



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LİPAZ ENZİMİNİN DOĞAL DESTEK MADDELERİNE
İMMOBİLİZASYONU ve BİYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANIMININ
KEMOMETRİK METODLARLA ARAŞTIRILMASI**

İBRAHİM SÜRMEİİOĞLU

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
MART-2014



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİPAZ ENZİMİNİN DOĞAL DESTEK MADDELERİNE
İMMOBİLİZASYONU ve BİYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANIMININ
KEMOMETRİK METODLARLA ARAŞTIRILMASI

İBRAHİM SÜRMELİOĞLU

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
MART-2014

T.C.
MUSTAFAKEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİPAZ ENZİMİNİN DOĞAL DESTEK MADDELERİNE
İMMOBİLİZASYONU ve BİYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANIMININ
KEMOMETRİK METODLARLA ARAŞTIRILMASI

İBRAHİM SÜRMEİİOĞLU

KİMYAANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANSTEZİ

Doç. Dr. Yasin YÜCEL danışmanlığında hazırlanan bu tez 17/03/2014 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Yasin YÜCEL
Başkan

Prof. Dr. Şana SUNGUR
Üye

Prof. Dr. Sermin ÖRNEKTEKİN
Üye

Kod No:708

Doç. Dr. İsmail Hakkı KARAHAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 1201Y0102

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

17/03/2014

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

İbrahim SÜRMEİİÖĞLU

ÖZET

LİPAZ ENZİMİNİN DOĞAL DESTEK MADDELERİNE İMMOBİLİZASYONU VE BİYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANIMININ KEMOMETRİK METOTLARLA ARAŞTIRILMASI

Yenilenebilir kaynaklardan elde edilen yakıtlara olan ilgi son on yılda özellikle fosil yakıtların tükenmesi ile ilgili endişeler nedeniyle büyük bir ilgi görmektedir. Sürekli artan maliyetler ve işlenmemiş yakıtların kullanımından kaynaklanan çevresel etkiler nedeniyle araştırmalar son yıllarda katlanarak artmıştır.

Son on yılda yüksek maliyetler nedeniyle enzimlerin uygun bir destek maddesi üzerine tutturularak defalarca kullanılabilmesi endüstriyel uygulamalar açısından önemli hale gelmiştir. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek maddesi enzime kazandırdığı biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikler nedeniyle oldukça önemlidir. Destek maddesine tutturulan enzim reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilen ve sürekli proseslere uygulanabilmektedir.

Bu çalışmada doğal destek maddesi olarak çay atığı, pamuk, lif kabağı ve talaş kullanılmıştır. Lipozyme TL-100L lipaz enzimi doğal destek maddesi örneklerine kovalent bağlama metodu kullanılarak immobilize edilmiştir. Kemometrik optimizasyon teknikleri kullanılarak enzimlerin doğal destek maddesine en uygun immobilizasyon koşulları belirlenmiştir. Ayrıca enzimlerin immobilizasyon verimliliği ve aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle hesaplanmıştır. Bunun yanında doğal destek maddelerine immobilize edilen enzimler biyodizel üretiminde kullanılmıştır.

2014, 67 Sayfa

Anahtar Sözcükler: Doğal destek maddesi, immobilizasyon, lipaz, kemometri, optimizasyon.

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF LIPASE ENZYME ON NATURAL SUPPORT MATERIALS AND INVESTIGATION OF ITS USING ON BIODISEL PRODUCTION BY CHEMOMETRIC METHODS

Fuels obtained from renewable resources have deserved a great deal of interest during the past decades mainly due to concerns about fossil fuels depletion. Research efforts have been multiplied in the last years as a consequence of constant increasing costs and environmental impact derived from the use of crude-based fuels.

In the last decade, due to high costs of enzymes, immobilization of enzymes on a suitable support material and can be reusing has become important for its industrial applications. Support material which is used immobilization of enzymes is very important because it gained biochemical, mechanical and kinetic properties to enzymes. Enzyme which is immobilized on carrier can be separated from reaction environment and can be applied to continuous process.

In this study, tea waste, cotton, loofah and wood chips are used as natural supplements. Lipozyme TL-100L immobilized onto natural support materials using covalent binding method. The optimum immobilization conditions of enzymes determined using chemometrics optimisation techniques. In addition, immobilization efficiency and activity of enzymes calculated using spectrophotometric methods. Also enzymes which immobilized onto natural support materials used in production of biodiesel.

2014, 67 Pages

Keywords: Natural support material, immobilization, lipase, chemometrics, optimisation.

TEŐEKKÖR

Tez alıőmamn her aşamasında bŸyŸk bir Ÿzveriyle bana destek olan bilgi, deneyimi ve yardım severliği ile bana yol gŸsteren danıőman hocam Sayın Doç. Dr. Yasin YÖCEL'e teőekkŸrlerimi bir borç bilirim,

YŸksek lisans dŸnemi boyunca tecrŸbe, deneyim ve bilgisiyle bana destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sermin ÖRNEKTEKİN' e teőekkŸrlerimi sunarım,

Çalıőmalarım sırasında yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Zeki AYDIN ve Yrd. Doç. Dr. Yener TEKELİ' ye teőekkŸrlerimi sunarım,

Bu bilimsel projenin gerçekleőmesine katkı sağlayan Mustafa Kemal Ÿniversitesi Fen Bilimleri EnstitŸsŸ'ne teőekkŸr ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. ENZİMLER	1
1.1.1. Enzimlerin Yapısı	1
1.1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması	2
1.1.3. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Faktörler	3
1.1.4. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği	4
1.1.5. Enzim Aktivite Ölçüm Yöntemleri	8
1.1.6. Lipaz Enzimleri	8
1.1.7. Lipaz Enzimlerinin Özellikleri	9
1.1.8. Lipazların Kullanım Alanları	9
1.2. ENZİM İMMOBİLİZASYONU	10
1.2.1. İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Maddeleri	10
1.2.2. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları	11
1.2.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	11
1.2.3.1. Çapraz Bağlama	11
1.2.3.2. Enzim Kopolimerizasyonu	12
1.2.3.3. Taşıyıcıya Bağlama	12

1.2.3.4. Jelde Hapsetme	15
1.2.3.5. Mikrokapsülleme	15
1.2.3.6. Lipozom Tekniği	16
1.4. BİYODİZEL	17
1.4.1. Biyodizel Özellikleri	18
1.4.2. Biyodizel Üretim Yöntemleri	20
1.5. KEMOMETRİ	21
1.5.1. Optimizasyon Teknikleri	22
1.5.2. Plackett-Burman Dizayn	23
1.5.3. Merkezi Kompozit Dizayn	25
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	34
3.1. MATERYAL	34
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Reaktifler	34
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	35
3.2. YÖNTEM	35
3.2.1. Doğal Destek Maddelerinin Hazırlanması	35
3.2.2. Doğal Destek Maddelerinin Modifikasyonu	35
3.2.3. Doğal Destek Maddesine Enzim İmmobilizasyon	36
3.2.3.1. Enzim İmmobilizasyonun Kemometrik Optimizasyonu	36
3.2.4. Kantitatif Protein Tayini	36
3.2.4.1. Bradford Boyasının Hazırlanması	36
3.2.4.2. Bradford Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	37
3.2.4.3. Protein Tayini	38
3.2.5. Enzim Aktivite Tayini	38
3.2.6. Biyodizel Üretimi	39

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	40
4.1. Doğal Destek Maddelerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonun Kemometrik Optimizasyonu	40
4.1.1. Doğal Destek Maddelerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonun Plackett-Burman Dizayn Analiz Sonuçları	42
4.1.2. Doğal Destek Maddelerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonu İçin Merkezi Kompozit Dizayn Analiz Sonuçları	45
4.2. Enzim İmmobilizasyonunun Kemometrik Optimizasyon Sonuçları	55
4.3. Enzimatik Biyodizel Üretimi	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
6. KAYNAKLAR	61
7. ÖZGEÇMİŞ	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	E enzimi, S substratı, ES ara bileşiği ve P ürünü göstermektedir.	5
Şekil 1.2	Lineweaver-Burk grafiği	6
Şekil 1.3	Reaksiyon hızının substrat derişimi ile değişimi.	6
Şekil 1.4	Sıcaklıkla reaksiyon hızının değişimi.	7
Şekil 1.5	Aktivasyon enerjisinin belirlenmesi.	7
Şekil 1.6	Kopolimerizasyon yöntemi.	12
Şekil 1.7	Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin gösterimi	13
Şekil 1.8	Jelde hapsetme ile enzim immobilizasyonu	15
Şekil.1.9	Mikrokapsülde tutuklama yöntemi	16
Şekil 1.10	Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu	16
Şekil 1.11	Trigliserid molekülünün transesterifikasyon reaksiyonu	17
Şekil 1.12	Merkezi kompozit tasarım noktaları	25
Şekil 1.13	Merkezi kompozit tasarım şeması	26
Şekil 3.1	Bradford kalibrasyon grafiği	37
Şekil 3.2	Enzim aktivite kalibrasyon grafiği	39
Şekil 4.1	Çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin İmmobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı	47
Şekil 4.2	Çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin İmmobilizasyonu için deneysel lipaz aktivitesine karşı tahmini lipaz aktivitesi	47
Şekil 4.3	Pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı	49
Şekil 4.4	Pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel lipaz aktivitesine karşı tahmini lipaz aktivitesi	50
Şekil 4.5	Lif aabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı	52
Şekil 4.6	Lif kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel lipaz aktivitesine karşı tahmini lipaz aktivitesi	52
Şekil 4.7	Talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı	54
Şekil 4.8	Talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel lipaz aktivitesine karşı tahmini lipaz aktivitesi.	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Lipazların farklı reaksiyonlar üzerindeki kataliz görevi	9
Çizelge 1.2	Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan destek maddeleri	10
Çizelge 1.3	TS EN 14214 otomotiv yakıtları yağ asidi metil esterlerli dizel motorlar için belirlenen standart özellikleri.	19
Çizelge 1.4	Plackett-Burman tasarımı için üreticiler	24
Çizelge 1.5	11 faktör için Plackett Burman tasarımı	24
Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	34
Çizelge 3.2	Çalışmada kullanılan cihazlar	35
Çizelge 4.1	Plackett-Burman dizayn metodunda kullanılan faktörler	40
Çizelge 4.2	Plackett-Burman dizayn tablosu	41
Çizelge 4.3	Faktörlerin optimizasyonunda kullanılan merkezi kompozit dizayn tablosu	41
Çizelge 4.4	Lipaz enziminin çay atığı desteğine immobilizasyonu için Plackett-Burman dizayn sonuçları	42
Çizelge 4.5	Lipaz enziminin pamuk desteğine immobilizasyonu için Plackett-Burman dizayn sonuçları	43
Çizelge 4.6	Lipaz enziminin lif kabağı desteğine immobilizasyonu için Plackett-Burman dizayn sonuçları	44
Çizelge 4.7	Lipaz enziminin talaş desteğine immobilizasyonu için Plackett-Burman dizayn sonuçları	45
Çizelge 4.8	Çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları	46
Çizelge 4.9	Pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları	48
Çizelge 4.10	Lif kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları	51
Çizelge 4.11	Talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları	53
Çizelge 4.12	Tüm destek maddeleri üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için bulunan optimum koşullar	56
Çizelge 4.13	Tüm destek maddeleri üzerine lipaz enziminin immobilizasyonunun optimizasyonunda kullanılan model denklemleri verilmiştir.	56
Çizelge 4.14	Tüm destek maddeleri için bulunan optimum koşullarda maksimum immobilize enzim miktarları ve lipaz aktiviteleri	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASTM	: American Society For Testing Materials
BAS	: Bovine Serum Albumine
CBB	: Coomassie Brilliant Blue
EN	: Europaen Norms
GA	: Gluteraldehit
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
PGA	: Poligluteraldehit
pNP	: Para-Nitro Fenol
pNPP	: Para-Nitrofenil Palmitat
UV-VIS	: Ultraviyole Visible Spektrofotometre
TL	: Thermomyces Lanuginosus
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu

1.GİRİŞ

1.1. ENZİMLER

1.1.1. Enzimlerin Yapısı

Enzimler, canlı organizmalar tarafından üretilen, farklı maddeler içeren, belirli bir kimyasal reaksiyonu katalizleyen veya kolaylaştıran, kendisi reaksiyondan bozulmadan ve değişikliğe uğramadan çıkabilen protein molekülleridir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Enzimler bir bölümü yalnız proteinden oluşurken diğerleri apoenzim ve koenzim denilen iki kısımdan meydana gelmektedir. Enzimlerin etkileyerek değişikliğe uğrattığı moleküle ise substrat adı verilir (Yücel, 2008).

Enzimler polipeptid zincirler halinde sentezlenmektedir. Ancak, enzimin aktivite kazanabilmesi için polipeptidin sekonder, tersiyer ve bazı hallerde kuarterner yapı kazanması gerekmektedir. Enzimlerin en önemli özellikleri katalitik güçleri ve spesifiklikleridir. Kataliz enzimin özel bölgesi olan aktif merkezde gerçekleşir. Enzimler, reaksiyonun denge sabitini değiştirmeden reaksiyon hızını arttırmaktadırlar. Organizmalardaki organik moleküllerin yapımı ve yıkımı, kas hareketleri, solunum, sindirim gibi fizyolojik olaylar enzimlerin yardımıyla yürütülmektedir (Telefoncu 1997). Bazı enzimler sadece aminoasitlerden oluşmuşken bazıları da aminoasitlerden başka gruplar ihtiva etmektedir. Enzimler protein yapısında olmasına rağmen, pek çok durumda bu protein yapısına protein olmayan daha küçük yapıları organik veya anorganik moleküllerin bağlanmasıyla oluşmuş protein yapısı gözlenir. Bu yapıda enzimin protein kısmı apoenzim, protein olmayan kısmı ise koenzim olarak adlandırılmaktadır. Apoenzim ve koenzimin birleşmesiyle meydana gelen yapıya haloenzim adı verilir. Koenzimler enzimatik reaksiyonlarda elektron alışverişi sağlarlar. Enzimin spesifik olarak etki ettiği maddeye substrat denir. Koenzim enzimin etki edeceği kimyasal reaksiyonu, apoenzim ise hangi substrata etki edeceğini tayin eder (Tekman ve Öner 1994).

