

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİDROTALSİT VE ZEOLİT ÜZERİNE TUTUKLANMIŞ
LİPAZ İLE YEMEKLİK ATIK YAĞLARDAN
BİYODİZEL ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS

Kimya Müh. Funda YAĞIZ

Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği

Danışman: Prof. Dr. A.Nilgün AKIN

KOCAELİ, 2006

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİDROTALSİT VE ZEOLİT ÜZERİNE TUTUKLANMIŞ
LİPAZ İLE YEMEKLİK ATIK YAĞLARDAN
BİYODİZEL ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Müh. Funda YAĞIZ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 26 Mayıs 2006

Tezin Savunma Tarihi: 26 Haziran 2006

Tez Danışmanı
Prof.Dr.A.Nilgün AKIN
(.....)

Üye
Prof.Dr.Dilek KAZAN
(.....)

Üye
Doç.Dr.Mustafa ÇANAKÇI
(.....)

Üye
Yrd.Doç.Dr.Nezahat BOZ
(.....)

Üye
Yrd.Doç.Dr.Enver DEMİRHAN
(.....)

KOCAELİ, 2006

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Gün geçtikçe yakıt ihtiyacının arttığı gibi petrol rezervlerinin de kurumaya yüz tuttuğu günümüzde gittikçe de çevrenin kirlenmesi nedeniyle dünya çapında gündeme gelen alternatif ve yenilenebilir yakıt araştırmaları, biyodizel üzerinde odaklanmıştır. Özellikle Avrupa Birliği'nin 2005 yılında, petrol kökenli dizel yakıtın biyodizel ile karıştırılarak kullanımını zorunlu hale getirdiğini açıklamasından sonra önemi daha da yükselen biyodizel, ülkemiz için de geleceği parlak bir alternatif dizel yakıt haline gelmiştir.

Bu çalışmada biyodizelin lipaz katalizörlüğünde üretiminde, bugüne kadar farklı bir araştırma olarak lipazın hidrotalsit ve dört farklı tip zeolit üzerine tutuklanmış formları, farklı reaksiyon sıcaklıklarında denenmiş ve sonuçta metil ester dönüşümleri karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmanın, ülkemizde gün geçtikçe öneminin arttığı biyodizel hakkında yapılan çalışmalara bir ışık tutmasını dilerim. Çalışmalarım boyunca benden bilgisini ve sabrını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. A. Nilgün AKIN'a (KO.Ü. Müh.Fak.) ve destekleri için Sayın Prof. Dr. Dilek KAZAN ve Prof. Dr. A.Alp SAYAR'a (Marm.Ü.Müh.Fak.), laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör. Meltem YILDIZ (KO.Ü.Müh.Fak.) ve Tekns. Süleyman ARSU (Marm.Ü.Müh.Fak.) ile bugüne kadar almış olduğum eğitimde payı bulunan, beni yetiştiren değerli hocalarıma ve her zaman yanımda olarak bana yüreklerini ve sevgilerini veren ve bugünlere gelmemin sebebi olan anneme, babama, kardeşim Fulya'ya ve her zaman yanımda olan Zeynel Abidin YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez canım AİLEME ithaf olunmuştur.

Kimya Müh. Funda YAĞIZ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. BİTKİSEL YAĞ ÇEŞİTLERİ VE ÖZELLİKLERİ	4
2.1. Bitkisel Yağ Çeşitleri ve Biyodizel Üretiminde Kullanımı	4
2.2. Bitkisel Yağların Çeşitleri, Kimyasal Yapı ve Özellikleri.....	5
2.2.1. Bitkisel yağların kimyasal bileşimi.....	5
2.2.2. Bitkisel yağların yakıt özellikleri	10
2.2.3. Bitkisel yağların yakıt özelliklerinin iyileştirilmesi.....	11
3. BİTKİSEL YAĞDAN BİYODİZEL ÜRETİMİ VE KULLANIMI.....	14
3.1. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Alkoller.....	15
3.2. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Katalizörler	16
3.2.1. Asit katalizörler.....	17
3.2.2. Alkali katalizörler.....	17
3.2.3. Enzim katalizörler	19
3.3. Lipazın Özellikleri ve Biyodizel Üretiminde Kullanımı.....	19
3.3.1. Lipazın enzim özellikleri.....	19
3.3.2. Lipazın tutuklanması	21
3.3.3. Lipazın biyodizel üretiminde kullanımı	22
3.4. Enzim Katalizör ile Yapılan Diğer Literatür Çalışması.....	23
3.5. Biyodizelin Dünyada ve Türkiye’de Kullanımı.....	27
3.5.1. Dünyada biyodizel Kullanımı	27
3.5.2. Türkiye’de biyodizel Kullanımı.....	30
4. BİYODİZEL VE DİZEL YAKITLAR VE ÖZELLİKLERİ	33
4.1. Biyodizel Özellikleri	33
4.1.1. Kimyasal yapısı ve özellikleri.....	34

4.1.2. Yanma özellikleri	34
4.1.3. Emniyet ve çevre yönetmeliği.....	38
4.1.4. Biyodizel standartları	39
4.1.5. Biyodizel emisyonları	42
4.2. Dizel Yakıt Özellikleri ve Biyodizel ile Karşılaştırması.....	43
5. DENEYSSEL MALZEME VE YÖNTEM.....	45
5.1. Malzemeler.....	45
5.1.1. Araştırmada kullanılan kimyasallar	45
5.1.2. Araştırmada kullanılan cihaz ve aletler.....	46
5.2. Deneysel Yöntem	47
5.2.1. Lipazın hidrotalsit üzerine tutuklanması.....	47
5.2.2. Lipazın zeolit üzerine tutuklanması	49
5.2.3. Protein tayini	49
5.2.4. Enzimatik etkinlik tayini	51
5.2.5. Atık kızartma yağ asidi metil ester üretimi.....	51
5.2.6. Yapılan deneylerde izlenen parametreler.....	52
6. DENEYSSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	54
6.1. Tutuklayıcı Malzemenin Cinsi ve Tanecik Boyutunun Tutuklanma Verimine Etkisi.....	54
6.2. Tutuklamanın Lipolitik Enzim Aktivitesine Etkisi	57
6.3. Ortam pH ve Sıcaklığının tutuklanma Verimine Etkisi	58
6.4. Sıcaklığın Tekrarlanan Kullanımlarda Tutuk. Lipazın Kararlılığına Etkisi.....	59
6.5. Tutuklanma İşlemi Süresinin Tutuklanma Verimine Etkisi.....	60
6.6. Enzim Formatının Yağ Asidi Metil Ester Dönüşümüne Etkisi.....	61
6.7. Tepkime Süresinin Yağ Asidi Metil Ester Dönüşümüne Etkisi.....	64
7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
8. KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER	67
KAYNAKLAR.....	68
EK.A. Enzim tutuklamada protein ve etkinlik tabloları.....	76
EK.B. Hidrotalsit üzerine tutuklama koşullarının optimizasyon çalışması ile ilgili t. 81	
EK.C. Farklı pH ve sıcaklıklarda denenmiş enzim tutuklama verileri.....	84
EK.D. Hidrotalsit yapısı tayini için XRD analizi grafikleri.....	86
EK.E. Biyodizel deneylerine ait GC analiz kromatogramları.....	87
EK.F. Tanecik boyutu ve sıcaklığın tutuklanmaya etkisini gösteren grafikler	95
EK.G. Protein ve etkinlik analizleri için ilgili kalibrasyon eğrileri	98
ÖZGEÇMİŞ	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.2.1. Bitkisel yağların kimyasal yapısını oluşturan trigliserid molekülü.....	6
Şekil.2.2. Bitkisel yağları oluşturan mono- di- ve tri- gliserid molekülleri.....	7
Şekil.2.3. Dört karbondan oluşan kısa zincirli bir yağ asidi olan butirik asitin yapısı.....	8
Şekil.2.4. Ester değişimi tepkimesi.....	12
Şekil.3.1. Sabunlaşma tepkimesi.....	17
Şekil.3.2. Serbest yağ asitlerinin esterleşme tepkimesi.....	18
Şekil.3.3. Bir alfa/beta hidrolaz enzimi olan B. subtilis lipazın kristal yapısı.....	20
Şekil.3.4. Avrupa'nın 2010 yılındaki yenilenebilir enerji kaynakları kullanım hedefi.....	29
Şekil.4.1. Biyodizelin dizel ile karıştırılarak oluşturulan kombinasyonları.....	33
Şekil.5.1. Coomassie Blue G-250 ile boyanmış protein molekülleri.....	50
Şekil.5.2. Yemelik atık yağlardan üretilen metil ester.....	52
Şekil.6.1. Tanecik boyutunun tutuklanmaya etkisi.....	55
Şekil.6.2. Sıcaklık ve pH'nın hidrotalsit üzerine tutuklanmaya etkisi.....	58
Şekil.6.3. Sıcaklığın zeolit tipleri üzerine tutuklanmaya etkisi.....	59
Şekil.6.4. Zamanın 4°C'de hidrotalsit üzerine tutuklamaya etkisi.....	61
Şekil.6.5. Reaksiyon süresinin metil ester verimine etkisi.....	64
Şekil.D.1. Hidrotalsit yapısı tayini için XRD analiz sonuçları-1.....	86
Şekil.D.2. Hidrotalsit yapısı tayini için XRD analiz sonuçları-2.....	86
Şekil.E.1. Biyodizel-1 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	87
Şekil.E.2. Biyodizel-2 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	87
Şekil.E.3. Biyodizel-3 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	88
Şekil.E.4. Biyodizel-4 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	88
Şekil.E.5. Biyodizel-5 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	89
Şekil.E.6. Biyodizel-6 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	89
Şekil.E.7. Biyodizel-7 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	90
Şekil.E.8. Biyodizel-8 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	90
Şekil.E.9. Biyodizel-9 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	91
Şekil.E.10. Biyodizel-10 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	91
Şekil.E.11. Biyodizel-11 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	92
Şekil.E.12. Biyodizel-12 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	92
Şekil.E.13. Biyodizel-13 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.....	93

Şekil.E.14. Biyodizel-14 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.....	93
Şekil.E.15. Biyodizel örneklerinde GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi için kullanılan FAME standartı.....	94
Şekil.F.1. 24°C’de hidrotalsit ve zeolitlere immobilizasyon verimleri.....	95
Şekil.F.2. 37°C’de hidrotalsit ve zeolitlere immobilizasyon verimleri.....	95
Şekil.F.3. Farklı sıcaklıkların zeolit-AW 300 üzerine immobilizasyona etkisi.....	96
Şekil.F.4. Farklı sıcaklıkların zeolit-13x üzerine immobilizasyona etkisi.....	96
Şekil.F.5. Farklı sıcaklıkların zeolit-5A üzerine immobilizasyona etkisi.....	97
Şekil.F.6. Farklı sıcaklıkların zeolit-FM8 üzerine immobilizasyona etkisi.....	97
Şekil.G.1. Protein analizlerinde standart olarak kullanılan BSA kalibrasyon eğrisi.....	98
Şekil.G.2. Aktivite tayini için 4-Nitrofenol’ün pH 9.0 Tris-HCl tamponundaki kalibrasyon eğrisi.....	98
Şekil.G.3. Aktivite tayini için 4-Nitrofenol’ün pH 8.5 Tris-HCl tamponundaki kalibrasyon eğrisi.....	99
Şekil.G.4. Aktivite tayini için 4-Nitrofenol’ün pH 7.0 Tris-HCl tamponundaki kalibrasyon eğrisi.....	99

TABLolar DİZİNİ

Tablo.2.1. Biyodizel üretiminde kullanılan yağların yapısındaki yağ asitleri ve kimyasal yapıları.....	8
Tablo.2.2. Bitkisel yağlarda yağ asitlerinin dağılımı.....	9
Tablo.2.3. Bitkisel yağların ve dizel yakıtın yakıt özellikleri.....	10
Tablo.3.1. Biyodizel üretiminde kullanılan alkoller ve ester dönüşümleri.....	16
Tablo.3.2. Biyodizel üretiminde alkali ve lipaz katalizli yöntemlerin karşılaştırılması...	19
Tablo.3.3. Avrupa ülkelerinin biyodizel kapasiteleri.....	28
Tablo.4.1. Avrupa (EN 590) ve Amerika (ASTM D 975) dizel yakıt standartları.....	40
Tablo.4.2. Amerika Biyodizel B100 Standardı. (EN 14214:2005).....	41
Tablo.4.3. Avrupa Biyodizel B100 Standardı. (ASTM D 6751:2005).....	42
Tablo.6.1. Çalışmada kullanılan tutuklayıcı malzemelerin özellikleri.....	54
Tablo.6.2. Tutuklanmanın enzimin lipolitik aktivitesine etkisi.....	57
Tablo.6.3. Tekrarlanan kullanımlarında tutuklanmış enzimin kararlılığı.....	60
Tablo.6.4. Üretilen biyodizel örneklerinde YAME kompozisyonları.....	63
Tablo.A.1. İmmobilizasyon sonrası zeolitte 1/10 dilüsyon ve HT’de ½ dilüsyonda protein ölçümleri spektrofotometrede 595 nm’deki sonuçları.....	76
Tablo.A.2. İmmobilizasyon sonrası OD ₅₉₅ protein ve OD ₄₁₀ aktivite değerleri....	77
Tablo.A.3. İmmobilizasyon sonrası protein (mg/mlt) ve Pg (mg/g) değerleri.....	78
Tablo.A.4. İmmobilizasyon sonrası Pg ve adsorpsiyon derecesi değerleri.....	79
Tablo.A.5. İmmobilizasyon sonrası aktivite OD ₄₁₀ ve aktivite (IU) değerleri.....	80
Tablo.B.1.a. 20 mM 4-NPP ile farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki denenmiş aktivite sonuçları.....	81
Tablo.B.1.b. Hidrotalsit üzerine immobilize lipazın tekrarlanan kullanımlarındaki 55°C’de inkübe edilerek denenmiş stabilitesi.....	81
Tablo.B.2. Hidrotalsit üzerine immobilize lipazın tekrarlanan kullanımlarındaki 45°C’de inkübe edilerek denenmiş stabilitesi.....	82
Tablo.B.3. 20 mM 4-NPP’nin farklı derişimlerde 45°C’de inkübe edilerek denenmiş aktivite sonuçları.....	83
Tablo.C.1.a. Serbest enzimin immobilize edilmeden önce farklı tamponlar kullanılarak SP’de ölçülen aktivite (IU/min) ve protein (mg/mlt) değerleri.....	84

Tablo.C.1.b. Fosfat tamponunda (pH 8.5-9.0) hidrotalsit üzerine immobilize olan lipazın karşılaştırmalı aktivite (IU/min) değerleri.....	84
Tablo.C.2. Farklı tamponlarda ve farklı pH değerlerinde hidrotalsit üzerine immobilize edilen lipazın Pg (mg/g) değerleri.....	85

HİDROTALSİT VE ZEOLİT ÜZERİNE TUTUKLANMIŞ LİPAZ İLE YEMEKLİK ATIK YAĞLARDAN BİYODİZEL ÜRETİMİ

Funda YAĞIZ

Anahtar Kelimeler: Biyodizel, Lipaz, Enzim tutuklanması, Transesterifikasyon, Hidrotalsit hazırlama, Metil ester.

Özet: Bu çalışmada transesterifikasyon reaksiyonunda kullanılan lipazın tutuklanması için hidrotalsit ve dört ayrı çeşit zeolit (13-x, 5A, FM-8 ve AW-300) denenmiştir ve hidrotalsitin zeolitlere göre daha etkin olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre en iyi adsorplanan protein miktarı (P_g), 13 mg/g ile hidrotalsitin 4°C'deki tutuklanması sonucu elde edilmiştir. Bu miktar, zeolitlerde 9 mg/g olan miktara göre daha yüksektir ve en yüksek tutuklanma verimi hidrotalsitte %95,8 iken, zeolit çeşitlerinde bu verim sadece %56,1'dir. Dolayısıyla, lipaz tutuklanması için hidrotalsit kullanılmasının daha verimli olduğu söylenebilir.

Biyodizel üretiminde ise 24°C'de, Lipozyme-TL IM serbest enziminin hidrotalsit üzerine tutuklanmış formu kullanıldığında 105 saatte %92,8 metil ester dönüşümü elde edilirken, aynı tepkime koşullarında zeolit-FM8 üzerine tutuklanmış lipaz ile hiç dönüşüm gözlenmemiştir. Enzimin etkinlik göstermemesinin nedeni, zeolit üzerine tutuklanma sırasında enzimin etkin bölgesinin bloklanması olarak açıklanabilir.

BIODIESEL PRODUCTION FROM WASTE OILS BY USING LIPASE IMMOBILIZED ON HYDROTALCITE AND ZEOLITES

Funda YAĞIZ

Keywords: Biodiesel, Lipase, Enzyme immobilization, Transesterification, Hydrotalcite preparation, Methyl ester.

Abstract: In this work hydrotalcite and four different type of zeolites (13-x, 5A, FM8 ve AW-300) were used as lipase immobilization material for using in transesterification. And it was found that hydrotalcite is more efficient than zeolites studied. According to the results, the maximum amount of protein adsorbed (P_g) was found at 4°C on hydrotalcite 13 mg/g was higher than that of zeolite as 9 mg/g. The maximum immobilization efficiencies are 95.8% for hydrotalcite and only 56.1% for zeolite types. Thus, hydrotalcite is more suitable for lipase immobilization.

In production of biodiesel at 24°C after 105 hours it was found that Lipozyme-TL IM immobilized on hidrotalcite gave a 92.8 % conversion, and enzymes immobilized on zeolite FM-8 did not show significant conversion at the same reaction conditions. This inactivity of this biocatalyts may be caused from blocking of lipase active sites during lipase immobilization process.

BÖLÜM.1. GİRİŞ

En son istatistiksel değerlendirmelerle, yeryüzündeki petrolün 38 yıl, doğalgazın 59 yıl, kömürün ise 227 yıl daha rezerv kullanım süresinin kaldığı açıklanmıştır. 1973'teki petrol krizi ve sonraki yıllarda gündeme gelen sera etkisi ve CO₂ sorunu, insanoğlunun alternatif enerji kaynağı arayışını hızlandırmıştır.

Hava kirliliğinin, sınırları belirlenen limitleri aştığında kanser gibi önemli ve tehlikeli hastalıklara yol açması ve dolayısıyla öldürücü olması gelinebilecek en kritik noktadır. Fosil kökenli yakıtların, üretimleri ve kullanımları sırasında çevreye yaydıkları göz ardı edilemeyecek düzeylerdeki CO₂, SO₂ ve NO_x gibi zararlı ve toksik gazlar nedeniyle hem insan sağlığına hem de çevreye zarar verdikleri tartışılmaz bir gerçektir ve global olarak tehlikeli gelişmelere sebep olacak önemli bir durum olan küresel ısınmaya etki payları %60'dır. Bu durumun buzulların erimesi, okyanusların yükselmesi, sel baskınları ve çölleşme gibi ciddi sorunlar doğuracak iklim değişikliklerine yol açmasının beklendiği Çevre ve Orman Bakanlığı tarafından açıklanmıştır. En son yapılan bilgisayar modelleme çalışmalarına göre küresel sıcaklıkların bu yüzyılın ortalarında 2-5°C artacağı tahmin edilmektedir (Duygu 2004). Küresel ısınmanın deniz seviyesi yükselmelerine sebep olacağı gibi yağış miktarlarını etkileyerek ciddi boyutlarda iklim değişikliklerine ve kuraklaşmaya da etkisinin olacağı aşikardır.

Yaşam standartlarının gelişerek nüfusun artması ve sanayileşmenin gelişmesine bağlı olarak artan motorlu araç kullanımı da taşıt egzozundan kaynaklanan ciddi boyutlara çıkabilecek çevre kirliliğini beraberinde getirir. Nitekim atmosferdeki toplam CO₂ emisyonunun % 93'ü, SO₂'nin %1'i ve NO_x'lerin %39'u taşıt kaynaklıdır (Ciniviz ve diğ. 2001). Dünya otomotiv sanayisinin de hızla gelişmesi ve petrol ürünlerine olan talebin artması çevre kirliliğinin de sürekli artmasına neden olmaktadır. Tüm bu nedenlerden ötürü "Biyokütle", alternatif enerji kaynağı olarak ön plana çıkan yenilenebilir enerji kaynakları içinde en büyük potansiyel sahibi olanıdır.

Ana bileşenini karbonhidrat bileşiklerinin oluşturduğu bitkisel ve hayvansal kaynaklı her çeşit madde “Biyokütle Enerji Kaynağı”, ve bunlardan elde edilen enerji ise “Biyokütle Enerjisi” adı ile tanımlanmaktadır. 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 biyokütlesel enerji kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Biyokütle kökenli en önemli alternatif enerji kaynağı ise Biyomotorin ve Biyoyakıt olarak da adlandırılan Biyodizel’dir (Karaosmanoğlu 2002).

İlk olarak 1895’te Dr. Rudolf Diesel’in yerfıstığı yağı kullanarak dizel yakıt elde etmesiyle (Fangrui ve diğ. 1999) gündeme gelen biyodizel yakıtın 1990’lardan itibaren dünyada kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Bugün ABD ve AB ülkeleri ile Malezya’da üretimi ve kullanımı önemli miktarlara ulaşan biyodizelin fosil yakıtlardan elde edilen ürünlere göre çeşitli avantajları vardır. Biyodizel toksik özellikler içermez, yenilenebilir, düşük emisyon profili verir ve çevreye zararı yok denecek kadar azdır (Krawczyk 1996). Biyodizel üretiminde hammadde olarak atık yağların kullanılması ise, hem çevre sorunlarının azaltılmasını hem de üretim maliyetinin düşürülmesini sağlamaktadır. Ayrıca biyodizel kullanımının, kilogram başına 0,85 kg petrol ürünü yakıt kullanımını azaltması açısından da büyük önem taşımaktadır (Körbitz 1999).

Bu çalışmada yenilenebilir enerji kaynaklarından elde edilen bir ürün olan biyodizelin dünyada ve ülkemizdeki üretimi ile enerji verimliliği açısından avantajlı bir süreç olan lipaz enzimi katalizörlüğündeki üretiminde hidrotalsit ve zeolit gibi taşıyıcı malzemenin üzerine lipaz enziminin tutuklanarak kullanılması hakkında bilgiler sunulmaktadır.

Bölüm 2’de bitkisel yağ çeşitleri ve özellikleri hakkında bilgi verilmektedir. Bölüm 3’te ise, bitkisel yağlardan biyodizel üretimi ve biyodizelin dünyada ve Türkiye’de kullanımı ile ilgili teorik bilgiler derlenmiştir.

Bölüm 4, biyodizel ve petrol kökenli dizel yakıtların özellikleri hakkında karşılaştırmalı olarak bilgi vermektedir. Bölüm 5'te ise, yapılan deneysel çalışmada kullanılan malzemeler, deney düzenekleri ve yöntemler anlatılmaktadır.

Bölüm 6'da lipaz enziminin hidrotalsit ve zeolit malzemeleri üzerine tutuklanma koşullarının inceleme sonuçları ve biyodizel üretimindeki performansı tartışılmıştır. Bölüm 7 ise, çalışmada elde edilen sonuçların ışığında gelecek çalışmalar için uygun olabilecek önerileri içermektedir.

BÖLÜM.2. BİTKİSEL YAĞ ÇEŞİTLERİ VE ÖZELLİKLERİ

Bitkisel yağlardan ve ayrıca hayvansal yağlardan “transesterifikasyon” olarak bilinen ve diğer adı “alkoliz” olan ester değişimi tepkimesi ile biyodizel elde edilmektedir. Biyodizelin ne olduğunu ve kimyasal yapısını tam olarak anlayabilmek için, ester değişimi (transesterifikasyon) tepkimesinde tepken olarak tepkimeye giren yağların temel özelliklerini ve kimyasal yapısını bilmemiz gerekir. Yağlarla ilgili gereken bilgiler aşağıdaki başlıklar altında anlatılmaktadır.

2.1. Bitkisel Yağ Çeşitleri ve Biyodizel Üretiminde Kullanımı

Dünyada yaklaşık 323 milyon ton üretilen yağlı tohum bitkilerinden yağ üretimi yapılmaktadır. Soya fasulyesi 182,4 milyon ton ile ilk sırada yer almaktadır. 36,5 milyon ton ile pamuk yağı ve 36,4 milyon ton ile kolza yağı ise ikinci ve üçüncü sırada yer almaktadırlar. Dördüncü sırada 33,7 milyon ton ile yerbıstığı ve beşinci sırada ise 21,3 milyon ton ile ayçiçeği yer almaktadır (Yosmaoğlu 2002 a).

Yüksek protein içeren soya bitkisi, yaklaşık %20 oranında yağ içerir. Dünyada çeşitli iklimlerde ve yörelerde 2500’den fazla soya bitkisi çeşidi yetiştirilmektedir. Amerika’da üretilen biyodizelin büyük bir kısmı saf soya yağından veya kullanılmış soya kızartma yağından elde edilir. Ancak yağ içeriğinin az olması nedeniyle yağ üretimi için pek verimli bir bitki değildir. Soya yağı üretiminde 2002 yılı verilerine göre ilk sırayı 8,51 milyon ton ile Amerika almaktadır. Sonra sırasıyla 4,45 ve 3,27 milyon ton ile Brezilya ve A.B. ülkeleri yer alır. Ülkemizde ise, en geniş soya ekimi yapılan alanlar % 90 oran ile Çukurova Bölgesi’nde yer almaktadır (Yosmaoğlu 2002 b).

Yağ elde edilen diğer bir bitki ise, ayçiçeğidir. Tohumları %40-50 oranında yağ içerir ve ülkemizde üretilen bitkisel yağların %65’i ayçiçeğinden elde edilmektedir. Ayçiçeği tarımı, İç Anadolu, Ege, Trakya ve Marmara Bölgelerinde yapılmaktadır.

Dünyada ise ayçiçeği üretiminde ilk üç sırada sırasıyla Amerika, Rusya ve A.B. ülkeleri yer almaktadır (Yosmaoğlu 2002 a).

Buğday ve pirinçten sonra en önemli tahıl olan mısır bitkisi, etanol ve bitkisel yağ yakıtı üretiminde kullanılan en önemli bitkilerden biridir. Dünyada mısır üretiminde ilk üç sırada A.B. ülkeleri, Romanya ve Meksika yer almaktadır (Tickell 2000).

Amerika'da kanola ve Avrupa'da kolza olarak bilinen bu bitki, tohumlarında %38-50 oranında yağ içerir. Bir dönüm kolza tohumundan 90-175 litre yağ üretilebilecek kadar verimlidir. Dünyada yaklaşık 220 milyon hektarda tarımı yapılan kolza bitkisinin anavatanı Anadolu'dur. Ülkemiz topraklarında çok yaygın rastlanan hardal bitkisi, kolzanın yabani formudur. İnsan sağlığı için zararlı olan erüsik asit içeriğinin %5 sınırını aştığı, 1977 yılında Sağlık Bakanlığı kontrollerinde tespit edilmesinden sonra tarımına yasak getirilmiş olup, araştırmalar sonucu erüsik asitten arındırılmış yeni kolza çeşitlerinin tarımı ülkemizde hala yapılmaktadır (Tickell 2000, Çildir 2003).

Bu yağların dizel motorunda herhangi bir modifikasyona gerek duyulmadan yakıt olarak kullanılabilmesi için, petrol kökenli dizel yakıtına benzer özelliklere sahip bir yakıtı dönüştürülmeleri gerekmektedir. Yağların dizel yakıtı dönüştürülmesinde kullanılan en yaygın yöntem, ester değişimi tepkimesidir.

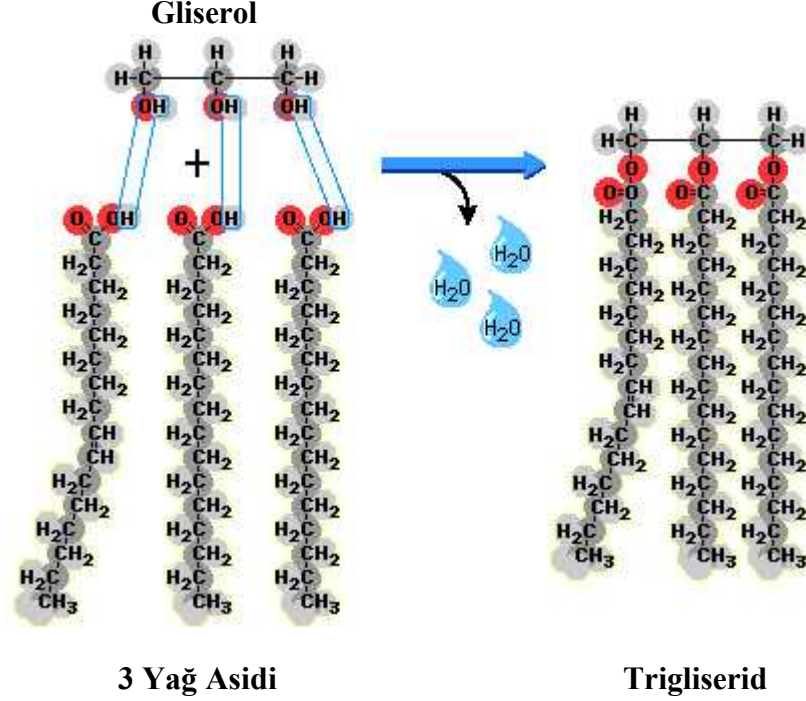
Biyodizel üretimi için gerçekleştirilen ester değişimi tepkimesinde soya, kanola, fındık, ayçiçeği gibi bitkisel yağlar kullanıldığı gibi hayvansal yağlar ve hatta atık yemeklik yağlar dahi kullanılabilir.

2.2. Bitkisel Yağların Çeşitleri, Kimyasal Yapı ve Özellikleri

2.2.1. Bitkisel yağların kimyasal bileşimi

Gerek hayvansal yağlar gerekse bitkisel yağlar, yağ asitlerinin gliserol ile oluşturdukları oldukça kompleks esterlerdir. Bu esterlere "gliserid" adı verilir. Bitkisel yağların kimyasal bileşeni Şekil 2.1'de görüldüğü gibi, ester bağlarıyla

birbirine bağlanmış olan gliserol ve üç yağ asidinden oluşan trigliseridlerden meydana gelir.

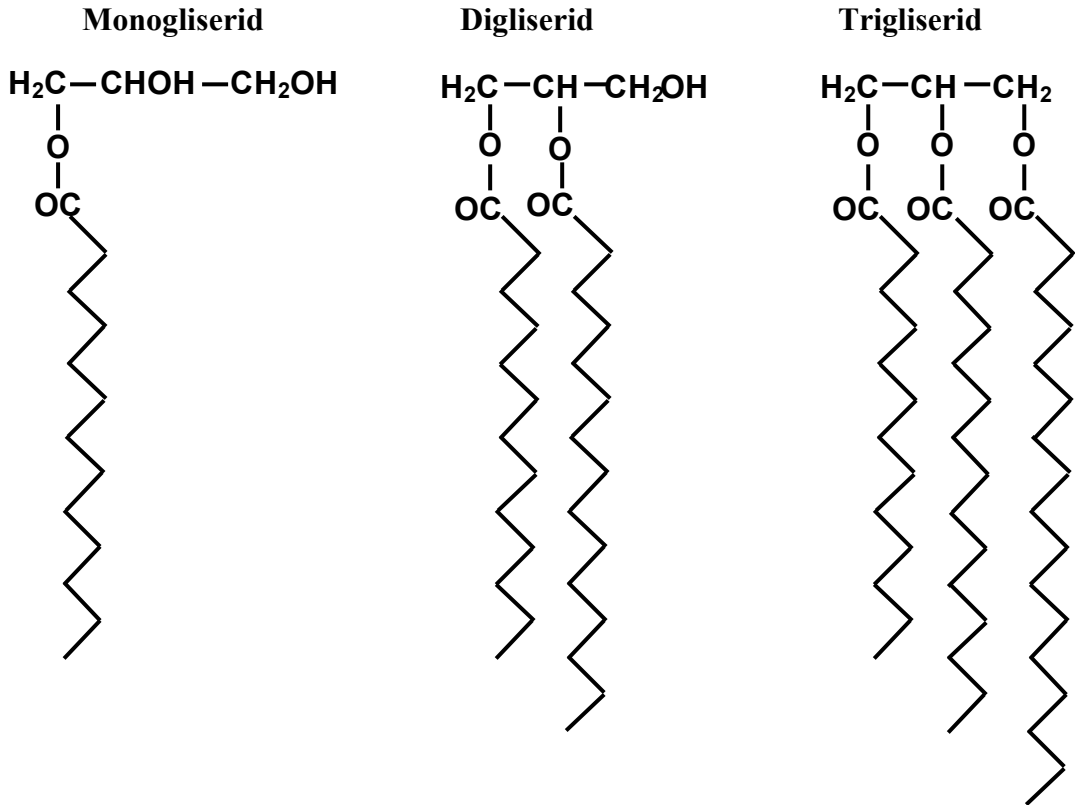


Şekil 2.1. Bitkisel yağların kimyasal yapısını oluşturan trigliserid molekülü.

