

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ALG YAĞINDAN LİPAZ KATALİZLİ BİYODİZEL ÜRETİMİ**

**GÜLŞAH AYDIN**

**KOCAELİ 2014**

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

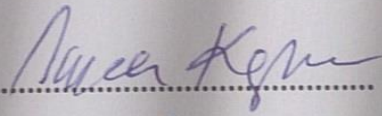
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

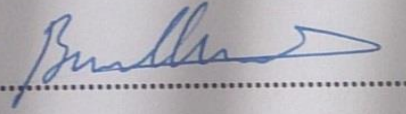
ALG YAĞINDAN LİPAZ KATALİZLİ BİYODİZEL ÜRETİMİ

GÜLŞAH AYDIN

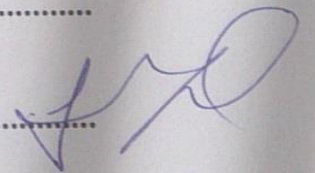
Yrd.Doç.Dr. Nurcan KAPUCU  
Danışman, Kocaeli Üniv.

  
.....

Yrd.Doç.Dr. Başar UYAR  
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

  
.....

Doç.Dr. Sevil YÜCEL  
Jüri Üyesi, Yıldız Teknik Üniv.

  
.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 10.01.2014

## **ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR**

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle yanımda olan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Nurcan Kapucu'ya

Çalışmam sırasında büyük yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Togayhan Kutluk'a,

Mezunu olmaktan her zaman gurur duyduğum, Kocaeli Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü'ndeki değerli hocalarıma,

Çalışmam boyunca yanımda olan tüm asistan arkadaşlarıma,

Her konuda desteğini benden esirgemeyen eşim Sadık Aydın'a,

Bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ocak- 2014

Gülşah AYDIN

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLOLAR DİZİNİ .....	vi
SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR .....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT .....	ix
GİRİŞ .....	1
1. GENEL BİLGİLER .....	4
1.1. Biyodizel .....	4
1.1.1. Üretim yöntemleri.....	4
1.1.2. Özellikleri .....	6
1.1.3. Çevresel etkileri .....	7
1.1.4. Biyobozunurluğu .....	8
1.1.5. Toksik etkileri.....	8
1.2. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Katalizörler .....	8
1.2.1. Homojen katalizörler .....	9
1.2.2. Heterojen katalizörler .....	10
1.2.3. Lipaz katalizörler .....	11
1.3. Enzim Tutuklama Yöntemleri .....	13
1.3.1. Adsorpsiyon .....	14
1.3.2. Hapsetme .....	15
1.3.3. Kapsülleme .....	15
1.3.4. İyonik bağlama .....	16
1.3.5. Kovalent bağlama .....	16
1.3.5.1. Lipazın perlit desteğe kovalent bağlanması .....	18
1.3.6. Çapraz bağlama.....	19
1.4. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Yağlar .....	21
1.4.1. Birinci nesil yağlar.....	21
1.4.2. İkinci nesil yağlar .....	21
1.4.3. Üçüncü nesil yağlar .....	23
1.5. Mikroalgler .....	24
1.5.1. Mikroalglerin üretimi.....	24
1.5.2. Mikroalglerden yağ eldesi .....	25
1.5.3. Mikroalglerin yağ içeriği ve verimliliği .....	26
1.6. Biyodizel Üretimine Etki Eden Faktörler .....	29
1.6.1. Alkol türünün etkisi .....	30
1.6.2. Enzim türü ve miktarının etkisi .....	32
1.6.3. Su miktarının etkisi.....	34
1.6.4. Çözücü türünün etkisi .....	34
1.6.5. Sıcaklığın etkisi .....	35
1.7. Alg Yağından Üretilen Biyodizelin Özellikleri.....	36
1.8. Konuyla İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar .....	37

1.8.1. Perlit desteğe lipaz tutuklama.....	37
1.8.2. Çapraz bağlama ile lipaz tutuklama.....	37
1.8.3. Alg yağından lipaz katalizli biyodizel üretimi.....	39
1.9. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı .....	42
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	43
2.1. Malzemeler .....	43
2.1.1. Kimyasallar.....	43
2.1.2. Cihazlar.....	43
2.2. Yöntem .....	44
2.2.1. Tutuklama .....	44
2.2.1.1. Perlit desteğe lipaz tutuklama.....	45
2.2.1.2. Çapraz bağlama ile lipaz tutuklama.....	44
2.2.2. Alg yağından lipaz katalizli biyodizel üretimi.....	45
2.2.3. Analizler .....	45
2.2.3.1. Protein tayini .....	45
2.2.3.2. Lipaz aktivitesi tayini .....	46
2.2.3.3. Yağ asidi metil ester (YAME) analizi.....	46
3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	47
3.1. Tutuklama.....	47
3.1.1. Perlit desteğe lipaz tutuklama.....	47
3.1.1.1. Tampon türü ve pH etkisi.....	47
3.1.1.2. Sıcaklık etkisi .....	49
3.1.1.3. Enzim miktarının etkisi .....	50
3.1.1.4. Destek miktarının etkisi .....	51
3.1.1.5. Perlit desteğe tutuklanmış lipazın aktivitesi.....	53
3.1.2. Çapraz bağlama ile lipaz tutuklama.....	54
3.2.1.1. pH etkisi .....	54
3.2.1.2. Çapraz bağlı lipazın aktivitesi .....	55
3.2. Alg Yağından Lipaz Katalizli Biyodizel Üretimi.....	55
3.2.1. Su miktarının etkisi.....	56
3.2.2. Alkol ekleme sıklığının etkisi.....	58
3.2.3. Yağ/alkol mol oranının etkisi .....	59
3.2.4. Sıcaklığın etkisi .....	60
3.2.5. Enzim miktarının etkisi.....	62
3.2.6. Çözücü türünün etkisi.....	63
3.2.7. Reaksiyon süresinin etkisi .....	65
3.2.8. Tekrar kullanımın etkisi.....	66
3.2.9. Enzim türünün etkisi.....	67
4. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	69
KAYNAKLAR .....	72
EKLER.....	78
ÖZGEÇMİŞ .....	82

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Stokiyometrik bir transesterleşme işlemi.....	6
Şekil 1.2. Lipaz transesterleşme mekanizması.....	13
Şekil 1.3. Taşıyıcı yüzeye bağlı enzimlerin şematik gösterimi.....	14
Şekil 1.4. Hapsetme yöntemiyle tutuklanmış enzimlerin şematik gösterimi.....	15
Şekil 1.5. Kapsülleme yöntemiyle tutuklanmış enzimlerin şematik gösterimi.....	15
Şekil 1.6. İyonik bağlama yöntemiyle tutuklanmış enzimlerin şematik gösterimi.....	16
Şekil 1.7. Kovalent bağlama yöntemiyle tutuklanmış enzimlerin şematik gösterimi.....	17
Şekil 1.8. Genleşmiş ve genleşmemiş perlit.....	18
Şekil 1.9. Perlit yüzeyinin aktifleştirilmesi ve lipazın perlite tutuklanması .....	19
Şekil 1.10. Çapraz bağlı enzim agregatlarının oluşması .....	19
Şekil 1.11. Lipazların glutaraldehit ile çapraz bağlanması .....	20
Şekil 1.12. Mikroalg üretiminde a)Kanal tipi havuzlar, b) Fotobiyoreaktörler .....	25
Şekil 1.13. Mikroalglerden yağ ekstraksiyonu ve biyodizel üretimi .....	26
Şekil 1.14. Enzimatik biyodizel üretimini etkileyen faktörler .....	29
Şekil 1.15. Atık yağın üç basamakta kesikli metanolizi .....	30
Şekil 1.16. <i>Thermomyces laniginosus</i> lipazının kapalı konformasyondaki üç boyutlu yapısı .....	32
Şekil 1.17. <i>Thermomyces laniginosus</i> lipazının PEG 600 ile çöktürülerek çapraz bağlanması a)PEG derişimi, b)Glutaraldehit derişimi, c)Sıcaklık, d)Sürenin bağıl aktiviteye etkisi .....	38
Şekil 1.18. <i>Chlorella protothecoides</i> alg yağıyla biyodizel üretiminde dönüşüme etki eden parametreler etkisi.....	40
Şekil 3.1. Lipozyme CALB L'nin a) Perlit, b) Kalsine perlite tutuklanmasında pH'ın ve sürenin tutuklama verimine etkisi.....	48
Şekil 3.2. Lipozyme CALB L'nin a) Perlit, b) Kalsine perlite tutuklanmasında sıcaklığın ve sürenin tutuklama verimine etkisi .....	50
Şekil 3.3. Lipozyme CALB L'nin a) Perlit, b) Kalsine perlite tutuklanmasında enzim miktarı ve sürenin tutuklama verimine etkisi .....	51
Şekil 3.4. Lipozyme CALB L'nin a) perlit, b) kalsine perlite tutuklanmasında destek miktarının ve sürenin tutuklama verimine etkisi.....	52
Şekil 3.5. Novozym 435 ve perlite tutuklanmış CALB L'nin Lipozyme CALB L'ye göre bağıl aktiviteleri .....	53
Şekil 3.6. Lipozyme TL 100L'nin çapraz bağlanmasında pH 'ın tutuklama verimine etkisi.....	54
Şekil 3.7. Alg yağından biyodizel üretiminde su miktarının YAME içeriğine etkisi .....	56
Şekil 3.8. Lipozyme TL IM ile Alg yağından biyodizel üretiminde su miktarının YAME içeriğine etkisi.....	57

Şekil 3.9. Çapraz bağlı-TL lipazı ile alg yağından biyodizel üretiminde su miktarının YAME içeriğine etkisi.....	58
Şekil 3.10. Alg yağından biyodizel üretiminde metanol ekleme sıklığının YAME içeriğine etkisi .....	59
Şekil 3.11. Ticari tutuklu lipazlar kullanılarak alg yağından biyodizel üretiminde yağ/metanol mol oranının YAME içeriğine etkisi.....	60
Şekil 3.12. Lipozyme TL IM ve Novozym 435 ile alg yağından biyodizel üretiminde sıcaklığın YAME içeriğine etkisi .....	61
Şekil 3.13. Novozym 435 lipazı ile alg yağından biyodizel üretiminde lipaz miktarının YAME içeriğine etkisi.....	63
Şekil 3.14. Lipozyme TL IM lipazı ile alg yağından biyodizel üretiminde lipaz miktarının YAME içeriğine etkisi .....	63
Şekil 3.15. Çapraz bağlı-TL lipazı ile alg yağından biyodizel üretiminde lipaz miktarının YAME içeriğine etkisi.....	63
Şekil 3.16. Novozym 435 ve Lipozyme TL IM ile alg yağından biyodizel üretiminde çözücü türünün YAME içeriğine etkisi .....	64
Şekil 3.17. Novozym 435 ve Lipozyme TL IM ile alg yağından biyodizel üretiminde sürenin YAME içeriğine etkisi .....	65
Şekil 3.18. a) Lipozyme TL IM, b)Çapraz bağlı-TL lipazlarının tekrar kullanılabilirliğinin YAME içeriğine etkisi .....	66
Şekil 3.19. Alg yağından biyodizel üretiminde farklı lipazların YAME içeriğine etkisi .....	67

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. TS EN 14214 Otomotiv yakıtları yağ asidi metil esterlerinin (YAME) motorlar için belirlenen özellikleri .....	6
Tablo 1.2. Biyodizel üretiminde alkali ve lipaz katalizli yöntemlerin karşılaştırılması .....	10
Tablo 1.3. Kovalent bağlanma yöntemleri .....	17
Tablo 1.4. Bitkisel yağ kalitelerinin enzimatik biyodizel üretimine etkisi .....	22
Tablo 1.5. Farklı mikroalg türlerinin yağ içeriği ve verimlilikleri.....	27
Tablo 1.6. Bazı mikroalglerin yağ asidi bileşimleri.....	28
Tablo 1.7. Alg yağı ile diğer yağların karşılaştırılması.....	29
Tablo 1.8. Basamaklı metanol eklemeli enzimatik transesterleşme tepkimeleri.....	31
Tablo 1.9. Çeşitli alkoller ve lipazlar ile ilgili sonuçlar.....	31
Tablo 1.10. Çeşitli lipazlarla biyodizel üretimi.....	33
Tablo 1.11. Algal biyodizel, klasik dizel yakıtı ve ASTM biyodizel standartlarının karşılaştırılması .....	36
Tablo 1.12. Çeşitli enzimlerin perlit desteğe tutuklanması.....	37
Tablo 1.13. Lipazların çapraz bağlanması ile ilgili çalışmalar .....	39
Tablo 1.14. Alg yağından biyodizel üretimi üzerine yapılmış çalışmalar .....	41
Tablo 3.1. Çapraz bağlı-TL lipazı aktivitesine pH etkisi .....	55



## SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR

°C	: Sıcaklık (Celcius)
dk	: Dakika
M	: Molekül kütlesi (g/mol)
m	: Örnek kütlesi (mg)
rpm	: Round per minute (dakikadaki devir sayısı)
U	: Ünite (lipaz aktivitesi birimi)

### Kısaltmalar

AB	: Avrupa Birliği
CALB	: <i>Candida Antarctica</i> Lipazı B
CFPP	: Soğuk Filtre Tıkanma Noktası
CLEA	: Çapraz Bağlı Enzim Agregatı
EN	: European Standards (Avrupa Standardı)
FID	: Flame Ionization Dedector (Alev İyonlaştırıcı Dedektör)
GA	: Glutaraldehit
p-NPP	: Para Nitrofenil Palmitat
p-NP	: Para Nitrofenol
SYA	: Serbest Yağ Asidi
TL	: <i>Thermomyces laniginosus</i>
YAME	: Yağ Asidi Metil Esteri
3-APTS	: Aminopropil Trietoksisilan

## ALG YAĞINDAN LİPAZ KATALİZLİ BİYODİZEL ÜRETİMİ

### ÖZET

Dünyada petrol kaynaklarının azalması ve egzoz gazlarının yarattığı çevresel problemler alternatif enerji kaynaklarına olan ilgiyi artırmıştır. Biyodizel yenilenebilir, biyobozunur ve çevre dostu bir yakıt olarak petrol kaynaklı dizele alternatif bir yakıt haline gelmiştir. Fakat biyodizel üretiminde kullanılan yağların yüksek üretim maliyeti biyodizel üretim maliyetini de artırmaktadır. Mikroalglerin yüksek fotosentetik etkinlikleri, yüksek büyüme hızları ve verimlilikleri, %70'e varan yağ içerikleri, alg yağını biyodizel üretimi için en çok gelecek vadeden yağ kaynağı haline getirmiştir. Çevre dostu, ılımlı reaksiyon koşullarında biyodizel üretimini mümkün kılan lipaz enzimlerinin transesterleşme reaksiyonlarında kullanımı üzerine yapılan araştırmalar giderek artmaktadır.

Bu çalışmada serbest *Thermomyces lanuginosus* lipazının çapraz bağlı agregatları oluşturulmuş, ayrıca serbest *Candida antarctica* lipazı perlit ve kalsine edilmiş perlit desteğe tutuklanmıştır. Enzimlerin tutuklanma verimleri ve aktiviteleri belirlenmiştir. Tutuklanmış lipaz katalizörlüğünde, alg yağının metanol ile transesterleşmesiyle biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık (25-45 °C), başlangıç su miktarı (%0-20), metanol ekleme sıklığı (tek, iki ve üç basamak), enzim miktarı (%1-25), yağ/metanol mol oranı (1/3, 1/4, 1/6), çözücü türü (heksan, heptan, ter-bütanol, toluen) gibi parametrelerin biyodizel üretime etkileri incelenmiştir. *Candida antarctica* kaynaklı Novozym 435 ve *Thermomyces lanuginosus* kaynaklı Lipozyme TL-IM ticari tutuklu lipazlarının transesterleşme reaksiyonundaki performansları karşılaştırılmıştır. Ayrıca perlit-CALB ile çapraz bağlı-TL lipazlarının biyodizel üretimine uygunluğu araştırılmıştır.

Transesterleşme reaksiyonunda YAME içeriği, 24 saat sonunda, 300 rpm karıştırma hızı, %10 su miktarı, 1/4 yağ/metanol oranı ve üç basamakta metanol eklendiği durumda, Novozym 435 için 45°C sıcaklıkta ve %25 enzim kullanıldığında %85 ve Lipozyme TL IM için 35°C sıcaklıkta ve % 3 enzim kullanıldığında %87 olarak elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Alg yağı, Biyodizel, Çapraz bağlama, Lipaz, Perlit.

## LIPASE-CATALYSED BIODIESEL PRODUCTION FROM ALGAE OIL

### ABSTRACT

The reduction of the world's petroleum resources, and the environmental problems caused by exhaust gases have increased interest in alternative energy sources. Biodiesel is a renewable, biodegradable and environmentally-friendly diesel oil as a fuel source has become an alternative to petroleum diesel, but costs of oils which used in biodiesel production have increased the production costs. Microalgae's high efficiency photosynthetic activities, high growth rates and the contents of oil up to 70% make them most promising oil source. Studies which performed with the use of lipases which make possible eco-friendly and moderate reaction conditions for biodiesel production via transesterification reaction, have risen up recent days.

In this study, cross-linked *Thermomyces lanuginosus* lipase aggregates were prepared and *Candida artartica* lipase was immobilized on calcinated and uncalcinated perlite for investigating immobilization efficiencies and lipase activities. Biodiesel production carried out by transesterification of algae oil with methanol, using immobilized lipase catalyst. The effects of parametres, such as temperature (25-45°C), initial water content (0-20%), methanol addition frequency (one, two, three step), amount of enzyme (1-25%), oil/methanol molar ratio (1/3, 1/4, 1/6), solvent type (hexane, heptane, tert-buthanol, toluene) on biodiesel reaction were investigated. Commercial immobilized lipases, *Candida artartica* (Novozyme 435) and *Thermomyces lanigunosus* (Lipozyme TL IM) performances on the production of biodiesel were compared. Furthermore, suitability of biodiesel production performances of cross-linked *Thermomyces lanuginosus* lipase agrerates and *Candida artartica* lipase immobilized on perlite were investigated.

After 24 h transesterification reaction at 300 rpm aggitation speed, inital water content 10%, oil/methanol molar ratio 1/4, three step methanol addition, the maximum FAME content was obtained as 85% with 25% enzyme content and 45°C for Novozyme 435 and 87% with 3% enzyme content and 35°C for Lipozyme TL IM.

**Keywords:** Algae oil, Biodiesel, Cross-linked, Lipase, Perlite.

## **GİRİŞ**

Dünyadaki fosil kökenli enerji kaynaklarının sınırlı olması ve hızla azalmasına karşılık artan nüfus ve gelişmeye bağlı olarak enerji ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Aynı zamanda fosil yakıtların yanması sonucu oluşan CO<sub>2</sub> gazının yarattığı sera etkisi sonucu meydana gelen küresel ısınma insanlığı çevre dostu ve yenilenebilir enerji kaynakları arayışına yöneltmektedir. Yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan bitkisel ve hayvansal kökenli maddelerden elde edilen 'biyokütle enerjisi' seçenekler arasında en büyük potansiyele sahip enerji kaynağıdır.

Günümüzde biyokütle kökenli en önemli yenilenebilir enerji kaynağı ise 'biyodizel'dir. Biyodizel bitkisel ya da hayvansal yağlardan elde edilen uzun zincirli yağ asitlerinin alkil esterleri olarak tanımlanabilir. Biyodizel yenilenebilir, biyoparçalanabilir (21 günde %99,6'ya varan biyolojik parçalanma) ve toksik olmayan çevre dostu bir yakıttır. Biyodizelin yanması sonucu oluşan CO<sub>2</sub>, atmosferdeki toplam CO<sub>2</sub> miktarını arttırmadığı için küresel ısınmaya neden olmaz, sülfür içermez. Kullanılan fosil kaynaklı petrol ürünlerinin sadece %10'unun ülke içinde üretildiği göz önünde bulundurulduğunda dışarıya olan petrole bağımlılığı azaltarak ülke ekonomisine katkıda bulunabilir. Ülkemizde daha az yakıt sarfiyatında bulunan dizel motorlu araçların giderek yaygınlaşması, deniz taşımacılığının dizel motorlarla yapılması ve endüstride kullanılan dizel yakıt miktarının her geçen gün artması biyodizeli daha önemli hale getirmektedir.

Biyodizel üretimi için günümüzde kullanılan yöntemler; direkt kullanma ve karıştırma, mikroemülsiyon, piroliz ve transesterleşmedir. Transesterleşme; bitkisel ve hayvansal yağları oluşturan trigliseritleri parçalayarak yani içindeki gliserolü alarak, kullanılan alkoldeki alkil radikali ile yer değiştiren bir ester dönüşüm işlemidir. Kısacası gliserol esaslı triesterler alkil esaslı monoesterlere dönüştürülür. Transesterleşme günümüzde en çok kullanılan yöntemdir. Transesterleşme işlemi süperkritik akışkanlarla, kimyasal katalizörlerle (asidik, alkali) ya da enzim katalizörle gerçekleştirilmektedir. Kuvvetli alkali katalizörlüğünde yağ asidi

metil esterleri kısa sürede ve yüksek verimle elde edilmektedir. Ancak bu katalizörlerin yağ içindeki serbest yağ asitleriyle sabun reaksiyonu vermesi, yüksek sıcaklık gereksinimi ve yan ürün gliserolün ortamdaki kolay ayrılmaması gibi ek proses basamağı gerektiren ve maliyeti artıran dezavantajları vardır. Enzimatik transesterleşme yönteminin, ılımlı reaksiyon koşullarına sahip olması, reaksiyon yan ürünü gliserolün üründen kolay ayrılması, yağdaki mevcut yağ asitlerinin tümünün metil estere dönüşebilmesi ve yağda bulunması muhtemel suyun reaksiyonu olumsuz etkilememesi, daha az proses basamağı vb. gibi diğer proseslerde bulunmayan birçok avantajı vardır.

Enzimlerin kaynaklarından izolasyonu ve saflaştırılmaları oldukça maliyetli bir süreçtir. Bu nedenle enzimlerin bir destek malzemesi üzerine tutuklanarak tekrar tekrar kullanılabilir hale getirilmesi oldukça önemlidir. Biyodizel üretiminin destekler üzerine tutuklanmış lipaz enzimleriyle yapılması enzimlerden kaynaklanan yüksek üretim maliyetinin azalmasını, lipazların serbest formlarına göre daha uzun süre aktivitelerini korumalarını ve ısı, pH gibi değişkenlere daha dayanıklı olmalarını sağlayarak biyodizel üretiminde enzim kullanımını daha cazip hale getirmiştir.

Biyodizel üretiminde genel olarak bitkisel ya da atık bitkisel yağlar kullanılmaktadır. Yağların maliyeti toplam üretim maliyetinin %75'ini oluşturması nedeniyle en uygun yağlar, hektar başına en yüksek verimliliğe sahip biyokütleden elde edilmiş yağlardır. Yeni nesil mikroalglerden elde edilen yağlar geleneksel yağ kaynaklarına göre yüksek fotosentetik etkinlikleri, yüksek büyüme hızları ve verimlilikleri, kuru kütlelerinin %70'ine varan yağ içerikleri ile biyodizel üretimi için en çok gelecek vadeden yağ kaynağı olarak ortaya çıkmıştır. Bunlara ek olarak hızlı çoğalmaları, bitkiler gibi yetiştirilebilmeleri için tarım arazilerine ihtiyaç duymayarak açık havuzlar ya da biyoreaktörlerde daha hızlı yetiştirilmeleri, biyodizel üretimi için daha yüksek verimde yağ üretebilmelerini sağlamaktadır. Ayrıca alg yağında yüksek oranda bulunan çoklu doymamış yağlar algal biyodizelin soğuk havalarda donmasını geciktirir.

Bu çalışmanın amacı serbest *Candida antarctica* ve *Thermomyces lanuginosus* lipazları çeşitli tekniklerle tutuklanarak *Chlorella protothecoides* kaynaklı alg yağıyla biyodizel üretiminde kullanılabilirliğinin incelenmesi, bu lipazların ticari

tutuklanmış formları ile biyodizel verimlerinin karşılaştırılmasıdır. Literatürde konu ile ilgili yapılan az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Çalışmanın ilk aşamasında, serbest *Candida antarctica* (Lipozyme CALB L) lipazı yüzeyi aktifleştirilmiş perlit ve kalsine edilmiş perlit desteğe tutuklanmış (perlit-CALB) ve *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL 100L) lipazının glutaraldehite çapraz bağlanmış agregatları (çapraz bağlı- TL) oluşturulmuştur.

Çalışmanın ikinci aşamasında, lipaz katalizörlüğünde alg yağı ve metanol arasındaki transesterleşme reaksiyonu ile biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Transesterleşme reaksiyonunda ticari tutuklu Novozym 435 (*Candida antarctica*), Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*), çapraz bağlı-TL, perlit-CALB kullanılarak reaksiyon parametrelerinin yağ asidi metil esteri dönüşümü üzerindeki etkileri incelenmiştir.

## **1. GENEL BİLGİLER**

### **1.1. Biyodizel**

Biyodizel, yenilenebilir biyolojik yağlardan üretilen ve dizel motorlarda kullanılabilen bir yakıttır. Hayvansal yağlar, kolza, ayçiçeği, palmiye yağı gibi bitkisel yağlar ve kullanılmış atık yağların yanı sıra son zamanlarda mikroalglerden elde edilen yağlar da biyodizel üretiminde kullanılabilir.

Sebze yağlarının yakıt olarak kullanılabilmesini, ilk olarak 1900'lü yılların başında Rudolph Diesel yer fıstığı yağıyla dizel motorunu çalıştırarak göstermiştir (Vermeersch, 2000). Aynı yıllarda 30'dan fazla bitkisel yağ araştırılmış, bu bitkisel yağlara uzun süreli testler uygulandığında yağların motorda ciddi problemlere yol açtığı görülmüştür.

Problemlerin en büyük nedeni, bitkisel yağların yüksek viskoziteleri (motorinin yaklaşık 15-20 katı), düşük uçuculukları ve kötü soğuk akış özellikleridir. Yüksek viskozite, enjeksiyon işlemi engelleyerek kötü atomizasyona neden olmaktadır. Bununla birlikte, yakıtın hava ile yetersiz bir şekilde karışması sonucu eksik yanma meydana gelmekte, silindir içinde kurum oluşmasına ve enjektörlerin tıkanmasına neden olmaktadır. Bitkisel yağların yüksek viskoziteleri, molekül ağırlıklarının yüksek olmasından kaynaklanır. Moleküler ağırlıkları motorininkinin üç katından daha fazladır. Bitkisel yağların alternatif dizel motor yakıtı olarak kullanılabilmesi için bu denli yüksek olan viskozitelerinin dizel yakıtına yaklaştırılması ve uçuculuklarının da iyileştirilmesi gerekmektedir (Şanlı, 2005a).

#### **1.1.1. Üretim yöntemleri**

Bitkisel yağların yüksek viskoziteleri çeşitli kimyasal yöntemle iyileştirilmektedir. Bu yöntemler; inceltme, mikroemülsifikasyon, piroliz (termal kraking) ve transesterleşmedir.

İnceltme yöntemi, bitkisel yağların çeşitli oranlarda dizel yakıtı ya da organik bileşikler karıştırılarak inceltilmesi işlemidir. Böylece yağ viskozitesi düşürülerek yakıt olarak kullanılabilir hale getirilmektedir (Demirbaş, 2003).

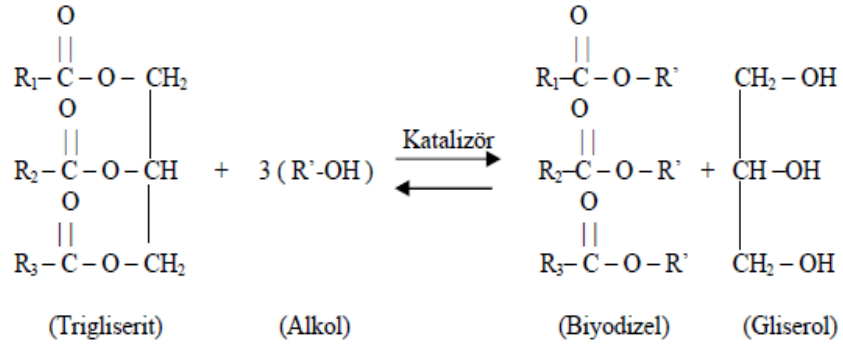
Bitkisel yağların viskozitesini azaltmak için, metanol ve etanol gibi kısa zincirli alkoller ile mikroemülsiyon oluşturulmaktadır. Bu yöntemle petrol içermeyen alternatif dizel yakıtları meydana getirmek mümkün olabilmektedir (Koç, 2011). Tepkime sırasında düşük kaynama noktalı bileşenlerin buharlaşarak patlamasıyla sprey karakteristikleri iyileşir. Bütanol, hekzanol ve oktanol ile gerçekleştirilen bütün mikroemülsiyonlarda, dizel yakıtları için uygun en düşük viskoziteler elde edilir (Kaplan, 2001).

Piroliz ya da kraking kimyasal bağların daha küçük moleküller oluşturmak üzere kırılması prosesidir (Ölçüm, 2006). Bitkisel yağların piroliz ürünlerini elde etmek için iki yöntem vardır. Bunlardan biri, bitkisel yağı ısı etkisiyle kapalı bir kaptan parçalamak, diğeri ise standart ASTM distilasyonu ile ısı parçalanma etkisinde tutmaktır (Güler, 2008).

Transesterleşme; bitkisel ve hayvansal yağları oluşturan trigliseritleri parçalayarak yani içindeki gliserolü alarak, kullanılan alkoldeki alkil radikali ile yer değiştiren bir ester dönüşüm işlemidir. Trigliseridlerin ester değişim reaksiyonu ardışık üç denge reaksiyonundan oluşur. Trigliserid molekülü adım adım digliserid, monogliserid ve son olarak da gliserine parçalanır. Reaksiyonun her basamağında bir mol ester açığa çıkar (Koç, 2011). Kısacası gliserol esaslı triesterler alkil esaslı monoesterlere dönüştürülür. Transesterleşme ile trigliseritler monoesterlere dönüştürüldüğünde moleküler ağırlık üçte bir oranında azalır. Ayrıca uçuculuk da bir miktar iyileşir. Stokiyometrik bir transesterleşmede bir mol yağ için üç mol alkol kullanılır ve bunun sonucunda üç mol yağ asidi alkil mono ester (biyodizel) ve yan ürün olan bir mol gliserol elde edilir. Şekil 1.1'de teorik bir transesterleşme işlemi görülmektedir (Şanlı, 2005a).

Reaksiyonu hızlandırmak ve ester dönüşümünü artırmak için; baz, asit ya da enzim (biyolojik) katalizör kullanılır.





