

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİTKİSEL ATIK YAĞLARDAN TUTUKLANMIŞ LİPAZ
KATALİZLİ BİYODİZEL ÜRETİMİ**

Togayhan KUTLUK

KOCAELİ 2013

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİTKİSEL ATIK YAĞLARDAN TUTUKLANMIŞ LİPAZ
KATALİZLİ BİYODİZEL ÜRETİMİ**

Togayhan KUTLUK

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


.....

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


.....

Yrd.Doç.Dr. Didem OMAV
Jüri Üyesi, Yalova Üniv.


.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 27.06.2013

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimin sonuna gelmiş bulunuyorum. Mesleğimin ayrıntılarını öğrenmek, ülkeme ve bilim dünyasına daha faydalı olmak için önümde aşmam gereken birçok engel olduğunun farkında olarak;

Yüksek lisans eğitimi boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Nurcan Kapucu'ya,

Engin tecrübelerini her an bir espriyle bağdaştırıp sunarak öğretmekte ustalığıyla hatırlayacağım Sayın Yrd. Doç. Dr. Başar Uyar'a,

Diğer branşlarda eğitimimde bana yardımcı olan hocalarıma ve ekiplerindeki herkese; birlikte çalışmaktan zevk aldığım değerli asistan arkadaşlarıma,

Her zaman her konuda bana engin desteğini sunan eşim Bahar Kutluk'a

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Haziran-2013

Togayhan KUTLUK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	5
1.1. Biyodizel	5
1.2. Biyodizel ve Çevre	8
1.3. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Yağlar	9
1.4. Yemeklik Atık Yağlar	9
1.5. Biyodizel Üretim Yöntemleri.....	10
1.5.1. Transesterleşme ile biyodizel üretimi.....	10
1.5.2. Katalizör kullanmadan biyodizel üretimi.....	11
1.6. Transesterleşme Tepkimesinde Kullanılan Katalizör Tipleri.....	11
1.6.1. Homojen katalizörler.....	12
1.6.2. Heterojen katalizörler.....	12
1.6.3. Enzim katalizörler	13
1.6.4. Enzim tutuklama yöntemleri	15
1.6.4.1. Çapraz bağlama.....	16
1.6.4.2. Hapsetme	16
1.6.4.3. Kapsülleme	17
1.6.4.4. Taşıyıcı bir yüzeye bağlama	17
1.7. Hidrotalsit.....	20
1.8. İnorganik perlit	21
1.9. Enzim Katalizli Biyodizel Üretimine Etki Eden Faktörler	21
1.9.1. Yağ türü.....	22
1.9.2. Alkol (açıl alıcı) türü	22
1.9.3. Enzim ve tutuklama desteği türü	23
1.9.4. Su miktarı	24
1.9.5. Sıcaklık.....	25
1.9.6. Süre.....	25
1.9.7. Yağ/metanol mol oranı.....	25
1.9.8. Çözücü türü	26
1.10. Konu İle İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar	26
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	36
2.1. Kimyasallar	36
2.2. Cihazlar	36
2.3. Yöntem	37
2.3.1. Üre hidrolizi yöntemiyle Mg-Al hidrotalsit hazırlama	37

2.3.2. Perlit yüzey aktivasyonu	38
2.3.3. Mg-Al hidrotalsit ve inorganik perlit üzerine lipaz tutuklanması	38
2.3.4. Bitkisel atık yağdan biyodizel üretimi	38
2.4. Analiz Yöntemleri	40
2.4.1. Protein tayini	40
2.4.2. Lipaz aktivitesi tayini	40
2.4.3. Yağ asidi metil ester analizi	40
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	41
3.1. Mg-Al Hidrotalsit ve İnorganik Perlit Desteğine Lipaz Tutuklama.....	41
3.2. Atık Kızartma Yağından Biyodizel Üretimi	44
3.2.1. Reaksiyon Ortamındaki Su Miktarının Etkisi	45
3.2.2. Sıcaklığın etkisi	46
3.2.3. Enzim türü ve miktarının etkisi	47
3.2.4. Yağ/metanol mol oranının etkisi	48
3.2.5. Alkol ekleme sıklığının etkisi	50
3.2.6. Karıştırma hızının etkisi	53
3.2.7. Çözücü türünün etkisi.....	54
3.2.8. Reaksiyon süresinin etkisi	57
3.2.9. Tutuklanmış lipazın tekrar kullanılması.....	58
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	64
EKLER.....	71
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER	75
ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Transesterleşme tepkimesi	10
Şekil 1.2.	<i>Humicola lanuginosa</i> üç boyutlu yapısı	14
Şekil 1.3.	Çapraz bağlı enzimin şematik gösterimi.....	16
Şekil 1.4.	Hapsetme yöntemiyle tutuklanmış enzimlerin şematik gösterimi.....	17
Şekil 1.5.	Kapsülleme yöntemi ile enzim tutuklama.....	17
Şekil 1.6.	Taşıyıcı yüzeye bağlı enzimin şematik gösterimi.....	18
Şekil 1.7.	Metanol ekleme sıklığının biyodizel verimine etkisi.....	27
Şekil 1.8.	Tutuklama işlemine pH ve sıcaklığın etkisi.....	28
Şekil 1.9.	Reaksiyon süresinin metil ester verimine etkisi	28
Şekil 1.10.	Tutuklanmış <i>Thermomyces lanuginosa</i> lipazı katalizörlüğünde % YAME içeriğine farklı yağ türlerinin etkisi.....	29
Şekil 1.11.	Bitkisel atık yağın metanolizi ile ortamdaki adsorbent türünün biyodizel üretimine etkisi	30
Şekil 1.12.	Transesterleşme tepkimesine lipaz kaynağının etkisi	32
Şekil 1.13.	Rafine ve atık ayçiçeği yağından <i>P. Fluorescens</i> katalizli biyodizel üretiminin YAME verimi	33
Şekil 2.1.	Deneysel çalışmada kullanılan ekipmanlar (a) çalkalamalı ve soğutmalı inkübatör, (b) hassas terazi, (c) mikrofantrifüj, (d) mikropipetler, (e) Lipozyme TL-IM ve Lipozyme TL-100L.....	37
Şekil 2.2.	Biyodizel üretiminde yağ ve gliserol fazı	39
Şekil 3.1.	Lipozyme TL 100 L'nin hidrotalsite tutuklanmasında Mg/Al mol oranı ve sürenin tutuklama verimine etkisi	42
Şekil 3.2.	Lipozyme TL 100 L'nin hidrotalsite tutuklanmasında Mg/Al mol oranı ve sürenin desteğe yüklenen enzim miktarına etkisi	42
Şekil 3.3.	Perlit desteğine Lipozyme TL 100 L'nin tutuklanmasında kalsinasyon işlemi ve sürenin tutuklama verimine etkisi.....	43
Şekil 3.4.	Perlit desteğine Lipozyme TL 100 L'nin tutuklanmasında kalsinasyon işlemi ve sürenin tutuklanan enzim miktarına etkisi.....	44
Şekil 3.5.	Atık kızartma yağından lipaz katalizli biyodizel üretiminde uygulanan ön işlemin ve enzim türünün YAME içeriğine etkisi	45
Şekil 3.6.	Atık kızartma yağından lipaz katalizli biyodizel üretiminde başlangıç su miktarının ve enzim türünün YAME içeriğine etkisi	46
Şekil 3.7.	Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde lipaz türü ve sıcaklığın YAME içeriğine etkisi	47
Şekil 3.8.	Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde lipaz türü ve enzim miktarının YAME içeriğine etkisi	48
Şekil 3.9.	Atık kızartma yağından lipaz katalizli biyodizel üretiminde enzim türü ve yağ/metanol mol oranının YAME içeriğine etkisi	49
Şekil 3.10.	UHT-TL katalizörlüğünde atık kızartma yağından biyodizel üretiminde alkol ekleme sıklığının ve sıcaklığın etkisi.....	50
Şekil 3.11.	Lipozyme TL-IM katalizörlüğünde atık kızartma yağından biyodizel üretiminde alkol ekleme sıklığının ve sıcaklığın etkisi.....	51

Şekil 3.12. Lipozyme TL 100 L katalizörlüğünde atık kızartma yağından biyodizel üretiminde alkol ekleme sıklığının ve sıcaklığın etkisi.....	52
Şekil 3.13. Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde enzim türü ve metanol ekleme sıklığının YAME içeriğine etkisi.....	53
Şekil 3.14. Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde karıştırma hızının ve enzim türünün YAME içeriğine etkisi	54
Şekil 3.15. Atık kızartma yağından UHT-TL ile biyodizel üretiminde çözücü türünün YAME içeriğine etkisi.....	55
Şekil 3.16. Atık kızartma yağından TL-IM ile biyodizel üretiminde çözücü türünün içeriğine etkisi.....	55
Şekil 3.17. Atık kızartma yağından TL 100L ile biyodizel üretiminde çözücü türünün YAME içeriğine etkisi.....	56
Şekil 3.18. Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde reaksiyon süresinin YAME içeriğine etkisi.....	57
Şekil 3.19. Tutuklanmış lipazın tekrarlı kullanımı sonucunda reaksiyon veriminin değişimi.....	58

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. ASTM standartlarına göre biyodizel ve dizel yakıt içeriklerinin sınır değerleri.....	6
Tablo 1.2. Biyodizel ve dizelin element bazında karşılaştırılması.....	7
Tablo 1.3. Biyodizel ve dizel yakıtların bileşik bazında karşılaştırılması	7
Tablo 1.4. Biyodizel üretiminde kullanılan yağlar	9
Tablo 1.5. Biyodizel üretiminde çözücülü ve çözücüsüz ortamda kullanılan mikrobiyal kaynaklı lipazlar.....	15
Tablo 1.6. Basamaklı metanol eklemeli enzimatik transesterleşme tepkimeleri	23
Tablo 1.7. TPP ve mikrodalga işlemlerinden sonra lipaz aktivitesinin değişimi.....	31
Tablo 1.8. Literatürde atık kızarma yağından enzim katalizli biyodizel üretimi üzerine yapılmış bazı çalışmalar.....	35

SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR

°A	: Angstrom
°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
A.B.D.	: Amerika Birleşik Devletleri
EN	: European Standards (Avrupa Standardı)
FID	: Flame Ionization Dedector (Alev iyonlaştırıcı dedektör)
TPP	: Triphase Partitation (Üç faz ayrımı yöntemi)
UHT	: Mg-Al hidrotalcite by urea hydrolysis (Üre hidrolizinden elde edilen Mg-Al hidrotalsit)
UHT-TL	: Mg-Al Hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100 L
YAME	: Yağ Asidi Metil Esteri

BİTKİSEL ATIK YAĞLARDAN TUTUKLANMIŞ LİPAZ KATALİZLİ BİYODİZEL ÜRETİMİ

ÖZET

Sınırlı enerji rezervleri ve fosil yakıtlardan dolayı atmosferde artan sera gazları nedeniyle, biyodizel (Yağ asidi metil esterleri, YAME), her ülkenin politik gündeminin bir konusu haline gelmiştir. Bu çalışmada serbest *Thermomyces lanuginosa* lipazı üre hidrolizi yöntemi ile hazırlanan Mg-Al hidrotalsite ve inorganik perlite tutuklanmıştır. Tutuklanmış lipaz katalizörlüğünde atık yemeklik yağın metanol ile transesterleşmesiyle biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalkalama hızı (150 – 300 rpm), sıcaklık (25 – 45 °C), başlangıç su miktarı (%0-20), metanol ekleme sıklığı (tek, iki ve üç basamak), enzim miktarı (%1-10), yağ/metanol mol oranı (1/3, 1/4, 1/6), çözücü türü (hekzan, isooktan, propanol, toluen) gibi parametrelerin biyodizel üretimine etkileri incelenmiştir. Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış lipaz *Thermomyces lanuginosa* serbest lipazının, sıvı formdaki Lipozyme TL-100 L ve ticari tutuklanmış formu Lipozyme TL-IM'nin transesterleşme reaksiyonundaki performansları karşılaştırılmıştır. Reaksiyonlar 6ml'lik viallerde 24 saatlik sürede gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda, Mg-Al hidrotalsit için tutuklama verimi %36, inorganik perlit için %15 olmuştur. Transesterleşme reaksiyonu deneyleri sonucunda optimum su içeriği sırasıyla Lipozyme TL-100 L, Lipozyme TL-IM ve UHT-TL için %10, %15, %1 olarak bulunmuştur. 24 saat sonunda her enzim için optimum su içeriğinde, 35°C sıcaklıkta, çalkalama hızı 200 rpm, enzim miktarı %5, yağ/metanol mol oranı 1/4 ve metanol 3 basamak eklendiği koşulda en yüksek YAME içeriği üç enzim için sırasıyla %98, %83 ve %92 olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Atık bitkisel yağ, Biyodizel, Hidrotalsit, Perlit, *Thermomyces lanuginosa*.

BIODIESEL PRODUCTION BY IMMOBILIZED LIPASE CATALYSIS FROM WASTE VEGETABLE OIL

ABSTRACT

Due to limited energy reserves and the increasing environmental pressure on green house gases coming from the fossil fuels, biodiesel (Fatty acid methyl esters, FAMES), is becoming the hot topic of every country's policy agenda. In this study, *Thermomyces lanuginosus* lipase was immobilized on Mg-Al hydrotalcite prepared by the hydrolysis of urea and inorganic perlite. Biodiesel production of waste cooking oil with methanol by lipase catalyzed was investigated. Agitation speed (150–300 rpm), temperature (25–45 °C), initial water content (%0-20), methanol addition frequency (one, two, three step), amount of enzyme (%1-10), oil/methanol molar ratio (1/3, 1/4, 1/6), solvent type (hexane, isooctane, propanol, toluene) the effects of parametres on biodiesel reaction were studied. Transesterification reaction performances of commercially available immobilized lipase (Lipozyme TL-IM) and free lipase (Lipozyme TL 100 L) were compared to the immobilized lipase on the Mg-Al hydrotalcite (UHT-TL). The reactions were carried out in the 6ml volumed vials for 24 hours. According to the experimantal studies immobilization yield for Mg-Al hydrotalcite, inorganic perlite 36%, 15% respectively. At the end of transesterification reaction experiments it was found that initial water content of the media for UHT-TL, Lipozyme TL-IM and Lipozyme TL 100 L %10, %15, %10 respectively. When the reaction time of 24 hours in 1/4 oil/alcohol molar ratio, 3 step methanol addition at 35 °C with 5% the amount of enzyme, 200 rpm agitation speed and 1%, 15% and 10% water contents, the yields of FAME were 98%, 83%, and 92%.

Keywords: Waste vegetable oil, Biodiesel, Hydrotalcite, Perlite, *Thermomyces lanuginosa*.

GİRİŞ

Dünya genelinde çevre duyarlılığı ve buna bağlı olarak yasal yaptırımlar sürekli artmakta, insanlık daha temiz teknolojilere yönelmektedir. Çevreye zararlı atık miktarını azaltan veya yok eden teknolojilerle üretim yapan kuruluşların tasarımı ve geliştirilmesi sürdürülebilir kalkınmanın gereğidir. Gelişmiş ülkelerde kirliliğin azaltılmasında ve dünyadaki kaynakların yeniden kullanılabilir duruma getirilmesinde katalitik süreçlerin kullanımı çok yaygındır ve ekonomik açıdan önemlidir.

Fosil yakıtların rezervlerinin gittikçe azalması, CO₂, CH₄ gibi sera gazlarının yayılımı sonucu çevre kirliliği yaratmaları, insanoğlunun alternatif enerji kaynağı arayışını hızlandırmıştır. Alternatif enerji kaynağı olarak ön plana çıkan yenilenebilir enerji kaynakları içinde en büyük potansiyel sahibi “Biyokütle” dir. Ana bileşeni karbonhidrat bileşikleri olan bitkisel ve hayvansal kökenli bütün maddelere “Biyokütle Enerji Kaynağı” ve bunlardan elde edilen enerjiye ise “Biyokütle Enerjisi” denmektedir. Ayçiçeği, soya, kanola gibi yağlı tohum bitkileri; buğday, mısır, patates gibi karbonhidrat bitkileri; keten, kenevir, sorgum, kenaf gibi elyaf bitkileri; fasulye, bezelye gibi protein bitkileri; odun olarak çeşitli ağaçlar; dal, kabuk, sap, saman gibi bitkisel atıklar, şehirsal ve endüstriyel atıklar biyokütle enerji kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Biyokütle kökenli en önemli alternatif enerji kaynağı ise Biyomotorin ve Biyoyakıt olarak da isimlendirilen Biyodizel’dir (Karaosmanoğlu, 2002).

Giderek artan bilimsel çalışma ve tartışmalar sonucunda, biyodizel üretimi, özellikle Avrupa Birliği ülkelerinde büyük bir ivme kazanarak 1991 yılında Avusturya’da ilk endüstriyel biyodizel tesisinin kurulması ile ticarileşmiştir. 1970’li yıllarda yaşanan petrol krizi nedeniyle petrol kaynaklarının giderek azalması ve çevreye olan duyarlılığın artması nedeniyle fosil yakıtlara olan yaygın bağımlılığımızı kaldırabilecek yeni teknolojileri, yeni endüstriyel biyoürünleri geliştirmek için biyodizel üretimine eğilim artmıştır. Bu hızlı artışı teşvik eden önemli bir adım

Avrupa Konseyi ve Avrupa Parlamentosunun 2003 yılında yayınladığı “Biyoyakıtların Kullanımını Teşvik Direktifi” olmuştur. Türkiye biyodizel üretim potansiyeli açısından Almanya’dan sonra önemli üretici ülkeler arasında yer almaktadır. Ülkemizde modern biyodizel tesisleri olduğu gibi, yağ fabrikalarına eklemeler yapılarak biyodizel üretim tesislerine dönüştürülen üretim tesisleriyle de karşılaşmaktadır. Bununla birlikte, özellikle küçük ölçekli işletmelerin kullanımı için tasarlanan esterleşme makinelerinin de piyasadan temin edilip, biyodizel üretiminde kullanıldığı görülmektedir

Tüm dünyada yaşanan gelişmeler neticesinde biyodizel tesis sayısı yüzü aşmış ve üretim miktarı artış göstermiştir. 2006 yılında Avrupa’da biyodizel üretimi 4,9 milyon ton, Amerika’da 0,9 milyon ton olmuş ve 2007 yılında dünyadaki yıllık üretimi ise 8,5 milyon tona ulaşmıştır.

Bitkisel ve hayvansal yağların kısa zincirli alkoller ile tepkimeye girmesiyle oluşan bir alkil ester karışımı olan biyodizel, benzer özellikleri nedeniyle, dizele alternatif olabilecek bir yakıttır. Biyodizel konusunda 2008 Türkiye verilerine göre resmi olarak faaliyet gösteren, işleme ve dağıtım lisansına sahip 59 adet firmanın bulunmasına rağmen günümüzde, bu firmaların önemli bir bölümü aktif olarak faaliyet göstermemektedir. 2011 Çevre ve Şehircilik Bakanlığı verilerine göre ise 3 firmanın bitkisel atık yağ toplama ve biyodizel üretme lisansına sahip olduğu görülmektedir.

Ülkemizde biyodizel konusunda temel olarak maliyet sorunu ile karşılaşmaktadır. Biyodizel üretiminin %84’ünü hammadde, %7’sini kimyasallar, %4’ünü su ve elektrik, %5’ini sabit giderler oluşturmaktadır. Biyodizel tamamen bitkisel yağlardan katalizör yardımıyla elde edilen ve çoğu dizel araçta hiç bir modifikasyon yapmadan direkt olarak kullanılabilen bir yakıttır. Her türlü yağ bitkisinden üretilebileceği gibi, yemeklik atık yağlardan da biyodizel üretimi mümkündür (Yücel ve Demir, 2011). Son yıllarda Malezya, İtalya, ABD, Fransa, Almanya, Avustralya, Brezilya, Arjantin gibi ülkelerde biyodizel üretimi oldukça yaygınlaşmıştır. İlk olarak 1895’te Dr. Rudolf Diesel’in yerfıstığı yağı kullanarak dizel yakıt elde etmesiyle (Fanguri, 1999) gündeme gelen biyodizel yakıtın 1990’lardan itibaren dünyada kullanımı yaygınlaşmıştır. Bugün ABD ve AB ülkeleri ile Malezya’da üretimi ve kullanımı

önemli miktarlara ulaşan biyodizelin fosil yakıtlardan elde edilen ürünlere göre çeşitli avantajları vardır (Krawczyk, 1999). Biyodizel üretiminde hammadde olarak atık yağların kullanılması ile hem çevre sorunlarının azaltılması hem de üretim maliyetinin düşürülmesi mümkün olmaktadır. Biyodizelin kullanımı petrol ürünü yakıt kullanımına kıyasla %15 yakıt tasarrufu sağlar (Körbitz, 1999).

Türkiye’de 2000’li yılların başında gündeme gelen biyoyakıtlar devamında ilk kez biyodizel ve biyoetanol ismi ile 4.12.2003 tarih ve 5015 sayılı “Petrol Piyasası Kanunu”nda harmanlanan ürünler arasında yer almıştır. Türkiye’de yılda 1.500.000 ton bitkisel yağ gıda amacıyla kullanılmaktadır. Bu yağdan yaklaşık olarak 350.000 ton atık yağ oluşmaktadır. İstanbul’da günde ortalama 100–150 ton arasında bitkisel ve hayvansal yağ atıkları oluşmaktadır (Öztürk, 2001). Bu yağların bir kısmı piyasada yağ toplama işi yapan birkaç firma tarafından toplanmaktadır. Çevre ve Orman Bakanlığı, atık bitkisel yağların toplanması ve geri kazanımı konusunda şimdiye kadar 22 firmaya izin vermiştir. Firma temsilcileri, 350.000 ton’luk atık yağın 50.000 ton’unun bile toplanamadığı görüşünde olup 300.000 ton atık yağ kayıp olduğunu varsaymaktadırlar. Türkiye’de kullanım oranı her yıl artan bitkisel ve hayvansal yağların yeterli derecede geri kazanılmadığı ve geri kazanılmadığı için de çevreye büyük zararlar verdiği açıkça görülmektedir. Bu hem insanların bu konudaki bilinçsizliği, hem yasal yaptırımların yetersiz oluşu hem de bu işi yapabilecek tesislerin yeterli olmayışından kaynaklanan bir durumdur.

Biyodizel ticari olarak homojen ve alkali katalizörler ile üretilir. Günümüzde ticari biyodizel üretimi, homojen, alkali katalizörler ile yüksek sıcaklıklarda yapılmaktadır. Yüksek sıcaklık, reaksiyon sonucunda ürünün ayrıştırma zorlukları ve kimyasal katalizörlerin çevreye verdikleri zararlar kimyasal proseslerin başlıca dezavantajlarından. Üretimde katalizör olarak enzimlerin kullanımı, ılımlı tepkime koşulları ile alternatif bir yöntem olmaktadır. Yan ürün gliserinin biyodizelden ayrılması kolay ve atık su miktarı daha azdır. Enzimlerin pahalı olması üretimin ticarileşmesini kısıtlamaktadır. Ancak gelişen genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak elde edilen enzimlerin uygun desteklere tutuklanmasıyla maliyet azaltılabilir.

Bu çalışmanın amacı serbest Lipozyme TL 100 L'nin Mg/Al hidrotalsit ve inorganik perlit desteğine tutuklanması, bitkisel atık yağdan biyodizel üretiminde kullanılabilirliğinin incelenmesi, serbest lipaz ile lipazın ticari tutuklanmış formu olan Lipozyme TL-IM ile karşılaştırılmasıdır.

Tez çalışmasında, tutuklanmış *Thermomyces lanuginosa* lipazı atık kızartma yağının metanol ile transesterleşmesi sonucunda biyodizel üretimi incelenmiştir. Literatürde konu ile ilgili yapılan az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmanın ilk aşamasında, Lipozyme TL 100 L (*Thermomyces lanuginosa*), serbest lipazı farklı molar oranlarda üre hidrolizi yöntemiyle elde edilmiş Mg/Al hidrotalsit desteğe ve perlit desteğe tutuklanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, lipaz katalizörlüğünde atık yağ ve metanol arasındaki transesterleşme reaksiyonu ile biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon parametrelerinin yağ asidi metil esteri dönüşümü üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kullanılan lipazlar, Mg/Al hidrotalsite tutuklanmış *Thermomyces lanuginosa* lipazı, aynı enzimin ticari tutuklanmış formu (TL-IM) ve serbest formudur.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Biyodizel

Dizel motorlarda yakıt olarak kullanılan ve yenilenebilir biyolojik maddelerden türetilen yakıtlar biyodizel olarak adlandırılır. Hayvansal yağlar ile soya fasulyesi, mısır ve ayçiçeği, alg gibi bitkisel ürünlerin yağlarından biyodizel yakıt üretiminde faydalanılır. Biyodizel saf olarak kullanılabilmesi gibi petrolden elde edilen dizel yakıtla karıştırılarak da kullanılabilir. Sebze yağlarının yakıt olarak kullanılabilmesini ilk olarak 1900'lü yılların başında Rudolph DIESEL yer fıstığı yağıyla dizel motorunu çalıştırarak göstermiştir. Fakat petrol hazır bir sektör olduğu için yaygınlaşması ancak bazı özel olaylar sonucu ve kısıtlı olmuştur. İkinci Dünya Savaşı, 1970'lerdeki petrol darboğazı ve yeni dönemde çevre bilincinin artması yeni enerji kaynaklarına ilgiyi artırmıştır. Biyodizel, yenilenebilir yağ kaynağından türetilen uzun zincirli yağlı asitlerin mono alkil esterleri olarak tanımlanır. Yani biyolojik kaynaklardan elde edilen ester tabanlı bir tür oksijenli yakıttır ve sıkıştırılmalı (dizel) motorlarda kullanılabilir. Mazotla belli oranlarda karıştırılarak kullanılabilir. Bu oran; ekonomi, gaz emisyonu, yanma özelliği gibi birçok faktöre bağlıdır ve genelde %20'lik karışım kullanılır. Bakterilerle ayrışabilen, zehirsiz, sülfürsüz ve hoş kokuludur. Bitkisel yağların metil veya etil esteridir. Elde edilen bitkisel veya biyolojik yağlar alkolle (genelde metanol) karıştırılır ve sodyum hidroksitle tepkime hızlandırılır. Kimyasal reaksiyon sonunda bir ester ve gliserin oluşur. Ester yakıt olurken gliserinde değerli bir ürün olarak birçok sektörde kullanılır. Amerika Standardı 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, vucuculuk) karakterize edilir. Tablo 1.1'de biyodizel ve dizel yakıtların bu özellikleri ASTM standardına göre karşılaştırmalı şekilde verilmiştir (Loterio ve Goodwin, 2006).

