تبدیل ۱۵٪) هر چند با افزایش بیشتر نسبت مولی و رساندن آن به ۹ مشاهده گردید که مقدار تولید کاهش می‌یابد. کم شدن میزان محصول به غیرفعال شدن آنزیم توسط الکل نسبت داده می‌شود. همچنین مشاهده شد که با افزایش دما تا مقدار بهینه ۵۰ درجه سلسیوس (که منجر به استحصال درصد تبدیل ۲۵٪ شد) مقدار محصول، افزایش و با افزایش بیشتر دما، تولید، کاهش می‌یابد. مشاهده شد که اثر افزایش مرحله ای الکل به جای اضافه کردن کامل آن در ابتدای واکنش منجر به تولید بیشتر محصول می‌شود. این افزایش، خصوصاً در نسبت مولی استوکئومتری الکل به روغن نمود بیشتری داشت به طوری که اضافه شدن تک مرحله ای الکل به نسبت مولی ۳:۱ باعث استحصال محصول به میزان ۱۵٪ شد و در حالت اضافه شدن سه مرحله ای الکل، میزان استحصال محصول به ۲۰٪ افزایش پیدا کرد. همچنین مشاهده شد که در شرایط مشابه عملیاتی، درصد تولید محصول با استفاده از اتانول (۲۵٪) بیشتر از متانول (۱۴٪) می‌باشد [۳۱].

تولید آنزیم با استفاده از لیپازهای درون سلولی و برون سلولی قابل حصول است. در هر دو مورد، آنزیم ابتدا به صورت تثبیت شده در می‌آید و سپس جهت تولید زیست‌دیزل به کار می‌رود که این امر سبب حذف عملیات پایین دستی مثل جداسازی و بازیابی خواهد شد. در همه تحقیقات گزارش شده از هر دو صورت آنزیم تثبیت شده (برون سلولی) یا همه سلولهای^۱ تثبیت شده (آنزیم درون سلولی) به عنوان کاتالیزگر استفاده شده است که در هر دو مورد، بازدهی بسیار بالاتری در مقایسه با استفاده از آنزیم متحرک (غیر تثبیت شده) گزارش شده است.

- لیپاز برون سلولی

میتلباخ^۲ (۱۹۹۰) ترانس استری شدن روغن آفتابگردان را با الکل‌های نوع اول مانند متانول، اتانول و بوتانول با استفاده از موکورمیهی^۳ و سی. آنتراکتیکا (نووزیم ۴۳۵) در حضور یا غیاب حلال گزارش داد. بازدهی به دست آمده برای اتانول و بوتانول، حتی

1. Whole cell
2. Mittelbach
3. *Mucor Miehei*

4. Nelson
5. Matsumoto

موجب افزایش میزان تولید زیست‌دیزل می‌شود و افزایش بیشتر از آن سبب کاهش تولید می‌گردد. دلیل این اتفاق، تخریب آنزیم در دماهای بالاست. در تحقیقات انجام گرفته، مشاهده شد که تثبیت لیپاز بر روی محیط مناسب، علاوه بر صرفه جویی در میزان مصرف این ماده، باعث افزایش چشمگیر تولید می‌شود. همچنین اضافه کردن مرحله ای الکل باعث کاهش اثر بازدارندگی الکل بر فعالیت لیپاز و به دنبال آن، سبب افزایش تولید محصول می‌گردد.