Enzimin substrata bağlanması, anahtar kilit modeli ve uyarılmış uyum modeli olmak üzere iki farklı modelle açıklanır. Anahtar kilit modelinde, enzimin aktif merkezi

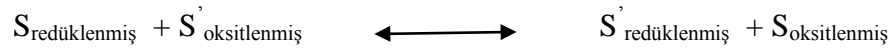
substrata birebir benzerdir. Uyarılmış uyum modelinde, enzimin aktif merkezi, enzim substrattan uzakta olduğu dönemde substrata benzerlik göstermez. Enzim substrata yaklaştıkça enzimin aktif merkezi substratın şeklini alır (Aybastier, 2010).

1.1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

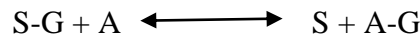
Enzimler faaliyet gösterdikleri yere göre; hücre içinde salgılanıp hücre içinde etki ediyorsa, hücre içi (endojen) ve hücre içinde salgılanıp hücre dışında faaliyet gösteriyorsa hücre dışı (eksojen) adını alır.

Enzimler sınıflandırılırken her enzime etki ettiği reaksiyon çeşidine göre 4 rakamlı bir numara verilir. 1. Numara sınıfını, 2. Numara alt sınıfını, 3. Numara grubunu, 4. Numara kendine özgü sıra numarasını veririr 3.6.1.3 ATP Fosfohidroliz gibi. Buna göre enzimler aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır.

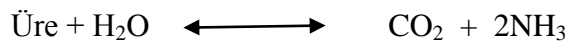
Oksidoredüktazlar: İki substrat arasında oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizlerler.



Transferazlar: Bir substrat çifti arasında (S ve A) fonksiyonel bir grubun (G) hidrojenden başka transferlerini katalizlerler.



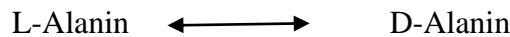
Hidrolazlar: Substratın yapısına göre eter ester peptid glikozit v.s bağları üzerine hidroliz reaksiyonlarını sağlayan enzimlerdir.



Liyazlar: Hidrolizde olandan başka bir mekanizma ile substratların bazı gruplarını ayıran enzimlerdir.



İzomerazlar: Substratların izomerleşmesini sağlarlar.



Ligazlar: Daha büyük bir molekülü oluşturmak için iki metabolitin bağlanmasını katalize eden enzimlerdir.



Kaynak:<http://www2.aku.edu.tr/~mkonuk/enzimler.pdf>

1.1.3. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Faktörler

Sıcaklık; Belli derecede bir sıcaklık artışı kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzimatik reaksiyonlarında hızını arttırıcı bir etki yapmaktadır. Bununla birlikte sıcaklık artışı enzimlerin protein yapısının bozulup denatürasyon olmasına neden olabilmektedir. Pek çok çalışma 37°C’ de yürütülür, bunun birinci nedeni vücut sıcaklığının enzimler için optimum sıcaklığı olabileceği, ikinci nedeni ise bu sıcaklığın üzerinde enzimlerin inaktivasyon oranlarının çok fazla değişmemesi etkilidir. Uluslararası Biyokimya Birliği başlangıçta 25°C’ de standart sıcaklık olarak tavsiye etmiş ancak sıcak iklimlerde enzimleri düşük sıcaklıkta tutmanın zor olmasından dolayı bu sıcaklığı 30°C’ ye arttırmıştır. Ancak hâlâ enzimlerin aktiviteleriyle alakalı sıcaklık ile ilgili çalışmalarda belli bir standardın olmadığı görülmektedir. Bunun temel nedeni enzimlerin protein yapılarının farklı olmasından kaynaklanır (Nelson, 2004).

pH; Her bir enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirli bir optimum pH derecesi vardır. Protein yapılarından dolayı enzimlerin içindeki amin ve karboksil grupları pH derecesine göre iyonlaşabilirler ve yapısal değişikliğe uğrayabilirler. Genel olarak enzimlerin optimum pH dereceleri 5-9 arasında değişmektedir.

Substrat yüzeyi ve konsantrasyonu; Bir tepkimede substrat yüzeyinin artması tepkime hızını arttırıcı özellik göstermektedir. Enzimin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini inceleyen deneysel çalışmaların sonuçları tutarlılık gösterir. Düşük substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı azalırken, yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı artar. Yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı belli bir süre sonra sabitlenmeye başlar ve sonunda aşağı yukarı sabit olur (Nelson, 2004).

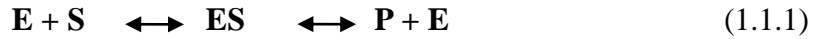
İnhibitör (Önleyici) Etkisi; Enzim reaksiyonların yavaşlatan veya engelleyen maddelere inhibitörler denir. İnhibitörler enzimlerle birleşerek, enzimleri parçalayarak enzimin substratını veya aktif maddesini bozarak önleyici etkisini yapmaktadır.

Aktivatör (Aktifleştirici) Etkisi; Enzim reaksiyonlarını hızlandıran maddelere aktivatör denir. Özellikle mangan, nikel klor ve magnezyum iyonları enzimlerin etkinliğini arttıran iyonlardır. Bazı aktivatörler, enzimin substratı ile birleşmesini kolaylaştırırken, bazıları enzimin aktif yüzeyini daha da aktif hale getirerek reaksiyon hızını arttırmaktadır (Yücel, 2008).

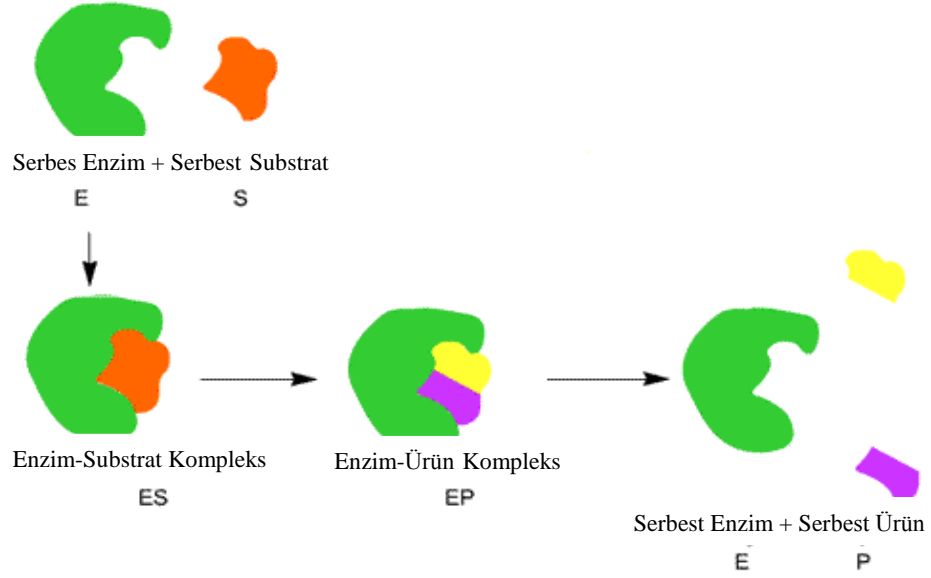
Su Etkisi; Enzimlerin büyük bir kısmı işlevlerini su içerisinde gösterdiklerinden, suyun miktarı da enzim işlevinde önemli bir parametredir. Genellikle % 15'in altında su içeren ortamlarda, enzimler işlev göstermezler. Reçel ve pekmez yapımında bu faktör önemlidir. Sulandırılan reçelin, balın ya da pekmezin mayalanması ve ekşimesi enzimlerin aktif hale geçmesinden dolayıdır (Yücel, 2008).

1.1.4. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği

Enzimler reaksiyon kinetiği ve mekanizması yönünden kimyasal katalizörlere benzerler. Reaksiyonda önce enzim ile substrat arasında bir ara bileşik oluşur. Bu kararsız ara bileşiğin oluşma hızı enzim ve substrat derişimine bağlıdır. Reaksiyon koşulları ve enzim derişimi sabit tutulurken substrat derişimi arttırılırsa reaksiyon hızı belli bir maksimum değere erişir. Bu değerden sonra, substrat derişimi arttırılsa bile reaksiyon hızında bir değişme gözlenmez. Bunun nedeni, ortamdaki enzim moleküllerinin ortam substrat moleküllerini karşılayamamasıdır. Başka bir deyişle enzim-substrat ara bileşiğinin oluşum hızında enzim derişiminin kısıtlayıcı rol oynamasıdır. Enzimlerin davranışı 1913 yılında L. Michaelis ve Menten tarafından önerilen bir mekanizmayla açıklanmıştır.



Burada; E enzimi, S substratı, ES ara bileşiği ve P ürünü göstermektedir. Bu mekanizmanın kinetik analizi 1926' da Brips ve Haldane tarafından yapılmıştır (Aydın, 2012).



Şekil 1.1. E enzimi, S substratı, ES ara bileşiği ve P ürünü göstermektedir (Aydın, 2012).

Reaksiyon hızı için;

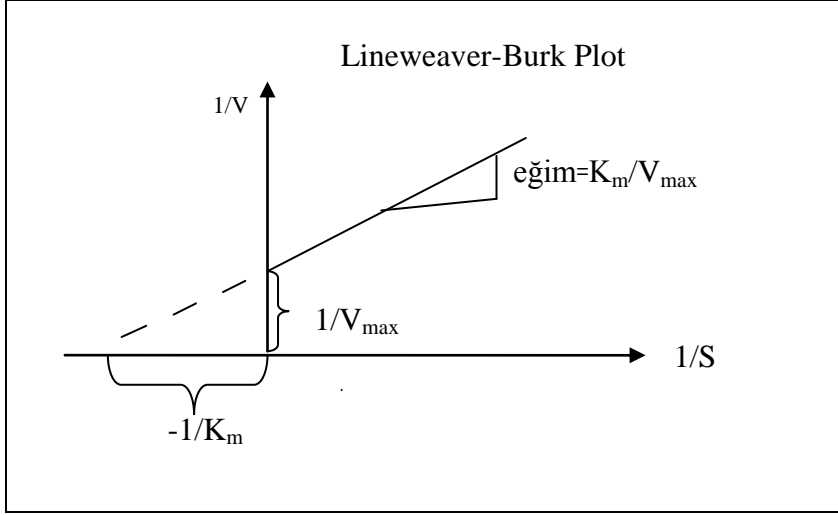
$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1.1.2)$$

Bu denklem Michaelis-Menten eşitliği ve "Km" de Michael-Menten sabiti diye tanımlanır. Fiziksel olarak Km katsayı enzim ve substratın birbirine olan ilgisini göstermektedir. Enzim ve substrat arasındaki ilgi fazla ise oldukça düşük substrat derişimlerinde enzimi substrat ile doyurmak mümkün olur (Devlin, 1997).

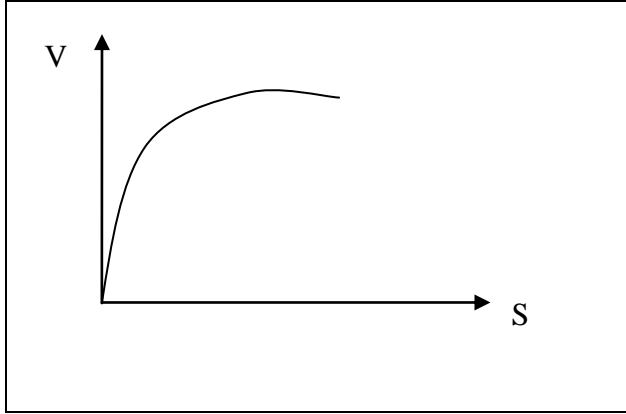
Lineerleştirmek için eşitlik (1.1.2)'nin tersi alınır ve düzenlenirse;

$$\frac{1}{V_o} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} \quad (1.1.3)$$

denklemini elde edilir. (1/S) değerine karşı (1/V) grafiği çizildiğinde aşağıdaki doğru elde edilir.



Şekil 1.2. Lineweaver-Burk grafiği (Devlin, 1997).



Şekil 1.3 . Reaksiyon hızının substrat derişimi ile değişimi (Devlin, 1997)

Michaelis-Menten eşitliği, çözünmüş substratlar ve kütle aktarımı kısıtlaması olmaya sistemler için geçerlidir. Bu nedenle çözünmüş substrat sisteminde ve immobilize enzimlerinde difüzyon kısıtlamalarından dolayı görünür K_m değeri verilir (Aydın, 2012; Bailey ve Ollis,1997).