Şekil 1.1. Stokiyometrik bir transesterleşme işlemi (Şanlı, 2005a)

### 1.1.2. Özellikleri

Biyodizel, biyolojik olarak parçalanabilen, zehirsiz, sülfürsüz bir yakıttır. Biyodizel ile ilgili standartlar, ASTM D6751 (Amerika Standardı) ve EN 14214 (Avrupa Standardı)'dır. Bu standartlarda fiziksel özellikler (yoğunluk, viskozite, iyot değeri, asit değeri, bulutlanma noktası, saflık noktası, uçuculuk) karakterize edilir. Tablo 1.1'de Enerji Piyasası Düzenleme Kurumu tarafından yayınlanan ve 01.01.2006 tarihinde yürürlüğe giren TS EN 14214 standardına göre otomotiv yakıtları yağ asidi metil esterlerinin (YAME) dizel motorlar için belirlenen özellikleri ve deney yöntemleri verilmiştir.

Tablo 1.1. TS EN 14214 Otomotiv yakıtları yağ asidi metil esterlerinin (YAME) dizel motorlar için belirlenen özellikleri (URL-1)

Özellik	Birim	En az	En çok	Test Yöntemi
Ester içeriği	% (m/m)	96,5	-	EN 14103
Yoğunluk, 15 °C	kg/m <sup>3</sup>	860	900	EN ISO 12185
Kinematik viskozite, 40°C	mm <sup>2</sup> /s	3,50	5,00	EN ISO 3104
Parlama Noktası	°C	120	-	EN ISO 3679
Kükürt içeriği	mg/kg	-	10	EN ISO 20846
Karbon kalıntı	% (m/m)	-	0,30	EN ISO 10370
Setan sayısı		51	-	EN ISO 5165
Sülfat kül içeriği	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Su içeriği	mg/kg	-	500	EN ISO 12937
Toplam kirlilik	mg/kg	-	24	EN 12662
Bakır şerit korozyonu	-	1		EN ISO 2160

Tablo 1.1 (Devam). TS EN 14214 Otomotiv yakıtları yağ asidi metil esterlerinin (YAME) dizel motorlar için belirlenen özellikleri (URL-1) (devam)

Oksidasyon kararlılığı 110 °C	Saat	6.0	-	EN 14112
Asit değeri	mg KOH/g	-	0,5	EN 14104
İyot değeri	g iyot/100 g	-	120	EN 14111
Linolenik asit metil esteri	% (m/m)	-	12	EN 14103
Yüksek doymamış ( $\geq 4$ çift bağ)	% (m/m)	-	1	
Metanol içeriği	% (m/m)	-	0,20	EN 14110
Monoglisericid içeriği	% (m/m)	-	0,80	EN 14105
Diglisericid içeriği	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Triglisericid içeriği	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Serbest gliserol	% (m/m)	-	0,02	EN 14105
Toplam gliserol	% (m/m)	-	0,25	EN 14105
Grup I Metalleri (Na+K)	mg/kg	-	5,0	EN 14108
Grup II Metalleri (Ca+Mg)			5,0	EN 14109
Fosfor içeriği	mg/kg	-	10	EN 14107

Biodizel, petrol kaynaklı dizel ile her oranda karıştırılabilir. Genelde dizele hacimce %20 oranında biyodizel karıştırılır. Petrol kökenli dizele göre daha yüksek tutuşma derecesine sahip olan biyodizel, bu özelliğiyle taşıma ve depolama sırasında da kolaylık sağlar. Biyodizel setan sayısı motorinin setan sayısından daha yüksektir. Biyodizel, motoru güç azaltıcı birikintilerden temizler ve motorinden çok daha iyi yağlayıcılık özelliğine sahiptir. Biyodizel ve biyodizel-motorin karışımları, motorinden daha yüksek akma ve bulanma noktasına sahiptir; bu durum yakıtların soğukta kullanımında sorun çıkarır. Akma ve bulanma noktaları, uygun katkı maddeleri (anti-jel maddeleri) eklenerek düşürülebilmektedir. (Güler, 2008). Mazot egzoz atığının zehirli etkisinin yok olması için gerekli süre 30 gün civarında iken biyodizel katkılı yakıtta bu süre üç kat kısalmaktadır (Elmas, 2005).

### 1.1.3. Çevresel etkileri

Sera gazları içinde büyük bir pay sahibi olan CO<sub>2</sub>, yanma sonucu ortaya çıkan bir gazdır ve dünyanın en önemli çevre sorunu olan küresel ısınmaya neden olmaktadır. Yine yanma sonucu açığa çıkan ve sera gazları arasında yer alan CO, SO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub> gazları da insan sağlığına zararlıdır.

Biyodizel, tarımsal bitkilerden elde edildiği için, biyolojik karbon döngüsü içinde, fotosentez ile CO<sub>2</sub>'i dönüştürüp karbon döngüsünü hızlandırır ve sera etkisini artırıcı yönde etki göstermez. Ayrıca biyodizelin yanması sonucu, CO, SO<sub>x</sub> gazlarının, partikül maddelerin ve yanmamış hidrokarbonların da daha az salındığı kanıtlanmıştır. Biyodizelin NO<sub>x</sub> emisyonları dizel yakıttan daha fazladır. Emisyon miktarı, motorun biyodizel yakıtı uygunluğuna bağlı olarak değişir. NO<sub>x</sub> emisyonlarının %13 oranına kadar arttığı test edilmiştir. Bu yüzden NO<sub>x</sub> kontrol teknolojileri biyodizel yakıtı kullanan sistemlere uygulanabilir (Vermeersch, 2000). Ozon tabakasına olan olumsuz etkiler, biyodizel kullanımında dizel yakıtı nazaran %50 daha azdır. Asit yağmurlarına neden olan kükürt bileşenleri (SO<sub>x</sub>), biyodizel yakıtlarda yok denecek kadar azdır. Biyodizel yakıtlarının yanması sonucu ortaya çıkan CO (zehirli gaz) oranı, dizel yakıtın yanması sonucu oluşan CO oranından %50 daha azdır.

#### **1.1.4. Biyobozunurluğu**

Biyodizeli oluşturan C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> metil esterleri doğada hızla parçalanarak bozunur. 10000 mg/L' ye kadar herhangi bir olumsuz mikrobiyolojik etki göstermezler. Suda biyodizelin 28 günde %95'i, motorinin ise %40'ı bozunabilmektedir. Biyodizelin doğada bozunabilme özelliği dekstroza (şeker) benzemektedir (Şen, 2012).

#### **1.1.5. Toksik etkileri**

Biyodizelin toksik etkisi bulunmamaktadır. Biyodizel için ağızdan alımda öldürücü doz 17,4 g biyodizel/kg vücut ağırlığı şeklinde olup, sofraya tuzu için bu değer 1,75 g tuz/kg vücut ağırlığıdır. İnsanlar üzerinde yapılan elle temas testlerinde, biyodizelin ciltte %4'lük sabun çözeltisinden daha az toksik etkisi olduğunu görülmüştür (URL - 2).

### **1.2. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Katalizörler**

Biyodizel üretiminde kullanılan katalizörler, trigliserid bağlarını kırarak esterlerin serbest hale gelmesini sağlamaktadır (Yağız, 2006).

### 1.2.1. Homojen katalizörler

Homojen kataliz reaksiyonlarında, reaktant ve katalizörün her ikisi de aynı fazda bulunur. Homojen katalizörler asit, baz ya da sıvı enzim çözeltileridir.

Asidik transesterleşme tepkimesinde genellikle homojen katalizör olarak sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) ve HCl kullanılırken, alkali transesterleşme tepkimesinde sodyum hidroksit (NaOH) ve potasyum hidroksit (KOH) kullanılmaktadır (Sharma ve diğ., 2008). Sıvı formda lipaz enzimi ise transesterleşme tepkimesinde kullanılan homojen enzim katalizörüdür.

Asidik katalizörler varlığında sıcaklık yüksektir, gliserinle aynı homojen ortamdaki katalizör birlikte ayrılır, tekrar geri kazanılmaz ve ortamda bulunan su, reaksiyonu olumsuz etkiler. Bu katalizörle çalışma esnasında ortamın kuvvetli asit olması, kullanılan ekipman ve malzemelerin korozyona ve basınca dayanıklı olmasını, pahalı malzemeden yapılmasını gerektirir. Bu da maliyeti artırır ve kullanıcı açısından tehlike oluşturacağından daha dikkatli olunmalıdır (Elibol ve diğ., 2008).

Aynı miktarlarda baz katalizör kullanıldığında, asit katalizörlüğündeki reaksiyondan 4000 kat daha hızlıdır. Ayrıca alkali katalizörler asitlere göre daha az koroziftir. Nem ve serbest yağ asidi (SYA) miktarı bazik transesterleşmeyi etkileyen en temel kriterlerdir. Ortamda su bulunması durumunda, yağların hidrolizi ile yağ asitleri serbest hale geçer ve bu şartlarda esterleşme yapılamazken (URL-3), SYA'lar ise baz katalizör ile reaksiyona girerek bazik katalizörü tüketip sabun oluşumuna neden olurlar (Şanlı, 2005b). Bu nedenle bazik katalizörlü reaksiyonda, SYA miktarı %4'ün altında olmalıdır (Meher ve diğ., 2006).

Transesterleşme tepkimelerinde kullanılan homojen enzim katalizörler, sıvı lipaz formülasyonlarıdır. Bu formülasyonlar, enzimin denatürasyonunu engellemek için gliserol, sorbitol gibi ve aynı zamanda mikrobiyal gelişmeyi engellemek için benzoat gibi stabilizör katılmış sulu enzim çözeltileridir (Nielsen ve diğ., 2009).

Homojen katalizde, daha uygun reaksiyon ortamlarında gerçekleşmesi ve seçiciliğin yüksek olması gibi avantajlarının yanında, pahalı katalizörlerin geri kazanım zorluğu

vardır. Heterojen katalizör kullanılarak homojen katalizörlerin bazı dezavantajları ortadan kaldırılabılır (Avşar, 2008).

### 1.2.2. Heterojen katalizörler

Eğer bir katalizör, reaktantlarla ayrı bir fazda bulunuyorsa heterojen katalizör olarak adlandırılır (URL-4). Reaksiyon ortamında katalizör desteklerinin kullanılması, özel bir yüzey alanı ve gözeneklilik sağlayarak, aktif grupların büyük trigliserid molekülleriyle reaksiyona girmesine olanak sağlar ve kütle aktarım kısıtlamasını engeller (Akbin, 2012). Destek maddelerinin ise kendi başlarına katalizleme özellikleri yoktur, fakat katalizörün etkinliğini artırır (URL-4). Biyodizel üretiminde heterojen katalizörler, tepkime karışımından ayrılarak tekrar kullanılabilirler için üretim maliyeti açısından büyük avantaj sağlar.

ZnO-La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Mg/La, CaO, KOH/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gibi katalizörler, heterojen katalizörlere örnek olarak verilebilir. Heterojen katalizörler asidik, bazik ya da enzimatik (tutuklanmış form) olabilir.

Tablo 1.2. Biyodizel üretiminde alkali ve lipaz katalizli yöntemlerin karşılaştırılması (Özçimen, 2001)

	<b>Alkali katalizli proses</b>	<b>Lipaz katalizli proses</b>
<b>Reaksiyon sıcaklığı</b>	70-80 °C	30-40 °C
<b>Hammaddede serbest yağ asidi</b>	Sabunlaşmış ürünler	Metil ester
<b>Hammaddedeki su Metil ester verimi</b>	Karışması engellemeli Normal	Etkisi yok Yüksek
<b>Gliserolün geri alınması</b>	Zor	Kolay
<b>Metil esterin saflaştırılması</b>	Tekrarlanan yıkamalarla	Yok

Tutuklanmış enzimler, enzimatik biyodizel üretiminde kullanılan heterojen katalizörlerdir. Tutuklama işlemi, enzimin ya da mikroorganizmanın katalitik aktivitesini kaybetmeden taşıyıcı bir malzeme üzerine (çeşitli reçineler, gözenekli ya

da gözeneksiz polimerik matriksler, inorganik matriksler ve jeller vb.) çeşitli yöntemlerle bağlanması ya da hapsedilmesidir.

Tutuklanmış lipazların biyodizel üretiminde kullanılmasıyla, kararlılık, tekrar kullanılabilme, sürekli işletme imkanı, reaksiyonun daha iyi kontrolü, yüksek saflık ve yüksek ürün dönüşümü sağlanmaktadır.

Kimyasal transesterleşmeyle karşılaştırıldığında enzimatik katalizin çok sayıda avantajı vardır. Bunlar, oluşan ürünün saflığı ve ayırım kolaylığı, atık oluşumunun azalması, yan ürün oluşmaması, lipaz katalizörünün tekrar kullanılabilirliği, ılımlı reaksiyon koşulları ve serbest yağ asidi oluşumuna hassas olmaması olarak sıralanabilir (Akın ve diğ., 2008). Alkali ve lipaz katalizörlü yöntemlerin karşılaştırması Tablo 1.2’de görülmektedir.

### **1.2.3. Lipaz katalizörler**

Son yıllarda biyodizel üretiminde kullanılacak enzimler arasında , doğal substratı yağlar olan lipazlar, yaygın bir şekilde araştırılmaktadır. Lipazlar, altı enzim sınıfının üçüncü sırasında yer alan hidrolazlar sınıfının triaçil gliserol hidrolazları (E.C.3.1.1.3) gurubunda yer alır. Doğada lipazlar, canlı organizmalardaki lipidlerin tersinir olarak hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Suda çözünmeyen lipidin bulunduğu organik faz ile enzimin bulunduğu sulu fazın ara yüzeylerinde ester bağlarını hidroliz ederler. Yüzey aktif madde olan safra tuzları, lipidleri emülsiyon halinde tutarak hidrolizi kolaylaştırır (URL-5).

Lipazlar, *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizopus arrhizus* gibi bakteri hücrelerinden elde edildiği gibi, *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Saccharomycopsis lipolytica*, *Geotrichum candidum* ve *Trishosporon fermentas* gibi maya hücrelerinden de elde edilebilirler (Yağız, 2006).

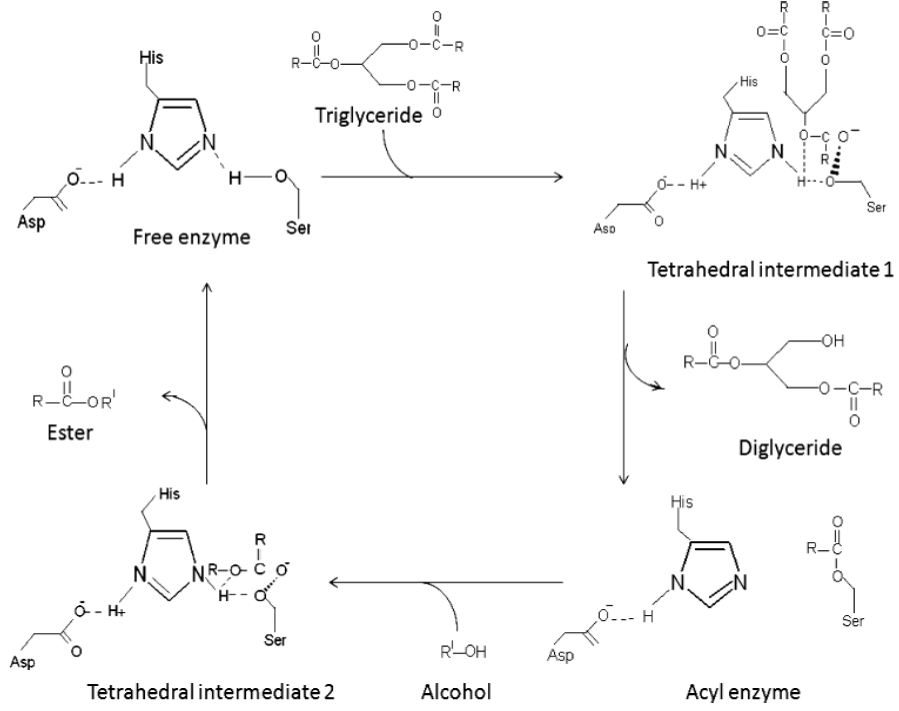
Bazı lipazlar, yağ asitleri ile gliserid arasındaki bağları rasgele parçalar; gliserid molekülünün yerleşimi önemli değildir. *Candida rugosa*, *Corynebacterium acnes*, *Chromobacterium spp.* ve *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar bunlara örnek olarak verilebilir. Pozisyon seçiciliği olan lipazlar ise, sadece sn-1,3 pozisyonundaki yani dıştaki ester bağlarını parçalar. Bu gruba örnek

olarak *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus* ve *Rhizopus delemar* gibi organizmalardan elde edilen lipazlar verilebilir. Bazı lipazlar ise, yağ asidinin zincir uzunluğuna göre seçicidir. Mesela, *Penicillium cyclopium* lipazı, uzun zincirli yağ asitlerini parçalarken, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus delemar* lipazları ise, kısa zincirli yağ asitlerine seçicilik gösterir (Kutluk, 2013).

Lipazlar mikrobiyal, hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilebilirler. Lipazların biyodizel üretiminde endüstriyel boyutta kullanımı henüz çok sınırlıdır. Ancak yapılan çalışmalarda özellikle mikrobiyal lipazların, saflaştırılmış halde ya da doğrudan mikroorganizma halinde (dinlenen hücre), katalitik performansları araştırılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı lipazlar, maya, mantar ve diğer mikroorganizmalardan elde edilirler. Mikroorganizmaların hızlı bir şekilde çoğalmaları, çevresel şartlara bitki ve hayvan hücrelerinden daha dayanıklı olmaları, bol miktarda ekonomik olarak lipaz üretilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca mikroorganizmaların genetik düzenleme ile daha fazla enzim üretmeleri sağlanabilmektedir (Koç, 2011).

Lipazlar, su aktivitesi çok düşük sistemlerde hidroliz reaksiyonun tersi olan esterleşme, transesterleşme ve benzeri reaksiyonları gerçekleştirirler (URL-5). Lipaz ile transesterleşme reaksiyonunda, ilk olarak enzimin aktif kısmında bulunan serin kalıntılarıyla trigliserid arasında kovalent bağ kurulur ve enzim substrat kompleksi oluşur. Açıl enzim ve digliserid serbest kalır. Açıl enzim metanolle etkileşerek yağ asidi alkil esteri ve gliserin oluşur (Şekil 1.2). Bu yöntemle enzimatik biyodizel üretimi gerçekleştirilir (Nielsen ve diğ., 2008).

Lipaz katalizli biyodizel üretiminde, reaksiyon ortamı oda sıcaklığı, basıncı ve nötral pH gerektirdiği için, aşırı sıcaklık, basınç ve bunlara bağlı korozyon söz konusu değildir. Bu nedenle proses tasarımları ya da donanımları, daha basit ve ucuz malzemedan yapılabilir. Bu durum, insan ve donanım açısından daha emniyetli ve aynı zamanda ekonomik biyodizel üretimini mümkün kılmaktadır (Koç, 2011). Ayrıca, trigliseridlerin yanında serbest yağ asidi esterleşmesini de katalizleyebilmesi, düşük ürün inhibisyonu, kısa reaksiyon süresi, enzimin kolay üretilirliği ve tekrar kullanılabilirliği bu yöntemin diğer avantajlarıdır.



Şekil 1.2. Lipaz transesterleşme mekanizması (Fjerbaek ve diğ., 2009)

### 1.3. Enzim Tutuklama Yöntemleri

Tutuklama işlemi, enzimin ya da mikroorganizmanın katalitik aktiviteleri korunarak, taşıyıcı bir malzeme üzerine çeşitli yöntemlerle bağlanması ya da bir matirise hapsedilmesidir (Nielsen ve diğ., 2008). Enzimlerin tutuklanması ile sağlanan avantajlar şunlardır:

- Tekrar tekrar kullanılabilir.
- Enzimin çevre şartlarına (pH, sıcaklık, organik reaktifler vb.) karşı dayanıklılığı artar.
- Ürünler saf olarak elde edilebilir.
- Sürekli proseslere uygulanabilirler.
- Enzimler reaksiyon ortamından basit yöntemlerle ayrılabilir.
- Üretim maliyeti düşer.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutularak ürün inhibisyonu önlenebilir.
- Serbest enzime göre daha kararlı hale gelirler.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilirler.
- Birbirini takip eden çok adımlı reaksiyonlar için uygulanabilir.



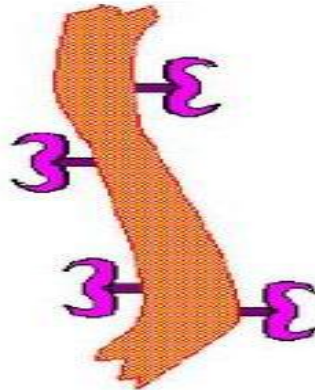
Enzimler doğal (alumina, kil, slika jel, selüloz, perlit gibi) ve sentetik (naylon, stiren gibi) destek maddelerine tutuklanabilirler (Yücel, 2008). Destek seçiminde endüstriyel üretim için en önemli etkenler desteğin mekanik ve kimyasal dayanıklılığı, mikrobiyal direnci, kimyasal yapısı(hidrofobik/ hidrofilik yapı), yüklenme kapasitesi ve maliyetidir ( Akbin, 2012).

Tutuklamaya etki eden faktörler, kullanılan tutuklama yöntemine göre farklılık gösterir. Genel olarak kullanılan tampon türü, derişimi ve pH'ı, tutuklama sıcaklığı ve süresi, destek miktarı, enzim türü ve miktarı, çöktürücü ve çapraz bağlama ajanı türü ve derişimleri sayılabilir. Enzim tutuklama için kullanılan yöntemler fiziksel ve kimyasal metotlar olmak üzere ikiye ayrılır.

### 1.3.1. Adsorpsiyon

Enzimlerin suda çözünmeye bir destek üzerine adsorpsiyonu ile gerçekleşen tutuklama yöntemidir. Fiziksel adsorpsiyonda tutuklamadan sorumlu kuvvetler hidrojen bağları, van der waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir (Şekil 1.3).

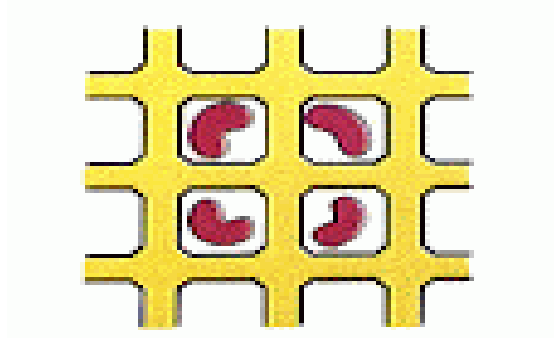
Adsorpsiyon, kimyasal bağlama yöntemlerine göre, enzim proteinine daha az zarar vermektedir (Yücel, 2008). Ancak enzim ve taşıyıcı arasında oluşan kuvvetler zayıf olduğundan, adsorbe olmuş enzim destek üzerinden sıyrılabilir. Bir diğer dezavantaj ise, diğer proteinlerin ve maddelerin de destek üzerine adsorblanabilmesidir (Bilge, 2010; Kuluk 2013).



Şekil 1.3. Taşıyıcı yüzeye bağlı enzimlerin şematik gösterimi (Bilge, 2010)

### 1.3.2. Hapsetme

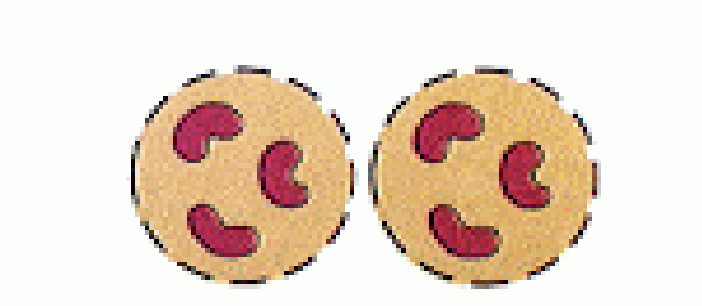
Hapsetme ile tutuklama, enzimlerin katı destek maddesinin gözenekleri arasına hapsedilmesi temeline dayanır (Şekil 1.4). Yöntemde enzimi, sulu monomer ya da polimer çözeltisinde çözülür. Polimer oluşumu sonucu, enzim polimerin içinde hapsedilir (Yücel, 2008). Substrat ve ürün kafesin içine girip çıkabilirken, enzimler çıkamaz. Bu yöntemle tutuklanan enzim, fiziksel adsorpsiyon ile tutuklanmış enzimden daha kararlıdır (Yücel, 2008; Kutluk, 2013).



Şekil 1.4. Hapsetme yöntemiyle tutuklanmış enzimlerin şematik gösterimi (URL-6)

### 1.3.3. Kapsülleme

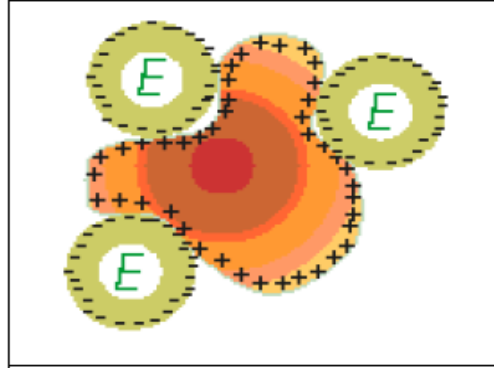
Kapsülleme ile tutuklama yöntemi, enzimlerin yarı geçirgen membranlar içinde hapsedilmesini içerir (Şekil 1.5). Yarı geçirgen membran, büyük protein ya da enzimlerin kapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürünlerin serbestçe girip çıkmasına izin verir (Yadav ve Jadhav, 2005; Yücel, 2008).



Şekil 1.5. Kapsülleme yöntemiyle tutuklanmış enzimlerin şematik gösterimi (URL-6)

#### 1.3.4. İyonik bağlama

Tutuklama, iyon değiştirici kalıntılar içeren suda çözünmeyen destek maddesine enzim iyonik bağlanmasıyla gerçekleşir. Şekil 1.6’da iyonik bağlama ile tutuklama yöntemi gösterilmiştir.

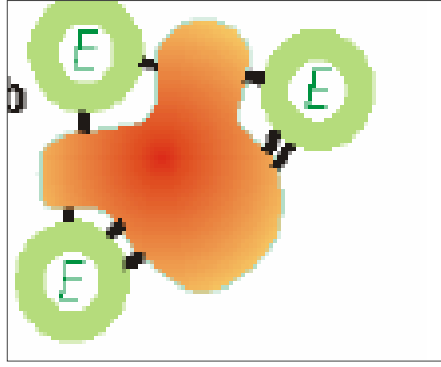


Şekil 1.6. İyonik bağlama yöntemiyle tutuklanmış enzimlerin Şematik gösterimi (Yücel, 2008)

İyon değiştirici kalıntılar içeren polisakkaritler ve sentetik polimerler, bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadırlar. İyonik bağlama yöntemi, enzimin aktif merkezinde ve konformasyonunda önemli değişiklikler oluşturmadığından enzimin tutuklanması yüksek verimle gerçekleştirilebilmektedir (Yücel, 2008). Ayrıca enzimin taşıyıcı yüzey üzerine bağlanması, kovalent bağlamada olduğu gibi ortam koşullarına çok bağlı olmadığında enzim aktivitesi yüksektir. İyonik bağlamada enzim ve destek arasında oluşan bağlayıcı kuvvetler, kovalent bağlamada olduğu kadar kuvvetli değildir. Yüksek iyonik kuvvete sahip substrat çözeltilerinde ve pH değişimlerinde, enzim taşıyıcı yüzey üzerinden sıyrılabilir (Bilge, 2010; Kutluk, 2013).

#### 1.3.5. Kovalent bağlama

Destek maddesiyle enzim arasında kovalent bağ oluşumuna dayanan bu yöntem tutuklama yöntemleri arasında en dayanıklı olanıdır. Yöntemde ilk olarak destek maddesinin yüzeyi aktifleştirilir ve daha sonra enzimin aktifleşen destek maddesine kovalent olarak bağlanması sağlanır (Yücel, 2008; Karimi ve diğ., 2011). Şekil 1.7’de kovalent bağlama ile tutuklama yöntemi gösterilmiştir



Şekil 1.7. Kovalent bağlama yöntemiyle tutuklanmış enzimlerin şematik gösterimi (Yücel, 2008)

Bu bağlanma için kullanılan fonksiyonel gruplar; amino, karboksil, sülfidril, hidroksil, imidazol, fenolik, tiyol, treonin ve indol gruplarıdır. Kovalent bağlanma yöntemleri Tablo 1.3'te verilmiştir.

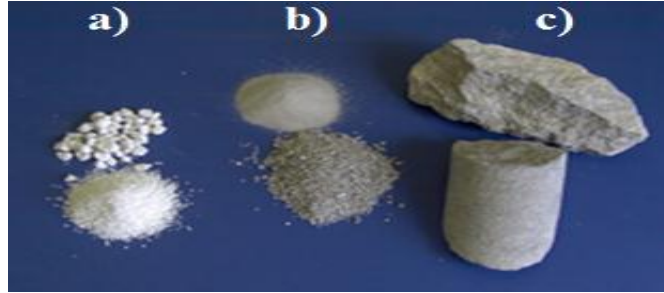
Tablo 1.3. Kovalent bağlanma yöntemleri (Yücel, 2008)

Kovalent Bağlanma Yöntemi	Destek maddesine bağlanma
<b>Diazotlama Reaksiyonu</b>	DESTEK – N = N – Enzim
<b>Amid Bağı Oluşumu</b>	DESTEK – CO – NH – Enzim
<b>Alkilleme Reaksiyonu</b>	DESTEK – CH <sub>2</sub> – NH – Enzim
<b>Schiff Bazı Oluşumu</b>	DESTEK – CH = N – Enzim
<b>Amidinasyon Reaksiyonu</b>	DESTEK – CNH – NH – Enzim
<b>Tiyol-Disülfür Değişimi</b>	DESTEK – S – S – Enzim
<b>Bifonksiyonel Kimyasallarla Desteğe Bağlanma</b>	DESTEK – O(CH <sub>2</sub> )N = CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH = N – Enzim

Kovalent bağlama, enzimlerin kararlı olmasını sağlar ve bağ güçlü olduğundan enzimin çözeltiye geçmesini engeller (Yücel, 2008). Fakat enzimin konformasyonunu değiştirebileceği gibi, enzimin aktif bölgesini de etkileyerek aktivite kaybına neden olabilir. Ayrıca kovalent bağlanma, diğer tutuklama yöntemlerine göre daha pahalı ve karmaşıktır (Akbin, 2012).