Tablo 1.1. ASTM standartlarına göre biyodizel ve dizel yakıt içeriklerinin sınır değerleri (Loteri ve Goodwin, 2006)

İçerik	Dizel	Biyodizel
Standart	ASTM D975	ASTM D6751
Kompozisyon	HC (C10-C21)	YAME (C12-C22)
Kinematik viskozite (mm ² /s) (313°K)	1,9-4,1	1,9-6,0
Spesifik ağırlık (g/ml)	0,85	0,88
Parlama noktası (°K)	333-353	373-443
Bulutlanma noktası (°K)	258-278	270-285
Akma noktası (°K)	238-258	258-289
Su (hacimce %)	0,05	0,05
Karbon (kütlece %)	87	77
Hidrojen (kütlece %)	13	12
Oksijen (kütlece %)	0	11
Sülfür (kütlece %)	0,05	0,05
Setan sayısı	40-55	48-60

Taşınabilirlik, kolay elde edilebilirlik, yüksek yanma verimi, düşük sülfür ve aromatik içerik, yüksek setan sayısı ve biyobozunabilirlik biyodizelin dizel yakıtı göre avantajlarıdır (Demirbaş, 2009). Bulutlanma noktası, akma noktası, yüksek viskozite, düşük enerji içeriği, yüksek nitrojen oksit emisyonu, enjektörde koklaşma, yüksek fiyat ve motor dezavantajları olarak sıralanabilir (Demirbaş, 2008, Akbin, 2012).

Biyodizelin setan sayısı (~50) daha yüksektir (Balat ve Balat, 2010), aromatik bileşik ve sülfür içermez, kütlece %10-11 oranında oksijen barındırır (Chhetri ve diğ., 2008). Biyodizelin parlama noktası yüksektir. Bu özellik yakıtın depolanması ve taşınması güvenlidir. Dizel yakıtların setan sayısı tutuşma kalitesini belirleyen bir özelliktir. Bu özellik, yakıtın motora enjekte edildiği anda tutuşmaya olan yatkınlığının ölçüsüdür. Tutuşma kalitesi biyodizelin, içeriğindeki YAME'nin yapısı ile belirlenir.

Biyodizel için viskozite de önemli bir özelliktir. Yüksek viskozite yakıt sprey atomizasyonunu kötü yönde etkiler (Balat ve Balat 2010). Tablo 1.2 ve Tablo 1.3'te biyodizel ve dizel yakıtın içeriğindeki element ve bileşik miktarları verilmiştir. Biyodizel yapısında bulunan oksijen nedeniyle dizel yakıtı göre daha polardır. Bu nedenle biyodizelin viskozitesi daha yüksektir (Kulkarni ve Bujar, 2008). Isıl değer yakıtın enerji içeriğinin bir ölçüsüdür. Biyodizelin düşük ısıl değeri (LHV) No. 2 dizel yakıtın LHV değerinden kütle bazında %12 daha azdır (16.000 Btu/lb, 18.300 Btu/lb) (Gerpen, 2004; Capehart, 2007; Akbin, 2012).

Tablo 1.2. Biyodizel ve dizelin element bazında karşılaştırılması (Kulkarni ve diğ., 2008; Akbin, 2012)

Elementler	İçerik (%)	
	Biyodizel	Dizel Yakıt
Karbon (C)	79,6	86,4
Hidrojen (H)	10,5	13,6
Oksijen (O)	8,6	-
Nitrojen (N)	1,3	-
C/H	7,6	6,5

Tablo 1.3. Biyodizel ve dizel yakıtların bileşik bazında karşılaştırılması (Kulkarni ve diğ., 2008; Akbin, 2012)

Bileşik Tipi	Biyodizel	Dizel Yakıt
n-Alifatik	15,2	67,4
Olefinikler	84,7	3,4
Aromatikler	-	20,1
Naftenler	-	9,1

Biyodizel dizel yakıtla belirli oranlarda karıştırılarak kullanılabilir ya da saf halde kullanılır. B2 (%2 biyodizel, %98 dizel), B5 (%5 biyodizel, %95 dizel), B20 (%20 biyodizel, %80 dizel) sık kullanılan biyodizel karışımlarıdır. Soğuk havada yakıt donması, düşük enerji yoğunluğu ve uzun süreli depolanmalarda yakıt bozulması bu karışımların teknik dezavantajlarıdır (Akbin, 2012). Her türlü dizel motorda B20

karışım oranına kadar olan biyodizel/dizel karışımları kullanılabilir. Bu karışım depo ve taşıma araçlarının birçoğu için uyumludur. Daha yüksek oranlı karışımlar ve B100 yakıtı, dizel motorda az bir değişiklik veya hiçbir değişim olmadan kullanılabilir. Fakat B100'ün depolanması ve nakliyesi için özel donanıma ihtiyaç vardır (Pandey, 2008; Akbin, 2012).

1.2. Biyodizel ve Çevre

Biyodizel yenilenebilir hammaddelerden elde edilerek sürdürülebilir bir enerji özelliğine sahiptir. Doğada biyolojik olarak hızlı ve kolay bozunur. Toksik etkisi yoktur. Yapılan araştırmalara göre biyodizelin, suda 28 günde %95'i, dizelin ise %40'ı bozunur. Atık bitkisel ve hayvansal yağlardan da üretilebilir. Bu nedenle biyodizel üretimi, atıklardan enerjinin geri kazanıldığı çevre dostu bir proses olarak değerlendirilebilir. Biyodizel dizel yakıtı göre emisyonu düşüktür. Daha düşük CO, CO₂, SO_x, poliaromatik ve partiküler madde içerir. AB tarafından yayınlanan araştırma raporu sonuçlarına göre; 1 litre dizel tüketiminden 3,2 kg CO₂ emisyonu meydana gelirken, biyodizel tüketiminde bu miktar 0,7 kg/L seviyesine kadar düşmektedir (Akbin, 2012).

Sera gazları içinde büyük bir orana sahip olan CO₂ küresel ısınmaya neden olmaktadır. Yanma sonucunda açığa çıkan ve sera gazları arasında yer alan CO, NO_x, SO_x, emisyonları da sera gazı etkisini hızlandırmaktadır. Tarımsal bitkilerden elde edilmesi nedeniyle biyodizel, biyolojik karbon döngüsü içinde, fotosentez ile karbon döngüsünü hızlandırdığı için sera etkisini azaltır.

Dizel yakıtı göre biyodizelin NO_x emisyonları fazladır. Bununla birlikte biyodizel kükürt içermez. NO_x kontrol teknolojileri biyodizel yakıtı kullanan sistemlere uygulanabilir. Dizel yakıtı kükürt içerdiği için NO_x kontrol teknolojilerine uygun değildir. Dizel yakıtın Ozon tabakasına olan olumsuz etkileri biyodizele göre fazladır. Biyodizel yakıtlarda asit yağmurlarına neden olan kükürt bileşenleri azdır. Ayrıca, biyodizelin sudaki canlılara karşı herhangi bir toksik etkisi yoktur. Buna karşılık 1 milyon litre içme suyunu 1 litre ham petrol kirletebilir (Dizge ve diğ. 2005).

1.3. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Yağlar

Biyodizel; birinci nesil yağlar (yenebilen) , ikinci nesil yağlar (atık yağlar ve yenmeyen), üçüncü nesil yağlar (alg ve tek hücreli canlıların yağı) asidik, bazik veya enzimatik eşliğinde bir alkol ile (metanol veya etanol) reaksiyonu sonucunda açığa çıkan ve yakıt olarak kullanılan yenilenebilir bir üründür (Dizge ve diğ., 2005). Tablo 1.4'te biyodizel üretiminde kullanılan yağlar gösterilmiştir.

Tablo 1.4. Biyodizel üretiminde kullanılan yağlar (Demirbaş, 2009)

Yağ Çeşidi	Yağ Kaynağı
Başlıca yağlar	Hindistan cevizi, mısır, pamuk çekirdeği, kanola, zeytin, fıstık, susam, soya, ayçiçeği
Fındık yağları	Badem, kaju, fındık, pekan cevizi, antep fıstığı, ceviz
Diğer yenebilen yağlar	Kayısı, enginar, avakado, defne, kişniş tohumu, çam fıstığı, üzüm çekirdeği, limon çekirdeği, bamyaya tohumu, pirinç kepeği, don yağı, buğday tohumu
Yenemeyen yağlar	Alg, babassu ağacı, jatrofa, kauçuk tohumu

1.4. Yemeklik Atık Yağlar

Kızartma koşullarına göre farklı derecede ve farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleşen reaksiyonlar sonunda kızartma yağında yüzlerce farklı yapıda, ancak hepsi polar karakterli bozunma ürünleri oluşmaktadır.

Örneğin; gıdanın içerdiği suyun neden olduğu yağ hidrolizi sonunda mono ve digliseridler, serbest yağ asitleri oluştururken, havanın ve gıdanın içerdiği oksijen, doymamış yağ asitlerinden, önce hidroperoksitlerin oluşmasına ve bu ara ürünlerin de hızla bozunarak çeşitli ikincil oksidasyon ürünleri ile bunların polimerizasyon ürünlerinin oluşmasına neden olur.

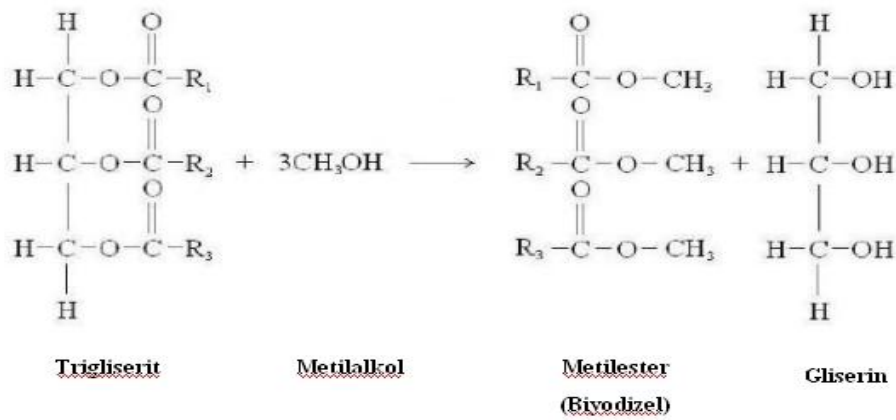
Polar madde oranı %25'i geçtiğinde kanserojen etki başlar, %75'lik biyodizel yapımına uygun trigliserit miktarı azalır. Kızartmalık yağların zamanında gıda zincirinden çekilmesi hem insan sağlığının hem de biyodizel yapmaya uygun hammadde kaynağının korunmasını sağlayacaktır.

Kızartma yağları; bir endüstriyel kızartma gıda veya yan ürün hazırlama sırasında, fast food zincirlerinde, büyük restoranlarda çok miktarda üretilir. Bu yağların çok az miktarı sabun üretiminde kullanılmıştır. Çünkü kızartma yağından üretilen sabunun kalitesi düşüktür, birçok kızartma yağı boşa gider ve ekonomik ve ekolojik problem oluşturur. Bu nedenle, kızartma yağlarından biyodizel üretimi daha etkili ve ekonomik alternatiftir bir yöntemdir. Atık kızartma yağlarının kimyasal katalizli transesterleşmesi hammaddenin ön arıtması, gliserolün ayrılması, katalizörün uzaklaştırılması ve yoğun enerjili proses (iyi dönüşüm için gerekli yüksek karıştırma hızı ve yüksek sıcaklık) olması gibi birçok probleme sahiptir. Enzim katalizli reaksiyonun kimyasal katalizli reaksiyonlara göre ürünün geri kazanımının kolay olması, ılımlı reaksiyon koşulları, katalizörün geri dönüşümünün olması gibi avantajları vardır. Enzimatik reaksiyonlar; serbest yağ asitleri ve atık pişmiş yağlardaki su içeriğine karşı duyarsız olması nedeniyle, Dolayısıyla atık kızartma yağlarının transesterleşmesi için en iyi alternatif olarak değerlendirilir (Charpe and Ratrod, 2011).

1.5. Biyodizel Üretim Yöntemleri

1.5.1. Transesterleşme ile biyodizel üretimi

Homojen ya da heterojen katalizör eşliğinde hayvansal ve bitkisel yağların alkol ile reaksiyon veren ester ve gliserolün olduğu tepkime transesterleşme tepkimesidir. Stokiyometrik transesterleşme tepkimesi Şekil 1.1'de görülmektedir (Akbin, 2012).



Şekil 1.1. Transesterleşme tepkimesi (Akbin, 2012)

Transesterleşme tepkimesi denge tepkimesi olduğu için ortama fazla miktarda alkol eklemek reaksiyonun ürünler tarafına kaydırır. Metanol, etanol, propanol, bütanol ve amil alkol transesterleşmede kullanılan en genel alkollerdir. Bu alkollerden metanol ve etanol en çok kullanılanlarıdır. Kısa zincirli ve polar bir alkol olan metanol düşük maliyeti olduğundan dolayı çok kullanılır (Leung ve diğ., 2010).

1.5.2. Katalizör kullanmadan biyodizel üretimi

Katalizör kullanılmadan transesterleşme tepkimesi, süperkritik ortam şartlarında metanol ile olabilir (Demirbaş, 2002). 8-10 dk'da %50-95 dönüşüme ulaşılabilindiğinden tepkime çok hızlıdır, fakat bu tepkime yüksek sıcaklıklarda (250-400 °C) ve basınçlarda (1200 psi) gerçekleşir (Al- Zuhair ve diğ., 2006). Bu nedenle yüksek üretim maliyeti ve enerji tüketimi gerektirir.

Transesterleşme tepkimesi alkali katalizörler kullanılarak yapıldığında serbest yağ asidi ve su oluşumu istenmeyen bir durumdur. Çünkü tepkime ortamında sabun oluşur ve katalizör etkinliğini kaybeder. Süperkritik yöntem, katalizörlü kimyasal tepkimeye karşı avantajlıdır. Çevre dostu bir prosesdir. Üretim sonrası metil estere karışmış katalizör ve sabun oluşumunun ayrılmasına ihtiyaç duyulmaz. Asitlik ve su içeriğinin süperkritik tepkimeyi etkilememesi biyodizel üretiminde pek çok hammaddenin kullanılabilmesine olanak sağlar. Örneğin yüksek asit ve su içermesine rağmen kalitesiz yağ ve kızartma yağ kullanılarak, süperkritik metanol ile biyodizel üretilebilir.

1.6. Transesterleşme Tepkimesinde Kullanılan Katalizör Tipleri

Katalizör, tepkimenin hızını arttırmak için kullanılan bir maddedir. Transesterleşme tepkimesinde kullanılan katalizörler asit, baz ve enzimlerdir. Yüksek oranda serbest yağ asidi içeren yağların transesterleşmesi için asit katalizörler uygundur (Schuchardta ve diğ., 1998). Yağın serbest yağ asidi içeriği enzim katalizli biyodizel üretiminde önemli değildir. Fakat tepkime süresi uzundur (24-48 saat). Bitkisel yağlar asidik özelliktedir. Tepkimeye giren alkol ve katalizör ise bazik özelliktedir. Biyodizel tepkimesi iki bazik ve bir asidik madde arasında oluşmaktadır. Katalizör madde pH değerinin 8 ile 9 ise tepkimeye kullanılması uygundur. Kullanılmış kızartma yağları ısıtma işlemleri sonucunda ortaya çıkan

serbest yağ asitleri nedeni ile yeni rafine edilmiş bitkisel yağlara göre daha asidik özellik göstermektedir.

1.6.1. Homojen katalizörler

Homojen katalizörler asidik ya da bazik özelliktedirler ve biyodizel üretiminde kullanılırlar. Sülfirik asit, fosforik asit, hidroklorik asit ve organik sülfonik asit biyodizel üretiminde kullanılırlar. Bu katalizörler sayesinde yüksek verim elde edilir. Ancak tepkime çok yavaştır. Asit katalizörler, transesterleşme tepkimesi için oldukça uygun katalizörlerdir (Schuchardt ve Serchelia, 1998).

Transesterleşme tepkimesinde sıklıkla kullanılan asit katalizör sülfirik asittir. Biyodizel üretimi için alkali katalizör daha yaygın olarak kullanılan katalizördür. Alkali katalizörün transesterleşme tepkimesindeki avantajı reaksiyonun kısa sürmesidir. Benzer sıcaklıklarda transesterleşme bir alkali katalizör varlığında aynı miktardaki asidik katalizör varlığından yaklaşık 4000 kez daha hızlı ilerler. Alkali katalizörler ile daha küçük hacimlerde alkoller ile çalışılabilir. Bu da mevcut reaktör hacimlerinin daha küçük olması demektir. Asit katalizörler ile üretim için gerekli miktarın yaklaşık yarısının KOH yoluyla tepkime verebilir (Chung ve diğ., 2009). Alkali transesterleşme tepkimesinde sodyum hidroksit (NaOH) ve potasyum hidroksit (KOH) kullanılmaktadır (Sharma ve diğ., 2008). Sodyum metoksit (CH_3ONa) ve potasyum metoksit (CH_3OK) de homojen katalizör olarak kullanılır ve NaOH ve KOH göre performansları çok daha iyidir. Çünkü CH_3ONa ve CH_3OK ile yürütülen transesterleşme tepkimesinde yan ürün olarak su oluşmazken, NaOH ve KOH ile gerçekleşen tepkimede az miktarda su oluşur (Leung ve Guo, 2006).

1.6.2. Heterojen katalizörler

Heterojen katalizörler reaksiyon ortamından ayrılıp tekrar kullanılabilir özelliktedirler. Mg/Al hidrotalsit, CaO, Mg/La heterojen katalizörlere örnektir.

Az aşındırıcı etkiye sahip olduklarından heterojen katalizörler homojen katalizörlerden daha avantajlıdır (Sharma ve diğ., 2008). Transesterleşme tepkimesinde homojen sıvı katalizör yerine tekrar kullanılabilir katı heterojen katalizör kullanmak üretim maliyeti için avantajlıdır. Bununla birlikte

transesterleşme ve esterleşme tepkimelerinin eş zamanlı yürütür. Heterojen katalizörler reaksiyonlarda daha az miktarda kullanılırlar (Akbin, 2012).

1.6.3. Enzim katalizörler

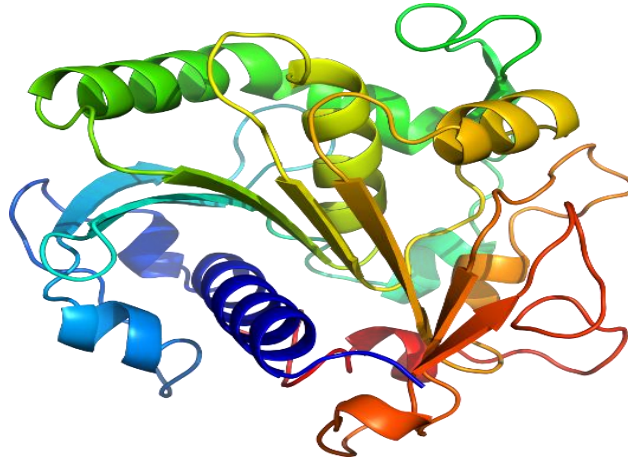
Kimyasal katalizörlerin dezavantajlardan dolayı enzimatik transesterleşme birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir Kimyasal katalizörlerin kullanımı sonucu aşırı miktarda atık su oluşumu ve reaksiyon ortamından gliserinin ayrılmasındaki güçlükler dezavantajdır. Enzim katalizli transesterleşme tepkimesi, ılımlı koşullarda (20°C - 50°C) düşük enerji ile gerçekleşir. Yan ürün oluşmaz, ürün reaksiyon ortamından kolay ayrılır (Kulkarni ve Dalai, 2006). Enzimatik transesterleşmenin en temel dezavantajları, enzim maliyetinin yüksek, tepkime hızlarının düşük olması, substrat olarak kullanılan metanolün ve yan ürün olarak oluşan gliserolün enzim üzerine inhibisyon/deaktivasyon etkilerinin olmasıdır. Bu dezavantajları aşmak için enzimler uygun desteklere tutuklanabilir. Bu sayede geri kazanımı ve tekrar kullanımı ile enzim maliyeti düşürülebilir. Hücre içi ve hücre dışı lipazlarla enzim katalizli biyodizel üretimi gerçekleştirilmektedir. Hücre dışı lipaz, öncelikle sıvı besiyerindeki mikroorganizmadan üretilir. Lipaz üreten başlıca mikroorganizmalar; *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica* ve *Pseudomonas cepacia*'dır. Reaksiyon ortamında mikroorganizma kullanılır. Hücre içi lipaz, mikroorganizmanın kendisidir.

Lipazlar hidroliz, transesterleşme ve esterleşme tepkimelerinde kullanılırlar. Lipaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar doğal metabolik reaksiyonlara benzerler. Bu nedenle daha çevre dostudurlar. Lipazlar düşük aktivasyon enerjileri ile reaksiyonları daha düşük sıcaklık ve nötral pH değerlerinde gerçekleştirirler. Ürün ve substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir. Lipazlar genellikle optimum aktivitelerini 30-40 °C arasında göstermektedir (Kurashige ve diğ., 1989).

Lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açıl hidrolaz) hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bunun dışında esterleşme, transesterleşme gibi reaksiyonları da katalizlemektedir. Enzimin maliyeti yüksektir. Buna ek olarak moleküler biyoloji yolu ile enzimin maliyeti de düşürülebilir. Bunun için genetik özellikleri geliştirilmiş olan lipazın büyük miktarlarda üretimi sağlanabilir. Lipaz spesifikliğı (özgüllüğü), substrat ve stereo

seçicilik olarak üç temel grupta toplanır. 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. Bunlardan başka, yağ asidi seçici lipazlar da vardır. Bunlar ise cis-9 pozisyonuna duyarlıdır. *Geotrichum candidum* lipazı cis-9 pozisyonunda çift bağ içeren uzun yağ asitlerine seçicidir.

Lipazlar, suda çözünmeyen substrat fazı ile su fazının ara yüzeyindeki ester bağlarını hidroliz ederler. Ara yüzeydeki katalitik etki substratın nasıl kümeleneyeceğine bağlıdır. Şekil 1.2’de lipaz enziminin üç boyutlu yapısı görülmektedir. Ara yüzeyin olmaması durumunda lipaz ikincil yapı elemanlarına sahiptir ve bu yapı enzimin substrata ulaşmasını engeller. Fakat hidrofobik bir ara yüzey ile karşılaşması durumunda lipaz “açık yapı” durumuna geçer ve aktif hale gelir. Bu şekilde lipazlar katalitik merkezi çevreleyen hidrofobik alanlar aracılığıyla hidrofobik yüzeylere güçlü bir şekilde adsorbe olur (Öztürk, 2001).



Şekil 1.2. *Humicola lanuginosa* üç boyutlu yapısı (Karaca, 2006)

Bütün lipazların üç boyutlu yapıları hemen hemen birbirine benzemektedir. Lipazlar serbest ya da uygun bir desteğe tutuklanarak transesterleşme tepkimelerinde kullanılırlar. Serbest enzimler hassastır ve kararsız yapıdadırlar. Bu nedenle katalitik reaksiyonlarda pek tercih edilmezler. Enzimler katalitik aktivitelerini, uygun bir desteğe tutuklandıklarında uzun süre korurlar (Rahman ve diğ., 2004). Ve reaksiyonda tekrar kullanılabilirler. Bu nedenle süreç daha ekonomik olur (Balcao ve diğ., 1996).

Biyodizel üretiminde kullanılan lipazların bazıları hem organik çözücü ortamında hem de çözücsüz ortamda kullanılabilir (Tablo 1.5). Bu lipazların çoğu ticari amaçlı hücre dışı enzimler olup farklı desteklere tutuklu enzimlerdir (Adamczak ve Bednarski, 2004).

Tablo 1.5. Biyodizel üretiminde çözücülü ve çözücsüz ortamda kullanılan mikrobiyal kaynaklı lipazlar (Akbin, 2012)

Organik çözücüde kullanılanlar	Çözücsüz ortamda kullanılanlar
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Candida antarctica</i>
<i>Rhizopus delemar</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Candida antarctica</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Mucor miehei</i>
<i>Mucor miehei</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Thermomyces lanuginosa</i>
<i>Candida rugosa</i>	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Pseudomonas cepacia</i>

1.6.4. Enzim tutuklama yöntemleri

Biyodizel üretiminde kullanılan lipazın tutuklanması için birçok yöntem vardır. Bunlar; adsorpsiyon, çapraz bağlama, hapsetme, kapsüllemedir. Tutuklama ortamının pH değeri, tutuklama verimini etkileyen önemli bir parametredir. Tutuklama işlemi esnasında ve sonrasında enzim aktivitesinin mümkün olduğunca korunması dolayısıyla, kararlı olması gerekir. Çünkü tutuklanmış lipazın kullanılacağı reaksiyonun verimi bu lipazın kararlılığına bağlıdır. Tutuklama işleminde kullanılan tampon çözeltinin türü ve pH değeri bu kararlılığı önemli

ölçüde etkiler. Kullanılan lipaz kaynağına göre tampon çözelti türü ve pH değeri belirlenmelidir.

Enzimler, temelde protein yapıda oldukları için sıcaklığa karşı duyarlıdırlar. Belirli sıcaklıklarda yüksek aktivite gösterirken belirli sıcaklıklarda ise aktiviteleri düşer ya da tamamen kaybederler. Yüksek sıcaklıklarda serbest enzimlerin yapıları bozulur dolayısıyla aktiviteleri düşer. Tutuklama işlemi ile enzimlerin ısıl dayanımları artırılabilir. Tutuklanan enzimler yüksek sıcaklıklara çıkabilir ve bazı durumlarda serbest halden daha fazla aktivite gösterirler. Lipazların tutuklanması ile uzun süre reaksiyonlarda kullanılabilmesinin yanı sıra, kullanıldıkları reaksiyondaki sıcaklık parametresi belirlenirken büyük kolaylık sağlar.

1.6.4.1. Çapraz bağlama

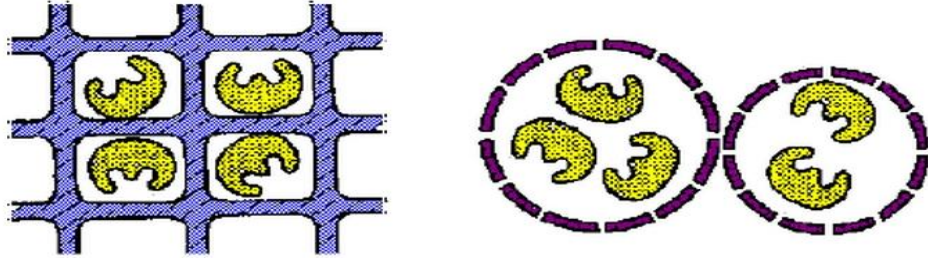
Bu yöntemde; gluteraldehit, heksametilen diizosiyanat gibi fonksiyonel reaktifler vasıtasıyla enzim molekülleri arasında çapraz bağlar oluşur (Şekil 1.3). İlk aşamada enzim aseton ile çöktürülerek enzim kümelenir. Daha sonra oluşan bu küme gluteraldehitle çapraz bağlanarak daha sert bir yapı elde edilir (Kumari ve diğ., 2007). Çapraz bağlı enzimlerin transesterleşme hızını artırır.