Enzim reaksiyonlarının hızı kimyasal kinetikten farklılık göstererek, sıcaklıkla önce artar; sonra azalır (Şekil 1.4.) başka bir deyişle enzim aktivitesi belirli bir optimum sıcaklığa kadar artar, sonra ısısal deaktivasyonu nedeniyle düşer. Enzimatik

reaksiyonlar, kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi bu optimum sıcaklığa kadar Arrhenenius kanunua uyar. Bu bölgede reaksiyon hız sabiti ve maksimum hız için;

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad (1.1.4)$$

$$V_m = K_3[E]_0 \quad (1.1.5)$$

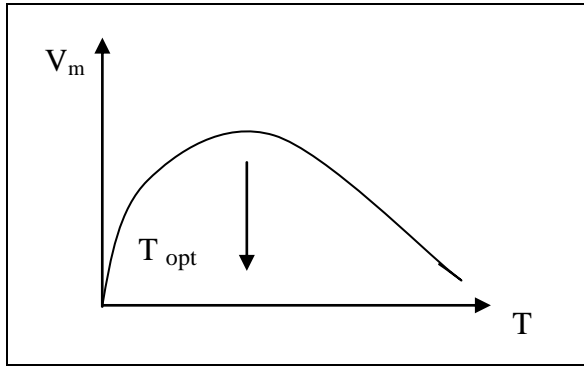
yazılır. Bu eşitliklerin birleşiminden;

$$V_m = E_3 A \cdot e^{-E_a/RT} \quad (1.1.6)$$

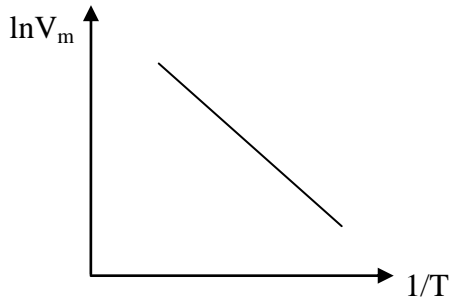
$$[E]_0 \cdot A = \alpha \quad (1.1.7)$$

$$\ln V_m = \ln \alpha E_a / RT \quad (1.1.8)$$

bulunur. Belirli sıcaklık değerlerine karşı gelen maksimum reaksiyon hızları eşitlik (1.1.8) göre grafiğe geçirilirse elde edilen doğrunun eğiminden enzimin aktivasyon enerjisi hesaplanır (Şekil 1.5).



Şekil 1.4. Sıcaklıkla reaksiyon hızının değişimi (Devlin, 1997)



Şekil 1.5. Aktivasyon enerjisinin belirlenmesi (Devlin, 1997)

1.1.5. Enzim Aktivite Ölçüm Yöntemleri

Enzim aktivite tayininde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Aktivite tayinlerinde genellikle ya kaybolan substrat miktarı ya da meydana gelen ürün miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiveleri ölçülür. Çoğunlukla hücredeki enzim proteinini tayin etmek çok zordur. Bunun yerine kaybolan substrat veya oluşan ürünü ölçerek enzim hakkında bir fikir sahibi olabiliriz. Enzim aktivite tayininde yöntem seçerken metodun pratik oluşuna ve kısa sürede yapılmasına, ayrıca hassas oluşuna da özen göstermek gerekir. Aşağıda aktivite tayininde kullanılan bazı terimler ve ne anlama geldiği belirtilmiştir.

Ünite; bir mikromol substratı bir dakikada ve optimal koşullarda ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir. Enzim üniteleri U şeklinde gösterilir (İmamoğlu, 2011).

Spesifik Aktivite; Bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilir. Spesifik aktivite; ünite/mg protein olarak tanımlanabilir. Enzim aktivite tayininde kullanılan yöntemleri yedi başlık altında toplayabiliriz. Bu yöntemler: Spektrofotometrik yöntem, Monometrik yöntem, Thunberg yöntemi, Elektrot yöntemi, Polimerik yöntem, Kromatografik yöntem ve Kimyasal tayin yöntemi olarak sıralanır (Yücel, 2008)

1.1.6. Lipaz Enzimleri

Lipazlar (EC 3.1.1.3) hidrolazlar sınıfında olup esterlerin hidrolizini katalizleyen, doğal substratları uzun zincirli yağ asidi triaçilgliserinleri olan enzimlerdir.

Yapay substratlar ile sentetik organik reaksiyonları kataliz eden birçok enzim vardır. Buna rağmen substrat çeşitliliğinin fazlalığı, kofaktör, ılımlı reaksiyon şartları ve stabilite gereksiniminin olmayışı hidrolazları en çok kullanılan enzim sınıfı yapmıştır (Vicente, 2007).

Lipaz enzimi bitkisel, hayvansal ya da mikrobiyal kaynaklı olabilir. Bu kaynaklar arasında en geniş uygulama alanı bulunan lipazlar; mikrobiyal lipazlardır. Mikrobiyal lipazlar, birçok bakteri, küf ve mantardan elde edilebilir. Bunun nedeni;

mikroorganizmaların üretiminin yetiştirilmesinin kolay olmasından ve genetiklerine müdahale edilebilmesidir. Lipazlar lipidlerin biyolojik değişiminde kilit etkiye sahiptir. Lipazlar lipidlerin biyolojik membranlarında bulunurlar ve hücre içindeki metabolizmada görev alırlar (Schmidt ve Verger, 1988).

1.1.7. Lipaz Enzimlerinin Özellikleri

Lipazların bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilmesine rağmen, mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar daha kolay ve hızlı üretilbildiğinden dolayı daha geniş uygulama alanı bulmuştur.

Lipaz enzimleri pH 4,0 ile pH 8,0' a arasında uygun çalışma aralığına sahiptirler. Bununla birlikte en yüksek çalışma sabitliğini pH 6,0-7,5 arasında göstermektedirler. Lipazların önemli bir özelliğide birkaç tür reaksiyonu katalizleyebilmesidir (Villeneuve ve ark, 2000).

Çizelge 1.1. Lipazların farklı reaksiyonlar üzerindeki kataliz görevi (Rajakumara ve ark. 2008).

Reaksiyon adı	Lipazın görevi
Hidroliz	Trigliseridlerdeki ester bağlarını hidrolizini katalizler.
Esterifikasyon	Alkoller ile yağ asitleri arasındaki esterleşme reaksiyonlarını katalizler.
Transesterifikasyon	Bir ester ile bir alkol arasındaki açıl radikalinin değiş tokuşunu katalizler.
İnteresterifikasyon	Bir ester bir başka esterin yeni bir ester oluşturmasını katalizler.

1.1.8. Lipazların Kullanım Alanları

Lipazlar; gıda, ilaç, kozmetik, deterjan endüstrisi gibi çok geniş kullanım alanına sahiptir. Lipazların sulu ve susuz ortamda biyokatalitik potansiyellerinin son yıllarda keşfedilmesiyle endüstride çok önemli hale gelmiştir.

1.2.ENZİM İMMOBİLİZASYONU

1.2.1. İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Maddeleri

Enzim immobilizasyonunda doğal ve sentetik birçok organik ve inorganik metaryal kullanılmaktadır (Aybastier, 2010). Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan destek maddeleri Çizelge (1.2)'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan destek maddeleri (Aksoy, 2003)

Anorganik	Doğal polimerler	Sentetik polimerler
Cam	Selüloz	Poliakrilamid
Kil	Albumin	Naylon
Silikajel	Nişasta	İyon değiştirici reçineler
Seramik	İpek	Epoksi reçineleri
Ponza taşı	Dekstran	Oksiranlar
Bentonit	Kitin ve kitosan	Polistiren türevleri
Hidroksiapatit	Jelatin	Vinil ve allil polimerler
Titan dioksit	Agar ve agaroz	Maleik anhidrit polimerler
Aktif karbon	Karragen	Metakrilat
Zirkonyum dioksit	Kollagen	Polivinil alkol
Nikel oksit	Alginat	

İmmobilize enzim sistemlerinin yüksek performans göstermesi için destek maddesinin seçimi çok önemlidir (Yücel,2008; Aybastier, 2010). İmmobilizasyon için seçilecek destek maddelerinin kararlı, mekanik-kimyasal ve ısıl dayanıklılık, gözenekli yapı, suda çözünmeme, düşük maliyetli olması, hidrofilik karakter, tekrar kullanıma uygun olması, pH değerinin değişmemesi, mikroorganizmalara karşı dirençli olması gereken en önemli özelliklerindendir (Mateo ve ark, 2007).

1.2.2. Enzim İmmobilizasyonu Avantajları

Enzim immobilizasyonu, enzimlerin stabilitesinin artması ve daha küçük bir hacimde daha derişik enzim bulunmasını sağlayarak verimliliği arttırır. İmmobilize enzimler serbest enzimlere göre pH değişimlerine ve sıcaklığa karşı daha dayanıklıdırlar. İmmobilize edilen enzimlerin sağladığı avantajlar aşağıda sıralanmıştır.

- İmmobilize edilen enzim tekrar tekrar kullanılabilir.
- Enzimin katalitik gücü büyük ölçüde sabitlenir.
- Ürünler saf olarak kolaylıkla elde edilir.
- Enzimin ortam koşullarına (sıcaklık, pH, organik maddeler) karşı dayanıklılığı artar.
- Sürekli proseslere uygulanabilir.
- İmmobilize enzim reaksiyon sonunda ortamdan kolayca ayrılabilir.
- Birbirini takip eden çok basamaklı reaksiyonlarda kullanılabilir.
- Seçici olarak maddelerin sentezine imkan sağlar.
- Üretim maliyeti düşer.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutularak ürün inhibisyonu önlenebilir.
- İmmobilize enzim serbest enzime göre daha kararlıdır.
- İmmobilize enzim bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterebilir (Telefoncu, 1997).

1.2.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

1.2.3.1. Çapraz Bağlama

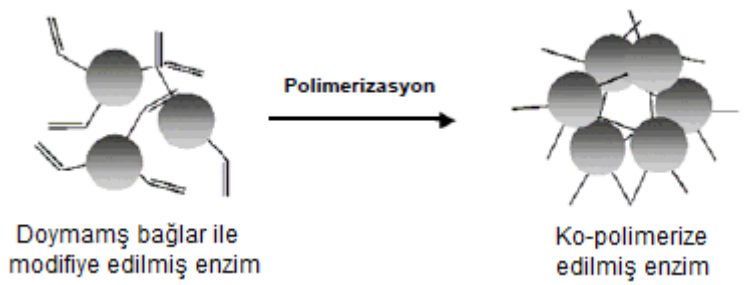
Çapraz bağlama yönteminde immobilizasyon, proteinlerin çözünmeyen destek matrisindeki proteinlere veya fonksiyonel gruplara moleküller arası çapraz bağlanmasıyla sağlanır. İki ve daha çok fonksiyona sahip bileşikler, enzimlerin molekülleri arasına çapraz bağlanmayı sağlayan maddeler olarak kullanılır (Özçömlekçi, 2006). Çapraz bağlama derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH'a ve immobilize edilecek enzime oldukça bağımlıdır.

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, klorformat ve karbonilimidazol, heterosiklik halojenler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorohidrinlerdir. Kolay bulunması ve pahalı olmayışından dolayı en çok kullanılan çapraz bağlama reaktifi glutaraldehittir.

Çapraz bağlama yönteminin dezavantajları; çapraz bağlama reaksiyonun kontrolünün zor olması, enzimin aktivite kaybına uğramasının kolay olması ve fazla miktarda enzime ihtiyaç duyulmasıdır.

1.2.3.2. Enzim Kopolimerizasyon

Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır. Yöntem polimer matrikse tutuklanmaya benzemekle birlikte enzim kaçışının önlenmesi gibi üstünlüğü vardır (Telefoncu, 1997).



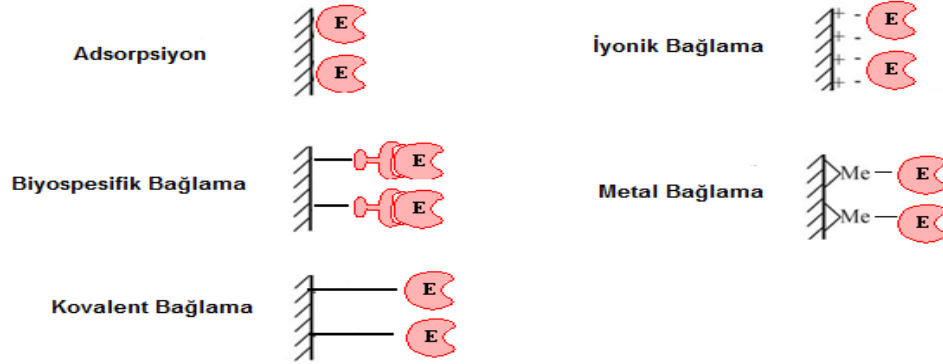
Şekil 1.6. Kopolimerizasyon yöntemi (Cao, 2005)

1.2.3.3 Taşıyıcıya Bağlama

Taşıyıcı bağlama uygulanan en eski immobilizasyon yöntemidir. Adsorpsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama olarak beş gruba ayrılmaktadır. Bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar. Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Eğer kullanılacak olan taşıyıcı aktif değil ise uygun reaktifler

kullanılarak taşıyıcı reaktif hale getirilerek immobilizasyonda kullanılır. Enzim ve taşıyıcı arasında gerçekleşecek olan reaksiyonun, oda sıcaklığı ve nötral pH gibi ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesine dikkat edilmelidir (Telefoncu, 1997).

Taşıyıcı bağlama yöntemi; adsorpsiyon, iyonik bağlama, metal bağlama(şelat), kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama(affinite) olarak beş gruba ayrılır.



Şekil 1.7. Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin gösterimi (Şengül, 2013).