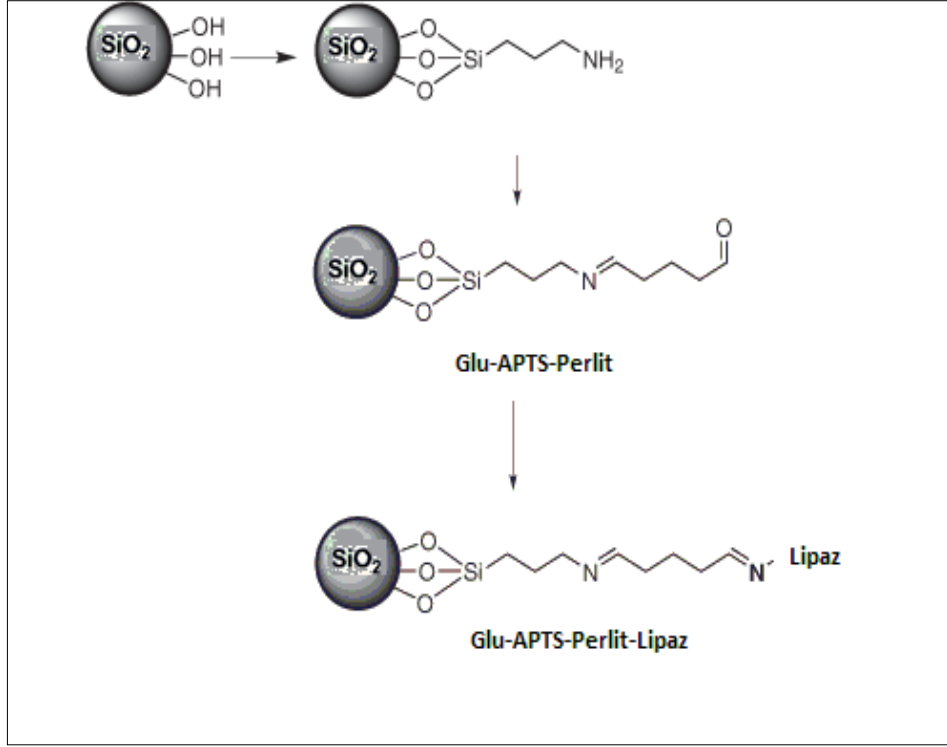
### 1.3.5.1. Lipazın perlit desteğe kovalent bağlanması

Perlit; inci parlaklığında, amorf, açık gri renkli, küçük, yuvarlak camsı taneciklerden oluşmuş ve bu tanecikler içinde % 2-6 oranında su bulunan inorganik volkanik bir kayadır. Perlitler, yapısında %70 oranında silika bulunan alüminyum silikatlardır (Torabi ve diğ., 2007). Genleşmemiş perlit öğütülüp, özel fırınlarda yumuşama noktasına kadar (760°C-1100°C) hızlı bir şekilde ısıtılırsa bu tanecikler, içlerindeki suyun buharlaşması sonucu, ilk hacminin 10 ile 20 katı kadar genişleyebilir. Genleşme sonrasında çok sayıda küçük yumuşamış, beyaz renkte, camsı parçacıklar oluşur (Tekin, 2004). Şekil 1.8’de genişlemiş ve genişmemiş perlitin görüntüsü verilmiştir. Perlit gözenekli, hafif, kimyasal olarak inert, termal ve mekanik stabilitesinin iyi, organik çözücülere karşı dayanıklı olup, toksik değildir ve ucuzdur (Kutluk, 2013; Torabi ve diğ., 2007; Karimi ve diğ., 2011). Bu teknik özellikleri nedeniyle perlit, enzim tutuklama desteği olarak kullanım açısından araştırmacıların ilgisini çekmektedir.



Şekil 1.8. Genleşmiş ve genişmemiş perlit (URL-6)

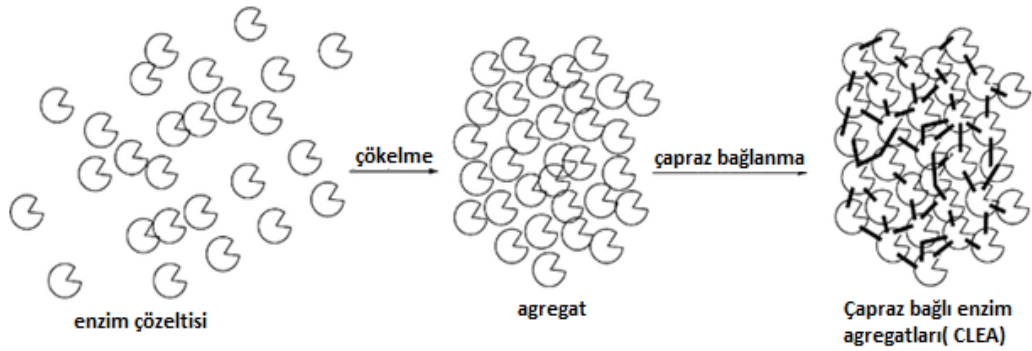
Silika jellerin yüzey özelliklerini modifiye etmenin en basit yollarından biri, yüzeyini kısmen ya da tamamen dehidroksilasyonlamaktır (Tekin, 2004). Buradan yola çıkarak %70 oranında silika içeren perlitte enzim tutuklama işleminde, organik silanlama tekniği kullanılarak ilk adımda bir alkil amin (3-aminopropil trietoksi silan, 3-APTS) ile perlit yüzeyindeki silanol grupları (Si-OH) kovalent olarak bağlanır. İkinci adımda glutaraldehitteki -CHO gruplarının biri alkil amin grubuna bağlanır. Bu şekilde glutaraldehitte, enzim moleküllerinin -NH<sub>2</sub> gruplarıyla bağlanabileceği bir tane serbest -CHO grubu kalır (Karimi ve diğ., 2011). Daha sonra lipazın perlitte kovalent olarak bağlandığı tutuklama reaksiyonu gerçekleştirilir. Şekil 1.9’da perlitin yüzeyinin aktifleştirilme ve lipazın kovalent bağlanma basamakları görülmektedir.



Şekil 1.9. Perlit yüzeyinin aktifleştirilmesi ve lipazın perlite tutuklanması

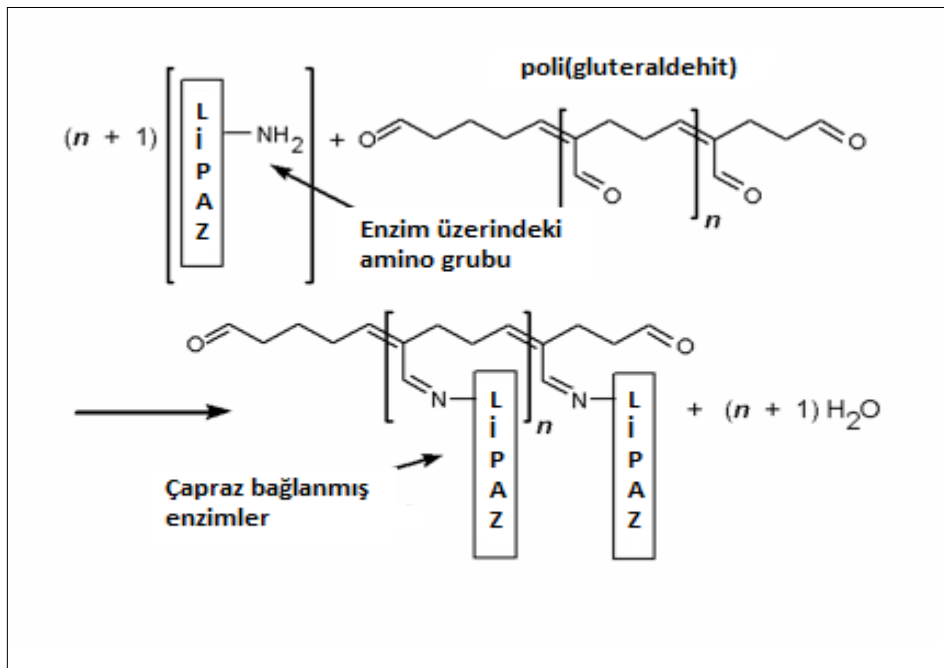
### 1.3.6. Çapraz bağlama

Çapraz bağlama ile yapılan enzim tutuklama yöntemi, küçük molekül yapılı, glutaraldehit ya da heksametilen diizosiyanat gibi iki ya da çok fonksiyonlu reaktiflerin, enzim molekülleri arasında kovalent bağlar oluşturması sonucu, çözünür enzim moleküllerinin çözünmez agregatlar (topaklar) haline dönüşmesine dayanmaktadır (Hürren ve Tüker, 2012; Kumari ve diğ., 2007). Şekil 1.10'da çapraz bağlama yöntemi görülmektedir.



Şekil 1.10. Çapraz bağlı enzim agregatlarının oluşması (Hanefeld ve diğ., 2009)

Çapraz bağlama reaktifi olarak, genellikle glutaraldehit kullanılmaktadır. Glutaraldehit enzim yüzeyindeki amino gruplarıyla taşıyıcı arasında reaksiyon veren bifonksiyonel reaktif bir ajandır. (Gupta, 2009). Şekil 1.11’de lipaz üzerindeki amino grupları ile glutaraldehit üzerindeki -CHO grupları arasında meydana gelen çapraz bağlanma görülmektedir. Kovalent bağlanma yönteminde enzimlerin güçlü bağlanmaları nedeniyle desorpsiyonları çok azdır (Yücel, 2008). Çapraz bağlama sonucu stabilitesi ve aktivitesi yüksek enzim agregatları elde edilmiş olur (Gupta, 2009).



Şekil 1.11. Lipazların glutaraldehit ile çapraz bağlanması (Kiernan, 2000)

Çapraz bağlama işleminde önce proteinlerin çöktürülmesi gerekmektedir. Çöktürme işlemi ortama tuz ya da organik çözücü eklenerek yapılabilir. İyonik şiddeti artırarak çöktürme yöntemi, nötral tuzların ortama eklenmesiyle gerçekleştirilir. Aktivite kaybını azaltmak için  $4^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilir ve tuz olarak genellikle amonyum sülfat kullanılır.

Organik çözücülerle çöktürme yöntemi, aseton, etanol, PEG gibi su ile karışabilen çözücülerin eklenmesiyle gerçekleştirilir. Organik çözücünün eklenmesi, çözeltinin dielektrik sabitini ve dolayısıyla çözme kuvvetini düşürmektedir. Böylece proteinin çözünürlüğü azaltılmış olur ve elektrostatik çekimler etkisi ile agregasyon meydana gelir. Denatürasyonu minimuma indirmek için organik çözücülerle çöktürme işlemi

0°C’de ya da altındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilmelidir. Daha yüksek sıcaklıklarda protein konformasyonu hızlı bir şekilde değişecektir. Bu da organik çözücü moleküllerinin proteinin iç kısmına erişmesine olanak sağlayacaktır. Organik çözücülerin sulu çözeltilerle karışımlarının donma noktasının 0°C’nin altında olması, çöktürme işleminin uygulanabilirliğini artırmaktadır (URL-8).

#### **1.4. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Yağlar**

##### **1.4.1. Birinci nesil yağlar**

Kanola, soyayağı, palm yağı ve ayçiçek yağı birinci nesil biyodizel yağları olarak bilinmektedir. Çünkü biyodizel üretiminde kullanılan ilk yağlardır. Bu yağların %95 oranında yenilebilir yağ olması, küresel gıda pazarı üzerine negatif etkilere yol açmıştır. Bu tür gıda ürünlerinden üretilen yağların büyük ölçekli biyodizel üretimlerinde kullanılmaları, küresel gıda pazarında dengesizliklere yol açarak, dünyanın ‘gıdaya karşı yakıt’ kriziyle karşı karşıya kalmasına neden olabilir. Ayrıca dünyanın ihtiyacı olan biyodizeli karşılamaya yetecek kadar birinci nesil biyodizel ürünlerini yetiştirmek için çok geniş alanlar gerekmektedir. Ekinler için bu kadar geniş alanların gereksinimi, orman kesimlerine kadar gidecek olan çevresel sorunlara ve ekolojik dengesizliklere neden olabilir (Ahmad ve diğ., 2011).

##### **1.4.2. İkinci nesil yağlar**

Yenilebilir yağlara olan bağımlılığı azaltmak için, gıda dışı hammaddeler, alternatif biyodizel kaynağı olarak kullanılmaktadır. Jatropha, mahua, jojoba yağı, tütün tohumu, somon balığı yağı, deniz mangosu gibi yenilemeyen ürünler ikinci nesil biyodizel hammaddelerinden bazılarıdır. Ayrıca atık yemeklik yağlar, restoran gresleri (Ahmad ve diğ., 2011) ve hayvansal yağlar (domuz yağı, iç yağı, tavuk yağı), asit yağları (kimyasal yağ rafinerizasyonunda sabun ayırıcısından elde edilen yağ/yağ asitleri), yağ asidi distilatları (koku giderici, yağ asidi sıyırıcıdan elde edilen yağlar) gibi yağlar da ikinci nesil biyodizel hammaddeleri olarak sayılabilir (Nielsen ve diğ., 2009). Yenilemeyen yağ ürünlerinin biyodizel üretiminde kullanımı, geçen birkaç yıl içinde önemli artış göstermiştir. Tablo 1.4’te ham ve atık yağlarla ilgili biyodizel üretimiyle ilgili yapılmış çeşitli çalışmaların sonuçları verilmiştir. İkinci nesil yağların avantajları şunlardır:



- İçerdikleri toksik maddeler nedeniyle, insan beslenmesinde kullanılamamaları gıda-yakıt yarışının önüne geçmektedir.
- Birinci nesil biyodizel yağlarına göre daha çevrecidirler.
- Daha az tarım arazisi gerektirirler. Yenilemeyen yağ ürünleri, gıda ürünleri yetiştirmeye uygun olmayan boş arazilerde yetiştirilebilirler (Leung,2010).
- Hayvansal yağların metil esterlerinin, yüksek setan sayısı, aşındırıcı olmayan özellikleri, temiz ve yenilenebilir özellikleri birinci nesil yağlara göre üstündür (Guru ve diğ., 2009).

Tablo 1.4. Bitkisel yağ kalitelerinin enzimatik biyodizel üretimine etkisi (Fjerbaek ve diğ., 2009)

Trigliserit substratı	Lipaz ve alkol	Şartlar ve incelemeler	Referans
Soya yağı deodorizer distilatı (%28 SYA)	Novozym 435, metanol	Enzimin metanole yüksek tolerans göstermesi ve yüksek reaksiyon hızları sağlanmıştır. SYDD kullanımıyla rafine edilmiş soya yağına göre metanole karşı yüksek tolerans ve yüksek reaksiyon hızları sağlanmıştır. SYA içeriğinin artışına karşılık metanol inhibisyonunda doğrusal bir azalma gözlenmiştir.	Du ve diğ. (2007)
Asit yağı (%77,9 SYA)	Novozym 435, metanol	Düşük asit yağlarına göre 8:1 gibi daha yüksek metanol:yağ molar oranlarında optimum şartlar sağlanmıştır.	Watanabe ve diğ. (2006)
Oleik asit	Novozym 435, etanol	Trigliserid substratlarıyla karşılaştırıldığında daha yüksek reaksiyon hızları elde edilmiştir. Alkol asit molar oranının 0,5:1'den 10:1 e kadar yükseltilmesiyle verimin artışı gözlenmiştir.	Trubiano ve diğ. (2007)
Soya yağı ve zeytin yağı	Lipozyme, laurik asit	Yenilebilir soya yağı kullanıldığında yüksek derecede artırılmış zeytin yağına göre asidoliziz aktivitesindeki azalmanın daha hızlı olduğu görülmüştür.	Posorske ve diğ. (1988)
Pirinç kepeği yağı (rafine edilmiş ve rafine edilmemiş)	Novozym 435, metanol	Yağ kalitesi azaldıkça reaksiyon süresi artmış ve verim azalmıştır. Metanolizden önce yağa kütlece %2 soyayağı fosfolipidi eklediğinde ester veriminin %10 azaldığı, kütlece %2 pirinç kepeği yağı eklendiği durumda bir değişiklik olmadığı görülmüştür.	Lai ve diğ. (2005)
Soya yağı (rafine edilmiş ve edilmemiş)	Novozym 435, metanol	Soya yağına fosfolipid eklendiğinde ve rafine edilmemiş ham soya yağı kullanıldığında rafine soya yağına göre verimde azalma gözlenmiştir.	Wei ve diğ. (2004)

Bu özelliklerine rağmen ikinci nesil yağlar, taşımacılık için gereken yakıt ihtiyacını karşılayacak kadar verimli değildir. Bitkisel ve hayvansal yağların diğer bir dezavantajı ise düşük sıcaklık performanslarıdır. Hayvansal yağlar ise, bitkisel yağlardan daha fazla miktarda doymuş yağ asidi içermektedirler. Doymuş yağlar, transesterleşme işlemini zorlaştırmakta ve üretim prosesinde problemlere yol açmaktadır.

### **1.4.3. Üçüncü nesil yağlar**

Ticari ölçekli biyodizel üretimi önündeki en büyük engel, biyodizel üretiminde kullanılan bitkisel yağların maliyetinin yüksek olmasıdır. Diğer bir problem ise, birinci ve ikinci nesil yağların yetersizliğidir. Bunun aksine mikroalglerden elde edilen üçüncü nesil yağların, geleneksel ekinlere göre fotosentetik etkinliklerinin ve verimliliklerinin yüksek olması, ayrıca hızlı çoğalmaları, biyodizel üretimi için en çok gelecek vadeden yağ kaynağı haline gelmelerine neden olmuştur. Mikroalgler, yüksek miktarda yağ içermeleri nedeniyle palm gibi geleneksel biyodizel hammaddelerine oranla %25 daha fazla yağ verimine sahiptir. Biyodizel kaynağı olarak kullanılmak üzere yapılan mikroalg tarımcılığının avantajları şunlardır:

- Mikroalg taşıma ve hasatına ilişkin maliyetler oldukça düşüktür. Bununla birlikte insan gıda kaynağı zincirini direkt olarak etkilememektedir.
- Mikroalg yetiştirmek için yağ bitkilerini yetiştirmede kullanılan büyük tarım arazilerine gerek yoktur.
- Mikroalgler, diğer yağlı tohumların yetişmesine uygun olmayan temiz, az tuzlu/tuzlu su ya da ekime uygun olamayan araziler gibi birçok alanda, açık havuzlarda ya da biyoreaktörlerde yetiştirilebilirler. Seçici olmayan bu yetiştirilme yöntemleriyle, mikroalgler hektar alan başına üstün bir verimle üretilebilirler.
- Genel olarak mikroalgler, kuru kütlelerinin %20-50'si arasında yağ üretebilirler. Özel şartlarda daha yüksek yağ miktarlarına ulaşılması mümkündür.
- Mikroalgler, fotosentetik mikroorganizmalar olmaları nedeniyle güneş enerjisini kullanarak organik bileşenleri üretmeleri sağlanabilmektedir.

- Mikroalgler, küresel bir problem olan atmosferde birikmiş olan CO<sub>2</sub>'yi tutarak CO<sub>2</sub> seviyesinin düşmesini kolaylaştırırlar (1 kg kuru algal biyokütle üretmek için 1,8 kg karbondioksit gereklidir).

Mikroalg lipidlerinin yüksek derecedeki doymuşlukları ve mikroalgal hücre içindeki birikimlerinin büyümenin farklı evrelerinde (suşa bağlı olarak) olması, algal yağları potansiyel dizel yakıtı haline getirmektedir (Ahmad ve diğ., 2011).

## **1.5. Mikroalgler**

Mikroalgler, tek hücreli basit ya da çok hücreli karmaşık yapıları sayesinde, ağır şartlarda yaşayabilen ve hızlı bir şekilde çoğalabilen fotosentetik mikroorganizmalardır. Örneğin, siyanobakteriler (mavi yeşil algler) prokaryotik, yeşil algler ve diatomlar ökaryotik mikroorganizmalardır.

Biyosferde her yere yayılmışlardır ve tatlı sulardan, çok tuzlu ortama kadar birçok sucul ortamda kültürlenebilirler. 50000' den fazla türün var olduğu tahmin edilmekle birlikte, 30000 kadar tür üzerinde çalışmalar ve incelemeler yapılmaktadır.

Mikroalgler, enerji ürünü olarak üretilme potansiyelleri çok yüksektir. Tarıma uygun iklim koşullarında yetiştirilebilirler ve ticari öneme sahip yağlar, şekerler, biyoaktif bileşikler gibi birçok yan ürünü üretebilirler. Gelecekteki yenilenebilir enerji senaryolarında önemli bir yere sahiptirler (URL-9).

### **1.5.1. Mikroalglerin üretimi**

Mikroalgler, havuz, göl gibi açık sistemlerde ya da çok iyi kontrollü kapalı sistemlerde üretilirler. Bazı mikroalgler, koşulların çok spesifik olduğu durumlarda (yüksek tuz ya da alkali) açık üretim için çok uygundur. Bu sistemlerin avantajı, düşük yatırım ve üretim maliyetine sahip olmaları ve kolay düzenlenebilmeleridir. Diğer taraftan fotobiyoreaktörler, kapalı sistem olarak kullanılabilir. Kapalı sistemler çok ciddi yatırım ve işletme maliyeti gerektirirler, ancak tüm değişken koşullardan bağımsız olup, yüksek performans ve kalite için çok kontrollü bir şekilde üretim yapılabilir. Heterotrofik üretim için ise, konvansiyonel fermentörler kullanılabilir (Mata ve diğ., 2010; Şahin ve Akyurt,

2010). Şekil 1.12’te mikrolag üretiminin yapıldığı açık havuz ve fotobiyoreaktör görülmektedir.



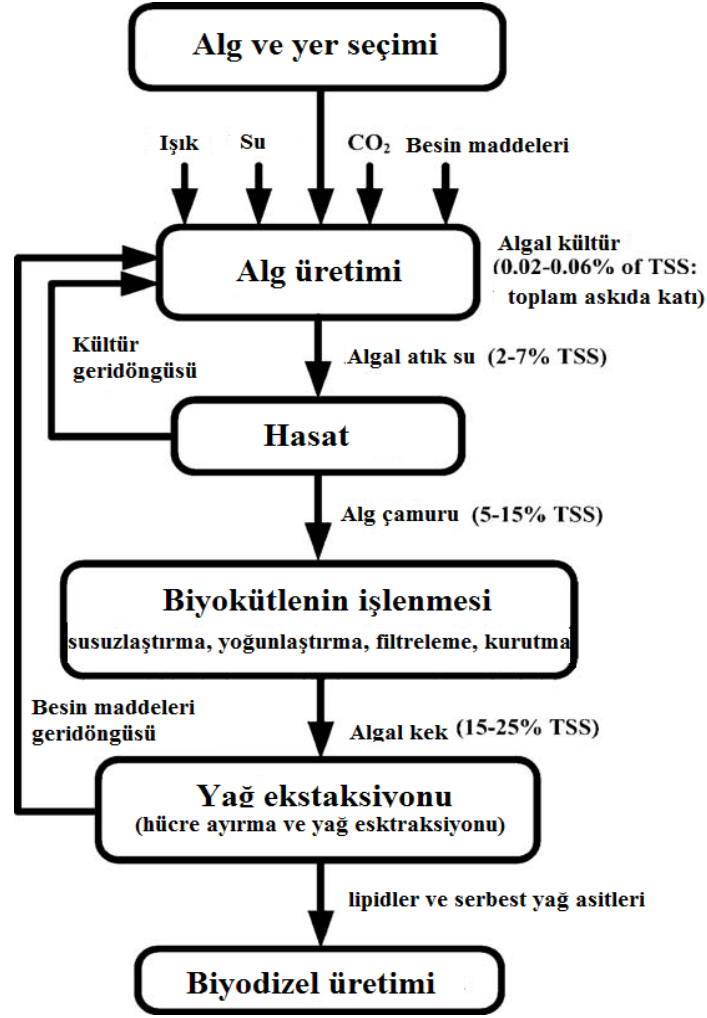
Şekil 1.12. Mikrolag üretiminde a)Kanal tipi havuzlar, b) fotobiyoreaktörler (Şahin ve Akyurt, 2010)

### 1.5.2. Mikroalglerden yağ eldesi

Şekil 1.13’te mikroalglerden yağ eldesi şematik olarak görülmektedir. Birinci basamak, özel kültür şartları ve ürünler için uygun özelliklere sahip alg türünün seçimidir. Işık, sıcaklık, pH, hava (karbondioksit) ve besin derişimi gibi kültür şartları kontrol altında tutulmalıdır. Mikroalgler, mikro basınçlı elekler, sedimentasyon, santrifüj, flokülasyon ya da membran filtrasyonu gibi ayırma prosesleriyle fermentasyon ortamından hasat edilebilir. Toplanan biyokütle, vakum altında su miktarı sabit bir değere gelene kadar kurutulur. Kurutulan biyokütle yağ ekstraksiyonundan önce havan ile ezilir. Yağın mikroalglerden ekstraksiyonu için iyi bilinen üç yöntem vardır:

- Presleme
- Çözücü ekstraksiyonu
- Süperkritik akışkan ekstraksiyonu

En yaygın ekstraksiyon yöntemi, hekzanın çözücü olarak kullanıldığı ve 4 saatlik ekstraksiyon süresiyle Soxhlet ekstraksiyonudur (Ahmad ve diğ., 2011).



Şekil 1.13. Mikroalglerden yağ ekstraksiyonu ve biyodizel üretimi (Mata ve diğ., 2010)

### 1.5.3. Mikroalglerin yağ içeriği ve verimliliği

Birçok mikroalg türü, yağların önemli miktarını biriktirmeleri için indüklenebilmektedir. Böylece yüksek yağ verimi sağlanmaktadır. Ortalama yağ içeriği %1-70 arasında olmasına karşın, özel koşullar altında bazı türler kuru kütlelerinin %90'ına varan yağ miktarına ulaşmaktadırlar.

Tablo 1.5'te görüldüğü üzere, mikroalgdeki yağ miktarı, kuru kütlelerinin %75i ulaşabilmekte, fakat düşük verimlilik göstermektedir (örn. *Botryococcus braunii*). En yaygın algler (*Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*) %20 ile %50 arasında yağ içermekte ve bu algler ile daha yüksek verimliliklere ulaşılabilir.

Tablo 1.5. Farklı mikroalg türlerinin yağ içeriği ve verimlilikleri (Mata ve diğ., 2010)

Mikroalg türü	Yağ içeriği (biyokütlenin % kuru kütlesi)	Lipid verimliliği (mg/L/gün)	Biyokütlenin hacimsel verimliliği (mg/L/gün)	Biyokütlenin alan verimliliği (mg/L/gün)
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0–75,0	–	0,02	3,0
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0–63,0	10,3–50,0	0,036–0,041	0,91–0,97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6–57,8	121,4	2,00–7,70	–
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0–22,0	44,7	0,23–1,47	–
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0–58,0	11,2–40,0	0,02–0,20	0,57–0,95
<i>Chlorella sp.</i>	10,0–48,0	42,1	0,02–2,50	1,61–16,47/25
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2,0	–	2,90–3,64	72,5/130
<i>Chlorella</i>	18,0–57,0	18,7	–	3,50–13,90
<i>Dunaliella salina</i>	6,0–25,0	116,0	0,22–0,34	1,6–3,5/20–38
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	–	0,09	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7–71,0	–	0,12	–
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5–67,0	33,5	–	–
<i>Isochrysis sp.</i>	7,1–33,0	37,8	0,08–0,17	–
<i>Nannochloris sp.</i>	20,0–56,0	60,9–76,5	0,17–0,51	–
<i>Nannochloropsis oculata.</i>	22,7–29,7	84,0–142,0	0,37–0,48	–
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12,0–53,0	37,6–90,0	0,17–1,43	1,9–5,3
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0–65,0	90,0–134,0	–	–
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0–57,0	44,8	0,003–1,9	2,4–21
<i>Porphyridium cruentum</i>	9,0–18,8/60,7	34,8	0,36–1,50	25
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0–55,0	–	0,004–0,74	–
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9–18,4	35,1	0,19	–
<i>Tetraselmis suecica</i>	8,5–23,0	27,0–36,4	0,12–0,32	19
<i>Tetraselmis sp.</i>	12,6–14,7	43,4	0,30	–

Mikroalg türlerindeki yağ asitlerinin bileşimleri, üretilen biyodizelin karakteristik özelliklerini belirler. Bunlar 12-22 karbon atomlu doymuş ve doymamış yağ asitlerinin bileşimidir ve bazıları omega 3 ve omega 6 ailesine aittir. Tablo 1.6'da bazı alg türlerinin yağ asidi bileşimleri verilmiştir. (Francisko ve diğ., 2010).

Tablo 1.6. Bazı mikroalglerin yağ asidi bileşimleri (Francisko ve diğ., 2010)

Metil esterler (%)	AMP	CV	DT	PS	PT	SO
<b>Kaprik (C10:0)</b>	1,74	0,54	0,35	0,36	24,59	0,99
<b>Laurik (12:0)</b>	ND	0,27	3,35	2,2	-	0,47
<b>Miristik (C14:0)</b>	ND	1,19	1,47	0,73	-	0,28
<b>Miristoleik (C14:1)</b>	ND	0,94	1,2	16,61	50,97	21,71
<b>Pentadekanoik (C15:0)</b>	23,55	31,81	17,84	1,89	14,9	2,29
<b>Palmitik (C16:0)</b>	1,58	2,22	1,16	1,53	-	1,4
<b>Palmitoleik (C16:1)</b>	1,02	1,36	11,71	12,29	-	5,16
<b>Stearik (C18:0)</b>	2,04	1,06	4,91	12,25	-	19,54
<b>Oleik (C18:1n9c)</b>	ND	7,98	0,18	25,92	-	ND
<b>Linoleaidik(C18:2n6t)</b>	11,54	1,32	27,13	0,006	0,58	13,25
<b>Linoleik (C18:2n6c)</b>	3,13	0,1	0,67	4,53	-	0,01
<b>cis-10-Heptadekenoik (C17:1)</b>	27,34	31,64	4,13	0,52	-	1,17
<b>DYA</b>	44,15	46,27	33,33	29,72	4,82	48,09
<b>TDYA</b>	40,88	49,1	34,94	63,87	51,57	35,67
<b>ÇDYA</b>	14,85	4,48	31,55	6,22	0,58	16,09
<b>Toplam</b>	99,88	99,85	99,82	99,81	99,97	99,85

\* DYAlar, doymuş yağ asitleri; TDYA, teklidoymamış yağ asitleri; ÇDYA çokludoymamış yağ asitleri, AMP, *Aphanothece Microscopia Nageli*; CV, *Chlorella vulgaris*; DT, *Dunaliella tertiolecta*; PS, *Phormidium Sp.*; PT, *Phaeodactylum*; SO, *Scenedesmus obliquus*

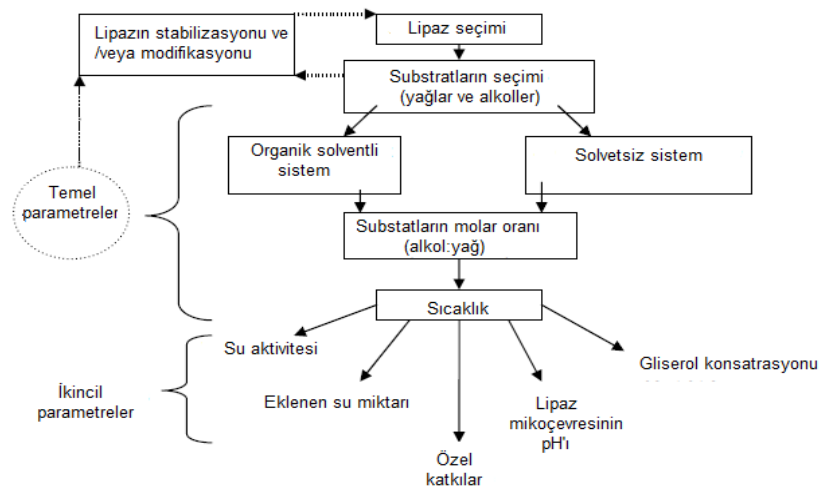
Mikroalg yağ verimi suşa bağlı olduğu halde, tüm suşlar genel olarak yağlı bitki tohumlarına göre daha verimlidir. Tablo 1.7'de görüldüğü üzere bitki tohumlarıyla mikroalgler yağ içeriği bakımında benzer olsa da, toplam biyokütle verimliliği, yağ verimi ve biyodizel verimliliği bakımından mikroalglerin belli bir üstünlüğe sahip olduğu görülmektedir (Mata ve diğ., 2010).