جدول ۱- خلاصه آزمایش‌های متعدد بر روی تولید آنزیمی زیست‌دیزل

شماره	نویسنده/سال	روغن/آنزیم	الکل به کار رفته	درصد تبدیل	روش به کار گرفته شده	قیمت تولید
۱	واتانابه و همکاران [۳۵] (۲۰۰۰) ^۱	(روغن گیاهی/نووزیم ۴۳۵)	متانول	۹۲ تا ۹۳	اضافه کردن مرحله‌ای متانول	متوسط
۲	ساموکاوا و همکاران [۳۶] (۲۰۰۰) ^۱	(روغن سویا/نووزیم ۴۳۵)	متانول	۹۷	اضافه کردن مرحله‌ای متانول و پیش انکوباسیون آنزیم در روغن متیل اولئات سویا	بالا
۳	بن و همکاران [۳۷] (۲۰۰۱) ^۳	(روغن گیاهی/آر. آریزا)	متانول	۹۰	اضافه کردن مرحله ای متانول به کارگیری گلوآرالدهید برای تثبیت آنزیم	پایین
۴	ایسو و همکاران [۳۸] (۲۰۰۱)	(تریولئین/پی.فلورسنس)	بوتانول	۹۰	بوتانول به عنوان پذیرنده اسیل مورد استفاده قرار گرفت و از هیچ حلالی استفاده نشد	متوسط
۵	شیمادا و همکاران [۳۹] (۲۰۰۲) ^۱	(روغن آشپزی مصرف شده/نووزیم ۴۳۵)	متانول	۹۰	اضافه کردن مرحله ای متانول	پایین
۶	باکو و همکاران [۴۰] (۲۰۰۲) ^۱	(روغن آفتابگردان/نووزیم ۴۳۵)	متانول	۹۷	اضافه کردن مرحله ای متانول و حذف گلیسرول به کمک دیالیز	بالا
۷	دو و همکاران [۴۱] (۲۰۰۴) ^۱	(روغن سویا/نووزیم ۴۳۵)	متیل استات	۹۲	از یک پذیرنده اسیل جدید به نام متیل استات که اثر بازدارنده برای آنزیم ندارد استفاده شد.	بالا
۸	ژو و همکاران [۴۲] (۲۰۰۴) ^۱	(روغن سویا/نووزیم ۴۳۵)	متانول	۹۸	اضافه کردن مرحله ای متانول و حذف گلیسرول با استفاده از حلال ایزو پروپانول	بالا
۹	لی و همکاران [۴۳] (۲۰۰۶) ^۱	(روغن دانه انگور/ نووزیم ۴۳۵ و لیپوزیم تی ال آی ام (لیپاز تثبیت شده))	متانول	۹۵	ترکیب استفاده از نووزیم ۴۳۵ و لیپوزیم تی ال آی ام با ترت بوتانول به عنوان حلال	بالا
۱۰	رویون و همکاران [۴۴] (۲۰۰۷) ^۱	(روغن دانه کتان/نووزیم ۴۳۵)	متانول	۹۷	ترت بوتانول به عنوان حلال مورد استفاده قرار گرفت	بالا
۱۱	مودی و همکاران [۴۵] (۲۰۰۷) ^۱	(روغن جاتروفا/نووزیم ۴۳۵)	اتیل استات	۹۱/۳	از اتیل استات که دارای اثر بازدارندگی نیست استفاده شد	بالا
۱۲	هاما و همکاران [۴۶] (۲۰۰۷) ^۳	(روغن دانه سویا/آر آریزا)	متانول	۹۰	اضافه کردن مرحله ای متانول در یک راکتور با بستر آکنده (پُر شده)	پایین

