BRIEF REPORT

Immobilized Lipase Prepared Using the Cross-Linked Enzyme Aggregates Method for the Transesterification of Soybean Oil

Shahla Rezaei[1]
Ali Pakdin Parizi[2]
Mohammad Shaban[3]
Masoud Salehipour[4]
Pedram Ebrahimnejad[5]
Mehdi Mogharabi-Manzari[6]

[1]Assistant Professor, Research Center of Pediatric Infectious Diseases, Institute of Immunology and Infectious Disease, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]. Assistant Professor, Tabarestan Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, University of Agricultural Science and Natural Recourses, Sari, Iran
[3]. Pharm.D. Candidate, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4]. Associate Professor, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
[5]. Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6]. Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 29, 2026; Accepted September 19, 2026)

Abstract

Background and purpose: The use of lipase in biodiesel production, owing to its ability to catalyze reactions under mild conditions and its environmental advantages, is considered a suitable alternative to chemical catalysts. However, the low stability and high cost of free enzymes have limited their industrial use. The aim of this study was to prepare an immobilized lipase using the cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) method, evaluate its performance in the transesterification of soybean oil, and determine the optimal process conditions.

Materials and methods: In this experimental study, porcine pancreatic lipase was precipitated with ammonium sulfate and subsequently immobilized using glutaraldehyde through the cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) method. Enzyme activity was determined spectrophotometrically using p-nitrophenyl palmitate as the substrate. The kinetic characteristics of the enzyme and the effects of various factors, including temperature, reaction time, alcohol-to-oil ratio, and stirring speed, on the transesterification yield were also investigated.

Results: The optimum temperature and pH for the activity of the immobilized lipase were 45 °C and 7.5, respectively. After five consecutive reuse cycles, the immobilized enzyme retained more than 90% of its initial activity. The Michaelis–Menten constant (Km) of the immobilized enzyme was lower than that of the free enzyme, whereas the maximum reaction velocity (Vmax) decreased. Furthermore, increasing the alcohol-to-oil ratio to 6 and the stirring speed to 450 rpm enhanced biodiesel yield, with the highest yield achieved after 20 h.

Conclusion: The immobilized lipase prepared by this method exhibited good stability, reusability, and catalytic efficiency in the transesterification of soybean oil. Therefore, it may serve as a promising biocatalyst for enzymatic biodiesel production and could help overcome some limitations of conventional chemical catalysts.

Keywords: lipase, enzyme immobilization, soybean oil, transesterification

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 36 (Supple 1): 192-197 (Persian).

Corresponding Author: Mehdi Mogharabi-Manzari - Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: m.mogharabi@mazums.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و ششم شماره ویژه نامه آبان سال ۱۴۰۵ (۱۹۷-۱۹۲)

لیپاز تثبیت شده به روش توده آنزیمی اتصال یافته متقاطع جهت ترانس استریفیکاسیون روغن سویا

شهلا رضایی[۱]
علی پاکدین پاریزی[۲]
محمد شبان[۳]
مسعود صالحی پور[۴]
پدرام ابراهیم نژاد[۵]
مهدی مقربی منظری[۶]

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از لیپاز در تولید بیودیزل به دلیل انجام واکنش در شرایط ملایم و سازگاری با محیط زیست، جایگزین مناسبی برای کاتالیزورهای شیمیایی محسوب می‌شود. با این حال، پایداری پایین و هزینه بالای آنزیم آزاد، کاربرد صنعتی آن را محدود کرده است. این پژوهش با هدف تهیه لیپاز تثبیت شده به روش توده‌های آنزیمی اتصال یافته متقاطع و بررسی کارایی آن در واکنش ترانس استریفیکاسیون روغن سویا و تعیین شرایط بهینه فرآیند، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی– آزمایشگاهی، لیپاز پانکراس خوکی پس از رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم، با استفاده از گلوتار آلدهید به روش توده آنزیمی اتصال یافته متقاطع تثبیت شد. فعالیت آنزیمی به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از سوبسترای پارانیتروفنیل پالمیتات اندازه‌گیری شد. همچنین ویژگی‌های سینتیکی آنزیم و اثر عوامل مختلف از جمله دما، زمان، نسبت الکل به روغن و سرعت هم زدن بر بازده واکنش ترانس استریفیکاسیون بررسی گردید.