Şekil 1.3. Çapraz bağlı enzimin şematik gösterimi (Bilge, 2010)

1.6.4.2. Hapsetme

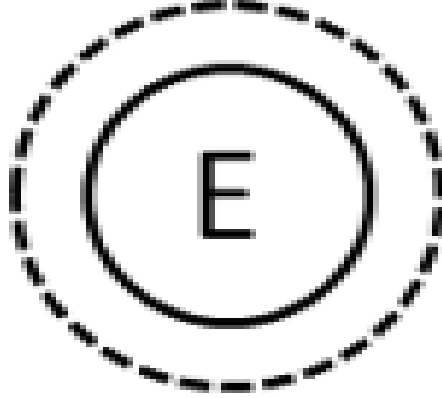
Bu yöntemde enzimin polimer bir matrise ile yakalanır (Şekil 1.4) (Xavier ve diğ., 1990). Tutuklanmış lipaz fiziksel adsorpsiyon ile tutuklanmış lipazdan daha karardır. Çapraz bağlama tutuklama yönteminden daha basittir. Enzimin aktivitesi ve kararlılığı değişmez (Kennedy ve diğ., 1990).



Şekil 1.4. Hapsetme yöntemiyle tutuklanmış enzimlerin şematik gösterimi (Bilge, 2010)

1.6.4.3. Kapsülleme

Enzimin delikli membran ile çift kat oluşturularak hapsedilmesidir (Şekil 1.5). Bu yöntem, enzimin yığın ile doğrudan temasını engeller. Kapsülleme enzim çevresinde bir kafes oluşturularak enzimin destekten sıyrılması engellenir. (Yadav ve Jadhav, 2005). Kapsüllemiş lipaz yüksek protein içeriğinden dolayı destek üzerindeki gözenekler tıkanır. Dolayısıyla difüzyon kısıtlaması oluşur. Bu etkinin önüne geçmek için lipaz daha küçük parçalar halinde kapsüllemiş ve gözeneklerin tıkanmaması için enzim saflaştırılır (Orçaire ve Buisson, 2006; Akbin, 2012).



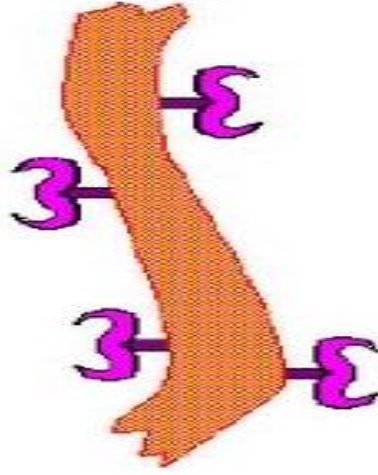
Şekil 1.5. Kapsülleme yöntemi ile enzim tutuklama (Jegannathan ve diğ., 2008)

1.6.4.4. Taşıyıcı bir yüzeye bağlama

Taşıyıcı bir yüzey üzerine bağlama bilinen en eski enzim tutuklama yöntemidir. Bu yöntemde bağlanan enzim miktarı ve tutuklanmış enzim aktivitesi taşıyıcı yüzeyin özelliklerine bağlıdır. Şekil 1.6'da taşıyıcı yüzey üzerine bağlı enzim molekülün görülmektedir.

Taşıyıcı yüzey seçilirken enzimin bazı özellikleri dikkate alınmalıdır. Bunlar, partikül büyüklüğü, yüzey alanı, hidrofilik ve hidrofobik grupların molar oranı, kimyasal bileşim olarak sıralanabilir.

Genel olarak hidrofilik grupların oranı ve enzim miktarındaki artış, tutuklanmış enzimin daha yüksek aktiviteye sahip olmasıyla sonuçlanmaktadır. Enzim tutuklanması için yaygın olarak kullanılan taşıyıcı yüzeyler arasında selüloz, dekstran, agaroz ve poliakrilamid jel bulunmaktadır (Bilge, 2010). Bağlanma şekline göre, taşıyıcı yüzey üzerine bağlama, fiziksel adsorbsiyon, iyonik bağlanma ya da kovalent bağlanma şeklinde olabilir.



Şekil 1.6. Taşıyıcı yüzeye bağlı enzimin şematik gösterimi (Bilge, 2010)

Fiziksel adsorbsiyon yöntemi, enzim proteininin suda çözünmeyen bir taşıyıcı üzerine fiziksel adsorbsiyonunu temel almaktadır. Enzim molekülünde ve aktif bölgede hemen hemen hiçbir hasara ve konformasyonel değişime yol açmayan bir tutuklama yöntemidir. Eğer uygun bir taşıyıcı yüzey bulunursa hem ucuz hem de kolay olabilmektedir. Ancak enzim ve taşıyıcı arasında oluşan kuvvetlerin zayıflığından dolayı kullanım sırasında, adsorbe olmuş enzim taşıyıcı yüzey üzerinden ayrılabilir. Enzimlerin fiziksel adsorbsiyonu için statik işlem, elektro-boşalım, reaktörde bekletme, çalkalama ya da karıştırma banyosunda bekletme işlemleri uygulanır.

Genel bir tutuklama yöntemi olan adsorbsiyonun ana avantajı bağlama için kimyasal madde kullanılmaması ve aktivasyon için minimum basamağa ihtiyaç duyulmasıdır. Adsorbsiyon, kimyasal bağlama yöntemlerine göre enzim proteinine daha az zarar vermektedir. Çünkü adsorbsiyonda bağlanma, hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri ve Van der Waal's kuvvetleriyle olmaktadır. Oluşan zayıf bağlardan dolayı ortam pH'nın, sıcaklığın, iyonik kuvvetlerin değişimiyle ve substrat varlığıyla enzim proteininin taşıyıcı yüzey üzerinden desorbsiyonu gözlenmektedir. Bir diğer dezavantaj ise, çok spesifik bir yöntem olmamasından dolayı diğer proteinlerin ve maddelerin de destek üzerine adsorblanmasıdır. Bu durum tutuklanmış enzimin özelliklerini değiştirmekte ve reaksiyon hızını düşürmektedir (Bilge, 2010).

İyonik bağlama yöntemi ise enzim proteininin suda çözünmeyen iyon değişimini sağlayan maddeler içeren bir taşıyıcı yüzey üzerine iyonik olarak bağlanmasına dayanmaktadır. İyon değişim merkezleri içeren polisakkaritler ve sentetik polimerler bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Enzimin taşıyıcı yüzey üzerine bağlanması kovalent bağlamada olduğu gibi ortam koşullarına çok bağlı olmadığından kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca bu yöntem konformasyonda ve enzim inaktif bölgesinde çok az değişime neden olmaktadır. Bu nedenle yüksek aktivite görülmektedir. Enzimin taşıyıcı yüzey üzerinden ayrılması gibi durumlar yüksek iyonik kuvvete sahip substrat çözeltilerinde ve pH değişimlerinde olmaktadır. Bunun nedeni, taşıyıcı yüzey ile enzim arasında oluşan bağlayıcı kuvvetlerin kovalent bağlamada olduğu kadar kuvvetli olmamasıdır. İyonik bağlanma ve fiziksel adsorbsiyon arasındaki ana fark iyonik bağlamada taşıyıcı yüzey ile oluşturulan bağların daha kuvvetli olmasıdır (Bilge, 2010).

Kovalent bağlama durumunda enzim ve taşıyıcı matriks arasında kovalent bağların olduğu en sık kullanılan tutuklama yöntemidir. Proteinin tutuklanacağı reaksiyon türü seçilirken bağlanma reaksiyonunun gerçekleştiği koşullarda enzim aktivitesinin kaybolmamasına, kullanılan kimyasallardan dolayı enzimin aktif bölgesinin etkilenmemesine dikkat edilmelidir.

Kovalent bağlama yöntemi enzim ve suda çözünmeyen bir taşıyıcı yüzeyin kovalent bağlanması temeline dayanmaktadır. Bu bağlama yönteminde oluşabilecek bazı fonksiyonel gruplar karboksil, amino, hidroksil gruplarıdır.

Oluşan bağlara göre bu yöntem, diazo, peptid ve alkilasyon yöntemleri gibi alt gruplara ayrılabilir. Kovalent bağlama fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlama gibi yöntemlere göre daha karmaşıktır ve tutuklama için gerekli şartlar daha fazladır. Bu nedenle kovalent bağlama enzimin konformasyonunu değiştirebileceği gibi enzimin aktif bölgesini de etkileyerek aktivite kaybına neden olabilir. Ancak enzim ve taşıyıcı yüzey arasındaki bağlanma kuvvetleri çok güçlü olduğundan yüksek iyonik güçteki bir çözeltide bile enzimin taşıyıcı yüzey üzerinden desorpsiyonu gibi bir durum kovalent bağlamada söz konusu olamaz (Bilge, 2010; Akbin, 2012).

1.7. Hidrotalsit

Enzimler farklı yöntemlerle destek malzemelerine tutuklanabilirler. Organik ortamlarda kullanılan enzimler genellikle katı bir desteğe tutuklanırlar. Lipazlar organik ortamda çözünmediği için destek ve lipaz arasında kuvvetli kovalent bağa ihtiyaç duyulmamakta ve adsorpsiyon yöntemiyle tutuklama yeterli olmaktadır. Adsorpsiyonla tutuklama kolay ve ucuz bir yöntemdir. Bu yöntemde bağlanmayı sağlayan kuvvetler hidrojen bağları, Vander Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir (Chang ve diğ., 2007). Üre hidrolizi yöntemiyle üretilen hidrotalsit yüksek saflıkta tek faz şeklindedir ve yüksek yoğunluğa sahiptir. Bu özellikler diğer hidrotalsit sentezleme yöntemlerinde söz konusu değildir. Yanma yöntemiyle hidrotalsit üretimi, enerji ve zaman tasarrufu açısından diğer yöntemlerden avantajlıdır. Ayrıca çözücü kullanılmadığı için destek yıkama işlemi oldukça kısa sürer. Hidrotalsite lipaz tutuklama işlemi ile ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte yapılan bazı çalışmalar vardır. Bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* lipazı çapraz bağlı jelatin, silika-jel, çitosan, Mg/Al mol oranı 4.0 olan Mg/Al hidrotalsit ve γ -Al₂O₃ desteklerine tutuklanmıştır ve enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır. En yüksek enzim aktivitesine (725 U/g) Mg/Al hidrotalsite tutuklu lipaz katalizör ile ulaşılmıştır (Zeng ve diğ., 2009). Bir diğer çalışmada *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL-IM) lipazı dört farklı çeşit zeolit ve Mg/Al hidrotalsite tutuklanmıştır. Desteklere tutuklanan enzim miktarları

ve tutuklanma verimleri karşılaştırıldığında hidrotalsite tutuklanan enzim miktarının (13 mg protein/g destek) ve tutuklanma veriminin (% 95.8), zeolite tutuklanan enzim miktarı (9 mg protein/g destek) ve tutuklanma veriminden (% 56.1) daha fazla olduğu görülmüştür (Yağız ve diğ., 2007; Akbin, 2012).

1.8. İnorganik perlit

Perlit, amorf yapılı, küçük, yuvarlak camsı taneciklerden oluşmuş açık gri renkli, volkanik bir kayadır. Tanecikler içinde % 4-6 oranında olarak su bulunur. Perlit öğütülüp, hızlı ve kontrollü bir şekilde özel fırınlarda yumuşama noktasına kadar (760–1100 °C) ısıtılırsa bu tanecikler, içlerindeki suyun buharlaşması sonucu, ilk hacminin 10 ile 20 katı kadar genişler (Sakaguchi ve diğ., 2005). Genleşme sırasında sıcak, yumuşamış, camsı parçacıklar halinde çok sayıda ufak tanecikler oluşur. Genleşmiş perlitin çok hafif, düşük termal iletkenlikli, ateşe dayanıklı bir malzeme oluşunun sebebi bu camsı taneciklerdir (Tekin, 2004). Perlitin gözenekliliği, hafifliği, ısı ve ses yalıtıcılığı, kimyasal inert olması ve yanmazlığı gibi teknik özellikleri nedeniyle birçok kullanım alanı bulmuştur. Perlitin bu özelliklerinden dolayı enzim tutuklama desteği olarak kullanılması araştırmacıları üzerlerine çekmiştir. Karimi ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (2011), perlit desteğine α -amilaz enzimini tutuklamışlardır. Tutuklama öncesinde perlit yüzeyini ön işlemlerden geçirerek 3-aminopropiltriheksasilan ile aktive etmişlerdir. Daha sonra 550 °C sıcaklıkta 5 saatlik kalsinasyon sonucunda enzim tutuklama işlemine hazır hale getirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda yüzeyi aktive edilmiş perlitin enzim aktivitesi 605 U/g iken doğal perlit için bu değer 215 U/g olarak belirtilmiştir (Karimi ve ark., 2011).

1.9. Enzim Katalizli Biyodizel Üretimine Etki Eden Faktörler

Enzim katalizli biyodizel üretim tepkimesine etki eden faktörler, kullanılan yağ ve alkol türü, enzim türü, tutuklama desteği, su miktarı, yağ/alkol mol oranı, sıcaklık ve süredir.

1.9.1. Yağ türü

Biyodizel üretiminde rafine, ham ve yenemeyen yağlar, mikrobiyal yağlar, donyağı, domuz yağı, kızartma yağı, balık yağı gibi atık yağlar kullanılmaktadır. Biyodizel daha çok serbest yağ asidi (daha çok C18:1) ve rafine yağlardan (kolza, soya, ayçiçek ve diğer) üretilir. Bu bitkisel yağlar C18 yağ asidi bakımından zengindir. Hayvansal ve bitkisel yağların özellikleri biyodizle kalitesini etkileyen önemli parametredir. Fiziksel özellikler (yoğunluk, viskozite, erime noktası, refraktif indeks vb.) ya da kimyasal özellikler (asitlik, iyot indeksi, peroksit indeksi, sabunlaşma indeksi vb.) göre sıralanabilir.

Biyodizel üretiminde kullanılacak yağlar, ilgili coğrafi bölgede yetişen yağlı bitkilerden elde edilir (Antczak ve diğ., 2009). Biyodizel üretiminde kullanılan bitkisel yağların maliyeti toplam üretim maliyetinin % 70'ini oluşturması nedeniyle en uygun yağlar, hektar başına en yüksek verimliliğe sahip bitkilerden elde edilen yağlar ya da atık yağlar gibi düşük fiyatlı yağlardır.

Brezilya'da biyodizel genelde ayçiçek yağından üretilir. Ayçiçek yağının transesterleşme tepkimesi için, organik çözücü (hekzan) varlığında *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor oryzae* ve *Pseudomonas fluorescens* lipazlarının kullanımı uygun iken, çözücüsüz ortamda *R. miehei*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Thermomyces lanuginosa* lipazları uygundur (Dossat ve diğ., 2002, Akbin, 2012).

Güney Amerika ve ABD'de biyodizel; soya yağı ve metanol (çözücülü ortamda)/ etanolün (çözücüsüz ortamda) *Mucor miehei* ya da *Pseudomonas cepacia* lipazlarıyla transesterleşmesi sonucu elde edilir. Ayrıca, *Rhizopus delemar* lipazı ile çözücüsüz ortamda metanoliz tepkimesiyle biyodizel üretimi de söz konusudur (Soumanou ve diğ., 2003).

1.9.2. Alkol (açıl alıcı) türü

Genellikle metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2- propanol, n-bütanol ve isobütanol biyodizel üretiminde kullanılırlar. Yüksek molekül ağırlıklı alkollerin yoğunluğu ve kaynama noktaları da yüksektir. Metanol ve etanolün biyodizel

üretiminde daha çok tercih edilmesinin nedeni ucuz ve çok üretilen alkoller olduğudur. Enzimatik biyodizel üretiminde kullanılan alkolün hidrokarbon zincir uzunluğu arttıkça transesterleşme tepkimesinin hızı artar. (Nelson ve Fogila, 1996). Alkollerin hidrokarbon zincirleri kısaltıldıkça enzim aktifliği bozulur. Bu bozulma kısa zincirli alkollerin (metanol, etanol) basamaklı şekilde tepkime ortamına eklenmesiyle çözülebilir. Tablo 1.6'da basamaklı metanol eklemeli enzimatik transesterleşme tepkimeleri gösterilmiştir. Lipaz katalizli biyodizel üretiminde işletim türü kesikli ya da sürekli olabilir. Kesikli sistemde özellikle çözücüsüz ortamda metanolün lipaz üzerine olan inhibisyon etkisi etanole kıyasla daha fazladır. Açıl alıcı/yağ oranının yüksek değerleri, hem yağın biyodizele dönüşümünü, hem de tepkime hızını artırır. Açıl-alıcı üçten az sayıda karbon içeriyorsa, fazlalığı lipaz inaktivasyonuna neden olur. Bunun için bu parametrenin etkisini ve optimum değerini belirlemek önemlidir.

Tablo 1.6. Basamaklı metanol eklemeli enzimatik transesterleşme tepkimeleri (Jegannathan ve diğ., 2008)

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	Metanol	Adsorpsiyon	4	3	30	48	10. saat 34	24. saat 66	48. saat 90,4
Soya yağı- Kolza yağı karışımı	Metanol	Adsorpsiyon	4	3	30	48	10. saat 34	24. saat 66	48. saat 95,6
Soya yağı	Metanol	Adsorpsiyon	4	3	30	3.5	1. saat 42,4	2.5. saat 69,8	3.5. saat 98,7
Soya yağı- kolza yağı karışımı	Metanol	Adsorpsiyon	4	2	30	36	7. saat 32	36.saat 96,5	
Soya yağı	Metanol	-	4	3	-	-	5. saat 32	25.saat 75	45. saat 90
Domuz yağı	Metanol	Adsorpsiyon	20	3	40	30	3. saat 28	18. saat 60	30. saat 87,4

1.9.3. Enzim ve tutuklama desteği türü

Literatüre göre lipazın yapısı ile katalitik aktivitesi arasında bir ilişki mevcuttur. Lipazlarının yapısı, katalitik dirsek olarak adlandırılan döngü içinde aktif serin bulunan merkezi L tabaka şeklindedir. Serin üzerinde hidrofobik bir yarık bulunur veya bu kısım enzim aktif hale geçtikten sonra oluşur (Svendsen, 2000). Bu hidrofobik yarık açıl parçalarının sığacağı şekilde uzayan bir cep şeklindedir. Lipaz

enziminin aktif duruma geçmesi için gerekli olan üzerindeki kapağın hareket etmesidir.(Pleiss ve Fisher, 1998). Lipazların bu farklı yapıları, onların değişik substratlara karşı farklı aktivitelere sahip olmalarının nedenidir (Jegannathan ve Abang, 2008; Akbin, 2012).

Enzimin hidrofobik silika matriks ile tutuklanması, farklı kaynaklardan elde edilen lipaz çeşitlerine kolaylıkla uygulanabilir ve tutuklanmış lipazın etkinliği, ticari olarak satılan serbest enzimlerden daha yüksektir. Diğer yandan, enzim tutuklanması, biyokatalizörlerle ilgili ekonomik güçlükleri büyük oranda azaltır. Yapılan araştırmalardaki tutuklanma tekniklerinde sentetik ya da doğal polimerler, gluteraldehit, çitosan, hidrotalsit, Celite olarak bilinen diatomik toprak gibi inorganik malzemeler, gözenekli camlar, silika, fillosilikatlar, seramikler, sol-jel bazlı inorganik matriksler ve mikroemülsiyon bazlı jeller taşıyıcı malzeme olarak kullanılmıştır. Biyodizel üretiminde ticari olarak tutuklanmış hücre dışı lipazların (makro gözenekli akrilik reçineye tutuklanmış *Candida antarctica* lipazı, Novozyme 435, anyonik reçineye tutuklanmış *Rhizomucor miehei* lipazı, Lipozyme RM IM, granül silika jelle tutuklanmış *Thermomyces lanuginosa* lipazı, Lipozyme TL IM) kullanımı yaygındır. Proses ekonomisi, geri kazanım ve tekrar kullanım için enzimin ucuz bir desteğe tutuklanması önemlidir. Pahalı organik reçinelere alternatif olarak, Celite, kaolinit, perlit, hidrotalsit gibi ucuz destekler olabilir (Robles ve diğ., 2009).

1.9.4. Su miktarı

Ortamın su içeriği önemli parametrelerden biridir. Lipazlar, katalitik olarak aktif olabilmeleri için az miktarda suya gereksinim duyarlar (Noureddini ve Philkana, 2005). Ortamın hiç su içermemesi durumunda katalitik olarak görev yapamazlar. Lipaz kaynağına ve tepkimede girdi olarak kullanılan bileşenlere göre değişen ortamın su içeriğinin optimize edilmesi gerekir, çünkü fazlalığında istenmeyen ester hidrolizine neden olur.

Literatürde bazı araştırmacılar su miktarının artmasıyla ester veriminin arttığını bazıları ise bunun aksini bildirmişlerdir (Jegannathan ve ark., 2008).

Lipaz, sulu ortam ile organik faz ara yüzeyinde benzeri olmayan özelliğe sahiptir ve lipaz aktivitesi bu ara yüzeye bağlıdır. Yağ-su ara yüzeyinde lipaz moleküllerinin yapısal değişiklikleri sonucu enzimin aktif hale geçer. Tepkime ortamına su eklendikçe yağ-su damlacıkları sayısı artar ve böylece ara yüzey artar. Fakat sulu ortamda lipaz, hidroliz tepkimesini yürüttüğü için ortamdaki fazla su rakip hidroliz reaksiyonunu uyarır. Alkoliz tepkime ortamında bulunması gereken su miktarı, hidrolizi en aza indirgeyip, transesterleşme tepkimesi için enzim aktivitesini en yüksek değere taşıyacak miktardır (Akbin, 2012; Al-Zuhair ve diğ., 2006).

1.9.5. Sıcaklık

Enzim katalizli biyodizel üretimi lipaz aktivitesinin korunması için düşük sıcaklıklarda gerçekleşir (Noureddini ve Philkana, 2005). Bu sayede enerji maliyetleri de düşer. Literatürde farklı lipazların katalizörlüğünde, çözücüsüz ortamda gerçekleşen transesterleşme tepkimesi için en uygun sıcaklık aralığının 30-50 °C olduğu belirtilmiştir (Antczak ve diğ., 2009).

1.9.6. Süre

Tranesterleşme tepkimesinde kullanılan katalizör ve ortam sıcaklığı tepkime süresini etkiler. Yağız ve diğ. (2007), yaptığı çalışmada ise atık kızartma yağının metanol ile enzimatik transesterleşmesi tepkimesine sürenin etkisi incelenmiştir. Metanol tek basamakta eklenmiştir. Lipozyme TL-IM ile 22-105 saat aralığında gerçekleşen tepkime sonucu üretilen metil ester miktarları hesaplanmıştır. Tepkime süresi arttıkça metil ester verimi sürekli artış göstermiş, 105. saatte %95'e ulaşmıştır.

1.9.7. Yağ/metanol mol oranı

Tranesterleşme tepkimesi denge tepkimesidir. Substratlardan birinin miktarındaki artış ester verimini artırır. Reaksiyondaki stakiyometrik oran 1/3 (yağ/alkol)'tür (Dizge ve Keskinler, 2008). Reaksiyon koşullarına da bağlı olarak, bu tersinir tepkimede substratlardan birinin (genellikle alkol) bir miktar fazlası eklenerek reaksiyon hızlandırılır. Ancak fazla miktarda metanol kullanımı enzimin inaktive eder.

1.9.8. Çözücü türü

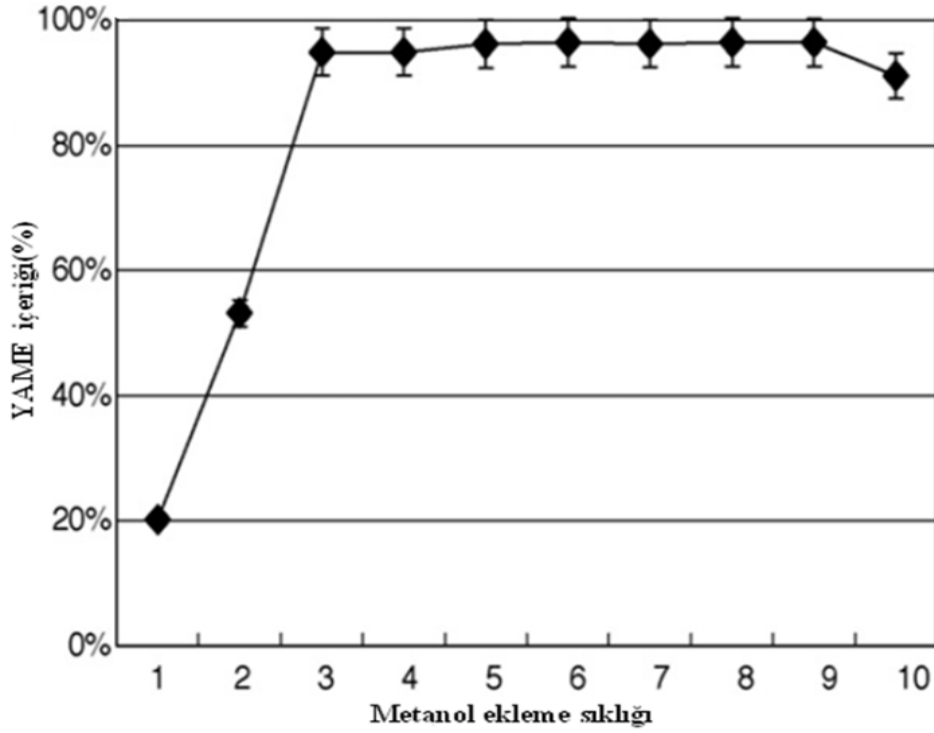
Ortama organik çözücü eklenmesi, alkolün çözünürlüğünü artırır aynı zamanda yağın viskozitesini düşürerek alkol ile kolay karışmasını sağlar. Substrat ile enzim ara yüzeyini arttırarak reaksiyonun hızını arttırıcı etkisi vardır (Bako ve diğ., 2002; Bornscheuer, 2003). Enzim aktivitesinin bozulmasını engelleyerek tek basamaklı enzimatik transesterleşmeye olanak sağlar (Dossat ve diğ., 2002; Trupti, 2011).

1.10. Konu İle İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar

Literatür incelendiğinde, kullanılan yağa, alkol türüne, ortamda var olan diğer bileşenlere kullanılan lipaz kaynağına, tutuklama yöntemine ve işletim parametrelerine bağlı olarak, kullanılan lipaz katalizörlerin gereksinimleri çok farklılık göstermekte ve bu nedenle üretim süreçlerinin optimize edilmesi gerekmektedir.