آ لیپاز درون سلولی ب لیپاز برون سلولی

- [1] Nag A., "Biofuels refining and performance", India, McGraw-Hill; pp 177-183, New York, (2008).
- [2] Van Gerpen J., Shanks B., Pruszek R., Clements D., Knothe G., "Biodiesel analytical methods", National Renewable Energy Laboratory, pp 510-36240, Colorado, (2004).
- [3] Van Gerpen J., "Biodiesel production and fuel quality". University of Idaho, Biodiesel Education Program, Publications on Biodiesel, Online: <http://www.uiweb.uidaho.edu/bioenergy/biodieselED/publication/01.pdf>.
- [4] Canakci M., Van Gerpen J.H., "Biodiesel production via acid catalysis". Transactions of the Am. Soc. Agri. Eng., vol 42, pp 1203-1210, (1999).
- [5] Nelson L.A., Foglia T.A., Marmer W.N., "Lipase catalyzed production of biodiesel". J. Am. Oil Chem. Soc., vol 73, pp 1191-1195, (1996).
- [6] Shimada Y., Watanabe Y., Samukawa T., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., "Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase", J. Am. Oil Chem. Soc., vol 76, pp 789-793, (1999).
- [7] Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominga Y., "Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase". J. Am. Oil Chem. Soc., vol 77, pp 355-360, (2000).
- [8] Wu W.H., Foglia T.A., Marmer W.N., Phillips J.G., "Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology". J. Am. Oil Chem. Soc., vol 76, pp 517-521, (1999).
- [9] "American Society for Testing and Materials, Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Distillate Fuels, Designation D6751-02, ASTM International, West Conshohocken, PA" (2002).
- [10] Zaks A., Klibanov A.M., "Enzyme-Catalyzed Processes in Organic Chemistry", Proc. Natl. Acad. Sci., vol 82, pp 3192-3196, (1985).
- [11] Foresee P., Kervinen M., Linko P., Suortti T., Poutanen K.J. "Effect of enzymatic interesterification on the melting point of tallow-rape seed oil (LEAR)", J. Am. Oil Chem. Soc., vol 69, pp 126-129, (1992).
- [12] Forsell P., Parovuori P., Linko P., Poutanen K. "Enzymatic transesterification of rapeseed oil and luric acid in a continuous reactor", J. Am. Oil Chem. Soc., vol 70, pp 1105-1109, (1993).
- [13] Claon P.A., Akoh C.A., "Enzymatic synthesis of geranyl acetate in n-hexane with *Candida* lipases", J. Am. Oil Chem. Soc., vol 71, pp 575-578, (1994).
- [14] Foglia T.A., Petroso K., Fairheller S.H., "Enzymatic interesterification of tallow-sunflower oil mixtures", J. Am. Oil Chem. Soc., vol 70, pp 281-285, (1993).
- [15] Abraham G., Murray M.A., John V.T., "Interesterification selectivity in lipase-catalyzed reactions of low molecular weight triglycerides", Biotechnol. Let., vol 10, pp 555-558, (1988).
- [16] Mittelbach M., "Lipase-catalyzed alcoholysis of sunflower oil", J. Am. Oil Chem. Soc., vol 67, pp 168-170, (1990).
- [17] Linko Y., Lamsa M., Huhtala A., Linko P., "Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil and 2-ethyl-1-hexanol", J. Am. Oil Chem. Soc., vol 71, pp 1411-1414, (1994).
- [18] Lazar G., "Ester Estersynthesen mit Lipasen", Fette Seifen Anstrichmittel, vol 87, pp 394-400, (1985).
- [19] Shaw J.F., Wang D.L., "Lipase-catalyzed ethanolysis and isopropanolysis of triglycerides with long-chain fatty acids", Enzyme Microb. Technol., vol 13, pp 544-546, (1991).
- [20] Demirbas A., "Biodiesel from sunflower oil in supercritical methanol with calcium oxide". Energy Convers. Manage., vol 48, pp 937-941, (2006).
- [21] Ma, F., Hanna, M.A., "Biodiesel production: a review". Bioresource Technol., vol 70, pp 1-15, (1999).
- [22] Freedman B., Pryde E.H., Mounts T.L., "Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils". J. Am. Oil Chem. Soc., vol 61, pp 1638-1643, (1984).
- [23] Akoh C. C., Chang S. W., Lee G. C., Shaw J. F., "Enzymatic approach to biodiesel production". J. Agric. Food Chem., vol 55, pp 8995-9005, (2007).
- [24] Ranganathan S. V., Narasimhan S. L., Muthukumar K., "An overview of enzymatic production of biodiesel". Bioresource Technol., vol 99, pp 3975-3981, (2008).
- [25] Pirozzi D., di Lorenzo M., Zuccaro L., Greco jr G., "Enzymatic synthesis of biodiesel". The 8th International Conference on Chemical and Process Engineering, The Italian Association of Chemical Engineering, ISCHIA Island Gulf of Naples, pp 24- 27 June (2007).
- [26] Dossat V., Combes D., Marty A. "Lipase-catalyzed transesterification of high oleic sunflower oil". Enzyme Microbial. Technol., Vol 30, pp 90-94, (2002).
- [27] Rodrigues R. C., Volpato G., Wada K., Antonino M., Ayub Z., "Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols". J. Am. Oil Chem. Soc., vol 85, pp 925-930, (2008).
- [28] Nouredini H., Gao X., Philkana R.S., "Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil". Bioresource Technol., vol 96, pp 796-777, (2005).
- [29] Dizge N., Keskinler B., "Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase". Biomass Bioeng., Vol 32., pp 1274-1278, (2008).
- [30] Moreira A. B.R, Perez V. H., Zanin G. M., de Castro H. F., "Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipase from several sources immobilized on silica-PAV composite". Energy and Fuels, vol 21, pp 3689-3694, (2007).
- [31] Matassoli A. L.F., Correa I. N.S., Portillho M. F., Velso C. O., Langone M. A. P., "Enzymatic synthesis of biodiesel via alcohololysis of palm oil". Appl. Biochem. Biotechnol., vol 155, pp 44-52, (2009).