یافته‌ها: دما و pH بهینه فعالیت لیپاز تثبیت شده به‌ترتیب ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۵/۷ بود. آنزیم تثبیت شده پس از پنج چرخه استفاده مجدد، بیش از ۹۰ درصد فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. مقدار ثابت میکائیلیس–منتن برای آنزیم تثبیت شده کم‌تر از آنزیم آزاد بود، در حالی که بیشینه سرعت واکنش کاهش یافت. همچنین، افزایش نسبت الکل به روغن تا ۶ و افزایش سرعت هم‌زدن تا ۴۵۰ دور بر دقیقه موجب افزایش بازده تولید بیودیزل شد و حداکثر بازده واکنش پس از ۲۰ ساعت به دست آمد.

استنتاج: لیپاز تثبیت شده تهیه شده به این روش از پایداری، قابلیت استفاده مجدد و کارایی مناسبی در واکنش ترانس استریفیکاسیون روغن سویا برخوردار بود و می‌تواند به عنوان کاتالیزوری مناسب برای تولید آنزیمی بیودیزل و کاهش محدودیت‌های روش‌های شیمیایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: لیپاز، تثبیت آنزیم، روغن سویا، ترانس استریفیکاسیون

مولف مسئول: مهدی مقربی- ساری، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری ایران **E-mail:** m.mogharabi@mazums.ac.ir

۱. استادیار، بیوتکنولوژی دارویی، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۲. استادیار، بیوتکنولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران
۳. دانشجوی داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری ایران
۴. استادیار، بیوشیمی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
۵. استاد، فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری ایران
۶. استادیار، بیوتکنولوژی دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری ایران

تاریخ دریافت : ۱۴۰۵/۱/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۵/۱/۲۳ تاریخ تصویب : ۱۴۰۵/۶/۳۰

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

مقدمه

آنزیم‌ها کاتالیزورهای زیستی هستند که با افزایش سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی، نقش اساسی در فرآیندهای زیستی و بسیاری از کاربردهای صنعتی ایفا می‌کنند(۱). لیپازها (EC3.1.1.3) از مهم‌ترین آنزیم‌های هیدرولیتیک هستند که هیدرولیز تری‌گلیسیریدها را به گلیسرول و اسیدهای چرب کاتالیز می‌کنند و علاوه بر محیط‌های آبی، در حلال‌های آلی نیز قادر به انجام واکنش‌های سنتزی از جمله استریفیکاسیون و ترانس استریفیکاسیون هستند. این ویژگی، لیپازها را به زیست کاتالیزورهایی ارزشمند در صنایع غذایی، دارویی، شوینده، شیمیایی و تولید سوخت‌های زیستی تبدیل کرده است(۲). بیودیزل، مخلوطی از آلکیل استرهای اسیدهای چرب است که از واکنش ترانس استریفیکاسیون روغن‌های گیاهی یا چربی‌های حیوانی با الکل‌های زنجیر کوتاه مانند متانول یا اتانول تولید می‌شود و به دلیل تجدیدپذیر بودن، زیست تخریب‌پذیری و انتشار کم‌تر آلاینده‌ها، به عنوان جایگزینی مناسب برای سوخت‌های فسیلی شناخته می‌شود(۳). تولید بیودیزل به روش شیمیایی معمولاً با استفاده از کاتالیزورهای قلیایی انجام می‌شود، اما این روش در حضور مقادیر زیاد اسیدهای چرب آزاد با تشکیل صابون، کاهش بازده و دشواری جداسازی محصولات همراه است(۴). در مقابل، لیپازها قادرند واکنش ترانس استریفیکاسیون را در شرایط ملایم، بدون نیاز به محیط‌های اسیدی یا بازی شدید و با تولید محصولات جانبی کم‌تر انجام دهند و از این رو به عنوان جایگزینی سازگار با محیط زیست برای کاتالیزورهای شیمیایی مطرح هستند(۵). کاربرد صنعتی لیپازهای آزاد به دلیل هزینه بالا، پایداری محدود و عدم امکان استفاده مجدد با محدودیت مواجه است. تثبیت آنزیم یکی از مؤثرترین راهکارها برای افزایش پایداری، تسهیل جداسازی و استفاده مکرر از آنزیم است(۶). در میان روش‌های مختلف تثبیت، فناوری توده‌های آنزیمی اتصال یافته متقاطع به دلیل عدم نیاز به حامل، بارگذاری بالای آنزیم، افزایش پایداری و کاهش هزینه، در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است(۱۰-۷). از سوی دیگر، ضایعات روغنی حاصل از صنایع غذایی و فرآوری دانه‌های روغنی علاوه بر ایجاد مشکلات زیست محیطی، منبع ارزشمندی برای تولید سوخت‌های زیستی محسوب می‌شوند. تبدیل این ضایعات به بیودیزل می‌تواند ضمن کاهش آلودگی، ارزش افزوده اقتصادی قابل توجهی ایجاد کند(۱۱).