Tablo 1.7. Alg yağı ile diğer yağların karşılaştırılması (Ahmad ve diğ., 2011)

Yağ kaynağı	Yağ içeriği (Biyokütlerdeki kütlece %yağ)	Yağ verimi (L yağ/ha yıl)	Kullanılan arazi (m <sup>2</sup> yıl/kg biyodizel)	Biyodizel verimliliği (L yağ/ha yıl)
Mısır	44	172	66	152
Kenevir	33	363	31	321
Soya fasulyesi	18	636	18	562
Jatropha	28	741	15	656
Keten	42	915	12	809
Kanola	41	974	12	862
Ayçiçeği	40	1070	11	946
Hint yağı	48	1307	9	1156
Palm yağı	36	5366	2	4747
Mikroalg (düşük yağ içerikli)	30	58,700	0,2	51,927
Mikroalg (orta yağ içerikli)	50	97,800	0,1	86,515
Mikroalg (yüksek yağ içerikli)	70	136,900	0,1	121,104

## 1.6. Biyodizel Üretimine Etki Eden Faktörler

Enzimatik biyodizel üretimini etkileyen faktörler Şekil 1.14'te verilmiştir.



Şekil 1.14. Enzimatik biyodizel üretimini etkileyen faktörler (Antczak ve diğ., 2009)

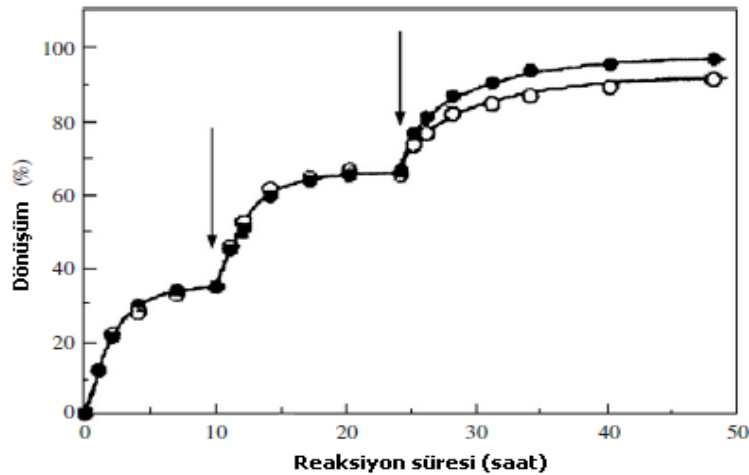


Görüldüğü gibi, enzim kaynağının yanı sıra, su aktivitesi, reaksiyon sıcaklığı, enzimin tutuklanmış ya da serbest olması, alkol seçimi, alkol/yağ mol oranı, reaksiyon süresi, çözücülü ya da çözücüsüz ortam kullanımı biyodizel üretimi için önemli parametrelerdir (Antczak ve diğ., 2009).

### 1.6.1. Alkol türünün etkisi

Biyodizel üretiminde kullanılan alkol cinsi, hem ester değişim tepkimesini hem de elde edilen biyodizel yakıtının özelliklerini etkilediğinden oldukça önemlidir. Çünkü üretilen biyodizelin yapısında, tepkimede kullanılan alkolün bağları vardır. Literatürde metanol, etanol, 1- ve 2-propanolün kullanımına ait çalışmalara rastlamak mümkündür.

Günümüzde ticari biyodizel olan YAME metanolla üretilmektedir. Metanol, ucuz ve kolay bulunabilir olması nedeniyle de en çok tercih edilen alkoldür. Ayrıca metanolün yağ içerisindeki çözünürlüğü istenilen değere yaklaşıktır. Fakat metanolün enzimler üzerindeki şiddetli inhibisyonu diğer alkollerin kullanıldığı duruma göre daha düşük bir enzim aktivitesine neden olmaktadır. Metanolün *Candida antartica* (Novozym 435) üzerindeki inhibisyon etkisinin, enzimde tersinmez bir aktivite kaybına neden olduğu ve yine alkol inhibisyonunu minimize etmek için, alkolün ortama basamaklı olarak eklenmesi, Shimada ve diğ. (1999) tarafından geliştirilen ve başarılı olmuş bir yöntemdir (Şekil 1.15). Tablo 1.8'de metanolün ortama basamaklı eklendiği çalışmaların sonuçları verilmiştir.



Şekil 1.15. Atık yağın üç basamakta kesikli metanolizi (Marchetti ve diğ., 2007)

Alkollerin lipazlar üzerindeki inhibisyon etkisinin, alkolün molekül ağırlığının artmasıyla azaldığı görülmüştür. Ayrıca kullanılan alkolün hidrokarbon zincir uzunluğu arttıkça tepkime hızı artar.

Tablo 1.8. Basamaklı metanol eklemeli enzimatik transesterleşme tepkimeleri (Jegannathan ve Abang, 2008; Akbin 2012)

Yağ	Alkol	Tutuklama tekniği	Enzim miktarı (kütlece % yağa göre)	Metanol ekleme basamak sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	1.basamak dönüşüm (%)	2.basamak dönüşüm (%)	3.basamak dönüşüm (%)
Atık yağ	MeOH	Adsorpsiyon	4	3	30	48	10. saat 34	24. saat 66	48. saat 90.4
Soya yağı-Kolza yağı karışımı	MeOH	Adsorpsiyon	4	3	30	48	10. saat 34	24. saat 66	48. saat 95.6
Soya yağı	MeOH	Adsorpsiyon	4	3	30	3.5	1. saat 42.4	25. saat 69.8	35. saat 98.7
Soya-kolza yağı karışımı	MeOH	Adsorpsiyon	4	2	30	36	7. saat 32	36.saat 96.5	-
Soya yağı	MeOH	-	4	3	-	-	5. saat 32	25.saat 75	45. saat 90
Domuz yağı	MeOH	Adsorpsiyon	20	3	40	30	3. saat 28	18. saat 60	30. saat 87.4

Bir alkolün endüstride kullanılabilmesi için ucuz ve kolay bulunur olması gerekmektedir. Bu nedenle, daha pahalı alternatifleri ekstra bir avantaj sağlamadığı sürece, metanol, etanol gibi basit alkollerin kullanımı en iyi seçenektir (Nielsen ve diğ., 2008; Yağız ve diğ., 2006; Fjerbaek ve diğ., 2009). Tablo 1.9’da farklı alkollerle yapılan çalışmalar verilmiştir.

Tablo 1.9. Çeşitli alkoller ve lipazlar ile ilgili sonuçlar (Fjerbaek ve diğ., 2009)

Alkol	Lipaz ve yağ	Şartlar ve incelemeler	Referans
<b>Metanol</b> <b>Etanol (%99 ve %96)</b> <b>1 ve 2-propanol</b> <b>1-bütanol</b> <b>izobütanol</b>	Novozym 435 ,ayçiçek yağı	Metanol, %99 luk etanol ve 1-bütanolle dönüşüm, %96lık etanol ile %45,3 dönüşüm	Deng ve diğ. (2005)
<b>Metanol</b> <b>Etanol (%99 ve %96)</b> <b>1 ve 2-propanol</b> <b>1-bütanol</b> <b>izobütanol</b>	Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM, ayçiçeği yağı	2-propanolle en düşük verim sağlanırken, metanol, etanol (%99luk ve %96lık),1-propanol ve 1- ve izobütanolle >%60 verim sağlanmıştır.	Deng ve diğ. (2005)

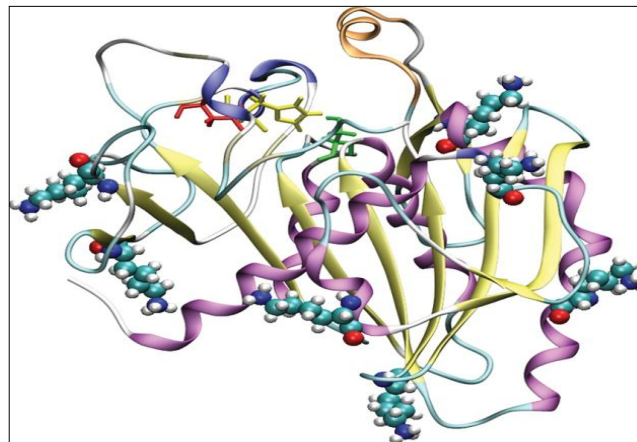
Tablo 1.10 (Devam). Çeşitli alkoller ve lipazlarla ilgili sonuçlar (Fjerbaek ve diğ., 2009)

<b>Etil asetat</b>	Novozym 435, rafine edilmemiş Jatropa curcas, karanj ve ayçiçeği yağı	Etil asetat/yağ molar oranının 11:1, yağdaki enzim oranının kütlece %10 olduğu ve etil asetatın tek basamakta eklendiği, 50°C sıcaklıkta ve reaksiyon süresinin 12 saatte olduğu durumda tüm yağlar için dönüşüm %90. Enzim 12 kullanımda hiç aktivite kaybına uğramamıştır.	Modi ve diğ. (2007)
--------------------	---	--	---------------------

### 1.6.2. Enzim türü ve miktarının etkisi

Lipazın çeşidi ve lipazın serbest ya da tutuklu olması, biyodizel üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir.

Trigliserid lipazlarının yapısı, içinde aktif serin kalıntısı bulunan merkezi L tabaka şeklindedir. Serin üzerinde hidrofobik bir yarık bulunur ya da bu kısım enzim aktif hale geçtikten sonra oluşur. Lipaz enziminin aktif duruma geçmesi için gerekli olan üzerindeki kapağın açılmasıdır. *Thermomyces lanuginosa* aktif bölge yüzeyi üzerinde bir kapağa sahipken, *Pseudomonas* ve *Candida antarctica* lipazı huni tipi bir kapağa sahiptir (Akbin, 2012). Şekil 1.16'da *Thermomyces lanuginosus* lipazının kapalı konformasyondaki üç boyutlu yapısı görülmektedir. Proteinin üst kısmında altın renkteki ikincil yapısı, aktif konumun açılmasını sağlayan kapağı oluşturmaktadır. Katalitik üçlü, serin (yeşil), histerin (sarı), aspartik asitten (kırmızı) oluşur (Cantone, 2012). Lipazların yapılarındaki bu farklılıklar, onların aynı substrata karşı farklı aktivite göstermesine neden olabilir.



Şekil 1.16. *Thermomyces lanuginosus* lipazının kapalı konformasyondaki üç boyutlu yapısı.

Enzimatik transesterleşme tepkimesinde substrat miktarı sabit tutulduğunda, ortama eklenen enzim miktarının artmasıyla ester miktarı artmakta, daha yüksek enzim miktarlarında sabit kalmakta ya da azalmaktadır (Li ve diğ., 2007; Tran ve diğ., 2013). Tablo 1.10’da farklı lipaz enzimleriyle üretilen biyodizel üretim çalışmaları bulunmaktadır.

Tablo 1. 11. Çeşitli lipazlarla biyodizel üretimi (Fjerbaek ve diğ., 2009)

Lipaz	Yağ	Alkol	Verim	Form	Şartlar
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Soya yağı	Metanol	%90	Serbest	35° C, alkol yağ molar oranı 3:1. Metanol 3 adımda ekleme. 90 saat, 150 rpm
<i>Pseudomonas cepacia</i>			>%80		
<i>Candida rugosa</i>			%90		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Soya yağı	Metanol	>%95	Tutuklu	40° C, 200 rpm,30 saat. Alkol yağ molar oranı 3:1. Alkol 3 adımda ekleme. Kütlece %10 enzim
<i>Rhizomucor miehei</i>			>%80		
<i>Thermomyces lanuginosa</i>			>%60		
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Mahua yağı	Etanol	%96 (6 saat) %92 (25 saat)	Tutuklu CLEA	40° C, 200 rpm, yağ alkol molar oranı 4:1. Alkol 4 adımda ekleme. Kütlece %10 enzim. Lipazlar pH-ayarlı.
Domuz pankreatik lipazı	Babassu yağı	Bütanol	%95	Tutuklu	40–50 °C, 150 rpm, alkol yağ molar oranı 10:1. Kütlece %20 enzim
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Jatropha yağı	Etanol	%98	Tutuklu	50° C, 200 rpm, 8saat. Alkol yağ molar oranı 4:1. Enzim kütlece %5 su içermektedir. kütlece %10 enzim
<i>Candida antarctica</i>	İç yağı	Metanol	%74	Tutuklu	30 °C, 200 rpm, 72 saat. Alkol yağ molar oranı 3:1. Metanol 3 adımda eklenmiştir. Kütlece %10 enzim
<i>Pseudomonas cepacia</i> ve <i>Candida antarctica</i> karışımı	Restoran gres yağı	Etanol %95	%96	Tutuklu	35 °C, 200 rpm, 24saat. Alkol yağ molar oranı 4:1. Etanol 3 adımda eklenmiştir. Kütlece %5 enzim. <i>Candida antarctica</i> 1saat sonra eklenmiştir.

### **1.6.3. Su miktarının etkisi**

Suyun lipaz etrafında muhafaza edilmesi enzimin uygun şeklini (konformasyonunu) koruması için önemlidir. Tamamen susuz bir ortamda enzimin protein yapısında tersinir kısmi olarak da tersinmez değişiklikler meydana gelebilir. Substratlar, enzim, çözücü, ve destek maddeleri içeren enzimatik transesterleşme reaksiyon sistemi için gerekli su aktivitesi, lipaz türüne göre farklılık göstermektedir. Bu nedenle hiç suyun bulunmadığı bir sistemde, reaksiyonun gerçekleşmesi mümkün değildir. Su içeriği hacimce %1-20'ye ulaştığında reaksiyon hızlanmaya başlar (Fjerbaek ve diğ., 2009).

Enzimin aktif hale geçmesi, yağ-su ara yüzeyinde lipaz moleküllerinin konformasyon değişiklikleri sonucu aktif bölgenin açığa çıkmasıyla olur. Tepkime ortamına su eklendikçe, yağ-su damlacıkları sayısı artar ve böylece ara yüzey artar (Al-Zuhair, 2006). Fakat ortamda fazla su olması durumunda lipaz, transesterleşme yerine hidroliz tepkimesini gerçekleştirir. Bu nedenle ortamda bulunması gereken su miktarı, hidrolizi en aza indirgeyip, transesterleşme tepkimesi için enzim aktivitesini en yüksek değere taşıyacak miktarda olmalıdır (Noureddini ve diğ., 2005; Akbin, 2012).

### **1.6.4. Çözücü türünün etkisi**

Biyokatalitik reaksiyonlarda genellikle, Log P değeri 2- 4 arasında olan organik çözücüler seçilmektedir (Gupta, 1992). Genellikle, Log P değeri 4'ün üzerinde olan çözücülerin, enzimler üzerinde dönüşümsüz inaktivasyona neden olduğu ve yine Log P değeri 2'nin altında olanların yüksek oranda inaktivasyon etkisi yaptığı görülmüştür. Fakat çözücülerin her enzim üzerine yaptığı etki farklı olduğundan genelleme yapmak doğru değildir (Adlercreutz, 2008).

Organik çözücülerin transesterleşme reaksiyonlarında kullanımının avantajları şunlardır:

- Homojen reaksiyon karışımı sağlar.
- Reaksiyon karışımının viskozitesini azaltarak enzim çevresindeki kütle aktarım problemlerini azaltır.

- Apolar çözücüler, tutuklanmış enzim kullanımında su kalıntılarının enzim etrafında kalmasını sağlayarak su aktivitesini lokal olarak artırır. Böylece enzimlerin daha kararlı olmasına yardımcı olur (Fjerbaek ve diğ., 2009).

Ter-bütanolün, çözücü olarak uygun derişim ve sıcaklıktaki yağ, alkol ve gliserolü çözme özelliğine sahip olduğu görülmüştür. Metanolün çözünür hale gelmesi, enzim stabilitesi üzerinde pozitif etkiye sahiptir. Tutuklanmış enzimlerde taşıyıcı üzerindeki gliserol birikmesi enzimin kullanım sayısını sınırlamaktadır. Çözücü, gliserolün çözünmesini sağlayarak destek üzerinde birikmesini önler (Nielsen ve diğ., 2009).

Çözücü temelli enzimatik biyodizel üretimi, büyük ölçekli endüstriyel üretimler için tam olarak uygun değildir. Çünkü organik çözücüler oldukça uçucudurlar ve proses için potansiyel bir tehlike oluşturmaktadırlar. Ayrıca çözücü eklenmesi nedeniyle, daha büyük reaktörlerelere ihtiyaç duyulacak ve çözücülerin biyodizelden uzaklaştırılması ve geri kazanılması, üretime ek bir maliyet getirecektir. Bu nedenle, gelecekteki endüstriyel enzimatik biyodizel üretimleri için, çözücü kullanılmayan sistemler hedeflenmelidir. Çözücülü ve çözücsüz sistemlerle benzer verimler elde edilse de, çözücsüz üretimlerin çözücü içeren üretime göre daha düşük reaksiyon hızına sahip oldukları görülmüştür. Bu nedenle, endüstriyel uygulama için öncelikle bu tip problemlerin çözülmesi gerekmektedir (Fjerbaek ve diğ., 2009).

#### **1.6.5. Sıcaklığın etkisi**

Enzim reaksiyonlarının hızı sıcaklık arttıkça artar. Fakat belirli bir noktadan sonra reaksiyon hızı düşmeye başlar ve durur. Bir enzimin en iyi çalıştığı sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Yüksek sıcaklıkta (55-60°C üzeri) enzimler denatürasyona uğrayarak etkisiz hale geçerler. Optimum sıcaklığın üstüne çok çıkılması durumunda enzimler protein yapıda oldukları için deaktivasyona uğrayarak koagüle olurlar (Yücel, 2008). Genel olarak tutuklanmış enzimler, sıcaklık artışından daha az etkilenirler. Çünkü enzimin taşıyıcı bir maddeye tutuklanması, enzimin kararlılığını artırırken termal bozulma etkisinin de azalmasını sağlar.

Optimum sıcaklık her enzim için aynı değildir. Bu nedenle, yapılan uzun süreli kesikli deneylerde, bir enzimin farklı sıcaklıklarda aynı verimi ve farklı enzimlerin farklı sıcaklıklarda aynı verimi verebileceği görülmüştür (Fjerbaek ve diğ., 2009).

## 1.7. Alg Yağından Üretilen Biyodizelin Özellikleri

Mikroalglerden üretilen biyodizelin yoğunluk, viskozite, soğuk filtre tıkanma noktası, donma noktası, ısıl değeri gibi özellikleri, petrol temelli biyodizel ile benzerdir (Ahmad ve diğ., 2011). Tablo 1.11’de mikroalg biyodizel (hetetrofik *Chlorella protothecoides* alginden elde edilen yağın asidik transesterleşmesi sonucu üretilen biyodizel), dizel yakıt ve biyodizel standardı karşılaştırılmıştır (Xiong ve diğ., 2008; Xu ve diğ., 2009).

Tablo 1.11. Algal biyodizel, klasik dizel yakıtı ve ASTM biyodizel standartlarının karşılaştırılması (Xu ve diğ., 2009)

Özellikler	Algal biyodizel	Dizel yakıt	ASTM biyodizel standardı
Yoğunluk (kgL <sup>-1</sup> )	0,864	0,838	0,84-090
Viskozite (mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ,cSt 40°C)	5,2	1,9-4,1	3,5-5,0
Parlama Noktası (°C)	115	75	Min 100
Donma noktası (°C)	-12	-50den 10a kadar	-
Soğuk filtre tıkanma noktası (°C)	-11	-3.0 (maks. -6,7)	Yaz maks 0 Kış maks<-15
Asit değeri (mg KOH g <sup>-1</sup> )	0,374	Maks 0,5	Maks 0,5
Isıl değer (MJ kg <sup>-1</sup> )	41	40-45	-
H/C oranı	1,81	1,81	-

Algal biyodizelin içerdiği asit miktarı motorda aşınma yapmayacak kadar düşük miktardadır ve algal biyodizelin parlama noktasının petrol kaynaklı biyodizel göre daha stabil olması depolama, taşıma ve kullanımının yeterince güvenli olduğunu göstermektedir (Xiong ve diğ., 2008). Diğer yandan algal yağlar bitkisel yağlara oranla daha yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi içermekte bu da algal yağ depolamada oksidasyona duyarlı hale getirmekte dolayısıyla da kullanımını kısıtlamaktadır. Bu problem yağın kısmi katalitik hidrojenasyonu ya da antioksidanlar kullanılarak çözülebilir (Adamczak ve Bornscheuer, 2009). Buna karşın ne kadar yüksek düzeyde çoklu doymamış yağ varsa, soğuk filtre tıkanma noktası (CFPP), o denli düşük olmaktadır. Bu nedenle, yağdaki çoklu doymamış yağ asitleri optimum bir düzeye getirilmelidir. Tüm bunlar göz önünde

bulundurulduğunda, yağ asitlerinin ‘ideal karışımı’ için 16:1, 18:1 ve 14:0 yağ asidi oranlarının 5:4:1 olması önerilmektedir. Böyle bir biyodizel iyi CFPP derecesi, setan sayısı ve çok düşük oksidatif potansiyele sahip olacaktır (Schenk ve diğ., 2008).

## 1.8. Konuyla İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar

### 1.8.1. Perlit desteğe lipaz tutuklama

Literatürde perlit desteğe enzim tutuklamayla ilgili sonuçlar, Tablo 1.12’de verilmiştir. Perlit ile yapılmış çalışma sayısı çok az olmakla birlikte, lipaz enziminin perlite tutuklanmasıyla ilgili yalnız tek bir çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu tek çalışmada ise, *Thermomyces lanuginosus* lipazı (Lipozyme TL 100 L) kullanılmıştır (Kutluk, 2013). Tutuklama sonuçlarına bakıldığında, tutuklanan enzimlerin serbest formlarına göre aktivitelerinde kayıplar olduğu görülmüştür.

Tablo 1.12. Çeşitli enzimlerin perlit desteğe tutuklanması

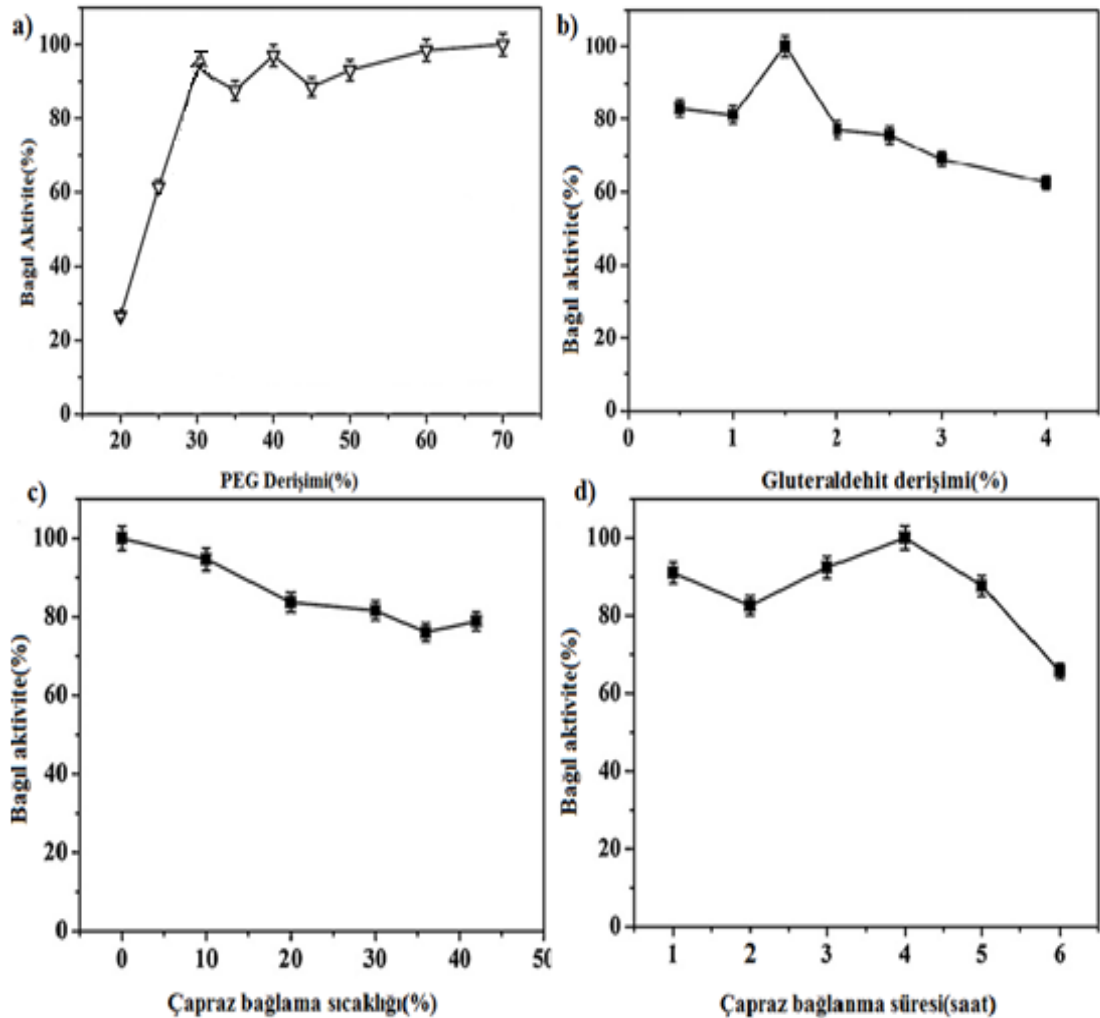
Enzim	Destek	Tutuklama şartları	Tutuklama sonucu	Referans
<i>Aspergillus oryzae</i> kaynaklı $\alpha$ -amilaz	Yüzeyi 3-APTS ve GA ile işlem görmüş perlit	25°C, 4 saat, pH 6,9 (fosfat) 20°C kurutma	<u>Spesifik aktivite</u> 216U/g  <u>Bağıl aktivite</u> %93,5	Karimi ve diğ. (2011)
<b>Kolesterol oksidaz</b>	Yüzeyi 3-APTS ve GA ile işlem görmüş perlit	4°C, 24 saat pH 7,0 (fosfat)	<u>Tutuklama verimi</u> Kolest. oksidaz :%100 Peroksidaz :%97	Torabi ve diğ. (2007)
<b>Peroksidaz</b>			<u>Bağıl aktivite</u> Kolest. oksidaz :%50 Peroksidaz :%11	
<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipazı(Lipozyme TL 100 L)	Yüzeyi 3-APTS ve GA ile işlem görmüş perlit	30°C,24 saat, 200rpm, pH 8,5 (tris-HCl)	<u>Tutuklama verimi</u> %15	Kutluk (2013)

### 1.8.2. Çapraz bağlama ile lipaz tutuklama

Tablo 1.13’te literatürde *Thermomyces lanuginosus* ve farklı lipazların çapraz bağlanmasıyla ilgili sonuçlar verilmiştir. Çalışmalarda farklı çöktürücü ajanlar ve katkı maddeleri kullanarak, tutuklanma verimleri ve enzim aktivitelerini incelenmiştir.



Yang ve diğ. (2012) tarafından PEG 600 ile yapılan çalışmada, glutaraldehit derişimi %1,5 olması durumunda %100'e yakın bağıl aktivite değerine ulaşılmış ve daha yüksek glutaraldehit derişimlerinde aktivitelere düşüş gözlenmiştir (Şekil 1.17). Bunun nedeni, ortamda fazla miktarda bulunan glutaraldehitin enzime denatürasyon etkisi yapmasıdır. Aynı zamanda, fazla miktarda glutaraldehit, büyük boyutta agregatlar oluşturarak kütle aktarım kısıtlamalarına neden olmaktadır. Düşük glutaraldehit derişimlerinde, enzim etkin şekilde çapraz bağlanamadığı için, düşük aktivite göstermiştir. Aynı şekilde çok yüksek glutaraldehit derişimlerinde ise, fazla sayıda çapraz bağlar oluşması nedeniyle, enzim yeterli aktivite gösterebilmek için gerekli olan esnekliğini kaybetmiştir.