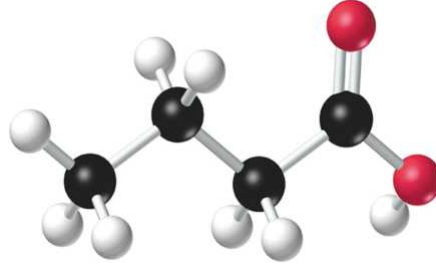
Yağ molekülünü oluşturan bu trigliseridler, yapılarında kütleli oranda yaklaşık %10 kadar oksijen içerirler. %90-98 oranında trigliserid, %2-5 oranında da di- ve monogliserid (bkz. Şekil 2.2) bitkisel yağların içeriğini oluşturmaktadır (Srivastava ve Prasad 1999). Gliserolün bir alkol grubu bir molekül yağ asidi ile esterleşerek monogliseridi, iki alkol grubu iki yağ asidi ile esterleşerek digliseridi, üç alkol grubu üç yağ asidi ile esterleşerek trigliseridi meydana getirir (bkz. Şekil 2.2). Trigliseridlerde gliserolün polar hidroksil grupları ile yağ asitlerinin polar karboksilat grupları ester bağları ile bağlanmış olduğundan, trigliseridler esas olarak suda çözünmeyen apolar, hidrofobik moleküllerdir. Bu nedenle yağ-su karışımı, iki faz oluşturur; yağlar sudan daha düşük yoğunluklu olduğundan, yağ su fazı üzerinde yüzer. Trigliseridlerin zincir uzunluğu, kendisini oluşturan yağ asidinin zincir uzunluğuna göre değişir. Yağ asitleri, Şekil 2.3'te bir örneği verildiği gibi, zincirin sonunda karboksil grubu (-COOH) bulunan R-COOH formunda bir hidrokarbon zinciridir.

Bir yağ asidinin yapısında ne kadar az çift bağ varsa, o kadar doymuş yağ asidi demektir. Doymuş yağ asitlerinde yağ asidi zincirini teşkil eden karbonların zincir haricinde olan bağlarının hepsi hidrojenle bağlanmıştır. Doymuş yağlar et ürünlerinde, tam yağlı mandıra ürünlerinde (peynir, süt ve dondurma gibi), kümes hayvanlarının derisinde ve yumurta sarısında bulunur. Hindistan cevizi, hurma yağı ve kakao yağı gibi bazı bitkisel besinler de doymuş yağ bakımından zengindir.

Doymuş yağlar, oda sıcaklığında katı haldedirler. Ancak zeytinyağı, ayçiçek yağı, kanola yağı, soya yağı, yarfıstığı yağı gibi sıvı yağlar da çok küçük miktarlarda olsa bile doymuş yağ içerirler. Doymamış yağ asitlerinde ise bir veya daha fazla karbonun birer bağı hidrojenle bağlanmamıştır. Oda sıcaklığında sıvı haldedirler ve büyük çoğunluğu bitkisel kaynaklıdır. Trigliseritdeki doymamış yağ asitlerinin yapısı ve miktarı, bitkisel yağın özelliklerini belirler.



Şekil 2.2. Bitkisel yağları oluşturan mono- di- ve tri- gliserid molekülleri (Atkins ve Carey 1999).



Şekil 2.3. Dört karbondan oluşan kısa zincirli bir yağ asidi olan butirik asit'in yapısı (Atkins ve Carey 1999).

Bitkisel yağların kimyasal özelliklerinden fosfat içeriği özelliği, düşük fosfat değerlerinde normal halinde yağın sakıızlaşmamasını belirleyen bir özelliktir. Karbon atomuna fosfat bağlanması nedeni ile yapısında fosfat içeren yağlar, fosfolipidler ya da fosfatidler olarak bilinirler. Keten, mısır, pamuk ve yerbıstığı yağları düşük fosfat değerli yağlardır (Kaplan 2001).

Tablo 2.1. Biyodizel üretiminde kullanılan yağların yapısındaki yağ asitleri ve kimyasal yapıları (Tyson 2001).

Yağ Asidi Tipi	Kimyasal Yapısı
Kaprilik (8:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
Kaprik (10:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
Laurik (12:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Miristik (14:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Palmitik (16:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Stearik (18:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Oleik (18:1)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linoleik (18:2)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linolenik (18:3)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Arakhidik (20:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Eicosenoik (20:1)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
Behenik (22:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
Erusik (22:1)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

Yağ asitleri içerdiği karbon sayısını ve çift bağ sayısını belirtecek şekilde gösterilir. Örneğin, C 18:1 (oleik asit), yapısında 1 tane çift bağ bulunan 18 karbonlu bir yağ asididir. Yağ tipleri, zincir yapılarına göre çeşitli farklı özellikler kazanan bu yağ asitlerinin değişik karışımı ile meydana gelir. Yağ asitlerinin karboksil grupları ile alkollerin hidroksil grupları arasından su çıkışı suretiyle yağ asidi ve alkolün birbirine ester bağıyla bağlanarak esterleşmesi sonucu esterler oluşur. Örneğin trigliseridler, gliserolün yağ asidi esterleridirler. Yağların yapısındaki trigliseridleri oluşturan en yaygın yağ asitleri Tablo 2.1’de gösterilmektedir.

Yağ asitlerinin cinsi ve bulunma oranları, bitkisel yağın cinsini ve özelliklerini belirler. Yağ asitlerinin bitkisel yağlarda ağırlıkça dağılımı ve doyma noktaları Tablo 2.2’de gösterilmiştir (Srivastava ve Prasad 1999).

Tablo 2.2. Bitkisel yağlarda yağ asitlerinin dağılımı (Srivastava ve Prasad 1999).

Yağın Cinsi	Bitkisel Yağın Kompozisyonu, % Ağırlık										Doyma Noktası %
	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0	22:1	24:0	
Mısır	0	12	2	25	60	0.5	0.5	0	0	0	14
Kolza	0	3	1	64	23	8	0	0	0	0	4
Ayçiçek	0	6	3	17	74	0	0	0	0	0	9
Soya	0	12	3	23	55	6	0	0	0	0	15

Trigliseridlerden türetilen biyodizelin özelliği, trigliserid molekülünde bulunan her bir yağ asidinin miktarına bağlıdır. Örneğin, setan sayısı, zincir uzunluğuna bağlı olarak artış gösterir. Doymuşluk arttıkça, setan sayısı da artar. Zincir uzunluğunun artması, soğuk akış özelliklerini kötüleştirir. Örneğin, stearik asit (C18:0) 70°C ’de katılaştırırken, oleik asit (18:1) 16°C ’de katılaştır. Bunun sebebi, oleik asidin yapısında tek çift bağın bulunmasıdır (Graboski ve McCormick 1998).

2.2.2. Bitkisel yağların yakıt özellikleri

Bazı bitkisel yağların yakıt olarak kullanılabilme özellikleri, Tablo 2.3'te dizel yakıt ile karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Tablo 2.3'deki bilgilere bakıldığında, bitkisel yağların viskozitelerinin dizel yakıtı için 4,0 (ASTM Standardı) olan üst sınırını 9-13 kat aştığı görülmektedir. Yüksek viskozite değeri, büyük moleküler kütlelerinden ve kimyasal yapılarından kaynaklanmaktadır. Viskozite değerindeki bu yükseklik, bitkisel yağların yakıt olarak kullanımındaki en önemli dezavantajlardan biridir.

Tablo 2.3'te görüldüğü gibi dizel yakıt için 150 saat olan oksitlenme süresinin, bitkisel yağlar için 5-10 saat arasında olması bitkisel yağlar açısından bir olumsuzluktur. Setan sayısında, bitkisel yağların ASTM alt sınırı olan 40 değerine yakın olduğu görülmektedir.

Tablo 2.3. Bitkisel yağların ve dizel yakıtın yakıt özellikleri (Georing ve diğ. 1982).

Bitkisel Yağın Adı	Özgül Ağırlık (g/ml)	Kinematik Viskozite (mm ² /s)	Isıl Değeri (Mj/kg)	Setan Sayısı (ASTM D613)	Donma Noktası (°C)	Akma Noktası (°C)	Parlama Noktası (°C)	Oksitlenme Süresi (saat)
Ayçiçek	0,92	34,9	39,6	33	7,2	-15,0	274	5,5
Soya	0,92	36,4	39,4	39	-3,9	-12,2	254	8,0
Pamuk	0,91	37,4	37,4	51	1,7	-15,0	234	7,5
Yer Fıstığı	0,91	37,2	37,2	39	12,8	-6,7	232	6,7
Kolza	0,92	39,0	39,9	37,6	-3,9	-31,7	246	10,5
Dizel Yakıt	0,86	2,9	42,5	50,8	-15,0	-33,0	52	150,0

2.2.3. Bitkisel yağların yakıt özelliklerinin iyileştirilmesi

Yapılan araştırmalara göre bitkisel yağların yakıt olarak dizel motorda kullanılması sonucu uzun vadede, enjeksiyon uçlarının tıkanması, tortu oluşumu, yanma odasının karbon kurumu ile kaplanması gibi bazı motor problemlerinin meydana geldiği görülmüştür. Bu motor problemlerinin en büyük nedenleri; bitkisel yağların yüksek viskoziteli olması, kötü soğuk akış özelliklerine sahip olmaları ve düşük uçuculuk değerleridir (Clark ve diğ. 1984).

Bitkisel yağların alternatif dizel motor yakıtı olarak kullanılabilmesi için istenmeyecek kadar yüksek olan viskozitelerinin ve uçuculuklarının iyileştirilmesi gerekmektedir. Bunun için piroliz (termal kraking), inceltme, mikroemülsiyon oluşturma ve ester değişimi (transesterifikasyon) olmak üzere dört kimyasal yöntem uygulanabilir (Kaplan 2001).

Piroliz (termal kraking), daha küçük moleküller oluşturmak üzere kimyasal bağların kırılması işlemidir. Piroliz işlemi, iki şekilde uygulanabilir. Biri, bitkisel yağların kapalı bir kaptaki ısı etkisi ile parçalanması, diğeri ise standart ASTM distilasyonu ile ısı parçalanma etkisinin uygulanmasıdır. Bu ikinci yöntem ile soya yağından elde edilen distilatın saf bitkisel yağa göre dizel yakıtına daha yakın olduğu gözlenmiş; yakıtın %79 karbon ve %11,8 hidrojen içerdiği, setan sayısının 37,9'dan 40,3'e yükseldiği, viskozitesinin 10,2 mm²/s 'ye düştüğü görülmüştür (Şanlı 2005).

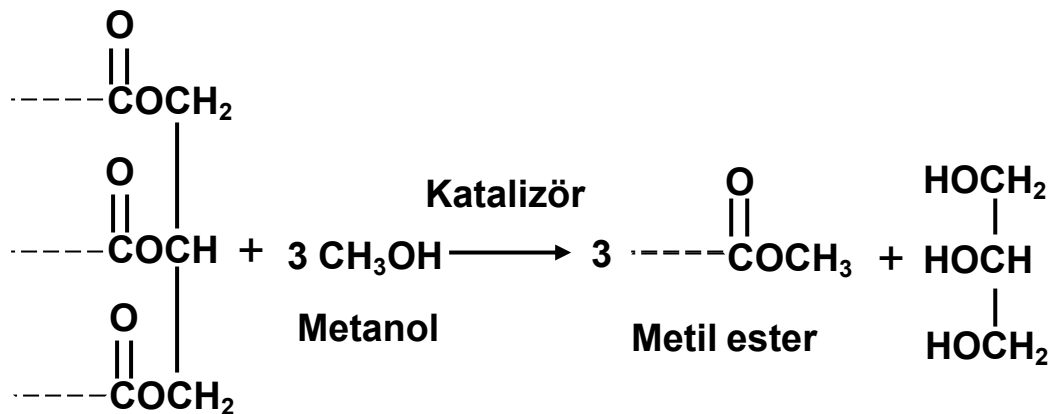
Bitkisel yağların yüksek viskozitesini düşürmek için bir diğeri yöntem, metanol ve etanol gibi kısa zincirli alkol çözücülerle mikroemülsiyon oluşturmaktır. Bu yöntemle, petrolden tamamen bağımsız alternatif bir dizel yakıt meydana getirmek mümkündür. Mikroemülsiyonlar alkol içermeleri nedeniyle enjektör tıkanıklığını azaltırlar, ancak alkollerin gizli buharlaşma ısıları yüksek olduğundan yanma odasının soğumasına sebep olurlar (Ma ve Hana 1999, Srivastava ve Prasad 1999).

Bitkisel yağların inceltmesi, dizel yakıt veya çözücü veya etanol gibi maddelerle belli oranlarda karıştırılması işlemidir. Ayçiçek yağının dizel yakıt ile hacimsel olarak 1:3 oranında karıştırılarak inceltmesi sonucu, karışımın viskozitesinin

40°C’de 4,88 mm²/s olduğu görülmüştür. Ancak, bu karışımın ciddi boyutta enjektör tıkanıklığına ve direkt enjeksiyonlu dizel motorlarda kullanımının uygun olmadığı sonucuna varılmıştır (Şanlı 2005).

Ester değişimi (transesterifikasyon) işlemi, yağa incelik kazandırabilmek ve vizkozitesini azaltabilmek amacıyla gliserolün bitkisel yağdan uzaklaştırılması işlemidir. Bu işlem esnasında, bitkisel yağın gliserol kısmı bir alkol (etanol veya metanol alkölü) ile yer değiştirmektedir. Etanol, tahıllardan elde edilen bir alkoldür. Metanol ise, kömür, doğal gaz veya odundan elde edilmektedir. Genellikle daha stabil bir biyodizel üretimi için metanol alkölü etanole tercih edilmektedir. Diğer yandan metanol kauçuk maddeleri çözebilme özelliğine sahip oldukça agresif bir alkoldür ve yutulduğu takdirde öldürücü olabilmekte ve muhafazası çok dikkat gerektiren bir maddedir.

Metil esterler, metanol ve bitkisel yağ esterlerinden elde edilen biyodizeli ifade etmektedirler. Etil esterler ise, etanol ve bitkisel yağ esterlerinden elde edilen biyodizeli ifade etmektedirler. Alkilester terimi ise daha genel bir tanım olup bitkisel yağ esterleri ile herhangi bir alkol bileşimini ifade eder. Hangi alkol veya hangi bitkisel yağ kullanılırsa kullanılsın biyodizel üretimi, her zaman için trigliserid molekülünü üç ester ve bir gliserol molekülüne ayrıştırma ve her bir ester molekülünün bir alkol molekülüne bağlanması işlemidir ve bu sayede bir trigliserid molekülünden üç alkil ester molekülü elde edilmektedir.



Şekil 2.4. Ester değişimi tepkimesi.

Ester değişimi (transesterifikasyon), Şekil 2.4'te gösterildiği gibi kolza (kanola), ayçiçeği, soya, mısır yağları gibi bitkisel yağların bir katalizör eşliğinde, uygun bir alkol ile tepkimeye girip trigliseridlerin parçalanarak bünyesindeki gliserolün alkoldeki alkil radikali ile yer değiştirmesini sağlayan bir kimyasal yöntemdir. Yani, gliserol esaslı triesterler, alkil esaslı monoesterlere dönüşür.

Tepkime sonundarnler ester, gliserol, kullanılmayan alkol, katalizör ve tri- di- ve mono- gliserid karışımından oluşmaktadır. Mono- ve di- gliseridler, esterlerde kirlilik yarattıklarından saf ester elde etmek zordur. Monogliseridler, ester karışımında bulanıklığa yol atığından soğuk akış özelliğinin kötüleşmesine sebep olurlar (Şanlı 2005).

Ester değişimi tepkimesi ile bitkisel yağların viskoziteleri oldukça azalarak dizel yakıt değerine yakınlaşmaktadır. Bitkisel yağ esterleri motorlarda kullanıldığında yakıt atomizasyonu, yanma ve yakıt karakteristikleri açısından saf bitkisel yağa göre çok daha iyi sonuçlar elde edilmektedir.

Tepkimede kullanılan alkolün cinsine göre oluşan mono-esterin de adı değişir. Örneğin, etanol kullanıldığında tepkimeden elde edilecekrn etil ester, ya da kullanılan alkol metanol olduğunda ise oluşacakrn metil ester'dir.

Ester değişimi tepkimesinde kullanılan katalizörler ise asidik, alkali veya enzimatik olabilir. Çoğunlukla tercih edilen asit katalizörler sülfirik, sülfonik ve hidroklorik asittir. Sodyum hidroksit, sodyum metoksit, potasyum hidroksit ise alkali katalizörler olarak tercih edilir. Enzimatik katalizör olarak da, yağ moleküllerini yağ asitlerine kolaylıkla parçaladığı bilinen lipaz enzimidir.

Esterlerdeki katalizör tortusu bazı motorlarda problem yaratabilir. Özellikle asit katalizörler, bazı metal motor parçalarını aşındırmakta, alkali katalizörler ise yanma esnasında katı kl parçacıkları oluştururlar. Bu nedenle, reaksiyon sonunda ester içinde kalan istenmeyenrnler, esterin yıkanması işlemi ile uzaklaştırılmalıdır (Canakci 2001).

BÖLÜM.3. BİTKİSEL YAĞLARDAN BİYODİZEL ÜRETİMİ VE KULLANIMI

İlk olarak Walton'un, dizel motorda bitkisel yağları kullanması üzerine çıkan problemler karşısında trigliseridleri yapıtaşları olan yağ asitlerine parçalayarak yakıt olarak kullanmayı önermesiyle "biyodizel" kavramı ortaya çıkmıştır (Graboski ve McCormick 1998).

Biyodizel, bitkisel yağlardan ester değişimi tepkimesi denilen kimyasal bir süreç ile elde edilen ve kimyasal yapısı monoalkil ester olan bir yakıttır. Bu tepkimede yağ ile monohidrik bir alkolün (etanol, metanol) bir katalizör eşliğinde tepkimeye girerek ana ürün olarak yağ asidi esterleri ve gliserol olacak şekilde esterleşme gerçekleşir. Yan ürün olarak mono- ve di- gliseridler, tepken fazlası ve serbest yağ asitleri oluşur.

Bitkisel yağlar asidik özelliklidir, diğer bir deyişle pH değerleri 7'nin altındadır. Tepkimeye giren alkol ve katalizör ise bazik özelliklidir, yani pH değeri 7'nin üzerindedir. Biyodizel tepkimesi bu iki bazik ve bir asidik madde arasında gerçekleşmektedir. Bu nedenle tepkimeye dahil edilecek katalizör madde, tepkime karışımının pH değerinin 8 ile 9 arasında olmasını sağlayacak miktarda olmalıdır. Bilindiği gibi, kullanılmış kızartma yağları kızartma veya ısıtma işlemleri sonucunda ortaya çıkan serbest yağ asitleri nedeniyle yeni rafine edilmiş bitkisel yağlara göre daha asidik özelliklidir. Biyodizel üretiminde bu serbest yağ asitlerinin ortadan kaldırılması ve bunun için de daha fazla miktarda katalizör madde kullanılması gerekmektedir.

Süreçte katalizör olarak alkali ve asit katalizörlerin kullanılması sonucu ürünün saflaştırılması ve süreç koşulları ile ilgili yaşanan bu olumsuzluklar lipaz enziminin katalizör olarak kullanılması ile giderilmektedir. Üretim teknolojisinde herhangi bir zorluk bulunmamakla birlikte, üretimdeki en önemli nokta biyodizelin saflık derecesidir. Bu nedenle rafinasyon aşaması büyük önem kazanmaktadır. Biyodizel yakıt olarak kullanıldığında en az %99 saflık derecesiyle üretildiği zaman en iyi

performansı göstermektedir. Bu nedenle yakıt olarak kullanılabilirliği açısından biyodizelin saflığı oldukça önemlidir (Özçimen ve diğ. 2000).

3.1. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Alkoller

Biyodizel üretiminde kullanılan alkol cinsi, hem ester değişimi tepkimesini ve hem de elde edilen biyodizel yakıtın özelliklerini etkilediğinden oldukça önemlidir. Çünkü, üretilen biyodizelin yapısında, tepkimede kullanılan alkolün bağları bulunmaktadır. Örneğin, aynı yağdan üretilen biyodizel yakıtlarının uçuculuğu, alkil grubu büyüdükçe azalma gösterir. Yoğunlukları ise, metil ~ 2-propil > etil > bütil ~ ester sırasıyla azalır. Bu nedenlerden dolayı, biyodizel üretiminde ester değişimi işleminde kullanılan monohidrik alkoller arasında, düşük maliyeti ve polar bir alkol olup en kısa zincirli alkol olması gibi fiziksel ve kimyasal avantajları sebebiyle en sık tercih edilen alkol, metanoldür. Trigliseridlerle hızlı bir şekilde tepkimeye girebilir ve tepkimede kullanılan katalizör metanol içinde kolayca çözünebilmektedir.

Etil alkolün ve özellikle dallanmış zincirli alkollerin asitlik derecesi düşük olması sebebiyle gerçekleştirdikleri tepkimenin etkinliği düşük olur. Bunun sonucunda ester değişimi tepkimesinde 66:1 gibi yüksek molar oranlar kullanmak gerektiği gibi, hem ester dönüşümü düşük olmakta ve hem de dönüşen esterin yanında, tepkimenin tam olmadığını belirten mono- ve di-gliserid gibi yakıtın saflığını azaltan istenmeyen yan ürünler de oluşabilmektedir. Bununla birlikte, ester değişimi tepkimesinde izo-propil alkol gibi dallanmış zincirli alkoller kullanıldığında elde edilen biyodizelin soğuk akış özellikleri oldukça iyileşir. Bunun sebebi, soğuk şartlarda donmaya neden olan kristalizasyon, moleküllerin düz zincir halinde dizilmesini gerektirir.

Uzun ve düz zincirli esterlerin arasına dallanmış yapılar eklendiğinde kristalizasyon sıcaklığı düşer, bu da dolayısıyla soğuk akış özelliğini iyileştirmiş olur. Ancak, monoalkil ester dönüşümü %100 olmaz. Yüksek oranda doymuşluğa sahip hayvansal yağların, dallanmış zincirli alkollerle tepkimeye girmesi sonucu oluşan esterlerin kristalizasyon başlangıç sıcaklıkları T_{co} , bitkisel yağlardan elde edilen metil esterinkine yakındır (Lee ve diğ. 1995, Lang ve diğ. 2001, Korus ve diğ. 1993).

Tablo 3.1. Biyodizel üretiminde kullanılan alkoller ve ester dönüşümleri (Molar oran 1:6, sülfürik asit %3, reaksiyon 48 saat) (Canakci 2001).

Alkol Tipi	Formül	Kaynama Noktası (°C)	Erime Noktası (°C)	Parlama Noktası (°C)	Yoğunluk (g/ml)	Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	Ester Dönüşümü
Metanol	CH ₄ O	65,0	-93,9	12	0,791	60	92,1
Etanol	C ₂ H ₆ O	78,7	-117,3	13	0,789	75	95,8
2-Propanol	C ₃ H ₈ O	82,4	-89,5	12	0,785	75	92,9
1-Bütanol	C ₄ H ₁₀ O	117	-89,5	35	0,810	110	87,8

Tablo 3.1’de görüldüğü gibi, 1-bütanol ile gerçekleştirilen esterleşme tepkimesinde tepkime sıcaklığının yüksek olmasına rağmen dönüşüm oranının diğerlerine göre daha düşük olmasının sebebi, alkolün yapısının dallanmış zincirden oluşmasıdır.

Asit miktarı fazla olan yağların asit oranını düşürmek için, dallanmış zincir yapılı isopropil alkol (2-propanol) ile reaksiyona sokup asit değeri düşürülebilir. Metanol ile reaksiyona sokarak ise, % esterleşme oranı artırılmış olur. Metanol ile reaksiyon sonucu elde edilen biyodizelin petrol kökenli dizel ile daha iyi karıştığı gözlenmiştir. Etanol ile elde edilen biyodizelde petrol kökenli dizel ile karışma performansı daha kötüdür (Canakci 2001).

3.2. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Katalizörler

Trigliserid bağlarının kırılabilmesi için bitkisel yağ içerisine “katalizör” eklenmektedir. Biyodizel üretiminde kullanılan katalizörler, trigliserid bağlarını kırarak esterlerin serbest hale gelmesini sağlamaktadırlar. Serbest hale geçen esterler, ancak serbest hale geçtikten sonra alkol ile birleşebilmektedir. Biyodizel üretimindeki ester değişimi tepkimesini hızlandırmak için kullanılan katalizörler asit, alkali (baz) ve enzim katalizörler olarak üç grupta incelenebilir.

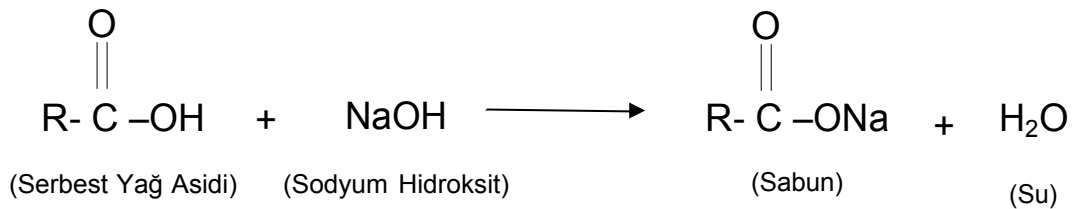
3.2.1. Asit katalizörler

Asit katalizörler olarak sülfürik, fosforik, hidroklorik ve organik sülfonik asitler kullanılır. Asit katalizörlü ester değişimi tepkimesi, alkali katalizör kullanılanlara göre çok daha yavaştır (Fangrui ve diğ. 1999, Körbitz ve diğ. 1999). Asit katalizör kullanıldığında, reaksiyona giren alkol miktarı artar. Örneğin, alkali (baz) katalizör ile 6:1'lik alkol oranında elde edilen ester dönüşümünü aynı süre içinde asit katalizör ile elde etmek için bu oranı 30:1'e çıkarmak gerekir (Freedman ve diğ. 1984).

Alkali (baz) katalizör için tepkimeye katılan katalizör miktarı kütlece %0,1-1 oranında iken, bu oran asit katalizörler kullanıldığında %3-5'e çıkar (Ma ve Hanna 1999). Gerek yukarıda bahsedilen olumsuzluklar ve gerekse asit katalizörlerin baz katalizörlere göre daha çok korozif olmaları sebebiyle pek çok ticari ester değişimi uygulamasında asit katalizörler tercih edilmemektedir.

3.2.2. Alkali katalizörler

Alkali katalizör olarak NaOH, KOH, karbonatlar ve alkoksitler (sodyum metoksit, sodyum etoksit, sodyum bütoksit v.b.) biyodizel üretiminde kullanılır. Alkali katalizörlü ester değişimi, asit katalizörlü olanlara göre yaklaşık 4000 kez daha hızlı olduğundan ticari olarak en çok kullanılan yöntemdir (Körbitz ve diğ. 1999, Hideki ve diğ. 2001). Alkali katalizörlü tepkimelerin su içeriğinin kontrolü çok önemlidir; çünkü ortamda mevcut olan su, sabunlaşma reaksiyonu sonucu sabun oluşumuna neden olmaktadır.

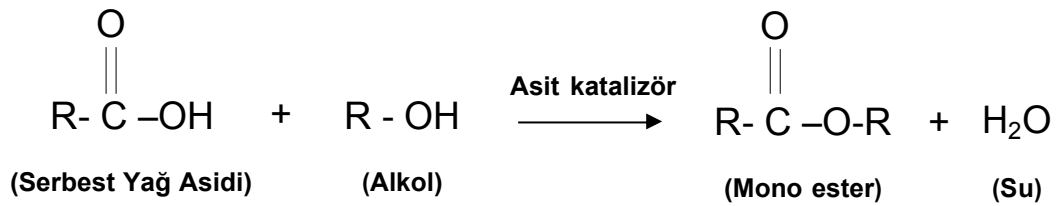


Şekil 3.1. Sabunlaşma tepkimesi.

Eğer katalizör olarak alkali katalizör kullanılacaksa trigliseridin serbest yağ asidi (SYA) içeriği %0,5 (asit değeri karşılığı 1 mg KOH/g) değerinden yüksek olmamalıdır. Çünkü, SYA'lar alkali katalizör ile tepkimeye girdiğinde, Şekil 3.1'de de gösterildiği gibi, katalizörü tüketip ester dönüşümünü azaltan ve ester, gliserol ve yıkama suyunun ayrışmasını engelleyen sabun oluşumuna neden olurlar. Oluşan bu sabunlar, viskoziteyi arttırdığından ve jel oluşumuna sebep olduğundan istenmeyen bir durumdur (Nye ve diğ. 1984, Körbitz ve diğ. 1999).

Tepkimede kullanılan yağın SYA miktarı %0,5 değerinin üzerinde olursa, SYA'ları metanol ile Şekil 3.2'de görülen tepkime sonucu estere dönüştürebildikleri için asit katalizörler kullanılmalıdır. Böylece, asit katalizörler sayesinde SYA değeri istenilen değer olan %0,5'in altına düşürülmüş olur. Böylece bir ön işlem olarak SYA'lar bir alkol ve asit katalizör ile reaksiyona sokularak mono esterlere dönüştürülür. Ön iyileştirme için ise, Şekil 3.2'de de görüldüğü gibi en büyük engel su oluşumudur.

Suyun etkisini daha anlaşılır belirlemek için bitkisel yağa su eklenerek deneyler yapılmış, %3 H₂SO₄ kullanılan reaksiyonda %0,1 kadar az bir miktarda su ilavesinin dahi esterleşme dönüşümünü düşürdüğü tespit edilmiştir. Asit katalizörlerin suya bu kadar hassasiyetlerine karşı, alkali katalizörler suya karşı daha toleranslıdır. (Canakci ve Gerpen 1999)



Şekil 3.2. Serbest yağ asitlerinin esterleşme tepkimesi.

Alkali katalizörler ile elde edilen biyodizelin saflaştırılması, yan ürün olarak oluşan gliserolün geri kazanımı, ve tepkimenin yüksek sıcaklıkta olması gibi problemler, bu süreçte karşılaşılan başta enerji verimini azaltan nedenlerdir.

3.2.3. Enzim katalizörler

Enzim katalizörlü ester değişimi tepkimesinde, yağları yağ asitlerine parçalayan enzim olan lipaz kullanılmaktadır. Enzim katalizörlü tepkime, alkali katalizörlü tepkimeye göre daha düşük sıcaklıkta (30-40 °C) gerçekleşir (Yuji ve diğ. 2002). Alkali ve lipaz katalizörlü süreçlerin karşılaştırılmaları Tablo 3.2’de görülmektedir.

Tablo 3.2. Biyodizel üretiminde alkali ve lipaz katalizli yöntemlerin karşılaştırılması (Fangrui ve diğ. 1999).

	Alkali katalizli proses	Lipaz katalizli proses
Reaksiyon Sıcaklığı	70-80 °C	30-40 °C
Hammaddede serbest yağ asiti	Sabunlaşmış ürünler	Metil Ester
Hammaddedeki su	Karışması Engellenmeli	Etkisi yok
Metil ester verimi	Normal	Yüksek
Gliserolün geri alınması	ZOR	KOLAY
Metil esterinin saflaştırılması	Tekrarlanan yıkamalarla	Yok

Metil ester oluşumu için enzim kullanıldığında önemli olan, lipazın tepkimeye sulu tampon çözeltileri halinde ya da taşıyıcı bir malzeme üzerine tutuklanarak katılmasıdır. Bu tutuklanma işlemi sonucu enzim, tepkimeye birebir katılmaz, taşıyıcı bir molekül üzerine çeşitli bağlarla bağlanarak tutuklanması sonucu oluşan kombine bir yapı olarak ester değişimi tepkimesine katılır. Enzimin tutuklanmasının en büyük avantajları, enzimin tekrar tekrar kullanılabilir olması ve ürün ile enzimin birbirine karışmamasıdır.

3.3. Lipazın Özellikleri ve Biyodizel Üretiminde Kullanımı

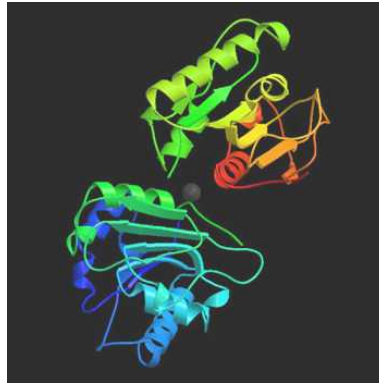
3.3.1. Lipazın enzim özellikleri

Lipazlar sentetik organik kimyada, sulu ortamda karboksilik asit esterlerinin hidrolizinde katalizör olarak en çok kullanılan ve endüstride önemli yerleri olan çok yönlü bir enzim grubudur (Manfred 2002). Aslında bir lipaz, uzun zincirli

asilgliserollerin sentezinde ve ester hidrolizlerinde katalizör olarak kullanılan bir karboksilesteraz olarak tanımlanır (Kamini ve diğ. 2000, Jaeger ve Eggert 2002).

Lipazlar, triasilgliserollerin ester hidrolizini yürüten enzimlerdir. Bu enzimler, insan bünyesinde ve hayvansal organizmalarda, bazı bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur. Buldukları ortamlar ise, çeşitli biyolojik sıvılar, hücreler, organlar ve çeşitli dokulardır (Fennema 1985). Lipazların endüstrideki uygulamaları deterjan sanayisinde, peynir üretiminde, cilt ve yüzey temizleyicilerde ve kağıt üretiminde kullanılan önemli rollere sahiptirler (Schmidt ve diğ. 1998, Villeneuve ve diğ. 2000, Manfred 2002).