هدف از این پژوهش، تهیه و تثبیت لیپاز پانکراس خوکی به روش CLEAs و بررسی کارایی آن در واکنش ترانس استریفیکاسیون روغن سویا است. همچنین، اثر عوامل مختلف شامل دما، زمان واکنش، مقدار آنزیم، مقدار سوبسترا، میزان الکل، حلال و محتوای آب بر بازده واکنش به منظور تعیین شرایط بهینه تولید بیودیزل مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آنزیم لیپاز پانکراس خوکی به‌صورت تجاری از شرکت سیگما تهیه شد. برای تهیه آنزیم تثبیت شده، یک میلی‌لیتر محلول آنزیمی (1 mg/mL) در بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (7=pH) با دو میلی‌لیتر محلول اشباع سولفات آمونیوم مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هم‌زده شد. سپس رسوب حاصل با سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) جمع‌آوری و در یک میلی‌لیتر بافر فسفات مجدداً سوسپانسیون شد. برای ایجاد پیوندهای عرضی، گلوتارآلدهید با غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار به سوسپانسیون افزوده و مخلوط به مدت ۶ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در پایان، آنزیم تثبیت شده سه مرتبه با بافر فسفات شستشو داده شد و فعالیت آن اندازه‌گیری گردید. فعالیت لیپاز با استفاده از پارانیتروفنیل پالمیتات (pNPP) به‌عنوان سوبسترا تعیین شد. بدین منظور، سوبسترا در ۱۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق حل و با ۹۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات حاوی ۰/۵ درصد تریتون X-100 مخلوط شد. سپس یک میلی‌لیتر محلول