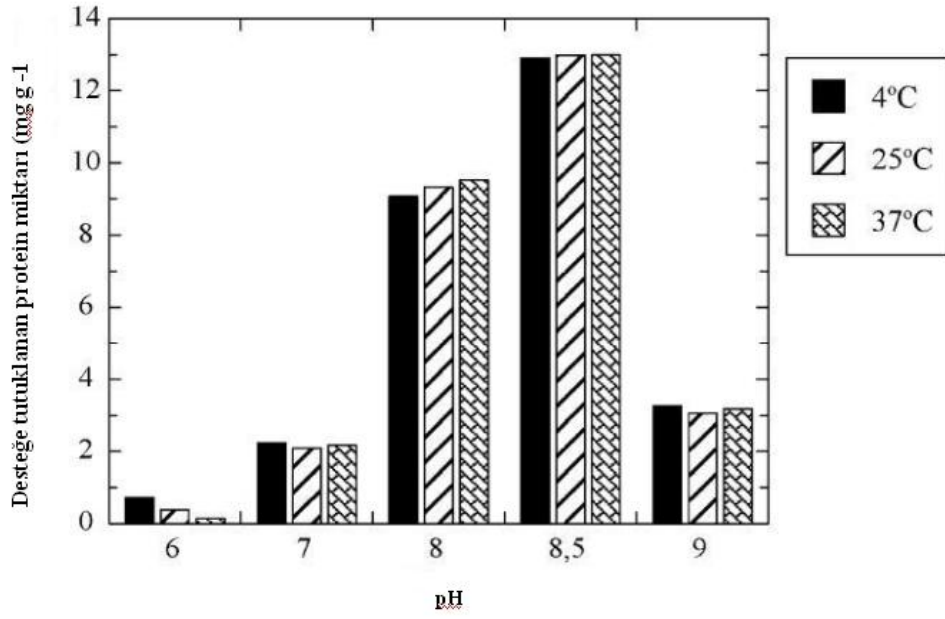
Shimada ve diğ. (2001) yaptıkları çalışmada, serbest *Candida antarctica* lipaz enzimi ile balık yağından ve yemeklik atık yağından metanoliz ile biyodizel üretimini incelenmiştir. Balık yağı olarak tuna ve sardalya balık yağları kullanılmıştır. Metanoliz tepkimesi metanolün üç basamak halinde eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. 30 °C'de gerçekleşen reaksiyonun birinci basamağında, metanolün 1/3'ünün eklenmesi ile ilk 7 saat sonunda YAME içeriği %33 olarak ölçülmüştür. İkinci basamağında metanolün 1/3'ünün eklenmesi ile 20.saat sonunda YAME içeriğinin %66,4'e yükseldiği görülmüştür. 3.basamakta metanolün kalanı eklenerek 48 saat sonunda YAME içeriğinin %97,3 olduğu görülmüştür.

Nie ve arkadaşlarının (2006) yaptığı bir diğer çalışmada, pamuk membrana *Candida sp.* lipazı tutuklanmış ve atık kızartma yağından biyodizel üretiminin optimum koşulları araştırılmıştır. Reaksiyon çözücü olarak *n*-hekzan varlığında 40 °C'de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ortamında ağırlıkça %15 su bulunduğunda ve metanol/atık yağ mol oranı 3/1 iken 30 saatlik reaksiyon sonunda %92 YAME içeriğine ulaşılmıştır. Kullanılan lipaz aktivitesini 20 gün korumuştur. Metanol ekleme sıklığı incelendiğinde, reaksiyon ortamına üç ve üzeri basamakta metanol eklenmesi durumunda en yüksek metil ester verimine ulaşılmıştır (Şekil 1.7).

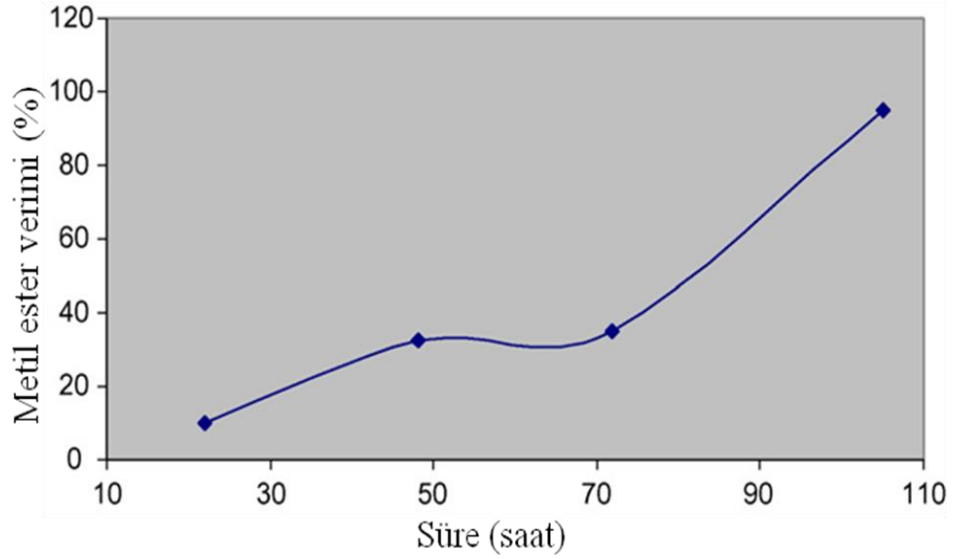


Şekil 1.7. Metanol ekleme sıklığının biyodizel verimine etkisi (Nie, 2006)

Yağız ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada (2007) *Thermomyces lanuginosa* lipazı farklı desteklere tutuklanmış, ardından bitkisel atık yağların tutuklanmış lipazların katalizi ile metanol reaksiyonu sonucunda oluşan YAME içeriği incelenmiştir. Hidrotalsit desteğe tutuklanan protein miktarına pH ve sıcaklığın etkisi Şekil 1.8’de verilmiştir. İncelenen sıcaklıklarda tutuklama için pH 8,5 değerinin uygun olduğu belirlenmiştir. 105 saatte atık yağ ile metanol reaksiyonları sonucu Zeolit FM-8 desteğine tutuklanmış lipaz varlığında YAME verimi gözlenmemiştir. Fakat Mg/Al hidrotalsit desteğine tutuklu lipaz varlığında YAME verimi %95 olarak ölçülmüştür (Şekil 1.9).



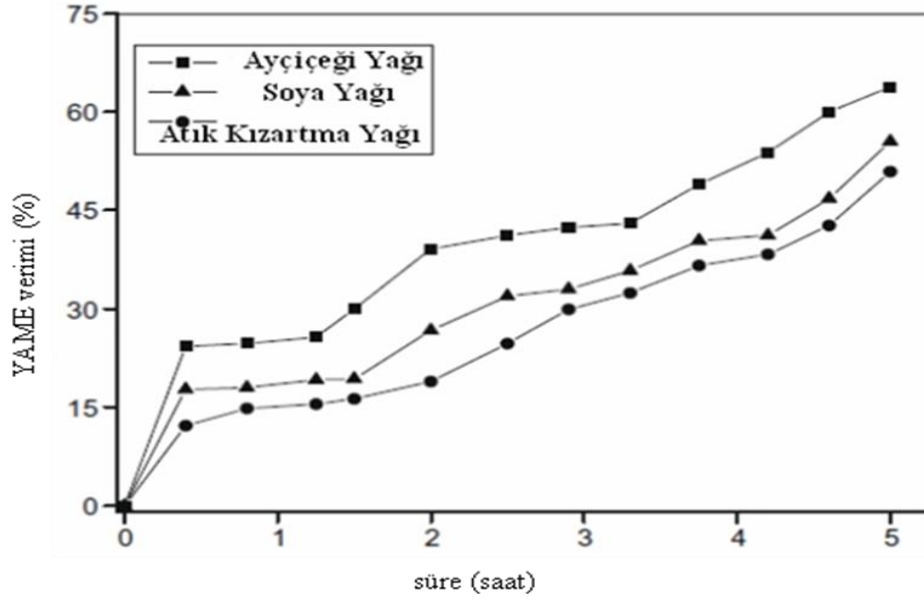
Şekil 1.8. Tutuklama işlemine pH ve sıcaklığın etkisi (Yağız, 2007)



Şekil 1.9. Reaksiyon süresinin metil ester verimine etkisi (Yağız, 2007)

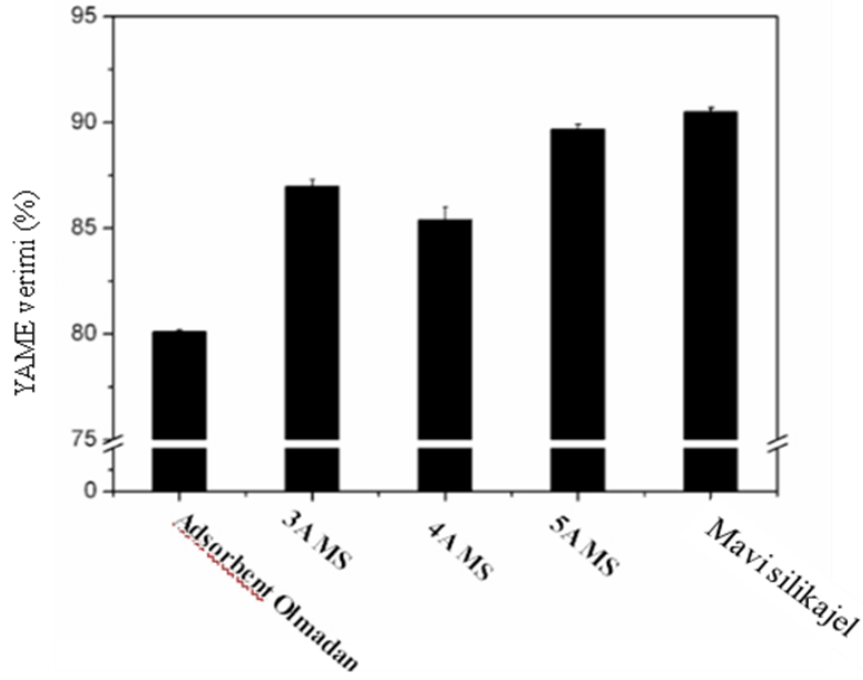
Dizge ve diğ. (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *Thermomyces lanuginosa* lipazı mikrogözenekli polimerik bir matrise %89'luk verimle tutuklanarak bitkisel atık yağ, rafine ayçiçeği yağı ve soya yağının metanolizi ile elde edilen yağ asidi metil ester üretimi incelenmiştir. Reaksiyon koşulları 65 °C sıcaklık, 5 saat tepkime süresi, 250 rpm çalkalama hızı koşullarında yağ/alkol oranı 1/6 ve ortamdaki su miktarı ağırlıkça %15 olacak şekilde seçilmiştir. Bu koşullarda YAME içeriği rafine ayçiçeği yağında %63,8 bitkisel soya yağında %55,5, atık

kızartma yağında ise %50,9 olarak belirlenmiştir (Şekil 1.10). Tutuklu lipazın aynı reaksiyon koşulları altında 10 reaksiyon sonucu aktivitesini koruduğu görülmüştür.



Şekil 1.10. Tutuklanmış *Thermomyces lanuginosa* lipazı katalizörlüğünde % YAME içeriğine farklı yağ türlerinin etkisi (Dizge ve diğ., 2009)

Wei ve diğ. (2008) yaptıkları çalışmada reaksiyon ortamında farklı tür adsorbentler kullanarak serbest *Penicillium expansum* lipazı katalizörlüğünde bitkisel atık yağ ve metanolün reaksiyonu sonucundaki yağ asidi metil ester verimi incelemişlerdir. Reaksiyon ortamındaki su derişimini dengede tutmak için farklı adsorbentlerin etkisi gözlenmiştir (Şekil 1.11). Reaksiyon ortamında 3°A, 4°A ve 5°A moleküler elek ve mavi silika jel bulunması durumunda 35 °C sıcaklıkta 200 rpm çalkalama hızında 24 saatlik süre sonunda yağ asidi metil ester içeriği %92,8 olarak belirlenmiştir.



Şekil 1.11. Bitkisel atık yağın metanolizi ile biyodizel üretimine ortamdaki adsorbent türünün etkisi (Wei ve ark., 2008)

Chen ve arkadaşları (2009), bitkisel atık yağdan Novozyme 435 lipazı katalizörlüğünde sabit yataklı reaktörde biyodizel üretimi için optimum koşulları incelemiştir. Yapılan çalışmada metanol reaksiyon ortamına üç adımda eklenmiş ve çözücü olarak hekzan kullanılmıştır. 40 °C de 15 saatlik reaksiyon sonucunda ortamda ağırlıkça %25 enzim, %15 hekzan ve %10 oranında su bulunması durumunda %91,08 YAME verimine ulaşılmıştır.

Al Zuhair ve diğ. (2009) seramik boncuklar üzerine *Pseudomonas cepacia* ve *Candida antartica* lipazlarını tutuklamışlar ve reaksiyon ortamında çözücü olarak n-hekzan kullanmışlardır. Atık palm yağından biyodizel üretiminin incelendiği bu çalışma sonucunda tutuklanmış *Pseudomonas cepacia* lipazının katalizör gözenek boyutları tutuklanmış *Candida antartica* lipazından daha az olarak hesaplanmıştır. Bu durumun biyodizel üretimi üzerine etkisi incelendiğinde 62 saatlik reaksiyon sonucunda sırasıyla %9,5 ve %5,9 YAME verimine ulaşılmıştır. Seramik boncuklara tutuklanmış *Pseudomonas cepacia* lipazının gözenek boyutunun küçük olmasına rağmen *Candida antartica* lipazından daha yüksek verim sağlanması, kütle aktarım kısıtlamalarının reaksiyon ortamında *Pseudomonas cepacia* lipazı tarafından daha iyi tolere edilmesi ile açıklanmıştır.

Saifuddin ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada *Candida rugosa* lipazı önce Tris-HCl tamponunda çözülmüş, ardından mikrodalga (2,45 GHz, 100 Watt) titreşimine 10 sn maruz bırakılmıştır. Hazırlanan enzim çözeltisi %50'lik amonyum sülfat çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışımdan sonra çözeltiliye t-bütanol eklenmiş ve oluşan yeni çözelti 25 °C'de 1 saat vortekslenmiştir [üç faz ayrımı (TPP)]. Yapılan bu işlemler sonunda lipaz aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 1.7'de verilmiştir. TPP ve mikrodalga ile aktivitesi artırılmış lipaz 40 °C de 8 saatlik bitkisel atık yağdan biyodizel üretimi sonucunda %82 metil ester verimi elde edilmiştir.

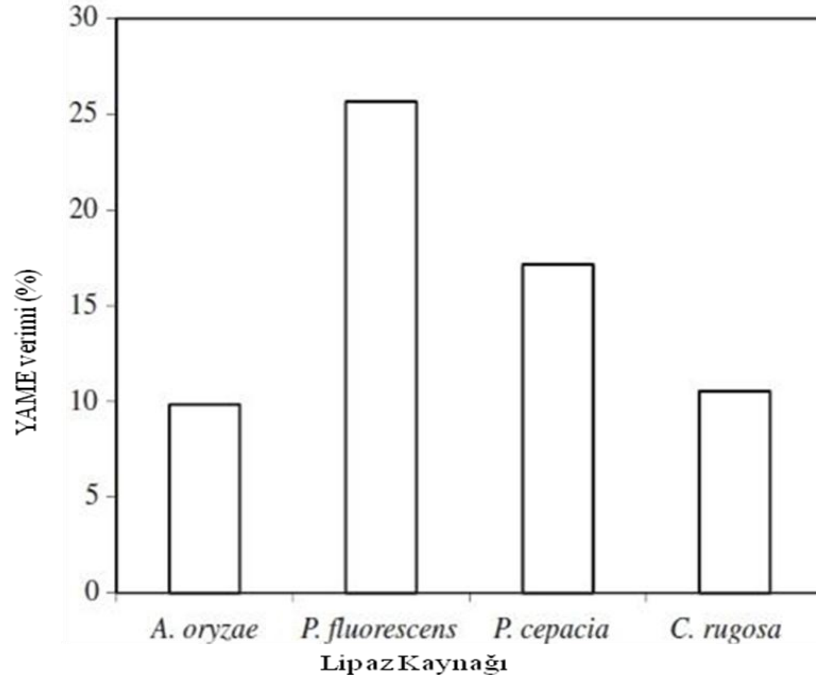
Tablo 1.7. TPP ve mikrodalga işlemlerinden sonra lipaz aktivitesinin değişimi (Saifuddin ve diğ., 2009)

Lipaz	Aktivite (U)	Aktivite Değişimi (U)
Saf	840	1
pH Ayarlanmış	1995	2,4
pH Ayarlanmış (TPP)	3247	3,9
(TPP) ve mikrodalga uygulanmış	4515	5,4

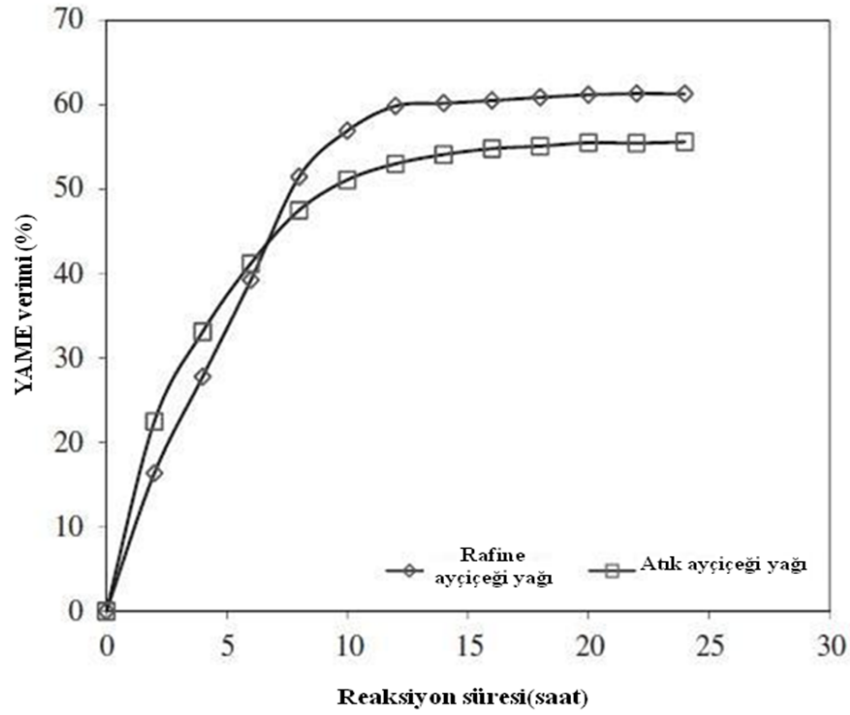
Yang ve diğ. (2009) tarafından yapılan çalışmada, Novozyme 435 ve serbest *Photobacterium lipolyticum* (M37) lipazı varlığında bitkisel atık yağdan biyodizel üretim reaksiyonu incelenmiştir. Reaksiyon ortamına bir seferde ağırlıkça %10 metanol eklendiğinde Novozyme 435 ile YAME verimi alınamamıştır. M37 kullanıldığında tek seferde ağırlıkça %10 metanol eklendiğinde verimin %70 olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, Novozyme 435 kullanıldığında tek basamakta metanol ekleme işleminin enzime inhibisyon etkisi yaptığı, M37'nin ise metanolden etkilenmediği görülmüştür.

Azocar ve diğ. (2010) ise Novozyme 435 katalizörlüğünde yemeklik atık yağlar ve metanolün tepkimesi için optimum reaksiyon koşullarını incelemiştir. 200 rpm çalkalama hızında, 12 saatte 44,5 °C sıcaklıkta yağ/metanol molar oranı 1/3,8 ve ağırlıkça %15 Novozyme 435 varlığında %100 dönüşüm elde edilmiştir. 10 tekrarlı kullanımının sonunda dahi aktivitesini büyük ölçüde koruduğu görülmüştür.

Trupti ve diğ. (2011) tarafından farklı ve serbest lipaz kaynakları (*A. oryzae*, *P. fluorescens*, *P. cepacia*, *C. rugosa*) kullanılarak bitkisel atık yağ ve rafine ayçiçeği yağının metanol ile farklı koşullarda reaksiyonu sonucu yağ asidi metil ester verimleri incelenmiştir (Şekil 1.12). Yapılan deneylerde transesterleşme reaksiyonu için n-hekzan çözücü ortamında sıcaklık, enzim miktarı, reaksiyon süresi ve metanol/yağ mol oranının üretime etkileri incelenmiştir. Metanol kesikli beslenerek 24 saatte 45 °C sıcaklıkta, ağırlıkça %6 enzim ve yağ/alkol oranı 1/3 olduğu durumda *P. fluorescens* enzimi varlığında yağ asidi metil ester verimi rafine ayçiçeği yağı ile %64, bitkisel atık yağ kullanıldığında %54 olarak ölçülmüştür (Şekil 1.13).



Şekil 1.12. Transesterleşme tepkimesine lipaz kaynağının etkisi (sıcaklık 45 °C, yağ/alkol molar oran 1/3, reaksiyon süresi 24 saat) (Charpe ve Rathod, 2011)



Şekil 1.13. Rafine ve atık ayçiçeği yağından *P. Fluorescens* katalizli biyodizel üretiminin YAME verimi (Charpe ve Rathod, 2011)

Rodrigues ve diğ. (2011) tarafından Süperkritik CO₂ akışkan ortamında gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, yemeklik atık yağlardan sürekli proses ile 20 MPa basınçta, 40 °C'de Lipozyme TL-IM varlığında yağ/metanol molar oranı 1/24 iken 20 saat reaksiyon süresi sonunda yağ asidi metil ester verimi %96 olarak belirlenmiştir.

Al Zuhair ve diğ. (2011) tarafından Novozyme 435 ile %87 verimle çalışan 1 ton/gün kapasiteli bir tesis tasarımı yapılmış ve yatırım maliyeti 620.000\$ olarak hesaplanmıştır. Tasarlanan bu tesisin 4 senede yatırım maliyetini geri ödediği öngörülmüştür.

Yan ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları bir çalışmada *Geotrichum sp.* lipazı K₂SO₄ ile modifiye edilerek çapraz bağlanmış ve katalitik etkisi artırılmıştır. Elde edilen modifiye lipaz ile atık kızartma yağından farklı çözücü ortamlarında biyodizel üretimi incelenmiştir. Çözücü olarak oktan, tersiyer bütül alkol, propanol ve aseton kullanılmış, reaksiyon için en iyi çözücünün tersiyer bütül alkol olduğu belirlenmiştir. 45 °C'de gerçekleştirilen 4 saatlik reaksiyon sonucunda, YAME

içeriği, sırasıyla serbest ve modifiye edilmiş *Geotrichum sp* lipazları için sırasıyla %38 ve %85 olarak elde edilmiştir.

Chesterfield ve arkadaşlarının (2012) yaptıkları bir diğer çalışmada, Novozyme 435 katalizörlüğünde atık bitkisel yağdan biyodizel üretimi incelenmiştir. Reaksiyonda alkol/yağ oranı 3/1 olacak şekilde seçilmiştir. Çözücüsüz ortamda gerçekleştirilen reaksiyonda optimum su miktarı ağırlıkça %5 olarak belirlenmiştir. Reaksiyon üç boyunlu erlende, manyetik karıştırıcı üzerinde, 700 rpm hızla ve 45 °C'de gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar altında biyodizel verimi %90 olarak elde edilmiştir. Ayrıca reaksiyonun kinetiği Ping Bong Bi-Bi mekanizmasına göre incelenmiştir.

Lee ve diğ. (2012) atık kanola yağını süperkritik metanol ortamında katalizör kullanmadan 270 °C'de, 10 MPa basınç altında, 45 dk'da, ağırlıkça metanol/yağ oranının 2/1 olduğu durumda %100 biyodizel verimine ulaşmışlardır.

Akbin'in 2012 yılında yaptığı çalışmada 2/1 mol oranında üre hidrolizi yöntemi ile Mg/Al hidrotalsit sentezlemiş ve serbest *Thermomyces lanuginosa* lipazını tutuklamış, kanola yağından biyodizel üretim reaksiyonunu incelemiştir. 37 °C pH 8,5 Tris-HCL tamponunda tutuklama verimi elde etmiştir. 1/4 yağ/metanol mol oranı olduğu durumda 24 saatlik reaksiyon sonucunda 25°C'de % 100 YAME içeriğine ulaşmıştır.

Tablo 1.8'de konu ile ilgili yapılmış çalışmalardan oluşan karşılaştırmalı bir özet yer almaktadır.

Tablo 1.8. Literatürde atık kızartma yağından enzim katalizli biyodizel üretimi üzerine yapılmış bazı çalışmalar

Kaynak	Katalizör	Sıcaklık (°C)	Alkol Tipi Ve Alkol/Yağ Mol Oranı	Katalizör Miktarı (% ağı.)	Reaksiyon Süresi (saat)	Biyodizel Verimi (%)	Bilgiler
Wu ve ark. (1999)	<i>Pseudomonas cepacia</i> (serbest) ve <i>Novozyme 435</i>	38.4	Etanol 6,6/1	13,7	2.47	96	Novozyme 435 1. saatin sonunda ağı. %5 olarak eklenmiş Etanol tek basamakta ekleme
Watanabe ve ark. (2001)	Novozyme 435	30	Metanol 3/1	4	50	90,9	3 basamakta metanol ekleme
Halim ve ark. (2008)	Novozyme 435	40	Metanol 4/1	4	12	88	Tersiyer bütül çözücülü ortamı
Ying ve ark. (2007)	Manyetik partiküllere tutuklanmış <i>Bacillus subtilis</i>	40	Metanol 1/1	3	72	90	2 basamakta metanol ekleme
Chen ve ark. (2006)	<i>Rhizopus oryzae</i> (serbest)	40	Metanol 4/1	30	30	90	3 basamakta metanol ekleme
Li ve ark. (2009)	<i>Penicillium Expansum</i> (serbest)	35	Metanol 1/1	-	7	92,8	3 basamakta metanol ekleme, ortamdaki fazla suyu emdirmek için mavi silika jel
Yaakop ve ark. (2009)	<i>Thermomyces lanuginosa</i> (serbest)	65	Metanol 6/1	-	5	55,5	Çözücüsüz ortam

Literatür çalışmalarından da görüldüğü üzere serbest *Thermomyces lanuginosa* lipazının Mg/Al hidrotalsit ve perlit desteğine tutuklanmış ve ticari tutuklu formunun atık kızartma yağından biyodizel üretiminin incelendiği çalışma sayısı çok azdır. Yapılan bu çalışmanın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca tutuklama desteği olarak hidrotalsit sentezlenmesinde Mg/Al mol oranını inceleyen literatür çalışması da yoktur.