Şekil 3.3'te de görüldüğü gibi lipazlar, aktif bölgelerini içine alan helezonik oligopeptid yapılardan oluşurlar. Bu helezonik şekildeki esteraz, proteaz ve haloperoksidazlarda da görülen alfa/beta-hidrolaz kıvrım karakteristiği, bütün lipazlarda da mevcuttur (Ollis ve diğ. 1992).



Şekil 3.3. Bir alfa/beta hidrolaz enzimi olan Bacillus subtilis lipazın kristal yapısı.

Son yıllarda yeni lipaz uygulamalarının kullanıldığı üretim ve süreçlerde, özellikle tutuklanmış hücrelerin kullanıldığı lipaz katalizli süreçlerin teknik uygulamalarına dair araştırmaların arttığı gözlenmektedir (Macrae ve Hammond 1985). Peki, lipazları bu kadar kullanılabilir ve çekici kılan nedir? Öncelikle, mükemmel bir kimyasal seçicilik, bölgesel seçicilik ve çift yönlü seçicilik göstermeleridir. İkinci olarak, fungi ve bakteriler gibi mikroorganizmalar tarafından yüksek verimlerle üretildiğinden büyük miktarlarda kullanılabilir olmalarıdır. Üçüncü olarak ise, çoğu

lipazın kristal yapılarının sırları bilimsel araştırmalarla çözülmüş olmaları ve mühendislik stratejilerinin tasarımını oldukça kolaylaştırmalarıdır. Bütün bu özellikler, organik kimya sektöründe en çok kullanılan biyokatalizör olarak lipazların seçilmesinin nedenidir (Kamini ve diğ. 2000, Jaeger ve Eggert 2002).

Pseudomonas glumae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* (Bornscheuer ve diğ. 2002) ve *Rhizopus arrhizus* (Elibol ve Ozer 2000) gibi bakteri hücrelerinden elde edildiği gibi, *Candida cylindracea* (Tomizuko ve diğ. 1966), *Saccharomycopsis lipolytica* (Ota ve diğ. 1982), *Geotrichum candidum* (Tsujisaka ve diğ. 1973) ve *Trishosporon fermentas* (Chen ve diğ. 1992) gibi maya hücrelerinden de lipazlar elde edilebilir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen bu mikrobial lipazlar, üretildiği mikroorganizmadan mikrobiyolojik işlemlerle izole edilip saflaştırılarak elde edilirler ve ilgili süreçlerde kullanılır hale getirilirler (Kamini ve diğ. 2000, Jaeger ve Eggert 2002). Günümüze kadar doğal kaynaklar olan bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan izole edilip tanımlanmış 50'den fazla çeşit lipaz vardır (Dumitriu ve diğ. 2003).

Yüksek pH'larda enzimler genelde etkinliklerini yitirirler. Enzimlerin en yüksek etkinlik ile çalıştıkları pH değeri "optimum pH" olarak adlandırılır. Pepsin gibi pH 1,8'de ya da arginaz gibi pH 10,0'da en yüksek etkinlik gösteren istisna enzimler de olduğu gibi, çoğu enzimler pH 4,5-8,5 aralığında en yüksek etkinliği gösterirler. Yüksek pH'larda yapılarındaki proteinlerin yapısının bozulması sebebi ile enzim etkinliği, geri dönülemez olarak düşer (Fennema 1985). pH 7-9 aralığında ve 30-40°C sıcaklıkta en yüksek etkinliği göstermeleri, mikrobial lipazların en önemli karakteristik özelliklerindedir (Ollis ve diğ.1992).

3.3.2. Lipazın tutuklanması

Tutuklanma işlemi, enzimin ya da mikroorganizmanın taşıyıcı bir malzeme üzerine çeşitli yöntemlerle tutuklanmasıdır. Bir enzimin tutuklanmasının en önemli avantajları, kesikli ya da sürekli süreçlerde enzimin istenildiği zaman tepkimeye sokulup geri çıkartılabilir hale gelmesi, tepkimenin istenildiği zaman tutuklanmış enzim ortamdaki hızla sonlandırılabilir olması, ürün oluşumunun

kolaylıkla denetlenebilir olması, çok basamaklı tepkimelerde yüksek etkinlik göstermeleri ve tutuklanma ile enzimin seçilen bazı özelliklerinin modifiye edilebilir olmasıdır. Ayrıca, enzimin tutuklanma süreci, operasyonun ekonomikliğini bozmayacak kadar kolay ve zahmetsizdir (Fennema 1985).

Enzim tutuklanmasında kullanılan beş yöntem vardır: a) Çözünmeyen bir matriks üzerine kovalent bağlama yöntemi, b) Kafes-jel yapılı yarı geçirgen bir membrana hapsetme yöntemi, c) Hidrofobik ve bağlanma afinitesi yüksek, çözünmeyen matriksler üzerine adsorpsiyon yöntemi, d) Taşıyıcı malzeme ile çapraz bağlama yöntemi, e) Adsorpsiyonu takip eden çapraz bağ oluşumu yöntemi (Fennema 1985). Ancak en çok kullanılan ve en etkin tutuklanma yöntemi, fiziksel ve kolay bir prosedürü olması nedeniyle enzimin katı bir malzeme üzerine adsorpsiyonudur (Dumitriu ve diğ. 2003).

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 veya doğal polimerler, selit 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 (Dumitriu ve diğ. 2003).

3.3.3. Lipazın biyodizel üretiminde kullanımı

Bitkisel yağın metil- ya da kısa zincirli başka bir alkol esterine dönüşümü, lipaz enzimi katalizörlüğünde ester değişimi tepkimesi ile gerçekleştirilir. Ancak, lipaz katalizli biyodizel üretim sürecini endüstriye uygulamak, lipazın pahalı olması sebebiyle yüksek maliyet gerektirir.

Yüksek maliyet problemini çözmek için, yapılan araştırmalar sonucu iki strateji geliştirilmiştir: a) Bir lipaz üreticisi mikroorganizma olan *P.fluorescens*'ın ürettiği lipazın tutuklanması ile tekrarlanan kullanımlarda enzimin stabilitesi arttırılarak

harcanan enzim miktarının azaltılmasıdır. b) *Rhizopus oryzae* lipazının *Saccharomyces cerevisiae* içinde sitoplazmik overekspresyonu ile elde edilen tam-hücre biyokatalizörünün, solventsiz bir tepkime sistemi ile metanoliz tepkimesinde kullanılmasıdır (Iso ve diğ. 2001, Matsumoto ve diğ. 2001, Jaeger ve Eggert 2002). c) Lipaz enzimi yerine doğrudan lipaz üreten mikroorganizmaların taşıyıcı malzeme üzerine tutuklanması sonucu maliyetin azaltılmasıdır (Ban ve diğ. 2001, Oda ve diğ. 2005).

3.4. Enzim Katalizör İle Yapılan Diğer Literatür Çalışmaları

İlk olarak 1895'te Dr. Rudolf Diesel'in yerfıstığı yağı kullanarak dizel yakıt elde etmesiyle (Fangrui ve diğ. 1999) gündeme gelen biyodizel yakıtın 1990'lardan itibaren dünyada kullanımını yaygınlaşmaya başlamıştır. Günümüze kadar 30'dan fazla çeşit bitkisel yağın uygunluğunun araştırıldığı, bu bitkisel yağlardan kısa zamanda olumlu sonuçlar alınsa da test süreleri uzatıldığında ortaya çıkan motor problemlerini aşmak için yağların çeşitli kimyasal işlemlerden geçirilerek elde edilen biyodizel yakıtıyla dizel motorların kısa ve uzun vadelerde çalıştırıldığı, performans, yakıt tüketimi ve egzoz emisyonları bakımından değerlendirildiği pek çok araştırmanın olduğu görülmektedir. Biyodizel üretiminde en çok kullanılan alkol olarak metanol ve katalizör olarak da alkali katalizör, genellikle sodyum hidroksit kullanılmış; bunların haricindeki alkol ve asit katalizörlerin kullanıldığı çalışma sayısı, karşılaşılan olumsuzluklar nedeniyle sınırlı kalmıştır. Bu bölümde, biyodizel üretiminde katalizör olarak kullanılan lipazlar ile yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

Kaieda ve arkadaşları (1999), Japonya'daki çalışmalarında bitkisel yağ ve metanolden çözücü olmayan bir ortamda geliştirilen tepkime sisteminde metil esterlerin sentezinin gerçekleştirildiği yeni bir enzimatik yöntem geliştirmişlerdir. Araştırmalarında kullanılan *Rhizopus oryzae* lipazı ile katalizlenen soya yağının metanolizinde, ağırlıkça %4-30 arasında su kullanıldığı halde, ortamdan su çekildiğinde enzimin etkinliğini kaybettiği görülmüştür. Ve metil ester dönüşümü, sulu ortamda %80-90 olarak gerçekleşmiştir.

Abigor ve arkadaşları (2000), Amerika'da yürüttükleri çalışmalarda Nijerya'dan gelen laurik yağ olan hurma çekirdeği yağı ve hindistan cevizi yağı kullanarak lipaz katalizli biyodizel üretimi denemişlerdir. Lipaz olarak ticari Lipaz PS30 kullanılan tepkime, 250 rpm hızla karıştırılmalı su banyosunda 40°C'de ve 8 saatte gerçekleştirilmiştir. Yağ olarak hurma çekirdeği yağı kullanıldığında en iyi metil ester dönüşümlerinin %72 ile etanol, %62 ile t-bütanol, %42 ile 1-bütanol, %42 ile n-propanol ve en düşük %24 ile iso-propanole ait olduğu görülmüştür. Hindistan cevizi yağının kullanıldığı tepkimelerde ise 1-bütanol ve iso-bütanol ile %40, 1-propanol ile %16 ve etanol ile %35 dönüşüm elde edilmiştir.

Iso ve arkadaşları (2001), Japonya ve Çin'de yürüttükleri çalışmalarında tutuklanmış lipaz kullanarak, susuz ortamda trigliserid ve alkolden biyodizel yakıt üretimi üzerine denemeler yapmışlardır. Yağ olarak ayçiçek yağı ve triolein kullandıkları tepkimelerde, alkol olarak da kısa zincirli olan metanol, etanol, 1-propanol ve 1-bütanol kullanmışlardır. Enzim tutuklanmasında taşıyıcı malzeme olarak ticari adı Toyonit 200-M olan gözenekli kaoliniti seçmişlerdir. Enzim olarak da Lipaz AK, Lipaz PS, Lipaz M, lipaz AY ve Newlase F ticari enzimlerini kullanmışlar ve en yüksek tepkime etkinliğini tutuklanmış Lipaz AK'de görmüşlerdir. Tutuklanmış enzimin etkinliği, serbest lipazınki ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu açıklanmıştır. Tutuklanmış Lipaz AK kullanıldığında tepkimede metil ester dönüşümü, 25 saatte %90 olarak sonuçlanmıştır.

Shimada ve arkadaşları (2001), Japonya'daki araştırmalarında lipaz enzimi ile balık yağından ve yemeklik atık yağlardan metanoliz ile biyodizel üretimi denemişlerdir. Balık yağı olarak tuna ve sardalye balıklarının yağını kullanmışlar ve metanoliz tepkimesini ise literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak üç basamaklı gerçekleştirmişlerdir. Reaksiyonun birinci basamağında 30°C'de 1:3 oranında metanol ile ilk 7 saat sonunda dönüşüm %33 ölçülmüş, ikinci basamakta 1:3 molar oranda metanolün 2.kez eklenmesi ile 10 saat daha beklendikten sonra 20. saat sonunda dönüşümün %66,4'e çıktığı ve üçüncü basamakta ise 1:3 molar oranda metanolün 3.kez eklenip toplam 48 saat sonunda dönüşümün %97,3 olduğu görülmüştür. Bu basamaklı alkoliz reaksiyonu sisteminin, tuna balığı yağının etanolizinde daha başarılı olduğu gözlenmiştir.

Pizarro ve Park (2002), Shizuoka Üniversitesi'ndeki araştırmalarında rafine soya yağı, palm yağı ve kolza yağı kullanarak lipaz katalizli biyodizel üretimi gerçekleştirmişlerdir. Alkol olarak metanol kullanmışlar ve yağ/alkol molar oranı 1:1 (3,0/0,10 g yağ/alkol), 1:4 ve 1:6 olarak denemişler. Tepkime 175 rpm hızla karıştırmalı reaktörde 37°C'de ve 72 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Metanoliz tepkimesi için optimum koşulların, %75 su içeriği, yağ/alkol molar oranının 1:4 ve 37°C'de 175 rpm hızla karıştırlarak 96 saat sürdüğünü söylemişlerdir. 96 saat boyunca en yüksek dönüşüm, %55 olmuştur.

Lara ve Park (2003), Japonya'da Shizuoka Üniversitesi'nde, organik çözücülü sistem içinde *Candida cylindracea* lipazı ile rafine palm yağı ve kolza yağı kullanarak yağ asidi alkil esterlerinin üretimi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Katalizör olarak Lipaz OF, Lipaz F-AP15, Sumizyme NLS, Lipaz A-10FG ticari enzimlerinin kullanıldığı tepkimelerde alkol olarak da metanol, etanol, 1-propanol, 1-bütanol, iso-bütanol, iso-amil alkol ve n-oktanol denenmiştir. Palm yağının metanol ile alkolinin optimizasyonu yapılmıştır. n-Hekzan'ın çözücü olarak kullanıldığı ortamda en yüksek enzim etkinliğini *Candida cylindracea* lipazının (Lipaz OF) gösterdiği görülmüştür. 8 saat sonra yağ asidi alkil ester dönüşümü en yüksek %96 olarak elde edilmiştir.

Soumanou ve Bornscheuer (2003), Almanya'daki çalışmalarında ayçiçek yağından yağ asidi metil ester dönüşümünü araştırmışlardır. Alkoliz tepkimesinin hızı üzerine organik çözücünün etkisi araştırılmış ve en yüksek dönüşüm %80 olarak n-hekzan kullanıldığında elde edilmiştir. Çözücüsüz ortamda en iyi dönüşümün, %90 olarak *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) lipazı kullanıldığında elde edildiği görülmüştür. Tutuklanmış lipaz olan Lipozyme RM-IM ile en yüksek dönüşümün %80 olduğu ve ester değişimi tepkimesi için en iyi sürenin 120 saat olduğu söylenmektedir.

Oliveira ve arkadaşları (2004), Brezilya'daki çalışmalarında Novozym-435 ve Lipozyme-IM lipazlarını katalizör olarak ve çözücü olarak da n-hekzan kullanarak hint yağından yağ asidi etil ester üretimini denemişlerdir. 35-65°C reaksiyon sıcaklıklarını, su ve enzim derişimlerini, yağ/etanol molar oranını 1:3 ve 1:10

aralığında değiştirerek tepkimeye etkilerini tespit etmişlerdir. Her iki enzim çeşidi için en iyi biyodizel üretimi ve ayrıca ürün dönüşümünde ana ve dolaylı değişkenlerin etkisi iyileştirilecek şekilde bir deney modeli elde etmişlerdir. Novozym-435 enzimi kullanıldığında, 1:10 yağ/etanol molar oranı ile 65°C’de en yüksek dönüşümün %81,4 olduğu görülmüştür. Lipozyme-IM enzimi kullanıldığında ise, 1:3 yağ/etanol molar oranı ile 65°C’de en yüksek %98 dönüşümün gerçekleştiği görülmüştür.

Du ve arkadaşları (2004), in’de Tsinghua niversitesi’nde yürüttükleri araştırmalarda Novozym-435 ile rafine ve ham soya yağının ester değişimi işlemi sonucu biyodizel elde etmişlerdir. Metanolün ciddi bir şekilde enzim etkinliğini olumsuz etkilediğini ifade etmişlerdir. Farklı asil alıcısı olarak metil asetat kullandıklarında enzimin etkinliğini kaybetmediğini, ancak metil asetatın tepkime hızını düşürerek lipaz sarfiyatını arttırdığı sonucuna ulaşmışlardır. Tepkimeye giren lipazın yağa oranını ağırlıkça %4 ve %30 gibi iki farklı oranda değiştirerek denemişlerdir. Metanol ile tepkime hızının, ham yağda daha yavaşladığı, metil asetat ile metil ester verimlerinin ham yağda, rafine yağda olduğu kadar yüksek (%92) olduğu görülmüştür. Diğer bir deyişle, kullanılan yağın ham ya da rafine olması yağın içeriğini değiştirmediğinden metil ester dönüşümüne etki etmediği sonucu çıkarılmıştır.

Peres ve arkadaşları (2005), Portekiz-Lisboa niversitesi’nde susuz ortamda gerçekleştirdikleri lipaz katalizli ester değişimi tepkimesinde zeolitlerin tepkime verimine etkileri üzerinde çalışmışlar ve en yüksek enzim etkinliğini zeolit NaA ile elde etmişlerdir.

Salis ve arkadaşları (2005), İtalya’da Cagliari niversitesi’nde biyokatalizörlerle triolein ve kısa zincirli alkollerden biyodizel üretimi üzerinde çalışmışlar ve oleik asit alkil esteri sentezini gerçekleştirmişlerdir. Candida antarctica B, Rizhomucor miehei ve Pseudomonas cepacia gibi farklı ticari tutuklanmış enzimlerle triolein ve bütanol kullanarak btil oleat üretimi tepkimeleri test edilmiştir. Ve Pseudomonas cepacia lipazının 6 saat sonunda %100 dönüşümü sağlayarak etkinliği en yüksek enzim olduğu sonucuna varılmıştır. Tepkime sıcaklığı, su aktivitesi ve tepkenlerin

stokiyometrik oranları gibi operasyon koşulları değiştirilerek araştırma yapılmış ve sonuçlar optimize edilmiştir. Düz ve kısa zincirli ve birincil alkol ile daha yüksek tepkime hızına ulaşıldığı ve daha yüksek oranda dönüşüm elde edildiği görülmüştür.

3.5. Biyodizelin Dünyada ve Türkiye’de Kullanımı

3.5.1. Dünyada biyodizel kullanımı

Dünyada son yıllarda pek çok ülke yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımını enerji politikaları gereği arttırmak için çaba göstermektedirler. Almanya, Avustralya, İtalya başta olmak üzere tüm Avrupa ve Amerika’da biyodizel üretimi ve tüketimi hızla çoğalmaktadır. Avrupa Birliği sürecinde ve Kyoto protokolüne göre %2, 2010 yılında da %5 biyodizel kullanılmasının mecburi olması öngörülmüştür. Bu durum AB ülkelerinin de biyodizel talebini artıracak ve ihracı mümkün olacaktır. EN 14214 Avrupa standardı olup bu standartta uygun biyodizel üretilmesi mecburiyeti getirilmiştir. Karaosmanoğlu (2002) kaynağında Avrupa’nın üretim kapasitesinin 2003’te 2,3 milyon ton iken 2010’daki hedefin, bu miktarı 8,5 milyon tona çıkartmak olduğunu bildirmektedir.

Fransa’da özellikle biyodizelin çevre dostu niteliği ön plana çıkartılarak; biyodizel uygulamaları Novaol, Sofiproteol, Rouen gibi üreticiler Citroen, Renault, Peugeot gibi otomotiv üreticileri ile Total ve Elf gibi büyük petrol firmaları genelinde Avrupa Birliği desteği ile gerçekleştirilmektedir. Rouen firması 1999/2000 döneminde 180.000 ton biyodizel üretmiştir (Karaosmanoğlu 2002). Kolza yağından üretilen biyodizel, 32 şehrin şehirler arası ağında toplu taşıma otobüslerinde biyodizel ve karışımları olarak vergi indirimi desteği ile kullanılmaktadır.

Avrupa’da Avusturya, biyomotorin uygulamasında önde gelen ülkelerdendir. 2000 yılı verilerine göre, Avusturya’da biri pilot ölçekli olmak üzere 7 ticari tesiste, en büyük üretici firma 22.000 ton/yıl kapasite ile çalışarak toplam 30.000 ton/yıl biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir (Karaosmanoğlu 2002). Uygulanan süreçlerde daha çok kolza yağı ve kullanılmış kızartma yağı tercih edilmektedir. Dizel motorda %100 biyodizel kullanımında %95 vergi indirimi yapılmaktadır.

İtalya’da Comlube, Estereco, Novamont, Olefici gibi 11 tane firmada ayçiçek ve kolza yağı kullanılarak yılda 125.000 ton biyodizel üretimi gerçekleştirilmektedir. Üretilen bu biyodizel, daha çok toplu taşıma araçlarında, otobüslerde vergi indirimli olarak kullanılmaktadır (Karaosmanoğlu 2002).

Almanya, Tablo 3.3’te görüldüğü gibi biyodizel için kapasite geliştirmede öncü konumdadır. Almanya kendi üretim kapasitesini, 1992’de 5000 ton/yıl’dan 2002’de 550.000 ton/yıl’a yükseltmiştir. Geçtiğimiz yıl Almanya’da biyodizel üretimi 2 milyon tona ulaşmış olup halen yeni tesislerin kurulmasına devam edilmektedir (Karaosmanoğlu 2002). Gelecekte de toplam kapasitesini 10 katına çıkartması beklenmektedir (Bockey ve Körbitz 2003).

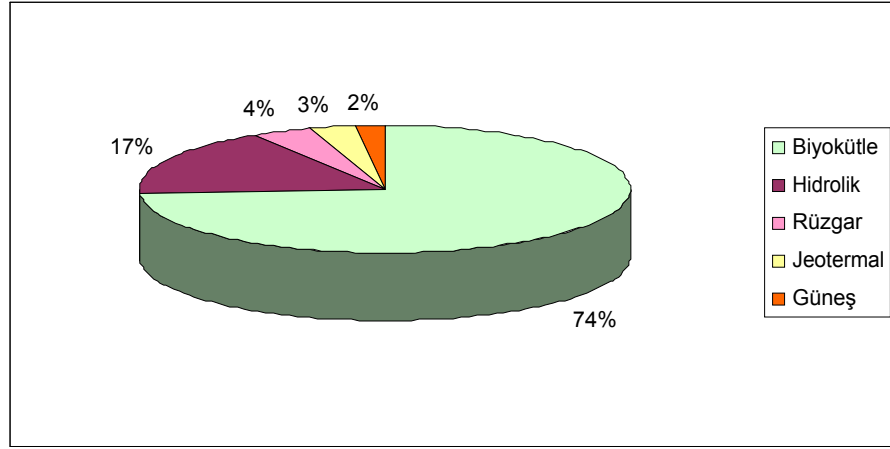
Tablo 3.3. Avrupa ülkelerinin biyodizel kapasiteleri (Bockey ve Körbitz 2003).

Ülke	Kapasite (ton/yıl)
Almanya	1.109.000
Fransa	440.000
İtalya	350.000
Çek Cumhuriyeti	60.000
Danimarka	60.000
Avusturya	45.000
İsveç	30.000
İngiltere	30.000
Toplam	2.124.000

Amerika’da “Ulusal Temiz Şehirler” programı kapsamında biyodizel kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Biyodizel yakıt olarak Columbus Foods, Twin Rivers Technology, Pasifik Biodiesel, Procter and Gamble gibi firmalar tarafından kolza, ayçiçek, soya ve kullanılmış kızartma yağlarından üretilmektedir (Karaosmanoğlu 2002). Daha çok şehir içi yolcu otobüslerinde, deniz taşıtlarında ve askeri taşıtlarda kullanılmaktadır.

Biyodizel için vergi uygulamaları ise, her ülkede farklılık göstermektedir. Almanya'da biyodizel kullanımını teşvik amacı ile biyodizel, tüketim vergilerinden hariç tutulmuştur ve %100 biyodizelin kullanımı yasal olarak mümkün kılınmıştır. Amerika'da biyodizel teşvikleri eyalet bazında değişiklik göstermektedir. En önemli teşvik uygulamaları biyoenerji tüketici kredi programı, hava kalitesi geliştirme programı ve temiz yakıt altyapısı için vergi programlarıdır. Avusturya, İngiltere, İtalya gibi AB ülkelerinde de yenilenebilir ham maddelerden vergi alınmamaktadır (Anonim 1, 2006).

Avrupa Birliği'nde 2003/30/CE sayılı ve 8/2003 tarihli direktifi ile karışım oranları mecbur hale getirilmiştir. Gelişmiş ülkelerde ise uygulama imkanı çevreyle dost bir enerji türü olan biyodizel üretimine yönelik Bitkisel ve Hayvansal Atık Yağ Kontrolü Yönetmeliği çalışmalarına devam edilmektedir (Anonim 2, 2005).



Şekil 3.4. Avrupa'nın 2010 yılındaki yenilenebilir enerji kaynakları kullanım hedefi (Karaosmanoğlu 2003).

Avrupa Birliği'ne üye ülkelerin 2000 yılındaki enerji ihtiyacının %6'sı yenilenebilir enerji kaynaklarından sağlanmıştır. Biyokütle, bu kaynaklar arasında %55'lik bir paya sahiptir. AB ülkeleri 27 Kasım 2001 tarihli yönergede (2001/77/EC) 2010 yılında toplam enerji tüketiminin %22'sini yenilenebilir kaynaklardan sağlamayı garanti etmiştir (Karaosmanoğlu 2003). Şekil 3.4'te de görüldüğü gibi en büyük oran %74 ile biyokütle kaynaklı biyoyakıtlara ayrılmıştır. AB'de Kyoto Protokolü

çerçevesinde CO₂ emisyonlarının düşürülmesi konusunda biyoyakıtlar ve özellikle biyodizel özel bir yere sahiptir. Türkiye de bu gelişme ve planlamaların dışında kalmamalıdır.

Eylül 2002’de Joannesburg Sürdürülebilir Kalkınma Dünya Zirvesi’nde yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı konusunda bir anlaşma sağlanamamış olsa da, bu kaynakların kullanımının küresel enerji kaynaklarına oranla artırılması uygulama planına alınmıştır. T.C. Çevre Bakanlığı koordinatörlüğünde “Ulusal Koordinasyon Grubu” tarafınca bu konudaki çalışmalar sürdürülmektedir.

3.5.2. Türkiye’de biyodizel kullanımı

Ülkemizde mevcut olanaklarla uygulamaya alınabilecek en önemli alternatif yakıt seçeneklerinden biri, biyodizeldir. Ülkemizde deniz taşımacılığının tamamında ve kara taşımacılığının büyük bir kısmında dizel motorlu araçlar ve endüstride jeneratörler için dizel yakıt kullanılmaktadır. Petrol tüketimimizin sadece %15’inin yerli üretimle sağlandığı günümüzde, petrol ürünleri tüketimi içinde de en büyük pay %34 oranında dizele aittir (Sarıyıldız 2005). Böylece biyodizel kullanımı ile, petrol tüketiminde ve egzoz gazı kirliliğinde azalma olacaktır.

Ülkemizde kolza, soya, aspir, ayçiçeği gibi yağlı tohum bitkilerinin enerji amaçlı tarımı çok uygun olup, devlet tarafından GAP Bölgesi’nde, ülkemiz ikliminde çok rahat yetişebilen kolza ve soya tarımına destekler başlatılmıştır (Anonim 1, 2006). Tarımı sorunsuz ve maliyeti buğday ve ayçiçeğinden daha az olan kolzanın, Türk çiftçisi için önemli bir kurtarıcı olacağı kaçınılmazdır. Karaosmanoğlu 2002’deki çalışmasında GAP Bölgesi’nde 10 milyon dekar’lık bir alanda sulu tarım olanağı ile, bölgede yetiştirilen pamuğun yanı sıra, dönüşümlü olarak kolza ve/veya soyanın oldukça verimli bir şekilde yetiştirilmesinin gerçekleştirilebileceğini ve genel olarak hesaplanırsa, GAP Bölgesi’nde kolza ve/veya soya ekimi ile yılda 1,5 milyon ton biyodizel üretilebileceğini açıklamaktadır. Enerji amaçlı tarımın Türkiye tarım politikası içine alınarak çiftçinin bu konuda yönlendirilmesi şüphesiz ülkemizin kalkınması adına yararlı olacaktır.

Türkiye, biyodizel üretimi için yeterli teknolojiye sahiptir ve yakıtın kullanımına kolaylıkla uyum sağlayabilir. Öncelikle kırsal kesimde çeşitli kapasitelerde biyodizel üretim tesisleri kurularak tarım makinelerinin ve kamyonların bu yakıtı kullanımı özendirilmelidir. Ayrıca egzoz kirliliğinin yoğun olduğu büyük şehirlerin toplu taşıma araçlarında da biyodizel kullanımının yararlı olduğu biyodizel kullanımlarının artması ile kanıtlanmaya başlayacaktır.

13 Nisan 2002'den beri Trakya'da bir firma tarafından biyodizelin sürekli üretimi gerçekleştirilmektedir. B50 formatında olmak üzere şu anda 8 köyde satışı ve kullanımı gerçekleştirilmektedir. Ayrıca İstanbul, İzmir, Mersin, Adana ve Kocaeli illerimizde de kesikli süreçlerle küçük miktarlarda biyodizel üretimi yapılmaktadır. Ezici ve Ayhanlar firmaları 2006'dan itibaren üretime geçmiştir. Yakın zamanda çok daha yeni tesis sürekli üretime geçecektir. Ve çok sayıda yeni girişimci de basının da etkisi üzerine biyodizel üretimi için kolları sıvamıştır.

T.C. 57. Hükümeti ile Dünya Bankası arasında imzalanan "Tarımsal Reform ve Uygulama Projesi" olan ARİP'nin amacı, mevcut destekleme politikalarını ortadan kaldırarak doğrudan gelir desteğine geçmektedir. Alternatif ürün projeleri gerçekleştirerek arz fazlası olan tütün ve fındık üreticilerinin faaliyet alanlarının, arz açığı olan ürünlere yönltilmesi sağlanacaktır. Bu kapsamda çiftçi, biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilecek bitkilerin tarımına yönlendirilecektir. Bu nedenle 30 Nisan 25094 sayılı tebliğ, 25.10.2002 tarih ve 24917 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan 2002 yılı ürünü kütlü pamuk, yağlık ayçiçeği, soya fasülyesi, kanola ve zeytin yağı üreticilerine destekleme primi ödenmesine dair 2002/4842 sayılı Bakanlar Kurulu Kararı esas alınarak hazırlanmıştır (Anonim 1, 2006).

Kararnameye göre yağlık ayçiçeğinde; yağ sanayi işletmelerine satış yapılması veya ham yağ olarak işletilmesi koşuluyla tüccar alımları destekleme primi uygulaması kapsamına alınmıştır. Soya fasülyesi ve kanolada ise; yem sanayi, yağ sanayi ve gıda sanayi işletmelerine satış yapılması koşuluyla tüccar alımları da destekleme primi kapsamına alınmıştır.

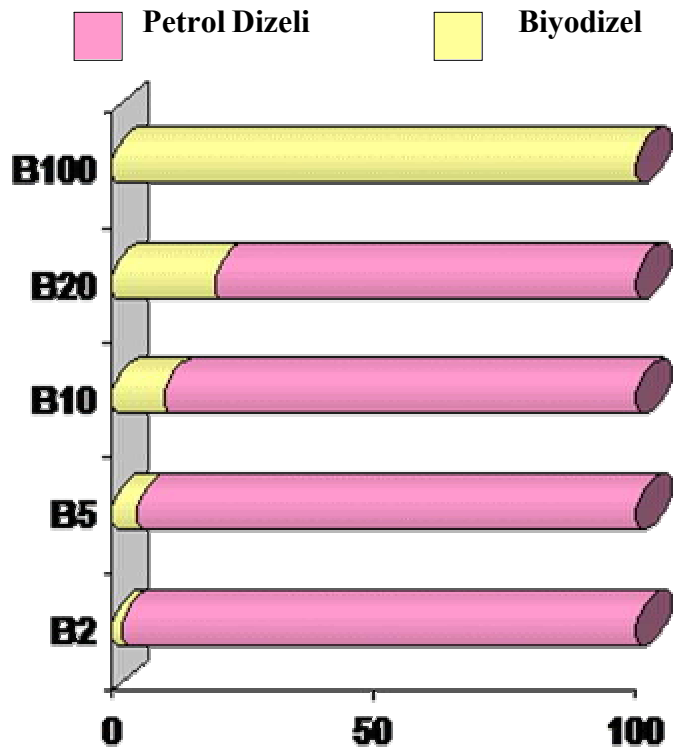
Ülkemizde biyodizel pazarını etkileyen en önemli faktör, biyodizel üretim maliyetinin yüksek olmasıdır. Biyodizelin birim üretim maliyetinde etkili bir faktör, yan ürün olarak elde edilen gliserolün ekonomik olarak değerlendirilmesidir. Bu gliserol, sabun ve kozmetik sanayinde kullanılabildiği gibi saflaştırarak ilaç sektöründe de değerlendirilmektedir (Anonim 1, 2006).

Biyodizelin ülkemizde üretimi ve tüketimi tamamen yaygınlaşınca, biyodizelin alternatif yakıt olarak dizel motorları dışında da yaygın olarak kullanımı beklenmektedir. Biyodizel bu özelliğinden dolayı, “Acil Durum Yakıtı” ve “Askeri Stratejik Yakıt” olarak da adlandırılabilir. Kesinlikle kükürt içermeyen biyodizel, tarımda kullanılan seralar için mükemmel bir yakıt olabilir. Yer altı madenciliğinde, gıda işleme sanayi dahil olmak üzere sanayinin bütün alanlarında ve ayrıca jeneratör yakıtı ve kalorifer yakıtı olarak da değerlendirilmesi mümkündür. Biyodizel ulaştırma sektöründe dizel yakıt yerine kullanıldığı gibi konut ve sanayi sektöründe de fuel oil yerine kullanılacak çok yönlü bir yakıttır (Anonim 1, 2006).