Şekil 1.17. *Thermomyces laniginosus* lipazının PEG 600 ile çöktürülerek çapraz bağlanması a)PEG derişimi, b)Glutaraldehit derişimi, c)Sıcaklık, d)Sürenin bağıl aktiviteye etkisi (Yang, 2012)

Tablo 1.13. Lipazların çapraz bağlanması ile ilgili çalışmalar

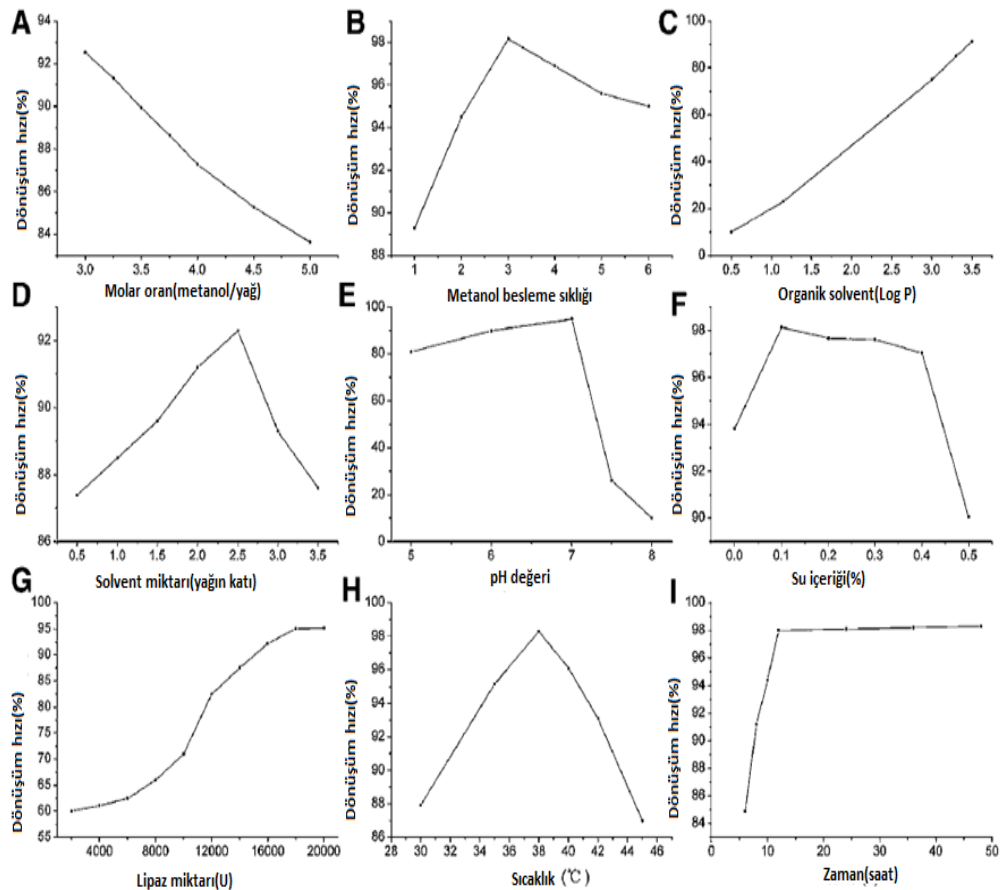
Lipaz	Çöktürücü	Kullanılan katkılar	GA ile Çapraz bağlama şartları	Aktivite	Referans
<b>Ticari</b> <i>Thermomyces lanuginosa</i> (Lipozyme TLL (5000 U/mL))	Doygun amonyum sülfat	Bovine Serum Albumin Oleik asit n-heptan	4 °C, 4saat Tampon yok. .	<u>Bağıl aktivite</u> %31	Guauque Torres ve diğ. (2013)
<b>Ham</b> <i>Thermomyces lanuginosa</i>	%60lık amonyum sülfat	Sodyum dodekil sülfat (SDS) Triton X-100 Tween-80	4°C,14 saat pH 9,0 (Tris-HCl)	<u>Bağıl aktivite</u> Amonyum sülfat: %68 Amonyum sülfat+SDS:%137 Amonyum sülfat+Triton X-100 :%17 Amonyum sülfat+Tween 80: %78	Gupta ve diğ. (2009)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Aseton	yok	4°C, 4,5 saat	<u>Bağıl aktivite</u> %78	Valdés ve diğ. (2011)
<i>Candida antarctica</i> lipazı B	PEG200 PEG600 Amonyum sülfat Aseton	Yok	Oda sıcaklığında 3 saat çalkalama. Sodyum borohidrit eklendikten sonra çalkalamadan 5°C de 12 saat bekletme pH 7,0 (sodyum fosfat)	<u>Spesifik aktivite</u> PEG200 :9,2U/g PEG600 :7,1U/g Amonyum sülfat :8,2U/g Aseton :7,1U/g	Devi ve diğ. (2009)
<b>Lipozyme TL 100 L.</b>	PEG 400 PEG 600	d-sorbierit	0 °C, 4saat Tampon yok. .	<u>Spesifik aktivite (PEG derişimi %40 )</u> PEG 400 : 10,7U/g PEG 600 : 16,4U/g <u>Bağıl aktivite (PEG derişimi %33)</u> PEG 400 : %100 PEG 600 : %90	Yang ve diğ. (2012)

### 1.8.3. Alg yağından lipaz katalizli biyodizel üretimi

Literatürde lipaz katalizörlüğünde alg yağının metanol ile transesterleşmesiyle biyodizel üretimi üzerine yapılmış az sayıda çalışma Tablo 1.14'te verilmiştir. Tran ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada, %63 oranında yağ içeren alg biyokütlesi ile

biyodizel üretiminde YAME içeriğini %92 olarak belirlemişlerdir. Ancak, çok fazla miktarda kullanılan alkol, çözücü ve biyokatalizör miktarını azaltmak için, mikrolag yağ içeriğinin %90'ın üzerinde olması gerektiğini belirtmişlerdir. Lai ve diğ. (2012) *Chlorella vulgaris* alg yağı ile yaptıkları çalışmada, *Penicillium expansum* ve Novozym 435 lipazlarıyla sırasıyla %90,7 ve 86,2 verimlere, 48 saatte ve iyonik sıvı kullanarak ulaşabilmişlerdir. İyonik sıvılar verimi artırmakla beraber, üretim maliyetini de büyük oranda artırmaktadırlar.

Li ve diğ., (2007) çözücü olarak n-hekzan kullanımıyla, %98 verimle biyodizel üretimi gerçekleştirmişlerdir. Ancak yağ kütesinin %75'i oranında lipaz kullanmışlardır. *Chlorella protothecoides* alg yağı ile yaptıkları çalışmada farklı parametrelerin dönüşüm hızına etkisi şekil 1.18'de görülmektedir.



Şekil 1.18. *Chlorella protothecoides* alg yağıyla biyodizel üretiminde dönüşüme etki eden parametreler (Organik çözücüler; tetrahidrofuran (log P 0,49), ter-amil alkol (log P 1,15), siklohekzan (log P 3,0), pertol esterleri (log P 3,4), n-hekzan (log P 3,5) (Li, 2007)

Tablo 1.14. Alg yağından biyodizel üretimi üzerine yapılmış çalışmalar

Mikroalg yağ kaynağı	Kullanılan katalizör	Reaksiyon şartları	YAME içeriği (%)	Referans
<i>Chlorella protothecoides</i>	Sülfirik asit	30°C. asit/yağ oranı 1:1 metanol/yağ oranı 56:1	>80	Xu ve Miao (2006)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Heterojen kataliz (Alümina destekli CaO ve MgO)	50°C, 4saat. Metanol/yağ mol oranı 30:1	97,5	Umdu ve diğ. (2009)
Heterotrofik <i>Chlorella Protothecoides</i>	Tutuklanmış <i>Candidia sp</i> lipazı. (Yağa göre kütlece %75)	38°C, 180rpm, 12saat. Su (yağa göre hacimce) %10 Çözücü n-hegzan (yağ kütlesinin 2.5 katı) Metanol /yağ mol oranı 3:1 Metanol ortama 3 basamakta eklenmiştir.	98,15	Li ve diğ. (2007)
<i>Chlorella</i> (Tatlısu)	Biyolojik destek partiküllerine (BSPs) tutuklanmış mold-fungus (JN7) hücre biyokatalizi	40°C, 150rpm, 72 saat. Çözücü n-hegzan (yağ kütlesinin 2.5 katı) Metanol ortama 3 basamakta eklenmiştir.	50,3 (Chrlla.)	Xiao ve diğ. (2010)
DY54(Singapur sahillerinden izole edilen bir mikroalg)			68,2 (DY54)	
<i>Chlorella Protothecoides</i>	Hidrotalsite tutuklanmış <i>Thermomyces lanuginosus</i> lipazı (yağa göre kütlece %5)	24 saat, 200rpm, 30°C Metanol/yağ oranı 4:1 Su yağa göre %5	90	Kutluk (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Tutuklanmış <i>Penicillium expansum</i> lipazı (PEL) (yağa göre kütlece %20)	48saat, 40°C Metanol/yağ oranı 3:1 Su içeriği yağa göre kütlece %3 Çözücü: iyonik sıvı (1-butil-3-metilimidazolyum hegzaflo-rofosfat [BMIm][PF6] ) yağa göre kütlece %2(ml)	90,7	Lai ve diğ. (2012)
		48saat, 40°C Çözücü: Ter-bütanol Yağa göre kütlece %1(ml)	48,6	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Tutuklanmış <i>Candida antarctica</i> lipaz B (Novozym 435) (yağa göre kütlece %10)	48saat, 50°C Metanol yağ oranı 4:1 Su içeriği yağa göre kütlece %1 Çözücü: iyonik sıvı (1-butil-3-metilimidazolyum hegzaflo-rofosfat [BMIm][PF6] ) yağa göre kütlece %2(ml)	86,2	Lai ve diğ. (2012)
		48saat, 50°C Çözücü: Ter-bütanol Yağa göre kütlece %1(ml)	44,4	

Tablo 1.14 (Devam). Alg yağından biyodizel üretimi üzerine yapılmış çalışmalar

<i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31 mikrolgleri hücre parçalama işlemi sonrası reaksiyon ortamına eklenmiştir (Biyokütlenin yağ içeriği %63).	Tutuklanmış <i>Burkholderia sp.</i> lipazı Destek: alkille kaplanmış Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -SiO <sub>2</sub> manyetik parçacıklar) (reaksiyon ortamına göre kütlece% 3.5)	45°C,600rpm, 48saat. Çözücü: n-hegzan (reaksiyon ortamına göre kütlece% 63.4) Alg biyokütlesinin su içeriği %86-91. Metanol/ yağ molar oranı:67	92.15	Tran ve diğ. (2013)
--	--	---	-------	---------------------

### 1.9. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Bu tez çalışması kapsamında;

- *Candida antarctica* (Lipozyme CALB L) lipazının perlit desteğe tutuklanarak tutuklama verimleri ve hidrolitik aktivitelerin araştırılması,
- *Termomyces laniginosus* lipazının (Lipozyme TL 100 L) çapraz bağlı agregatları oluşturularak tutuklama verimleri ve hidrolitik aktivitelerin araştırılması,
- Ticari tutuklu lipazlar katalizörlüğünde alg yağının metanol ile transesterleşmesinde düşük sıcaklıklar ve enzim miktarlarında yüksek YAME verimleri elde edilmesi,
- Perlit desteğe tutuklanan (Perlit-CALB) ve çapraz bağlı agregatları oluşturulan (çapraz bağlı-TL) lipazların biyodizel üretimine uygunluğu araştırılarak literatüre katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

## **2. MALZEME VE YÖNTEM**

### **2.1. Malzemeler**

#### **2.1.1. Kimyasallar**

Deneysel çalışmada kullanılan *Chlorella protothecoides* mikroalginden elde edilmiş yağ (yağ asidi bileşimi; C 16:1, %5,2; C16:1, %0,4; C18:0, %2,0; C 18:1, %63,4; C 18:3 n3, %6,2, C 20:0, %0,6; C 20:1 n9; %1,4) Soley firmasından temin edilmiştir. Sıvı formda serbest Lipozyme TL 100 L (*Thermomyces lanuginosus*) ve Lipozyme CALB L (*Candida antarctica*) lipazları ve ticari tutuklanmış Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*) ve Novozym 435 (*Candida antarctica*) lipazı Novozymes (Danimarka) firmasından temin edilmiştir. Serbest lipazın tutuklandığı perlit, bahçe ürünleri satan yerel bir marketten satın alınmıştır. Etanol, metanol, fosforik asit, n-heptan, n-hekzan, ter-bütanol, toluen, HCl, NaOH, Potasyum dihidrojen fosfat, amonyum sülfat ve PEG 400 analitik saflıkta olup Merck firmasından satın alınmıştır. Brilliant Blue G, trizma baz (tampon çözelti bazı), para-nitrofenil palmitat (p-NPP), 3- aminopropil trietoksisilan (3-APTS), glutaraldehit (GA) ve metil heptadekanoat (Fluka) analitik saflıkta olup Sigma Aldrich firmasından, teknik etanol (%70) Labor Teknik Laboratuar Malzemeleri ve Ekipmanları San. A.Ş. firmasından satın alınmıştır.

#### **2.1.2. Cihazlar**

Enzimlerin çapraz bağlanması, perlit desteklere enzim tutuklama ve biyodizel sentezi, karıştırma ve sıcaklık kontrolü New Brunswick Scientific Innova 40 R orbital çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Protein miktarı ve enzim aktivitesi tayini için, Hach DR 5000 UV-Vis spektrofotometre kullanılmıştır. Transesterleşme tepkimesi sonucu oluşan metil ester içeriği, Agilent 6890N Gaz Kromatografisi (GC) analiz sistemiyle belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca, IKA RCT Classic ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, Mettler Toledo SevenEasy S20-K pH metre, Kern ABJ 320-4 analitik terazi, Brand Transferpette S otomatik mikropipet (100 µl, 1000 µl, 5 ml), USF ELGA distile su cihazı (USF ELGA kompozit filtreli) ve Vestel

(BZP-M3203W model) No-Frost buzdolabı kullanılmıştır. Reaksiyon karışımından alınan örnekler santrifüjlenmiş (Hettich Mikro 220R) ve katalizörden ayrılan sıvı örnekler, ependorf tüplerine alınarak, -18°C’de analiz için saklanmıştır.

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. Tutuklama**

Lipozyme CALB L lipazının perlit desteğe kovalent bağlanarak ve Lipozyme TL 100L lipazının çapraz bağlı agregatlarını oluşturarak tutuklama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

#### **2.2.1.1. Perlit desteğe lipaz tutuklama**

Perlit yüzey aktivasyonu 3-APTS çözeltisi kullanılarak yapılmıştır (Karimi ve diğ., 2011, Kutluk, 2013). Tutuklama işlemi, 12 ml hacimli ve kapaklı cam viyaller kullanılarak, sıcaklık ve çalkalama hızı kontrollü inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Tutuklamaya destek miktarı (0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2g ), enzim miktarı (100, 300, 500, 700 µl ), sıcaklık (25 °C, 37°C ve 45 °C), tampon türü (tris-HCl, fosfat tamponu) ve pH’ın (pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5) etkileri incelenmiştir. Tüm deneyler 250 rpm, 6ml tampon kullanarak, 24 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Tutuklama işlemi sonrası perlitler süzülerek ortamdaki ayrılmış ve reaksiyonda kullanılan tampon ile üç kez yıkanmıştır. 20°C’de bir gece kurutulmuş ve 4°C’de saklanmıştır. Tutuklama verimi ve desteğe bağlanan enzim miktarları, tutuklamadan önce ve sonra örneklerde bulunan protein miktarları tayin edilerek belirlenmiştir. (Karimi ve diğ., 2011; Torabi ve diğ., 2007)

#### **2.2.1.2. Çapraz bağlama ile lipaz tutuklama**

Cam viyallerde 2ml enzim üzerine 4ml tris-HCl tamponu (0,1M, pH 7,0, 8,0 ve 9,0) eklenmiştir. Vortekslenen karışım üzerine çöktürücü ajan olarak 1ml PEG 400 damla damla eklenerek 20 dk 100 rpm’de çalkalanmıştır. Çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi için karışıma 0,4 ml hacimce %25lik glutaraldehit çözeltisi eklenip 100rpm hızında 4 saat daha çalkalanmıştır. Tüm işlemler buz banyosunda gerçekleştirilmiştir. Karışım 4°C, 6000 rpm, 20dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucunda çöken enzimler 2 kez saf su ile yıkanmış ve 4°C’de kurutulmuş

saklanmıştır (Guauque Torres, 2013; Yang, 2013). Enzimlerin tutuklanma verimleri, biriktirilmiş santrifüj ve yıkama sularında bulunan protein miktarları tayin edilerek bulunmuştur.

### **2.2.2. Alg yağından lipaz katalizli biyodizel üretimi**

Biyodizel üretimi, 6 ml hacimli ve kapaklı cam viyaller kullanılarak, sıcaklık ve çalkalama hızı kontrollü inkübatörde gerçekleştirilmiştir. 2g alg yağı, 1/4 yağ/metanol mol oranında (3 basamaklı, 3,5 saatte bir metanol ekleme) tepkime ortamına eklenen farklı su miktarı, sıcaklık, karıştırma hızı, süre ve enzim miktarlarında yapılan deneyler sonucu oluşan metil ester içerikleri belirlenmiştir. Su miktarının etkisinin incelendiği deneyler yağa göre kütlece % 0-15 aralığında ortama su eklenmesiyle, yukarıda belirtilen koşullarda yapılmıştır. Sıcaklık etkisinin incelendiği deneyler için 25°C, 35°C ve 45°C sıcaklık koşullarında yapılan deneyler ile üretime sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Yağ/metanol mol oranının etkisinin incelenmesi amacıyla 1/3, 1/4 ve 1/6 mol oranları kullanılmıştır. Metanol ortama tek basamak, iki basamak (6 saatte bir) ve üç basamak (3 saatte bir) halinde eklenerek alkol ekleme sıklığının etkisi araştırılmıştır. Sürenin etkisinin incelendiği deneylerde 6, 24, 30 ve 48. saatlerde örnek alınmıştır. Çözücü türünün etkisinin incelenmesi amacıyla ter-bütanol (logP 0,28), toluen (logP 2,386), hekzan (logP 3,657), heptan (logP 3,668) kullanılmış, yağ kütlesine göre 1/1 oranında eklenerek biyodizel üretimi incelenmiştir. Enzimler tekrar kullanımlarda, filtreleme sonrası yıkama yapmadan reaksiyon ortamına geri eklenmiştir.

### **2.2.3. Analizler**

#### **2.2.3.1. Protein tayini**

Lipozyme TL 100L ve Lipozyme CALB L lipazlarının tutuklanmasında protein miktarı Bradford Yöntemi ile tayin edilmiştir (Bradford 1976). Bradford yöntemi, proteine bağlanan Coomassie Brilliant Blue G250 boyasının UV-vis spektrofotometresinde 595nm'de absorbans vermesi ilkesine dayanan bir ölçüm yöntemidir. Kullanılan boya ortamdaki proteinlerle kompleks oluşturarak proteinin yoğunluğuna göre açık ya da koyu renk vermektedir. Yöntem ve hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği EK-A' da verilmiştir (Bradford, 1976; Kutluk, 2013). Tutuklama



verimi başlangıçta çözeltide bulunan protein miktarı ile tutuklama sonrası çözeltide kalan protein miktarı arasındaki farktan hesaplanmıştır.

### 2.2.3.2. Lipaz aktivitesi tayini

Tutuklanmış ve serbest lipazların aktivite tayini için paranitrofenil palmitatın (p-NPP) hidrolizi yöntemi kullanılmıştır (Winkler ve Stuckmann, 1979). Uygulanan yöntem ve hesaplamalar EK B’de verilmiştir. Bir lipaz ünitesi (U) bir dakikada oluşan para nitrofenol (p-NP) miktarı olarak tanımlanmıştır. Çapraz bağlı lipazların spesifik aktivitesi için Eşitlik (2.1), perlite tutuklanan lipazların spesifik aktivitesi için Eşitlik (2.2), bağlı aktiviteler için Eşitlik (2.3) kullanılmıştır.

$$\text{Spesifik aktivite} = \left( \frac{U}{\text{g protein}} \right) = \frac{\text{Ünite}}{\text{Protein miktarı (g)}} \quad (2.1)$$

$$\text{Spesifik aktivite} = \left( \frac{U}{\text{g destek}} \right) = \frac{\text{Ünite}}{\text{Destek miktarı (g)}} \quad (2.2)$$

$$\text{Bağlı aktivite} = \frac{\text{Tutuklu lipazın spesifik aktivitesi}}{\text{Serbest lipazın spesifik aktivitesi}} \times 100 \quad (2.3)$$

### 2.2.3.3. Yağ asidi metil ester (YAME) analizi

Transesterleşme tepkimesi sonunda karışımdaki YAME miktarı, alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 30m x 320µm x 0,25µm kapiler kolon (CARBOWAX 20M) ile donatılmış Agilent 6890N Gaz Kromatografisi (GC) analiz sistemiyle belirlenmiştir. Sistem, EN 14103 standardına göre, metilheptadekanoat iç standardı kullanılarak kalibre edilmiştir. Reaksiyon ortamı santrifüj ile fazlarına ayrılarak üst fazdan kütlesi belirli örnek, derişimi belirli iç standart çözeltisi ile seyreltilmiştir. YAME içeriği EK-C’de verilen denklem yardımıyla örnek hesaplamaya uygun olarak belirlenmiştir.

### **3. BULGULAR VE TARTIŞMA**

Çalışmanın birinci aşamasında, tutuklama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle serbest *Candida antarctica* lipazı (Lipozyme CALB L), kalsine edilmiş ve edilmemiş perlite tutuklanmıştır. Daha sonra serbest *Thermomyces lanuginosus* lipazı (Lipozyme TL 100 L), çapraz bağlanma yöntemiyle tutuklanarak lipaz agregatları oluşturulmuştur. Her iki tutuklama yöntemi için, tutuklama verimi, desteğe tutuklanan protein miktarı ve tutuklanmış lipazların aktivitesi hesaplanmıştır

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, perlite tutuklanmış Lipozyme CALB L (perlit-CALB), çapraz bağlanmış Lipozyme TL 100 L (çapraz-TL) ve bu enzimlerin ticari tutuklu formları olan Novozym 435 ve Lipozyme TL-IM ile alg yağından biyodizel üretimi için farklı reaksiyon parametreleri incelenmiş, her biri ile elde edilen YAME içerikleri karşılaştırılmıştır.

#### **3.1. Tutuklama**

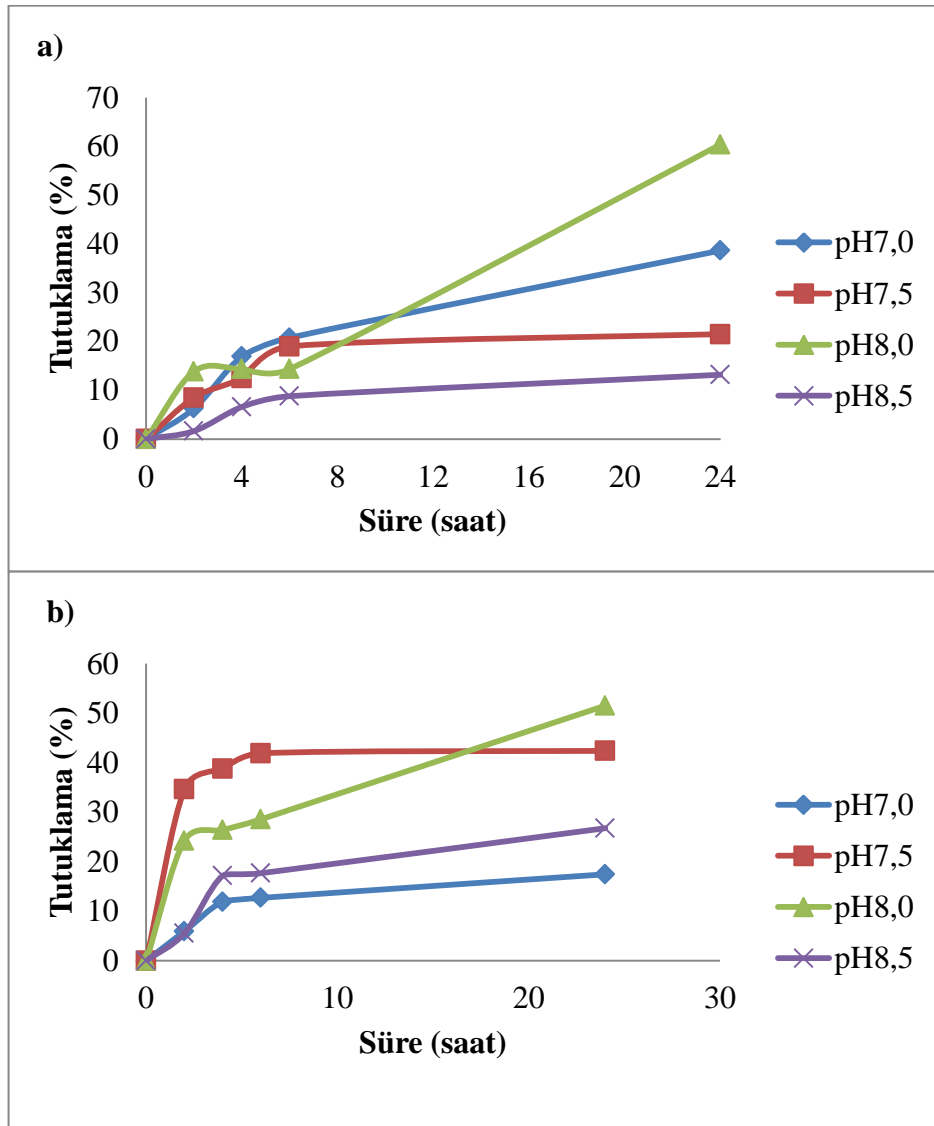
Lipozyme CALB L lipazının perlit ve kalsine edilmiş perlit desteğe ve Lipozyme TL 100L lipazının çapraz bağlı agregatları oluşturularak tutuklanmasına farklı parametrelerin etkisi incelenmiştir.

##### **3.1.1. Perlit desteğe lipaz tutuklama**

###### **3.1.1.1. Tampon türü ve pH etkisi**

Enzimlerin aktif konumlarında yer alan amino asitler, asidik, bazik ya da nötral gruplara sahip olabilirler. Aktif konumlardaki bu iyonik grupların görev yapmaları için uygun formda (asit ya da baz form) olması gerekir. Ortam pH'ındaki değişimler aktif konumun iyonik formunu ve enzimin üç boyutlu yapısını değiştirerek enzim aktivitesini etkiler. Bu nedenle enzimler belli pH aralığında aktifirler ve bu her enzim için farklıdır (Shuler ve Kargı, 2003; Bailey ve Ollis, 1986).

Çalışmada Lipozyme CALB L, perlit ve kalsine edilmiş perlit desteğe tutuklanmıştır. Tris-HCl tamponu kullanılarak farklı pH değerlerinde yapılan tutuklama sonunda, her iki tür perlit için tutuklama verimi, Şekil 3.1’de verilmiştir. 37°C sıcaklıkta gerçekleştirilen deneylerde perlit için ilk 6 saatte pH 8,5’den 7,0’ye düştükçe tutuklama miktarının arttığı görülmüştür ancak tutuklama yüzdeleri ilk 6 saatte oldukça düşüktür. 24 saat sonunda, tutuklama miktarı pH 7,0’de %39 iken pH 8,0’de %60’a yükseldiği görülmektedir. pH 7,5 ve pH 8,5 te 6. saatten sonra sürenin artırılması tutuklama verimini fazla etkilememiştir.



Şekil 3.1. Lipozyme CALB L'nin a)Perlit, b)Kalsine perlite tutuklanmasında pH'in ve sürenin tutuklama verimine etkisi (Tutuklama koşulları: 0,05g destek, 6 ml Tris-HCl tampon, 100 µl enzim, 250 rpm, 37 °C, 24 saat)

Kalsine edilmiş perlitte ise ilk 6 saatte tutuklama verimleri pH 7,5'te %42, pH'8 de %29 olarak elde edilmiştir. 24 saat sonunda ise pH 7,5 te tutuklama veriminde artış olmamış pH 8,0 ile %52 tutuklama verimine ulaşılmıştır. pH 7,0 ve pH 8,5'te kalsine perlit ile etkin tutuklama gerçekleştirilememiştir.

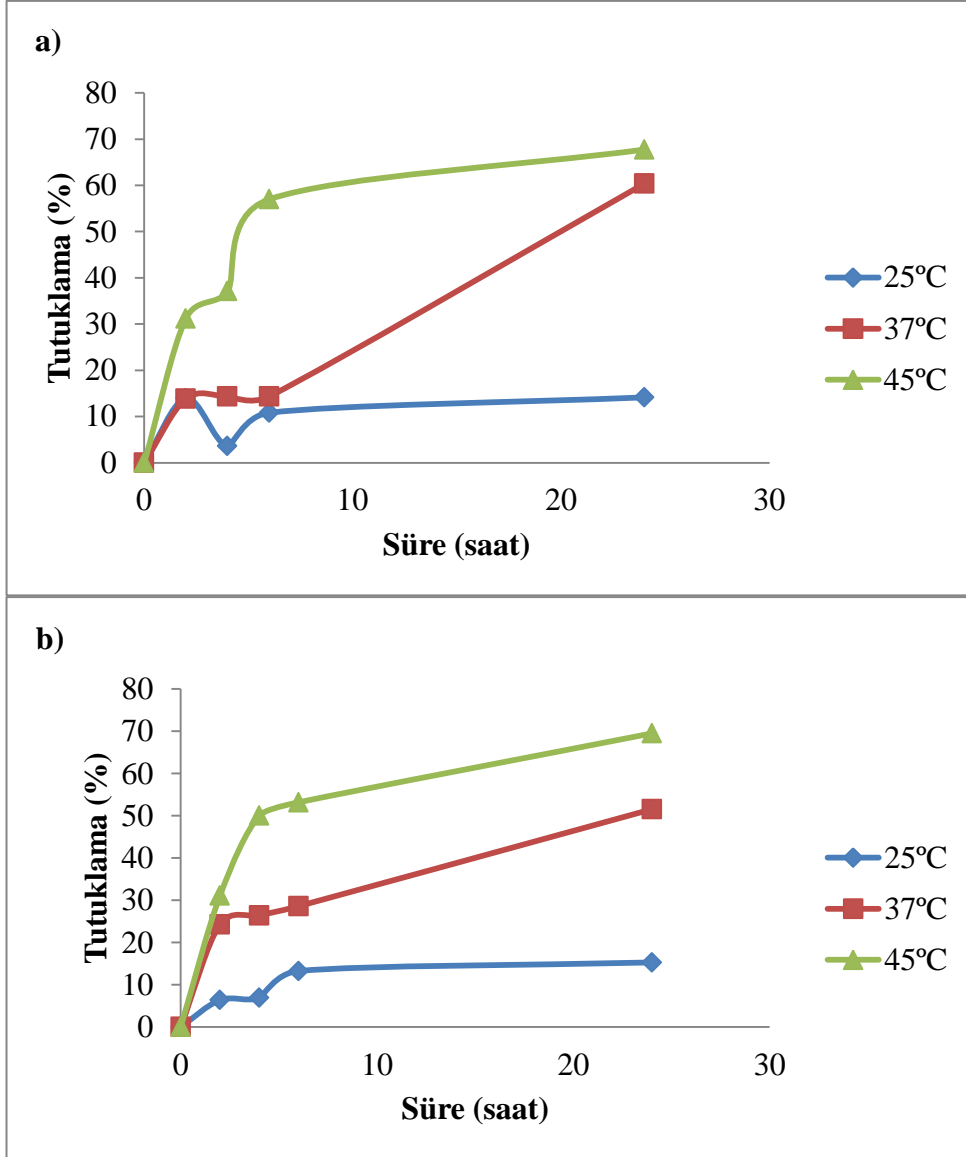
Sonuç olarak hem perlit hem de kalsine perlit için 24 saat sonucunda en iyi tutuklama verimi pH 8,0 ile sağlanmıştır. Bu nedenle Lipozyme CALB L enziminin perlitte tutuklanması işlemi için pH 8,0 tris-HCl tamponunun uygun olduğu düşünülmüştür.

Çalışmada 37 °C de tris-HCl yerine farklı pH değerlerinde fosfat tamponu da kullanılmış, fakat tutuklama verimleri çok düşük çıkmıştır. Ayrıca protein tayini sırasında, absorbans değerlerinde çok büyük sapmalar gözlemlenmiştir. Dolayısıyla fosfat tamponunun Lipozyme CALB L enziminin perlitte tutuklanması için uygun olmadığı anlaşılmıştır. Literatürde lipaz dışında birkaç enzimin perlit desteğe tutuklanması ile ilgili çalışmalarda pH 7,0 fosfat tamponu kullanılmıştır (Bkz. Tablo 1.12).