2. MALZEME VE YÖNTEM

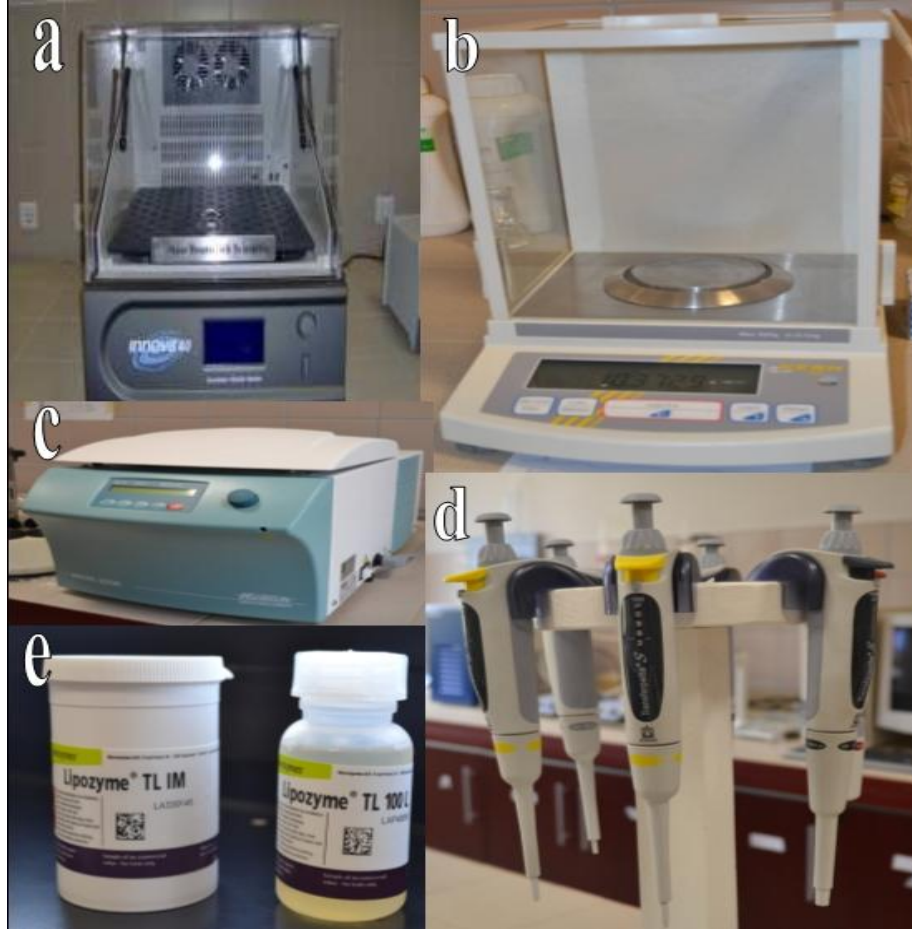
2.1. Kimyasallar

Deneysel çalışmada kullanılan atık yağ evsel kızartma yağıdır. Lipozyme TL 100 L (*Thermomyces lanuginosa*) sıvı formda serbest lipaz ve ticari tutuklanmış Lipozyme TL IM lipazı Novozymes (Danimarka) firmasından temin edilmiştir. Serbest lipazın tutuklandığı Mg/Al hidrotalsit destek laboratuvarında sentezlenmiştir. Perlit, bahçe ürünleri satan yerel marketten satın alınmıştır. Etanol, metanol, fosforik asit, para-nitrofenol (p-NP), n-heptan, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, HCl ve üre analitik saflıkta olup Merck firmasından satın alınmıştır. Brilliant Blue G, bovine serum albumine, trizma baz (tampon çözelti bazı), para-nitrofenil palmitat (p-NPP), 3-aminopropiltriheksasilan, 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.

2.2. Cihazlar

Tutuklama desteği hazırlanmasında kullanılan kalsinasyon işlemi, MF 120 model (NÜVE) kül fırınında, destek kurutma NÜVE marka EV 018 model etüvde gerçekleştirilmiştir. Mg/Al hidrotalsit ve 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. Kullanılan malzeme ve ekipmanlar Şekil 2.1'de verilmiştir. Reaksiyon karışımından alınan örnekler santrifüjlenmiş

(Hettich Mikro 220R) ve katalizörden ayrılan sıvı örnekler ependorf tüplerine alınarak, -18°C 'de analiz için saklanmıştır.



Şekil 2.1. Deneysel çalışmada kullanılan ekipmanlar (a) çalkalamalı ve soğutmalı inkübatör, (b) hassas terazi, (c) mikrofantрифüj, (d) mikropipetler, (e) Lipozyme TL-IM ve Lipozyme TL-100L

2.3. Yöntem

2.3.1. Üre hidrolizi yöntemi ile Mg- Al hidrotalsit hazırlama

Hidrotalsit sentezlemede birçok yöntem kullanılır. Hidrotalsit üretim yöntemleri, hidrotalsitin fizikokimyasal (safılık, kristalleşme, yüzey alanı gibi) özelliklerini belirler. Üre hidrolizi yöntemi ile hidrotalsit üretimin avantajları, ortam pH'ı ve sıcaklığının sabit kalması sonucunda yüksek kristallikte ve daha homojen bir yapı oluşması ve daha az yıkama işlemine gerek duyulmasıdır.

Mg/Al hidrotalsit destek Mg/Al/üre mol oranı 3/1/15, 4/1/15 olacak şekilde $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ve üre tartılarak laboratuvarında daha önce yapılan çalışmalara göre hazırlanmıştır (Akbin, 2012).

2.3.2. Perlit yüzey aktivasyonu

Perlit üzerinde bulunan safsızlıkları gidermek için 10 gr perlit metanol içinde 100 rpm karıştırma hızında manyetik karıştırıcı yardımı ile 16 saat karıştırılmıştır. 5 M 50 ml NaOH çözeltisi eklenerek oluşan karışım 100 °C sıcaklığındaki sıcak su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Isıl işlem sonucunda perlit saf su ile yıkama suyunun pH değeri 7.0 oluncaya kadar yıkanmıştır. 24 saat 110 °C etüvde kurutulmuştur. 50 mM sodyum asetat pH 4.0 tamponu içerisinde (ağırlıkça %10) 3-aminopropiltriheksasilan çözeltisi hazırlanmıştır. Perlit hazırlanan bu çözelti ile 75 °C 200 rpm çalkalama 4 saat inkübe edilmiştir. Bu karışıma %10 glüteraldehit (GA) çözeltisi eklenerek 30 °C'da 2 saat inkübe edilmiş tutuklama işlemine hazır hale getirilmiştir. İnkübasyon sonrasında 500 °C kül fırınında 5 saat kalsine edilmiştir. (Karimi ve ark., 2011).

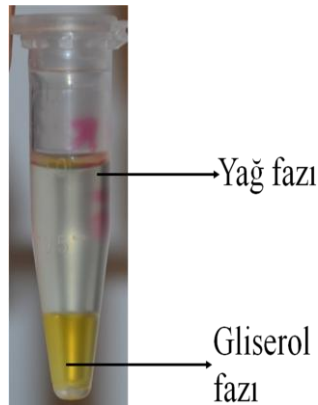
2.3.3. Mg/Al hidrotalsit ve inorganik perlit üzerine lipaz tutuklanması

Tutuklama işlemi için 0,01 g destek kullanılmıştır. Hidrotalsite tutuklamada pH 8,5 değerinde 3 ml Tris-HCL tampon, 50 µl enzim ve sıcaklık 37 °C iken, perlite tutuklamada 200 µl enzim ve sıcaklık 30 °C'dir. Tutuklama işlemi 200 rpm karıştırma hızında, 24 saat süre ile Enzim miktarı ve sıcaklık gerçekleştirilmiştir. Tutuklama sonunda sıvı ortam 25°C sıcaklık 6000 rpm hızında, 5 dk süre ile santrifüjlenmiş ve desteğe tutuklanmamış lipaz enziminin ayrılması için Tris-HCl tamponu ile yıkanmıştır. Kurutma işlemi ve saklanması için desikatörler kullanılmıştır. Tutuklama verimi ve desteğe bağlanan enzim miktarları, tutuklamadan önce ve sonra tayin edilerek belirlenmiştir.

2.3.4. Bitkisel atık yağdan biyodizel üretimi

Biyodizel üretim deneyleri 6 ml hacimli ve kapaklı cam viyaller kullanılarak, sıcaklık ve çalkalama hızı kontrollü inkübatörde gerçekleştirilmiştir. 2 g bitkisel atık yağ, 1/4 yağ/metanol mol oranında (3 basamaklı, 4 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. Aksi belirtilmedikçe deneyler, 2 g bitkisel yağ, 1/4 yağ/metanol mol oranı (3 basamaklı, 4 saatte bir metanol ekleme) 35 °C sıcaklık, % 5 enzim miktarı (yağa göre kütlece), 200 rpm karıştırma hızı kullanılarak 24 saat süre ile yapılmıştır. Su miktarının etkisinin incelendiği deneyler yağa göre kütlece % 0-20 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. Alkol ekleme sıklığının etkisi araştırılmıştır. Metanol ortama tek basamak, iki basamak (6 saatte bir) ve üç basamak (4 saatte bir) metanol eklenmiştir. Karıştırma hızının etkisinin incelendiği deneylerde karıştırma hızı 150, 200, 250 ve 300 rpm koşullarında deneyler yapılmış karıştırma hızının üretime etkisi incelenmiştir. Çözücü türünün etkisinin incelenmesi amacıyla propanol (logP 0,28), isooktan (logP 3,668), hekzan (logP 3,657) ve toluen (logP 2,386) kullanılarak biyodizel üretimi incelenmiştir. Çözücü, ortama kullanılan yağın kütlesine göre 1/1 olarak eklenmiştir. Tutuklanmış enzimin tekrar kullanımı için reaksiyon ortamından ayrılan enzim isopropanol ile yıkanarak süzölmüş ve reaksiyonda kullanılmak üzere 4 °C'de saklanmıştır. Biyodizel üretiminde elde edilen yağ ve gliserol fazları Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Biyodizel üretiminde yağ ve gliserol fazı

2.4. Analiz Yöntemleri

2.4.1. Protein tayini

Çözeltilerdeki protein miktarı Bradford yöntemi ile analiz edilmiştir. Bradford yöntemi, proteine bağlanan Coomassie Brilliant Blue G250 boyasının 595nm’de absorbans vermesi ilkesine dayanan spektrofotometrik bir ölçüm yöntemidir. Yöntem ve hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği EK-A’ da verilmiştir. (Bradford, 1976; Lucarini ve Kilikian, 1999).

2.4.2. Lipaz aktivitesi tayini

Zeng ve diğ., (2009) ve Romdhane ve diğ., (2011) lipaz tutuklanması üzerine yaptıkları çalışmalarında lipaz aktivitesi için çeşitli yöntemler kullanmışlardır. Yapılan literatür araştırması sonucu lipaz aktivitesi paranitrofenil palmitatın (p-NPP) lipaz varlığında hidrolizi sonucu oluşan p-NP’nin derişiminin hesaplanması ilkesine dayanan spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir (Kumar ve diğ., 2005) (EK-B).

2.4.3. Yağ asidi metil ester 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

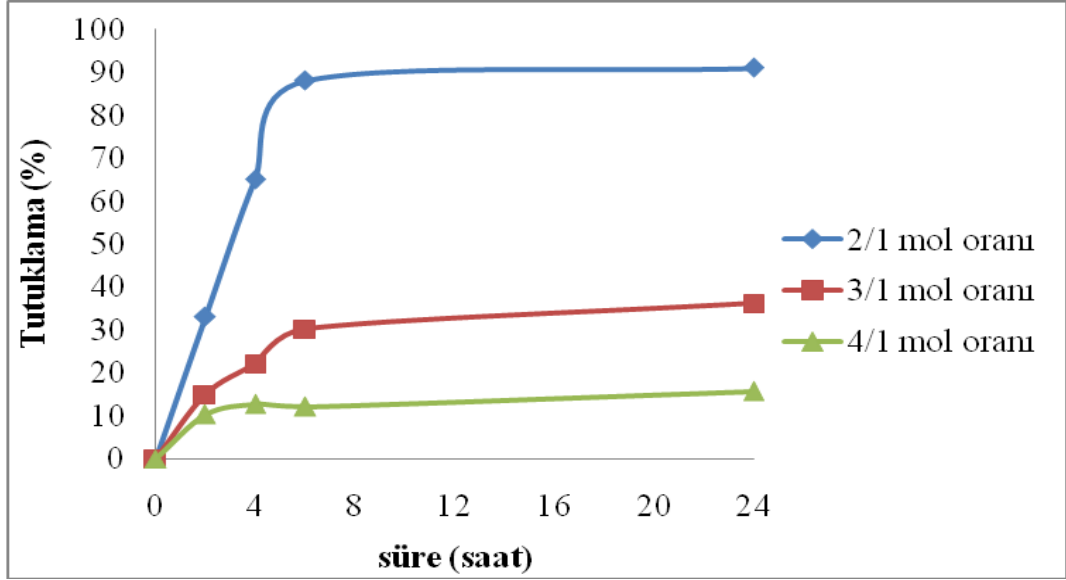
Çalışmanın birinci aşamasında, deneysel çalışmalarda katalizör olarak kullanılacak tutuklanmış lipazın elde edilmesi için, Lipozyme TL 100 L üre hidrolizi yöntemi ile hazırlanan Mg/Al hidrotalsite (UHT) ve inorganik perlite tutuklanmıştır. Tutuklama verimi, desteğe tutuklanan protein miktarı ve tutuklanmış lipazın aktivitesi hesaplanmıştır. Mg/Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100 L (UHT-TL)'nin yüksek tutuklanma performansı ve yüksek hidrolitik aktivite göstermesi nedeniyle, biyodizel üretimi için reaksiyon koşullarının optimizasyonunda katalizör olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, Kocaeli Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı'nda hazırlanan UHT-TL ile Lipozyme TL-100L (serbest enzim) ve Lipozyme TL-IM (ticari tutuklanmış enzim), atık kızartma yağından biyodizel üretimi reaksiyonlarında kullanılmış, reaksiyon parametreleri incelenmiş ve her biri ile elde edilen YAME içerikleri karşılaştırılmıştır.

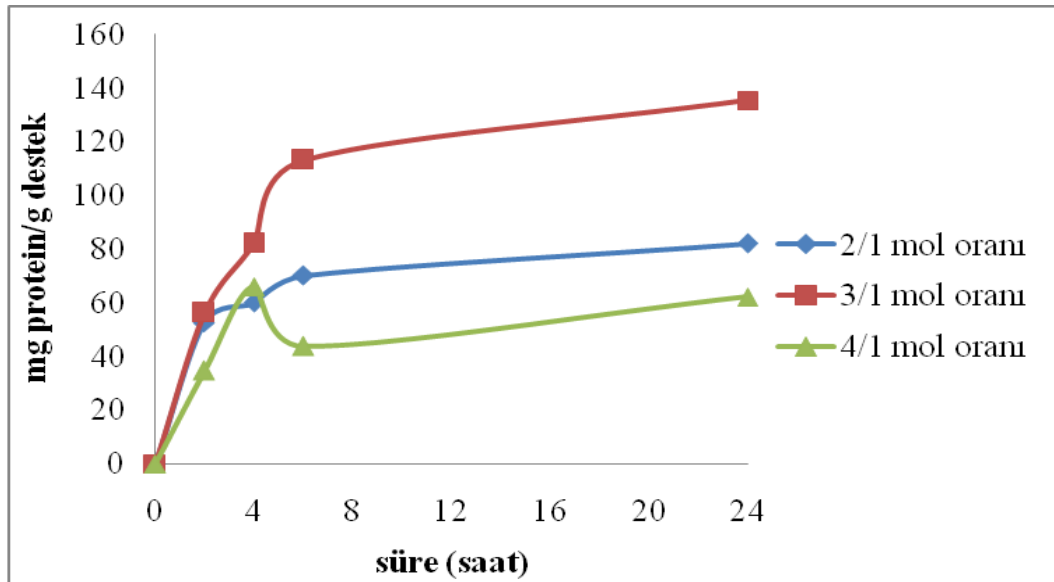
3.1. Mg/Al Hidrotalsit ve İnorganik Perlit Desteğine Lipaz Tutuklama

Öncelikle tutuklama desteği olarak kullanılmak üzere, Mg/Al hidrotalsit (UHT) daha önce belirtilen yöntemi kullanılarak farklı Mg/Al mol oranlarında (3/1 ve 4/1) sentezlenmiştir (Akbin, 2012). Daha önce yapılan çalışma ile karşılaştırılmak üzere Şekil 3.1'de tutuklama verimine Mg/Al mol oranının ve tutuklama süresinin etkisi verilmiştir. Görüldüğü gibi tutuklama süresinin artmasıyla Mg/Al hidrotalsit desteğe tutuklanan enzim miktarı önce artmış sonra Mg/Al mol oranının 3/1 ve 4/1 olması durumunda sırası ile %36 ve %16 tutuklanma verimine ulaşılmıştır. Tutuklama işleminin devam etmesiyle desteğe bağlanan protein miktarı sabit kalmıştır. Elde edilen tutuklama verimleri, Mg/Al mol oranı 2/1 olması durumunda elde edilen değerden (%90) daha düşük olmuştur. Hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100 L aktivitesi hidrotalsitin Mg/Al mol oranı 3/1 ve 4/1 olduğu durumda sırasıyla 0,1016 U/mg destek ve 0,1114 U/mg destek olarak ölçülmüştür. Lipaz aktivitesi 0,1335 U/mg destek olarak belirlenmiştir. Şekil 3.1'deki sonuçlara göre biyodizel üretim

çalışmalarında Mg/Al mol oranı 2/1 olarak hazırlanan hidrotalsit desteğin tutuklama desteği olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Şekil 3.2’de ise karşılaştırma desteğe tutuklanan enzim miktarına (mg protein/g destek) bağlı olarak verilmiştir.



Şekil 3.1. Lipozyme TL 100 L'nin hidrotalsite tutuklanmasında Mg/Al mol oranı ve sürenin tutuklama verimine etkisi (Tutuklama koşulları: 0,01 gr destek, 3 ml pH 8.5 Tris-HCl tampon, 50 µl enzim, 200 rpm, 37 °C, 24 saat)

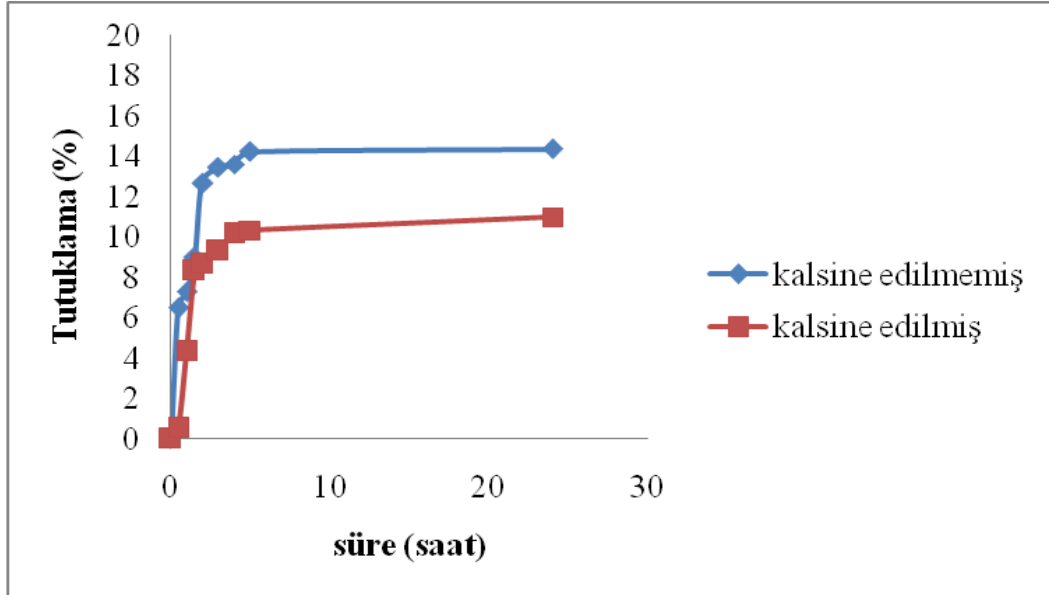


Şekil 3.2. Lipozyme TL 100 L'nin hidrotalsite tutuklanmasında Mg/Al mol oranı ve sürenin desteğe yüklenen enzim miktarına etkisi (Tutuklama koşulları: 0,01 gr destek, 3 ml pH 8.5 Tris-HCl tampon, 50 µl enzim, 200 rpm, 37 °C, 24 saat)

Lipozyme TL 100 L Mg/Al mol oranının tutuklanmasında, desteğe yüklenen enzim miktarı Mg/Al için 3/1 mol oranı olduğu durumda daha yüksek (135,4 mg protein/g

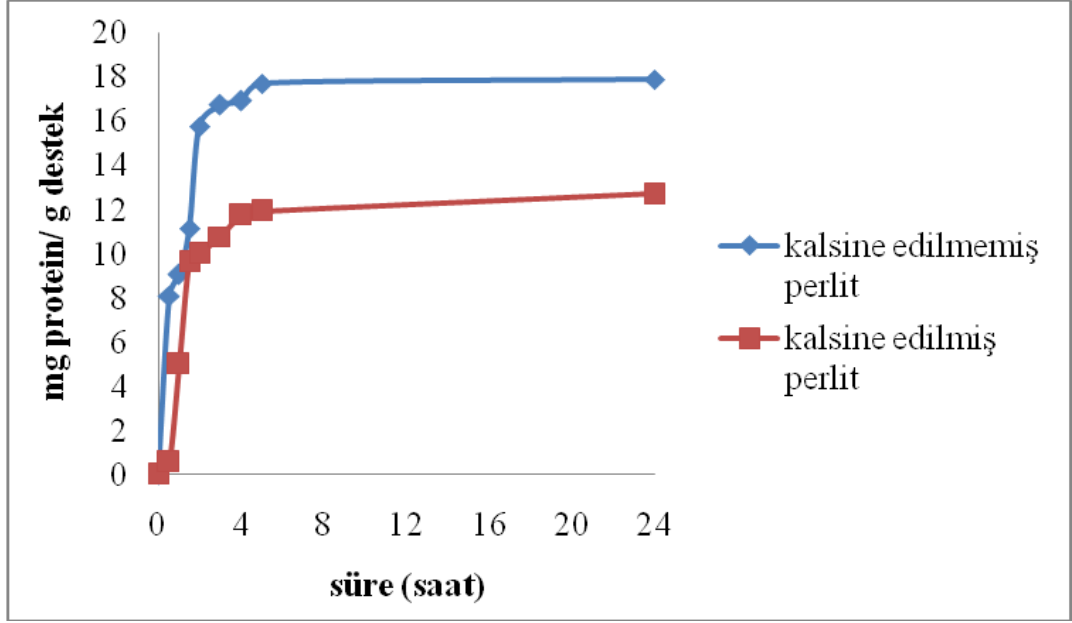
destek) olmasına rağmen, Şekil 3.1'den anlaşıldığı gibi tutuklanma verimi %30 değeri ile 2/1 mol oranının oldukça altındadır. Burada önemli olan en yüksek tutuklanma veriminin elde edilerek enzim kaybının önlenmesidir. Bu nedenle, yüksek tutuklama verimine sahip olan 2/1 mol oranı ile sentezlenmiş hidrotalsit desteğin tutuklama desteği olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Literatürde inorganik perlit üzerine *Thermomyces lanuginosa* lipazının tutuklanmasıyla ilgili bir çalışma yer almamaktadır. Şekil 3.3'de görüldüğü üzere 24 saat süre sonunda tutuklama verimleri kalsine edilmiş ve kalsine edilmemiş perlit için sırasıyla % 17 ve % 12 olarak belirlenmiştir. Aktivitelerine bakıldığında sırasıyla 0,0072 U/mg destek ve 0,0069 U/mg destek olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.3. Perlit desteğine Lipozyme TL 100 L'nin tutuklanmasında kalsinasyon işleminin tutuklama verimine etkisi (Tutuklama koşulları: 0,01 g destek, 3 ml pH 8.5 Tris-HCl tampon, 50 µl enzim, 200 rpm, 37 °C, 24 saat)

Kalsine edilmiş ve edilmemiş perlit desteğine yüklenen protein miktarları incelendiğinde (Şekil 3.4) desteğe yüklenen enzim miktarı 24 saat sonunda kalsine edilmiş ve kalsine edilmemiş perlit için sırasıyla 12 mg protein/g destek ve 18 mg protein/g destek olarak ölçülmüştür. Düşük olan tutuklama verimlerine paralel olarak desteğe yüklenen protein miktarları da düşüktür. Deneysel çalışmalar sonucu *Thermomyces lanuginosa* lipazını kalsine edilmiş perlit üzerine tutuklanmasının uygun olmadığına varılmıştır.



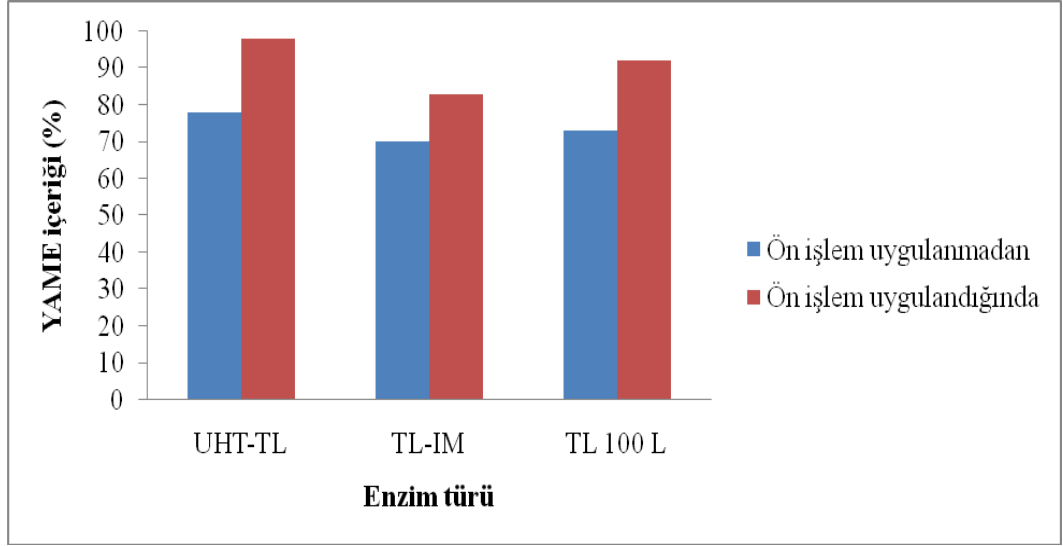
Şekil 3.4. Perlit desteğine Lipozyme TL 100 L'nin tutuklanmasında kalsinasyon işlemi ve sürenin tutuklanan enzim miktarına etkisi (Tutuklama koşulları: 0,01 gr destek, 3ml pH 8.5 Tris-HCl tampon, 50 µl enzim, 200 rpm, 37 °C, 24 saat)

3.2. Atık Kızartma Yağından Biyodizel Üretimi

Tutuklanmış lipaz katalizörlüğünde atık kızartma yağının metanolizi ile biyodizel üretimine, enzim türü, yağ/alkol mol oranı, reaksiyon ortamındaki başlangıç su miktarı, reaksiyon sıcaklığı, enzim miktarı, metanol ekleme sıklığı, çözücü türü ve reaksiyon süresi gibi parametrelerin etkileri incelenmiş, elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir. Katalizör olarak *Thermomyces lanuginosa* enzimi Mg/Al (mol oranı 2) desteğe tutuklanarak kullanılmış, ayrıca aynı enzimin ticari tutuklu formu (TL-IM) ve serbest formu (TL 100L) biyodizel üretim reaksiyonlarında kullanılarak performansları karşılaştırılmıştır.