BÖLÜM.4. BİYODİZEL VE DİZEL YAKITLAR VE ÖZELLİKLERİ

4.1. Biyodizel Özellikleri

Biyodizel, dizel yakıt ile tamamen homojen karışabilir ve genellikle karışım halinde test edilir. Bu karışımlar, karışım içerisindeki biyodizelin hacimsel yüzdesi ile tanımlanır. Örneğin, çeşitli kombinasyonları Şekil 4.1’de gösterilen B-20 hacimsel olarak %20 biyodizel içeren karışımdır. B-20 yaklaşık %2 ağırlıkta oksijen içerir ve kaynaklardaki çalışmaların büyük bir kısmı bu karışım üzerinden yürütülmektedir. Biyodizelin içeriğindeki oksijen oranının artması, yanma anında oksijen ihtiyacının kolay sağlanarak enerji yoğunluğunu da %10 oranında azaltır (Graboski ve McCormick 1998, Canakci ve Gerpen 2003).



Şekil 4.1. Biyodizelin petrol kökenli dizel ile karıştırılarak oluşturulan kombinasyonları.

4.1.1. Kimyasal yapısı ve özellikleri

Bitkisel yağlardan elde edilen monoalkil esterlerin kimyasal yapısı, yağ asidi alkil zincirlerinin uzunluğuna ve doymamışlık derecesine bağlıdır. Petrol kökenli dizelden en büyük farkı, yapısında ağırlıkça %10-12 oranında oksijen içermesidir ve bu da partikül emisyonunu azaltıcı etki yapar. Biyodizel, kükürlü bileşikler içermez. Yakıt bünyesindeki kükürt bileşikleri, egzoz uç borusunda kükürt oksitlere, sonra da kirletici olan sülfürik aside dönüştürülür. Ayrıca petrol kökenli dizel, biyodizelden dezavantajlı olarak hacimsel olarak %20-40 oranında değişen miktarlarda aromatik bileşik içerir. Aromatikler ise, çevre kirliliğinin en büyük sebeplerinden olan partikül emisyonunu ve NO_x emisyonunu artırır. Biyodizel ise, aromatik değildir.

Doymuş yağ asitlerinin donma noktaları, doymamış yağ asitlerinden daha yüksektir. Örneğin, oleik asit 16°C'de erir iken, stearik asit 70°C'de erir. Bunun sebebi, oleik asitin yapısında tek çift bağ bulunmasıdır, yani doymuştur. Donma ve kaynama noktası için yağ asitlerinin kimyasal yapısı belirleyici faktördür. Yağ asitlerinin kaynama noktası ise zincir uzunluğundan etkilenir, doymamışlık derecesinden bağımsızdır. Yağ asitlerinin kimyasal yapısının erime ve kaynama noktaları üzerindeki bu etkisi, aynı zamanda yağ asitlerinin esterleri için de geçerlidir (Graboski ve McCormick 1998).

4.1.2. Yanma özellikleri

Dizel yakıtlarda setan sayısı, ateşleme gecikmesinin bir ölçüsüdür. Setan sayısının yüksek olması, yakıt enjeksiyonunun başladığı andan itibaren ateşleme arasında geçen zamanın kısa olması demektir. Bu, her dizel yakıtı için arzu edilen bir özelliktir. Biyodizelin setan sayısı, biyodizelin üretildiği yağ kaynağına bağlılık gösterir ve genelde No.2 dizel yakıtın setan sayısından daha yüksektir. Bu da biyodizelin, motorda daha kolay ateşlendiğini gösterir.

Soya yağı metil esteri için belirlenen setan sayısı aralığı 45,8-56,9 ve kolza yağı metil esteri için ise 48-62 civarındadır (Graboski ve McCormick 1998). Değerlerin geniş bir aralıkta olması, muhtemelen esterler için trigliserid oranlarındaki

değişimlerden ve yakıtta istenmeyen atık metanol ve gliserol bulunma ihtimalinden kaynaklanmaktadır. Ester değişimi tepkimesine girecek olan alkolün etanol ya da bütanol gibi daha uzun zincirli alkoller olmasının setan sayısı üzerinde etkisi yok denecek kadar azdır. Setan sayısının artması, NO_x emisyonlarında azaltıcı etki göstermektedir.

No.2 dizelin 0,85 olan özgül ağırlığı, biyodizelde 0,86-0,90 arasında değiştiği rapor edilmiş ve daha çok 0,88 olarak gözlenmektedir (Graboski ve McCormick 1998). Bu nedenle, biyodizelin hacimsel olarak daha fazla harcanmasına sebep olur. Biyodizel hem hacimsel hem de kütleli olarak petrol kökenli dizele göre daha düşük enerji içeriğine sahiptir. Yani, motor enjektörü daha fazla yakıt kütlesi gönderse de, gönderilen gerçek enerji No.2 dizelininkinden daha düşüktür. Dolayısıyla, yakıt tüketimi açısından biyodizel daha fazla tüketilmiş olur.

Yakıtın üzerindeki yakıt ve buhar karışımının tutuşabileceği kadar yakıtın ısıtılması gerekli olan sıcaklık, parlama noktasıdır. Bütün No.2 dizel yakıtlar bağıl olarak, minimum 54°C ve tipik olarak 71°C olmak üzere yüksek parlama noktalarına sahiptirler. Saf biyodizellerin parlama noktası ise, en az 90°C olmak üzere çok daha yüksektir. Bazı çalışmalarda ölçülen düşük parlama noktalarının sebebi, biyodizelin safsızlığından ileri gelir, yani içerisinde istenmeyen atık metanol ya da gliserolden kaynaklanabilir. Yaklaşık olarak 90°C'den yüksek parlama noktasına sahip yakıtlar, A.B.D. Taşımacılık Düzenleme raporuna göre kendi kendine alevlenme açısından ve dolayısıyla depolama konusunda tehlikesizdirler. Bu rapora bakılırsa saf biyodizel yakıtın, parlama noktası bakımından dizel yakıttan çok daha güvenilir ve tehlikesiz olduğu görülmektedir. Karışımlarda ise, biyodizelin %50 ve daha yüksek oranda kullanılması halinde parlama noktasında yükselme sağlanmış olur (Graboski ve McCormick 1998).

Yakıtın önemli bir yanma özelliği de yanma ısısıdır. Yakıt tüketiminin, alt ya da net ısı değerine bağlı olduğu ve yakıtın hacimsel enerji yoğunluğu ile orantılı olduğu kabul edilir. Biyodizel, No.2 dizelden yaklaşık olarak %10 daha az ısı değerine sahiptir. Bu nedenle, biyodizelin %50 ve daha yüksek oranda kullanıldığı karışımlarda hacimsel yakıt tüketimi daha yüksek olacaktır.

Yakıtın viskozite değeri, yakıtın akış özelliğini oluşturduğundan önemlidir. Örneğin, soya yağı metil esterinin viskozitesi, 40°C’de en fazla 4,1 değerindedir. Kolza yağı ve iç yağı metil esterlerin viskoziteleri ise, bu değeri oldukça aşar. Herhangi bir durumda saf biyodizellerin viskozitesi, No.2 dizelden daha yüksektir. Yüksek viskozite de, yakıt spreyinin daha kötü atomize olmasına ve yakıt enjektörlerinin daha düşük doğrulukta çalışmasına neden olan olumsuz bir özelliktir. Ayrıca, biyodizelin ve karışımlarının viskozitesi, sıcaklık düşürüldüğünde No.2 dizele göre çok daha hızlı artar. İstenmeyen bir yan ürün olan monogliseritlerin, soya metil esterinin viskozitesini önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür.

Yakıtın yüzey gerilimi ise, sprey atomizasyonunu, damlacık boyutunu ve yakıt spreyinin diğer özelliklerini etkilediği için önemli bir özelliktir. Bu değer, No.2 dizel için 100°C’de 22,5 dyne/cm ’dir. Ve kolza yağı metil esteri için ise, 100°C’de 25,4 dyne/cm olarak ölçülmüştür (Graboski ve McCormick 1998).

Bir yakıtın düşük sıcaklıklardaki akış özelliği, o yakıtın soğuk hava şartlarında kullanılmasını etkileyen en önemli özelliktir. Soğuk havadaki kullanılmasında temel akış özelliklerini etkileyen en önemli faktörler, o yakıtın bulutlanma ve akma noktasıdır. Bulutlanma noktası, yakıt filtresinin mum oluşumu tarafından tıkanmaya başladığı sıcaklıktır. Yakıt soğutulduğunda ilk mum oluşumunun gözlemlendiği sıcaklık olarak ölçülür. Akma noktası ise, yakıtın jelleşme noktasının bir ölçümüdür. Bu sıcaklık, yakıtın yakıt pompasından artık pompalanamadığı sıcaklıktır. Akma noktası, her zaman bulutlanma noktasından daha düşüktür. Bulutlanma noktası genellikle, akış iyileştirici olarak bilinen katkı maddelerinden etkilenmez. Bu akış iyileştirici katkı maddeleri, yakıtın soğuk hava şartlarında mumlaşarak kristallenmesini engeller ve dolayısıyla mum tıkanıklığının bir sorun haline geldiği sıcaklığı düşürür. Akış iyileştiriciler, yakıtın jelleşme sıcaklığını da düşürücü etki gösterirler. Kış aylarında No.2 dizel yakıtının, Kuzey Amerika’da kış akış özelliklerini iyileştirmek için No.1 dizel ya da karosen ile inceltmekte ve de yakıtın bulutlanma ve akma noktaları bölgesel iklim şartlarına karşı rafinerilerde değiştirilmektedir. Tüm biyodizeller, No.2 dizelden 20-25 °C daha yüksek bulutlanma ve akma noktasına sahiptir. Bu da, biyodizellin dizele karşı avantajlarından biridir (Çetinkaya ve diğ. 2004).

Biyodizelin doymamışlık oranı, zincir uzunluğu ve zincirin dallanma derecesi, donma noktasını etkileyen yapısal özellikleridir. Yüksek oranda doymuş iç yağ esterleri, soya ve kolza gibi bitkisel yağ esterlerinden daha dezavantajlıdır. Soya ve kolza metil esterlerinin ortalama bulutlanma noktaları yaklaşık 0°C ila 5°C arasında ve akma noktaları ise, -4°C ila -10°C arasında seyir etmektedir. İç yağ metil esterleri ise, yaklaşık olarak 14°C'lik bulutlanma noktasına ve 10°C'lik akma noktasına sahiptirler. Zincir uzunluğunun, doymamışlık derecesinin ve zincirin dallanma yoğunluğunun etkisinin bulutlanma ve akma noktalarına etkisi göz önünde bulundurularak, biyodizel üretiminde düşünülmelidir. Bu öneriyi destekleyen bir çalışmada ise, iso-propil esterlerinin metil, etil ya da bütül esterlerinden daha iyi soğuk akış özelliklerine sahip olduğu gözlenmiştir. Zincir uzunluğunu azaltmak veya zincir dallanmasını arttırmak, yakıtın soğuk akış özelliklerini iyileştirici etki göstermektedir.

Zincir uzunluğu ve dallanma derecesi; bitki yetiştiriciliği, genetik mühendisliği yaklaşımları ve ayrıca biyodizelin kimyasal süreci sayesinde ikili bağları bölmek ya da dallanmış izomerler oluşturmakla iyileştirilebilir. Ancak bugüne kadar kimyasal süreç alanında çok az araştırma yapılmıştır. Biyodizelin soğuk akış özellikleri, araştırma yapılması oldukça önemli ve ihtiyaç olan bir husustur. No.1 dizel ve No.2 dizel ile soya ve iç yağ alkil esterlerinin karışımlarında, karışımın ester miktarı arttıkça bulutlanma ve akma noktalarında da artış gözlenmiştir (Graboski ve McCormick 1998). Her iki durumda da kimyasal yapısına uygun olarak iç yağ esterleri, soya esterlerine göre daha kötü özellik gösterirler.

Yakıtların soğuk akış özellikleri, akış iyileştirici katkı maddeleri ile iyileştirilebilir. Bu katkı maddeleri, mum oluşumunu önlemez, yani bulutlanma noktasını değiştirmez; ama küçük mum kristallerinin büyümesini ve birleşmesini engeller. Böylece, akma ve soğuk filtre tıkanma noktası etkilenmiş olur. Akış iyileştirici katkıları, özellikler kış aylarında kullanılması için ticari biyodizel yakıtları ve karışımları için gerekli olan maddelerdir (Graboski ve McCormick 1998).

4.1.3. Emniyet ve çevre yönetmeliği

Biyodizelin emniyet ve çevre yönetmeliği hakkındaki aşağıdaki bilgiler, K.S. Tyson'nın 2001 yılına ait NREL/TP-580-30004 no'lu "Biodiesel Handling and Use Guidelines" eserinden derlenmiştir.

Bileşimi: Biyodizel, tehlikeli değildir, tehlikeli madde içermez. Biyodizelin yağ asidi metil ester eşitleri 12 ve 22 karbonlu zincir uzunlukları arasında değişir. Daha çok 18 karbonlu zincir uzunluğu yaygındır. Yakıtsal değerleri ise yakıt kalite standart değerleri içinde olmalıdır.

Teneffüs etme: Biyodizel ısıtılıp buharlaşmadıka teneffüs etme açısından bir tehlike içermez. Buhar ve ince duman materyali, sinir sistemine etki ederek sinirlilik hali, baş dönmesi ve mide bulantısına sebep olabilir. Bu belirtiler görüldüğü zaman, temiz havaya çıkıp derin nefes alınmalıdır.

Göz ile teması: Biyodizelin göze teması halinde en az 15-20 dakika su ile yıkanmalıdır. Beklenmedik bir etki halinde derhal tıbbi müdahale gerekmektedir. Göze sıçrama ve buharına karşı emniyet gözlükleri, koruyucu gözlükler veya yüz koruyucuları ile korunması tavsiye edilir.

Yutma: Biyodizelin toksinsiz ve tehlikesiz olmasına karşın, şayet yutulursa 1-2 bardak su içilmelidir. Yutmadan dolayı mide semptomları görülürse, tıbbi müdahaleye başvurulur. Bu durumdaki bilinçsiz kişiye asla ağızdan bir şey verilmez. Müshil ile benzer etki gösterir. Ağızdan alma durumunda öldürücü dozun alt sınırı, vücut ağırlığı başına 17,49 g 'dır. Sofra tuzu ile karşılaştırılırsa, NaCl 10 kat daha toksiktir.

Cilt tahrişi: İnsan cildi üzerinde 24 saatlik uygulanan testte sulandırılmamış biyodizelle meydana gelen çok az tahrişin, %4'lük sabun-su karışımının meydana getirdiği tahrişten daha düşük derecede olduğu görülmüştür. Eğer biyodizelin cildi tahrişi söz konusu ise, su ve sabun ile yıkanır. Yakıt sıcak iken, yanma tehlikesinden

dolayı temas etmeyiniz. Cilt ile teması engellemek için PVC kaplı eldiven giymek önerilir. Cilt, sık sık yumuşatılmalıdır.

Biyolojik indirgenebilme: Biyodizel, petrol kökenli dizelere göre 4 kat daha hızlı indirgenebilir. Saf biyodizel, suyun içinde 28 günde %85-88 oranında indirgenir. Glikozun bir formu olan dekstroz da aynı oranda indirgenir. Dizel ile karıştırılmış biyodizel karışımlarında biyolojik indirgenme dizelere oranla hızlanır. Örneğin, %20'lik biyodizel karışımı yakıt, No.2 dizelere göre 2 kat daha hızlı indirgenir.

Parlama noktası: Biyodizel yakıtlarının parlama noktası 65,6°C, dizelinki ise 51,7°C civarındadır. Testlerde biyodizel karışımlarının parlama noktasının artmasının, karışımın yüzdelik oranının artmasıyla ilgili olduğu görülmüştür. Bu nedenle, biyodizel ve dizel-biyodizel karışımlarının depolanması ve taşınması daha güvenli ve petrol kökenli dizelden daha kullanışlıdır.

Taşıma ve depolama: Depolama hususunda, depo sıcaklığının 10 ila 48,9°C arasında olması ve deponun kuru ve temiz olması gerekli ve önemlidir. Oksitleyici maddelerden uzak tutulmalı, aşırı ısı ve tutuşma kaynaklarından ve güneşten korunmalıdır. Taşıma hususunda ise, bidon veya kapta delik, kayma veya sürüklenme olmamasına dikkat edilmeli, bidon ya da kap basınçlı olmamalıdır.

4.1.4. Biyodizel standartları

Biyodizel, petrol kökenli dizel yakıtın alternatifi olduğundan ikisi arasında karşılaştırma yapabilmek için dizel yakıtı standartlarını da bilmek gerekir. Dizelde de biyodizelde olduğu gibi Amerika ve Avrupa standartları bazı farklılıklar içermektedirler (bkz. Tablo 4.1). Ve yıllar geçtikçe teknolojik gelişmeler doğrultusunda standartlarda eklemeler ve düzeltmeler yapılarak revize edilmektedir. Örneğin, kükürt için, 1996 hedefi en çok %0.05 (500 ppm), 2000 hedefi 350 ppm, 2005 hedefi 50 ppm ve 2009 hedefi ise 10 ppm olarak konulmuştur. Setan sayısı da 2000 yılında 40'dan 51'e yükseltilmiştir.

Biyodizelin tüm dizel motorlu sistemlerde uzun süreler boyunca sorunsuz bir şekilde kullanılabilmesi için, yüksek yakıt kalitesinde olması, yani standartlara uyması gerekmektedir. Çünkü, dizel motorlu araçlarda yeni bir dizel yakıt püskürtme sistemi olarak kullanılmaya başlanan “common rail” sistemi, “kütük” olarak adlandırılan dağıtıcı bir enjektör sisteminden yakıtı her silindirin ihtiyacı kadar gönderen yeni bir teknolojidir. Bu sistem, silindirlere yüksek basınçla gönderdiği yakıtın kalitesi açısından çok hassas olmayı gerektirir. (Anonim 4, 2006)

Tablo 4.1. Avrupa (EN 590) ve Amerika (ASTM D 975) dizel yakıt standartları.

Özellik	ASTM D 975:2005				EN 590:2003	
	ASTM Metot	Birim	No.2 Dizel	No.1 Dizel	Test metodu	No.2 Dizel
Alevlenme noktası	D 93	°C (en az)	52	38	ISO 2719	55,0
Su ve Kalıntı (tortu)	D 2709 D 1796	mg/kg (en çok)	200 10	200 10	D 1744	200 24
Viskozite (40 °C)	D 445	mm ² /s	1,9 – 4,1	1,3 – 2,4	ISO 3104	2,0–4,5
Sülfat külü	D 482	Kütlesel % (en çok)	0,01	0,01	EN 26245	0,01
Kükürt	D 2622	Kütlesel % (en çok)	0,5	0,5	EN 24260	0,2
Bakır korozyonu (50 °C, 3 saat)	D 130	-	No.3	No.3	ISO 2160	No.1
Setan sayısı	D 613	(en az)	51	51	ISO 5165	51
Karbon kalıntısı(%10)	D 524	Kütlesel % (en çok)	0,15	0,15	ISO 10370	0,30

Biyodizel için Avusturya’da ÖN C 1190 Standardı, Almanya ve diğer Avrupa ülkelerinde EN 14214 Standardı kullanılmakta olup, A.B.D. ’de ise ASTM (American Society of Testing Materials) tarafından ASTM D 6751 standardı ile özellikleri belirlenmiştir. Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’de verilen Avrupa ve Amerika standartlarında da görüldüğü gibi bu standartlarda bazı farklılıklar vardır. Örneğin, Avrupa biyodizel standardında alkol içeriği mevcut iken, Amerikan standardında ise,

eğer biyodizelde atık alkol varsa zaten bunun alevlenme noktasında kendisini göstereceği gerekçesiyle belirtilmemiştir (Şanlı, 2005).

Tablo 4.2. Avrupa Biyodizel B100 Standardı. (EN 14214:2005)

Özellik	Test Metodu	Limit	Birim
Ester içeriği	EN 14103	en az 96,5	Kütleli %
Yoğunluk (15 °C)	EN ISO 3675 / EN ISO 12185	860–900 (en az-en çok)	kg/ m ³
Viskozite (40 °C)	EN ISO 3104	3,5–5,0 (en az-en çok)	m m ² /s
Alevlenme noktası	ISO / CD 3679	en az 101	°C
Kükürt	EN ISO 20846	en çok 10,0	mg/kg
Karbon kalıntısı (%100)	EN ISO 10370	en çok 0,3	Kütleli %
Setan sayısı	EN ISO 5165	en az 51,0	-
Sülfat külü	ISO 3987	en çok 0,02	Kütleli %
Su	EN ISO 12937	en çok 500	mg/kg
Toplam kirletici	EN 12662	en çok 24	mg/kg
Bakır korozyonu (50°C, 3 h)	EN ISO 2160	No.1	-
Oksitlenme kararlılığı (110°C)	EN 14112	en az 6	saat
Asit değeri	EN 14104	en çok 0,5	mgKOH/g
Linoleik asit alkil esteri	EN 14103	en çok 12	Kütleli %
Doymamış alkil esteri	-	en çok 1	Kütleli %
Alkol içeriği	EN 14110	en çok 0,2	Kütleli %
Monoglisericid içeriği	EN 14105	en çok 0,8	Kütleli %
Diglisericid içeriği	EN 14105	en çok 0,2	Kütleli %
Triglisericid içeriği	EN 14105	en çok 0,2	Kütleli %
Serbest gliserol	EN 14105	en çok 0,02	Kütleli %
Toplam gliserol	EN 14105	en çok 0,25	Kütleli %
Bazik metaller (Na+K)	EN 14108 / EN 14109	en çok 5	mg/kg
Fosfor içeriği	EN 14107	en çok 10	mg/kg

Tablo 4.3. Amerikan Biyodizel B100 Standardı. (ASTM D 6751:2005)

Özellik	ASTM Metot	Limit	Birim
Alevlenme noktası	D 93	en az 130	°C
Su	D 2709	en çok 500	ppm
Tortu	D 2709	24	mg/kg
Kinematik viskozite (40 °C)	D 445	5,0	m m ² /s
Sülfat külü	D 874	en çok 0,02	Kütleli %
Kükürt	D 5453	en çok 0,05	Kütleli %
Bakır korozyonu (50°C, 3 h)	D 130	en çok No.3	-
Setan sayısı	D 613	en az 51	-
Bulutlanma noktası	D 2500	Bölgesel	°C
Karbon kalıntısı (%100)	D 4530	en çok 0,05	Kütleli %
Asit Numarası	D 664	en çok 0,50	mg KOH/g
Serbest gliserol	D 6584	en çok 0,02	Kütleli %
Toplam gliserol	D 6584	en çok 0,24	Kütleli %
Distilasyon sıcaklığı (%95)	D 1160	en çok 360	°C

4.1.5. Biyodizel emisyonları

Biyodizel yakıt emisyonları, petrol kökenli dizel yakıt emisyonlarına nazaran gözle görülür bir farkla daha düşüktür. 20 kat daha az karbon monoksit çıktısı ve daha fazla serbest oksijen açığa çıkar. Biyodizelin emisyon karakteristikleri, petrol kökenli dizel ile karşılaştırıldığında biyodizelin her bakımdan daha çevre dostu olduğu görülmektedir.

Biyodizel emisyonlarında net karbondioksit (CO₂) emisyonlarında %50 azalma, kükürt dioksit (SO₂) emisyonlarında %100 azalma, hidrokarbon emisyonlarında %10-50 azalma, is emisyonlarında %40-60 azalma, karbon monoksit (CO) emisyonlarında %10-50 azalma, PAH, aldehitler, bempyren phenanthren gibi kanserojen maddelerde %100 azalma, dizel motorunun yaşına ve ayarına göre oksitlerde %5-10 artma veya azalma tespit edilmiştir (Tickell 2000).

Biyodizelin dizel yakıttan farklı olarak içeriğindeki %11 oranındaki oksijen miktarı ve dizelden yüksek setan sayısı, yanmanın çok daha iyi gerçekleşmesini ve is miktarının azalmasını sağlamaktadır.

Biyodizel kükürt bileşikleri içermediğinden hem sülfat ve SO₂ emisyonlarına neden olmamakta, hem de oksidasyon katalizörlerinin kullanımına imkan vermektedir. Böylelikle atık egzoz gazı içerisindeki zararlı maddeler azaltılmakta ve tipik kızarmış patates kokusu da giderilmektedir. Biyodizel katkısız olması ve doğal yapısı ile petrol kökenli dizelin aksine çok daha iyi bir biyolojik parçalanabilirlik performansı göstermektedir (Çildir 2003).

4.2. Dizel Yakıt Özellikleri ve Biyodizel ile Karşılaştırılması

Düz hidrokarbon zincirlerinden oluşan bir yakıt olan dizel, stabilitesini ve tutuşma kalitesini arttırmak amacıyla ön işlemlerden geçtikten sonra kullanıma sunulur. Bir başka ön işlem de, dizeli oluşturan parafın, soğukta kristalleşerek çöktüğünden, yakıt hattını ve filtreleri tıka sorunu engellemek için, düşük ısıda kullanım özelliği kazandırmaktır. Dizel yakıtın performansı, öncelikle tutuşma kalitesine bağlıdır. Dizelin ateşleme kolaylığını ve düzenli yanmasını “setan numarası (SN)” belirler. Düşük setan numaralı bir dizel, yanma hücrelerinde doğru noktada tutuşmadığından, kontrolsüz bir biçimde yanmaktan dolayı gürültüye ve motor içinde hasara yol açar (Çildir 2003).

Trigliseritler, ester değişimi yöntemi ile biyodizele dönüştürüldüğünde setan sayısı ve ısıl değeri biraz daha iyileşmesiyle birlikte çok büyük bir sorun olan yüksek viskozite değeri dizel yakıtına yaklaşıırken, uçuculuk değeri de iyileşme gösterir. Biyodizel, ana yakıt karakteristikleri açısından petrol türevi dizel yakıtı (D-2, motorin) oldukça benzerlik göstermektedir.

Biyodizelin petrol türevi dizelden en büyük farkı, yapısında kütle bazda %10-11 civarında oksijen içermesidir. Yapısındaki oksijen, biyodizelin ısıl değerini dizele oranla %10 düşürür. Bu nedenle biyodizel kullanımı durumunda, aynı çıkış gücünü alabilmek için daha fazla yakıt harcamak icap eder. Dizel yakıtı yapısında büyük

oranda hidrokarbon bileşikleri içerirken, biyodizel aromatik değildir (Graboski ve McCormick 1998).

Dizel yakıtlarının kükürt bileşiklerini içermesi, hem korozyona hem de partikül oluşumuna neden olduğu için istenmeyen bir durumdur. Dizel yakıtı çinko alaşımlı çelik depolarda saklarken çinko ile birleşerek korozif bazı bileşenler oluşturmaması için, çinko ile aktivitesinin az olması istenir.

Dizel yakıtının en önemli problemlerinden biri, yanma sonundaki kalıntı birikimidir, yani önemli ölçüde karbon ve kül içermesidir. Bu kalıntılar motorun içinde silindir yüzeylerinde, segman ve enjektörlerde biriktikleri için yakıttan olabildiğince uzaklaştırılmalıdır (Borat ve diğ. 1994).

Viskozite değerinin yüksek olması, yakıtın akışkanlığını azalttığından yakıtın iletim yollarında probleme ve enjektörden püskürtme bozukluklarına neden olur. Enjeksiyonda oluşan iri damlalar tam yanmayacağından egzoz gazları çok isli ve dumanlı olur (Borat ve diğ. 1994). Bu nedenle, yakıtın viskozitesinin düşük olması daha uygundur.

Motorda vuruntudan dolayı herhangi bir hasarın olmaması ve motor içinde biriken yakıtın vuruntuya neden olmaması için, dizel yakıtın kısa tutuşma gecikmesine sahip olması gerekir. Setan sayısı, yakıtın tutuşmaya yakınlığının bir göstergesidir. Tutuşma süresi ne kadar kısa olursa setan sayısı da o kadar yüksek olur. Ancak, setan sayısının 70'den yüksek olduğu durumlarda yakıtın is oluşumu arttığından en yüksek setan sayısı sınırı 70 olarak belirlenmiştir.

Özellikle hafif dizel yakıtları kapalı hacimlerde, deniz seviyesindeki sıcaklık ve basınçlarda daha kolay tutuşabildiğinden sıvı yakıt tankları üstünde patlayıcı bir ortam oluşturma tehlikesine sahip olduklarından alevlenme noktasının düşük olması tercih edilir. Ve yakıtın düşük sıcaklıkta buharlaşabilmesi, motorun ilk harekete geçebilmesi için daha makbuldür. Yakıtın buharlaşma özelliği azaldıkça kendi kendine tutuşma özelliği kötüleşir ve is miktarı da artar. Bu tür yakıtlar, motorun yakıt tüketiminin azalmasını sağlar (Borat ve diğ. 1994).

BÖLÜM.5. DENEYSEL MALZEME VE YÖNTEM

5.1. Malzemeler

Biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılan yağ, alkol ve katalizörün özellikleri üretilecek olan yakıtın özelliklerini doğrudan etkilediğinden bu özelliklerin gözden geçirilip dikkatli karar verilmesi bütün çalışmaya yön verecek önemli bir noktadır.

Bu araştırmada biyodizel üretiminde malzeme olarak kullanılan bitkisel yağ yerine kullanılmış restoran kızartma yağları, Kocaeli Saray Catering'den hediye edilmiştir. Enzim tutuklanması ve biyodizel yakıt üretimi, Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarındaki cihazlar ve kimyasallar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

5.1.1. Araştırmada kullanılan kimyasallar

Araştırmada kullanılan lipaz enzimi toz halinde, Novozymes (Danimarka)'dan tedarik edilen Novozym-435 ve Lipozyme-TL IM olup her iki lipaz enzimi de *Aspergillus niger* bakterisinden izole edilmiştir. Ticari enzim olduğundan deneylerde kullanırken herhangi bir saflaştırma işlemine gerek yoktur. Novozym-435 akrilik reçine üzerine tutuklanmış formdadır. Enzimin aktivite ölçümlerinde kullanılan 4-Nitrofenil Palmitat, 4-Nitrofenol ve protein ölçümlerinde kullanılan Commassie Blue G250 ve protein standartı olan Bovine Serum Albumin Merck Chemical Co. ve Sigma Chem. Ltd.'den temin edilmiştir.

Enzimin tutuklanması için kullanılan tutuklayıcı malzemeler olan dört farklı zeolit tipinden 13-x ve 5A Altek Metal Ticaret A.Ş. (Türkiye)'den, FM-8 ve AW-300 Zeochem EU ve Aldrich ürünü olarak tedarik edilmiştir. Diğer bir tutuklama malzemesi olarak kullanılan hidrotalsit ise Bölüm 5.2'de belirtildiği şekilde Kocaeli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Katalizör

Araştırma Geliştirme Laboratuvarında (KARGEL) özel olarak üretilmiştir. Analitik çalışmalarda kullanılan diğer bütün kimyasallar Merck AG (Darmstadt, Almanya) ve Sigma Chem. Ltd. (St Louis, USA)'den satın alınmıştır.

5.1.2. Araştırmada Kullanılan Cihaz ve Aletler

Biyodizel üretiminde katalizör olarak kullanılan lipaz enziminin aktivitesi ve protein değeri analizlerinde Lambda 35 model (Perkin Elmer Instrument) UV/VIS Spektrofotometre kullanılmıştır.

Yağ asidi metil esterlerinin analizi için 6890N model, 7694E Headspace Sampler ve Agilent 5973 Network Mass Selective dedektörlü GC-MS Gaz Kromatografisi (Agilent Technologies) kullanılmıştır. Kromatografik analizlerde yağ asidi metil esterlerinin ayırma işlemi için Agilent Technologies'den 122-3832 numaralı DB-35ms model, 0,25 mm * 0,25 µm * 30 m özelliklerinde silika kapileri kolon kullanılmıştır. Kolonda taşıyıcı gaz olarak 1,2 ml/dk. akış hızı ile kolondan geçirilen helyum gazı kullanılmıştır. Ayrıca diğer deneysel işlemlerde de 94960 model Sigma laboratuvar santrifüjü, en fazla 220 g, en az 10 mg kapasiteli Weighing Technology MonoBloc AB204-S hassas terazi, Polyscience sıcaklık kontrollü su banyosu, BINDER (Germany) marka etüv, ELGA Purelab Prima distile su cihazı, peristaltik pompa ve pH-metre kullanılmıştır. Ve kullanılan diğer laboratuvar aletleri aşağıda sıralandığı gibidir:

- Otomatik mikro pipet (10 µl, 200 µl, 1000 µl)
- Kapaklı ve kapaksız cam deney tüpü (15 ml)
- Manyetik karıştırıcı
- Mekanik karıştırıcı
- Teflon magnet (balık)
- Beher (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml)
- Erlen mayer (100 ml, 250 ml, 1000 ml)
- Mezür (10 ml, 25 ml, 40 ml, 100 ml, 250 ml)
- Spatül
- Koruyucu maske
- Eldiven

5.2. Deneysel Yöntem

Araştırmanın ilk safhasında lipaz enziminin tutuklanması çalışmaları ve optimizasyonu için tutuklayıcı malzeme tipi, tanecik boyutu ve tutuklanma sıcaklığı değiştirilerek toplam 120 adet deneme yapılmıştır. Bu çalışmada hidrotalsit ve dört farklı zeolit tipi, lipaz için tutuklayıcı malzeme olarak kullanılmıştır. En iyi sonuçları veren malzeme üzerine lipazın tutuklanma koşulları optimize edilmiş ve çalışmanın ikinci kısmı olarak 14 adet deney ile biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Bu çalışmaların detayı aşağıdaki başlıklarda verilmektedir.