Adsorpsiyon; enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Taşıyıcı ile enzim arasında tersinir yüzey etkileşimleri ile oluşur. Moleküller arasında van der waals, iyonik ve hidrojen bağı gibi güçler etkindir (Aybastier, 2010). Yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, gözenekli cam, kül, silikajel, CaCO₃, nişasta, gluten gibi) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak ortamdan uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Klibanov, 2001). Yöntemin, basit, hızlı ve ucuz olması, taşıyıcının tekrar tekrar kullanılabilmesi gibi avantajları vardır. Optimum koşulların belirlenmesindeki zorluk, enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma olmaması durumunda enzimin serbest hale geçerek reaksiyon ortamında ürünleri kirletmesi gibi dezavantajları vardır (Öztürk ve ark, 2007).

İyonik bağlama; iyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen destek maddelerine enzimin iyonik olarak bağlanması temeline dayanan bir yöntemdir (Wang, 1993). İyonik bağlamada ılımlı koşullarda gerçekleştirildiğinden enzim konformasyonuna ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. İyonik bağlanma ile enzimin destek maddesine bağlanması adsorpsiyondan daha güçlü bir bağlanmadır.

Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ çok güçlü olmadığından enzim kaçılabilmektedir (Telefoncu, 1997).

Metal Bağlama (Şelat); bu yöntemin esas destek maddesinin yüzeyini aktifleştirmek ve enzimin destek maddesine bağlanmasını sağlamak amacıyla bazı geçiş metallerinin (titanyum (III), titanyum (IV), zirkonyum (IV)) iyonlarının kullanılmasına dayanır. Bu iyonlar destek maddesi ile enzim arasında köprü vazifesi görür (Kennedy ve ark, 1983).

Biyospesifik bağlama; biyolojik sistemlerdeki gelişmiş biyospesifik etkileşme veya tanıma sistemleri kullanılarak yapılan immobilizasyon tekniğidir. Bir enzimin, antikor veya lektinler kullanılarak immobilizasyonu biyospesifik bir immobilizasyondur. Burada kullanılan lektinler belirli karbohidrat dizisine sahip enzimlere etkili bir şekilde bağlanabilir. Son zamanlarda monoklonal antikorlar kullanılarak da biyospesifik immobilizasyon yapılmaktadır (Telefoncu, 1997).

Kovalent Bağlama; bu yöntemde immobilizasyon, enzimin destek maddesine kovalent bağlanması sonucu enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir. Kovalent bağlama yöntemi, enzim molekülü ile destek arasındaki bağın kararlı olmasından dolayı enzimin destek yüzeyinden ayrılması çok zor olur bu nedenle immobilizasyonda en yaygın kullanılan yöntemlerden birisidir. Kovalent bağlanmada en önemli nokta bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olması ve bağlanma sırasında sterik engellemeler nedeniyle bu grupların pasifleştirilmemesidir (Huang ve ark, 2008)

Kovalent bağlama yönteminin avantajları;

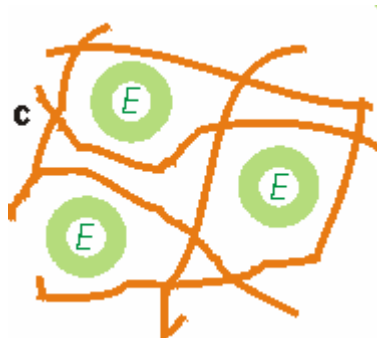
- Kovalent bağlanmadaki bağlar çok sıkı olduğundan ortamdaki yüksek iyon hareketleri çözücü veya substratın bulunması durumunda bile enzim destekten sızmaz.
- Enzim, destek yüzeyindeki belirli bölgelere lokalize olduğundan dolayı enzim ile substratın karşılaşma ihtimali artar.
- Enzim ile destek arasındaki kuvvetli etkileşimden dolayı enzimin sıcaklığa olan kararlılığı artar.

Kovalent bağlama yönteminin dezavantajlar;

- Enzim molekülü ile destek arasındaki kuvvetli etkileşimler, enzim hareketinde kısıtlamaya neden olabilmekte ve aktiviteyi düşürmektedir.
- İmmobilizasyon için optimum koşulların bulunması zordur.
- Kısmi modifikasyondan dolayı enzim moleküllerinin aktif yapılarında bozulma olabilmektedir (Gök, 2011).

1.2.3.4. Jelde Hapsetme

Çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece çözeltiye geçmeleri engellenmektedir (Noureddini ve ark. 2005). Aşağıdaki şekilde jelde hapsetme ile enzim immobilizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Jelde hapsetme ile enzim immobilizasyonu (Ayla, 2011).

1.2.3.5. Mikrokapsülleme

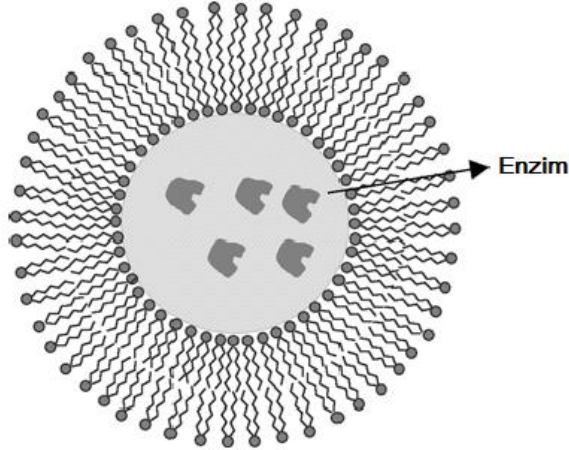
Mikrokapsülleme yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanmaktadır. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μ arasında değişmektedir. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır (Chang, 1976).



Şekil 1.9. Mikrokapsülde tutuklama yöntemi (Ayla, 2011).

1.2.3.6. Lipozom Tekniği

Lipozom tekniği, sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanmaktadır. Dönüşümlü ve tamamen fiziksel bir yöntemdir. Oldukça büyük bir temas yüzeyine sahip olup, aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlamaktadır. Substrat ve ürünün membrandan geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin aktivesini kaybetmesi ve sıvı olan membrandan enzimin kaçma olasılığının olması bu yöntemin dezavantajlarıdır (Luisi ve Magid, 1986).

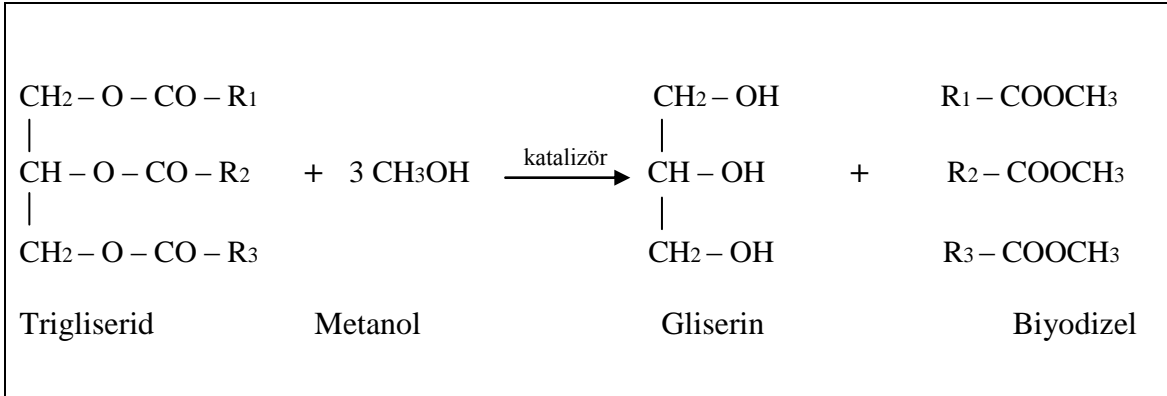


Şekil 1.10. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu (Alagöz, 2006).

1.4. BİYODİZEL

Hayvansal yağlar ile soya fasülyesi, kolza, ayçiçeği gibi bitkisel ürünlerin yağları, katalizör (NaOH, KOH) eşliğinde metanol ile reaksiyonu sonucu meydana gelen yağ asidi metil esterleri biyodizel olarak adlandırılır. Biyodizel, dizel makinalarda kullanılmak için üretilen motorine alternatif bir yakıttır.

Kimyasal olarak biyodizel; uzun zincirli yağ asitlerinin mono alkil esterleri olarak tanımlanırlar (Haşimoğlu ve ark, 2008). Baştaki ‘‘biyo’’ kelimesi yakıtın yenilenebilir ve biyolojik olduğunu, ‘‘dizel’’ kelimesi ise dizel motorlarında kullanılabilirliğini ifade etmektedir (Çanakçı ve Özsezen, 2005). Biyodizel üretiminde gerçekleşer transesterifikasyon reaksiyonu aşağıdaki gibidir.



Şekil 1.11. Trigliserid molekülünün transesterifikasyon reaksiyonu (Aybastier, 2010).

Transesterifikasyon reaksiyonunda stokiyometrik olarak 1 mol trigliserid için 3 mol metanol kullanılır. Ürün olarak 3 mol yağ asidi metil esteri (biyodizel) ve 1 mol gliserin oluşur (Barnwal, 2005).

Bitkisel ve hayvansal yağlardan üretilen biyodizel, kimyasal yapısı dizele benzemese de, işlev bakımından dizel yakıt ile benzer özelliklere sahip bir yakıttır. Petrol içermez saf çevre dostu bir yakıttır. Saf olarak ya da dizel yakıt ile her oranda kullanılabilir ve motorda fazla bir değişiklik yapmaya gerek kalmaz (Karaosmanoğlu 2003).

Biyodizel saf ve dizel-biyodizel karışımları şeklinde yakıt olarak kullanılmaktadır. Bu yakıtlar aşağıdaki gibi adlandırılmaktadır:

B5 : %5 Biyodizel + %95 Dizel

B20 : %20 Biyodizel + %80 Dizel

B50 : %50 Biyodizel + %50 Dizel

B100 : %100 Biyodizel

Günümüzde yaşanan küresel iklim değişikliği sorunu, hava ve su kalitesindeki düşüş ve insan sağlığı sorunları yenilenebilir, emisyonlarıyla temiz, çevreci alternatif yakıt biyodizel kullanımını hızla hayata geçirmiştir. Aynı zamanda ekonomik ve politik yaklaşımlar da fosil kökenli yakıtlara alternatif yakıtları destekler yönde değişmiştir. Böylece biyodizel tüm dünya ülkelerinde kabul görerek yaygın kullanım alanına sahip olmuştur (Şen, 2012; Kafadar, 2010).

1.4.1. Biyodizelin Özellikleri

Biyodizel orta uzunlukta C16-C18 yağ asidi zincirlerini içeren metil veya etil ester tipi bir yakıttır. Biyodizel ağırlıkça % 11 oksijen içerir. Oksijenli zincir yapısı biyodizeli, petrol kökenli yakıttan ayırır. Biyodizel, motorine yakın ısıl değere, motorinden daha yüksek alevlenme noktasına sahiptir. Bu özellik biyodizeli kullanım- taşıma-depolamada daha güvenli bir yakıt yapar (Sabancı, 2006).

Biyodizelin yakıt olarak kullanılmasındaki en büyük özelliği diğer fosil yakıtlar gibi sera etkisini çok daha az göstermesidir. Biyodizeli oluşturan metil esterleri doğada kolayca ve hızlıca bozunur. Suya bırakıldığında biyodizelin 28 günde %95'i, motorinin ise %40'ı bozunabilmektedir (Ölçüm, 2006). Biyodizeldeki yoğunluk yağların cinsine göre farklılık göstermekle beraber 15 °C de 880-920 kg/m³ arasındadır. Depolama yöntemi ise motorinki ile aynıdır. Ancak dizelin alevlenme noktası 55 °C iken biyodizelin alevlenme noktası 160-250 °C olup daha güvenilirdir. Bitkisel yağ esterlerinin viskoziteleri motorinden daha yüksek olup özellikle kış aylarında dizel motorlarda sorun çıkarmaktadır. Bunun için biyodizelin farklı yöntemlerle viskozitesinin azaltılma işlemi yapılmaktadır. Biyodizelde setan sayısının motorinden daha yüksek olması, viskozite ve düşük yanma verimini kısmen tolere etmektedir. (Anonim 2008).

Biyodizel için çeşitli ülkeler standartlar oluşturmuştur. Bu standartlarla ilgili; Amerika ASTM D-6751 (American Society for Testing and Materials) standardını, AB ise EN 14214 standardını belirlemişlerdir. Aşağıdaki çizelgede yakıt olarak kullanılan biyodizel için AB standartlarının Türkiye'ye uyumlu TS EN 14214 otomotiv yakıtları yağ asidi metil esterleri dizel motorlar için belirlenen standart özellikleri verilmiştir. (TS-EN 14214:2005).

Çizelge 1.3. TS EN 14214 otomotiv yakıtları yağ asidi metil esterlerli dizel motorlar için belirlenen standart özellikleri.