Reaksiyonda kullanılan atık kızartma yağına bazı ön işlemler uygulanmıştır. İçindeki safsızlıklardan arındırılmak için süzülen atık yağ, 105 °C'de 25 dk ısıtılarak içindeki suyun uzaklaşması sağlanmıştır. Filtre kâğıdı kullanılarak vakum pompası yardımıyla nüçe erleninde süzülerek içerdiği safsızlıklar (pişirme sonrası yağda kalan tanecikler) uzaklaştırılmıştır. Kullanılan atık yağa ön işlem uygulanmasının etkisini belirlemek amacıyla önceden belirtilen koşullarda deneyler yapılmıştır. Şekil 3.5'de görüldüğü gibi yağa ön işlem uygulanmaması durumunda 24 saat süre sonunda YAME içerikleri UHT-TL, TL-IM ve TL 100L için sırasıyla %78, %70 ve %73

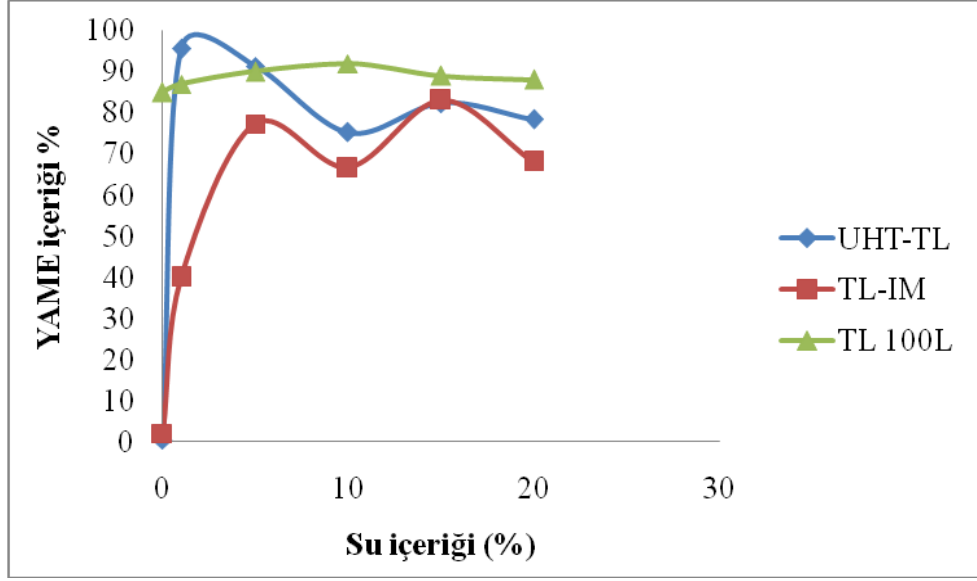
olarak belirlenmiştir. Ön işlem uygulandığında ise üç enzim için sırasıyla %98, %83 ve %92 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle sonraki tüm deneylerde yağa ön işlem uygulanarak kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Atık kızartma yağından lipaz katalizli biyodizel üretiminde uygulanan ön işlemin ve enzim türünün YAME içeriğine etkisi

3.2.1. Reaksiyon ortamındaki su miktarının etkisi

Biyokatalizörler aktifliklerini koruyabilmek için az bir miktarda suya ihtiyaç duyarlar (Charpe ve Rathod, 2011). Bu çalışmada, farklı miktarlarda (yağa göre kütlece %0-20) ortama eklenen suyun biyodizel üretimine etkisi incelenmiştir. Enzim miktarı %5, sıcaklık 35 °C de sabit tutularak, yağ/metanol oranı 1/4 iken, 24 saat süreyle, 200 rpm çalkalama hızında reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Her üç enzim türü için de başlangıç ortam su içeriğinin YAME içeriğine etkisi toplu olarak Şekil 3.6'da verilmiştir.

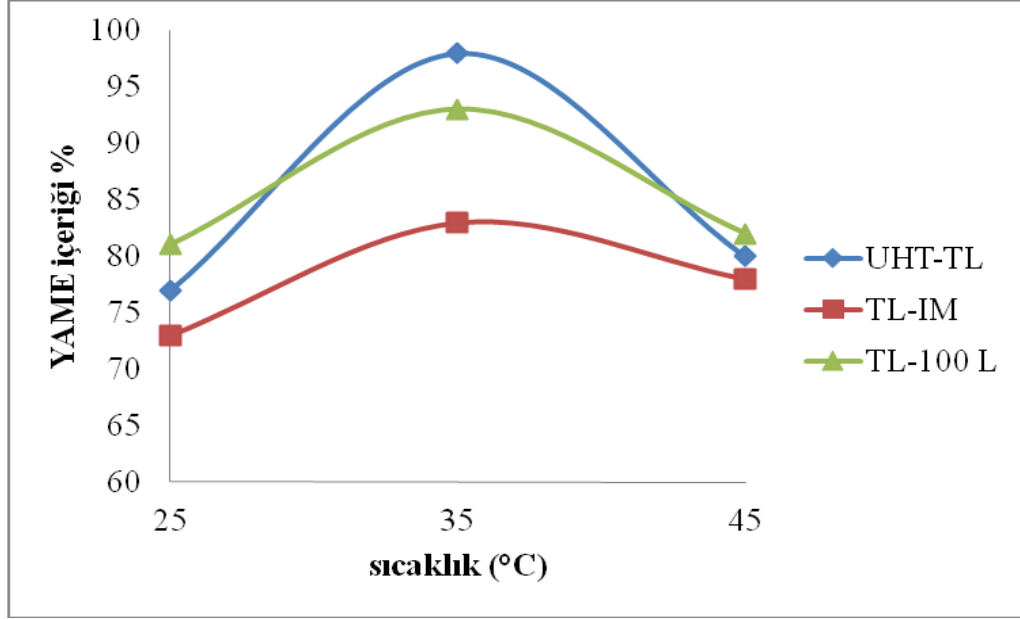


Şekil 3.6. Atık kızartma yağından lipaz katalizli biyodizel üretiminde başlangıç su miktarının ve enzim türünün YAME içeriğine etkisi

Ortamda başlangıçta su bulunmadığında Lipozyme TL-IM ve UHT-TL için YAME verimi sırası ile %2, %0,5 olarak hesaplanmıştır. Buna karşın serbest enzim (Lipozyme TL-100 L) ile %85 YAME içeriği elde edilmiştir. Sonuçta tutuklanmış lipazların ortama su eklenmemesi durumunda hemen hemen hiç aktivite göstermediği söylenebilir. UHT-TL için ortamın çok az (%1) su içermesi ile %98 YAME içeriğine ulaşılmıştır. En yüksek YAME içeriği Lipozyme TL-IM için %15 su miktarı ile %83 iken, Lipozyme TL 100 L ile %10 suyun bulunduğu durumda %92 olarak elde edilmiştir. Benzer sonuçlar başka çalışmalarda da gözlenmiştir (Al zuhair ve diğ., 2006; Dizge ve Keskinler 2008; Akbin, 2012).

3.2.2. Sıcaklığın etkisi

Yağ/metanol mol oranı 1/4 olduğu durumda ve reaksiyon ortamına metanolün 3 basamak halinde eklendiği koşulda, sıcaklığın YAME içeriğine etkisi incelenen lipaz türleri için Şekil 3.7’de verilmiştir. Her bir lipaz için önceki deneylerde en yüksek verimin elde edildiği su içerikleri kullanılmıştır. Sıcaklığın biyodizel üretimine etkisi serbest enzimle karşılaştırıldığında daha fazla olmuştur. En uygun sıcaklığın her üç lipaz içinde 35 °C olduğu, üzerinde ve altında YAME içeriğinde azalma olduğu görülmüştür. Elde edilen en yüksek YAME içerikleri, Lipozyme TL-IM, Lipozyme TL-100L ve UHT-TL varlığında sırasıyla %83, %92 ve %98’tür.



Şekil 3.7. Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde lipaz türü ve sıcaklığın YAME içeriğine etkisi (%5 enzim, su içeriği; UHT-TL için %1, TL-IM için %15, 100 L için %10)

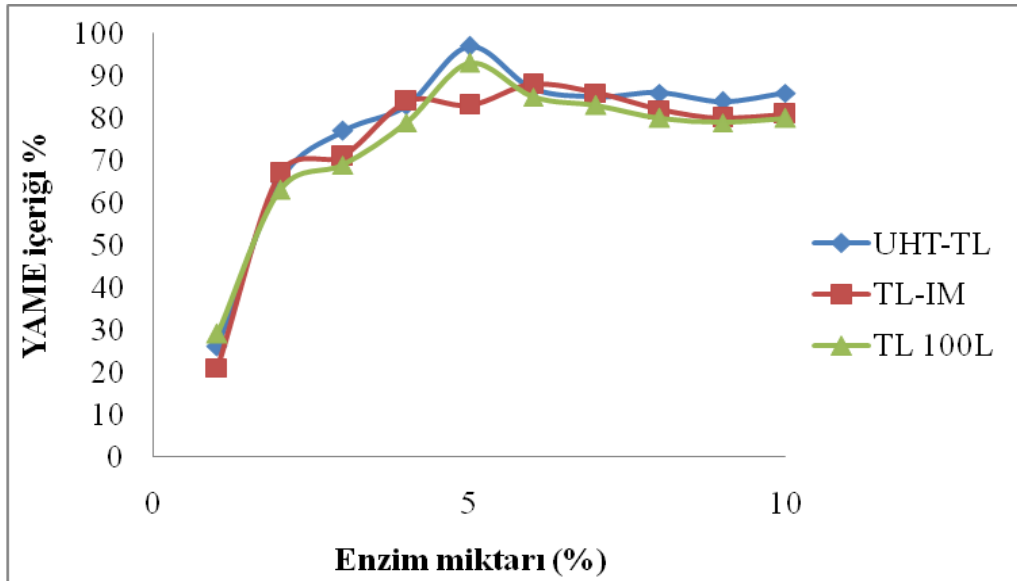
Farklı tür enzimleriyle katalizlenen transesterleşme tepkimesi için en uygun sıcaklık aralığı 30-50 °C'dir (Akbin, 2012). Serbest lipazın sıcaklık değişiminden az miktarda etkilendiği görülmüştür. Tutuklama desteğine bağlı olarak lipazın farklı sıcaklıklarda farklı aktiviteler gösterdiği söylenebilir. Sıcaklığın 35 °C'nin üzerinde olması durumunda ise tutuklanmış enzim aktivitesinin olumsuz etkilendiği düşünülmektedir. Çünkü benzer şekilde, Charpe ve arkadaşlarının farklı lipaz türleri ile atık yağdan biyodizel üretimi yaptıkları çalışmada sıcaklık artışıyla enzim aktivitesinin daha çok düştüğü, buna bağlı olarak YAME içeriğinde değişme olmadığını gözlemlemişlerdir (Charpe ve Rathod, 2011).

3.2.3. Enzim türü ve miktarının etkisi

Bu çalışmada, enzim miktarı yağa göre kütlece %1-10 aralığında değiştirilmiş ve her bir reaksiyonda elde edilen YAME içeriği hesaplanmıştır. Her bir lipaz için en uygun ortam su içeriği değerleri kullanılmış, yağ/metanol mol oranı 1/4 olacak şekilde metanol üç basamakta eklenerek 24 saat süre ile 35 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalanma hızında reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Atık kızartma yağının metanolizi ile biyodizel üretimine lipaz türü ve miktarının etkisi Şekil 3.8'de verilmiştir. En yüksek YAME içerikleri %5 enzim kullanımı ile UHT-TL, Lipozyme

TL-IM, Lipozyme TL-100L için sırasıyla %98, %83 ve %93 ve olarak elde edilmiştir. Görüldüğü gibi enzim miktarının artmasıyla incelenen tüm enzimler için YAME içeriği önce artmış, %5 değerinin üzerinde ise azalmıştır. Bunun nedeni, yüksek katalizör derişimlerinde karışmanın etkili olmamasındandır. Bu durumda yağ-su ara yüzeyi ile etkin bir temas yüzeyi sağlayamayan lipazın aktivitesi düşmüştür. Enzimde kümelenme oluşması nedeniyle tepkime hızı gerilemiştir. Benzer davranış başka çalışmalarda da gözlenmiştir (Akbin, 2012; Dizge ve Keskinler, 2008).

Ortama eklenen enzim miktarı arttıkça enzimatik biyodizel üretim tepkimelerinde metil ester verimi artmaktadır (Akbin, 2012; Dizge ve Keskinler, 2008). Enzimatik olarak gerçekleştirilen transesterleşme tepkimelerinde en yüksek verime ulaşmak için enzim miktarı en uygun değere ulaşıncaya kadar artırılmalıdır. Enzim miktarı arttırılmaya devam edilirse YAME içeriği ya sabit kalmakta ya da düşmektedir. Enzim miktarı arttırılmaya devam edilirse maliyetin de artmaya devam edeceği unutulmamalıdır.



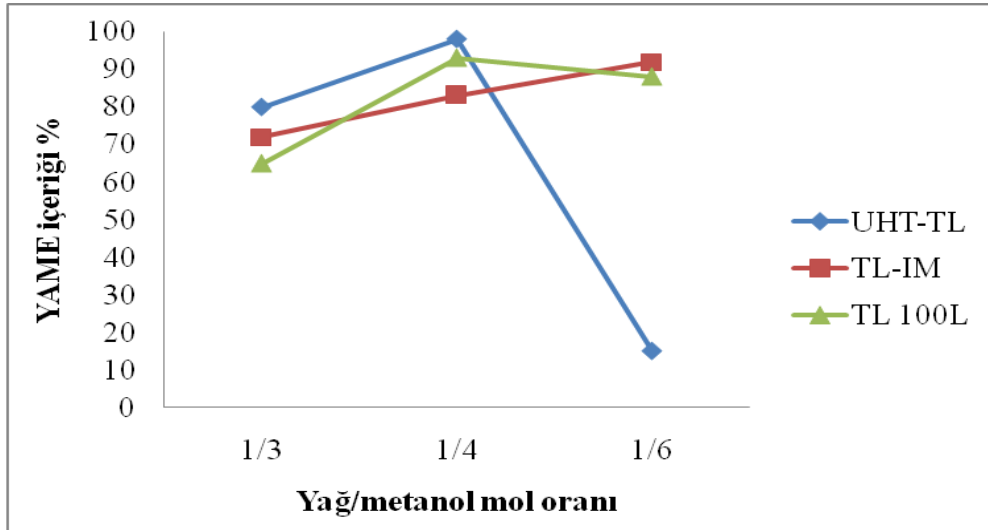
Şekil 3.8. Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde lipaz türü ve enzim miktarının YAME içeriğine etkisi

3.2.4. Yağ/metanol mol oranının etkisi

Enzimatik transesterleşme tepkimeleri için stakiyometrik oran 1/3 (yağ/alkol)'tür. Denge tepkimesi olan transesterleşme tepkimesinde ortama fazla miktarda alkol

eklendiğinde tepkime ürünler yöüne (biyodizel) yönüne kaymaktadır. Bununla birlikte alkol tepkime ortamında çözünmez ise enzim üzerinde inhibisyon etkisi yaratmaktadır. Bu çalışmada yağ/metanol mol oranının YAME verimine etkisini gözlemek için 1/3, 1/4 ve 1/6 mol oranı değerlerinde reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Her bir lipaz için optimum su içeriklerinde, metanolün üç basamak halinde eklenmesiyle, 35 °C sıcaklık, 200 rpm çalkalanma hızı ve 24 saat süreyle reaksiyonlar gerçekleştirilmiş, enzim miktarı %5 olarak alınmıştır.

Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde, enzim türü ve yağ/metanol mol oranının YAME içeriğine etkisi Şekil 3.9’da verilmiştir.



Şekil 3.9. Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde enzim türü ve yağ/metanol mol oranının YAME içeriğine etkisi

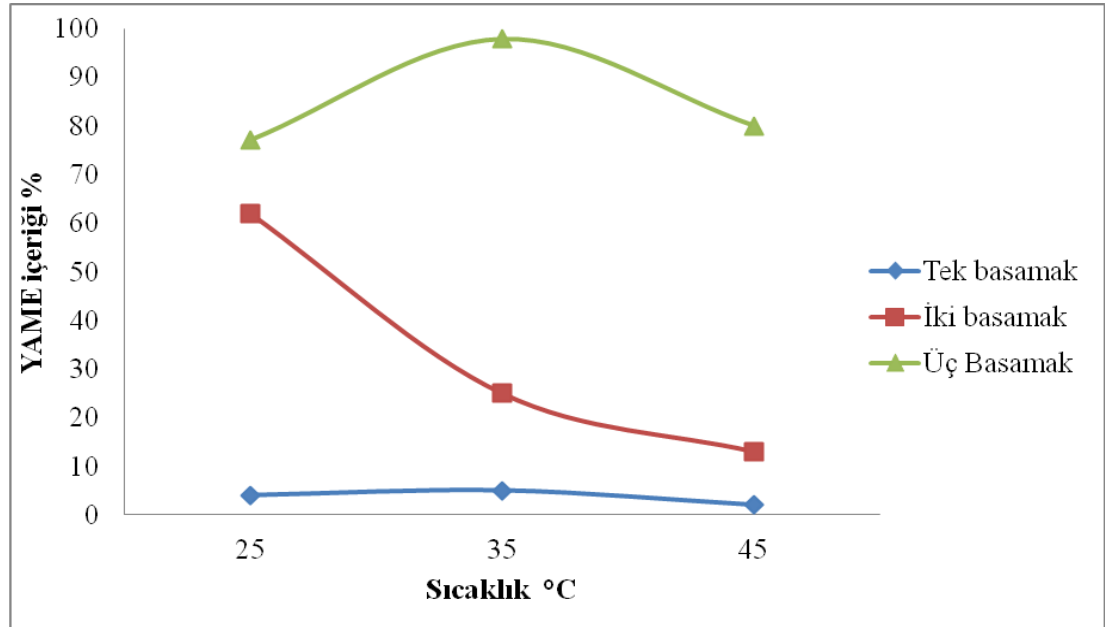
Şekilde görüldüğü gibi UHT-TL kullanımında, YAME içeriği metanol miktarının 1/3'ten 1/4'e artmasıyla artmış, fakat 1/6 mol oranına çıkıldığında oldukça azalmıştır. Bu sonuç, reaksiyon ortamındaki fazla metanolün UHT-TL üzerindeki olası inhibisyon etkisinden kaynaklanabilir. Yağ/metanol mol oranının artmasıyla YAME içeriğinde Lipozyme TL-IM ve Lipozyme TL 100 L enzimlerinin kullanıldığı durumda artış gözlenmiştir. Bu sonuç ortamdaki artan metanolün bu iki enzim üzerinde inhibisyon etkisi yaratmadığını göstermektedir. En yüksek YAME içeriği, 1/4 mol oranı kullanımında, UHT-TL için %98, TL-100 için %92 iken, 1/6 mol oranında TL-IM için %92 olarak belirlenmiştir. Literatürde yapılan atık yağdan biyodizel üretimi çalışmalarında, yağ/alkol mol oranı 1/3 ve 1/4 olarak

kullanıldığında en yüksek YAME içeriğine ulaşıldığı belirtilmektedir (Charpe and Rathod, 2011; Yan ve diğ., 2011; Rodrigues ve diğ., 2011).

3.2.5. Alkol ekleme sıklığının etkisi

Ortamda bulunan yüksek derişimli alkollerin etkisinde enzimlerin aktivitesi bozulur. Enzimlerin aktivitesini kaybetmemeleri için kullanılan alkol reaksiyon ortamına basamaklı eklenmelidir (Dizge ve Keskinler, 2008; Akbin, 2012).

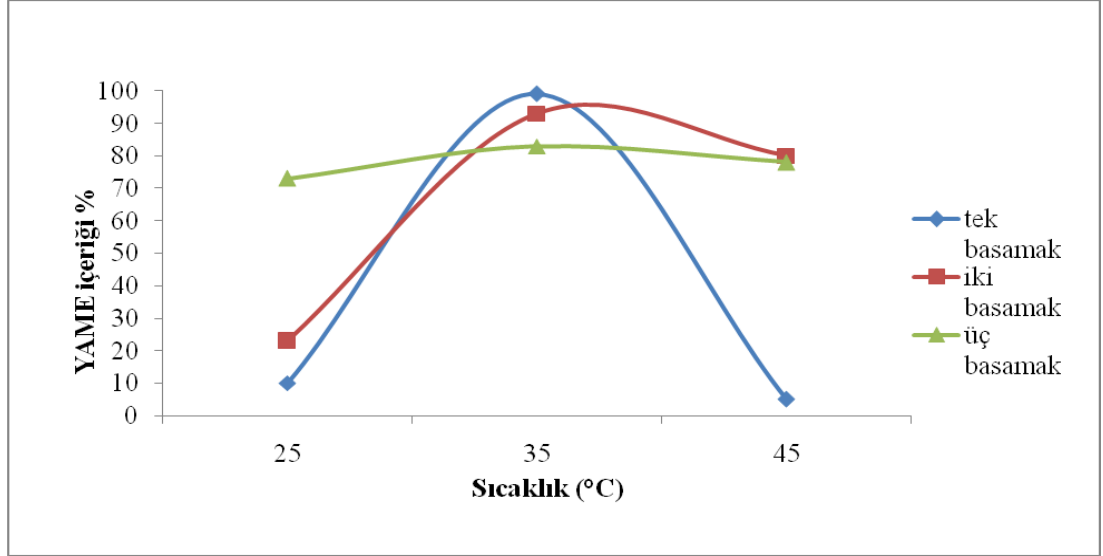
Bu çalışmada, her bir lipaz için optimum su içerikleri ile enzim miktarı %5, çalkalanma hızı 200 rpm ve 25-45 °C sıcaklık aralığında, yağ/metanol mol oranı 1/4 olduğunda, 24 saat süreyle reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Metanol, reaksiyon ortamına tek basamaklı, iki (6 saatte bir) ve üç basamaklı (4 saatte bir) olarak eklenmiş ve UHT-TL ile elde edilen YAME verimleri Şekil 3.10'da verilmiştir. Atık kızzartma yağından biyodizel üretiminde metanol ekleme sıklığının sıcaklıkla değişimi ve diğzer enzim türlerinin etkileri Lipozyme TL-IM için Şekil 3.11'de, Lipozyme 100 L için Şekil 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3.10. UHT-TL katalizörlüğünde atık kızzartma yağından biyodizel üretiminde alkol ekleme sıklığının ve sıcaklığın etkisi

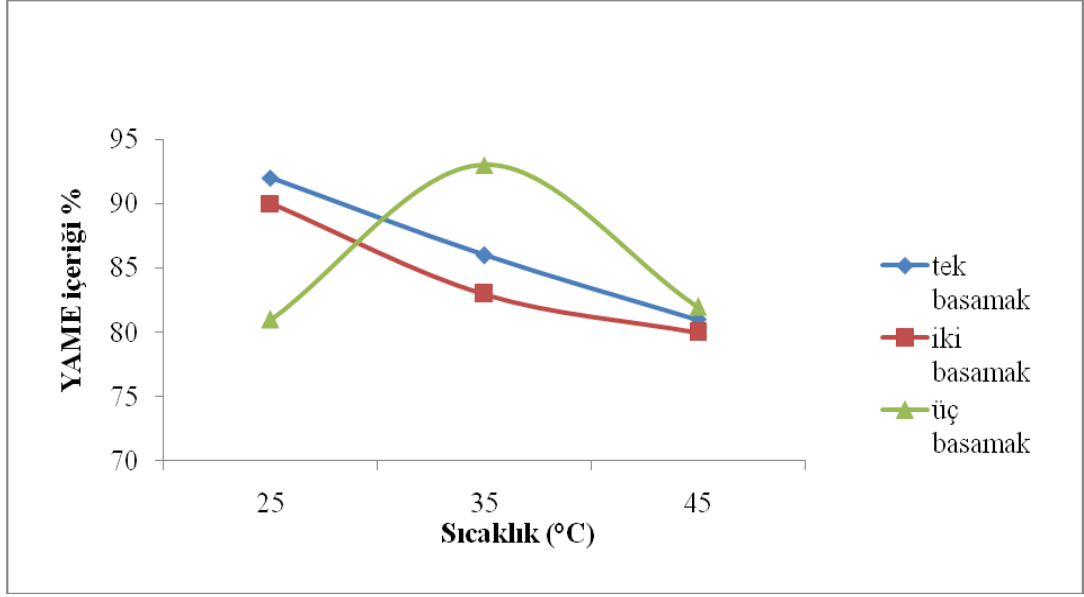
UHT-TL lipazı için 25-45 °C sıcaklık aralığında tek basamakta alkol eklemenin enzim üzerinde inhibisyon etkisini gösterdiği Şekil 3.10'da açıkça görülmektedir. İki basamakta metanol eklenmesiyle 25 °C sıcaklıkta YAME içeriği %62 olarak

belirlenmiş; sıcaklığın artmasıyla inhibisyon etkisinin attığı gözlenmiştir. Üç basamaklı metanol eklemesi incelenen üç sıcaklık için en iyi sonuçları vermiş alkolün inhibisyon etkisinin önüne geçilmiş ve 25 °C, 35 °C ve 45 °C reaksiyon sıcaklığında YAME içeriği sırasıyla %78, %98 ve %80 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.11. Lipozyme TL-IM katalizörlüğünde atık kızartma yağından biyodizel üretiminde alkol ekleme sıklığının ve sıcaklığın etkisi

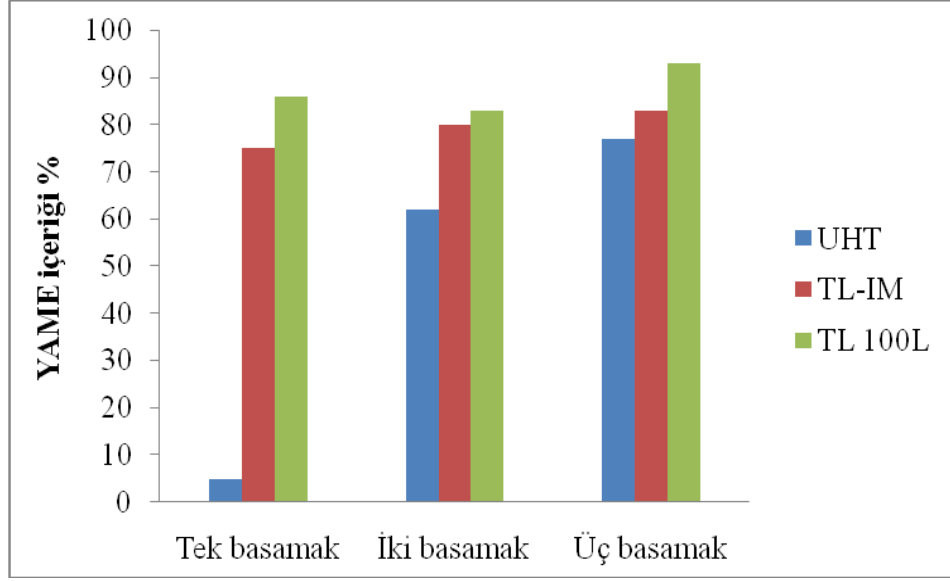
Şekil 3.11 ile Lipozyme TL-IM lipazı için 35 °C sıcaklığında tek basamakta alkol eklemenin enzim üzerinde inhibisyon etkisinin olmadığını açıkça görülmektedir. Bu enzim için optimum sıcaklık 35 °C'dir. Tek, iki ve üç basamakta 35 °C ortam sıcaklığında alkol eklendiğinde YAME içeriği sırasıyla %87, %83 ve %95 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.12. Lipozyme TL 100 L katalizörlüğünde atık kızartma yağından biyodizel üretiminde alkol ekleme sıklığının ve sıcaklığın etkisi

Lipozyme TL 100 L lipazı için alkolün reaksiyon ortamına tek ve iki basamakta eklenmesi ve sıcaklığın artmasıyla YAME içeriğinde düşüş gözlenmiştir. Şekil 3.12'deki değerlere göre en iyi koşullar metanolün 25 °C'de tek basamak eklenmesiyle %92, çift basamak eklenmesiyle %93, üç basamak eklemeye ise 35 °C'de % 98 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak alkolün reaksiyon ortamına tek basamak, iki basamak ve üç basamak halinde eklenmesi Lipozyme TL-IM ve Lipozyme TL 100 L için belirgin bir etki göstermemiştir. UHT-TL için, ortama tek basamakta eklenen alkolün enzimi deaktive ettiği, üç basamakta metanol eklendiği durumda ise UHT-TL enzimi için YAME içeriği artış göstermiş ve en yüksek değerine ulaşmıştır. Her üç enzim içinde metanolün üç basamak eklenmesi durumunda, 35 °C sıcaklık en uygundur. Şekil 3.13'de her üç enzimin 35 °C sıcaklıkta tek, iki ve üç basamak alkol eklenmesi durumunda YAME içerikleri gösterilmektedir.