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

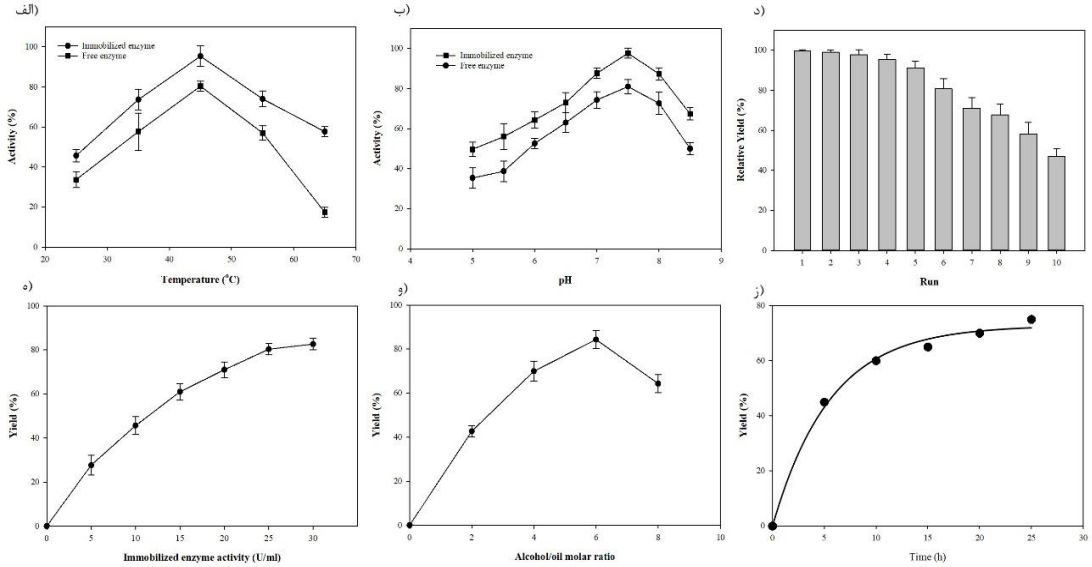
آنزیمی به مخلوط واکنش افزوده و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. واکنش با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر محلول یک مولار کربنات سدیم متوقف شد و پس از سانتریفیوژ، جذب محلول در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنزیمی بر اساس منحنی استاندارد پارانیتروفنول محاسبه شد. یک واحد فعالیت آنزیمی به مقدار آنزیمی اطلاق شد که در شرایط آزمون قادر به آزادسازی یک میکرومول پارانیتروفنول در دقیقه باشد (۱۲). واکنش ترانس استریفیکاسیون در ارلن‌های ۲۵ میلی‌لیتری با حجم نهایی ۱۰ میلی‌لیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل مقدار آنزیم تثبیت شده معادل ۵ واحد فعالیت، یک میلی‌لیتر روغن، سه میلی‌لیتر اتانول و نرمال‌هگزان تا حجم نهایی بود. واکنش در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۶ ساعت انجام شد و نمونه‌های فاقد آنزیم به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. میزان اسیدهای چرب آزاد باقی مانده با محلول هیدروکسید سدیم ۱/۰ نرمال و شناساگر فنل‌فتالئین تیتر شد. به‌منظور بهینه‌سازی شرایط واکنش، اثر دما (۲۵ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۱ تا ۱۲ ساعت)، مقدار سوبسترای لیپیدی (۰/۵ تا ۲ میلی‌لیتر)، فعالیت آنزیم (۱ تا ۳۰ واحد بر میلی لیتر)، محتوای آب (۰/۵ تا ۲ میلی‌لیتر)، حجم حلال (۱ تا ۱۰ میلی‌لیتر) و مقدار اتانول (۱ تا ۵ میلی‌لیتر) بررسی شد (۱۳).

داده‌های حاصل از آزمایش‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از سه تکرار مستقل محاسبه شد. تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (SPSS Inc., Chicago, USA) انجام گرفت. برای مقایسه‌ی داده‌های مربوط به دو گروه، از آزمون t مستقل استفاده شد. سطح اطمینان آماری در تمامی آزمون‌ها ۹۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) در نظر گرفته شد. طرح تحقیقاتی مربوط به این مطالعه با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1402.427 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران مورد تصویب قرار گرفته است.