Özellik	Birim	En az	En çok	Test Metodu
Ester içeriği	% (m/m)	96.5	-	EN 14103
Yoğunluk, 15 °C	kg/m ³	860	900	EN ISO 12185
Kinematik viskozite, 40°C	mm ² /s	3.50	5.00	EN ISO 3104
Parlama Noktası	°C	120	-	EN ISO 3679
Kükürt içeriği	mg/kg	-	10	EN ISO 20846
Karbon kalıntı	% (m/m)	-	0.30	EN ISO 10370
Setan sayısı		51	-	EN ISO 5165
Sülfat kül içeriği	% (m/m)	-	0.02	ISO 3987
Su içeriği	mg/kg	-	500	EN ISO 12937
Toplam kirlilik	mg/kg	-	24	EN 12662
Bakır şerit korozyonu	-	1		EN ISO 2160
Oksidasyon kararlılığı 110 °C	Saat	6.0	-	EN 14112
Asit değeri	mg KOH/g	-	0.5	EN 14104
İyot değeri	g iyot/100 g	-	120	EN 14111
Linolenik asit metil esteri	% (m/m)	-	12	EN 14103
Yüksek doymamış (≥4 çift bağ)	% (m/m)	-	1	
Metanol içeriği	% (m/m)	-	0.20	EN 14110
Monogliseric içeriği	% (m/m)	-	0.80	EN 14105
Digliseric içeriği	% (m/m)	-	0.20	EN 14105
Trigliseric içeriği	% (m/m)	-	0.20	EN 14105
Serbest gliserin	% (m/m)	-	0,02	EN 14105
Toplam gliserin	% (m/m)	-	0,25	EN 14105
Grup I Metalleri (Na+K)	mg/kg	-	5.0	EN 14108
Grup II Metalleri (Ca+Mg)			5.0	EN 14109
Fosfor içeriği	mg/kg	-	10	EN 14107

Kaynak: Türk Standartları Enstitüsü (TSE)

1.4.2. Biyodizel Üretim Yöntemleri

Seyreltme; yağlar, yakıt olarak kullanılabilmesine rağmen vizkozitelerinin büyüklüğünden dolayı dizel yakıt olarak kullanılabilmeleri için seyreltme işlemine ihtiyaç duyarlar. Bitkisel ve atık yağların dizel yakıtı ile belli oranlarda karıştırılarak inceltilmesi işlemine seyreltme denir. Seyreltme işlemi yapılan karışımın B20, B30, B40 gibi örnekleri kullanılmakta ve maliyeti dizele göre daha düşüktür (Şeker 2008). Karışım dizele göre daha çevrecidir ve dizel yakıtın özelliklerine yakın yakıt özelliği göstermektedir.

Mikroemilsüyon; bu yöntem 1- 150 nm boyutundaki iki karışmayan sıvının bir veya daha fazla iyonik ya da iyonik olmayan organik karışımlarla, sıvı mikro yapılarının birbiri içerisinde dengeli olarak koloidal dağılımı olarak tanımlanır (Schwab ve ark, 1987). Genel olarak yöntemde bitkisel yağlar, dizel yakıtlar; metanol, etanol, propanol gibi kısa zincirli alkollerle mikroemilsüyon oluşturulur ve vizkozitede aynı zamanda düşürülmüş olur. Bu yöntemin avantajları düşük vizkozite ve yüksek setan sayısına ulaşmasıdır. Yanmanın eksik olabilmesi ve karbon birikimi olması ise yöntemin dezavantajlarındanır.

Piroliz; kompleks yapıların, oksijensiz ortamda ve yüksek sıcaklıkta (450 – 850 °C) basit bileşenlere dönüştürülmesi olarak tanımlanır. Bu işlem sonucunda vizkozite düşer ve setan sayısı artar. Bitkisel yağlar, hayvansal yağlar, doğal yağ asitleri ve yağ asitlerinin metil esterleri pirolizlenebilirler (Bartan, 2009). Bu yöntemin en büyük dezavantajı maliyetin yüksek olmasıdır.

Transesterleşme; bitkisel yağ ve alkolün katalizör eşliğinde yağ asidi, alkil esterleri ve gliserin oluşum reaksiyonu olarak tanımlanır. Reaksiyonda yüksek vizkotiye sahip gliserin ayrılarak düşük vizkoziteye sahip fosil yakıtı benzer yakıt elde edilir (Yücel, 2008). Transesterleşme metodu, alkali katalizör, asit katalizör, biyokatalizör, heterojen katalizör veya süperkritik alkol gibi farklı katalizörler kullanılarak oluşturulabilmektedir (Fukada ve ark.2001).

Asit katalizörlü biyodizel üretim yönteminde herhangi bir mineral asit kullanılabilmeyle beraber en çok sülfirik asit (H₂SO₄), sülfonik asit (RSO₃H) ve hidroklorik asit (HCl) kullanılmaktadır. Bu yöntemin en büyük avantajı yüksek oranda

ester oluşumudur. Dezavantajları ise gliserinün ortamdan ayrılmasının güçlüğü ve asidik ortam oluşumudur.

Baz katalizörlü biyodizel üretim yönteminde katalizör olarak, sodyum hidroksit veya potasyum hidroksit kullanılır. Yöntem, çok yüksek olmayan sıcaklıkta (60 °C), yüksek ester dönüşümü sağlaması, üretim maliyetinin düşük olması ve reaksiyon süresinin kısa olması gibi avantajlara sahiptir (Aybastier, 2010). Yine gliserinin ortamdan uzaklaştırılmasındaki zorluklar, sabunlaşma, saflaştırma gibi dezavantajları vardır.

Süperkritik akışkan metanol kullanılarak biyodizel üretiminde, katalizör kullanılmadan süperkritik akışkan hale getirilmiş metanolla yağ reaksiyona girer. Süperkritik akışkan metanol ile biyodizel üretimi 240-500 °C sıcaklıkta ve 7-105 MPa basınçta elde edilir (Aybastier, 2010). Bu yöntemin en büyük avantajı ürünlerin kolayca ayrılabilir olmasıdır. Yüksek enerji maliyeti ve yüksek sıcaklıklarda esterlerde meydana gelen termal bozunmalar ise yöntemin dezavantajlarıdır.

Enzim katalizli biyodizel üretimi hem hücre içi hemde hücre dışı lipazlarla gerçekleştirilmektedir. Hücre dışı lipaz, öncelikle sıvı besi yerindeki mikroorganizmadan elde edilen enzim daha sonra saflaştırılarak üretilir. Hücre içi lipaz mikroorganizmanın kendisini ifade eder. Reaksiyon ortamında mikroorganizma kullanılır. Her iki yöntemde de enzimler uygun destek maddesine tutturularak defalarca kullanılabilir (Dizge ve Keskiner, 2008). Lipazlar trigliserid hidrolizi, transesterleşme ve esterleşme tepkimelerinde kullanılabilir. Son yıllarda, kimyasal transesterleşmedeki bazı dezavantajlardan dolayı enzimatik transesterleşme birçok araştırmacının ilgi odağı olmuştur (Akbin, 2012). Destek üzerindeki enzimin defalarca kullanılması, yüksek saflıkta ester oluşumu, düşük sıcaklıkla çalışma şartları ve gliserinin kolayca ayrılması bu yöntemin avantajlarındandır. Bu şartlar bu yöntemi diğer yöntemlere çok cazip kılmakla beraber yöntemde kullanılan enzimin maliyetinin yüksekliği yöntemin dezavantajı olmuştur.

1.5. KEMOMETRİ

Günümüzde gelişen teknolojiye paralel olarak analitik cihazlardan elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve yorumlanması deneysel çalışmalarını yapmak kadar büyük önem taşımaktadır. Üretilen veriler çok değişkene bağlı olarak elde ediliyorsa uygun

veri değerlendirme metotlarının kullanılması zorunlu olmaktadır. Bu metotlar arasında 1970’li yıllardan sonra araştırma ve endüstriyel alanlarda kullanılmakta olan kemometrik yöntemler büyük yer işgal etmektedir. Kemometri; bilgisayar, istatistik ve matematiksel yöntemlerin kimyasal verilere uygulanmasıdır. Ne var ki, tüm bu metotların limitleri ve varsayımları tam olarak anlaşılmadan kimyasal problemlerin çözümüne yönelik istatistiksel metotların kullanılması uygun olmamaktadır. Kimyasal veriler tek değişkenli olabildiği gibi çoğu zaman birçok değişkene bağlı olabilmektedir. Bu değişkenlerin her birinin analiz başlangıcında eşit öneme sahip olduğu önemle düşünölen bir noktadır. Çok değişkenli verilerin analizinde çoğu zaman kemometrik metotlar kullanılmaktadır (Demir, 1997).

Kemometri yöntemlerinde veriler genellikle matrix formundadır. Satır ve sütunlardan oluşan matrix yapıları kimyasal verileri karakterize etmektedir. Matrixler vektörlerden oluşmaktadır. Vektörler küçük, koyu ve italik simgelerle gösterilirler. Matrixler ise büyük, koyu ve italik simgelerle ifade edilir. Çok değişkenli veri analizinde ham veri X simgesiyle gösterilir. Bu verinin boyutları $I \times J$ şeklinde ifade edilir. Burada I örneği, J ise değişkeni gösterir. Konsantrasyon vektörleri ise y simgesiyle gösterilir. Eğer birden fazla konsantrasyon vektörü varsa simge Y şeklini alır ve konsantrasyon matrixi olarak isimlendirilir (Demir, 1997).

1.5.1. Optimizasyon Teknikleri

Klasik yöntemlerle deneysel optimizasyon yapılırken değişkenlerden biri sabit tutulurken diğer değişkenler farklı oranlarda alınarak bu değişkenlerin etkileri incelenir. Bu işlem her bir değişken için tekrarlanır. Fakat klasik yöntemlerde parametreler arasında da etkileşim olabileceği ve eğer etkileşim oluyorsa bu iki parametre arasındaki etkileşimin diğerlerini etkileyebileceği hesaplanamamaktadır. Bu nedenle bu yöntem yeterli değildir. Kemometrik tekniklerde ise; hangi parametreler etkilidir, bu parametrelerin etkisi ne kadardır ve bu parametrelerin etkileşim miktarları ne ölçüdedir gibi sorulara yanıt aranmaktadır. Bu amaca yönelik bir çok kemometrik optimizasyon tekniği geliştirilmiştir (Brereton, 1990).

Kemometrik optimizasyon tekniklerinde optimum koşulların sağlanabilmesi için deneysel dizaynlar oluşturulur. Bu dizaynlar deneysel çalışmanın planlı bir şekilde,

zaman kaybı olmadan ve yeterli sayıda yapılmasını sağlar. Değişik amaçlara yönelik çeşitli deneysel dizayn yöntemleri vardır (Brereton, 1990).

Deneysel dizaynın önemi dört maddede açıklanabilir. Bunlar; tarama, optimizasyon, zaman tasarrufu ve modelleme olarak sıralanmaktadır. Bu tasarımlar deneysel çalışmalarda sonucu etkileyen önemli faktörleri belirlemek için kullanılır. Örneğin bir kimyasal reaksiyonun verimini etkileyen faktörler; kullanılan reaktif konsantrasyonu, katalizör konsantrasyonu, sıcaklık, pH, reaksiyon süresi, karıştırma hızı, vb. 10 faktör etkilediği dikkate alındığında bu faktörlerden hangileri önemlidir, hangileri elimine edilebilir ve hangileri ayrıntılı incelenmelidir gibi soruların cevapları “faktöriyel” ve “Plackett-Burman” tasarımları ile verilebilir. Optimizasyon çalışmalarında tarama tasarımları ile bulunan önemli faktörlerin optimum değerleri bulunarak reaksiyon sonunda ulaşılmak istenen verim iyileştirilebilir. En yaygın kullanılan optimizasyon yöntemleri “simplex optimizasyonu” ve “merkezi kompozit tasarımı”dır. Deneysel çalışmalarda faktörlerin etkisi klasik yöntemle bir faktörün değerini değiştirme diğerlerini ise sabit tutma yöntemi ile de belirlenebilir. Ancak çok sayıda faktör incelendiğinde bu yöntem zaman alıcı ve maliyetli olmaktadır. Bu açıdan kemometrik optimizasyon zaman tasarrufu sağlamaktadır. Tarama tasarımı ve optimizasyon sonucu her bir faktörün etkisi matematiksel modelle ifade edilebilir. Böylece deneysel olarak bulunan sonucun yanında hesapla tahmini sonuç da bulunmuş olur. Beklenen sonucun deneysel olarak gerçekleştirilip gerçekleştirilemediği kontrol edilir (Demir ve Özdemir, 2012).

1.5.2. Plackett-Burman Dizayn

Çok sayıda faktörün etkisi incelenmek istendiğinde full faktöriyel ve fraksiyonel faktöriyel tasarım yöntemlerin pratik olarak uygulanması zorlaşmaktadır. Sadece faktörlerin kendi etkileri incelendiği, yani faktörler arasındaki etkileşimlerin önemli olmadığı durumlarda Plackett-Burman tasarımı pratik olarak uygulanabilir. Bu tasarımda geçerli olan deney sayısı, faktör sayısı ve üretici Çizelge 1.4’te gösterilmiştir.

Çizelge 1.4. Plackett-Burman tasarımı için üreticiler (Demir ve Özdemir, 2012).

Deney sayısı	Faktörler	Üretici
8	7	+++ - + - -
12	11	+ + - + + + - - - + -
16	15	+ + + + - + - + + - - - -
20	19	+ + - + + + + - + - - - - + + -
24	23	+ + + + + - + - + + - - + + - - - - -

11 faktör ve 12 deneyi içeren Plackett Burman tasarımı Çizelge 1.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 1.5. 11 faktör için Plackett Burman tasarımı (Demir ve Özdemir, 2012).

Deney	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	x ₇	x ₈	x ₉	x ₁₀	x ₁₁
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bu tasarımın bazı özellikleri vardır. Birinci satır aynı seviyeye sahiptir (-1 veya +1). İkinci satır üretici satırdır. Çizelge 1.4'teki üreticilerden birisi kullanılır. Faktör sayısı her zaman tek sayı ve deney sayısı faktör sayısından bir fazladır. Üçüncü satır ikinci satırın bir yana kaydırılması ile elde edilir(Çizelge 1.5). Bütün faktörler için yüksek ve düşük seviye sayısı eşittir. Bu da kolonların birbiri ile ortogonal (kolonlar birbirinden bağımsız) olduğunu gösterir.