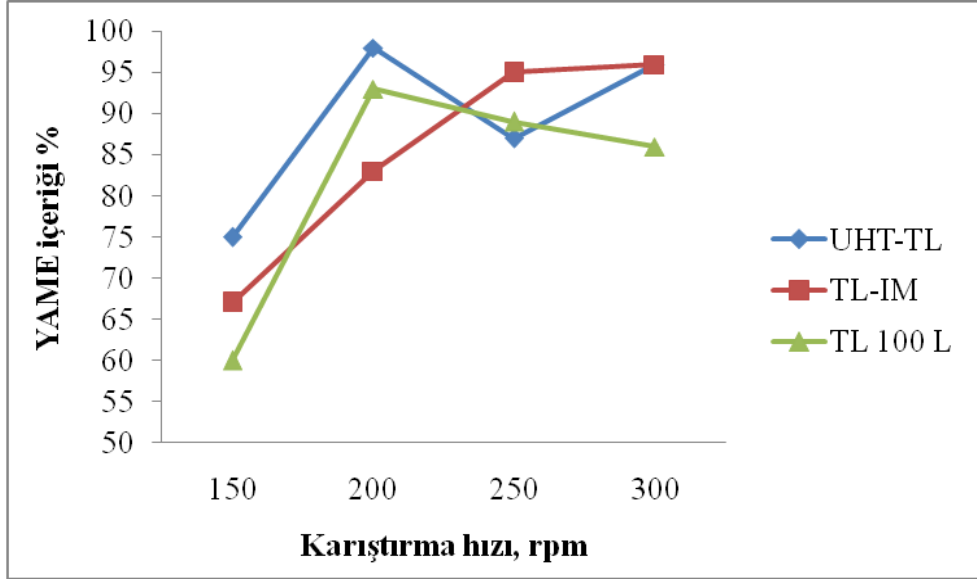
Şekil 3.13. Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde enzim türü ve metanol ekleme sıklığının YAME içeriğine etkisi

Yapılan literatür araştırmasında, Charpe ve Rathod 2011 atık kızartma yağının *Pseudomonas fluorescens* lipazı katalizörlüğünde metanolizi ile biyodizel üretimini inceledikleri çalışmalarında, reaksiyon ortamına metanolü tek ve üç basamakta eklemişler ve tek basamakta metanol eklemenin enzim üzerine inhibisyon etkisinin yarattığını belirlemişlerdir. Üç basamakta metanol eklendiğinde YAME içeriğinde en yüksek verim %64 elde etmişlerdir. Dizge ve Keskinler, 2008 yılında yaptıkları çalışmalarında, enzimatik biyodizel üretimi reaksiyonlarında alkolün reaksiyon ortamına tek basamakta eklendiği durumda enzim üzerine inhibisyon etkisini yarattığını vurgulamışlardır.

3.2.6. Karıştırma hızının etkisi

Reaksiyonda etkin karışma sayesinde kap içerisindeki kütle aktarım kısıtlamalarının önüne geçilerek yağ/su ara yüzeyinde gerçekleşen transesterleşme için uygun koşullar sağlanmış olur. Düşük karıştırma hızlarında tutuklanmış lipazın sıvı faz içinde homojen dağılamaması ya da yüksek hızlarda tutuklu lipazın kap çeperlerinin yukarısına doğru yönlenecek sıvı fazdan ayrılması ve yapışması da birer karışma problemi (Xin, 2008; Kutluk, 2012). Bu nedenle, en uygun karıştırma hızı ile mümkün olduğunca düşük hızda ancak etkin bir karışmanın gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu amaçla deneysel çalışmanın bu bölümünde 150, 200, 250 ve 300

rpm olarak belirlenen dört farklı karıştırma hızında çalışılmıştır. Farklı karıştırma hızlarının YAME içeriğine etkisi Şekil 3.14’de verilmiştir.



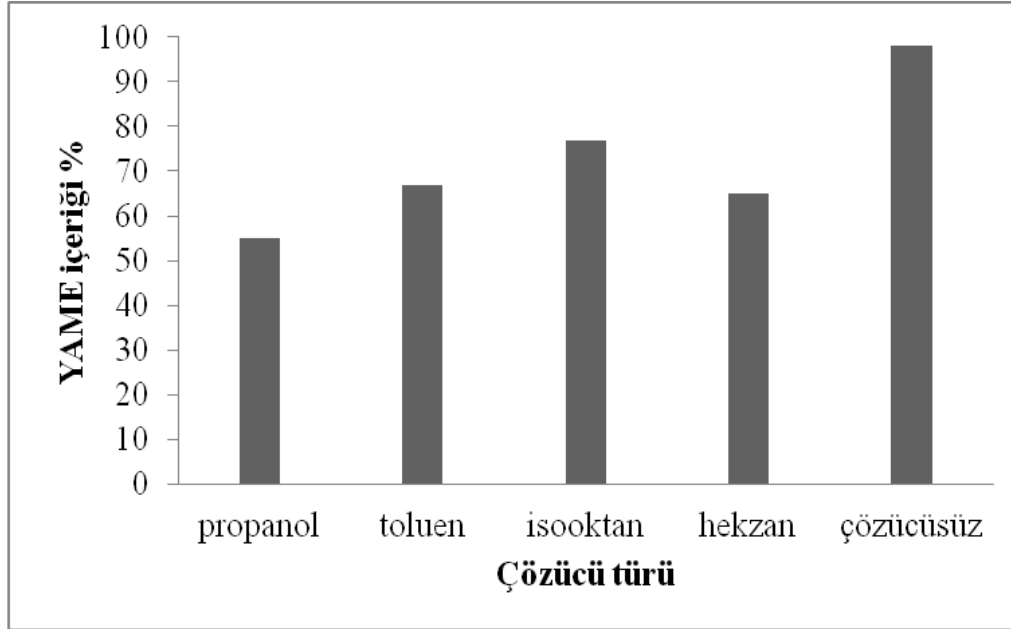
Şekil 3.14. Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde karıştırma hızının ve enzim türünün YAME içeriğine etkisi

Her bir lipaz için optimum su içerikleri seçilmiş, 35 °C sıcaklıkta, 24 saat süreyle reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Metanol üç basamak halinde sisteme eklenmiş, enzim miktarı %5 olarak seçilmiştir. Şekil 3.14’te görüldüğü gibi elde edilen bu sonuçlara göre fazlar arası kütle aktarım kısıtlamalarını yenebilmek için 150 rpm karıştırma hızı her üç enzim için yetersiz kalmaktadır. 200 rpm ve sonrası karıştırma hızlarında bu engelin aşıldığı görülmektedir. 200 rpm’de YAME içerikleri UHT-TL, Lipozyme TL-IM ve Lipozyme TL 100 L için sırasıyla %98, %83 ve %92 olarak belirlenmiştir. Literatürde atık yağdan biyodizel üretimi çalışmalarında karıştırma hızının reaksiyon YAME içeriğine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

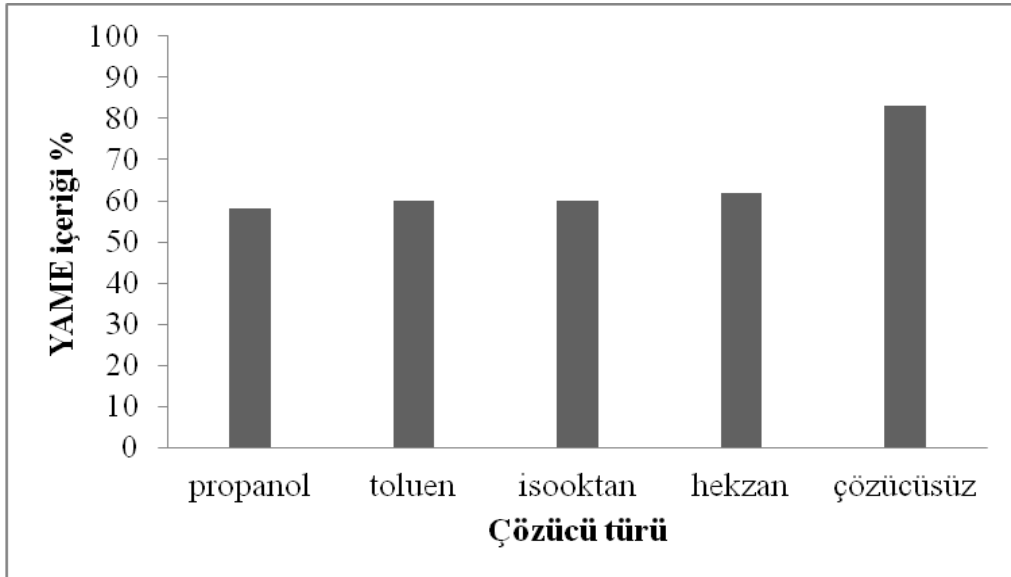
3.2.7. Çözücü türünün etkisi

Farklı organik çözücüler, tutuklanmış lipaz ve yağın vizkositesini düşürerek reaksiyonun verimini etkilerler. ,LogP değeri ayrışma sabiti ve polarite sabiti olarak bilinmektedir. Genellikle logP değeri ikiden büyük organik çözücüler seçilmektedir (Song ve Wei., 2002). Bu çalışmada, farklı çözücüler (propanol, isooktan, toluen, hekzan) kullanılarak atık yağdan biyodizel üretiminin YAME içeriğine etkisi araştırılmıştır. Her bir enzim için optimum su içeriğinde, üç basamak metanol

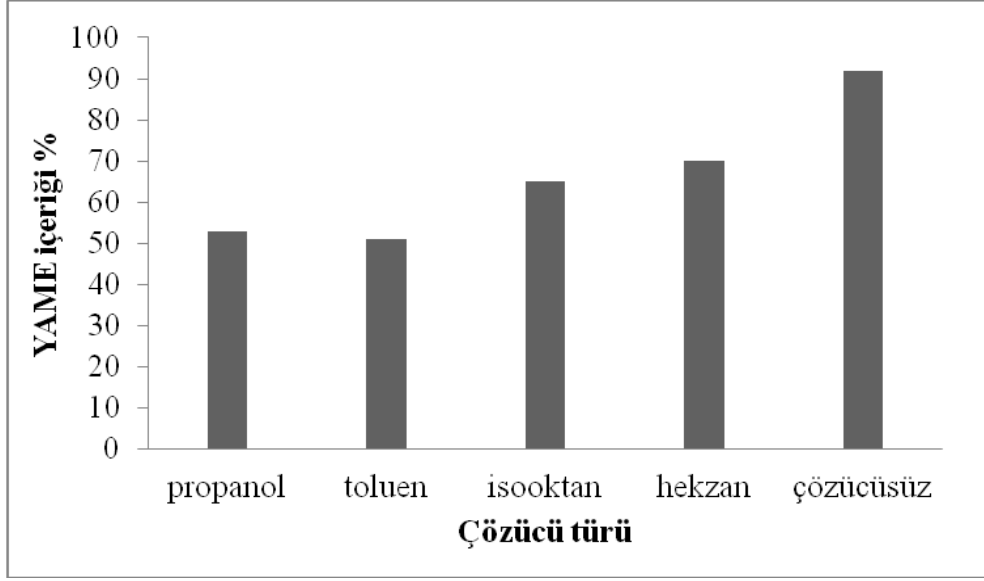
eklenerek, enzim miktarı %5, 35 °C sıcaklıkta ve çözücü miktarı ağırlıkça kullanılan yağa göre (2 g) hazırlanarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar her bir enzim için çözücü olarak propanol (logP 0,28), toluen (logP 2,386) isooktan (logP 3,668), ve kullanıldığında hekzan (logP 3,657) Şekil 3.15, 3.16, 3.17’de verilmiştir.



Şekil 3.15. Atık kızartma yağından UHT-TL ile biyodizel üretiminde çözücü türünün YAME içeriğine etkisi



Şekil 3.16. Atık kızartma yağından TL-IM ile biyodizel üretiminde çözücü türünün içeriğine etkisi



Şekil 3.17. Atık kızartma yağından TL 100L ile biyodizel üretiminde çözücü türünün YAME içeriğine etkisi

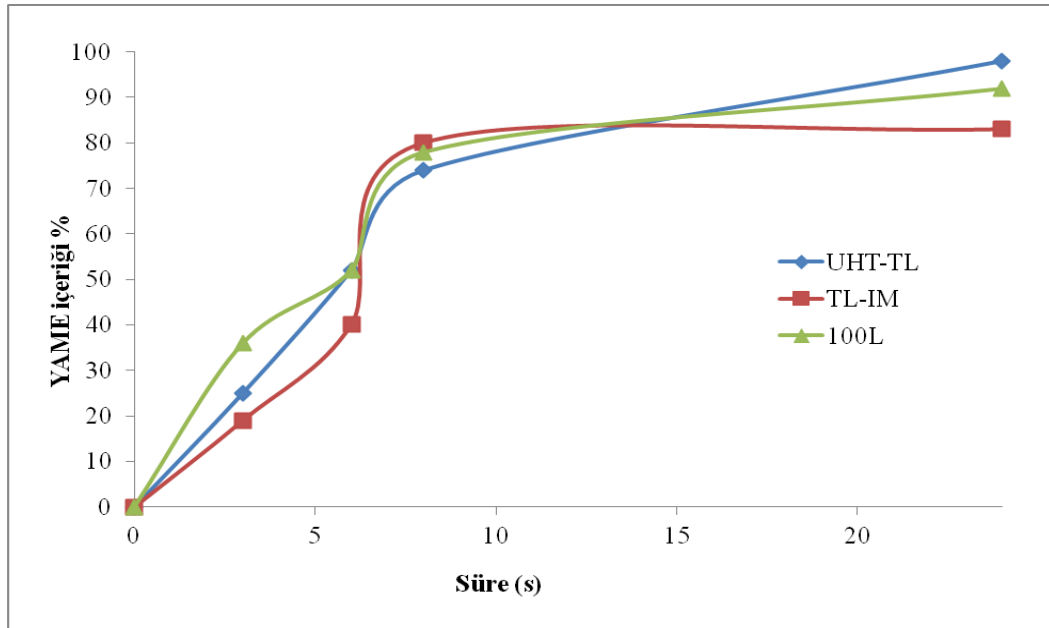
Sonuçlardan anlaşıldığı üzere reaksiyon ortamına çözücü eklenmesi atık kızartma yağından biyodizel üretim reaksiyonunun verimini olumsuz yönde etkilemiş ve YAME içeriğini azaltmıştır. Kullanılan çözücülerin lipaz aktivitesini olumsuz yönde etkilediği söylenebilir. UHT-TL kullanıldığında en yüksek YAME içeriğine (%77) çözücü olarak isooktan kullanıldığında ulaşılmıştır. Lipozyme TL-IM ve Lipozyme TL 100 L için en yüksek YAME içeriği sırasıyla %62 ve %70 hekzan kullanıldığında ulaşılmıştır. Görüldüğü gibi atık kızartma yağından biyodizel üretimi reaksiyonunda çözücü kullanılmadığı zaman daha yüksek YAME içeriklerine ulaşılmıştır.

Literatürde, polar çözücüler varlığında düşük dönüşüm elde edilmesi, polar yapıdaki çözücünün enzimin doğal yapısına zarar vermesi ile açıklanmıştır. Bunun nedeni, hidrojen bağlarının bozulması ve hidrofobik etkileşimlerin ortaya çıkması ile ifade edilmiştir (Bornscheuer, 2003). Buna ek olarak, polar çözücüler, reaksiyon ortamında, enzim için gerekli olan suyun sıyrılarak uzaklaşmasına neden olmakta, enzimin aktivasyonunu sağlayan mikro-sulu tabakaların kaybolmasına yol açmaktadır (Nie ve diğ., 2006).

3.2.8. Reaksiyon süresinin etkisi

Enzimatik biyodizel üretim reaksiyonları, asit ve alkali katalizli proseslere göre nispeten daha yavaş yürür. Enzimatik reaksiyon hızı zaman içinde azalır ve belirli bir süre sonunda dönüşümde bir değişimin olmadığı gözlenir (Charpe ve Rathod, 2011).

Bu çalışmada atık kızartma yağından biyodizel üretiminde kullanılan enzim türü ve reaksiyon süresinin etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.18'de verilmiştir. Başlangıç su miktarı her enzim için optimum koşullarda, metanol üç basamaklı eklenerek, yağ/metanol oranı 1/4 olacak şekilde reaksiyonlar yapılmıştır. 35 °C sıcaklık, %5 enzim miktarı, 200 rpm koşullarında yapılmış; ortamdan belli süreler sonunda alınan örneklerin YAME içerikleri belirlenmiştir.



Şekil 3.18. Atık kızartma yağından biyodizel üretiminde reaksiyon süresinin YAME içeriğine etkisi

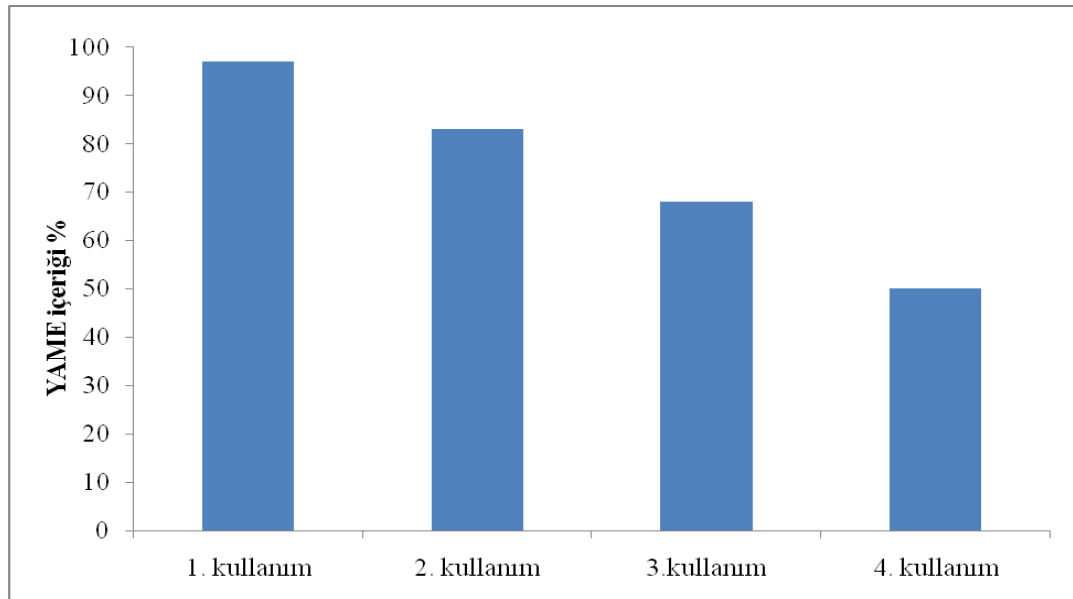
Görüldüğü gibi her üç enzim için de reaksiyon 8. saate kadar hızlı ilerlemiş buna bağlı olarak YAME içeriği artmış 8. saatten sonra sonra yavaşlamış ve YAME içeriği sabit kalmıştır. 24. saatte ise en yüksek YAME içeriklerine UHT-TL, TL-IM ve 100 L için sırasıyla, %98, %83 ve %92 olarak belirlenmiştir.

Literatüre bakıldığında atık kızartma yağından *Thermomyces lanuginosa* lipazı katalizörlüğünde biyodizel üretiminde sürenin etkisini inceleyen çalışma yoktur.

Watanabe ve arkadaşları (2001)'de yaptıkları çalışmada, atık kızartma yağından Novozyme 435 katalizörlüğündeki reaksiyonun oldukça yavaş gerçekleştiğini vurgulamışlar, 50 saat sonunda % 90,4 YAME içeriğine ulaşmışlardır. Halim ve arkadaşlarının 2008'de yaptıkları çalışmada ise, Novozyme 435 katalizörlüğünde atık yağdan biyodizel üretim reaksiyonu için, 12 saatte %88 YAME içeriği elde etmişlerdir. Chen ve arkadaşları 2007'de yaptıkları çalışmada, *Rhizopus oryzae* lipazı katalizörlüğünde, 30 saatlik reaksiyon sonunda, %90 YAME içeriği elde etmişlerdir. Aynı grup *Bacillus subtilis* mikroorganizmasını manyetik kapsüllere tutuklamışlar ve atık yağdan biyodizel üretimi reaksiyonu incelemişlerdir. 72 saatlik reaksiyon sonucunda %90 YAME içeriği elde etmişlerdir.

3.2.9. Tutuklanmış lipazın tekrar kullanılması

Endüstriyel uygulamalarda enzimlerin yüksek maliyetinden dolayı aktivitelerini kaybetmeden tekrar tekrar kullanılabilirmeleri önemlidir (Charpe ve Rathod, 2011, Nascantes ve diğ., 2011). Uygun bir desteğe tutuklanan enzimler sürekli proseslerde veya dolgulu reaktörlerde aktivitelerini kaybetmeden tekrar tekrar kullanılabilirler (Chen ve diğ., 2011). Bu çalışmada atık kızartma yağından biyodizel üretiminde UHT-TL enziminin tekrar kullanılabilirliği Şekil 3.19'da verilmiştir.



Şekil 3.19. Tutuklanmış lipazın tekrarlı kullanımını sonucunda reaksiyon veriminin değişimi (35 °C sıcaklık, 200 rpm, %5 enzim, 24 saat, 1/4 yağ/metanol mol oranı)

Önceden belirlenen en uygun koşullarda gerçekleştirilen reaksiyonlarda görüldüğü gibi ikinci ve üçüncü kullanım sonunda YAME içeriğinde fark edilebilir bir düşüş belirlenmiştir. Literatür incelendiğinde hidrotalsite tutuklanan *Thermomyces lanuginosa* lipazının tekrar kullanılabilirliğini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Benzer çalışmalarda biyodizel reaksiyonlarında daha çok Novozyme 435 ve Lipozyme TL-IM için tekrar kullanılabilirlik araştırılmıştır (Watanabe ve diğ., 2001; Du ve diğ., 2007).

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada lipaz katalizörlüğünde atık kızartma yağının metanol ile transesterleşmesi sonucunda biyodizel üretimi amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında sıvı formdaki *Thermomyces lanuginosa* lipazı hidrotalsit ve perlit desteklerine tutuklanmış, tutuklama verimi ve enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında sıcaklık, başlangıç su miktarı, yağ/alkol mol oranı, enzim miktarı ve türü, reaksiyon süresi, karıştırma hızı, metanol ekleme sıklığı çözücü kullanımı ve enzimin tekrar kullanılmasının biyodizel üretimine etkileri araştırılmıştır.

Lipozyme TL-100L (serbest), Lipozyme TL-IM (ticari tutuklu) ve UHT-TL (Mg/Al hidrotalsite tutuklu) enzimlerinin transesterleşme tepkimesindeki performansları incelenmiştir. Destek malzemesi olarak kullanılan Mg/Al hidrotalsit Mg/Al mol oranı 3/1 ve 4/1 olacak şekilde hazırlanarak üre hidrolizi yöntemi ile üretilmiştir. 24 saatlik tutuklama sonucunda Mg/Al mol oranı 3/1 ve 4/1 için sırasıyla %36 ve %16 verim elde edilmiştir. Enzim aktiviteleri sırasıyla 0,1016 U/mg destek ve 0,1114 U/mg destek olarak belirlenmiştir. Tutuklama verimleri, Akbin'in 2012'de Mg/Al mol oranı 2/1 olarak hazırlanan hidrotalsitten (%90 tutuklama verimi) oldukça düşüktür ve Mg/Al mol oranının artırılması ile tutuklama veriminin azaldığını destekler niteliktedir. İnorganik perlite yüzey aktifleştirme işlemleri uygulandıktan ve kalsinasyon işleminden sonra lipaz tutuklama verimi incelenmiş ve ham perlit ile lipaz tutuklama verimleri karşılaştırılmıştır. Her iki durum içinde tutuklama verimi %15 civarlarında olmuştur. Aktiviteleri sırasıyla 0,0072 U/mg destek ve 0,0069 U/mg destek olarak belirlenmiştir. Hidrotalsit desteğe lipaz tutuklamasında 3/1 ve 4/1 Mg/Al mol oranlarının uygun olmadığı, perlite tutuklamada ise ön işlemin uygun olmadığı belirlenmiştir. Mg/Al hidrotalsit lipaz tutuklama için destek malzemesi olarak kullanılacak ise Mg/Al mol oranı 2/1'i geçmemelidir. Mol oranının artması ile hidrotalsitin gözenekliğinin azaldığı ve destek yüzeyindeki kütle aktarım kısıtlamalarının arttığı düşünülmektedir. Tutuklama işlemi yapılırken enzimin

aktivitesini kaybetmemesi ve destek ile uyumlu yapısının bozulmaması gibi önemli detaylara dikkat edilmelidir. En ekonomik ve yüksek enzim aktivitesi sağlayacak yöntem kullanılarak katalizör maliyeti oldukça düşürülebilir. Bunun ile birlikte enzimin tekrar kullanılabilirliği araştırılmalıdır. Hazırlanan Mg/Al mol oranı 3/1 ve 4/1 olan hidrotalsitin ve inorganik perlitin tutuklama verimlerinin ve aynı zamanda aktivitelerinin düşük olması nedeni ile atık yağdan biyodizel üretiminde katalizör olarak kullanılmalarının uygun olmadığına karar verilmiştir. Çalışmanın sonraki aşamalarında Mg/Al mol oranı 2/1 olan hidrotalsit desteği hazırlanarak lipaz enzimi tutuklanmıştır ve atık yağdan biyodizel reaksiyonunda kullanılmıştır.

Atık kızartma yağından lipaz katalizli biyodizel üretiminin deneysel çalışmaları sonucunda, YAME elde etmek için en uygun koşullar belirlenmiştir. Reaksiyon koşulları 1/4 yağ/metanol mol oranı, 35 °C sıcaklık, %5 enzim miktarı, 200 rpm karıştırma hızı olarak belirlenmiş, metanol 3 basamakta eklenmiştir. 24 saatlik reaksiyon süresi sonunda başlangıç su içeriğinin Lipozyme TL-100L, Lipozyme TL-IM ve UHT-TL için sırasıyla %10, %15 ve %1 olduğu durum için en yüksek YAME içerikleri sırasıyla %92, %83, %98 olmuştur. Bu sonuçların literatürü doğruladığı görülmektedir.