5.2.1. Lipazın hidrotalsit üzerine tutuklanması

Biyodizel üretiminde katalizör olarak kullanılan lipaz enzimi hidrotalsit ve zeolitin 13-x, 5A, FM-8 ve AW-300 olmak üzere 4 ayrı çeşit zeolit üzerine tutuklanmış ve tutuklanma performansları denenmiştir. Parametre olarak tutuklayıcı malzeme tipi, tanecik boyutu ve tutuklama sıcaklığı değiştirilmiştir.

Önce lipazın tutuklanması için kullanılan hidrotalsit malzemesi aşağıda anlatıldığı gibi üretilmiştir: Lipazın tutuklandığı malzemelerden biri olan hidrotalsit, Tsyganok ve diğ. (2004) tarafından belirtildiği şekilde birlikte çöktürme yöntemi ile elde edilen sentetik Mg ve Al karışık oksitleridir. Hidrotalsit sentezinde birlikte çöktürme tepkimesi için, izolasyonlu ve otomatik sıcaklık ayarlı su banyosu, bir mekanik karıştırıcı, yukardan üç boyunlu cam küre tepkime kabı, peristaltik pompa ve bir de pH-metreden oluşan bir yarı kesikli tepkime sistemi kullanılmıştır.

300 cm³ saf su içinde iyice çözülerek hazırlanan Mg(II) nitrat (500 mM) ve Al(III) nitrat (167 mM) çözeltisi, 600 cm³ sulu 200 mmol Na₂CO₃ çözeltisine bir peristaltik pompa yardımı ile üç boyunlu cam küre tepkime kabının içine sıcaklık 60-61°C 'de sabit tutularak damla damla ilave edilmiştir. Birlikte çöktürme sırasında reaksiyon karışımı 500 rpm hızla mekanik bir karıştırıcı ile karıştırılmış ve pH 10'da sabit kalacak şekilde 1 M NaOH çözeltisi damla damla ilave edilmiştir. Mg(II) nitrat ve Al(III) nitrat çözeltisi ilavesi tamamlandıktan sonra oluşan süspansiyon, 1 saat boyunca 60°C 'de karıştırılmaya devam edilmiştir. Bir saat sonra karıştırma işlemi

bitince aynı sıcaklıkta karıştırma olmadan 18 saat boyunca dinlenmeye bırakılan renksiz beyaz katı süzöldükten sonra, saf su ile yıkanmış ve 80°C’de 16 saat kurutulmuştur. Kurutulan katı, 80-150-200-250 µm olmak üzere dört farklı boyutta elenerek 500°C’de 16 saat boyunca kalsine edilmiştir. Oluşan Mg ve Al karışık oksitlerin faz yapılarının belirlenmesi için XRD analizine gönderilmiş ve sonuçlar Ek D.1’de Şekil D.1 ve D.2 ile gösterilmiştir.

Parçacık büyüklüğü küçöldükçe yüzey alanı ve gözeneklilik artacağından lipaz enziminin adsorplanma kapasitesine ve ester değişimi verimine olan etkisini incelemek amacıyla tüm tutuklayıcı malzemeler, 80-150-200-250 µm olmak üzere dört farklı parçacık boyutunda elenmişlerdir. Eleme işleminden sonra lipaz enziminin malzemeler üzerine tutuklanması gerçekleştirilmiştir. Tutuklama işlemi için farklı boyutta hazırlanmış hidrotalsitten 0,2g tartılarak 2 ml lipaz (Lipozyme-TL IM) çözeltisi (2,5 mg/mL) ile 18 saat boyunca 4-25-37°C olan farklı tutuklama sıcaklıklarında, karıştırma olmadan cam deney tüpleri içine süspanse edilmiştir. Lipazın hidrotalsit üzerine tutuklanması için pH 8,5 olan 0,1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılmıştır. 18 saat sonunda elde edilen süspanسیون 10.000 rpm hızla santriföjlenerek çözelti ile tutuklanmış hidrotalsit kısmı ayrılmıştır. Hidrotalsit üzerine tutuklanmış lipazlar biyodizel deneylerinde kullanılmak üzere 4°C’de saklanmıştır. Santriföjlendikten sonra elde edilen sıvı ve katı kısmın protein içeriği ve lipaz aktivitesi Bölüm 5.2.3 ve 5.2.4’de anlatılan yöntemler ile hesaplanmıştır. Hesaplamalara ilişkin ham veriler Ek A’da verilmektedir.

Hidrotalsit ve zeolit çeşitlerinin tutuklama performanslarına bakıldığında hidrotalsit verilerinin zeolitlere göre daha iyi olması sebebiyle lipaz enzimini hidrotalsit üzerine en iyi performans ile tutuklayabilmek için, tutuklama koşulları optimize edilmiştir. Hidrotalsit üzerine tutuklama işleminde pH’ın tutuklanmaya etkisini tespit etmek için 0.1M fosfat tampon çözeltisi ayrı ayrı pH 6,0 ve pH 7,0 ve Tris-HCl tampon çözeltisi de pH aralığı 8,0, 8,5 ve 9,0 olmak üzere ayrı ayrı hazırlanmış ve ayrıca pH 5,0 olan asetat tampon çözeltisi de tutuklanma işlemi için denenmiştir. Bu deneylere ilişkin hesaplamaların sonucunda elde edilen ham veriler Ek B ve Ek C’de gösterilmektedir.

Tutuklanma süresinin lipazın hidrotalsit üzerine tutuklanmasına etkisini görmek için hazırlanan karışım yine karıştırma olmaksızın bekletildiği müddet boyunca eşit zaman aralıklarında küçük miktarlarla alınan sıvı örneklerinde Bölüm 5.2.3'te anlatıldığı gibi protein değeri ölçümleri yapılmıştır.

Tüm örneklerde tutuklanma işleminden sonra elde edilen hidrotalsit üzerine tutuklanmış lipaz, enzimin denatürasyonunu engellemek amacıyla soğuk saf su içerisinde yıkanarak varsa tutuklanmamış serbest enzim kalıntıları giderilmiştir. Son olarak yıkanan katı 10.000 rpm'de tekrar santrifüjlenerek biyodizel uygulamalarında kullanılmak üzere 4°C'de saklanmaya bırakılmıştır.

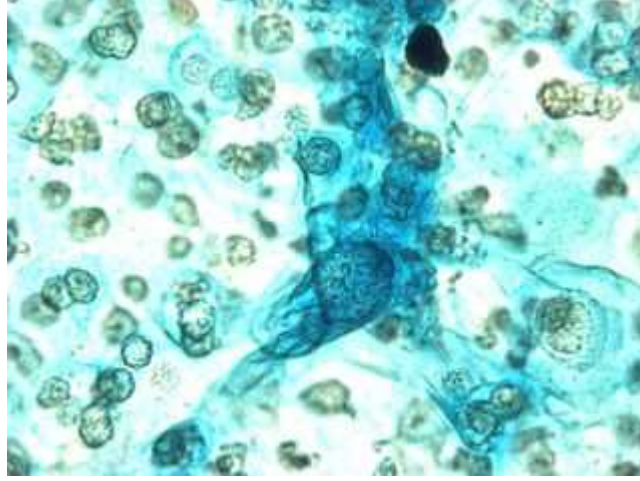
5.2.2. Lipazın zeolit üzerine tutuklanması

13-x, 5A, FM-8 ve AW-300 olmak üzere dört farklı zeolit tipi tutuklayıcı malzeme olarak denenmiştir. Uygulanan yöntem, Bölüm 5.2.1'de anlatılan hidrotalsit için uygulanan yöntem ile aynıdır; ancak birkaç küçük farklılık içerir. Farklı boyutlardaki dört ayrı zeolit tiplerinden 0,2 g tartılarak 2 ml lipaz (Lipozyme-TL IM) çözeltisi (2,5 mg/mL) ile 18 saat boyunca 4-25-37°C tutuklanma sıcaklıklarında, karıştırma olmadan cam deney tüpleri içine süspanse edilmiş ve lipazın zeolitlere tutuklanması için pH 7,0 olan 0,1 M fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır (Knezevic et al 1998). 18 saat sonunda elde edilen süspanسیون 10.000 rpm hızla santrifüjlenerek çözelti ile tutuklanmış zeolit kısmı ayrılmıştır. Elde edilen sıvı ve katı kısmın protein içeriği ve lipaz aktivitesi Bölüm 5.2.3 ve 5.2.4'de anlatılan yöntemler ile hesaplanmıştır. Zeolitler üzerine tutuklanan lipazlar biyodizel deneylerinde kullanılmak üzere 4°C'de saklanmıştır.

5.2.3. Protein tayini

Protein miktarları, Bovine Serum Albumin'in standart olarak alındığı Coomassie Blue G-250 ile bağlama yöntemi (Şekil 5.1) kullanılarak hesaplanmıştır (Spector 1978, Sedmark ve Grossberg 1977). Protein miktarına bakılacak olan çözelti ve Coomassie Blue G-250 ile hazırlanan Bradford çözeltisinden bire bir oranda alınan

miktarlar cam deney tüplerinde karıştırıldıktan sonra sonuçlar spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen veriler Ek A'da gösterilmektedir.



Şekil 5.1. Coomassie Blue G-250 ile boyanmış protein molekülleri.

Taşıyıcı tutuklama malzemesi üzerine adsorplanan protein miktarı, P_g (mg/g) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Knezevic ve diğ. 1998) :

$$P_g = (C_o V_o - C_f V_f) / w \quad (5.1)$$

Denklemden geçen C_o başlangıç protein konsantrasyonu (mg/ml); C_f süzüntüdeki protein konsantrasyonu (mg/ml); V_o lipaz çözeltisinin başlangıç hacmi (ml); V_f süzüntünün hacmi (ml); ve w ise taşıyıcı tutuklama malzemesinin ağırlığı (g)'dir.

Malzeme üzerine adsorpsiyon derecesi, Kolmogorov-Erofeev-Kazeeva-Avrami-Mampel (KEKAM) tepkime modeli ile aşağıdaki denklemle hesaplanmıştır:

$$\alpha = P_g / P_{g,m} \quad (5.2)$$

Denklemden geçen $P_{g,m}$ (mg/g), hidrotalsit ve zeolitler üzerine adsorplanmış en fazla protein miktarıdır (Knezevic ve diğ. 1998).

5.2.4. Enzimatik etkinlik tayini

Tutuklanmış ve tutuklanmamış serbest enzimin etkinlik tayini, 4-Nitrofenil palmitat'tan serbest kalan 4-Nitrofenol miktarının mikromol olarak ölçümü olarak tanımlanan Winkler and Stuckmann Yöntemi ile yapılmıştır (Kumar ve diğ. 2005). Bu yöntemde enzimatik reaksiyon karışımı toplam hacim 3 ml olmak üzere 75 µl 4-Nitrofenil palmitat çözeltisi (20mM), 5 µl enzim çözeltisi ve 2920 µl tampon çözeltisi (zeolitler için 0,1M fosfat tamponu pH 7,0 ve hidrotalsit için 0,1M Tris-HCl tamponu pH 8,5)'den oluşur. Bu karışım 45°C'lik su banyosunda 10 dakika boyunca bekletildikten sonra tepkimeyi durdurmak için -18°C'de 8 dakika bekletilmiştir. Enzim aktivitesinin ifade edildiği 1 IU (international unit), analiz koşullarında dakikada yağ parçalayarak 1 µmol serbest yağ asidi oluşumu için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanan bir birimdir (Knezevic ve diğ. 1998).

Ve tutuklanma işleminin verimi (%) aşağıdaki denklem ile hesaplanmaktadır:

$$\text{Verim (\%)} = [(E_o V_o - E_f V_f) / (E_o V_o)] * 100 \quad (5.3)$$

Denklemdaki E_o lipazın başlangıç aktivitesi (IU/ml); E_f tutuklanmadan sonra ölçülen lipaz aktivitesi (IU/ml); V_o enzim çözeltisinin başlangıç hacmi (ml); ve V_f ise tutuklanmadan sonraki süzüntünün hacmi (ml) olarak tanımlanır.

5.2.5. Atık kızartma yağı asidi metil esterinin üretimi

Ester değişimi tepkime karışımı, 9,65 g atık kızartma yağı, lipaz enzimi (ağırlıkça yağın 4%'ü) ve 1,4 g metanolden oluşmaktadır. Alkol:yağ molar oranı 4:1 olarak seçilmiştir (Du ve diğ. 2003). Tepkime karışımı, tepkime süresi boyunca 24°C (oda sıcaklığı) ve 37°C olmak üzere iki ayrı sıcaklık koşullarında tutulmuş ve magnetik karıştırıcı ile 200 rpm hızla karıştırılmıştır. Tepkime için 22-48-72-105 saat olarak denenen tepkime sürelerinden sonra, metil ester ile organik faz 10.000 rpm hızla santrifüjlenerek birbirinden ayrılmıştır (Şekil 5.2).

Tepkime süresi sonunda tepkime karışımının metil ester dönüşümü tespiti için metil ester içeriği gaz kromatografi yöntemi ile GC-MS (Agilent Technologies Model 6890N) ve DB-35ms kapilleri kolon (0.25 mm * 0.25 µm * 30 m; Agilent) kullanılarak ölçülmüştür. Taşıyıcı gaz olarak kullanılan helyum, kolondan 1,2 ml/dk akış hızı ile geçirilmiştir. Kolon sıcaklığı 190°C’de 0,5 dakika korunmuş, sonra dakikada 4°C artış hızı ile 300°C’ye kadar çıkartılmıştır. Analizlere ilişkin kromatogramlar Ek 5’te verilmiştir. Tepkimedeki metil ester verimleri, tepkenler ile ürünlerin ağırlık farkından hesaplanmıştır.



Şekil 5.2. Yemeklik atık yağlardan üretilen metil ester.

5.2.6. Yapılan deneylerde izlenen parametreler

Ester değişimi işlemi sırasında katalizör olarak kullanılan enzimin formatının, yani enzimin serbest ya da herhangi bir malzeme üzerine tutuklanmış olmasının, tepkimeye etkisinin açıklanması için hidrotalsit ve zeolit 13-x, 5A, FM-8 ve AW-300 olmak üzere toplam beş farklı taşıyıcı malzeme üzerine tutuklanma gerçekleştirilmiş, ve biyodizel üretiminde katalizör olarak kullanıldığında performansları ölçülerek serbest enzimin tepkimeye girdiği denemelerde elde edilen verim ile karşılaştırılmıştır.

Lipazın tutuklanması için değiştirilen parametreler, tutuklayıcı malzemenin tanecik boyutu, tutuklanmanın gerçekleştirildiği ortam sıcaklığı ve ortam pH'sıdır. Sentezlenen hidrotalsit ve zeolit tipleri ayrı ayrı 80-150-200-250 µm tanecik boyutunda elenerek, tutuklanma verimine etkisi gözlenmiştir. Tutuklanma sürecinde 4-24-37°C olmak üzere üç ayrı tepkime sıcaklığı denenmiş ve taşıyıcı malzeme üzerine adsorbe olan protein miktarı ölçülerek en optimum sıcaklık belirlenmiştir. Ayrıca, tutuklanma sürecinde pH 5-6-7-8-8,5-9 olmak üzere altı farklı ortamda enzimin tutuklanması denenerak en optimum pH belirlenmiştir. Lipaz enzimi pH 5,0'de hiç etkinlik göstermediğinden bu pH değeri elenerek optimizasyona diğer değer ile devam edilmiştir. 24°C, 37°C ve 45°C olmak üzere üç ayrı sıcaklık koşullarında sıcaklığın tutuklanma verimine ve enzimin tekrar kullanılabilirliğine etkisi de belirlenmiştir. Yapılan bu optimizasyon çalışmaları sonuçlarına göre enzimin etkinliğinin en iyi görüldüğü sıcaklık aralığında, yani 24°C'de (oda sıcaklığı) ester değişimi tepkimesinde denenerak metil ester dönüşümleri belirlenmiştir.

Biyodizel tepkimesinde ise 22, 48, 72 ve 105 saat tepkime süresi denenerak tepkime sonucu elde edilen metil ester dönüşümüne etkisi izlenmiştir. Ayrıca tutuklanmamış ve tutuklanmış ticari lipaz enzimi ile bu çalışmada elde edilen tutuklanmış lipaz enzimlerinin biyodizel tepkimesindeki verimleri de incelenmiştir.

BÖLÜM.6. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

6.1. Tutuklayıcı Malzemenin Cinsi ve Tanecik Boyutunun Tutuklanma Verimine Etkisi

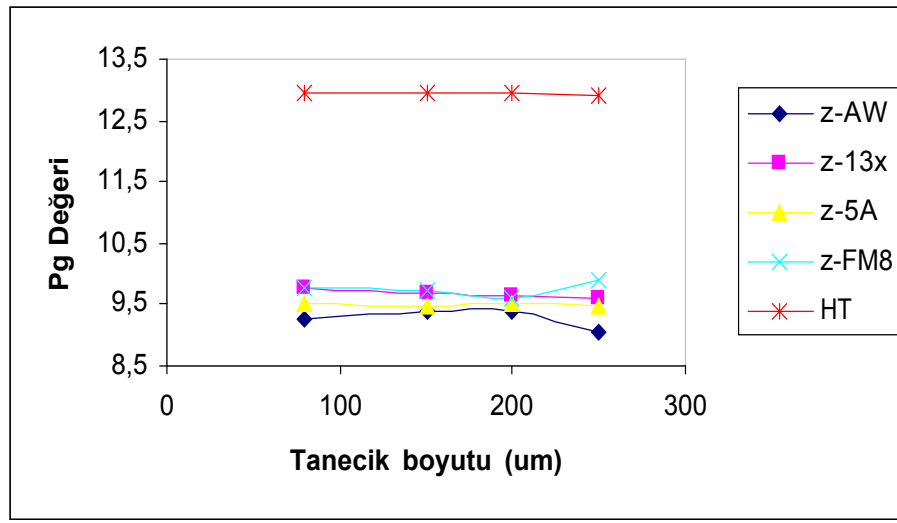
Süreç denetimi ve işlemlerinde sağladığı yararlarından dolayı endüstriyel enzim uygulamalarında büyük bir önemi olan enzimin tutuklanma işlemi, biyokatalizörlerin kararlılığının artırılması için kullanılan önemli bir yöntemdir (Bornscheuer ve diğ. 2002). Sentetik veya doğal polimerler, gözenekli cam, silika, zeolitler, seramikler, kaolinit gibi inorganik malzemeler gibi daha birçok farklı malzemeler de enzim tutuklanmasında kullanılabilir (Dumitriu ve diğ. 2003).

Bu çalışmada sistematik olarak sadece dört farklı zeolit cinsi ve hidrotalsit olmak üzere beş tip tutuklayıcı malzeme üzerinde çalışılmıştır. Literatürde zeolit ile enzim tutuklama denemesi çalışan birkaç araştırmacı vardır (Alfani ve diğ. 1994, Knezevic ve diğ. 1998, Peres ve diğ. 2005), ancak enzim tutuklama işlemi için hidrotalsit üzerinde herhangi bir detaylı çalışma bugüne kadar mevcut değildir. Araştırma sonuçları hakkında sağlıklı yorum yapabilmek için bu çalışmada kullanılan zeolit çeşitleri ve hidrotalsitin yapısal özellikleri ve kimyasal bileşimi Tablo 6.1’de verilmektedir.

Tablo 6.1. Çalışmada kullanılan tutuklayıcı malzemelerin özellikleri.

Malzeme	Tipi	Önemli Katyonu	Gözenek Çapı	Kimyasal Bileşimi
5A	A	Ca ²⁺	5 Å	Ca _{4.5} Na ₃ [(AlO ₂) ₁₂ (SiO ₂) ₁₂].30H ₂ O
13X	X	Na ⁺	10 Å	Na ₈₆ [(AlO ₂) ₈₆ (SiO ₂) ₁₀₆].276H ₂ O
AW-300	Mordenite	Na ⁺	4 Å	Na _{0.45} [(AlO ₂) _{0.57} (SiO ₂) _{0.45}].1,64H ₂ O
Zeocat FM-8	Mordenite	Na ⁺	3 Å	Na _{0.17} [(AlO ₂) _{1.10} (SiO ₂) _{0.17}].1,34H ₂ O
Hidrotalsit	-	Mg ²⁺ , Al ³⁺	-	Mg ₆ Al ₂ (CO ₃)(OH) ₁₆ .4H ₂ O

Hidrotalsit, yapısında $Mg(OH)_2$ katmanları bulunan tabakalı ve anyon değişimine elverişli bir yapıdır. Hidrotalsitin yoğunluğunu, diğer yapısal ve yüzey özelliklerini belirleyen faktör, Al^{+3} içeriğidir. Yapısındaki Mg^{+2}/Al^{+3} molar oranının 0,5-9,0 aralığında olması hidrotalsitin karakteristik bir özelliğidir. Al^{+3} iyonlarının artması sonucu Mg^{+2}/Al^{+3} molar oranının düşmesi ile hidrotalsitin anyon değiştirme kapasitesi artar (Nishida ve diğ. 2004, Di Cosimo ve diğ. 1998).



Şekil 6.1. Tanecik boyutunun tutuklanmaya etkisi.

Bu çalışmada dört farklı zeolit tipinin ve hidrotalsitin tanecik boyutunun tutuklanma üzerine etkisi incelenmiş ve karşılaştırmalı olarak Şekil 6.1’de gösterilmiştir. Tanecik boyutunun artması ile zeolitler ve hidrotalsit üzerine adsorplanan protein miktarlarının hemen hemen değişmediği şekilden de görüldüğü gibi, tutuklayıcı malzemenin tanecik boyutunun tutuklanmaya çok önemli bir etkisinin olmadığı söylenebilir. Yani, tutuklayıcı malzeme üzerine adsorplanan protein miktarı, protein moleküllerinin adsorplanacağı yüzey alanını arttırması sebebi ile malzemenin tanecik boyutundan çok, tanecik üzerindeki gözenek sayısı ve gözeneklerin çapı ile ilgilidir.

Hidrotalsitin adsorplanan protein miktarına göre dört farklı cins zeolitten daha etkin olduğu ve daha iyi performans gösterdiği görülmüştür. Hidrotalsit yapısındaki OH^- iyonlarının lipazın yapısındaki karboksil grupları ile daha kolay etkileşebilmesi,

yüzey üzerine adsorplanan protein miktarında hidrotalsitin daha etkin olmasının sebebi olabilir. Ayrıca, gözeneklilik arttıkça taneciğin yüzey alanının artmasına bağlı olarak yüzeye adsorplanan protein miktarı da artacağından; bu durum, hidrotalsitin gözenekliliğinin, zeolit cinslerinin ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu varsayımı ile açıklanabilir. Tutuklayıcı malzeme üzerine adsorplanan protein miktarı (P_g), hidrotalsitte 13 mg/g iken bu miktar zeolitlerde en fazla 9 mg/g olarak görülmektedir. En iyi tutuklanma verimi hidrotalsitte 95,8% iken zeolit çeşitlerinde bu verim sadece 56,1%'dir. Dolayısıyla, lipazın tutuklanması için hidrotalsit kullanılmasının daha kullanışlı ve daha avantajlı olduğu söylenebilir.

Zeolitler, AlO_4^- ve SiO_4^- bileşiklerinin oluşturduğu üç boyutlu tetrahedral kafes yapısı olan her birine oksijen atomu bağlı alüminasilikatların hidratlarıdır. Si/Al oranı, zeolitlerin önemli bir karakteristik özelliğidir. Zeolit kafes yapısındaki alüminyum fazlalığından dolayı oluşacak yük dengesizliği, zeolitlerin iyon değiştirme özelliği ile giderilir. Si/Al oranı arttıkça, zeolit yapısındaki pozitif iyon içeriği düşer, ısı kararlılığı artar ve yüzey seçiciliği özelliğinde ise hidrofobiklik derecesi artar (Tosheva 1999).

Katı yüzeye adsorplanma sırasında, enzim molekülleri yavaş yavaş bağlanma noktalarını açıp, protein segmentlerinden ayrılmaya başlarlar ve yüzey etkin merkezlerine doğru yönelirler. Fiziksel adsorpsiyon sırasında enzimin açıkta kalan etkin bölgeleri, zeolit üzerindeki etkin yüzeyle temas edince kilitleniyor olabilir. Enzimin zeolit üzerine tutuklanmasında, protein adsorpsiyonunun hidrotalsite göre daha düşük olmasının nedeni enzimin etkin bölgesindeki bu kilitlenme olabileceği gibi ayrıca şöyle de açıklanabilir: enzim moleküllerinin küresel yapıya benzer bir şekli olmasından dolayı, enzimin zeolit yüzeyi üzerinde adsorplanacağı mikro gözenek boyutları küçük ve dar geldiğinden enzimin gözeneklere girememesi sonucu bağlanma tam olarak gerçekleşmemiş olabilir. Bu da zeolit yüzeyi üzerine adsorplanan protein miktarını düşürücü etki yapmıştır. Enzimin zeolit yüzeyine fiziksel bağlanma ile adsorplanma gerçekleştiğinden kurulacak bağların zaten zayıf olması nedeniyle bağlanma sağlıklı bir şekilde gerçekleşmemiştir.

6.2. Tutuklanmanın Lipolitik Enzim Aktivitesine Etkisi

Tutuklanmadan önce ve sonra enzim etkinliğinin spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçümü (bkz. Bölüm 5.2.4) sonucunda hidrotalsit üzerine tutuklanmış enzimin aktivitesinin %200 arttığı ve zeolitler üzerine tutuklanmış enziminin ise %30 azaldığı görülmüştür. Tablo 6.2’de sadece bir örneği verilen verilerin tamamı Tablo A.2’de verilmektedir (bkz. Ek A).

Enzimin dış yüzeyi, tutuklayıcı zeolit malzemesinin yüzeyine bağlanırken hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar gibi düşük bağlanma enerjisi gerektiren kuvvetle bağlanır. Bütün bu etkileşimler, protein adsorpsiyonunun fiziksel adsorpsiyon olduğu yönündedir (Knezevic ve diğ. 1998). Fiziksel adsorpsiyon sırasında enzimin etkin bölgeleri zeolitin aktif bölgelerine kilitleyerek enzimin lipolitik etkinliğinde azalmaya neden olmuş olabilir.

Tablo 6.2. Tutuklanmanın enzimin lipolitik aktivitesine etkisi.

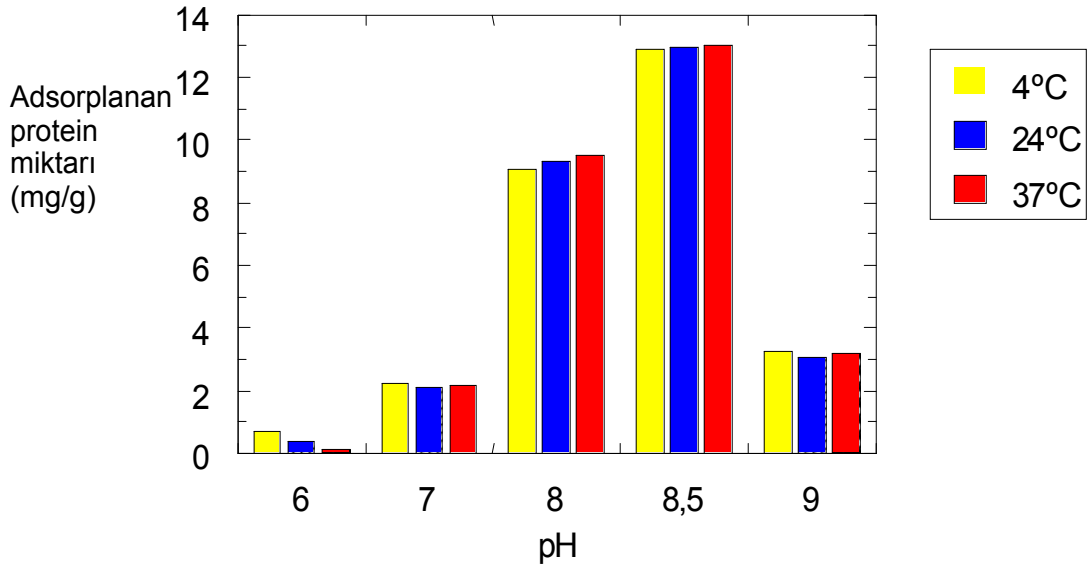
Enzim Şekli	Serbest Enzim Tris-HCl Tamp. Çöz.	Hidrotalsit Üzerine Tut.	Serbest Enzim Fosfat Tamp. Çöz.	Zeo-FM8 Üzerine Tut.
Aktivite (IU/dk.)	331,79	675,80	813,06	630,40

Hidrotalsit üzerine tutuklanmış enzimin daha yüksek aktivite göstermesinin nedenleri ise şöyle sıralanabilir: a) Lipaz molekülleri, hidrotalsit malzemesinin yüzeyi üzerinde çok iyi bir şekilde dağılmış ve substrat-protein etkileşimi en iyi şekilde oluşarak enzim etkinliğini kaybetmeden protein adsorpsiyonu gerçekleşmiştir; b) Lipaz moleküllerinin hidrofobik ortama doğru yönelişleri sayesinde tutuklayıcı malzemenin mikrogözenekleri içinde kolay bir şekilde kimyasal bağlanmanın gerçekleşmesi ile protein adsorplanması elverişli bir şekilde sağlanmıştır; c) OH⁻ iyonunca zengin olan hidrotalsit yüzeyi enzimin karboksil grupları ile kimyasal bağ oluşturarak daha fazla miktarda enzimin tutuklanmasını sağlamıştır.

6.3. Ortam pH'inin ve Sıcaklığın Tutuklanma Verimine Etkisi

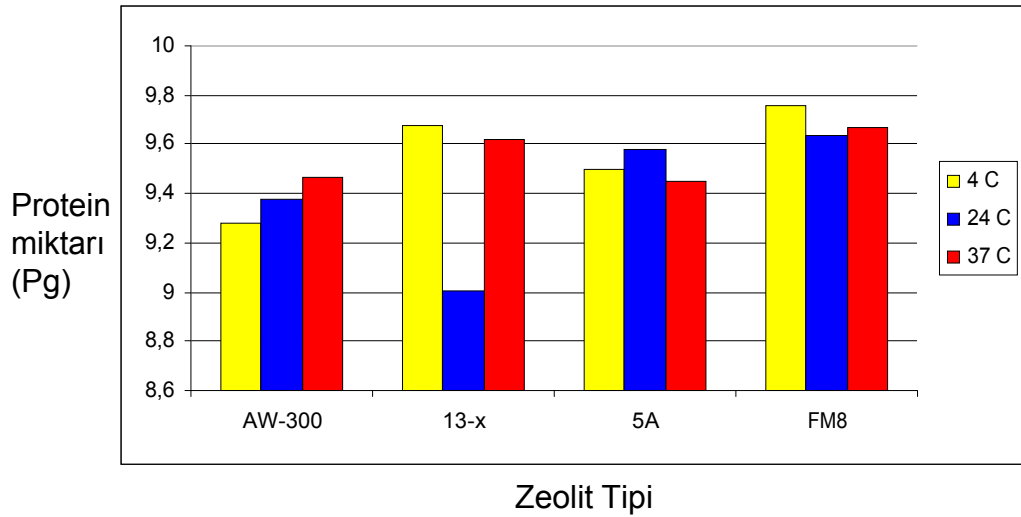
Şekil 6.2'de lipazın hidrotalsit üzerine tutuklanma işleminde pH ve sıcaklığın etkisi ve Şekil 6.3'de ise zeolit tipleri üzerine tutuklanmaya sıcaklığın etkisi gösterilmektedir. Hidrotalsit üzerine adsorplanan en yüksek protein miktarı 13 mg/g, ortam pH 8,5 olduğunda elde edilmiştir, bu değer de lipaz enziminin etkinlik gösterdiği en uygun pH değeridir.

Şekil 6.2'ye bakıldığında ayrıca, sıcaklığın 4°C'den 37°C'ye yükselmesinin ne hidrotalsit ne de zeolit çeşitleri üzerine adsorplanan protein miktarını çok önemli boyutta etkilemediği görülmektedir. Sıcaklığa bağlı olarak adsorplanma mekanizmasının gerçekleşme hızının arttığı tahmin edilse de, sıcaklık artışının yüzey üzerine adsorplanan protein miktarını ciddi derecede etkilediği söylenemez.



Şekil 6.2. Sıcaklık ve pH'nın hidrotalsit üzerine tutuklanmaya etkisi.

Şekil 6.3'te de görüldüğü gibi tutuklanma sıcaklığının değişmesi ile farklı zeolit tipleri üzerine adsorplanan protein miktarını en fazla 0,4 mg/g miktarında değiştirmiş olması, sıcaklığın zeolit üzerine tutuklanmasına çok etkisinin olmadığını gösterir.



Şekil 6.3. Sıcaklığın zeolit tipleri üzerine tutuklanmaya etkisi.