Plackett-Burman tasarımı faktör sayısı deney sayısından bir düşüktür. 11 faktör için 12 deney yapmak gerekir. Ancak gerçekte 10 faktör var ise 11. faktör sonuç üzerinde herhangi bir etkisi olmayan rastgele bir faktör seçilir. Bu faktöre dummy faktör denilir. Tasarım tablosuna kesim noktası (b₀) ilave edildiğinde kare matris elde edilir.

1.5.3. Merkezi Kompozit Dizayn

Merkezi kompozit tasarımlar fraksiyonel faktöriyel tasarım, ful faktöriyel tasarım, star tasarım ve merkezi tekrar tasarım bileşiminden oluşmaktadır. Faktöriyel tasarımlar her bir faktörün etkilerini genel olarak inceleyen yöntemlerdir. Her bir faktörün optimum koşullarının bulunması merkezi kompozit tasarım yöntemi ile yapılır (Brereton, 1990). Yapılacak deney sayısı 1.5.1'teki formüle göre belirlenir.

$$\text{Deney sayısı} = 2^k + 2k + 1 \quad (\text{k: faktör sayısı}) \quad (1.5.1)$$

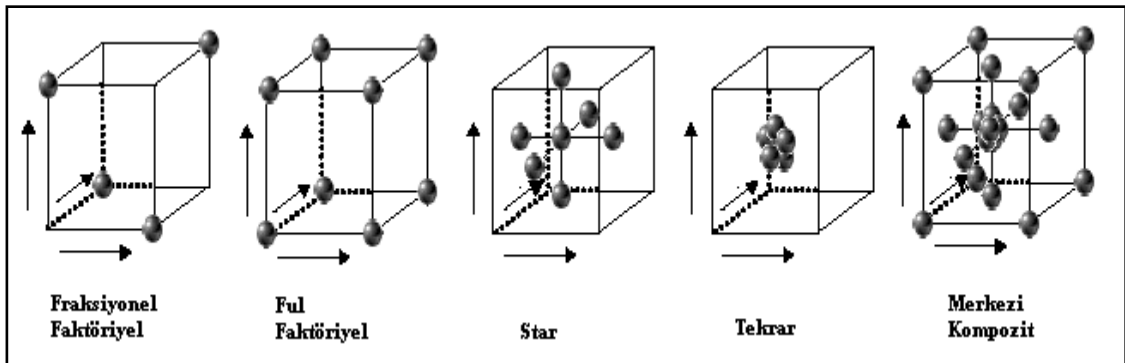
Formüldeki 2^k full faktöriyel veya fraksiyonlu faktöriyel tasarımdaki deney sayılarını, $2k$ star tasarım deney sayısını ve 1 ise orta seviyedeki deney sayısını gösterir. 2^k dki seviyeler (-1) ve (+1), $2k$ 'dkiler $\pm\alpha$, 1'deki ise (0) dır. α değeri dairesel ve ortogonal dizayna göre farklı seviyeler alır. Şekil 1.12'de deneysel dizayn noktaları gösterilmiştir (Brereton, 1990).

Dairesel dizaynda α 1.5.2'deki formüle göre hesaplanır.

$$\alpha = \mp \sqrt[4]{2^k} \quad (1.5.2)$$

Ortogonal dizaynda ise α 1.5.3'teki formüle göre hesaplanır.

$$\alpha = \mp \sqrt{k} \quad (1.5.3)$$



Şekil 1.12. Merkezi kompozit tasarım noktaları (Her eksen bir faktöre karşılık gelmektedir) (Brereton, 2003).

Yukarıda belirtilen noktalar ile oluşturulan merkezi kompozit tasarım modeli Şekil 1.13'te gösterilmiştir.

Fraksiyonel faktöriyel					
1	1	1			
1	-1	-1			
-1	-1	1			
-1	1	-1			
Ful faktöriyel					
1	1	1			
1	1	-1			
1	-1	1			
1	-1	-1			
-1	1	1			
-1	1	-1			
-1	-1	1			
-1	-1	-1			
Star			Merkezi kompozit dizayn		
0	0	-1	1	1	1
0	0	1	1	1	-1
0	1	0	1	-1	1
0	-1	0	1	-1	-1
1	0	0	-1	1	1
-1	0	0	-1	1	-1
0	0	0	0	0	-1
			0	0	1
			0	1	0
			0	-1	0
			1	0	0
			-1	0	0
Tekrar deneyleri			0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

Şekil 1.13. Merkezi kompozit tasarım şeması

Yapılan deneydeki parametrelerin etkisini belirlemek amacıyla aşağıda verilen doğrusal denklemdeki b katsayıları hesaplanır.

$$y = b X \quad (1.5.4)$$

Bu denklemden b katsayısı;

$$b = (X'X)^{-1} X'y \quad (1.5.5)$$

formülünden hesaplanır. b katsayıları doğru denkleminde yerine konulduğunda aşağıdaki model denklemi elde edilir.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (1.5.6)$$

Elde edilen model denkleminin kısmi türevi alınarak deneyin optimum koşulları belirlenir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Endüstriyel enzimler çok çeşitli proseslerde uygulanabilmelerinden dolayı özellikle mikrobiyal kökenli olanlara talep sürekli artmaktadır. Enzim ortamı reaksiyonlar, alternatifleri olan yorucu ve pahalı kimyasal reaksiyonlardan daha caziptir. Enzimler, gıda, süt ürünleri, ilaç sanayisi, deterjan, tekstil ve kozmetik endüstrileri gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bununla birlikte, son on yılda mikrobiyal lipazların sulu ve susuz ortamda biyokatalitik potansiyellerinin anlaşılmasıyla endüstride son derece önemli hale gelmişlerdir.

Enzimlerin çeşitli metotlarla katı bir destek maddesine tutturularak immobilize edilmesi önemli araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır. Enzimlerin tekrar kullanımına ve elde edilen ürünün ortamdaki kolayca ayrılmasına imkan sağladığından ucuz ve kullanıma uygun immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi özellikle endüstriyel kullanım açısından büyük önem taşımaktadır. Çalışma ile ilgili literatür incelendiğinde düşük maliyetli destek maddelerine enzimlerin farklı yöntemlerle immobilizasyonu ile ilgili araştırmalara olan ilginin giderek arttığı görülebilir.

Yücel.(2013), *Thermomyces lanuginosus* mikrobiyal lipaz stiren-divinilbenzen kopolimeri, polyglutaraldehide üzerine kovalent bağlanma ile immobilize etmiştir. Immobilize destek maddesi, prina yağı ve metanol kullanılarak, yarı-sürekli sistem ile biyodizel üretimi yapmıştır. Enzim inhibisyonunu önlemek için metanol reaktöre 1:6 molar eşdeğerinde üç ardışık eklenti yapılarak eklenmiştir. Maksimum metil ester verimi % 98 olarak tespit edildi.

Zaidan.(2012), çalışmasında immobilizasyonunu, *Candida regusa* (CRL) lipazını amino-aktif mika üzerine kovalent bağ (Amino-CRL) aracılığıyla ve fiziksel adsorpsiyon (NER-CRL) yoluyla nano reaktörle lipazın çapraz bağlanmasını gerçekleştirmiştir. Amino-CRL ve NER-CRL'nun spesifik aktiviteleri immobilizasyon üzerinde, sırasıyla 2.4 ve 2.6 kat artmıştır. İleriki aşamada şeker esterleri sentezinde immobilize lipazın kapasitesinin olduğu görülmüştür. Şeker yağlı asit ester sentezi için optimize edilmiş koşullar 48 saat, 2:1 molar oran (laktoz şeker, kaprik asit) ve sıcaklık 55 °C olarak belirlenmiştir.

Akbin.(2012), yaptığı çalışmada hidrotalsite tutuklanmış lipaz enzimi ile çözücüsüz ortamda kanola yağından biyodizel üretimi yapmıştır. Bu çalışmada destek

maddesi olarak Mg-Al hidrotalsit, lipazlar (Lipozyme TL *Thermomyces lanuginosa*, *Candida antarctica*, *Rhizomucor miehei*) desteğe tutuklanarak katalizör olarak kullanılmıştır. Tampon pH'ı, sıcaklık, enzim miktarı, tutuklama süresi gibi parametrelerin tutuklama üzerine etkileri incelenmiştir. Tutuklama koşulları; pH 8,5 tris HCl tampon, 37 °C ve 50 µl enzim/0.01 g hidrotalsittir. 24 saat sonunda tutuklama verimi % 90, tutuklanan enzim miktarı 82 mg protein/g destek, hidrolitik aktivite 9 U/g destektir. Daha sonra su yüzey cevap yöntemi ile optimum koşullar belirlenmiştir. % 100 metil ester dönüşümüne ulaşılmıştır. Koşullar; 25 °C , 1/4 yağ/metanol mol oranı, % 3 katalizör , % 0,8 su ve 24 saattir. RSM sonucu elde edilen metil ester dönüşümü ise % 96,4'tür ve tepkime koşulları 35 °C, 24 saat, % 5,25 enzim, 1/5 yağ/metanol mol oranı, % 5 sudur. Sonuç olarak oda sıcaklığında yüksek metil ester dönüşümü (% 100) elde edilmiştir.

Şengül.(2012), yaptığı çalışmada lipaz enziminin immobilizasyonu için yeni bir destek materyali olarak manyetik özellikte ve nanoboyutta Fe₃O₄ tanecikleri sentezlenmiş ve lipaz enziminin Fe₃O₄ manteyik nanopartiküllere farklı arakollar üzerinden(GA ve ECH) immobilizasyonu ve karakterizasyonu araştırmıştır. Serbest ve immobilize lipazlar için optimum pH 7,0 optimum sıcaklık 40 °C olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda serbest lipaz için K_m, V_{max}, K_{cat}, K_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 0,48 mM, 420,7 U/mg protein, 2,82x10⁴ dk⁻¹, 58,8x10³ dk⁻¹ mM⁻¹, immobilize lipaz (GA) için sırasıyla 1,3 mM, 33,6 U/mg protein, 2,25x10³ dk⁻¹, 1,73x10³ dk⁻¹ mM⁻¹, immobilize lipaz (ECH) için sırasıyla 9,4 mM, 51,7 U/mg protein, 3,47x10³ dk⁻¹, 0,37x10³ dk⁻¹ m M⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Immobilize lipazın tekrar kullanılabilirliği kesikli reaktor modelinde araştırılmıştır ve 20 kullanım sonrası immobilize lipazların başlangıç aktivitelerini sırasıyla % 71 (GA) ve % 63 (ECH)' ünü koruduğu belirlenmiştir.

Shu ve ark.(2011), yaptığı çalışmada polietilenimin (PEI) kaplama ve glutaraldehid çapraz bağlama işlemleri ile pamuklu kumaş üzerine *Candida rugosa* lipaz

immobilize ederek yeni bir yöntem geliştirmiştir. Çalışmada sonuç olarak belirlenen optimum koşullarda 0,25 M etanol ve 0,6 M bütirik asit 25 °C 'de immobilize lipaz ile katalizlendi, yüksek dönüşüm yüzdesi % 91,2 ve 1,27 mmol h-1 g-1 etil bütirat verimliliğini elde etmiştir.

Yücel.(2011), yaptığı çalışmada mikrobiyal lipaz *T. Lanuginosus* prina üzerinde kovalent bağla immobilize etmiştir. *T.lanuginosus* için max immiblize 18.67 mg/g destek ve en yüksek spesifik aktivite 10,31 U/mg protein elde etmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında en fazla biyodizel verimi %93 süre 24 saat ve tepkime sıcaklığı 25 °C tespit etmiştir.

Monier ve ark. (2010), doğal yün lifleri üzerine *Candida rugosa* lipaz enziminin immobilizasyonunu incelemişlerdir. Monier ve arkadaşları 1gram yün lifine 81,4 mg enzim bağlamayı başarmışlardır. Enzim 6 tekrar kullanım sonunda % 88,8 rölatif aktivite göstermiştir.

Aybastier.(2010), *Thermomyces lanuginosus* lipaz enzimi mikroporoz stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimerine kovalent olarak immobilize etmiştir. Optimum koşullardki tahmini spesifik aktivite 8.78 µmol pNP/mg enzim.dk olarak hesaplanmış, deneysel spesifik aktivite ise 8,41 µmol pNP/mg enzim.dk olarak belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında *Candida antarctica A* lipaz enzimi kitosan küreler üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Bu küreler üzerine yapılan immobilizasyonda en yüksek spesifik aktivite, % 12 (v/v) enzim konsantrasyonunda ve 24 saat immobilizasyon süresinde elde edilmiştir. Her iki destek maddesi kullanılarak üretilen biyodizel verimleri sırası ile % 85,95 ve % 59,32 dir. STR-DVB-PGA destek maddesi ile daha yüksek oranda biyodizel elde edildiği görülmüştür.

Kanışlı.(2010), yaptığı çalışmada R. Mihei kaynaklı lipaz enzimini; çeşitli iplikli destek materyalleri üzerine (pamuk, akrilik poliester ve polietilenteraftalat iplik akrilik ve naylon elyaf), Polietilenimin (PEI) ve Gluteraldehit (GA) kullanılarak tutuklanmıştır. Destek materyali kullanılmaksızın çözelti ortamında yapılan denemelerde optimum PEI/lipaz oranında Codexis ve Novozyme RM Lipazları sırasıyla, %85 ve %90 lipaz aktivitesi PEI ile kümecikleştirilmiştir. PEI Codexis lipazının aktivitesinde sınırlı bir düşmeye neden olurken Novozyme lipazının aktivitesini % 15-20 oranında arttırmıştır.