یافته ها و بحث

در میان پنج رسوب دهنده بررسی شده، رسوب دهی آنزیم با آمونیوم سولفات ۳۰ درصد بیش از ۹۵ درصد فعالیت اولیه را حفظ کرد، در حالی که دی‌متیل‌سولفوکساید موجب افت شدید فعالیت شد. کراس لینکینگ با گلوتارآلدهید موجب تشکیل توده آنزیمی پایدار شد که کاهش پیک کربونیل در طیف سنجی مادون قرمز و تشکیل ذرات با اندازه کم‌تر از ۵۰ نانومتر در تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی آن را تأیید کرد. آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد پایداری حرارتی و pH بیش‌تری نشان داد، اگر چه دمای بهینه هر دو ۴۵ °C و pH بهینه آن ها ۷/۵ بود. قابلیت استفاده مجدد، یکی از مزایای اصلی بیوکاتالیست تثبیت شده، نیز بررسی شد. پس از پنج چرخه، بیش از ۹۰ درصد فعالیت اولیه حفظ شد، در حالی که پس از ۱۰ چرخه فعالیت به حدود ۵۰ درصد کاهش یافت. بررسی پارامترهای سینتیکی نشان داد که Km آنزیم تثبیت شده کم‌تر از آنزیم آزاد، اما Vmax آن پایین‌تر بود که به‌ترتیب بیانگر افزایش تمایل ظاهری به سوبسترا و کاهش سرعت بیشینه واکنش پس از تثبیت است. در واکنش ترانس استریفیکاسیون، افزایش مقدار بیوکاتالیست موجب افزایش بازده شد و در ۲۵ U/mL به مقدار بیشینه رسید، مقادیر بالاتر تأثیر قابل توجهی نداشتند. افزایش سرعت هم‌زدن از ۱۵۰ تا ۴۵۰ rpm نیز بازده را افزایش داد، اما سرعت‌های بالاتر موجب کاهش بازده شدند. اتانول در مقایسه با متانول به‌عنوان پذیرنده آسیل عملکرد بهتری داشت. افزایش نسبت مولی اتانول به روغن تا ۶:۱ موجب افزایش بازده تولید بیودیزل شد، در حالی که مقادیر بالاتر باعث کاهش سریع بازده شدند. همچنین، افزودن تدریجی الکل موجب بهبود بازده واکنش شد. بازده تولید بیودیزل با افزایش زمان واکنش افزایش یافت و پس از ۵ ساعت از ۴۰ درصد فراتر رفت و در حدود ۲۰ ساعت به بیشینه رسید تصویر شماره ۱).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]



تصویر شماره ۱: بررسی شرایط بهینه آنزیم تثبیت شده جهت ترانس استریفیکاسیون روغن سویا

تولید بیودیزل از روغن‌های گیاهی و ضایعات روغنی با استفاده از لیپاز تثبیت شده، رویکردی پایدار برای کاهش مصرف کاتالیزورهای شیمیایی و امکان استفاده مجدد از بیوکاتالیست است. در مطالعه حاضر، تثبیت لیپاز به روش توده رسوبی کراس لینک شده موجب افزایش پایداری آن در برابر تغییرات دما و pH و حفظ بیش از ۹۰ درصد فعالیت پس از پنج چرخه استفاده شد که نشان دهنده قابلیت مناسب این بیوکاتالیست برای کاربردهای تکرار شونده است. نتایج ترانس استریفیکاسیون نشان داد که اتانول در مقایسه با متانول عملکرد بهتری دارد و افزایش نسبت اتانول به روغن تا ۶:۱ موجب افزایش بازده شد، در حالی که مقادیر بالاتر الکل بازده را کاهش دادند. این موضوع با گزارش‌های پیشین درباره حساسیت لیپازها به غلظت بالای الکل مطابقت دارد. Abigor و همکاران نیز بیش‌ترین تبدیل روغن هسته خرما به استرهای آلکیل را با اتانول گزارش کردند، اگر چه میزان تبدیل آن‌ها (۷۲ درصد) کم‌تر از بازده حاصل در مطالعه حاضر بود (۱۴).

همچنین، Kaieda و همکاران مقاومت متفاوت لیپازها در برابر متانول و تأثیر شرایط واکنش بر تولید متیل‌استر از روغن سویا را نشان دادند(۹). مطالعات جدیدتر نیز کارایی لیپازهای آزاد و تثبیت شده را در تولید بیودیزل تأیید کرده‌اند. Zhou و همکاران بازده ۹۳/۸ درصد را با لیپاز آزاد و Pooja و همکاران بازده ۹۶/۴ درصد را با لیپاز تثبیت شده گزارش کردند؛ در مطالعه اخیر، کاتالیزور تثبیت شده پس از ۱۰ چرخه بیش از ۸۵ درصد تبدیل را حفظ کرد(۱۵، ۱۶). در مقایسه با این مطالعات، عملکرد مناسب و قابلیت استفاده مجدد بیوکاتالیست حاصل از توده رسوبی کراس لینک شده در مطالعه حاضر، پتانسیل این روش را برای توسعه فرآیندهای آنزیمی تولید بیودیزل نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح شماره ۱۸۵۶۸ مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد.