6.4. Sıcaklığın Tekrarlanan Kullanımlarda Tutuklanmış Lipazın Kararlılığına Etkisi

Lipazın etkinlik ölçümlerinde inkübasyon sıcaklığı önce 55°C'deki su banyosunda denendiğinde hidrotalsit üzerine tutuklanmış lipazın tekrarlanan kullanımlarında etkinliğinin kararlılığını oldukça kaybettiği görülmektedir (bkz.Tablo 6.3). Bu etkinlik azalmasının sebebinin lipaz enziminin en iyi etkinlik gösterdiği sıcaklık aralığı olan 30-40°C'nin aşılmış olması nedeniyle sıcaklığın arttırılması ile lipaz enziminin protein yapısında bozulmalar olabileceği göz önüne alınarak bu inkübasyon sıcaklığının aşamalı olarak önce 45°C'ye sonra da 30°C'ye düşürülmesi uygun görülmüştür. 45°C'deki su banyosunda denenen etkinlik ölçümlerine göre enzimin tekrarlanan yedinci kullanımı sonunda etkinliği 55°C iken %14 olan enzimin kararlılığının %36'ya yükseldiği görülmüştür. Daha sonra aynı işlem bu sefer 30°C'deki su banyosunda denendiğinde enzimin etkinliğinin yedinci kullanım sonunda %38 korunduğu görülmüştür. Bu sonuçlar Tablo 6.3'de verilmektedir.

Hidrotalsit üzerine tutuklanmış lipazın her kullanımında yeni substrat (4-Nitro fenil palmitat) kullanılmıştır ve tutuklanmış lipazın ilk kullanımında ölçülen etkinliği %100 olarak kabul edilerek diğer değerler hesaplanmıştır. Bu çalışma sonucu hidrotalsit üzerine tutuklamada elde edilen bu sonuçların, Knezevic ve arkadaşlarının

(1998) 37°C’de zeolit üzerine yaptıkları denemede yedinci kullanım sonunda elde ettikleri %10,5’lik etkinlik oranından çok daha iyi değerlerle sonuçlandığı görülmektedir.

Tablo 6.3. Tekrarlanan kullanımlarında tutuklanmış enzimin kararlılığı.

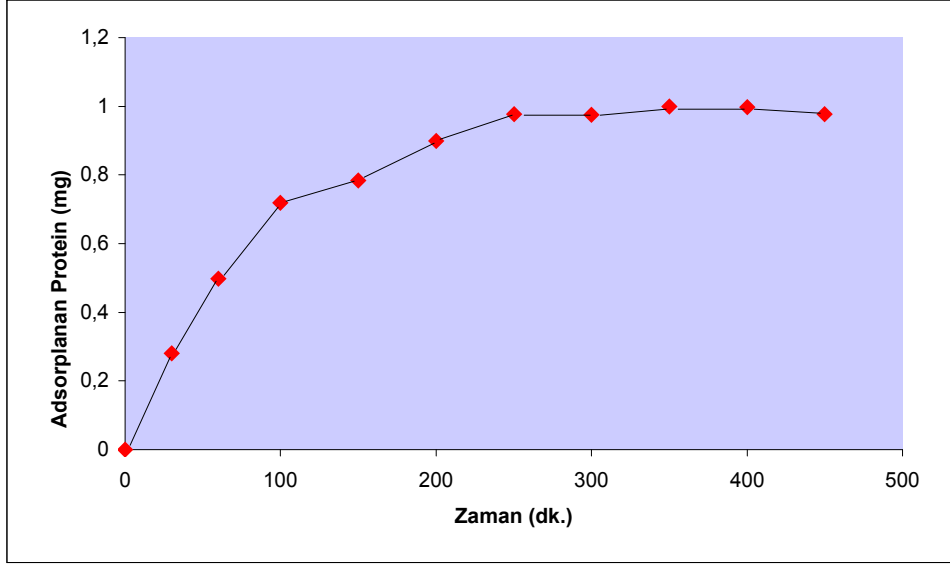
Kullanım No.	Bağıl Etkinlik		
	30°C	45°C	55°C
1	100	100	100
2	91	90	64
3	74	72	50
4	67	66	40
5	58	55	30
6	51	49	22
7	38	36	14

Hidrotalsit üzerine tutuklanmış lipaz 30°C ve 45°C’de iki kez kullanıldığında ilk etkinliğini %9-10 oranında kaybeder. Üçüncü kullanım sonunda, 55 °C’de etkinliğini %50 korumuşken, 45°C ve 30°C’de bu oran %70’in üzerinde kalmıştır. Ve 30-45 °C’lerde yedi kullanım sonunda ise orijinal etkinliğini %36-38’ini koruyabildiği deney sonuçlarında kanıtlanmıştır. 55°C ise, enzim ilk kullanım sonunda aktivitesinin yaklaşık %40’ını kaybetmiş ve yedinci kullanım sonunda sadece %14 oranında etkinlik gösterebildiği görülmüştür. Bu sonuçlara göre enzimin hidrotalsit üzerine tutuklanmış formatında tekrar tekrar kullanabilmek için 30-45 °C sıcaklık aralığı, enzimin orijinal etkinliğini %70’in altına düşmeden kullanılabilceği ilk üç kullanım için oldukça uygundur.

6.5. Tutuklanma İşlemi Süresinin Tutuklanma Verimine Etkisi

Tutuklayıcı malzeme üzerine protein adsorpsiyonunun zamanın bir fonksiyonu olduğu Şekil 6.4’de görülmektedir. Bu kinetik eğri, artış kısmı ve dengeye ulaştığı

kısım olmak üzere iki kısma ayrılır. Knezevic ve diğ. (1998) grafikte de gözlenen bu artış kısmını, adsorpsiyonun hızlı ve adsorplanan protein miktarının zamanla orantılı olarak yükseldiği şeklinde açıklar. Enzimin hidrotalsit üzerine tutuklanması yaklaşık 5 saat içerisinde yatışkın duruma gelerek kararlılık göstermektedir.



Şekil 6.4. Zamanın 4°C’de hidrotalsit üzerine tutuklanmasına etkisi.

6.6. Enzim Formatının Yağ Asidi Metil Ester (YAME) Dönüşümüne Etkisi

Katalizör olarak kullanılan hidrotalsit ve zeolitler üzerine immobilize edilen lipazın (Lipozyme IM) etkinliği, yemeklik atık yağ ile metanolün ester değişimi tepkimesine girmesi sonucu metil ester dönüşümünü etkileyen en önemli faktördür. Bu çalışmada ester değişimi için tepkimedede kullanılan yemeklik atık yağın serbest yağ asidi içeriği %1,05 ve asit değeri 2,1 mgKOH/g olarak KOU Alternatif Yakıtlar Araştırma Geliştirme Birimi (AYARGE) ’nde ölçülmüştür. Bu 2,1 mgKOH/g olan yağın asit değeri, alkali katalizörlü bir ester değişimi tepkimesi için bir yağın yeterli olduğunu ifade eden limitin (%1) üzerindedir. Yemeklik atık yağın yağ asidi içeriği standart bir titrimetrik metot (A.O.C.S. Official Test Method Cd 3a-63, Free Fatty Acid Standard Method) ile hesaplanmıştır.

Bu çalışmada araştırılan tepkime sıcaklığı ve süresi, enzim formatı (tutuklanmış olup olmaması) ve malzeme tipi atık yemeklik yağ ile metanolün kullanıldığı ester değişimi tepkimesi için değiştirilen parametrelerdir. %95 olan en yüksek metil ester dönüşümü, serbest Lipozyme-TL IM enziminin oda sıcaklığında gerçekleşen 105 saatlik tepkime sonucu elde edilmiş bir sonuçtur. Tepkimelerin verimi, GC kromatogram sonuçlarındaki dönüşen YAME oranlarına göre hesaplanmıştır.

OH- iyonunca zengin olan hidrotalsit yüzeyi enzimin karboksil grupları ile kimyasal bağ oluşturarak daha fazla miktarda enzimin tutuklanmasını sağlayarak alkol molekülleri için bir “su deposu” gibi davranırlar, çünkü polar çözücü olan alkol molekülleri hidrojen bağları ile bağlanabilecekleri polar yüzeye doğru yönelme gösterirler. Malzeme yüzeyine kolayca tutunan enzim, metil ester dönüşümünde de etkinliğini en iyi şekilde göstermiştir. Lipozyme-TL IM serbest enzimin hidrotalsit üzerine tutuklanmış formunda kullanıldığında, %95’lik verimden biraz düşük olan %92,8 oranında verim elde edilmiştir. Bununla birlikte tepkimede kullanılan enzim miktarı açısından karşılaştırsak, hidrotalsit üzerine tutuklanmış enzim tepkimeye serbest enzim kullanıldığı miktardan daha az değerde girmesine rağmen serbest enzimden daha fazla enzim etkinliği gösterdiği görülmektedir. Bunun nedeni, tutuklayıcı malzeme olarak kullanılan hidrotalsitin de ester değişimi tepkimesinde katalizör olarak etkin bir rol oynaması olabilir.

Deneylede üretilen biyodizellerin yağ asidi metil ester profilleri, Tablo 6.4’de gösterilmektedir. Diğer yandan zeolit-FM8 üzerine tutuklanmış enzim kullanıldığında metil ester dönüşümü hiç görülmediği ve ticari akrilik reçine üzerine tutuklanmış enzim olan Novozyme-435, aynı tepkime koşullarında olmasına rağmen metil ester dönüşümünün sadece %20 olduğu Tablo 6.4’te görülmektedir (bkz. Tablo 6.4). Bu biyokatalizörlerden tutuklayıcı malzeme olarak zeolit-FM8 kullanılan enzimde etkinlik görülmemesinin nedeni, tutuklanma işlemi sırasında fiziksel bağlar oluşurken lipaz enziminin substrat ile bağlanması gereken aktif bölgelerinin bloklanması veya yapısında konformasyonel değişikliklerin oluşması olabilir. Akrilik reçine üzerine tutuklanmış ticari enzim kullanıldığında ise metil ester dönüşümünün sadece %20 olarak kalmasının nedeni ise, tutuklayıcı malzeme olan akrilik reçinenin ester değişimi tepkimesi için uygun olmayıp metil ester dönüşümünü yavaşlatıcı

olumsuz bir etki göstermesi olarak söylenebildiği gibi, bu malzemenin ticari olması nedeniyle tutuklu bulunan lipaz enziminin miktarının tam olarak bilinmemesi sonucu enzim içeriğinin hazırlananlardan daha az olduğunun tahmin edilmesi olabilir.

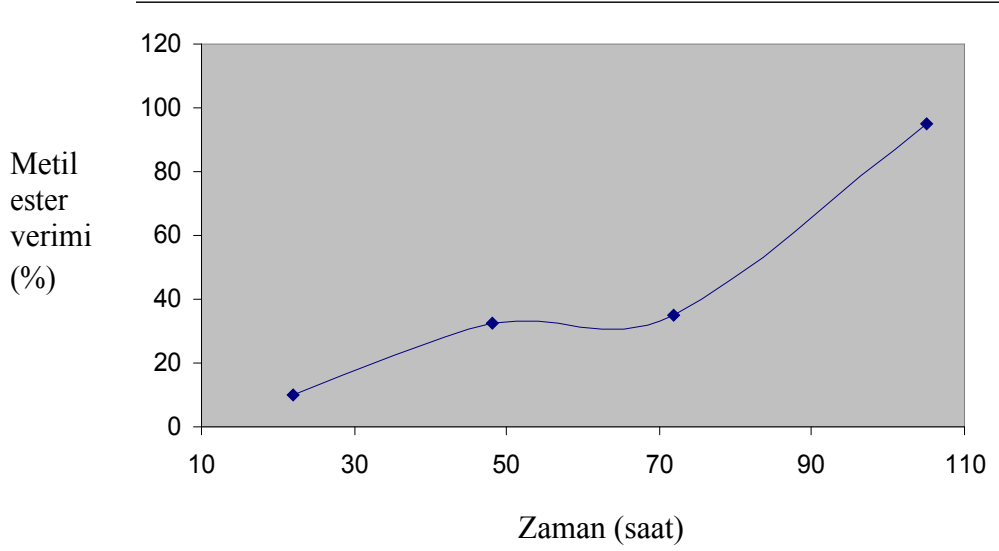
Tablo 6.4. Üretilen biyodizel örneklerinde YAME kompozisyonları.

Enzim	Enzim Miktarı (mg)	Verim %	YAME Adı	Yapısı ^a (Yağ asidi)	YAME (Wt %)
Tutuklanmış Hidrotalsit	5,0	92,8	Metil Miristat	14:0	0,4
			Metil Palmitat	16:0	9,0
			Metil Stearat	18:0	4,5
			Metil Oleat	18:1	69,7
			Linolenik asit ME	18:3	1,1
			Arahidik asit ME	20:0	1,0
			Diğer ME	Bilinmiyor	14,3
(serbest enzim)	386	95	Metil Miristat	14:0	0,9
			Metil Palmitat	16:0	18
			Metil Stearat	18:0	6,5
			Metil Oleat	18:1	57,8
			Linolenik asitME	18:3	1,3
			Arahidik asit ME	20:0	0,7
			Diğer ME	Bilinmiyor	14,8
Tutuklanmış FM-8	5,0	Dönüşüm yok	Metil Palmitat	16:0	0,04
			Metil Stearat	18:0	0,03
			Metil Oleat	18:1	0,6
Novozym 435 (akrilik reçine üzerine tutuklanmış lipaz)	386 (Akrilik reçine + Enzim)	20	Metil Miristat	14:0	0,4
			Metil Palmitat	16:0	9,9
			Metil Stearat	18:0	4,2
			Metil Oleat	18:1	6,9
			Linolenik asitME	18:3	0,4
			Arahidik asit ME	20:0	1,0

a: Karbon sayısı : çift bağ

6.7. Tepkime Süresinin Yağ Asidi Metil Ester Dönüşümüne Etkisi

Ester değişimi deneylerinde tepkime süresinin metil ester dönüşümüne etkisi, oda sıcaklığında (24°C) Lipozyme-TL IM serbest enzim kullanılarak 22-48-72-105 saat süreleriyle denenmiştir. Şekil.6.5'te görüldüğü gibi metil ester verimi, tepkime süresi uzadıkça artmakta olup, 105 saat sonunda %95 dönüşüm elde edilmiştir. Bu nedenle, yapılan diğer tüm ester değişimi deneyleri de 105 saatlik tepkime süresi üzerinde çalışılmıştır.



Şekil 6.5. Reaksiyon süresinin metil ester verimine etkisi.

BÖLÜM.7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Dünyadaki petrol rezervlerinin gün geçtikçe tükenmesi, petrol fiyatlarının her geçen gün yükselmesi ve zararlı egzoz gazlarından kaynaklanan çevre kirliliğinin artması nedenleriyle dizel motorlarda kullanılan petrol kökenli dizel yakıtın yerine kullanılabilir alternatif, kolay elde edilebilir, yenilenebilir ve çevre dostu yakıt araştırmaları oldukça yoğunlaşmıştır. Özellikle tarımsal potansiyelin yüksek olduğu ülkelerde bitkisel yağlardan elde edilen biyodizel yakıt ön plana çıkmıştır. Bir tarım ülkesi olan ülkemizde de bitkisel yağların yakıt olarak kullanılmasının mümkün hale getirilip ileride doğacak petrol krizlerinden ülkece etkilenmemeyi sağlayarak, biyodizel büyük bir potansiyel yakıt haline getirilmelidir.

Bu çalışmada yapılan deneylerde, hazırlanan hidrotalsit ve dört farklı tip ticari zeolit lipaz tutuklanmasında kullanılmış ve en iyi performans gösteren malzeme olan hidrotalsit üzerinde optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sıcaklık, pH, zaman ve parçacık boyutu parametrelerinin enzim etkinliği üzerindeki etkileri araştırılmıştır. En yüksek adsorplanan protein miktarının, pH 8,5 ve 4°C koşulları altında hidrotalsit üzerinde 13 mg/g değerinde olduğu ölçülmüştür. En yüksek tutuklanma verimi hidrotalsitte 95,8% iken, zeolit çeşitlerinde bu verimin sadece 56,1% değerinde kaldığı görülmüştür. Dolayısıyla, lipaz tutuklanması için tutuklayıcı malzeme olarak hidrotalsitin kullanılmasının daha kullanışlı ve avantajlı olduğu söylenebilir.

Ester değişimi tepkimesi sonunda enzimin tepkime ortamından geri alınımının kolay olması ve tekrar kullanımlarında avantaj sağlaması, enzimin bir malzeme üzerine tutuklanmasının en önemli artılarından biridir. Hidrotalsit üzerine tutuklanmış lipazın lipolitik etkinliği yedinci kullanım sonunda %36 olarak ölçülmüştür.

Hidrotalsit üzerine lipazın tutuklanma işlemi bu çalışmada hızlandırıcı faktör olarak herhangi bir karıştırma işlemi uygulanmadan gerçekleştirilmiş olup, tutuklanma olayının yatışkın duruma ulaştığı süre 5 saat olarak ölçülmüştür. Bu sürenin

kısalması için, ileriki çalışmalarda tutuklanma işlemi sırasında protein moleküllerinin hareketini kolaylaştırıcı bir karıştırma işlemi uygulanması önerilir.

Kullanılacak katalizörün lipaz enzimi olması, bu enzimin ticari olarak pahalı bir ürün olması sebebiyle biyodizel üretim maliyetini olumsuz yönde etkileyeceğinden, *Candida anartica* ya da *Aspergillus niger* gibi en bilinen lipaz üreticisi mikroorganizmaların bizzat kendisi tutuklayıcı malzeme üzerine tutuklanarak biyodizel üretiminde kullanılması çok daha verimli ve ucuz olacağından ileriki çalışmalar için uygulanabilecek bir yöntem olarak önerilir.

Lipaz enziminin hidrotalsit üzerine tutuklanma mekanizmasının belirlenmesi, gelecekteki çalışmalar için önem kazanabilir. Bu nedenle hidrotalsit malzemesinin gözenek yapısı ve yüzey alanı gibi fiziksel özelliklerinin tespit edilmesi önerilir.

Bu çalışmada tutuklayıcı malzemenin tanecik boyutunun yüzey üzerine adsorplanan enzim miktarına herhangi bir önemli etkisinin olmadığı görüldü ise de, biyodizel üretiminde ester değişimi sırasında tanecik boyutunun etkili olabileceği varsayımı ile farklı boyutlardaki malzemeler üzerine tutuklanmış enzim veya mikroorganizmanın kendisi ile biyodizel üretimi denenebilir ve metil ester dönüşümüne bir etkisi olup olmadığı bilimsel olarak kanıtlanabilir.

Bu çalışmada kullanılan atık yağın serbest yağ asidi miktarının düşük olması nedeniyle hazırlanan hidrotalsit üzerine tutuklanmış lipaz enziminin etkinliğinin serbest yağ asidi yüksek diğer atık yağlarda da araştırılması, elde edilen katalizörün ticari etkinliğinin araştırılması için önemli olabilir.

BÖLÜM.8. KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

1. Yagiz, F., ve Akin, A.N., “Lipaz Katalizörü ile Biyodizel Yakıt Üretimi”, ***EVK-1. Enerji Verimliliği ve Kalitesi Sempozyumu***, TMMOB Elektrik Mühendisleri Odası Kocaeli Şubesi, Kocaeli, 320-323, 17-18 Mayıs, 2005.
2. Yagiz, F., Kazan, D., and Akin, A.N., “Biodiesel Production Oils by Using Lipase Immobilized on Hydrotalcite and Zeolites”, ***17. International Conference on Chemical Reactors and Post-Symposium Catalytic Processing of Renewable Sources: Fuel, Energy, Chemicals***, Athens-Crete, Greece, May 15-19, 2006. (Chemical Engineering Journal’da yayınlanacak.)
3. Yagiz, F., Kazan, D., ve Akin, A.N., “Lipaz Enziminin Hidrotalsit ve Zeolit Üzerine Tutuklanması ve Biyodizel Yakıt Üretiminde Kullanımı”, ***UKMK-7***, Eskişehir, 5-7 Eylül. (Bildiri yayınlanacak.)

KAYNAKLAR

Abigor, R.D., Uadia, Pio., Foglia, T.A., Haas, M.I., Iones, K.C., Okbefa, E., Obibuzor, I.U., and Bafor, M.E., “Lipase-catalyzed Production of Biodiesel Fuel from Some Nigerian Lauric Oils”, *Biochemical Society Transactions*, Vol.28, part 6, 979-981, (2000).

Alfani, F., Cantarella, L., Cantarella, M., Coallifuoco, A., and Colella, C., “Synthetic Zeolites as Carrier For Enzyme Immobilization in Laboratory-scale Fixed-bed Columns”, *Elsevier Science B.V.*, 1115-1122, (1994).

Anonim (1), www.eie.gov.tr, Elektrik İşleri Etüt İdaresi Genel Müdürlüğü, (**Ziyaret tarihi: Nisan 2005**).

Anonim (2), www.tarim.gov.tr, Ulusal Biyoyakıt Raporu, (**Ziyaret tarihi: Ocak 2005**).

Anonim (3), www.cevreorman.gov.tr, Sera Etkisi ve Küresel Isınma, (**Ziyaret tarihi: Mayıs 2005**).

Anonim (4), www.globaldenso.com, (**Ziyaret tarihi: Haziran 2006**).

Atkins, R.C., ve Carey, F.A., “Organik Kimya”, Bilim Kitabevi, 2. Baskı, Çeviri Editörleri: Gürol Okay ve Yılmaz Yıldırım, (1999).

Ban, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., and Fukuda, H., “Whole cell Biocatalyst for Biodiesel fuel Production Utilizing *Rhizopus oryzae* cells Immobilized Within Biomass Support Particles”, *Biochemical Engineering Journal*, 8, 39-43, (2001).

Bockey, D., and Körbitz, W., “Situation and Development Potential For The Production of Biodiesel-an International Study”, *UFOP and ABI*, p.2, Berlin, Vienna, 1-8, (2003).

Borat, O., Balcı, M., ve Sürmen, A., “İçten Yanmalı Motorlar”, Cilt 1, 3. Baskı, *Teknik Eğitim Vakfı Yayınları-2*, İstanbul, (1994).

Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., and Krishna, S.H., “Optimizing Lipases and Related Enzymes For Efficient Application”, *Trends in Biotechnol.*, Vol.20, 433-437, (2002).

Chen, J., Ishii, T., Shimura, S., Kirimura, K., and Usami, S., “Lipase Production by *Trichosporon fermentans* WU-C12, a newly Isolated Yeast”, *J. Ferment. Bioeng.*, Vol.73, 412-414, (1992).

Ciniviz, M., Salman, M.S., ve Çarman, K., “Dizel Motorlarında Dizel+LPG Kullanımının Performans ve Emisyona Etkisi”, *Selçuk-Teknik Online Dergisi*, ISSN 1302-6178, Vol.2, no:1, (2001).

Clark, S.J., Wagner, L., Schrock, M.D., and Planner, P.G., “Methyl and Ethyl Soybean Esters as Renewable Fuels for Diesel Engines”, *JAOCs*, 61 (10), 1632-1638, (1984).

Canakci, M., and Gerpen, J.V., “Biodiesel production Via Acid Catalysis”, *Transactions of The ASAE*, 42 (5), 1203-1210, (1999).

Canakci, M., “Production of Biodiesel From Feedstocks with High Free Fatty Acids and Its Effect on Diesel Engine Performance and Emissions”, Doctor of Philosophy, *Iowa State University*, Ames Iowa, (2001).

Canakci, M., and Gerpen, J.V., “A Pilot Plant to Produce Biodiesel from High Free Fatty Acid Freestocks”, *Trans. of the ASAE*, 46(4), 945-955, (2003).

Çildir, O., “Bitkisel Yağ Metil Esterlerinde Dizel Motorlar İçin Yakıt Üretimi”, *Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli, (2003).

Di Cosimo, J.I., Diez, V.K., Xu, M., Iglesia, E., and Apesteguia, C.R., “Structure and Surface and Catalytic Properties of Mg-Al Basic Oxides”, *Journal of Catalysis*, 178, 499-510, (1998).

Du, W., Xu, Y., and Lin, D., “Lipase-catalysed Transesterification of Soya Bean Oil for Biodiesel Production During Continuous Batch Operation”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 38, 103-106, (2003).

Du, W., Xu, Y., Lin, D., and Zeng, I., “Comparative Study on Lipase-Catalyzed Transformation of Soybean Oil for Biodiesel Production with Different Acyl Acceptors”, *Journal of Mol. Catal. B Enzymatic*, Vol.30, 125-129, (2004).

Dumitriu, E., Secundo, F., Patarin, F., and Fechete, I., “Preparation and Properties of Lipase Immobilized on MCM-36 Support”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol.22, 119-133, (2003).

Duygu, E., “Türkiye Sürdürülebilir Kalkınma ve Sosyoekonomik, Ekoekolojij Enerji Kaynağı, Biyokütle”, *5. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu*, 26-28 Mayıs, İstanbul, 429-438, (2004).

Elibol, M., and Dursun, O., “Lipase Production by Immobilised *Rhizopus arrhizus*”, *Process Biochem.*, Vol.36, 219-223, (2000).

Fangrui, M., and Milford, A., “Biodiesel Production: a Review”, *Bioresource Technology*, Vol.70, 1-15, (1999).

Fennema, O.R., “Food Chemistry”, Second Edition, Mdi Dekker, Wisconsin, *Madison*, USA, 371-475, (1985).

Freedman, B., Pryde, E.H., and Mounts, T.L., "Variables Affecting The Yields of Fatty Esters From Transesterified Vegetable Oils", *JAOCs*, 61(10), 1638-1643, (1984).

Georing, C.E., Schwab, A.W., Daugherty, M.J., Pryde, E.H., and Heakin, A.J., "Fuel Properties of Eleven Vegetable Oils", *Transactions of The ASAE*, USA, 1472-1477, (1982).

Graboski, M.S., and McCormick R.L., "Combustion of Fat and Vegetable Oil Derived Fuels in a Diesel Engine", *Prog. Energy Combust. Sci.*, Vol.24, 125-164, (1998).

Hideki, F., Akihiko, K., and Hideo, N., "Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.92, 405-416, (2001).

Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., and Shrestha, S., "Production of Biodiesel Fuel From Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipase", *J. Mol. Catal. B Enzymatic*, Vol.16, 53-58, (2001).

Jaeger, K.E., and Eggert, T., "Lipases for Biotechnology", *Current Opinion in Biotech.*, Vol.13, 390-397, (2002).

Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Notomo, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E., and Fukuda, H., "Biodiesel Fuel Production from Plant Oil Catalyzed by *Rhizopus oryzae* Lipase in a Water-Containing System without an Organic Solvent", *J. Bioscience Bioeng.*, Vol.88, 627-631, (1999).

Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T., and Iefuji, H., "Production, Purification and characterization of an Extra Cellular Lipase From The Yeast *Cryptococcus* sp.S-2", *Process Biochemistry*, Vol.36, 317-324, (2000).

Kaplan, C., "Ayçiçek Yağı Metil Esterinin Dizel Motorlarında Alternatif Yakıt Olarak Kullanımı", *Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli, (2001).

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

Karaosmanoğlu, F., "Sürdürülebilir Enerji: Yenilenebilir Enerji Kaynakları ve Türkiye", *Akasya 2. Ulusal Gençlik Çevre Zirvesi*, İstanbul, 25-27 Nisan, (2003).

Kaufman, K.R., Ziejewski, M., Pratt, G.L., and Goettler, H.J., "Fuel Injection Anomalies Observed During Long-Term Engine Performance Tests on Alternative Fuels", *Society of Automotive Engineers*, USA, No:852089, (1986).

Knezevic, Z., Mojovic, L., and Adnadjevic, B., "Palm Oil Hydrolysis by Lipase From *Candida cylindracea* Immobilized on The Zeolite Type Y", *Enzyme Microb. Technol.*, Vol.22, 275-280, (1998).

Korus, R.A., Hoffman, D.S., Bam, N., Peterson, C.L., and Drown, D.C., "Transesterification Process and Manufacture of Ethyl Ester From Rapeseed Oil", *Proceedings of The First Biomass Conference of The Americas*, Burlington, 815-826, (1993).

Körbitz, W., "Biodiesel Production in Europa and North America, an Encouraging Prospect", *Renewable Energy*, Vol.16, 1078-1083, (1999).

Krawczyk, T., "Biodiesel-Alternative Fuel Makes Inroads but Hurdles Remain", *Inform*, 7, 801-829, (1996).

Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S., and Gupta, R., "Production, Purification, and Characterization of Lipase From Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3", *Protein Expression and Purification*, 41(1), 38-44, (2005).

Lang, X., Dalai, A.K., Bakhshi N.N., Reaney, M.J., and Hertz, P.B., "Preparation and Characterization of Biodiesels From Various Bio-oils", *Bioresource Technology*, Vol.80, 53-62, (2001).

Lee, I., Johnson, L.A., and Hammond, E.G., "Use of Branched-Chain Esters to Reduce The Crystallization Temperature of Biodiesel", *JAOCs*, 72 (10), 1155-1160, (1995).

Ma, F., and Hanna, M.A., "Biodiesel Production: a Review", *Biosource Technology*, Vol. 70, 1-15, (1999).

Macrae, A.R., and Hammond, R.C., "Present and Future Applications of Lipases", *Biotech. Genet. Eng.Rev.*, Vol.3, 193-217, (1985).

Manfred, T.R., "Lipases as Practical Biocatalysts", *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol.6, 145-150, (2002).

Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fukudo, H., and Kondo, A., "Yeast Whole-cell Biocatalyst Constructed by Intracellular Overproduction of *Rhizopus oryzae* Lipase is Applicable to Biodiesel Fuel Production", *Appl. Microbial. Biotech.*, Vol.57, 515-520, (2001).

Nishida, S., Takesoe, S., Yamasaki, Y., and Nakahira, A., "Attempt of Arsenic Removal in Wasted Water by Inorganic Materials", *14th International Conference on the Properties of Water and Steam in Kyoto*, 29 Aug.-3 Sep., Japan, 387-390 (2004).

Nye, M.J., and Southwell, P.H., "Conversion of Rapeseed Oil to Esters For Use as a Diesel Fuel", In Proc. Fifth Canadian Bioenergy Res. And Develop. Seminar, *Elsevier Applied Science*, 487-490, (1984).

Oda, M., Kaieda, M., Hama, S., Yamaji, H., Kondo, A., Izumoto, E., and Fukuda, H., "Facilitatory Effect of Immobilized Lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on Acyl Migration in Biodiesel-fuel Production", *Biochemical Engineering Journal*, 23, 45-51, (2005).

Oliveira, D.D., Luccio, M.D., Faccio, C., Rosa, C.D., Bender, J.P., Lipke, N., Menoncin, S., Amroginski, C., and Oliveira, J.V.D., "Optimization of Enzymatic Production of Biodiesel From Castor Oil in Organic Solvent Medium", *Appl. Biochem. Biotech.*, Vol.113, 771-780, (2004).

Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verscheuren, K.H.G., and Goldman, A., "The α/β hydrolase fold", *Protein Engineering*, Vol.5, 197-211, (1992).

Ota, Y., Gomi, K., Kato, S., Sugiura, T., And Minoda, Y., "Purification and Some Properties of Cell-bound Lipase From *Saccharomyces cerevisiae*", *Agric. Biol. Chem.*, Vol.46, 2885-2893, (1982).

Özçimen D., Kardaşlar, D., Çulcuoğlu, E., and Karaosmanoğlu F., "Biyomotorin Nedir?", *III. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu*, Cilt 2, İstanbul, 15-17 Kasım, (2000).

Peres, C., Harper, N., Da Silva M.D.R.G., and Barreiros, S., "Effect of Zeolites on Lipase Catalyzed Esterification in Nonaqueous Media", *Enzyme and Microbial Technology*, 37(1), 145-149, (2005).

Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., and Solinas, V., "Biodiesel Production from Triolein and Short Chain Alcohols Through Biocatalysis", *Journal of Biotech.*, 119(3), 291-299, (2005).

Sarıyıldız, Ü., 2005, "Petrol Dar Boğazına Alternatif: Biyodizel", Kimya Topluluğu, http://www.tepkime.net/2005_10_01_tepkime_archive.html, (*Ziyaret tarihi: Haziran 2006*).

Schmidt, R.D., and Verger, R., "Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications", *Agnew Chem. Int. Ed. Engl.*, Vol.37, 1608-1633, (1998).

Sedmark, J.J., and Grossberg, S.E., "A Rapid Sensitive and Versatile Assay For Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250", *Anal. Biochem.*, Vol.79, 544-552, (1977).

Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y., "Enzymatic Alcoholysis for Biodiesel Fuel Production and Application of the Reaction to Oil Processing", *J. Mol. Catal. B Enzymatic*, Vol.17, 133-142, 2001.

Soumanou, M.M., and Bornscheuer, U.T., "Improvement in Lipase-Catalyzed Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters from Sunflower Oil", *Enzyme Microb. Tech.*, Vol.33, 97-103, (2003).

Spector, T., "Refinement of The Coomassie Blue Method of Protein Quantitation. A simple and Linear Spectrophotometric Assay For Less Than or Equal to 0.5 to 50 microgram of Protein", *Anal. Biochem.*, 86(1), 142-146, (1978).

Srivastava, A., and Prasad, R., "Triglycerids-Based Diesel Fuels", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 111-133, (1999).

Şanlı, H., "Farklı Alkol ve Katalizör Kullanımının Biyodizel Üretimindeki etkileri", *Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli, (2005).

Tickell, J., "From The Fryer to The Fuel Tank", *ISBN 0-9707227-0-2*, 47-50, (2002).