Codexis ve Novozyme RM Lipazları pamuk iplikte optimize edilen şartlarda farklı iplikli materyallere %95'in üzerinde protein verimiyle tutuklanmıştır.

Dizge ve Keskinler.(2009), mikro gözenekli stiren-divinilbenzen kopolimerine lipaz enzimini fiziksel ve kovalent olmak üzere iki farklı metotla sırasıyla %60 ve % 85 verimle immobilize etmişlerdir.

Yang ve ark.(2009), yaptığı çalışmada lipaz enzimi glutaraldehit ile aktive edilen düşük maliyetli destek maddesine %38 ile %76 oranlarında immobilize edilerek aktivite kaybı olmadan on kez kullanılmıştır.

Gao ve ark.(2009), yaptığı başka bir çalışmada lipaz enzimlerini silika jel üzerine fiziksel olarak tutturmuştur. Çalışmada adsorpsiyon katsayısı 67.42 mg/g ve maksimum enzim aktivitesi 19.87 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein olarak hesaplanmıştır.

Villalonga ve ark.(2008), fenilalanin dehidrojenazı selüloz membran üzerine kovalent olarak tutturmuşlardır. Çalışmada glutaraldehit ile aktive ettikleri glükoz membrana cm^2 başına 440 μg enzim bağlayarak % 82 aktivite hesaplamışlardır.

Wu ve Lia.(2008), çalışmalarında glucoamilaz enzimini bakteriyel selüloza immobilize ederek % 77 rölatif aktivite hesaplamışlardır. Düşük maliyetli destek maddelerine enzimlerin farklı yöntemlerle immobilizasyonuna yönelik literatür tarandığında ise konu ile ilgili çeşitli makaleler karşımıza çıkmaktadır.

Pahujani ve ark.(2008), glutaraldehit ile aktive edilmiş noyilon-6 polimeri üzerine gram destek maddesi başına 228,8 μg lipaz enzimini kovalent olarak immobilize ederek 1,2 U/g aktivite değeri hesaplamışlardır.

Dizge ve ark.(2008), hidrofilik poliüretan destek maddesi üzerine poliglutaraldehit ön işlemi ile *Thermomyces lanuginosus* lipaz enzimini % 80 verimle tutturmuşlardır.

Karra-Châabouni ve ark.(2008), *Rhizopus oryzae* lipazını % 70 verimle selüloz lifler üzerine fiziksel olarak immobilize etmişlerdir.

Chang ve ark.(2007), poli (c-glütamik asit) (c-PGA) polimerine kovalent bağlanma ile *Candida rugosa* lipaz (lipase AY-30) immobilizasyonu sonucu enzimin performansının belirgin bir şekilde arttığını tespit etmiştir. RMS 3-level-3 faktör metodolijisi; immobilizasyon süresi(2-6 saat), immobilizasyon sıcaklığı (0-20 C) ve enzim/destek oranı (0,1-0,5 w/w) parametreleri immobilizasyon etkisi için değerlendirilmiştir. 2,3 saatlik immobilizasyon süresi, 13,3 immobilizasyon sıcaklığı ve

0,41 (w/w) enzim/destek oranı ile en yüksek lipaz aktivitesi 1196 U/mg protein olarak tespit edilmiştir.

Bryjak ve ark.(2007), glukoamilaz enzimini selüloz tabanlı destek maddesine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Glutaraldehit ile aktive edilen destek maddesine % 7,8 oranında immobilize olan glukoamilaz 4,3 U/mL aktivite göstermiştir.

Yağız.(2006), yaptığı çalışmada, transesterifikasyon reaksiyonunda kullanılan lipazın tutuklanması için hidrotalsit ve dört ayrı zeolit (13-x, 5A, FM-8 ve AW-300) denemiş ve hidrotalsitin zeolitlere göre daha etkin olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmaya göre en iyi adsorplanan protein miktarı (Pg), 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. Biyodizel üretiminde ise 24°C'de, Lipozyme-TL IM serbest enziminin hidrotalsit üzerine tutuklanmış formu kullanıldığında 105 saatte %92,8 metil ester dönüşümü elde edildiğini tespit etmiştir.

Bai ve ark.(2006), yaptığı çalışmada nanoölçekte hazırlanan SiO₂ küreleri aldehit gruplarıyla fonksiyonel hale getirilmiş ve lipaz enzimi bu destek materyaline kovalent olarak lipaz immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. Geliştirilen immobilizasyon yönteminde zeytin yağının hidrolizi için domuz pankreas lipazının optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 8.0 ve 50-60 °C olarak bulunmuştur.

Karaca.(2006), yaptığı çalışmada lipaz enzimi (E.C. 3.1.1.3) Poli(N,N-dimetilakrilamit-koakrilamit) ve Poli(N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/ Karragenan polimerleri kullanılarak kovalent bağlanma ve hapsetme yöntemi ile immobilize edilmiştir. Serbest enzim için Km değeri 3,58 mM ve immobilize enzimler için ise Km değerleri 7,36 bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için, optimum pH 8, optimum sıcaklık ise 30 -35 °C olarak bulunmuştur.

Bora ve ark.(2005), biyomoleküllerin selüloz membrana kovalent metotla bağlanmasıyla ilgili çalışmalarında % 85 aktivite oranı elde etmişlerdir.

Vecchia ve ark. (2005), yaptığı çalışmada 10 farklı lipaz enzimini karboksi metil selüloz, polivinil alkol ve karboksi metil selüloz/polivinil alkole immobilize edilip organik ortamda n-pentanol ve laurik asidin esterifikasyonunda kullanılmıştır. Optimum sıcaklığın 37 °C olduğu, 0.5 g destek materyali üzerine 50 mg enzimin tutulduğu çalışmada rapor edilmiştir.

Iso ve ark. (2001), tutuklanmış lipaz yardımıyla susuz ortamda trigliserid ve alkolden biyodizel üretimi için ayçiçeği yağı ve triolein, alkol olarak kısa zincirli (metanol, etanol, 1-propanol, 1-bütanol) kullanılmıştır. Enzim tutuklanması işleminde ticari adı Toyonit 200-M olan gözenekli kaoliniti kullanılmıştır. İşlem için Lipaz AK, Lipaz PS, Lipaz M, lipaz AY ve Newlase F ticari enzimlerini kullanmıştır. En yüksek tepkime verimi Lipaz AK'de tespit edilmiştir. Tutuklanmış Lipaz AK kullanıldığında tepkime de metil ester dönüşümü, 25 saatte %90 olduğu gözlenmiştir.

Chae ve ark.(1998), yaptıkları çalışmada glutearaldehit kullanarak proteaz enziminin kovalent bağlanmayla immobilizasyonunun etkisini incelemiştir. pH 7 ve molarite 50 mM da %1 GA konsantrasyonunda 2 saatlik işlem sonucunda uygun koşullar bulunmuş ve enzim çözeltisinin konsantrasyonu ve yükleme oranı incelenmiş ve immobilizasyon için optimum değer olarak 3 mg enzim/g taşıyıcı ile 1.8mg/ml enzim çözeltisi olduğu görülmüştür.

Abdel Naby ve ark.(1997), yaptıkları çalışmada çitosan fiziksel adsorpsiyon, Amberlit IR-120 iyonik bağlanma, çitin kovalent bağlanma ve %2'lik çapraz bağlı poliakrilamid de tutuklama yöntemi ile immobilizasyonda en yüksek aktiviteleri göstermeye çalışmıştır. Immobilizasyon verimleri sırasıyla %18.80, %15.02, %79.29 ve %76.55 olarak saptanmıştır. Serbest enzimin aktivitesi 29.3 U/mg protein iken, immobilize enzimlerde aktivite taşıyıcı olarak çitosan kullanıldığında 5.5, amberlit IR-120 kullanıldığında 4.35, çitin kullanıldığında 22.9 ve poliakrilamid kullanıldığında 21.7 U/mg protein olarak bulunmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

Bu çalışmada, ilk aşamada; pirina, nişasta, kil, zeolit, kireç taşı, aktif kömür, çay atığı, lif kabağı, pamuk ve talaş (10 adet) maddelerine ön çalışma ile en iyi immobilizasyon verimini veren 4 destek maddesinin seçimi yapılmıştır.

Yapılan ön deneyler sonucunda, çay atığı, pamuk, lif kabağı ve talaş olmak üzere toplam 4 farklı hammadde lipaz enziminin bağlanmasında destek maddesi olarak en iyi sonucu verdiği görülmüştür.

Pamuk ve lif kabağı, Antakya'daki aktarlardan,

Talaş, Antakya'daki marangoz işletmelerinden temin edilmiştir.

Demleme çayın atık çayı, atık çay olarak kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Adı	Üretici Firma	Katalog No
Lipozyme TL 100L	NOVOZYMES	LAP40012
Glutaraldehit %25	MERCK	820603
Potasyum Dihidrojen Fosfat	MERCK	104873
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	MERCK	105104
Coomassie Brilliant Blue G 250	MERCK	115444
Bovine Serum Albumine	SIGMA	A7906
4- Aminoantipirin	MERCK	107293
4-Nitrofenol	SIGMA	1048
4- Nitrofenilpalmitat	FLUKA	76166
Metanol	MERCK	106007
Etanol	SIGMA-ALDRICH	32221
Sülfürik asit	MERCK	100748
Sodyum hidroksit	MERCK	106462
Asetik asit	MERCK	100056

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka	Model
GC-MS	Hewlett Packard	HP 6890-5972
UV-VIS spektrofotometre	HITACHI	U-1900
Elektron mikroskobu	Jeol	JSM500LM
pH-metre	HACH sension 1	51700-23
Analitik terazi	Precisa	XB 220 A
Saf su cihazı	Human	New Human Power I
Laboratuvar tipi öğütücü	Braun	Multiquick 5
Derin donduruculu buzdolabı	Beko	D9420 NMK
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Wisestir	MSH-20 A
Çalkalamalı inkübatör	JSR	JSSI-100C
Kaba terazi	OHAUS	N3D110
Santrifüj	Nüve	NF 400

3.2. Yöntem

3.2.1. Doğal Destek Maddelerinin Hazırlanması

Doğal destek maddesi olarak toplanan çay atığı, pamuk, lif kabağı ve talaş numuneleri laboratuvarında blenderdan geçirilmek suretiyle öğütülerek uygun boyutlara getirildi. Örnekler 40-50 mesh’lik eleklerden geçirilip, kuru ve serin ortamda depolanmıştır.

3.2.2. Doğal Destek Maddelerinin Modifikasyonu

Çay atığı, pamuk, lif kabağı ve talaş numuneleri beherlere koyulduktan sonra taze hazırlanmış poliglutaraldehit çözeltisi ile muamele edilmiştir. Daha sonra destek maddeleri önce 300 mL saf su ile sonra da 200 mL 25 mM, pH 6 Ca(Ac)₂ tampon

çözeltisi ile yıkanmış ve böylece poliglutaraldehit destek maddelerinin yüzeyine tutturulmuştur.

3.2.3. Doğal Destek Maddelerinin Enzim İmmobilizasyonu

4'er gram destek maddeleri (çay atığı, pamuk, lif kabağı ve talaş) tartılarak behere yerleştirilmiş ve 500 mL saf su ile yıkanmıştır. Sonra taze hazırlanmış poliglutaraldehit çözeltisiyle 24 saat muamele edilmiş ve 500 mL saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra 3'er mL Lipozyme TL-100L lipaz enzimi alınarak 27 mL 25 mM pH 6 Ca(Ac)₂ tampon çözeltisine ilave edilerek %10'luk enzim çözeltileri hazırlanmış ve 24 saat boyunca destek maddelerine kovalent bağlama yöntemiyle immobilize edilmiştir. Bu süre sonunda bağlanmayan enzimler destek maddelerinin önce 300 mL saf su sonra 200 mL 25 mM, pH 6 Ca(Ac)₂ tampon çözeltisi ile yıkanmasıyla uzaklaştırılmıştır.

3.2.3.1. Enzim İmmobilizasyonunun Kemometrik Optimizasyonu

Enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak kullanılan çay atığı, pamuk, lif kabağı ve talaş üzerine lipaz enziminin tutunmasında etkili olan faktörlerin belirlenmesinde Plackett-Burman dizayn metodu kullanılmıştır. Daha sonra önemli faktörlerin optimizasyon işlemi için 3 faktörlü 5 seviyeli merkezi kompozit dizayn yöntemi uygulanmıştır.

3.2.4. Kantitatif Protein Tayini

Lipozyme TL-100L lipaz enziminin destek maddelerine immobilizasyonunda desteğe tutturulan protein miktarı Bradford Metodu ile tayin edilmiştir (Bradford, 1976). Yöntemin prensibi kısaca; Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm'de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanmaktadır. Ortamdaki proteinin yoğunluğuna göre açık veya koyu mavi renk vermektedir.