### **3.1.1.2. Sıcaklık etkisi**

Tris-HCl tamponu kullanılarak Lipozyme CALB L'nin perlit desteğe tutuklanmasında farklı sıcaklıkların ve tutuklama sürelerinin etkisi Şekil 3.2'de görülmektedir.

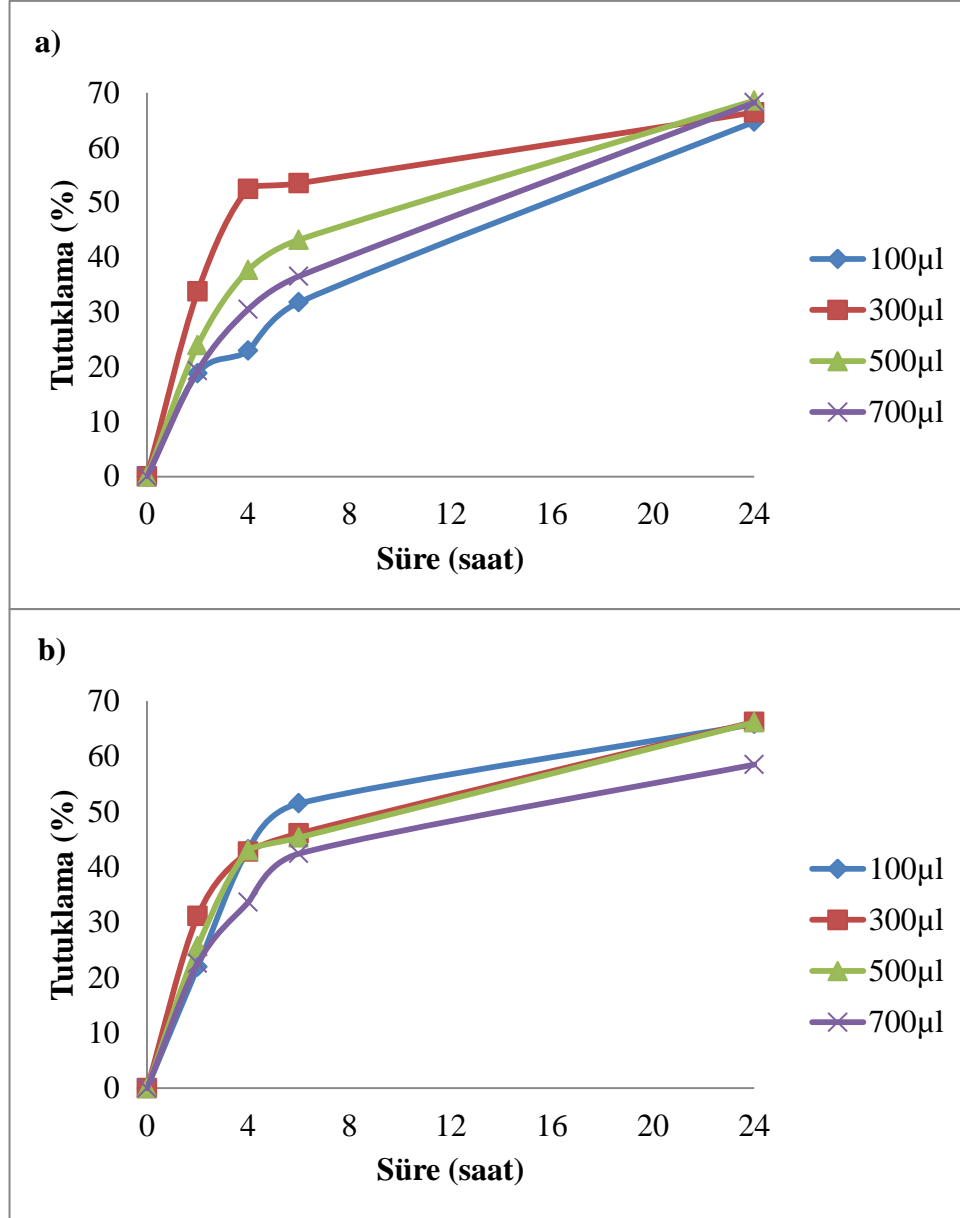
Hem perlit hem de kalsine perlitte sıcaklık arttıkça tutuklanma veriminde büyük bir artış gözlemlenmiştir. Daha yüksek tutuklama sıcaklıklarının enzim denatürasyonuna neden olabileceği bilindiğinden ve işletme maliyetleri de dikkate alındığında Lipozyme CALB L lipazının perlitte tutuklanması işlemi için 45°C uygun bulunmuştur. Tablo 1.12 incelendiğinde lipaz dışındaki enzimlerin tutuklama çalışmaları 25°C ve 4°C'de yapıldığı görülmektedir. Lipazın tutuklandığı çalışma ise 30 °C'de yapılmış ve %15 tutuklama verimi elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Lipozyme CALB L'nin a)Perlit, b)Kalsine perlite tutuklanmasında sıcaklığın ve sürenin tutuklama verimine etkisi (Tutuklama koşulları: 0,05 gr destek, 6 ml Tris-HCl tampon, pH 8,0, 100 µl enzim, 250 rpm, 24 saat)

### 3.1.1.3. Enzim miktarının etkisi

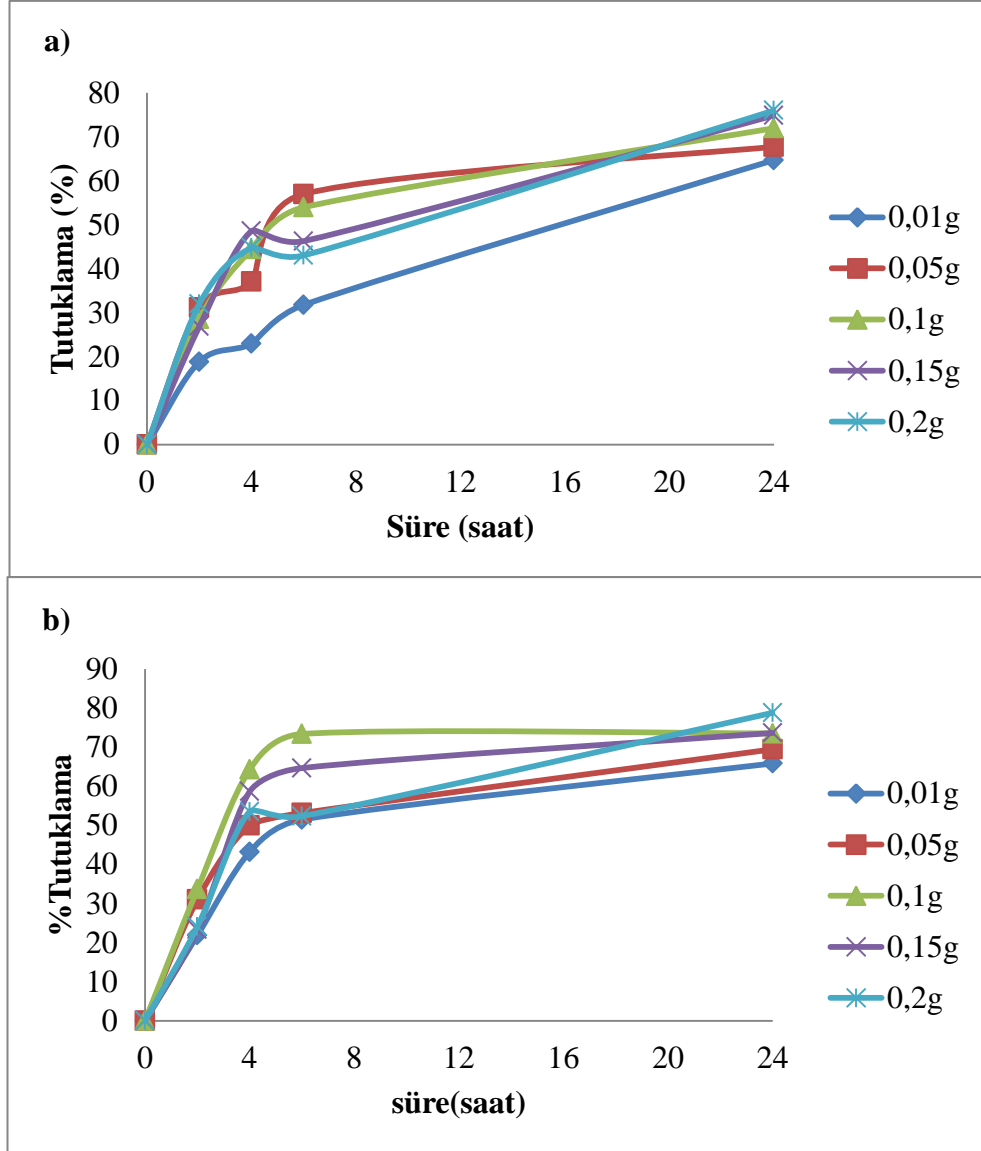
Tutuklama için uygun pH ve sıcaklık belirlendikten sonra, destek miktarı sabit tutularak enzim miktarındaki artışın tutuklama verimine etkisi araştırılmıştır. Bunun için 0,01 g destek içeren ortama farklı miktarlarda enzim (100-700 µl) eklenerek tutuklama yapılmıştır. Enzim miktarı ve sürenin tutuklama verimine etkisi, Şekil 3.3'te verilmiştir. Görüldüğü gibi hem perlit hem kalsine perlit için 24 saat sonunda birbirine çok yakın tutuklama verimleri elde edilmiştir.



Şekil 3.3. Lipozyme CALB L'nin a)Perlit, b)Kalsine perlite tutuklanmasında enzim miktarı ve sürenin tutuklama verimine etkisi (Tutuklama koşulları, 45°C, 6 ml Tris-HCl tampon, pH 8,0, 0,01g destek, 250 rpm, 24 saat)

#### 3.1.1.4. Destek miktarının etkisi

Son olarak destek miktarı değiştirilerek tutuklama veriminin artırılması amaçlanmıştır. Bunun için 100 µl serbest enzim içeren ortama farklı miktarlarda perlit (0,01-0,2g) eklenerek tutuklama yapılmıştır. Şekil 3.4'te görüldüğü gibi destek miktarı attıkça tutuklama verimi %65'ten %76'ya yükselmiştir. Aynı şekilde kalsine perlit için destek miktarı arttıkça tutuklama verimi %69'dan %79'a yükselmiştir.



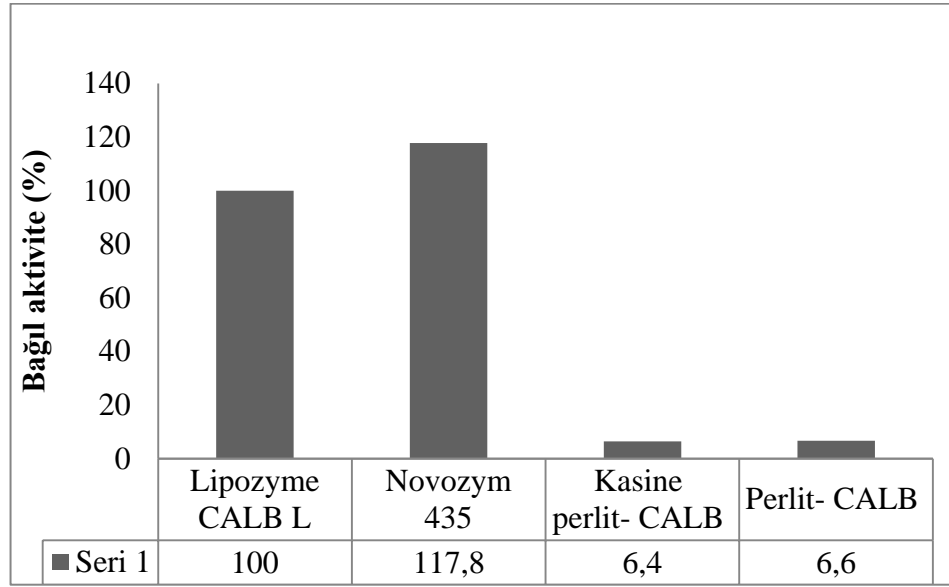
Şekil 3.4. Lipozyme CALB L'nin a)Perlit, b)Kalsine perlite tutuklanmasında destek miktarının ve sürenin tutuklama verimine etkisi (Tutuklama koşulları, 45°C, 6 ml Tris-HCl tampon, pH 8,0, 100 µl enzim, 250 rpm, 24 saat)

Destek ve enzim miktarının denendiği tüm sonuçlara bakıldığında perlit için tutuklama verimi %76 olarak elde edilmiştir. Enzim miktarının artmasıyla verimlerde önemli bir değişiklik olmamıştır. Kalsine perlit için ise 100µl enzim ile destek miktarı arttıkça tutuklama verimi %79'a kadar yükselmiştir, enzim miktarı arttıkça ise düşmüştür. Her iki durum da ortamdaki destek miktarının yüksek enzim derişimleri için yetersiz kaldığını göstermektedir. Tutuklanma verimlerinde %79'un üzerine çıkılamamasının nedeni perlit yüzeylerinin verimli şekilde aktifleşmemiş olması olabilir. Sonuç olarak hem perlit hem de kalsine perlit için en yüksek

tutuklama verimlerinin elde edildiği 100µl enzim ve 0,2 g destek miktarı uygun bulunmuştur.

### 3.1.1.5. Perlit desteğe tutuklanmış lipazın aktivitesi

Hidrolitik aktivite tayini için en yüksek tutuklama veriminin sağlandığı şartlarda (45°C, pH 8,0 tris-HCl tamponu, 100µl enzim ve 0,2 g destek) tutuklanmış olan enzimler seçilmiştir. Şekil 3.5'te hem perlit hem de kalsine perlite tutuklanmış *Candida antarctica* lipazının bağıl aktivite değerlerinin oldukça düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 3.5. Novozym 435 ve perlite tutuklanmış CALB L'nin Lipozyme CALB L'ye göre bağıl aktiviteleri

Tutuklama verimlerine göre aktivitelerin bu denli düşük bulunmasının nedeni enzimin aktif konumlarının bir bölümünün deaktivasyona uğraması olarak düşünülmektedir. Deaktivasyonun nedeni ise silika yüzeyleri üzerine adsorplanan protein moleküllerinin konformasyonunda meydana gelen bir bozulma sonucu aktif konumların substrat molekülleri ile bağlantısının kesilmesi olabilir (Karimi ve diğ., 2011). Şekilde aynı zamanda Novozym 435'in (*Candida antarctica*) serbest formu olan Lipozyme TL 100L'ye göre aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Literatürde *Candida antarctica* lipazının perlit desteğe tutuklanmasıyla ilgili bir çalışma olmadığı görülmektedir. Farklı enzimlerle yapılan çalışmalarda  $\alpha$ -amilazın perlit desteğe tutuklanmasında, enzimin serbest formuna göre aktivitesinin %6,5

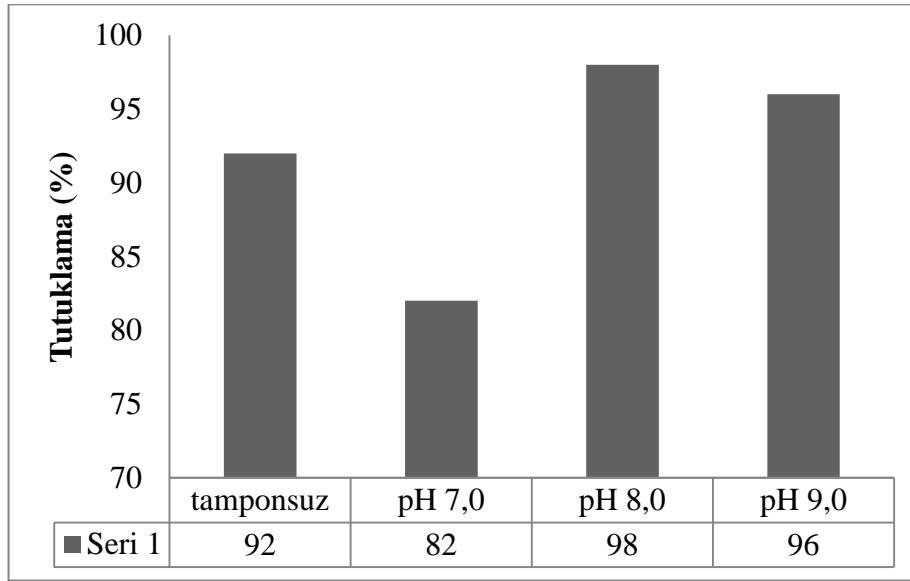


azaldığı görülmüştür (Karimi ve diğ., 2011). Benzer şekilde kolesterol oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin serbest formlarına göre aktivitelerinin sırasıyla %50'sini ve %89'unu kayb ettikleri gözlemlenmiştir (Torabi ve diğ., 2007). Bu sonuçlar çalışmada elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir (Bkz. Tablo 1.12).

### 3.1.2. Çapraz bağlama ile lipaz tutuklama

#### 3.2.1.1. pH etkisi

Çalışmanın bu bölümünde *Thermomyces lanuginosus* lipazının (Lipozyme TL 100L) glutaraldehit ile çapraz bağlı agregatları oluşturulmuştur. Çöktürücü ajan olarak PEG 400 kullanılmıştır. Tris-HCl tamponu kullanılarak farklı pH değerlerinde (pH 7,0, 8,0, 9,0) ve tampon kullanılmadan tutuklama yapılmış ve tutuklama verimlerine pH'ın etkisi Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6. Lipozyme TL 100L'nin çapraz bağlanmasında pH'ın tutuklama verimine etkisi (Tutuklama koşulları, 0°C, 2ml Lipozyme TL 100L, 1ml PEG 400, 0,4 ml glutaraldehit, 4ml tris-HCl tamponu, 100 rpm, 4 saat)

Görüldüğü gibi en yüksek tutuklama verimi, pH 8,0 olduğunda sağlanmıştır. Aynı zamanda tutuklama sonrası, tampon kullanılmadığı durum ile pH 7,0 olduğu durumda oluşan agregatlar, kolaylıkla suda dağılırken, pH 8,0 ve pH 9,0 olduğu durumda suda çözünmeyen ve elastik görümlü agregatlar elde edilmiştir. Sonuç

olarak tampon kullanılmadığı ve pH 7,0 olduğu durumda enzimlerin çöktüğü ancak, etkin bir çapraz bağlanma gerçekleşmediği söylenebilir.

### 3.2.1.2. Çapraz bağlı lipazın aktivitesi

Tablo 3.1’de çapraz bağlı-TL’nin aktivitesine pH’ın etkisi görülmektedir. En yüksek bağlı aktivite pH 8’de %97 olarak elde edilmiştir. *Thermomyces lanuginosus* lipazının çapraz bağlanması ile ilgili literatür incelendiğinde, Yang ve diğ. (2012) PEG 400 ile yaptıkları çalışmada tamponsuz durumda bağlı aktiviteyi %100 olarak bulmuşlardır. Guauque Torres ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada çöktürücü olarak amonyum sülfat kullanarak bağlı aktiviteyi en yüksek %31 olarak bulmuşlardır. Gupta ve diğ. (2009) tris-HCl pH 9 ve amonyum sülfat kullandıkları çalışmada elde ettikleri en yüksek bağlı aktivite %137 olmuştur (Bkz. Tablo 1.13 ).

Sonuç olarak, bu çalışmada çapraz bağlı-TL için, pH 8,0 olduğu durumda en yüksek tutuklama verimi ve bağlı aktivite değerleri elde edilmiştir.

Tablo 3.1.Çapraz bağlı-TL lipazı aktivitesine pH etkisi

	U (p-NP/dk)	Spesifik aktivite (U/g protein)	Bağlı aktivite
<b>Serbest lipaz</b>	0,054	17,9	100
<b>Tamponsuz</b>	0,044	14,7	82
<b>pH 7,0</b>	0,030	10,0	56
<b>pH 8,0</b>	0,052	17,3	97
<b>PH 9,0</b>	0,042	14,0	78

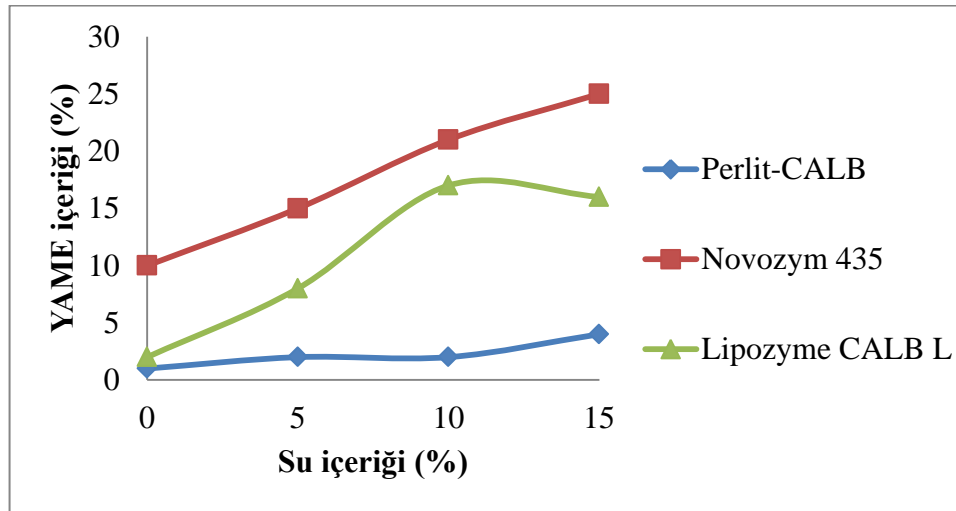
### 3.2. Alg Yağından Lipaz Katalizli Biyodizel Üretimi

Çalışmanın bu bölümünde tutuklanmış enzimler kullanılarak alg yağının metanolizi ile biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan enzimler, Novozym 435 (*Candida antarctica*), Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*) ile perlit-CALB (perlite tutuklanmış *Candida antarctica*) ve çapraz bağlı-TL (çapraz bağlı *Thermomyces lanuginosus*)dir. Yağ/alkol mol oranı, su miktarı, sıcaklık, tepkime süresi, enzim miktarı, metanol ekleme sıklığı gibi parametrelerin biyodizel üretimine etkileri incelenmiş, elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

### 3.2.1. Su miktarının etkisi

Lipazların katalitik olarak aktif olabilmeleri için ortamda bir miktar su olmalıdır. Fazla miktardaki su ise lipaz ile yağ arasında hidrofilik bariyer oluşturmasına ya da lipazın transesterleşme yerine hidroliz tepkimesini yürütmesine neden olur. Su miktarı lipazın en yüksek aktivite göstereceği, fakat hidrolize neden olmayağı miktarda olmalıdır (Noureddini, 2005, Akbin, 2012).

Bu çalışmada, farklı miktarlarda (substratlara göre kütlece %0- 15) ortama eklenen suyun biyodizel üretimine etkisi incelenmiştir. *Candida antarctica* kaynaklı lipazın serbest formu (Lipozyme CALB L), ve tutuklu formu (Novozym 435) ve perlit desteğe tutuklu formu (Perlit-CALB), *Thermomyces lanuginosus* kaynaklı lipazın ticari tutuklu formu (Lipozyme TL IM) ve çapraz bağlı formu için su içeriğinin YAME içeriğine etkisi Şekil 3.7, 3.8 ve 3.9’da verilmiştir.



Şekil 3.7. Alg yağından biyodizel üretiminde su miktarının YAME içeriğine etkisi (45°C, 24 saat, 250rpm, yağ/metanol oranı 1/4, %5 enzim)

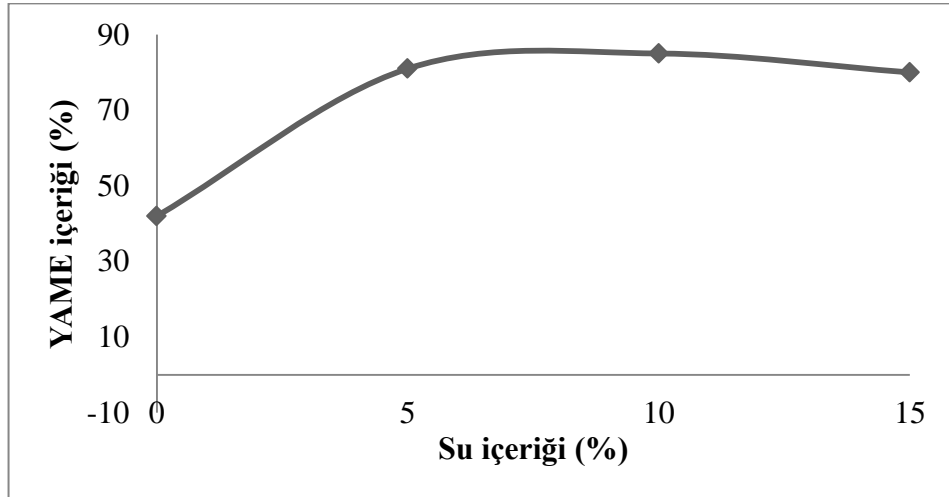
Şekil 3.6’da görüldüğü gibi ortamda başlangıçta su bulunmadığında düşük YAME içerikleri elde edilmiştir. Su miktarı arttıkça YAME içeriklerinde artış gözlemlenmiş ve %15 su olması durumunda Novozym 435 ile %25 YAME içeriği elde edilmiştir. Serbest formdaki, Lipozyme CALB L için ise su miktarı %10’un üzerine çıktığında YAME içeriği düşmüştür.

Tutuklu lipaz için su miktarı arttıkça YAME içeriğinin artmasının nedeni, lipazların aktif konformasyonlarına gelebilmeleri için ortamdaki suyun yetersiz kalması olarak

düşünülmektedir. Daha fazla YAME içeriği elde etmek için daha fazla suyun ortama eklenmesi gerekmektedir. Serbest lipazlar için YAME içeriğinin bir noktadan sonra düşmeye başlamasının nedeni, ortamdaki fazla miktarda suyun lipaz ile yağ arasında hidrofilik bariyer oluşturarak enzim ile substratın hidrofobik kısımları arasında etkileşimi engellemesi ve oluşan esterlerin hidroliz olması olarak düşünülmektedir.

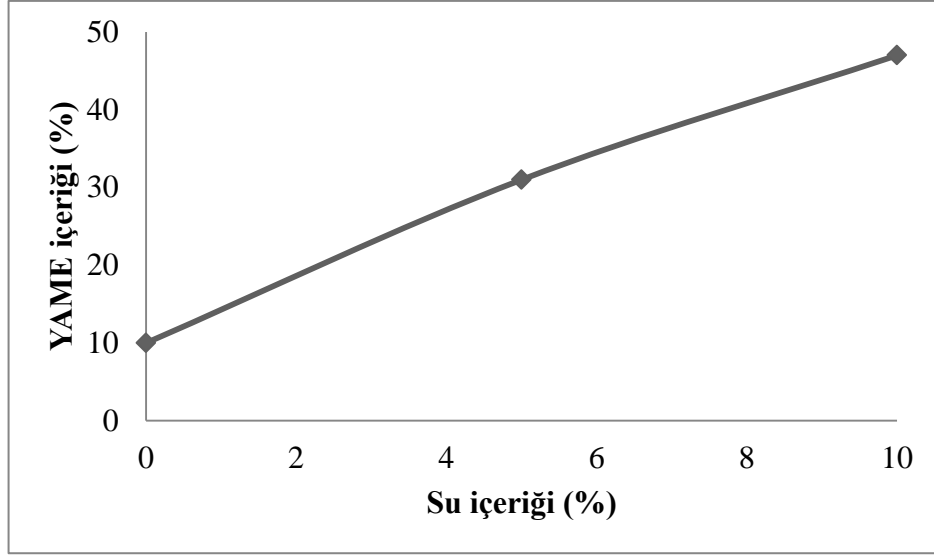
Serbest formda olan Lipozyme CALB L kullanımında Novozym 435'e göre daha düşük YAME içeriği elde edilmesinin nedeni ise, yüksek sıcaklıktan dolayı yeterince aktivite göstermemesi olabilir. Perlit-CALB için su miktarının artmasıyla YAME içeriği fazla değişmemiş ve en çok %4 YAME içeriği elde edilmiştir. Bu durum lipazın perlit desteğe etkin bir şekilde tutuklanamadığının bir göstergesidir.

Şekil 3.8'de görüldüğü gibi Lipozyme TL IM için su miktarının artmasıyla YAME içeriği artarak %10 su miktarında %85 olarak bulunmuştur. Ortamda %10'un üzerinde su olması durumunda YAME içeriği azalmıştır. Su miktarı arttıkça ortamdaki fazla miktardaki su lipazın kısmen hidroliz reaksiyonunu yürütmesine neden olmaktadır. Aynı şekilde Live diğ. (2007) *Chlorella protothecoides* alg yağıyla yaptıkları çalışmada optimum su içeriğini %10 olarak bulmuşlardır.



Şekil 3.8. Lipozyme TL IM ile Alg yağından biyodizel üretiminde su miktarının YAME içeriğine etkisi (35°C, 24 saat, 300rpm, yağ/metanol oranı 1/4, %5 enzim)

Şekil 3.9'da görüldüğü gibi çapraz bağlı-TL (*Thermomyces lanuginosus*) lipazı kullanıldığında, su miktarının artmasıyla YAME içeriği artarak %10 su miktarında %45 olarak bulunmuştur.



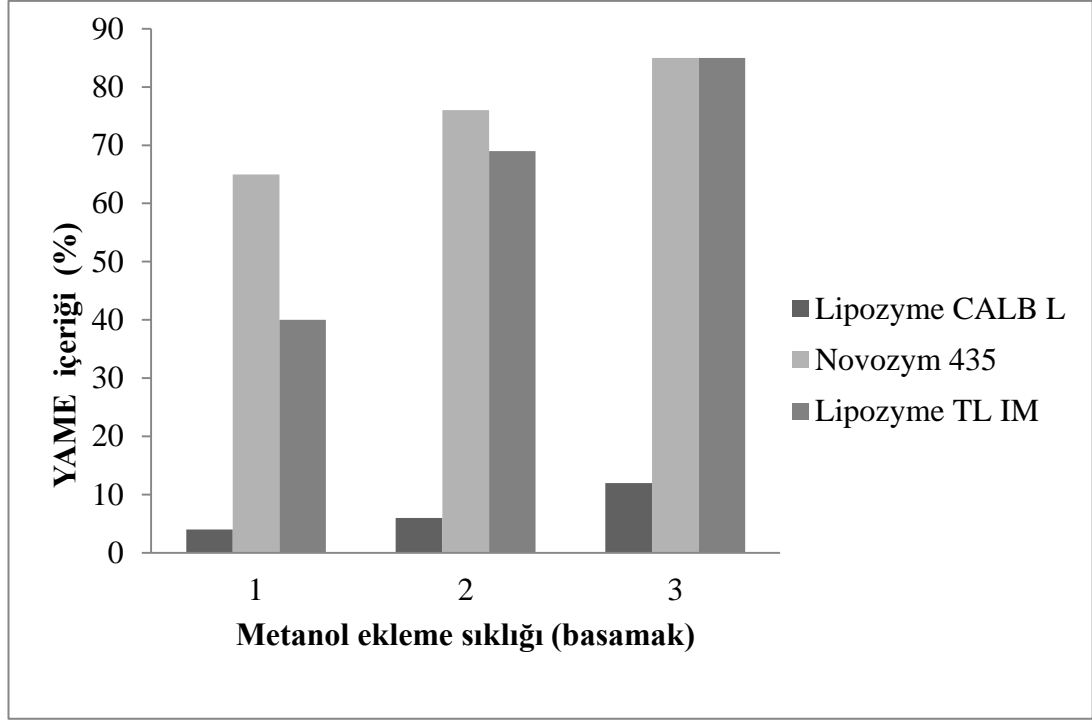
Şekil 3.9. Çapraz bağlı-TL lipazı ile alg yağından biyodizel üretiminde su miktarının YAME içeriğine etkisi (35°C, 24 saat, 300rpm, yağ/metanol oranı 1/4, %5 enzim)

### 3.2.2. Alkol ekleme sıklığının etkisi

Kısa zincirli alkollerin lipazlar üzerindeki inhibisyon etkisi bilinmektedir. Metanolün inhibisyonunu minimize etmek için alkolün ortama basamaklı olarak eklenmektedir.