Tomizuka, N., Ota, Y., and Yamada, K., "Studies on Lipase from *Candida cylindracea* I, Purification and Properties", *Agric. Biol. Chem.*, Vol.30, 576-584, (1966).

Tosheva, L., 1999, "Zeolite Macrostructures", Lulea Tekniska Universitet, <http://epubl.luth.se/1402-1757/1999/27/LTU-LIC-9927-SE.pdf>, (**Ziyaret tarihi: Nisan 2005**).

Tsujisaka, Y., Iurai, M., Fukumoto, J., and Okamoto, Y., "Induced Formation of Lipase by *Geotrichum candidum* Link", *Agric. Biol. Chem.*, Vol.37, 837-842, (1973).

Tsyganok, A.I., Inaba, M., Tsunoda, T., Suzuki, K., Takehira, K., and Hayakawa, T., "Combined Partial Oxidation and Dry Reforming of Methane to Synthesis Gas Over Noble Metals Supported on Mg-Al Mixed Oxides", *Appl. Catal. A-Gen.*, Vol.275, 149-155, (2004).

Tyson, K.S., "Biodiesel Handling and Use Guidelines", *NREL/TP-580-30004*, September, (2001).

Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., and Haas, M.J., "Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approaches", *J. Mol. Catal. B Enzyme*, Vol.9, 113-148, (2000).

Yosmaoğlu, M., "Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Araştırma, Planlama ve Koordinasyon Kurulu Başkanlığı Ayçiçeği Raporu", *Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı*, Aralık, (2002 a).

Yosmaoğlu, M., "Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Araştırma, Planlama ve Koordinasyon Kurulu Başkanlığı Soya Fasülyesi Raporu", *Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı*, Aralık, 2002 (b).

Yuji, S., Yomi, W., Akio, S., And Yoshio, T., “Enzymatic Alcoholysis For Biodiesel Fuel Production and Application of The Reaction to Oil Processing”, *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 17, 133-142, (2002).

EKLER

EK A. Enzim Tutuklamada Protein ve Etkinlik Tabloları.

EK A.1

Tablo A.1. İmmobilizasyon sonrası zeolitte 1/10 dilüsyon ve HT’de ½ dilüsyonda protein ölçümleri spektrofotometrede 595 nm’deki sonuçları. (BSA Eğim:0.0154)

Materyal ve Boyutu	4 °C		24 °C		37 °C		
	OD 595	Protein	OD 595	Protein	OD 595	Protein	
HT	250 µm	0,18710	0,0243	0,10900	0,0142	0,08615	0,0112
	200	0,11880	0,0154	0,13615	0,0177	0,09455	0,0123
	150	0,15740	0,0204	0,12260	0,0159	0,13215	0,0172
	80	0,15980	0,0208	0,09520	0,0124	0,10650	0,0138
Z-AW	250 µm	0,25635	0,1665	0,20320	0,1319	0,16045	0,1042
	200	0,19245	0,1250	0,18860	0,1225	0,16605	0,1079
	150	0,18625	0,1210	0,18810	0,1221	0,17845	0,1159
	80	0,21240	0,1379	0,18565	0,1206	0,18965	0,1232
Z-13x	250 µm	0,14985	0,0973	0,26175	0,1700	0,11010	0,0715
	200	0,13495	0,0877	0,29665	0,1927	0,13020	0,0845
	150	0,12770	0,0829	0,25415	0,1651	0,15680	0,1018
	80	0,10985	0,0714	0,25865	0,1680	0,17195	0,1117
Z-5A	250 µm	0,16910	0,1098	0,13795	0,0896	0,16965	0,1102
	200	0,16255	0,1056	0,14760	0,0958	0,16905	0,1098
	150	0,17080	0,1109	0,14215	0,0923	0,17945	0,1166
	80	0,16540	0,1074	0,17260	0,1121	0,18820	0,1222
Z-FM8	250 µm	0,08570	0,0556	0,12890	0,0837	0,13225	0,0859
	200	0,14970	0,0972	0,13565	0,0881	0,12940	0,0840
	150	0,11545	0,0750	0,14620	0,0949	0,12545	0,0815
	80	0,10775	0,0700	0,14540	0,0944	0,14395	0,0935

EK A.2

Tablo A.2. İmmobilizasyon sonrası OD₅₉₅ protein ve OD₄₁₀ aktivite değerleri.

Materyal ve Boyutu	4 °C		24 °C		38 °C		
	Protein	Aktivite	Protein	Aktivite	Protein	Aktivite	
HT	250 µm	0,18710	1,8585	0,10900	1,7307	0,08615	1,7328
	200	0,11880	1,8825	0,13615	1,8878	0,09455	1,7324
	150	0,15740	1,8368	0,12260	1,9189	0,13215	1,7895
	80	0,15980	1,8462	0,09520	1,9115	0,10650	1,8142
Z-AW	250 µm	0,25635	0,5528	0,20320	0,1355	0,16045	0,2113
	200	0,19245	0,6679	0,18860	0,3747	0,16605	0,7248
	150	0,18625	0,9620	0,18810	0,5702	0,17845	0,9812
	80	0,21240	1,0092	0,18565	0,6604	0,18965	1,1779
Z-13x	250 µm	0,14985	0,1921	0,26175	0,8907	0,11010	0,8553
	200	0,13495	0,6403	0,29665	0,5122	0,13020	0,9556
	150	0,12770	0,8097	0,25415	0,8440	0,15680	1,5500
	80	0,10985	1,2578	0,25865	1,3281	0,17195	1,7468
Z-5A	250 µm	0,16910	1,2390	0,13795	0,9986	0,16965	0,6415
	200	0,16255	0,8001	0,14760	1,0835	0,16905	1,0621
	150	0,17080	1,2400	0,14215	1,1450	0,17945	1,0656
	80	0,16540	1,6147	0,17260	1,0056	0,18820	1,3724
Z-FM8	250 µm	0,08570	0,8577	0,12890	0,6583	0,13225	0,5942
	200	0,14970	0,5283	0,13565	1,1281	0,12940	1,0158
	150	0,11545	0,5957	0,14620	0,6972	0,12545	1,3363
	80	0,10775	0,8816	0,14540	1,0974	0,14395	1,1261

EK A.3

Tablo A.3. İmmobilizasyon sonrası protein (mg/mlt) ve Pg (mg/g) değerleri.

Materyal	4 °C		24 °C		37 °C		
	Protein	Pg	Protein	Pg	Protein	Pg	
HT	250 µm	0,0243	12,9022	0,0142	12,9780	0,0112	13,0004
	200	0,0154	12,9689	0,0177	12,9517	0,0123	12,9922
	150	0,0204	12,9314	0,0159	12,9652	0,0172	12,9554
	80	0,0208	12,9284	0,0124	12,9914	0,0138	12,9809
Z-AW	250 µm	0,1665	9,0637	0,1319	9,3233	0,1042	9,5310
	200	0,1250	9,3750	0,1225	9,3938	0,1079	9,5033
	150	0,1210	9,4050	0,1221	9,3967	0,1159	9,4433
	80	0,1379	9,2783	0,1206	9,4080	0,1232	9,3885
Z-13x	250 µm	0,0973	9,5828	0,1700	9,0375	0,0715	9,7763
	200	0,0877	9,6548	0,1927	8,8673	0,0845	9,6786
	150	0,0829	9,6908	0,1651	9,0743	0,1018	9,5490
	80	0,0714	9,7770	0,1680	9,0525	0,1117	9,4748
Z-5A	250 µm	0,1098	9,4890	0,0896	9,6405	0,1102	9,4860
	200	0,1056	9,5205	0,0958	9,5940	0,1098	9,4890
	150	0,1109	9,4808	0,0923	9,6203	0,1166	9,4380
	80	0,1074	9,5070	0,1121	9,4718	0,1222	9,3960
Z-FM8	250 µm	0,0556	9,8955	0,0837	9,6848	0,0859	9,6683
	200	0,0972	9,5835	0,0881	9,6518	0,0840	9,6825
	150	0,0750	9,7500	0,0949	9,6008	0,0815	9,7013
	80	0,0700	9,7875	0,0944	9,6045	0,0935	9,6113

EK A.4Tablo A.4. İmmobilizasyon sonrası Pg (mg/g) ve adsorpsiyon derecesi (α) değerleri.

Materyal	4 °C		24 °C		38 °C		
	Pg	α	Pg	α	Pg	α	
HT	250 μm	12,9022	0,994	12,9780	0,998	13,0004	1,000
	200	12,9689	1,000	12,9517	0,997	12,9922	0,999
	150	12,9314	0,997	12,9652	0,998	12,9554	0,996
	80	12,9284	0,996	12,9914	1,000	12,9809	0,998
Z-AW	250 μm	9,0637	0,963	9,3233	0,991	9,5310	1,000
	200	9,3750	0,996	9,3938	0,998	9,5033	0,997
	150	9,4050	1,000	9,3967	0,999	9,4433	0,991
	80	9,2783	0,986	9,4080	1,000	9,3885	0,985
Z-13x	250 μm	9,5828	0,980	9,0375	0,996	9,7763	1,000
	200	9,6548	0,987	8,8673	0,977	9,6786	0,990
	150	9,6908	0,991	9,0743	1,000	9,5490	0,977
	80	9,7770	1,000	9,0525	0,997	9,4748	0,969
Z-5A	250 μm	9,4890	0,996	9,6405	1,000	9,4860	0,996
	200	9,5205	1,000	9,5940	0,995	9,4890	1,000
	150	9,4808	0,995	9,6203	0,998	9,4380	0,994
	80	9,5070	0,998	9,4718	0,983	9,3960	0,990
Z-FM8	250 μm	9,8955	1,000	9,6848	1,000	9,6683	0,996
	200	9,5835	0,968	9,6518	0,996	9,6825	0,998
	150	9,7500	0,985	9,6008	0,991	9,7013	1,000
	80	9,7875	0,989	9,6045	0,991	9,6113	0,990

EK A.5Tablo A.5. İmmobilizasyon sonrası aktivite OD₄₁₀ ve aktivite (IU) değerleri.

Materyal	4 °C		24 °C		37 °C		
	OD 410	Activity IU	OD 410	Activity IU	OD 410	Activity IU	
HT	250 µm	1,8585	710,71	1,7307	661,84	1,7328	662,64
	200	1,8825	719,89	1,8878	721,91	1,7324	662,50
	150	1,8368	702,41	1,9189	733,80	1,7895	684,32
	80	1,8462	706,01	1,9115	730,98	1,8142	693,77
Z-AW	250 µm	0,5528	342,29	0,1355	83,90	0,2113	130,84
	200	0,6679	413,56	0,3747	232,01	0,7248	448,79
	150	0,9620	595,67	0,5702	353,06	0,9812	607,55
	80	1,0092	624,90	0,6604	408,92	1,1779	729,35
Z-13x	250 µm	0,1921	118,95	0,8907	551,52	0,8553	529,60
	200	0,6403	396,47	0,5122	317,15	0,9556	591,70
	150	0,8097	501,36	0,8440	522,60	1,5500	959,75
	80	1,2578	778,82	1,3281	822,35	1,7468	1083,47
Z-5A	250 µm	1,2390	767,18	0,9986	618,33	0,6415	397,21
	200	0,8001	495,42	1,0835	670,89	1,0621	657,65
	150	1,2400	767,80	1,1450	708,97	1,0656	659,81
	80	1,6147	999,81	1,0056	622,66	1,3724	849,78
Z-FM8	250 µm	0,8577	531,08	0,6583	407,62	0,5942	367,92
	200	0,5283	327,12	1,1281	698,51	1,0158	628,98
	150	0,5957	368,85	0,6972	431,70	1,3363	827,43
	80	0,8816	545,88	1,0974	679,50	1,1261	697,27

EK B. Hidrotalsit Üzerine Tutuklama Koşullarını Optimizasyon Çalışması ile İlgili Tablolar.

EK B.1

Tablo B.1.a. 20 mM 4-NPP ile farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki denenmiş aktivite sonuçları.

Sıcaklık (C)	OD 410 nm	A (IU/min)
30	1,6667	742,96
35	1,7329	772,47
40	1,8065	805,27
45	1,8593	828,81
50	1,7203	766,85
55	1,7210	767,16
60	1,6156	720,18
65	1,7056	760,30

Tablo B.1.b. Hidrotalsit üzerine immobilize lipazın tekrarlanan kullanımlarındaki 55°C’de inkübe edilerek denenmiş stabilitesi.

Kullanım Sayısı	Aktivite OD 410	A (IU/min)	Stabilite %
1	1,6930	754,68	100
2	1,0877	484,86	64
3	0,8473	377,70	50
4	0,6716	299,38	40
5	0,5056	225,38	30
6	0,3731	166,32	22
7	0,2394	105,51	14

EK B.2

Tablo B.2. Hidrotalsit üzerine immobilize lipazın tekrarlanan kullanımlarındaki 45°C’de inkübe edilerek denenmiş stabilitesi.

Kullanım Sayısı	Aktivite OD 410	A (IU/min)	Stabilite %
1	1,777	792,14	100
2	1,5815	705,00	90
3	1,2837	572,23	72
4	1,1791	525,60	66
5	0,9788	436,32	55
6	0,8770	390,94	49
7	0,6503	289,88	36

EK B.3

Tablo B.3. 20 mM 4-NPP'nin farklı derişimlerde 45°C'de inkübe edilerek denenmiş aktivite sonuçları.

Molarite (mM)	Aktivite OD 410	A (IU/min)
2	0,3375	150,45
3	0,6896	307,40
4	0,5178	230,82
5	1,2982	578,70
7	1,2485	556,54
9	1,2757	568,66
10	1,4126	629,69
12	1,4395	641,68
15	1,6201	722,18
20	1,8066	805,32
25	1,9817	883,35
30	2,0137	897,64
35	2,0444	911,32
40	1,7890	797,50
45	1,7377	774,61

EK C. Farklı PH ve Sıcaklıklarda Denenmiş Enzim Tutuklama Verileri.

EK C.1

Tablo C.1.a. Serbest enzimin immobilize edilmeden önce farklı tamponlar kullanılarak SP’de ölçülen aktivite (IU/min) ve protein (mg/mlt) değerleri.

Kullanılan Tampon	Asetat Tamp.	Fosfat Tamp.		Tris-HCl Tamp.		
		6,0	7,0	8,0	8,5	9,0
pH	5,0	6,0	7,0	8,0	8,5	9,0
A (IU/min)	-	228,47	373,54	424,19	460,19	546,15
P (mg/ml)	-	0,1376	0,2250	0,3983	0,2648	0,3359

Tablo C.1.b. Fosfat tamponda (pH 8.5-9.0) hidrotalsit üzerine immobilize olan lipazın karşılaştırmalı aktivite (IU/min) değerleri.

Fosfat Tamponu		4 °C	24 °C	37 °C
pH 8.5	1	710,71	661,68	662,64
	2	719,88	721,91	662,49
	3	702,41	733,80	684,32
	4	706,00	730,98	663,77
pH 9.0	1	952,38	987,19	850,34
	2	886,63	889,84	868,66
	3	970,07	853,19	871,83
	4	961,60	868,62	821,46

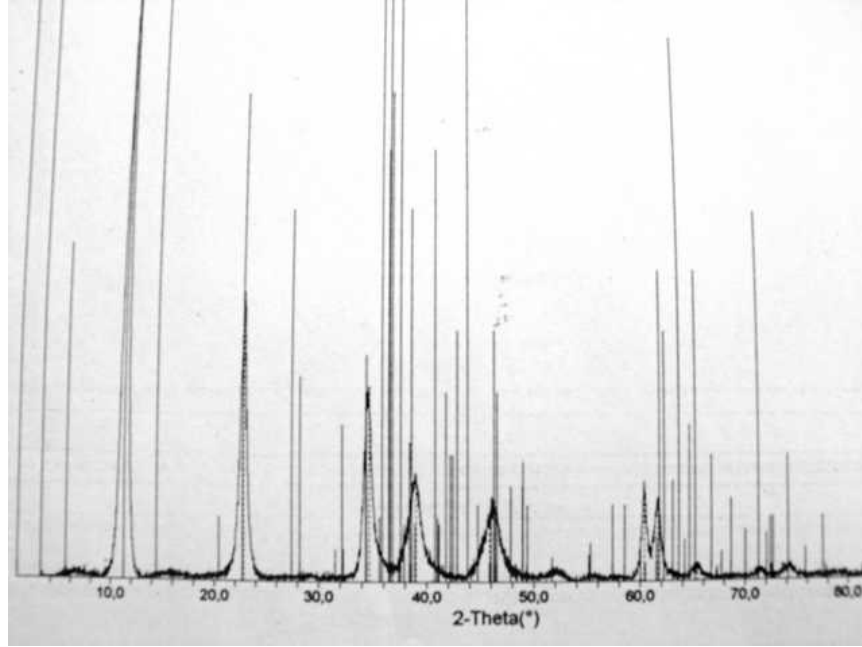
EK C.2

Tablo C.2. Farklı tamponlarda ve farklı pH değerlerinde hidrotalsit üzerine immobilize edilen lipazın Pg (mg/g) değerleri.

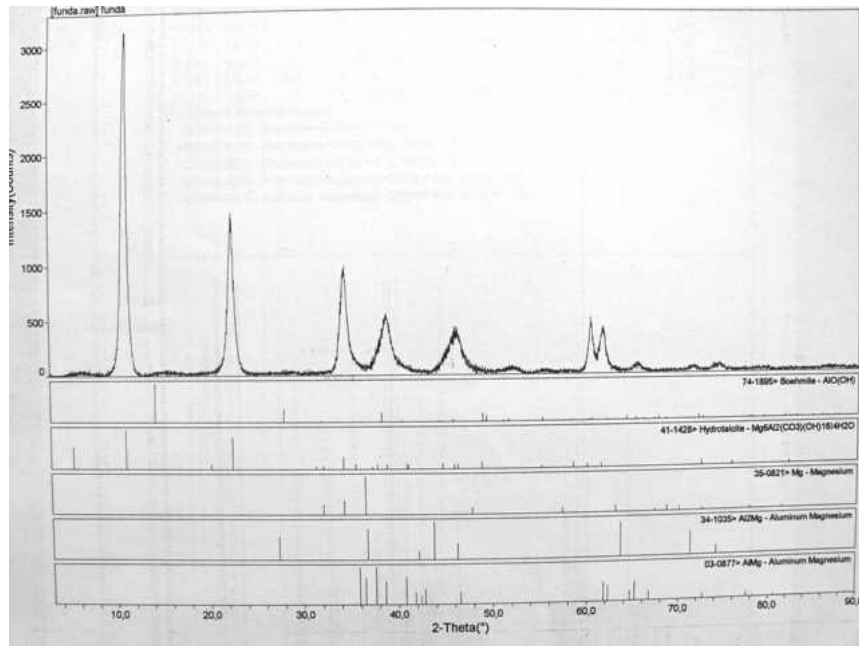
Tampon		Fosfat Tamponu		Tris-HCl Tamponu		
pH		6.0	7.0	8.0	8.5	9.0
4 °C	1	0,7175	2,2388	9,0637	12,9022	3,2623
	2	0,5668	2,2327	9,3750	12,9689	3,2300
	3	0,6035	2,1270	9,4050	12,9314	3,2023
	4	0,5848	2,1563	9,2783	12,9284	3,2233
24 °C	1	0,3905	2,0910	9,3233	12,9780	3,0545
	2	0,3313	2,2448	9,3938	12,9517	3,1753
	3	0,3875	2,1563	9,3967	12,9652	3,1535
	4	0,2338	2,1623	9,4080	12,9914	3,1693
37 °C	1	0,1363	2,1615	9,5310	13,0004	3,1843
	2	0,0971	2,0693	9,5033	12,9922	3,1700
	3	0,0248	2,0160	9,4433	12,9554	3,2218
	4	0,0457	2,0010	9,3885	12,9809	3,1115

EK D. Hidrotalsit Yapısı Tayini İçin XRD Analiz Grafikleri.

EK D.1



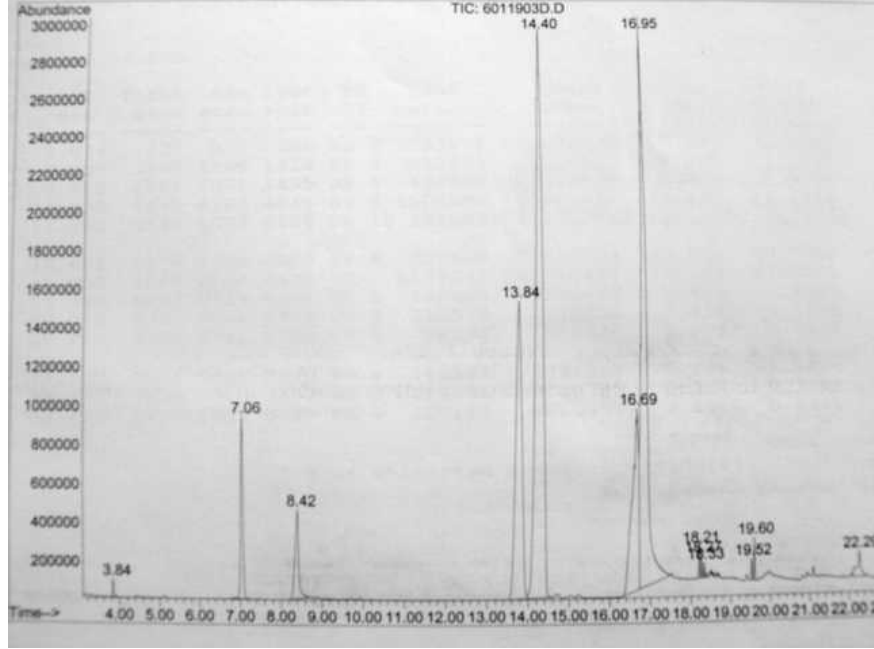
Şekil D.1. Hidrotalsit yapısı tayini için XRD analiz sonuçları-1.



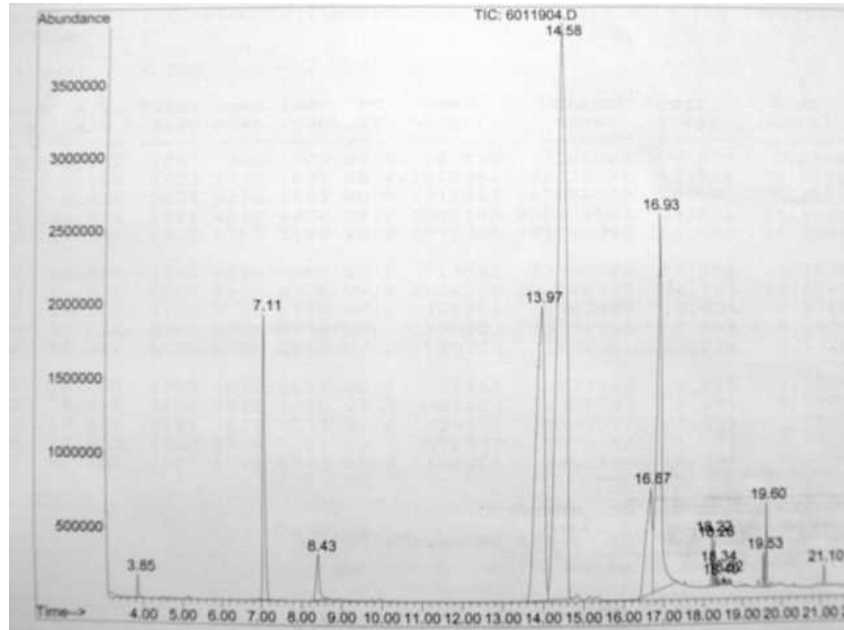
Şekil D.2. Hidrotalsit yapısı tayini için XRD analiz sonuçları-2.

EK E. Biyodizel Deneylerine Ait GC Analizi Kromatogramları.

EK E.1

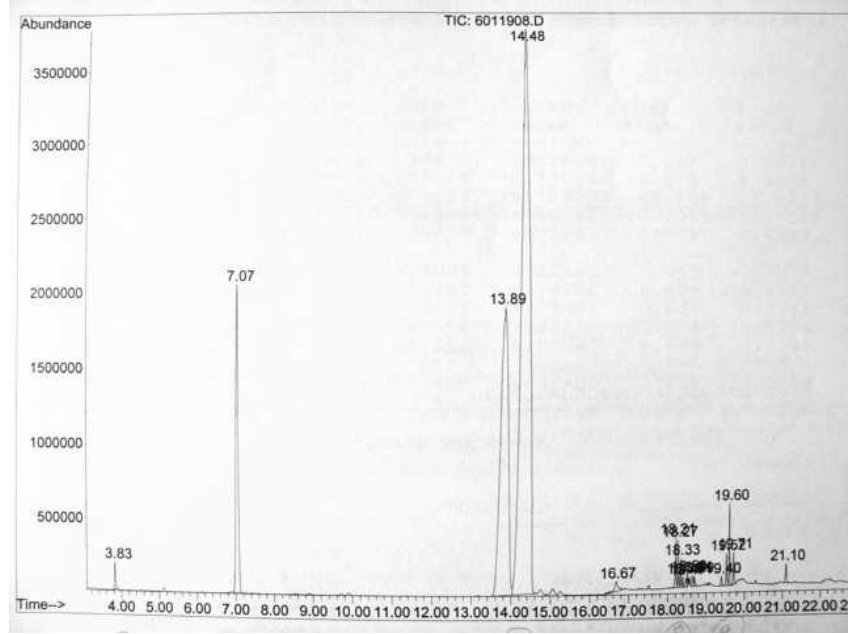


Şekil E.1. Biyodizel-1 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.

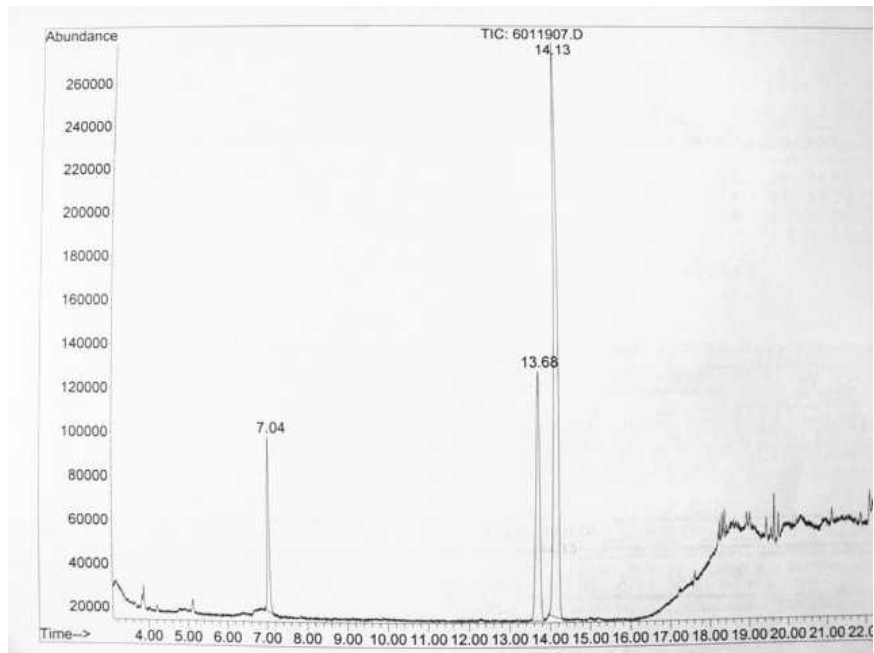


Şekil E.2. Biyodizel-2 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.

EK E.2

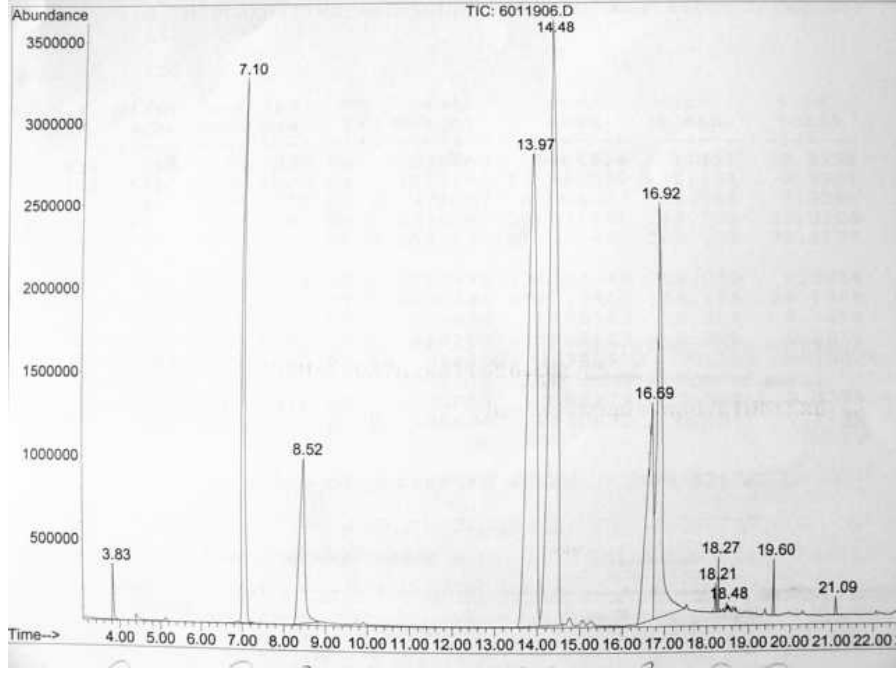


Şekil E.3. Biodizel-3 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.

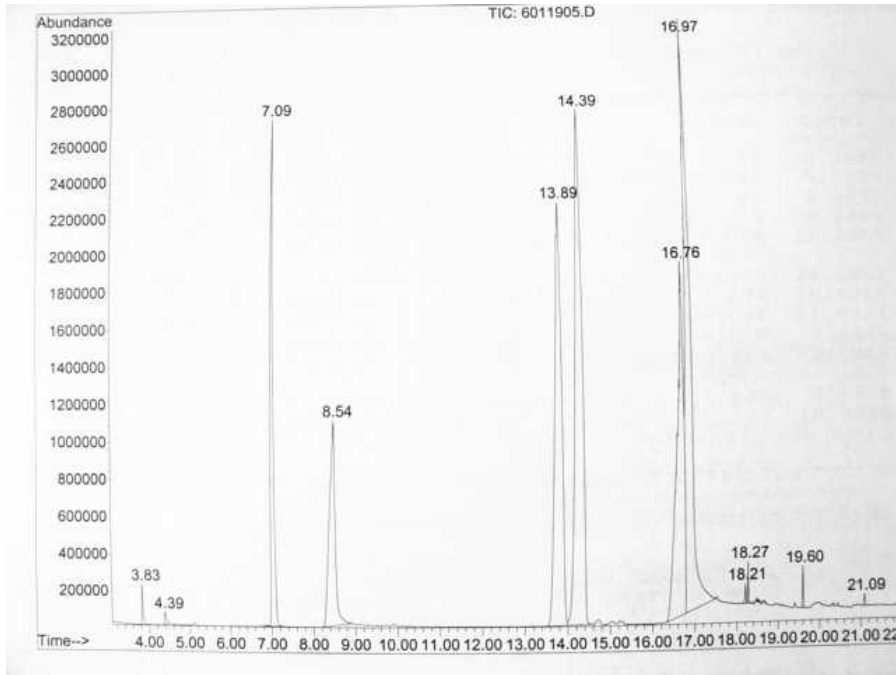


Şekil E.4. Biodizel-4 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.

EK E.3

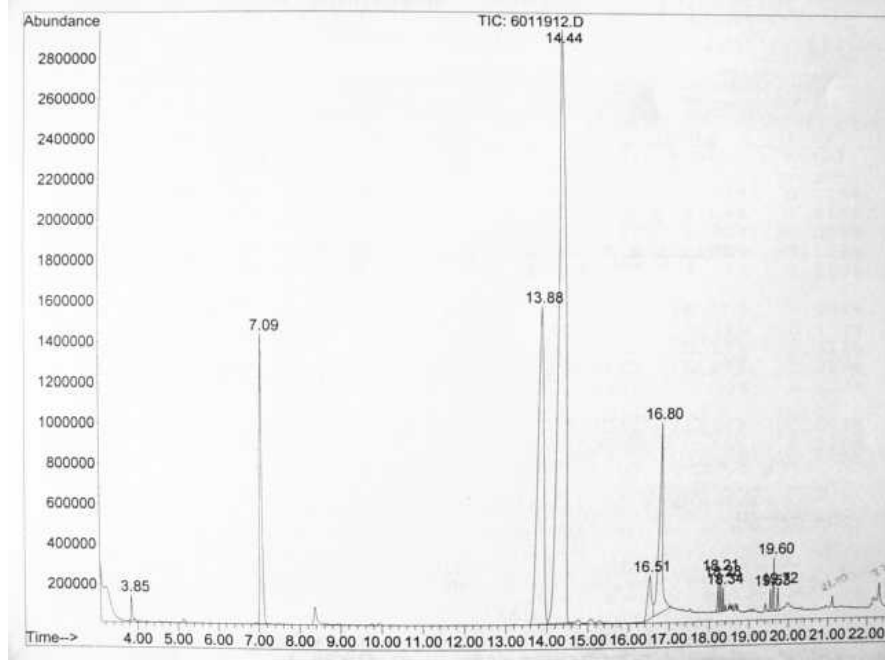


Şekil E.5. Biodizel-5 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.