References

1- Imam HT, Marr PC, Marr AC. Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. Green Chem 2021; 23(14): 4980-5005.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

2- Vieira B, Nadaleti WC, Sarto E. The effect of the addition of castor oil to residual soybean oil to obtain biodiesel in Brazil: energy matrix diversification. Renew Energy 2021; 165: 657-667.

3- Liang S, Wu XL, Xiong J, Zong MH, Lou WY. Metal-organic frameworks as novel matrices for efficient enzyme immobilization: an update review. Coord Chem Rev 2020; 406: 213149.

4- Oliveira PA, Baesso RM, Nunes MI, Coutinho JAP, Costa-Félix RPB. Ultrasound is a powerful tool for monitoring real-time online transesterification reaction. Fuel 2026; 410: 137861.

5- Pang H, Ma C, Zhang S. Conversion of soybean oil extraction wastes into high-performance wood adhesives based on mussel-inspired cation-π interactions. Int J Biol Macromol 2022; 209(Pt A): 83-92. PMID: 35341885

6- Zahirinejad S, Hemmati R, Homaei A, Dinari A, Hosseinkhani S, Mohammadi S, et al. Nano-organic supports for enzyme immobilization: scopes and perspectives. Colloids Surf B Biointerfaces 2021; 204: 111774. PMID: 33932893

7- Federsel HJ, Moody TS, Taylor SJC. Recent trends in enzyme immobilization—concepts for expanding the biocatalysis toolbox. Molecules 2021; 26(9): 2822. PMID: 34068706

8- Li Y, Sun J. Reversibly cross-linked polymers: a new method for high-performance and sustainable polymer materials. Acc Chem Res 2026; 59(2): 298-310.

9- Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, Fukuda H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. J Biosci Bioeng 2001; 91(1): 12-15.

10- Darnoko D, Cheryan M. Kinetics of palm oil transesterification in a batch reactor. J Am Oil Chem Soc 2000; 77(12): 1263-1267.

11- Feng Y, Hu H, Wang Z, Du Y, Zhong L, Zhang C, et al. Three-dimensional ordered magnetic macroporous metal-organic frameworks for enzyme immobilization. J Colloid Interface Sci 2021; 590: 436-445. PMID: 33561593

12- Kim HJ, Kang BS, Kim MJ, Park YM, Kim DK, Lee JS, et al. Transesterification of vegetable oil to biodiesel using heterogeneous base catalyst. Catal Today 2004; 93-95: 315-320.

13- Tesser R, Di Serio M, Guida M, Nastasi M, Santacesaria E. Kinetics of oleic acid esterification with methanol in the presence of triglycerides. Ind Eng Chem Res 2005; 44(21): 7978-7982.

14- Abigor RD, Uadia PO, Foglia TA, Haas MJ, Jones KC, Okpefa E, et al. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. Biochem Soc Trans 2000; 28(6): 979-981.Tesser R, Di Serio M, Guida M, Nastasi M, Santacesaria E. Kinetics of oleic acid esterification with methanol in the presence of triglycerides. Ind Eng Chem Res 2005; 44(21): 7978-7982.

15- Zhou Y, Li K, Sun S. Simultaneous esterification and transesterification of waste phoenix seed oil with a high free fatty acid content using a free lipase catalyst to prepare biodiesel. Biomass Bioenergy 2021; 144: 105930.

16- Pooja S, Anbarasan B, Ponnusami V, Arumugam A. Efficient production and optimization of biodiesel from kapok (Ceiba pentandra) oil by lipase transesterification process: addressing positive environmental impact. Renew Energy 2021; 165: 619-631.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]