Çalışmada, metanol ortama tek basamak, iki basamak, ve üç basamak halinde eklenerek biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Lipozyme CALB L, Novozym 435 ve Lipozyme TL IM kullanılarak metanol ekleme sıklığının biyodizel üretimine etkisi Şekil 3.10'da verilmiştir. Serbest formda bulunan Lipozyme CALB L kullanıldığında metanol ekleme sıklığının artmasıyla, YAME içeriği çok az artmıştır. Biyodizel üretiminin düşük seviyelerde olması, sıcaklığın serbest enzim için uygun olmaması şeklinde yorumlanabilir.

Beklendiği gibi hem Novozym 435 hem de Lipozyme TL IM için metanol ekleme basamağı arttıkça verimler önemli ölçüde artmıştır. Lipozyme TL IM'nin metanolden daha çok etkilendiği görülmektedir. Aynı şekilde başka bir çalışmada *Thermomyces laniginosus* lipazının metanolden Novozym 435'e göre daha çok etkilendiği görülmüştür (Yağız, 2006). Üç basamaklı metanol eklemenin YAME verimini artırdığı, Jegannathan ve diğ. (2008) tarafından farklı yağlar ile yapılan çalışmada (Bkz. Tablo 1.8) ve alg yağıyla yapılmış olan çalışmalarda da açıkça görülmektedir (Bkz. Tablo 1.14).

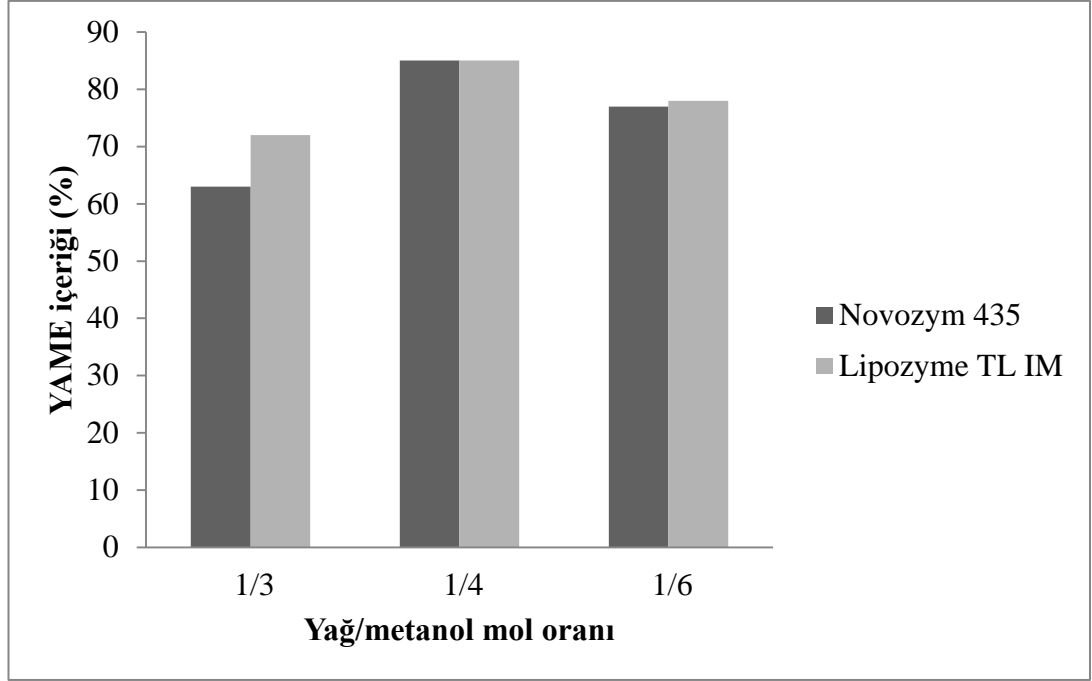


Şekil 3.10. Alg yağından biyodizel üretiminde metanol ekleme sıklığının YAME içeriğine etkisi (24 saat, 300rpm, su içeriği %10, yağ/metanol oranı 1/4, sıcaklık ve enzim miktarı Novozym 435, Lipozyme CALB L için 45°C, %25, Lipozyme TL IM için 35°C, %5)

### 3.2.3. Yağ/alkol mol oranının etkisi

Enzimatik transesterleşme tepkimesinde stokiometrik yağ/alkol mol oranı 1/3'tür. Ortama bu stokiometrik orandan fazla miktarda alkol eklenirse denge tepkimesi ürünler yönüne kayar ve dönüşüm hızı artar. Fakat ortamda çok fazla miktarda metanol bulunması enzimin inhibisyonuna neden olur.

Ticari tutuklanmış lipazlar kullanılarak yağ/metanol mol oranlarının (1/3, 1/4, 1/6) biyodizel üretimine etkisi incelenmiştir. Mol oranının YAME içeriğine etkisi Şekil 3.11'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere stokiometrik orandan fazla alkol (mol oranı 1/4) kullanıldığında her iki enzim için de en yüksek YAME içeriği (%85) elde edilmiş, çünkü fazla metanol denge reaksiyonunun ürünler yönüne kaymasını sağlamıştır. Yağ metanol oranı 1/6' ya yükseltildiğinde ortamdaki fazla metanol enzimlerin deaktivasyonuna neden olmuştur ve YAME miktarında düşüş meydana gelmiştir. Alg yağıyla yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Tran, 2013; Kutluk, 2013).

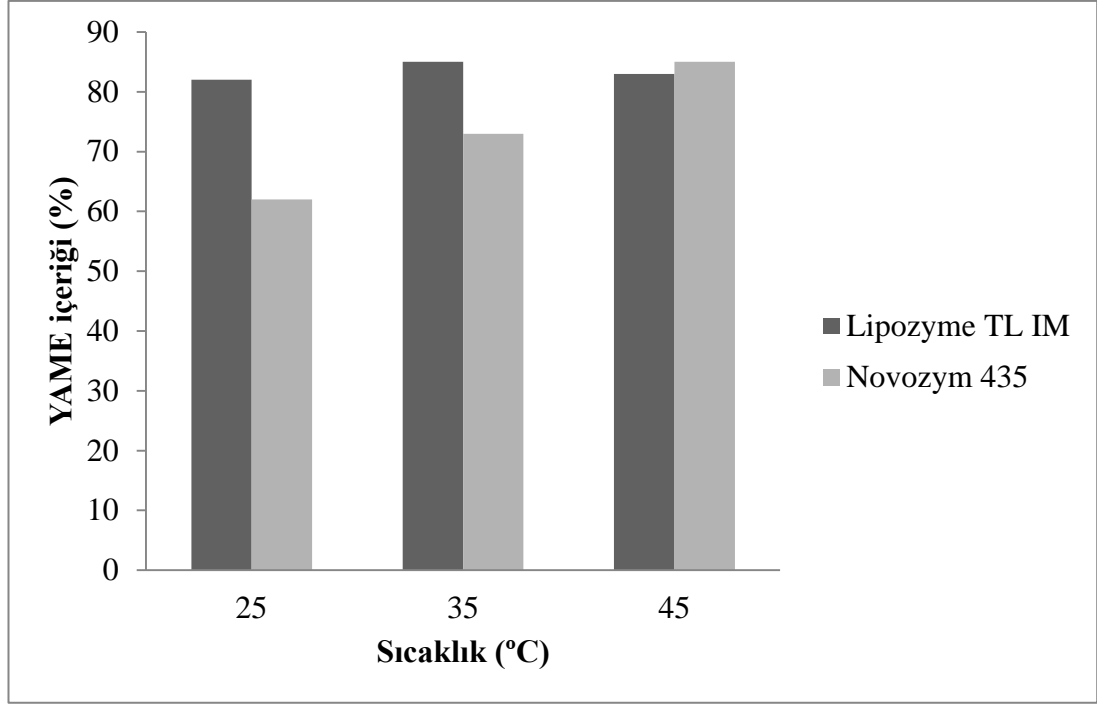


Şekil 3.11. Ticari tutuklu lipazlar kullanılarak alg yağından biyodizel üretiminde yağ/metanol mol oranının YAME içeriğine etkisi (24 saat, 300rpm, su içeriği %10, sıcaklık ve enzim miktarı Novozym 435 için 45°C, %25, Lipozyme TL IM için 35°C, %5)

### 3.2.4. Sıcaklığın etkisi

Enzim reaksiyonlarının hızı sıcaklık arttıkça artar. Yüksek sıcaklıkta enzimler denatürasyona uğrayarak etkisiz hale geçerler (Yücel, 2008). Yapılan çalışmalarda her enzim için optimum sıcaklığın farklı olduğu görülmüştür.

Çalışmanın bu kısmında, ticari tutuklu Novozym 435 (*Candida antarctica*) ve Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*) kullanılarak alg yağından biyodizel üretimine sıcaklığın etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.12’de verilmiştir. Novozym 435 için YAME içeriği, sıcaklığın 25°C’den 45°C’e yükselmesiyle önemli ölçüde artmıştır. Novozym 435 ile yapılan çalışmada, sıcaklık arttıkça verimin artması lipazın yüksek sıcaklıklarda daha aktif olduğunu göstermektedir. Lai ve diğ. (2012) alg yağıyla biyodizel üretimi gerçekleştirdikleri çalışmada, Novozym 435 için 50°C’nin uygun olduğunu belirlemişlerdir (Bkz. Tablo 1.14). Benzer olarak Hernandez ve diğ. (2008) tarafından 24 saat sonunda en yüksek dönüşümü elde etmek için Novozym 435 kullanıldığında en uygun sıcaklığın 60 °C olduğunu belirtmiştir.



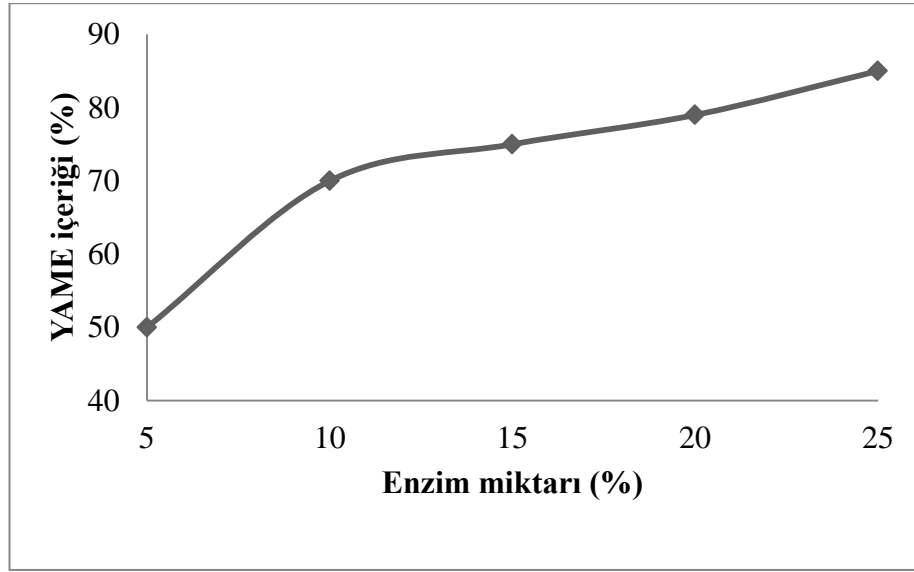
Şekil 3.12. Lipozyme TL IM ve Novozym 435 ile alg yağından biyodizel üretiminde sıcaklığın YAME içeriğine etkisi (24 saat, 300rpm, su içeriği %10, yağ/metanol mol oranı 1/4, enzim miktarı Novozym 435 için %25, Lipozyme TL IM için %5)

Lipozyme TL IM için sıcaklığın artmasıyla YAME içeriğinde önemli bir değişiklik olmamasına en yüksek YAME içeriği 35°C sıcaklıkta elde edilmiştir. Lipozyme TL IM kullanılarak Sim ve diğ. (2010) tarafından yapılan çalışmada, sıcaklığın 30°C'den 40°C'ye yükselmesiyle YAME içeriğinin %82'den %96'ya yükseldiği bildirilmiştir. Verimdeki bu artışın enzimle ilgili olmayıp, sıcaklığın artması nedeniyle palm yağının viskozitesinin azalmasıyla ilgili olduğu belirtilmiştir. Hernandez ve diğ. (2008), 24 saat sonunda en yüksek dönüşümü elde etmek için *Thermomyces lanuginosus* kullanımında en uygun sıcaklığın 25°C olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada, *Thermomyces lanuginosus* ve *Rhizomucor miehei* lipazlarının 60°C'de 24 saatte kısmi olarak deaktivasyona uğradığı, fakat Novozym 435'in bu çalışmadaki sıcaklıktan etkilenmediği görülmüştür (Yağız, 2006). Kanola yağı ve atık ayçiçeği yağıyla yapılan çalışmalarda ise, *Thermomyces lanuginosus* için en uygun sıcaklığın, 25-35°C olduğu belirtilmiştir (Akbin, 2012; Kutluk, 2013). Sonuç olarak en yüksek YAME içeriği için en uygun sıcaklığın, Novozym 435 için 45°C, Lipozyme TL 100 L için 35°C olduğu saptanmıştır.



### 3.2.5. Enzim miktarının etkisi

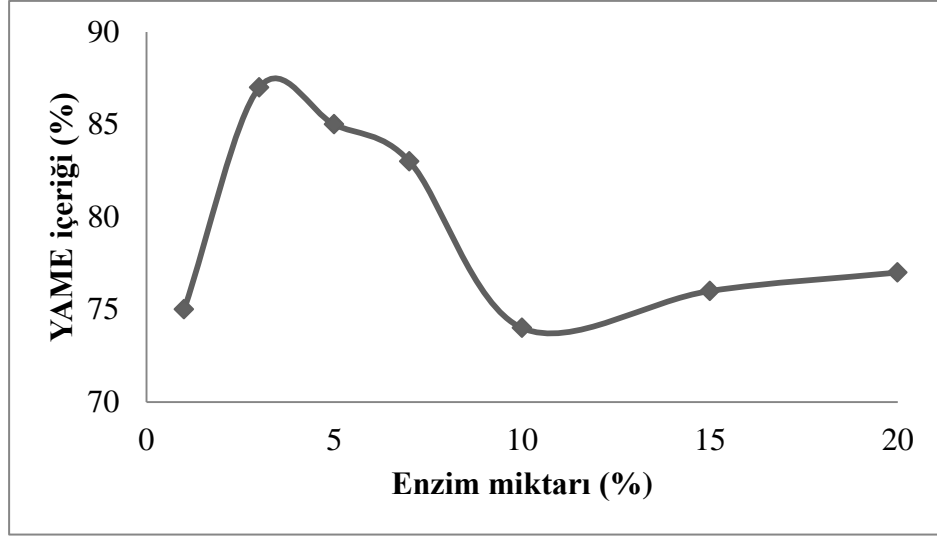
Bu çalışmada farklı enzim miktarlarında alg yağından biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Enzim miktarının YAME içeriğine etkisi Şekil 3.13, 3.14 ve 3.15'te verilmiştir. Novozym 435 için, enzim miktarı %5'ten %25'e (kütlece substratlara göre) yükseldiğinde en yüksek YAME içeriği %85 olarak elde edilmiştir (Şekil 3.13).



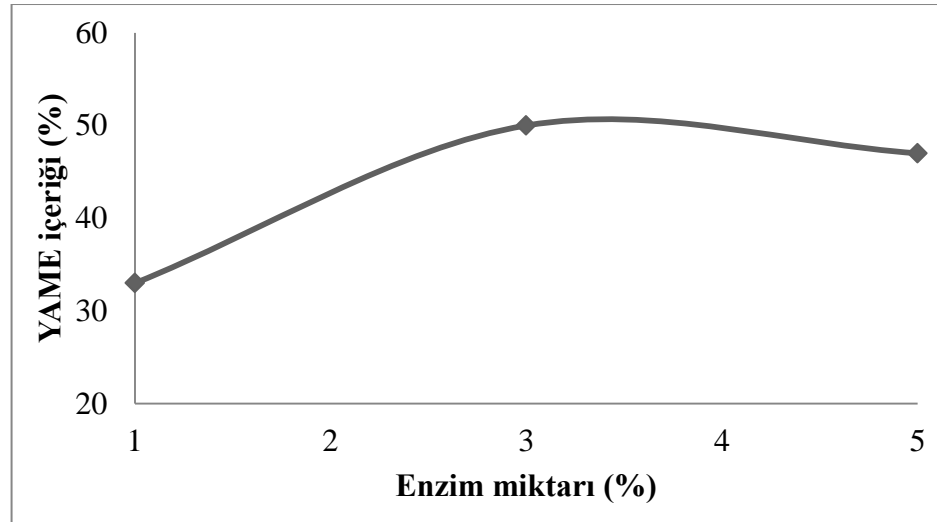
Şekil 3.13. Novozym 435 lipazı ile alg yağından biyodizel üretiminde lipaz miktarının YAME içeriğine etkisi (24 saat, 300rpm, su içeriği %10, yağ/metanol mol oranı 1/4, sıcaklık 45°C)

Lipozyme TL IM için enzim miktarı %3 iken en yüksek YAME içeriği %87 olarak elde edilmiştir (Şekil 3.14). Enzim miktarı bu değerin üzerinde olduğunda, YAME içeriği düşmeye başlamıştır. Bunun nedeni, artan enzim miktarıyla enzimlerin kümelenerek kütle aktarım kısıtlamalarına neden olması ya da enzim miktarı arttığı için ortamdaki suyun enzimlerin aktif konformasyonunu koruması için yetersiz kalması olabilir.

Çapraz bağlı-TL'nin Lipozyme TL IM ile benzer davranış gösterdiği gözlenmiş, enzim miktarı %3 iken en yüksek YAME içeriğine ulaşılmıştır. Daha yüksek miktarda enzim kullanımında YAME içeriği düşmeye başlamıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.14. Lipozyme TL IM lipazı ile alg yağından biyodizel üretiminde lipaz miktarının YAME içeriğine etkisi (24 saat, 300rpm, su içeriği %10, yağ/metanol mol oranı 1/4, sıcaklık 35°C)



Şekil 3. 15. Çapraz bağlı-TL lipazı ile alg yağından biyodizel üretiminde lipaz miktarının YAME içeriğine etkisi (24 saat, 300rpm, su içeriği %10, yağ/metanol mol oranı 1/4, sıcaklık 35°C)

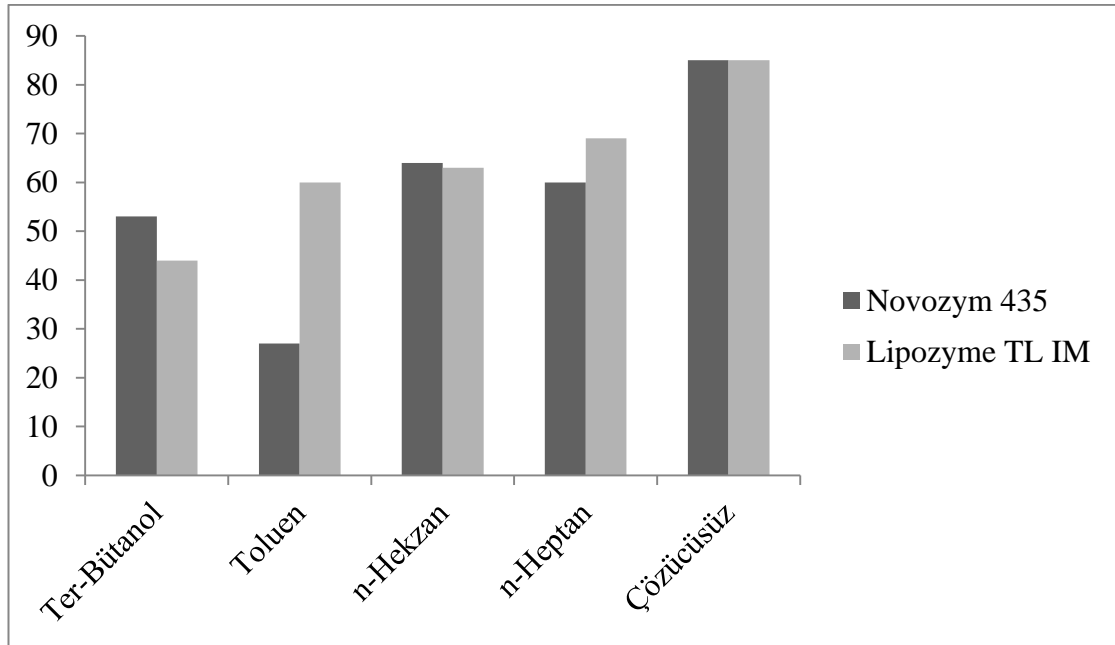
Benzer şekilde hidrotalsite tutuklanmış *Thermomyces Laniginosus* lipazı ile yapılan bir başka çalışmada, enzim miktarı %3 ün üzerine çıkıldığında YAME içeriklerinin düştüğü gözlemlenmiştir (Akbin, 2012).

### 3.2.6. Çözücü türünün etkisi

Kullanılan çözücülerin Log P değeri arttıkça çözücünün polaritesi azalır. Log P 2 ile 4 arasında olan çözücüler kısmen polardır. Bu nedenle reaksiyon ortamında hem

polar olan metanol ve suyu, hem de apolar gliserol ve yağı çözerek homojen reaksiyon karışım sağlarlar. Enzim üzerine biriken gliserolu çözerek enzim inhibisyonunu engellerler (Nielsen, 2009).

Bu bilgilerden yola çıkarak alg yağının transesterleşmesine çözücü türünün etkisinin incelenmesi amacıyla, ter-bütanol (log P 0,28), toluen (log P 2,386), hekzan (log P 3,657) ve heptan (log P 3,668) kullanılmıştır. Şekil 3.16'da Novozym 435 ve Lipozyme TL IM ile biyodizel üretiminde çözücü türünün YAME içeriğine etkisi görülmektedir. Her iki enzim için de çözücü kullanıldığı durumda YAME içeriklerinde düşüş meydana gelmiştir.



Şekil 3.16. Novozym 435 ve Lipozyme TL IM ile alg yağından biyodizel üretiminde çözücü türünün YAME içeriğine etkisi (24 saat, 300rpm, su içeriği %10, yağ/metanol mol oranı 1/4, çözücü oranı kütlece yağa göre 1/1, sıcaklık ve enzim miktarı, Novozym 435 için 45°C, %25, Lipozyme TL IM için 35°C, %5)

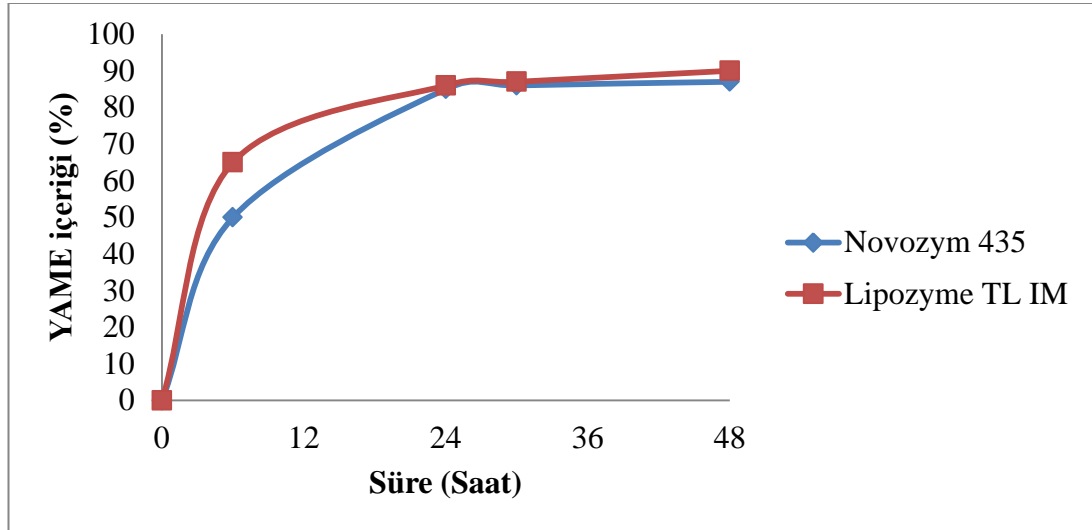
YAME içeriklerinde azalmanın nedeni, çözücülerin enzimin üç boyutlu yapısına zarar vermesi ya da çözücülerin yağı ve metanolü kısmen çözmesiyle enzimin hidrofobik yüzeyleri ile yağ arasındaki etkileşimi engellemesi olabilir. Ayrıca ortamındaki fazla suyun (%10 oranında) çözücü tarafından lipaz mikroçevresinde tutulmasından dolayı, lipazın transesterleşme yerine hidroliz reaksiyonunu yürütmesine neden olmuş olabilir. Benzer şekilde Li ve diğ. (2006) Novozym 435 ve Lipozyme TL IM lipazları ile ter-bütanolü çözücü olarak kullanmışlar, yüksek su

içeriğinin performansı düşürdüğünü ve suyun eliminasyonu ile dönüşümün etkili bir biçimde arttığını göstermişlerdir. Aynı şekilde Lai ve diğ. (2012) alg yağı ve terbutanolle yapmış oldukları çalışmada, %44 gibi düşük bir YAME içeriği elde etmişlerdir. Atık kızartma yağı ve Lipozyme TL IM ile çeşitli çözücülerin (propanol, toluen, izooktan, hekzan) kullanıldığı başka bir çalışmada çözücüsüz duruma göre YAME içeriklerinde önemli azalmalar olduğu görülmüştür (Kutluk, 2013).

### 3.2.7. Reaksiyon süresinin etkisi

Enzimatik biyodizel üretiminde reaksiyon süresi, lipaz türüne, serbest ya da tutuklanmış formda olmasına ve substratlara göre farklılıklar göstermektedir.

Novozym 435 ve Lipozyme TL IM tutuklu lipazları için reaksiyon süresinin YAME içeriğine etkisi şekil 3.17’de verilmiştir. YAME içeriğindeki artışın 24. saatten sonra yavaşladığı görülmektedir. Lipozyme TL IM kullanımında Novozym 435’e göre reaksiyonun daha hızlı gerçekleştiği görülmektedir. 48 saat sonunda YAME içeriği, Lipozyme TL IM için %90, Novozym 435 için %87 olarak bulunmuştur.



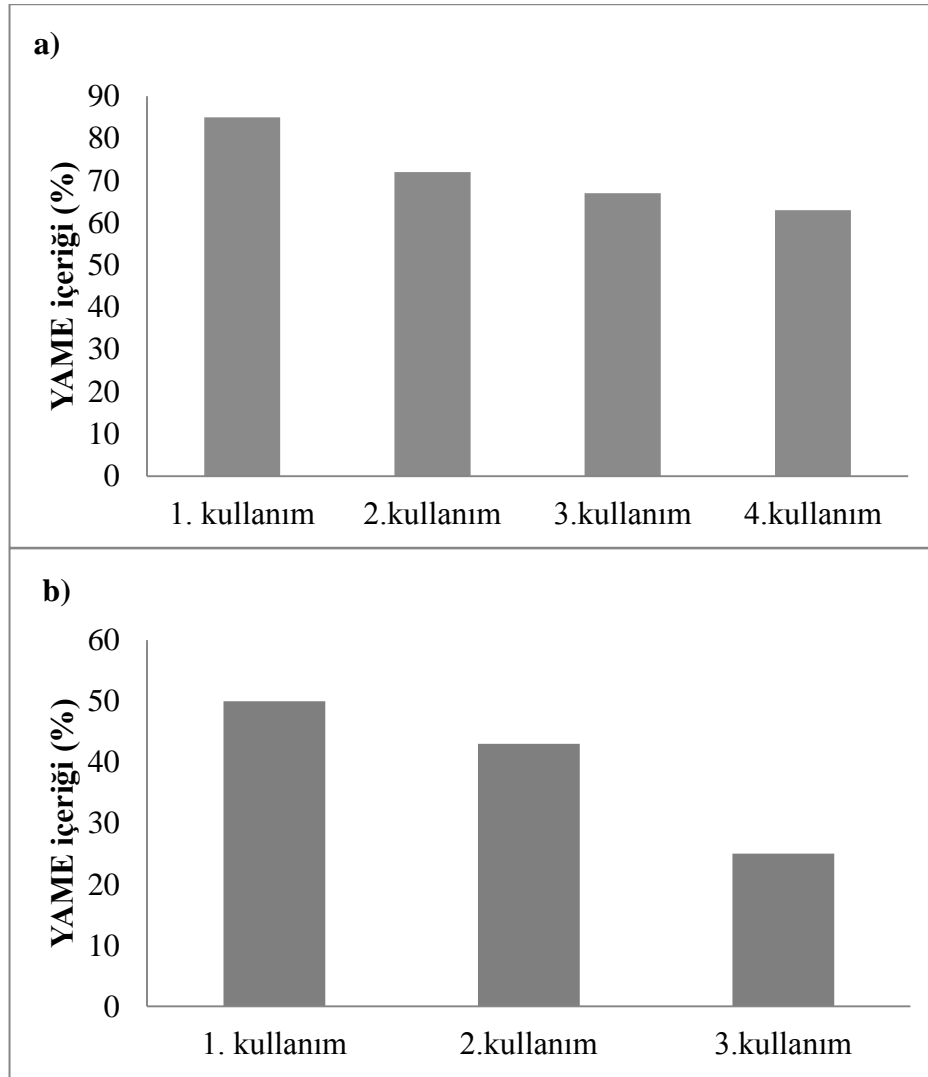
Şekil 3.17. Novozym 435 ve Lipozyme TL IM ile alg yağından biyodizel üretiminde sürenin YAME içeriğine etkisi (300rpm, su içeriği %10, sıcaklık ve enzim miktarı, Novozym 435 için 45°C, %25, Lipozyme TL IM için 35°C, %5)

Kutluk (2013) Lipozyme TL IM ile atık kızartma yağını kullanarak bu çalışmayla aynı şartlar altında gerçekleştirdikleri biyodizel üretiminde, 24 saat sonunda YAME içeriği %95 olarak belirlemişlerdir. Alg yağıyla gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada ise %85 YAME içeriği elde edilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında, farklı substratların ve

enzim türünün reaksiyon hızını değiştirerek YAME içeriğini nasıl etkilediği anlaşılmaktadır

### 3.2.8. Tekrar kullanımın etkisi

Endüstriyel uygulamalarda enzimlerin yüksek maliyetinden dolayı tekrar tekrar kullanılabilirliği önemlidir. Lipozyme TL IM ve çapraz bağlı-TL lipazlarının tekrar kullanılabilirliği şekil 3.18’de verilmiştir.