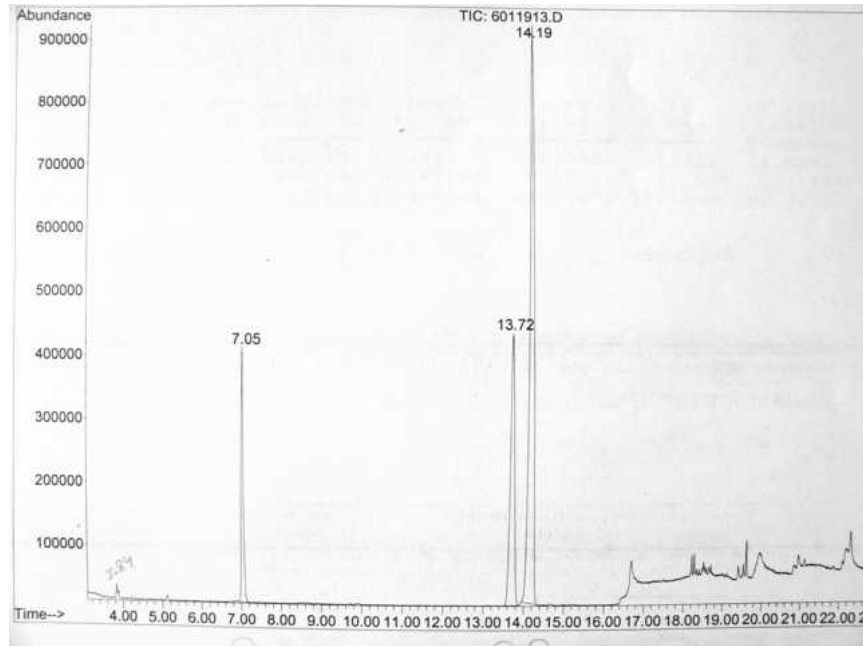


Şekil E.6. Biodizel-6 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.

EK E.4

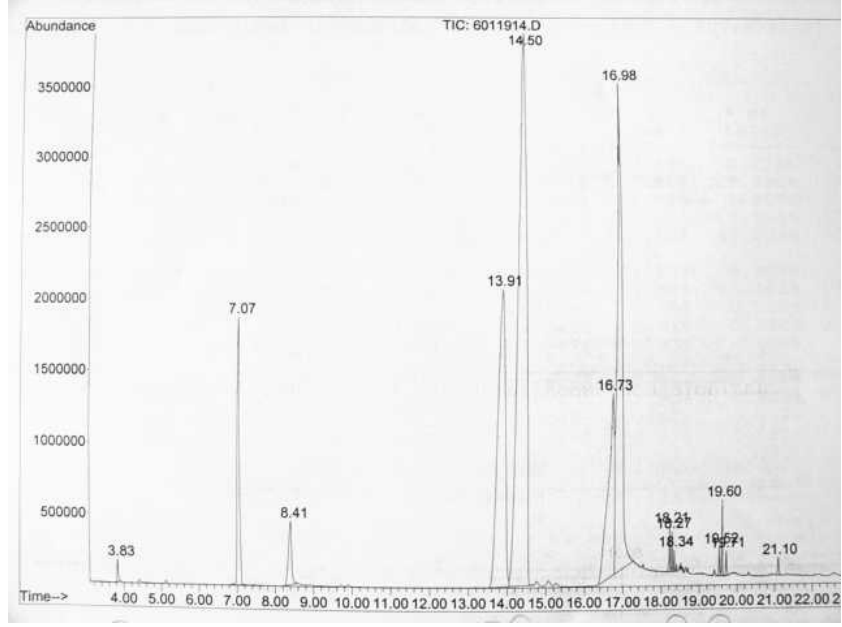


Şekil E.7. Biodizel-7 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.

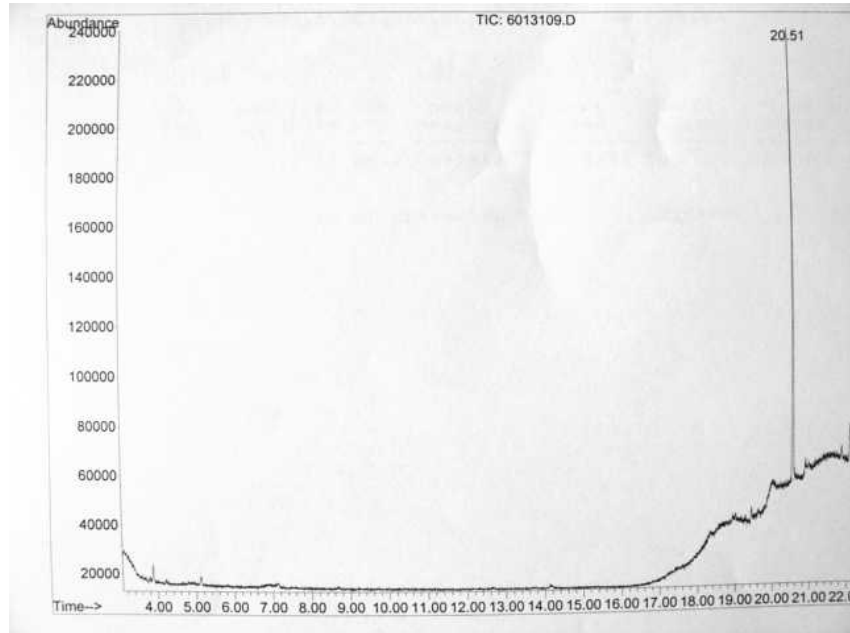


Şekil E.8. Biodizel-8 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.

EK E.5

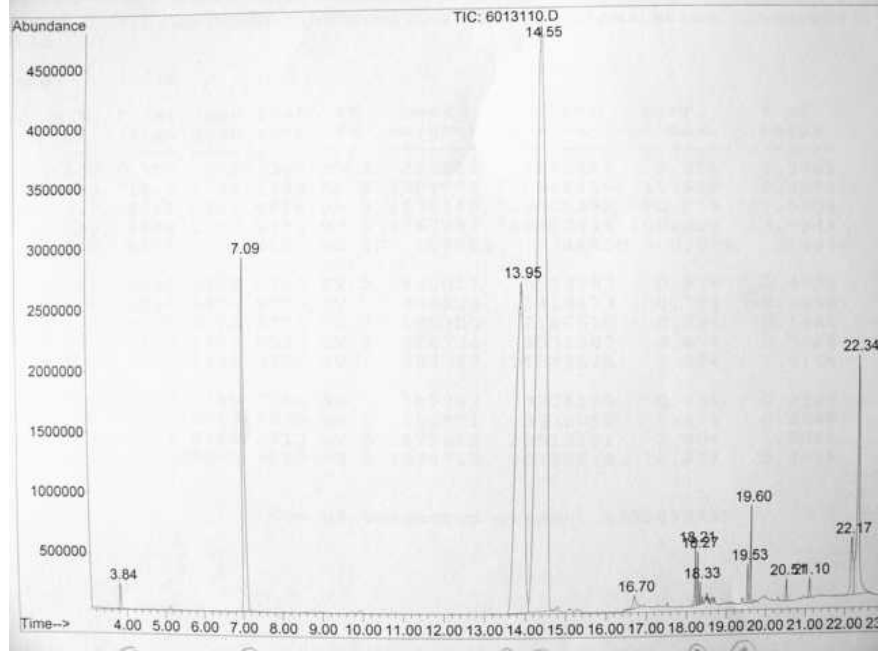


Şekil E.9. Biodizel-9 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.

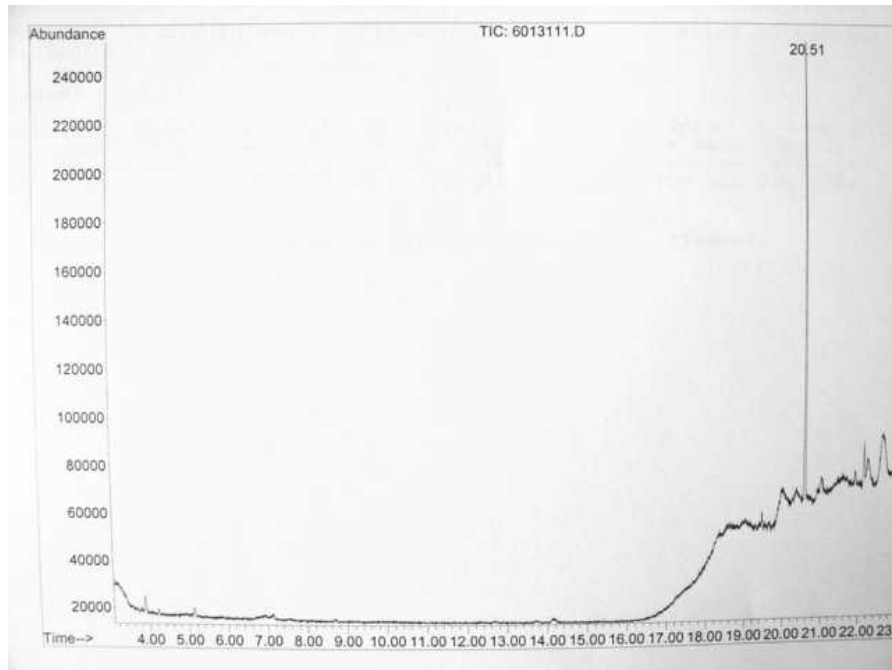


Şekil E.10. Biodizel-10 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.

EK E.6

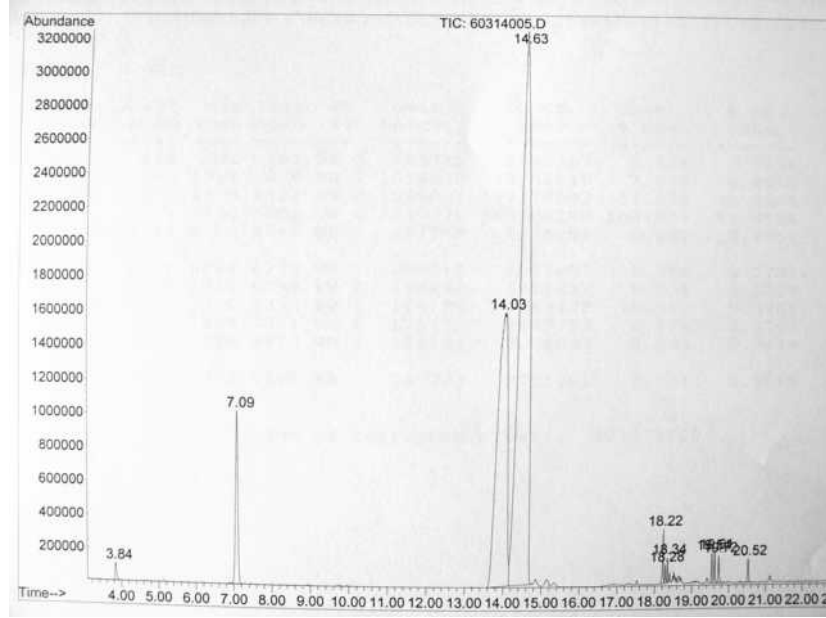


Şekil E.11. Biodizel-11 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.

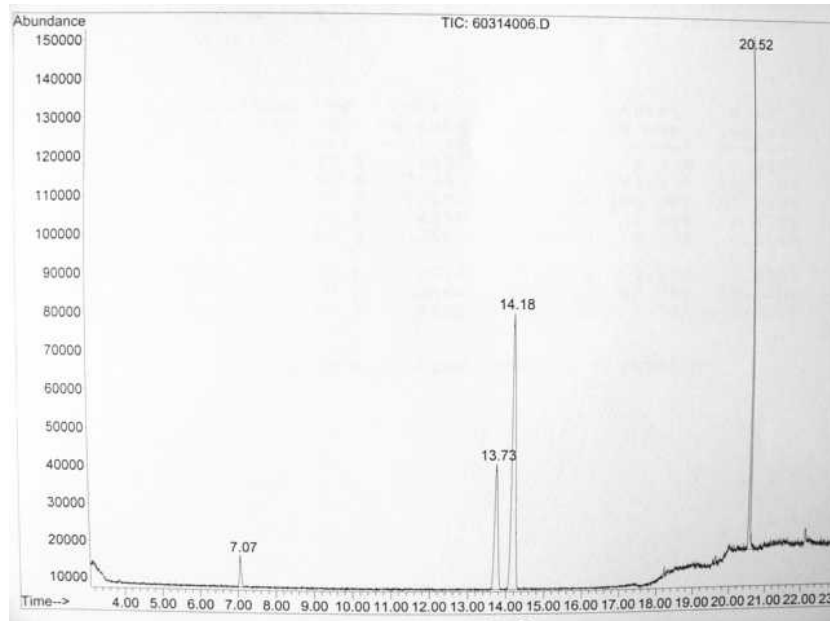


Şekil E.12. Biodizel-12 örneğinin GC-MS'de yağ asidi metil ester analizi.

EK E.7

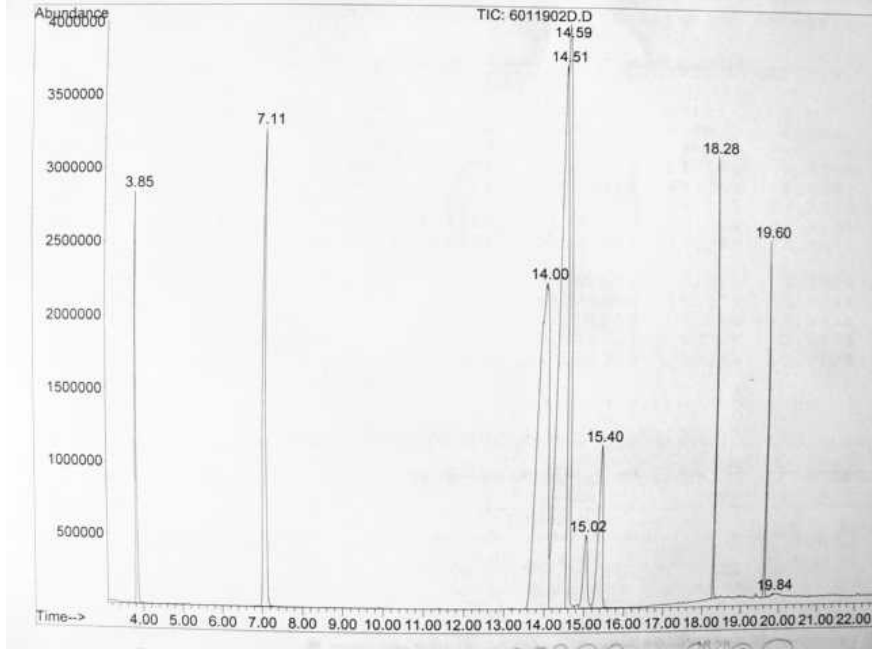


Şekil E.13. Biyodizel-13 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.



Şekil E.14. Biyodizel-14 örneğinin GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi.

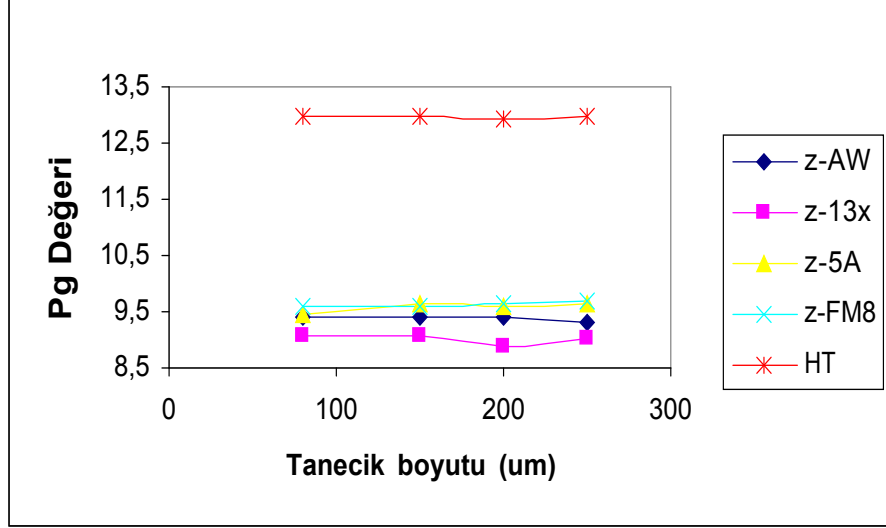
EK E.8



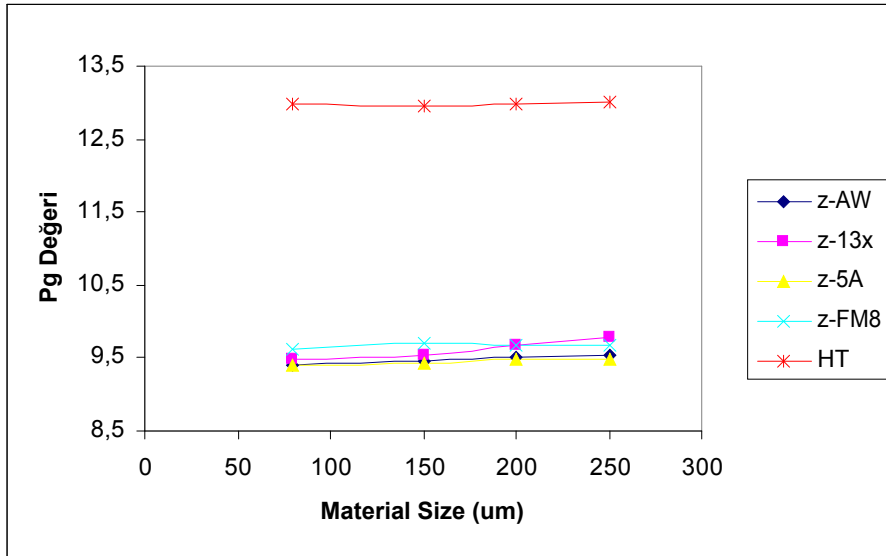
Şekil E.15. Biyodizel örneklerinde GC-MS’de yağ asidi metil ester analizi için kullanılan FAME standartı.

EK F. Tanecik Boyutunun ve Sıcaklığın Tutuklanmaya Etkisini Gösteren Grafikler.

EK F.1

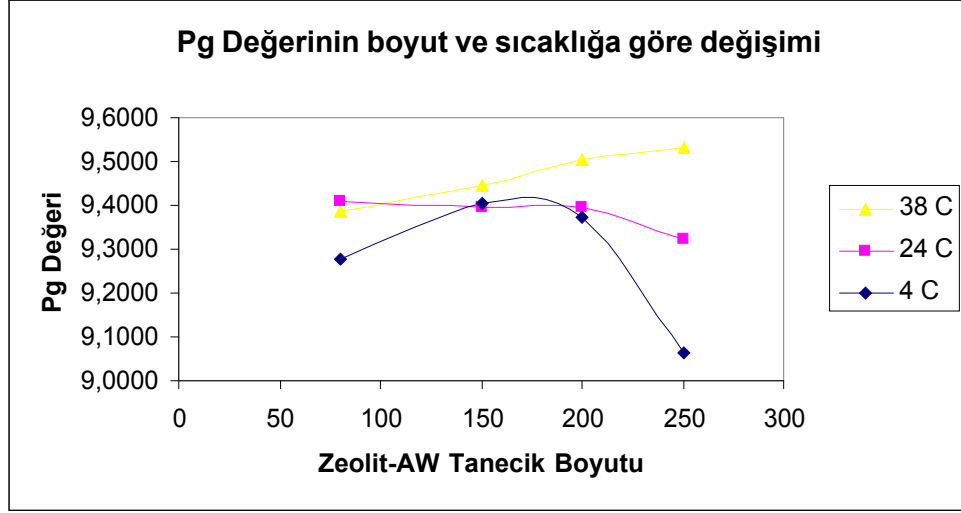


Şekil F.1. 24°C’de hidrotalsit ve zeolitlere immobilizasyon verimleri.

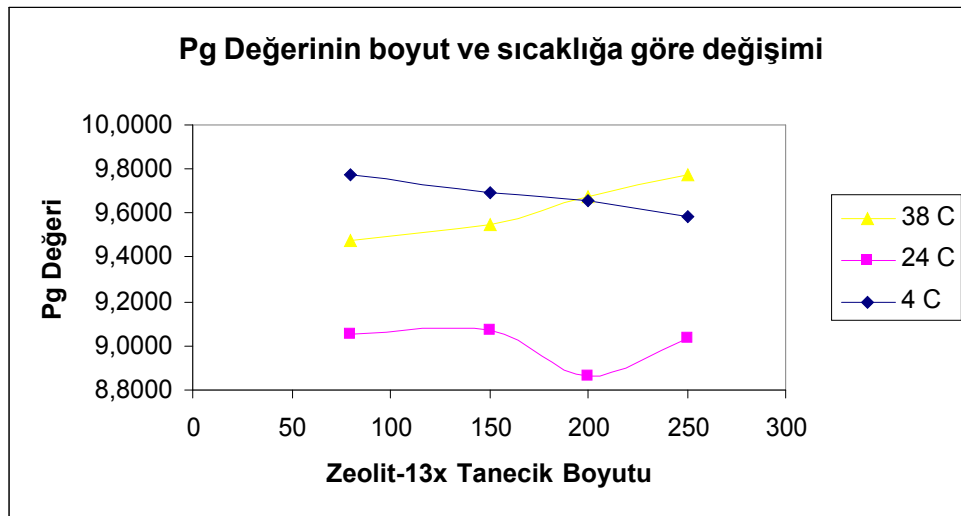


Şekil F.2. 37°C’de hidrotalsit ve zeolitlere immobilizasyon verimleri.

EK F.2

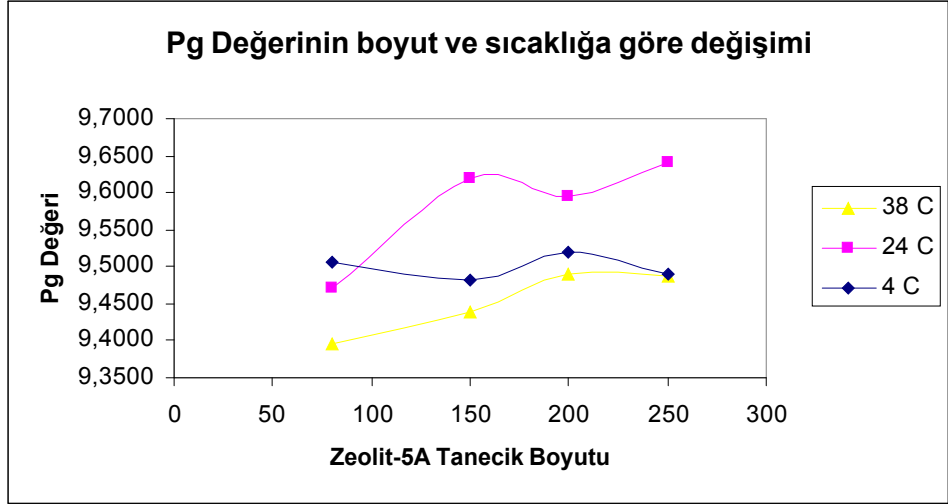


Şekil F.3. Farklı sıcaklıkların zeolit- AW 300 üzerine immobilizasyona etkisi.

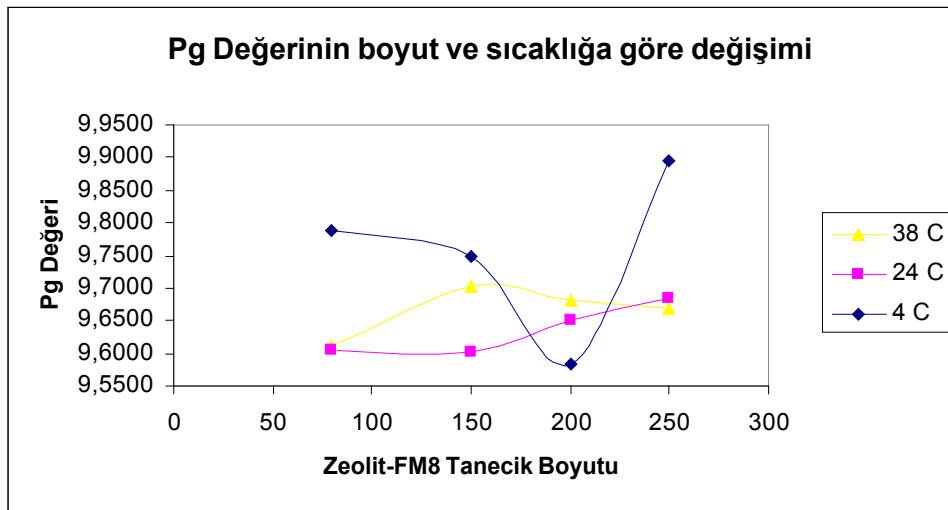


Şekil F.4. Farklı sıcaklıkların zeolit-13x üzerine immobilizasyona etkisi.

EK F.3



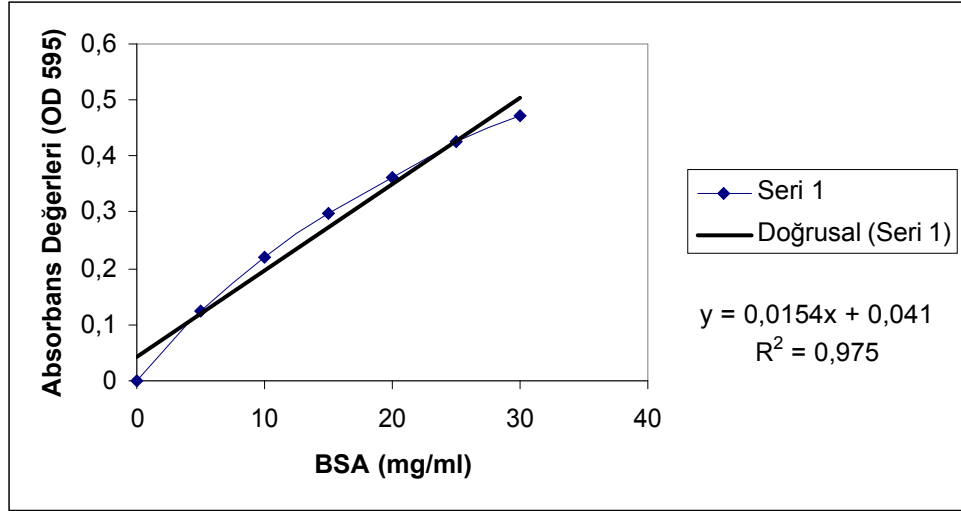
Şekil F.5. Farklı sıcaklıkların zeolit-5A üzerine immobilizasyona etkisi.



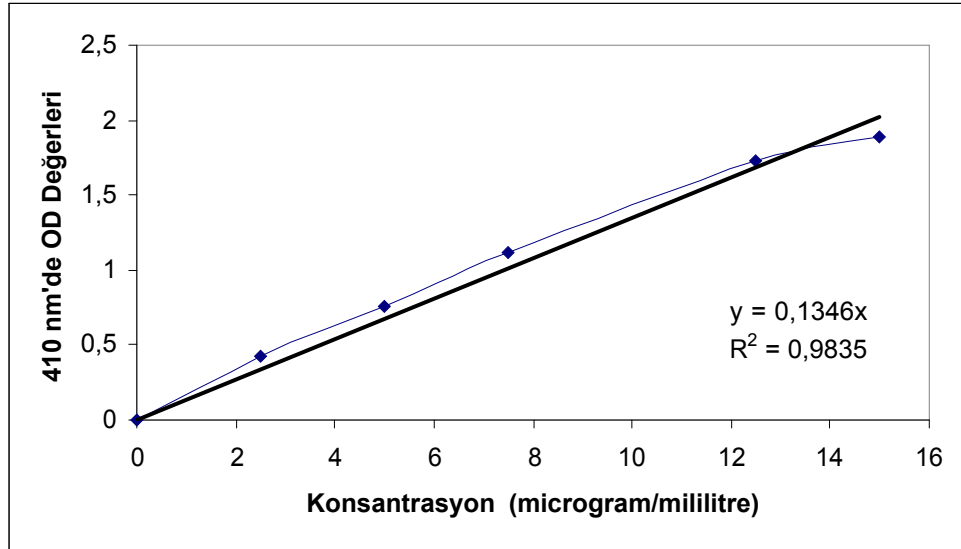
Şekil F.6. Farklı sıcaklıkların zeolit-FM8 üzerine immobilizasyona etkisi.

EK G. Protein ve Etkinlik Analizleri İçin İlgili Kalibrasyon Eğrileri.

EK G.1

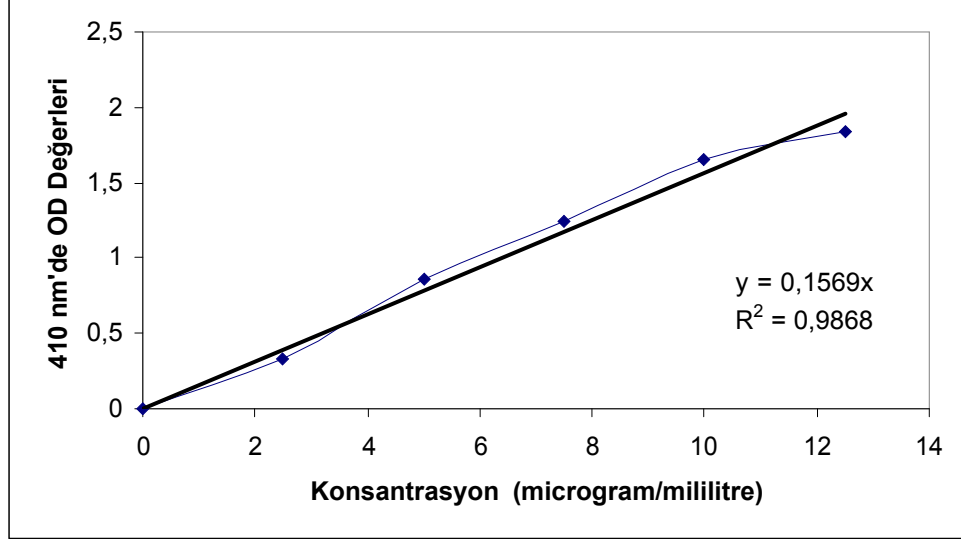


Şekil G.1. Protein analizlerinde standart olarak kullanılan BSA kalibrasyon eğrisi.

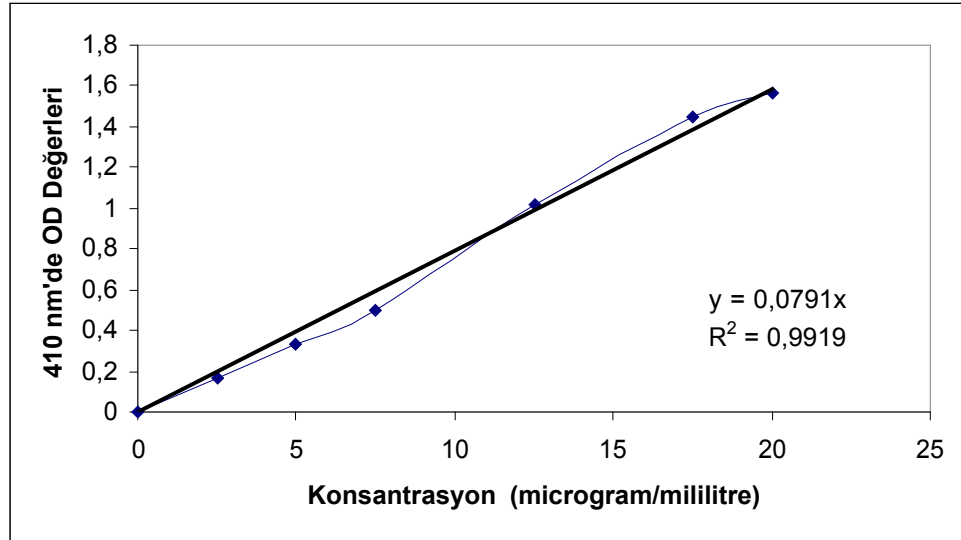


Şekil G.2. Aktivite tayini için 4-Nitrofenol'ün pH 9.0 Tris-HCl tamponundaki kalibrasyon eğrisi.

EK G.2



Şekil G.3. Aktivite tayini için 4-Nitrofenol'ün pH 8.5 Tris-HCl tamponundaki kalibrasyon eğrisi.



Şekil G.4. Aktivite tayini için 4-Nitrofenol'ün pH 7.0 Tris-HCl tamponundaki kalibrasyon eğrisi.

ÖZGEÇMİŞ

Funda YAĞIZ, 1981 yılında Bursa’da doğdu. İlköğretimini T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Atatürk İlköğretim Okulu’nda, orta ve lise öğrenimini T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Yalova Lisesi’nde tamamladıktan sonra, 1999 yılında Kocaeli Üniversitesi Müh. Fak. Kimya Mühendisliği Bölümü’ne girmiş, 2003 yılında da Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümünde yüksek lisansa başlamıştır.

15-19 Mayıs, 2006’da Yunanistan’da Chemreactor-17 Uluslar arası Kimyasal Reaktörler Kongresi’nde “Biodiesel Production From Waste Oils by Using Lipase Immobilized on Hydrotalcite and Zeolites” başlıklı makalesi ile sözlü sunuşa hak kazanmıştır. 17-18 Mayıs, 2005’te Kocaeli’de EVK-1. Enerji Verimliliği ve Kalitesi Sempozyumu’na “Lipaz Katalizörü ile Biyodizel Yakıt Üretimi” başlıklı bildirisi ile katılmıştır.

Yazar, ayrıca iyi derecede İngilizce ve Rusça bilmektedir.