- [32] Mittelbach M., "Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol 67, pp 168-170, (1990).
- [33] Nelson L.A., Foglia T.A., Marmer W.N., "Lipase-catalyzed production of biodiesel". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol 73, pp 1191-1195, (1996).
- [34] Matsumoto T., Takahashi S., Kaieda M., Ueda M., Tanaka A., Fukuda H., Kondo A., "Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol 57, pp 515-520, (2001).
- [35] Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y., "Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol 77, pp 355-360, (2000).
- [36] Samukawa T., Kaieda M., Matsumoto T., Ban K., Kondo A., Shimada Y., Noda H., Fukuda H., "Pretreatment of Immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil". *J. Bioresour. Bioeng.*, vol 90, pp 180-183, (2000).
- [37] 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.*, vol 8, pp 39-43, (2001).
- [38] Iso M., Chem B., Eguchi M., Kudo T., Shrestha S., "Production of Biodiesel from triglycerides and ethanol using immobilized enzyme". *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, vol 16, pp 53-58, (2001).
- [39] Shimada Y., Watanabe Y., Sugihara A., Tominaga Y., "Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction oil processing". *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, vol 17, pp 133-142, (2002).
- [40] Bako K.B., Kova F.C.S., Gubicza L., Hansco J.K., "Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent free system". *Biocatal. Biotransform.*, vol 20, pp 437-439, (2002).
- [41] Du W., Xu Y., Liu D., Zeng J., "Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soyabean oil for biodiesel production with acyl acceptors". *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, vol 30, pp 125-129, (2004).
- [42] Xu Y., Du W., Zeng J., Liu D., "Conversion of soyabean oil to biodiesel fuel using lipozyme TL IM in a solvent free medium". *Biocatal. Biotransform.*, vol 22, pp 45-48, (2004).
- [43] Li L., Du W., Liu D., Wang L., Li Z., "Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium". *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, vol 43, pp 58-62, (2006).
- [44] Royon D., Daz M., Ellenrieder G., Locatelli S., "Enzymatic production of Biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent". *Bioresour. Technol.*, vol 98, pp 648-653, (2007).
- [45] Modi M.K., Reddy J.R.C., Rao B.V.S.K., Prasad R.B.N., "Lipase mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate". *Bioresour. Technol.*, vol 98, pp 1260-1264, (2007).
- [46] Hama S., Yamaji H., Fukumizu T., Numata T., Tamalampudi S., Kondo A., Nodac H., Fukuda H., "Biodiesel fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles". *Biochem. Eng. J.*, vol 34, pp 273-278 (2007).