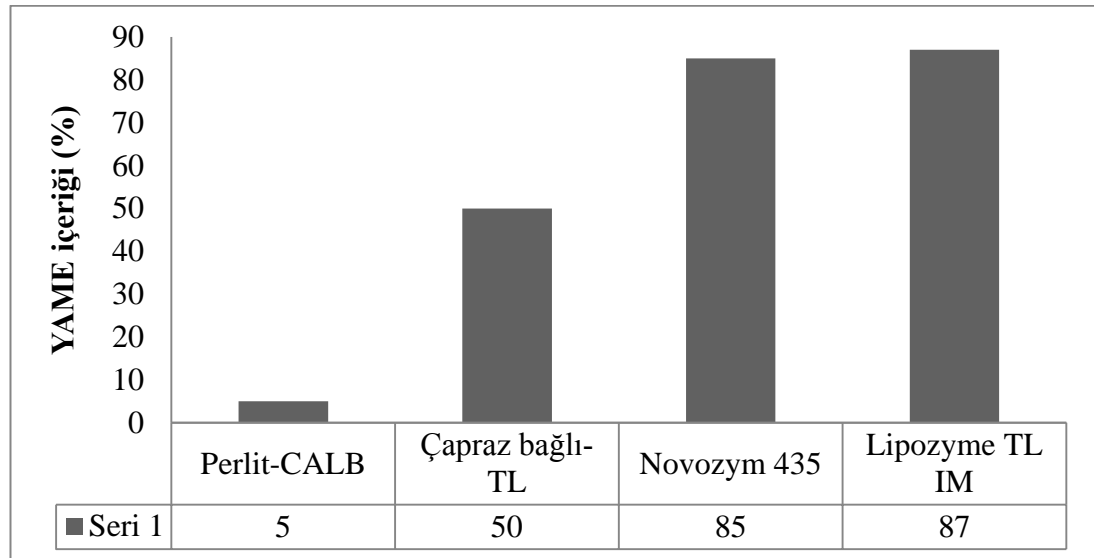
Şekil 3.18. a) Lipozyme TL IM, b) Çapraz bağlı-TL lipazlarının tekrar kullanılabilirliğinin YAME içeriğine etkisi (300rpm, su içeriği %10, sıcaklık 35°C, enzim miktarı Lipozyme TL IM için %5, çapraz bağlı-TL için %3)

Lipozyme TL IM kullanıldığında YAME içeriğinde 3. Ve 4. kullanımda 2. kullanıma göre daha yüksek oranda bir düşüş gözlemlenmiştir. 3. kullanımda düşüş hızı

yavaşlamıştır. Benzer şekilde Lipozyme TL IM ile yapılan diğer çalışmalarda 2. kullanımdaki aktivite kaybının, takip eden tekrar kullanımlara göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Li ve diğ., 2007; Wang ve diğ., 2008). Soumanou ve Bornscheuer (2003) Lipozyme TL IM ile yaptıkları çalışmada, ikinci kullanımda dönüşüm %45 azalırken, 6 kullanım sonunda dönüşümde 2. kullanıma göre sadece %5lik bir azalma belirlemişlerdir. Tekrar kullanımla YAME miktarındaki azalma, enzimlerin destekten sıyrılmasından ya da destek üzerine biriken gliserolün kütle aktarım kısıtlamaları nedeniyle olmaktadır. Çapraz bağlı-TL ile yapılan çalışmada, 3. kullanım sonrası YAME içeriği ilk kullanıma göre %50 azalmıştır.

### 3.3.9. Enzim türünün etkisi

Şekil 3.19'da alg yağında biyodizel üretiminde, *Candida antarctica* lipazının ticari tutuklu (Novozym 435) ve perlite tutuklu formu (perlit-CALB) ile *Thermomyces laniginosus* lipazının ticari tutuklu (Lipozym TL IM) ve çapraz bağlı formu ile (çapraz bağlı-TL) ile elde edilen YAME içerikleri verilmiştir.



Şekil 3.19. Alg yağından biyodizel üretiminde farklı lipazların YAME içeriğine etkisi(24 saat, 300rpm, su içeriği %10, sıcaklık ve enzim miktarı Novozym 435 ve perlit-CALB için 45°C, %25, Lipozyme TL IM ve çapraz bağlı-TL için 35°C, %3)

Perlit destek kullanımında, gösterdiği düşük hidrolitik aktiviteye paralel olarak, YAME içeriği de çok düşük bulunmuştur. Çapraz bağlı-TL ise gösterdiği yüksek hidrolitik aktivite değerlerine rağmen, Lipozyme TL IM ile aynı reaksiyon şartlarında %50 YAME içeriğine ulaşabilmiştir. Çapraz bağlanma ile *Thermomyces*

*lanuginosus* enzimin optimum reaksiyon şartları değişmiş olabilir. Ticari tutuklanmış enzimler olan, Lipozyme TL IM ile %3 enzim ve 35°C sıcaklıkta %87 YAME içeriği elde edilirken, Novozym 435 kullanımında %25 enzim ve 45°C'de %85 YAME içeriği elde edilmiştir.

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada alg yağından lipaz katalizörlüğünde biyodizel üretimi amaçlanmıştır. Transesterleşme reaksiyonlarında, ticari tutuklu Novozym 435 (*Candida antarctica*) ve Lipozyme TL IM'nin (*Thermomyces lanuginosus*) yanı sıra aynı enzimlerin serbest formları tutuklanarak biyodizel üretimi incelenmiştir.

Serbest Lipozyme CALB (*Candida antarctica*) perlit ve kasline edilmiş perlit desteğe tutuklanmıştır. 45°C sıcaklık, pH 8,0 (tris-HCl tamponu) 2g ve 100µl enzim kullanıldığı şartlarda perlit ve kalsine perlit için en yüksek tutuklama verimleri %75 ve %79 olarak bulunmuştur. Fakat perlit-CALB'nin %6,6, kalsine perlit-CALB'nin ise %6,4 gibi düşük bağıl aktivitelere sahip oldukları görülmüştür. Aktivitelerin bu denli düşük olmasının nedenleri, perlit yüzeylerinin aktifleştirilmesi işleminin yeterince verimli olmaması, perlit yüzeyine adsorplanan protein moleküllerinin konformasyonlarının değişmesi sonucu enzim aktif konumlarının substratla birleşememesi olabilir.

Daha sonra Lipozyme TL 100L (*Thermomyces lanuginosus*) çapraz bağlanarak tutuklanmıştır. Çapraz bağıl agregatlarının pH 8,0'de %98 tutuklama verimi ve %97 bağıl aktiviteyle üretilmesi sağlanmıştır.

Bu sonuçlara bakıldığında perlit desteğin lipaz tutuklama için uygun bir malzeme olmadığına karar verilmiştir. Çapraz bağlama yöntemi uygulanmış, ancak çok fazla parametre incelenememiştir. Bu nedenle, çapraz bağlama ile ilgili farklı parametreler (süre, glutaraldehit ve çöktürücü miktarı, çöktürücü türü vb.) incelenerek tutuklama işlemi geliştirilebilir. Çapraz bağlamayla enzim daha stabil hale gelmiş ve reaksiyon ortamında çözünmeyerek tekrarlanan kullanımlara elverişli bir biyokatalizör elde edilmiştir. Yöntemin dezavantajı ise, enzimlerin birbirine çapraz bağlanırken kendilerinin bir kısmını destek malzemesi olarak kullanmaları nedeniyle çok fazla miktarda sıvı enzim kullanılması gerekmektedir.



Biyodizel üretimi kısmında su miktarı, sıcaklık, katalizör miktarı, yağ/metanol mol oranı, tek basamaklı, iki ve üç basamaklı metanol ekleme ve çözücü kullanımının lipaz katalizli biyodizel üretimine etkileri incelenmiştir. Perlit-CALB ile biyodizel üretiminde düşük aktivite değerlerine paralel olarak YAME içeriği en çok %5 olmuştur. 1/4 yağ/metanol mol oranı, yağa göre kütlece %10 su eklenmesi ile metanolün üç basamakta eklendiği durumda, 24 saatte, Novozym 435 ile 45°C ve %25 (yağa göre kütlece) oranında enzim kullanıldığında %85, Lipozyme TL IM ile ise 35°C ve %3 oranında enzim kullanıldığında %87 YAME içeriği elde edilmiştir. Bu şartlarda reaksiyon süreleri 48 saate uzatıldığında Novozym 435 ile %87 ve Lipozyme TL IM ile %90 YAME içeriğine ulaşılmıştır.

Her iki enzim için de yukarıda belirtilen optimum şartlarda farklı çözücüler kullanarak biyodizel üretimi incelenmiş ve YAME içeriklerinde önemli düşüşler meydana gelmiştir. Bu durumun çözücüsüz ortam için belirlenmiş olan optimum su oranının çözücülü sistem için yüksek gelmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Çözücü kullanımında su miktarı azaltılarak YAME içeriğinin yükselmesi sağlanabilir. Ancak çözücülerin kullanılması tehlikelidir. Ayrıca reaksiyon sonrası ortamdaki ayrılma ve geri kazanılma işlemleri ek maliyet getirmektedir. Bu nedenle ileride yapılabilecek ticari ölçekli üretimler için çözücüsüz reaksiyon sistemlerinin optimize edilmesi daha uygun görülmektedir.

pH 8,0'de yüksek hidrolitik aktivite göstermiş olan çapraz bağlı-TL kullanılarak Lipozyme TL IM için belirlenen optimum koşullarda yapılan deney sonucunda, en fazla %50 YAME içeriği elde edilmiştir. Bu durumda çapraz bağlı-TL ile farklı reaksiyon koşulları (sıcaklık, enzim miktarı, su miktarı vb.) denenerek daha yüksek YAME içerikleri elde edilebilir.

Çapraz bağlı- TL ve Lipozyme TL IM'nin tekrar kullanımıyla ilgili yapılan çalışmada YAME içeriklerinde önemli azalmalar gözlemlenmiştir. Tekrar kullanım sonrasında enzimlerin uygun çözücülerle yıkanarak aktivitelerini geri kazanmaları sağlanabilir.

Sonuç olarak, daha düşük sıcaklık ve daha az enzim miktarı kullanılarak, ticari tutuklu Lipozyme TL IM'nin *Chlorella protothecoides* kaynaklı alg yağından

biyodizel üretimi için çalışmada kullanılan enzimler arasında en uygun biyokatalizör olduğu belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

Adamczak M., Bornscheuer U. T., Bednarski W., The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2009, **111**, 808–813.

Adlercreutz P., *Fundamentals of biocatalysis in neat organic solvents*, 1st ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2008.

Ahmad A. L., Yasin N. H. M., Derek C. J. C., Lim J. K., Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011, **15**, 584–593.

Akbin H. M., Kanola yağından hidrotalsite tutuklanmış lipaz ile biyodizel üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012, 323173.

Akın İ., Yemişçioğlu F., Göksungur Y., Yağ sanayiinde biyoteknoloji uygulamaları, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum, Türkiye, 21-23 Mayıs 2008.

Al-Zuhair S., Production of biodiesel: Possibilities and challenges, *Biofuels Bioproducts Biorefining*, 2007, **1**, 57–66.

Antczak M. S., Kubiak A., Antczak T., Bielecki S., Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process, *Renewable Energy*, 2009, **34**, 1185–1194

Avşar G., Orjinal nitelikte florlanmış fosfin ve rodyum (I) komplekslerinin sentezi ve süperkritik karbondioksit ortamında hidrojenasyon reaksiyonlarında kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008, 178377.

Bailey J. E., Ollis, D. F., *Biochemical engineering fundamentals*, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1986.

Bilge G., Glukoz oksidaz bazlı enzim elektrotlarda elektriksel iletkenliğin geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010, 270251.

Bradford M., A rapid and sensitive method for the quantitaion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**, 248-254.

Cantone S., Lipases for bio-based chemistry - Efficient immobilised biocatalysts for competitive biocatalysed processes, *Chemistry Today Catalysis Applications*, 2012, **30**(3), 10-14

Demirbaş, A., Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey, *Energy Conversion and Management*, 2003, **44**, 2093-2109.

Devi P., Guo Z., Xu X., Characterization of cross-linked lipase aggregates, *Oil Chem. Soc.*, 2009, **86**, 637-642.

Elibol M., Yaşa İ., Karaçancı Ş., Çoban I., Özsoy G., Zeytinyağı işletmeleri katı (pirina) ve sıvı (karasu) atıklarından mikrobiyal lipaz üretimi, *Tübitak MAG Proje*, 106M464, 1-101, 2008.

Elmas P., Umudumuz Biodizel!. *Ar&Ge Bülten, Araştırma ve Meslekleri Geliştirme Müd., İzmir Ticaret Odası*, 2022, 32-38, 2008.

Fjerbaek L., Christensen K. V., Norrdahl B., A Review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification, *Biotechnol Bioengineering*, 2009, **102**, 1298-315.

Francisco E. C., Neves D' B., Jacob-Lopes E., Francoa T. T., Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2010, **85**, 395-403

Guaunque Torres M. P., Foresti M. L., Ferreira M. L., Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa*, *Biochemical Engineering Journal*, 2013, **72**, 18-23.

Gunstone F. D., Hilditch T. P., The union of gaseous oxygen with methyl oleate, linoleate and linolenate, *J. Chem. Soc.*, 1945, **105**, 836-841

Gupta P., Dutt K., Misra S., Raghuwanshi S., Saxena R. K., Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde, *Bioresource Technology*, 2009, **100**, 4074-4076.

Gupta M. N., Enzyme function in organic solvents, *Eur. J. Biochem.*, 1992, **203**, 25-32.

Guru M., Artukoglu B. D., Keskin A., Koca A., Biodiesel production from waste animal fat and improvement of its characteristics by synthesized nickel and magnesium additive, *Energy Convers. Manage*, 2009, **50**, 498-502.

Güler K., Biyodizel teknolojisi, sistem tasarımı ve deneysel olarak biyodizel üretimi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008, 179909.

Hanefeld U., Gardossi L., Magner E., Understanding enzyme immobilisation, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 453-468.

Hürrem F., Tükel S. S., Katalazın çapraz bağlı enzim agregatlarını (clea) oluşturma yöntemiyle immobilizasyonu ve karakterizasyonu, *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 2012, **28**(4), 95-104.

- Jegannathan K. R., Abang S., Poncelet D., Chan E. S., Ravindra P., Production of biodiesel using immobilized lipase: a critical review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2008, **28**, 253–264.
- Jothiramalingam R., Wang M. K., Review of recent developments in solid acid, base, and enzyme catalysts (heterogeneous) for biodiesel production via transesterification, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2009, **48**, 6162–6172.
- Kaplan C., Ayçiçek yağı metil esterinin dizel motorlarında alternatif yakıt olarak kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2001, 105932.
- Karimi A., Mousavi M. S., Ghiasi B., Grace J. R., Immobilization of  $\alpha$ -amylase on modified mesostructure perlite, *American Journal of Scientific Research*, 2011, **32**, 107-114.
- Kiernan J. A., Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do, *Microscopy Today*, 2000, **1**, 8-12.
- Koç M., Biyodizel üretimine uygun Türkiye’de yetişen ve yetiştirilecek bitkilerin ve biyodizel teknolojilerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2011, 297033.
- Kumari V., Shah S., Gupta M. N., Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*, *Energy & Fuels*, 2007, **21**, 368–372.
- Kutluk T., Kutluk B. G., Kapucu N., Enzymatic transesterification of algae oil from *Chlorella Protothecoides*, *Advanced Materials World Congress*, İzmir, Türkiye, 16-19 Eylül 2013.
- Kutluk T., Bitkisel atık yağlardan tutuklanmış lipaz katalizli biyodizel üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013, 342546
- Lai J., Hu Z., Wang P., Yang Z., Enzymatic production of microalgal biodiesel in ionic liquid [BMIm][PF6], *Fuel*, 2012, **95**, 329–333.
- Leung D. Y. C., Wu X., Leung M. K. H., A review on biodiesel production using catalyzed transesterification, *Appl. Energy*, 2010, **87**, 1083–95.
- 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.*, 2006, **43**, 58–62.
- Li, X., Xu, H., Wu Q., Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, **98**, 764-71.
- Lotero E., Goodwin J. G., Bruce D. A., Suwannakarn K., Liu Y., Lopez D. E., The catalysis of biodiesel synthesis, *Catalysis*, 2006, **19**, 41–83.

- Marchetti J. M., Migue U. V., Errazu A. F., Possible methods for biodiesel production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2007, **11**(6), 1300–1311
- Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S., Microalgae for biodiesel production and other applications: a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, **14**, 217–232,
- Meher L. C., Vidya, D., Naik, S. M., Technical aspects of biodiesel producti by transesterification, *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, 2006, **10**, 248-268.
- Nielsen P. M., Brask J., Fjerbaek L., Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations, rewiev article, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2008, **110**, 692–700.
- Noureddini H., Gao X., Philkana R. S., Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil, *Bioresource Technology*, 2005, **96**, 769–777.
- Ölçüm T., Biyodizel teknolojisi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Estitüsü, 2006, 180520.
- Özçimen D., Kolza küspesinin sabit yatak pirolizi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2001, 101379.
- Schenk P. M., Thomas-Hall S. R., Stephens E., Marx U. C., Mussgnug J. H., Posten C., Kruse O., Hankamer B., Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production, *Bioenerg. Res.*, 2008, **1**, 20–43.
- Sharma Y. C., Singh B., Upadhyay S. N., Advancements in development and characterization of biodiesel: a review, *Fuel*, 2008, **87**, 2355–73.
- Shimada Y., Watanabe Y., Samukawa T., Sugiharaa A., Nodac H., Fukuda H., Tominaga Y., Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1999, **76**(7), 789-793.
- Shuler M. L., Kargı, F. *Bioprocess Engineering: Basic concepts*, 2nd ed., Prentice Hall Inc.,USA, 2002.
- Sim J. H., Kamaruddin A. H., Bhatia S., Biodiesel (FAME) productivity, catalytic efficiency and thermal stability of Lipozyme TL IM for crude palm oil transesterification with methanol, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2010, **87**(9), 1027-1034.
- Soumanoua M. M., Bornscheuer T., Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acidmethyl esters from sunflower oil, *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **33**, 97-103
- Şahin Y., Akyurt İ., Planktonlar ve fotobiyoreaktörler-derleme, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi* , 2010, **1**, 83-92.

Şanlı H., Çanakçı M., Dizel motorlar için yükselen bir alternatif yakıt: biyodizel., 3. *Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu ve Sergisi*, Mersin, Türkiye, 19-21 Ekim 2005a.

Şanlı H., Farklı alkol ve katalizör kullanımının biyodizel üretimindeki etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2005b, 168880.

Şen S., Hayvansal yağlardan biyodizel üretimi ve dizel motor performans ve emisyonlarına etkisinin araştırılması, Karabük Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012, 316280.

Tekin G., Perlit ve sepiyolitin amonyumheptamolibat ile modifikasyonu ve elektrokinetik özellikleri, *Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2004, 6(2), 35-49.

Torabi S., Khajeh K., Ghasempur S., Ghaemi N., Siadat S. R., Covalent attachment of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase on perlite through silanization: activity, stability and co-immobilization, *Journal of Biotechnology*, 2007, **131**, 111–120.

Tran D. T., Chen C., Chang J., Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized lipase as the biocatalyst, *Bioresource Technology*, 2013, **135**, 213–221.

Umdü E. S., Tuncer M., Şeker E., Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported CaO and MgO catalysts., *Bioresour. Technol.*, 2009, **100**, 2828-31.

URL-1: [www.albiyobir.org.tr/files/img\\_etk/e06-1008-cevdetdemir.ppt](http://www.albiyobir.org.tr/files/img_etk/e06-1008-cevdetdemir.ppt) (Ziyaret Tarihi: 20 Kasım 2013).

URL-2: <http://www.biyomotorin-biodiesel.com/biomoto.html> (Ziyaret Tarihi: 16 Kasım 2013).

URL-3: [http://biodizel.tr.gg/AG-80-Extra\\_Metoksit.html](http://biodizel.tr.gg/AG-80-Extra_Metoksit.html) (Ziyaret Tarihi: 22 Kasım 2013).

URL-4: <http://www.science.uwaterloo.ca/~cchieh/cact/applychem/heterocat.html> (Ziyaret Tarihi: 1 Aralık 2013).

URL-5: <http://www.textara.com/> (Ziyaret Tarihi: 15 Kasım 2013).

URL-6: <http://enzymetechnology.blogspot.com/> (Ziyaret Tarihi: 3 Aralık 2013).

URL-7: <http://www.perlite.net/> (Ziyaret Tarihi: 25 Aralık 2013).

URL-8: <http://biyokure.org/protein-cokturme-yontemleri/152/> (Ziyaret Tarihi: 30 Kasım 2013).

URL-9: <http://www.egebiyoteknoloji.com/> (Ziyaret Tarihi: 5 Ekim 2013).

URL- 10: [www.en-standard.eu](http://www.en-standard.eu) (Ziyaret tarihi: 25 Aralık 2013).

Valdés E. C., Soto L. W., Arcaya G. A., Influence of the pH of glutaraldehyde and the use of dextran aldehyde on the preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Burkholderia cepacia*, *Electronic Journal of Biotechnology*, 2011, **14**(3), 10-10.

Vermeersch G., Development of a Biodiesel Activity, *3th. International Congress and Expo Lipids, Fats, and Oils*, Würzburg, Germany, 8-10 October 2000.

Winkler U. K., Stuckmann M., Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*, *Journal of Bacteriology*, 1979, **138**(3), 663-670.

Xiao M., Intan R., Obbard J. P., Biodiesel production from microalgae oil-lipid feedstock via immobilized whole-cell biocatalysis, *Proceedings Venice, Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste*, Venice, Italy, 8-11 November 2010.

Xiong W., Li X., Xiang J., Wu Q., High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **78**, 29–36.

Xu H., Miao X., Wu Q., High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters, *Journal of Biotechnology* 2006, **126**, 499–507.

Yadav G. D., Jadhav S. R., Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2005, **86**, 215–222.

Yağız F., Hidrotalsit ve zeolit üzerine tutuklanmış lipaz ile yemeklik atık yağlardan biyodizel üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006, 197913.

Yang X., Zheng P., Ni Y., Sun Z., Highly efficient biosynthesis of sucrose-6-acetate with cross-linked aggregates of Lipozyme TL 100 L, *Journal of Biotechnology*, 2012, **161**, 27-33.

Wang Y., Wu H., Zong M. H., Improvement of biodiesel production by Lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer, *Bioresource Technology*, 2008, **99**, 7232–7237

Yücel Y., Bazı enzimleri kullanarak biyodizel üretimi ve biyodizel özelliklerinin analitik yöntemlerle araştırılması, Doktora Tezi, Uuldağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008, 246482.

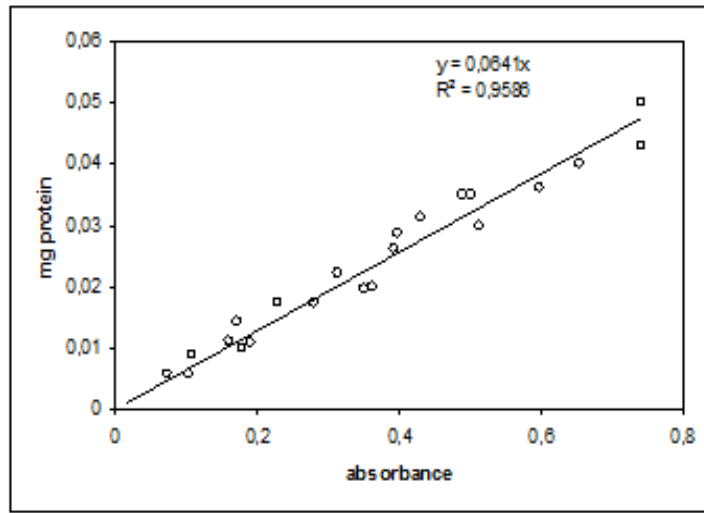


## **EKLER**

## EK A. Protein Tayini Hesaplamaları

Protein tayininde izlenen yöntem şu şekildedir;

- 1) 1 ml etanol, 2 ml fosforik asit, 0,45 ml brilliant blue çözeltisi, 15 ml saf su karıştırılarak Bradford çözeltisi hazırlanır.
- 2) Spektrofotometre 595 nm'ye ayarlanır, kuartz cam küvete 2,4 ml Bradford çözeltisi ve örnek hacmi kadar saf su eklenir (örneğin 100 µl) ve spektrofotometre sıfırlanır.
- 3) 2.4 ml bradford çözeltisine 100 µl örnek konur (örnek, tutuklama ortamının sıvı kısmından alınır), karıştırılır, 5 dakika beklenir, spektroda absorbans ölçülür.
- 4) Örneğin absorbansı ölçüldükten sonra Şekil A.1.'deki kalibrasyon grafiğinden absorbansa karşılık gelen protein miktarı bulunur.



Spektrofotometrede ölçtüğümüz örnek miktarı 100µl'dir. Kalibrasyon grafiğinden okunan protein miktarı (mg) 100 µl numune içindir. Bu değer 6 ml karışım ortamı için hesaplanır.

$m_0$ : t=0 anında 6 ml ortamda bulunan protein miktarı (mg)

$m_1$ : t=1 saat için 6 ml ortamda bulunan protein miktarı (mg)

d: 6ml ortamda bulunan destek miktarı (g)

$$\%tutuklama = \frac{(m_0 - m_1)}{m_0} \times 100$$

$$\frac{\text{mg protein}}{\text{g destek}} = \frac{m_0 - m_1}{d}$$

## EK B. Aktivite Tayini

Enzim hidrolitik aktivitesi para nitrofenil palmitatın (p-NPP) hidrolizi ile oluşan para nitrofenolün (p-NP) spektrofotometrik tayini ile aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

3mg tutuklu lipaz üzerine p-NPP çözeltisinden 75µl ve 2925µl tampon çözelti eklenir. 50°C'de 10dk süreyle inkübe edilir. Tepkimenin durdurulması için -18°C'de 8dk bekletilir. Tepkime karışımı tamponla 1/3 oranında seyreltilir ve 410nm'de UV-vis spektrofotometrede absorbansı okunur. Elde edilen absorbans değerleri ile kalibrasyon grafiği yardımıyla tepkime sonunda oluşan p-NP derişimi hesaplanır. Enzim aktivitesi (U), standart koşullarda (50°C sıcaklık ve pH 9,0) birim hacimde 1dk'da 1µmol p-NP üreten enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. pH 9,0 için tris-HCl tamponuyla hazırlanan enzim kalibrasyon grafiği Şekil EK B.1'de verilmiştir.

### Örnek Aktivite Hesabı:

Absorbans değeri: 2,83 (1 ml örnek)

(Absorbans değeri) x (kalibrasyon grafiğinin eğimi) (Şekil B.1.): 2,83 x 0,061= 0,173

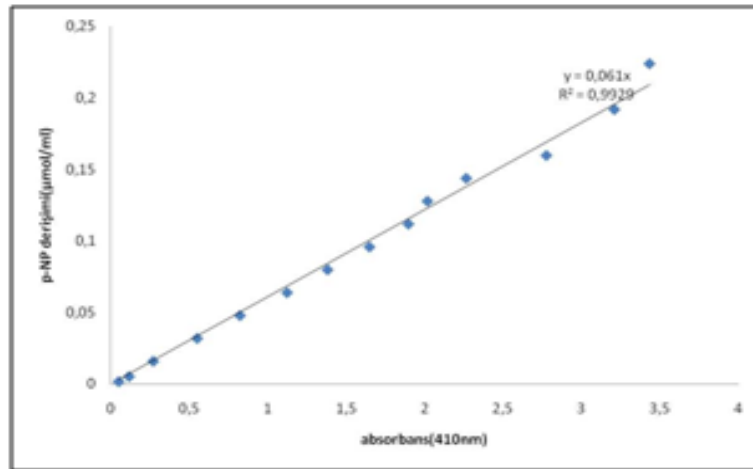
µmol/ml p-NP

0,173x3= 0,518µmol p-NP (3 ml örnek için)

Ünite(Bir dk'da oluşan p-NP miktarı ): 0,518/10 dk.= 0,052 p-NP/dk (U)

Spesifik aktivite=  $\frac{\text{Ünite}}{\text{Protein miktarı(g)}} = 0,052/0,003 = 17,26 \text{ U/g protein}$

Bağıl aktivite=  $\frac{\text{Tutuklu lipazın spesifik aktivitesi}}{\text{Serbest lipazın spesifik aktivitesi}} \times 100 = \frac{17,26}{17,89} \times 100 = 96,5$



Şekil B.1. Tris-HCl tamponu için pH 9,0 kalibrasyon grafiği (Akbin, 2012)

### **EK C. % Yağ Asidi Metil Ester İçeriğinin Örnek Hesaplanması**

Üst fazdaki YAME (yağ asidi metil esteri) içeriği EN 14103 standardına uygun olarak metilheptadekanoat iç standardı kullanılarak kalibre edilen gaz kromatografisi ile analiz edilmiş olup aşağıda verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır (European Standard EN14103, 2003) (URL- 10).

$$\%YAME = \frac{(\sum A) - A_{HM}}{A_{HM}} \times \frac{C_{MH} - V_{MH}}{m} \times 100$$

$\Sigma A$  = C14'teki metil esterden (metil miristat) C24:1 'teki metil estere (metil nervonat) kadar olan toplam pik alanı.

$A_{MH}$  = metil heptadekanoat'ın karşılığı olan pik alanı.

$C_{MH}$  = metil heptadekanoat çözeltisinin derişimi (10 mg/ml çözelti).

(mg/ml) 10 mg/ml çözelti.

$V_{MH}$  = metilheptadekanoat çözeltisinin hacmi (ml).

$m$  = örneğin kütlesi (mg)

## **ÖZGEÇMİŞ**

Gülşah Aydın, 1988 yılında Hereke’de doğdu. İlköğretimini Hereke Sümer İlköğretim Okulu’nda, lise eğitimini Körfez Oruç Reis Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2006 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü’nden 2010 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldu. 2010 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümü’nde yüksek lisans eğitimine başladı.