Enzimler aktifliklerini koruyabilmek için az bir miktarda suya ihtiyaç duyarlar. Susuz ortamda gerçekleştirilen reaksiyonlarda ise UHT-TL, Lipozyme TL-IM ve Lipozyme TL 100 L için YAME içeriği sırası ile %2, %0,5 ve %85 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç Lipozyme TL-100 L enziminin tepkime için yeterli miktarda su içerdiğini göstermektedir. Optimum ortamdaki su miktarları her bir lipaz için sırası ile %1, %15 ve %10 olarak belirlenmiştir.

Atık kızartma yağından biyodizel üretimine sıcaklığın YAME içeriğine etkisi incelendiğinde her bir enzim için 35 °C sıcaklık en uygun koşul olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık kimyasal prosese göre oldukça ılımlıdır. Enerjiden oldukça tasarruf sağlar ve güvenlidir.

Enzim türünün ve miktarının YAME içeriğine etkisi incelendiğinde ortama eklenen enzim miktarının %5 olduğu durumda her üç enzim için de en yüksek YAME içeriğine ulaşılmıştır. Bu miktarın üzerine çıkıldığında dönüşümün azaldığı ve sabitlendiği görülmektedir. Bu durum reaksiyona giren ürünlerin birbirleri ile temas

etme ve reaksiyona girme zorluğu ve enzim ile substrat arasındaki kütle aktarım kısıtlamaları ile açıklanabilir. Reaksiyon ortamına eklenen enzim miktarı arttıkça da enzimin aktivitesinin gösterebilmesi için ihtiyaç duyacağı fazla miktarda su miktarı kaçınılmaz olacaktır. Bununla birlikte enzim maliyetinin yüksek olduğunda bilinmektedir. Enzim miktarı arttıkça işletim maliyetide önemli ölçüde artacaktır.

Atık kızartma yağından biyodizel üretimine karıştırma hızının YAME içeriğine etkisi incelendiğinde, 150 rpm çalkalanma hızının yetersiz kaldığı belirlenmiştir. 200 rpm ve sonrası karıştırma hızlarında kütle aktarım kısıtlamalarının aşıldığı görülmektedir. 200 rpm'de YAME içerikleri UHT-TL, Lipozyme TL-IM ve Lipozyme TL 100 L için sırasıyla %98, %83 ve %92 olarak belirlenmiştir.

Yağ/alkol mol oranının YAME içeriğine etkisi incelendiğinde en yüksek YAME içeriklerine UHT-TL ve Lipozyme TL 100 L için mol oranı 1/4 olduğu durumda, Lipozyme TL-IM için 1/6 olduğu durumda ulaşılmıştır. Yağ/metanol oranının artışı metil ester içeriğini arttırmış fakat 1/6 mol oranına çıkıldığında UHT-TL ile yapılan deneyde ester içeriğinde azalma gözlenmiştir. Reaksiyon ortamındaki fazla metanolün UHT-TL üzerinde inhibisyon etkisi yarattığı açıkça görülmektedir. Literatürde ortamdaki fazla metanolün enzim üzerine inhibisyon etkisi yaratarak aktivitesini düşürdüğü buna bağlı olarak katalizlediği reaksiyonun verimini düşürdüğü yapılan birçok çalışmada belirtilmektedir. Aynı zamanda benzer transesterleşme reaksiyonlarında sitokiyometrinin biraz üzerinde alınan substrat miktarı ile istenen dönüşümlere ulaşılabildiği belirtilmektedir. Sonuçlar literatürü açıkça destekler niteliktedir.

Metanol ekleme sıklığının YAME içeriğine etkisi incelendiğinde, 25-45 °C sıcaklık aralığında, UHT-TL lipazı için tek basamakta alkol eklemenin enzim üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği açıkça görülmektedir. Üç basamakta metanol eklenmesi ile inhibisyon etkisi önlenmiştir. Ortama iki ve üç basamakta metanol eklendiğinde UHT-TL enzimi için YAME verimi yükselmiştir (%5, %25, %85). Bu sonuçlar literatürdeki daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

Çözücü türünün YAME içeriğine etkisi incelendiğinde kullanılan her çözücü için YAME içeriğinde çözücüsüz ortama göre bir düşüş gözlenmiştir. Polar ve bazı(hekzan, toluen, isooktan) apolar çözücüler kullanıldığında enzimin doğal

yapısına zarar vermektedir. Polar çözücüler hidrojen bağlarını bozar ve reaksiyon ortamındaki enzim için gerekli olan suyu sıyırır. YAME içeriklerini arttırmak üzere polar yapıda olmayan farklı çözücü türleri denenebilir.

Reaksiyon süresinin uzun olması zaman kayıplarına ve artan enerji maliyetlerine yol açar. Reaksiyon süresinin YAME içeriğine etkisi incelendiğinde literatürle benzer veriler elde edilmiştir. Reaksiyon ilk sekizinci saate kadar hızlı devam etmiş, sekizinci saatten sonra ise oldukça yavaş ilerlemiştir.

UHT-TL enzimi optimum koşullarda ikinci ve üçüncü kez kullanıldığında YAME içeriğinde belirgin düşüş göstermiştir. Dördüncü kullanımda başlangıç aktivitesinin yarısına düşmüştür. Tutuklama koşullarının iyileştirilmesi ile bu durumun önüne geçilebilir. Diğer yandan reaksiyon ortamından enzimi ayırmada kullanılan yöntem iyileştirilebilir. Mg/Al hidrotalsite enzim fiziksel adsorbsiyon yolu ile tutuklanmaktadır. Tutuklama, kovalent bağlanma şeklinde yapılırsa enzimin destekten sıyrılmasının önüne geçilebilir.

Sonuç olarak, Türkiye’de yılda yaklaşık olarak 400 bin ton atık yağ olduğu günümüzde bu yağların bir kısmı piyasada yağ toplama işi yapan birkaç firma tarafından toplandığı belirtilse de 400 bin tonluk atık yağın 50 bin tonunun bile toplanmadığı yetkililer tarafından bildirilmektedir. Türkiye’de kullanım oranı her yıl artan bitkisel ve hayvansal yağların yeterli derecede geri kazanılması, çevreye büyük zararlar vermemesi ve insanların bu konudaki bilinçsizliğinin önüne geçmesi açısından bu çalışma yol gösterici bir çalışma olabilir.

KAYNAKLAR

Adamczak M., Bednarski W., Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles, *Process Biochemistry*, 2004, **39**, 1347–61.

Akbin H. M., Yenilenebilir Kaynaklardan Lipaz Katalizli Biyodizel Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2012.

Alptekin E., Biyodizel ile Biyodizel Yakıtlarının Harmanlanmasında Yakıt Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2007.

Al-Zuhair S., Jayaraman K. S., Smita K., Chan W., The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase, *Biochemical Engineering Journal*, 2006, **30**, 212–217.

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

Al-Zuhair S., Dowaidar A., Kamal H., Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase, *Biochemical Engineering Journal*, 2009, **44**, 256–262.

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.

Azócar L., Ciudad G., Hermann J., , Robinson M. H., Navia R., Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, **109-6**, 609–614.

Bako K. B., Kova F. C. S., Gubicza L., Hansco J. K., Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent free system, *Biocatal. Biotransform*, 2002, **20**, 437–439.

Balat M., Balat H., Progress in biodiesel processing, *Applied Energy*, 2010, **87**, 1815–1835.

Balcao V. M., Paiva A. L., Malcata F. X., Bioreactors with immobilized lipases: state of the art, *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, **18**, 392–416.

Balcao V. M., Malcata F. X., Lipase catalyzed modification of milkfat, *Biotechnology Advances*, 1998, **16**, 309-341.

Bilge G., Glukoz Oksidaz Bazlı Enzim Elektrotlarda Elektriksel İletkenliğin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010.

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

Bornscheuer U. T., Mohamed M. S., Improvement in lipase-catalyzed fatty acid methyl ester from sunflower oil, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 97–103.

Capehart B. L., *Encyclopedia of energy engineering and technology*, 2nd ed., CRC Press, U.S.A, 2007.

Chang S., Chang S., Yen Y., Shieh C., Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM, *Applied Clay Science*, 2007, **37**, 67-73.

Charpe T. W., Rathod V. K., Biodiesel production using waste frying oil, *Waste Management*, 2011, **31**(1), 85-90.

Chen G., Ying M., Li W., Enzymatic conversion of waste cooking oils into alternative fuel biodiesel, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006, **132**, 911–21.

Chen H. C., Ju H. Y., Wu T., Liu L. C., Lee C. C., Chang C., Chung L. Y., Shieh C. J., Continuous Production of Lipase-Catalyzed Biodiesel in a Packed-Bed Reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, **2011**, 1-6.

Chen Y., Xiao B., Chang J., Fu Y., Lv P., Wang X., Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor, *Energy Conversion and Management*, 2009, **50**, 668–673.

Chesterfield D. M., Rogers P. L., Al-Zaini E. O., Adesina A., Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase, *Chemical Engineering Journal*, 2012, **207–208**, 701–710.

Chhetri A. B., Watts K. C., Islam M. R., Waste cooking oil as an alternate feedstock for biodiesel production, *Energies*, 2008, **1**, 3–18.

Chung K. H., Kim J., Lee K. Y., Biodiesel production by transesterification of duck tallow with methanol on alkali catalysts, *Biomass and Bioenergy*, 2009, **33**, 155-158.

Demirbaş A., *Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engine*, London: Springer Publishing Co., 2008.

Demirbaş A., Progress and recent trends in biodiesel fuels, *Energy Conversion and Management*, 2009, **50**, 14–34.

Demirbaş A., Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol, *Energy Conversion and Management*, 2002, **43**, 2349–2356.

Dizge N., Canlı M., Karpuzcu M., Biyodizel Kullanımının Çevre için Önemi, *III.Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu*, Mersin, Türkiye, 19-21 Ekim 2005.

Dizge N., Keskinler B., Enzymatic Production of Biodiesel from Canola Oil using Immobilized Lipase, *Biomass and Bioenergy*, 2008, **32**, 1274-78.

Dizge N., Aydın C., İmer D., Bayramoğlu M., Tanrıseven A., Keskinler B., Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer, *Bioresource Technology*, 2009, **100**, 1983–1991.

Dossat, V., Combes, D., Marty, A., Lipase catalyzed transesterification of higholeic sunflower oil, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **30**, 90–94.

Du W., Liu D., Li L., Dai L., Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodiesel production in a tert-butanol system, *Biotechnology Progress*, 2007, **23**(5), 1087–1090.

Du W., Li W., Sun T., Chen X., Liu D., Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **79**, 331–337.

Elibol M., Yaşa İ., Karaçancı Ş., Çoban I., Özsoy G., Zeytinyağı İşletmeleri Katı (Pirina) ve Sıvı (Karasu) Atıklarından Mikrobiyal Lipaz Üretimi, *TÜBİTAK proje no: 106M464*, 2008, İzmir, 7-25.

Fanguri M., Milford A., Biodiesel Production: a Review, *Bioresource Technology*, 1999, **70**, 1-15.

Gerpen J. V., Shanks B., Pruszko R., Clements D., Knothe G., Biodiesel Production Technology, *National Renewable Energy Laboratory*, CO, USA, 2004.

Halim S. F. A., Harun Kamaruddin A., Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system, *Process Biochemistry*, 2008, **43**, 1436–1439.

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.

Karaosmanoğlu F., Türkiye İçin Çevre Dostu-Yenilenebilir Bir Yakıt Adayı: Biyomotorin, *Kojenerasyon Dergisi ICCI 2002 Özel Sayısı*, 2002, **10**, 50-56, İstanbul.

Karimi A., Mousavi M., S., Ghiasi B., Grace J.,R., Immobilization of α -Amylase on Modified Mesostructure Perlite, *American Journal of Scientific Research ISSN 1450-223X*, 2011, **32**, 107-114.

Karube I., Yugeta Y., Suzuki S., Electric field control of lipase membrane activity, *Biotechnology and Bioengineering*, 1977, **19**, 1493–1501.

- Kennedy J. F., Melo E. H. M., Jumel K., Immobilized enzymes end cells, *Chemical Engineering Progress*, 1990, **86**, 81–89.
- Körbitz W., Biodiesel production in Europa and North America: An encouraging prospect, *Renewable Energy*, 1999, **16**, 1078-1083.
- Krawczyk T., Biodiesel: Alternative fuel makes inroads but hurdles remain, *Inform*, 1999, **7**, 801-829.
- Kulkarni B. M., Bujar B. G., Shanmukhappa S., Investigation of acid oil as a source of biodiesel, *Indian Journal of Chemical Technology*, 2008, **15**, 467–71.
- Kulkarni M. G., Dalai A. K., Waste cooking oil- an economical source for biodiesel: a review, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2006, **45**, 2901-2913.
- 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.
- Kumar S., Kikon K., Upadhyay A., S. Kanwar S., Gupta R., Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3, *Protein Expression and Purification*, 2005, **41**, 38–44.
- Kurashige J., Matsuzaki N., Makabe K., Modification of fats and oils by lipases, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 1989, **10**, 531-559.
- Kutluk G. B., Biyoyağlama Yağlarının Tutuklanmış Lipaz Katalizli Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2012.
- Lee S., Posarac D., Ellis N., An experimental investigation of biodiesel synthesis from waste canola oil using supercritical methanol, 2012, **91**, 229–237.
- Leung D. Y. C., Wu X., Leung M. K. H., A review on biodiesel production using catalyzed transesterification, *Applied Energy*, 2010, **87**, 1083–1095.
- Leung D. Y. C., Guo Y., Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production, *Fuel Process Technology*, 2006, **87**, 883–90.
- Li N. W., Zong M. H., Wu H., Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*, *Process Biochemistry*, 2009, **44**, 685–8.
- 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.
- Lucarini A. C., Kilikian B. V., Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances, *Biotechnology Techniques*, 1999, **13**(2), 149-154.
- Nascentes I., Corrêa S., Souza S. L., Catran M., Bernardes O. L., Portilho M. F., Langone P. A. M., Enzymatic biodiesel synthesis using a byproduct obtained from palm oil, *Refining Enzyme Research*, 2011, **2011**, 1-8.

Nelson L. A., Foglia T. A., Marmer W. N., Lipase-catalyzed production of biodiesel, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 1996, **73**, 1191–5.

Nie K., Xie F., Wang F., Tan T., Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, **43**, 142–147.

Noureddini H., Gao X., Philkana R. S., Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil, *Bioresource Technology*, 2005, **96**, 769–777.

Orçaire O., Buisson P., Pierre A. C., Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, **42**, 106–113.

Öztürk B., Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları, Yüksek Lisans Tezi, İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü, İzmir, 2001.

Pandey A., *Handbook of plant-based biofuels*, CRC Press, India, 2008.

Pleiss J., Fisher M., Schmid R. D., Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site, *Chemical Physics*, 1998, **93**, 67–80.

Rahman M. B. A., Basri M., Idris M. N. H., Hussein M. Z., Immobilisation of lipase from *Candida rugosa* on layered double hydroxides of Mg/Al and its nanocomposite as biocatalyst for the synthesis of ester, *Catalysis Today*, 2004, **93**(95), 405–410.

Robles-Medina A., González-Moreno P.A., Esteban-Cerdán L., Molina-Grima E., Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production, *Biotechnology Advances*, 2009, **27**, 398–408.

Rodrigues R. A., Pavia A., Silva M. G., Simoes P., Barreiros S., Continuous enzymatic production of biodiesel from virgin and waste sunflower oil in supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids*, 2011, **56**, 259–264.

Romdhane I. B-B., Romdhane Z. B., Gargouri A., Belghith H., Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 2011, **68**, 230–239.

Sakaguchi K., Matsui M., Mizukami F., Applications of zeolite inorganic composites in biotechnology: current state and perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, **67**, 306–311.

Saifuddin N., Raizan A. Z., Farrah H., Production of biodiesel from high acid value waste cooking oil using an optimized lipase enzyme/acid-catalyzed hybrid process, *e-Journal of Chemistry*, 2009, **6**(S1), 485-495.

Schuchardt U., Serchelia R., Vargas R. M., Transesterification of vegetable oils: a review, *Journal of The Brazilian Chemical Society*, 1998, **9**, 199–210.

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., Sugihara A., Tominaga Y., Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, **17**, 133-142.

Song Q. X., Wei D. Z., Study of Vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, **18**, 261–266.

Soumanou M. M., Bornscheuer U. T., Improvement in lipase catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil, *Enzyme Microbial Technology*, 2003, **33**, 97–103.

Svendsen A., Lipase protein engineering, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1543**, 223–238.

Tekin G., Perlit ve aepiyolit'in amonyumheptamolibat ile modifikasyonu ve elektrokinetik özellikleri, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2004, **6**, 2.

Wu W. H., Foglia T. A., Marmer W. N., Phillips J. G., Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 1999, **76**, 517–521.

Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Tominaga Y., Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 2001, **78**, 703–7.

Xavier M. F., Hector R. R., Hugo S. G., Charles G. H., Clyde H. A., Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils: a review, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 1990, **67**, 890–910.

Xin C., Wei D., Liu D., Effect of several factors on soluble lipase mediated biodiesel preparation in the biphasic aqueous -oil systems, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **24**, 2097-2102.

Yaakob Z., Mohammada M., Alherbawi M., Alam Z., Sopian K., Overview of the production of biodiesel from waste cooking oil, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013, **18**, 184–193.

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., Kazan D., Akın A. N., Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites, *Chemical Engineering Journal*, 2007, **134**, 262–267.

Yan J., Yan Y., Liu S., Hu J., Wang G., Preparation of crosslinked lipase coated microcrystals for biodiesel production from waste cooking oil, *Bioresource Technology*, 2011, **102**, 4755–4758.

Yang S. K., Sohn. H. J., Kim. K. H., Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, **107**(6), 599–604.

Ying M., Chen G., Study on the production of biodiesel by magnetic cell biocatalyst based on lipase producing *Bacillus subtilis*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, **137**(140), 793–803.

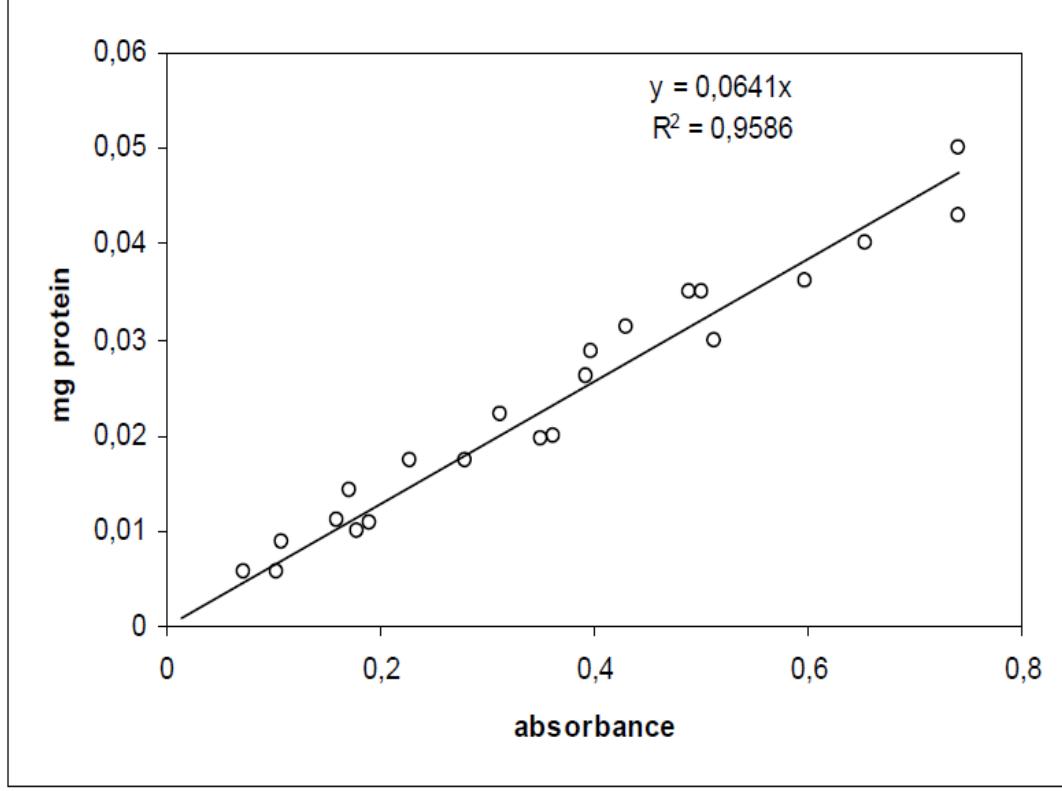
Yücel Y., Demir C., Dizge N., Keskinler B., Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase, *Biomass and Bioenergy*, 2011, **35**, 1496-1501.

Zeng H., Deng X., Wang Y., Liao K., Preparation of Mg/Al hydrotalcite by urea method and its catalytic activity for transesterification, *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 2009, **55**(5), 1229-1235.

EKLER

EK-A

Desteğe Tutuklanan Protein Miktarının Hesaplanması

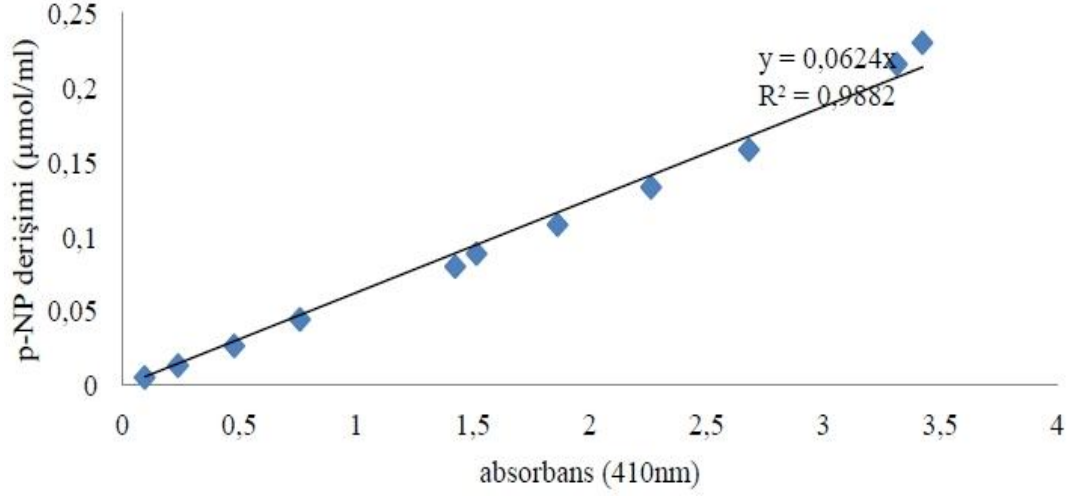


Şekil A.1. Protein tayini için kalibrasyon grafiği

Referans protein olarak Bovine Serum Albumin kullanılmıştır. Bradford çözeltisi, 1 ml etanol, 2 ml fosforik asit, 0,45 ml Brilliant Blue çözeltisi ve 15 ml saf su karıştırılarak hazırlanmıştır. 2,4 ml Bradford çözeltisine 100 µl örnek eklenmiş ve 595 nm'de absorbans ölçülmüştür. Elde edilen absorbansa karşılık gelen protein miktarı hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

EK-B

Enzim Aktivitesinin Hesaplanması



Şekil B.1. Enzim aktivitesi için Tris-HCl pH8,5 tampon çözeltisi için kalibrasyon grafiği

Yöntemde analizi yapılacak lipazdan 3 mg tartılarak üzerine derişimi belirli olan p-NPP çözeltisinden 75 µl ve 2925 µl tampon çözelti eklenerek 50 °C'de 10 dk süreyle inkübe edilen örnekler, tepkimenin durdurulması için -18 °C'de 8 dk bekletilmiştir. Tepkime karışımı filtre edilerek tutuklama işleminde kullanılan tamponla 1/3 oranında seyreltilmiş ve 410 nm'de UV-vis spektrofotometrede absorbansı okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri kullanılan tampon çözelti için hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği kullanılarak tepkime sonunda oluşan p-NP derişimi hesaplanmıştır. Bu derişime bağlı olarak hidrolitik aktivite yada spesifik aktivite değerleri elde edilmiştir (Kutluk, 2012).

EK-C

% Yağ Asidi Metil Ester İçeriğinin Örnek Hesaplanması

$$\%YAME = \frac{(\Sigma A) - A_{MH}}{A_{MH}} * \frac{C_{MH} * V_{MH}}{m} * 100$$

ΣA : C14'teki metil esterden (metil miristat) C24:1'teki metil estere (metil nervonat) kadar olan toplam pik alanı.

A_{MH} : Metilheptadekanoat'ın karşılığı olan pik alanı.

C_{MH} : Metilheptadekanoat çözeltisinin konsantrasyonu (10 mg/ml çözelti).

V_{MH} : Metilheptadekanoat çözeltisinin hacmi (ml).

m : 100 mg

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

- [1] **Kutluk T.**, Kutluk G. B., Uyar B., Kapucu N., Oleyik Asit Polyol Esterlerin Biyokatalitik Üretimi, *10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi*, Koç Üniversitesi, İstanbul, 3-6 Eylül 2012.
- [2] **Kutluk T.**, Kutluk G. B., Uyar B., Kapucu N., Biodiesel Production by Immobilized Lipase From Vegetable Waste Oil, *19th International Energy Environment Fair and Conference*, Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, İstanbul, 24-26 Nisan, 2013.
- [3] **Kutluk T.**, Kutluk G. B., Uyar B., Kapucu N., Çevre Dostu Polimerlerin Enzimatik Sentezi, *1. Uluslararası Plastik & Kauçuk Teknolojileri Sempozyumu ve Ürün Sergisi*, Gazi Üniversitesi, Ankara, 29-31 Mayıs, 2013.
- [4] **Kutluk T.**, Kutluk G. B., Uyar B., Kapucu N., Doğal Polimer Kitosana Lipaz Tutuklama, *1. Uluslararası Plastik & Kauçuk Teknolojileri Sempozyumu ve Ürün Sergisi*, Gazi Üniversitesi, Ankara, 29-31 Mayıs 2013.
- [5] **Kutluk T.**, Kutluk G. B., Uyar B., Kapucu N., Lipase Catalyzed Production of Trimethylolpropane Esters, *The international Conference on Environmental Science and Technology*, Nevşehir Üniversitesi, Nevşehir, 18-21 Haziran 2013.
- [6] **Kutluk T.**, Kutluk G. B., Uyar B., Kapucu N., *Enzymatic production of biodiesel from waste cooking oil*, *The international Conference on Environmental Science and Technology*, Nevşehir Üniversitesi, Nevşehir, 18-21 Haziran 2013.

ÖZGEÇMİŞ

Togayhan Kutluk, 1983 yılında İstanbul'da doğmuştur. 2009 yılı Ocak ayında Kocaeli Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden mezun olmuştur. Askerlik hizmetini tamamladıktan sonra Prista Oil Madeni Yağlar Tic. A.Ş.'de Kalite Kontrol Mühendisi olarak çalışmıştır. 2011 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır. 2012 yılından beri aynı birimde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır. İlgili alanları arasında Enzim Teknolojisi (Saflaştırma, Karakterizasyon, İmmobilizasyon), Biyokimyasal Prosesler, Yenilenebilir Enerji Teknolojileri, Biyoteknoloji, Biyoyağlayıcı Üretimi, Biyoyakıt Teknolojisi bulunmaktadır.