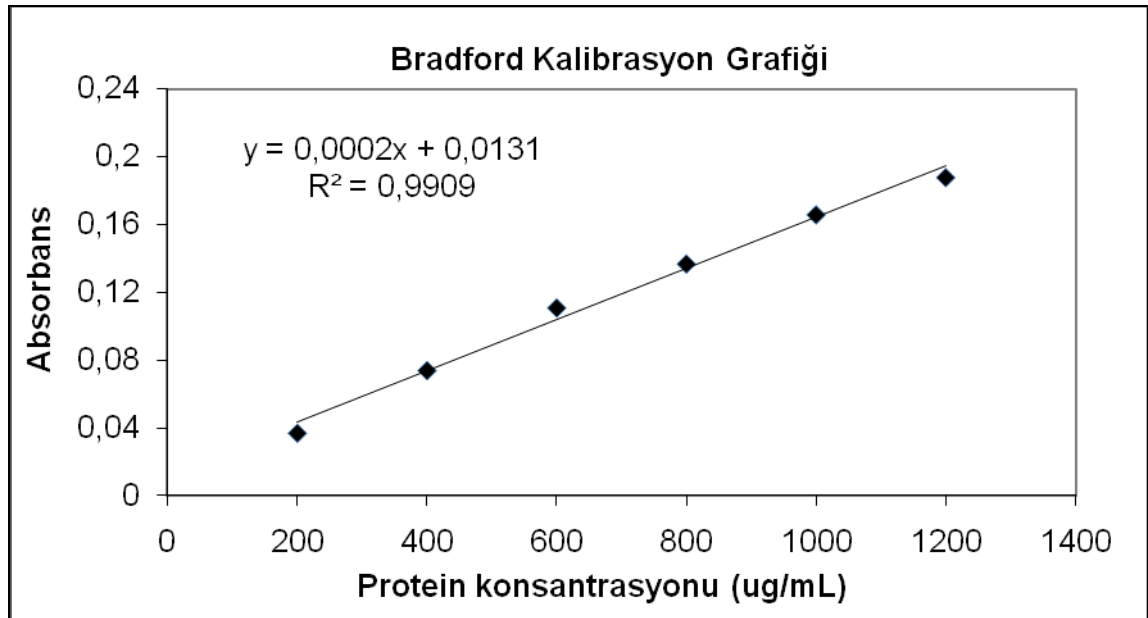
3.2.4.1. Bradford Boyasının Hazırlanması

100 mg Coomassie Brilliant Blue (CBB, C₄₇H₄₈N₃NaO₇S₂) boyası, 50 mL metanol içerisinde çözülerek üzerine 100 mL %85'lik fosforik asit (H₃PO₄) ilave

edilmiş ve saf su ile 200 mL'ye seyreltilmiştir. Elde edilen çözelti kullanılıncaya kadar koyu renkli bir şişe içerisinde buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır.

3.2.4.2. Bradford Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Protein kalibrasyonunda standart protein olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır. Sığır serum albumin olarak bilinen BSA; protein tayini için standart olarak sıkça kullanılan bir standarttır. Standart proteinden konsantrasyonları 200, 400, 600, 800, 1000 ve 1200 µg/mL olacak şekilde farklı derişimde 6 çözelti hazırlanmıştır. Farklı derişimlerde (200–1200 µg/mL) hazırlanan BSA standartlarından deney tüplerine 1.5 mL alınmış ve üzerlerine 1.5 mL Bradford boyası ilave edilmiştir. Ayrı bir deney tüpüne 3 mL saf su ve 3 mL boya eklenerek karıştırılmıştır. UV-spektrofotometrenin dalga boyu 595 nm olacak şekilde ayarlanmış ve saf su içeren karışıma göre sıfırlanmıştır. Her bir örneğin 595 nm dalga boyunda absorbanları okunarak protein konsantrasyonlarına (µg/mL) karşı okunan absorban (595 nm) değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Bradford kalibrasyon grafiği

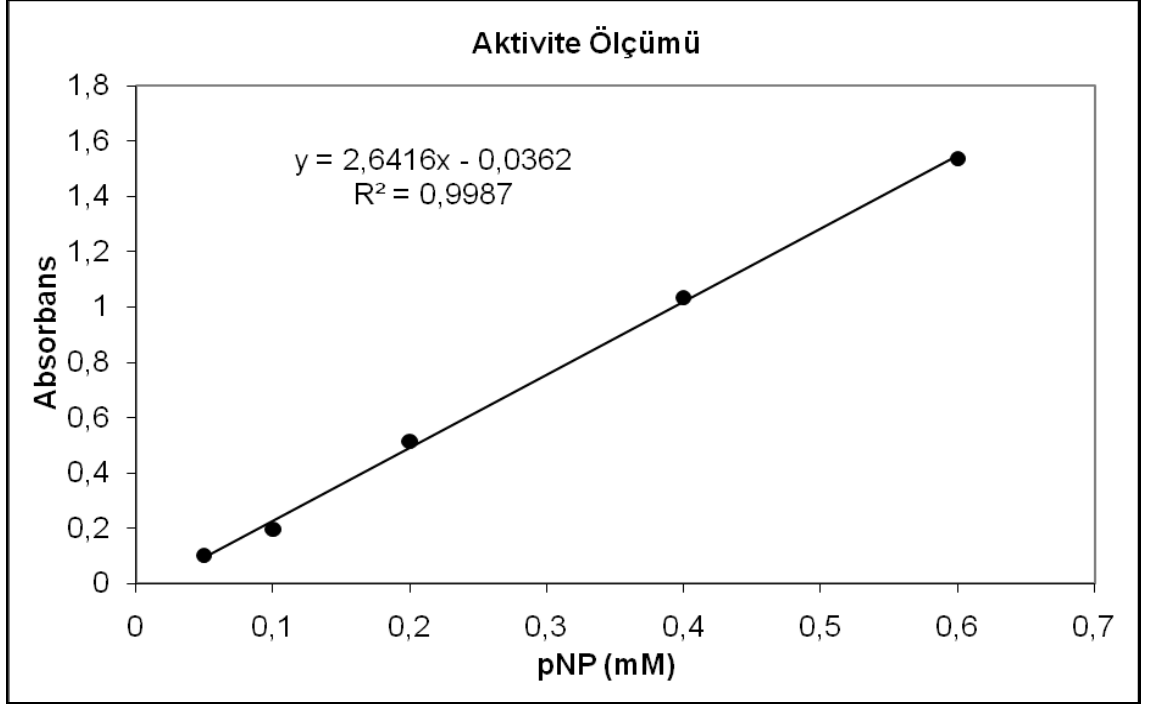
3.2.4.3. Protein Tayini

Belirli oranlarda bradford boyası, saf su ve 4-aminoantipirin içeren analiz reagentinden 5 mL alınarak 100 µL örnek ile karıştırılmış ve 5 dk. bekletilerek 595 nm'de UV absorbansı okunmuştur. Farklı derişimlerde Bovin Serum Albumin (BSA) standart proteini kullanılarak hazırlanmış Bradford kalibrasyon grafiği kullanılarak örnekteki protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.5. Enzim Aktivite Tayini

Çalışmamızda enzim aktivitesi spektrofotometrik metotla belirlenmiştir (Winkler ve Stuckman, 2003). Metot enzim moleküllerinin birim zamanda pNPP'ı (para-nitrofenil palmitat, C₉H₉NO₄) pNP'e (para-nitrofenol, C₆H₅NO₃) dönüştürme miktarının ölçülmesine dayanmaktadır. 1 birim enzim; reaksiyon koşullarında, pNPP'dan (para-nitrofenil palmitat) bir dakikada, 1 mmol pNP (para-nitrofenol) oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Uluslararası Ünite : IU).

Enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla öncelikle 0,2 mM; 0,4 mM; 0,6 mM; 0,8 mM ve 1,0 mM pNP (para-nitro fenol) çözeltileri hazırlanarak UV spektrofotometresinde 410 nm'de absorbansları ölçülerek standart kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Daha sonra 0,5 g yaş örnek tartılarak 9 hacim 25 mM Ca(Ac)₂ pH 6 tamponu ile 1 hacim 10 mM pNPP, % 0,8 triton X100 (C₈H₁₇C₆H₄(OCH₂CH₂)₉₋₁₀OH) ve % 0,2 gum arabic'den (E414) oluşan 15 mL'lik çözelti karışımına ilave edilmiştir. Manyetik balıkla 5 dk. 125 rpm hızla karıştırılan örnek beyaz bant süzgeç kağıdı ile süzölmüş ve berrak sıvı UV spektrofotometresiyle 410 nm'de absorbansı ölçülerek lipaz aktivitesi, spesifik aktivite ve immobilizasyon verimi hesaplanmıştır. Hazırlanan kalibrasyon grafiği Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Enzim aktivite kalibrasyon grafiği

3.2.6. Biyodizel Üretimi

Biyodizel üretimi uygun koşullarda doğal destek maddelerine immobilize edilmiş olan lipaz enziminin pirina yağı ve metanol beraberinde reaksiyonu sonucu gerçekleştirilmiştir.

Biyodizel sentezi için 250 mL'lik beher içine yağ ağırlığının %10'u oranlarında immobilize enzim ve 3'e 1 metanol/yağ molar oranı karışımı 3'er saat ara ile üç aşamada ilave edilir. Karışım 35 °C'de manyetik balık ile 200 rpm hızla sürekli karıştırılır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Doğal Destek Maddelerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonun Kemometrik Optimizasyonu

Enzim immobilizasyonunda doğal destek maddesi olarak kullanılan çay atığı, pamuk, lif kabağı ve talaş üzerine lipaz enziminin tutunmasında etkili olan faktörlerin belirlenmesinde Plackett-Burman dizayn metodu kullanılmıştır. Literatür kaynaklarından ve ön deneme yapılarak belirlenen önemli faktörlerin optimizasyonu merkezi kompozit dizayn yöntemi ile yapılmıştır. Çizelge 4.1’de Plackett-Burman dizayn metodunda kullanılan faktörler verilmiştir.

Çizelge 4.1. Plackett-Burman dizayn metodunda kullanılan faktörler

Faktörler		-1	1
X1	Enzim Konsantrasyonu (% v/v)	3	8
X2	Glutaraldehit konsantrasyonu (% v/v)	5	10
X3	İmmobilizasyon pH değeri	5	7
X4	İmmobilizasyon Sıcaklığı (°C)	25	45
X5	Karıştırma Hızı (rpm)	100	150
X6	Destek-Enzim temas süresi (Saat)	16	32
X7	Destek- Glutaraldehit aktivasyon süresi (Saat)	12	24

Çizelge 4.2’de sekiz deneyli Plackett-Burman dizayn tablosu görülmektedir.

Çizelge 4.2. Plackett-Burman dizayn tablosu

Deney No	X1 Enzim Konsantrasyonu (% v/v)	X2 Glutaraldehit konsantrasyonu (% v/v)	X3 İmmobilizasyon pH değeri	X4 İmmobilizasyon Sıcaklığı (°C)	X5 Karıştırma Hızı (rpm)	X6 Destek-Enzim temas süresi (Saat)	X7 Destek- Glutaraldehit aktivasyon süresi (Saat)
1	3	5	5	25	100	16	12
2	8	10	7	25	150	16	12
3	3	10	7	45	100	32	12
4	3	5	7	45	150	16	24
5	8	5	5	45	150	32	12
6	3	10	5	25	150	32	24
7	8	5	7	25	100	32	24
8	8	10	5	45	100	16	24

Faktörlerin optimizasyonunda kullanılan merkezi kompozit dizayn tablosu Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Faktörlerin optimizasyonunda kullanılan merkezi kompozit dizayn tablosu

Deney No	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,682	0	0
10	1,682	0	0
11	0	-1,682	0
12	0	1,682	0
13	0	0	-1,682
14	0	0	1,682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

4.1.1. Doğal Destek Maddelerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonun Plackett-Burman Dizayn Analiz Sonuçları

Çizelge 4.4’de çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için kullanılan Plackett-Burman dizayn metodu sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.4. Lipaz enziminin çay atığı desteğine immobilizasyonu için Plackett-Burman dizayn sonuçları

Deneş No	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	İmmobilize Enzim Miktarı (mg enzim/g destek)	Lipaz Aktivitesi (umolNP/gDestek.dk)
1	3	5	5	25	100	16	12	13,90	2,06
2	8	10	7	25	150	16	12	30,70	2,58
3	3	10	7	45	100	32	12	15,50	2,35
4	3	5	7	45	150	16	24	18,90	2,36
5	8	5	5	45	150	32	12	57,50	2,15
6	3	10	5	25	150	32	24	21,00	2,58
7	8	5	7	25	100	32	24	21,00	2,34
8	8	10	5	45	100	16	24	85,75	2,81

Çay atığı destek maddesi ile ilgili Plackett-Burman analiz sonuçlarına göre lipaz enziminin destek maddesine immobilizasyonunda X₁ (Enzim Konsantrasyonu), X₂ (Glutaraldehit konsantrasyonu) ve X₇ (Destek-Glutaraldehit aktivasyon süresi) faktörleri en önemli faktörler olarak bulunmuştur. Bu nedenle merkezi kompozit dizayn tablosunda bu faktörler kullanılmıştır.

Çizelge 4.5’de pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için kullanılan Plackett-Burman dizayn metodu sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.5. Lipaz enziminin pamuk desteğine immobilizasyonu için Plackett-Burman dizayn sonuçları

Deneý No	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	İmmobilize Enzim Miktarı (mg enzim/g destek)	Lipaz Aktivitesi (umolNP/gDestek.dk)
1	3	5	5	25	100	16	12	19,90	8,82
2	8	10	7	25	150	16	12	30,60	18,81
3	3	10	7	45	100	32	12	24,60	15,63
4	3	5	7	45	150	16	24	25,30	10,80
5	8	5	5	45	150	32	12	93,00	10,52
6	3	10	5	25	150	32	24	28,20	15,40
7	8	5	7	25	100	32	24	27,60	14,53
8	8	10	5	45	100	16	24	109,75	15,17

Pamuk destek maddesi ile ilgili Plackett-Burman analiz sonuçlarına göre lipaz enziminin destek maddesine immobilizasyonunda X₁ (Enzim Konsantrasyonu), X₂ (Glutaraldehit konsantrasyonu) ve X₃ (İmmobilizasyon pH değeri) faktörleri en önemli faktörler olarak bulunmuştur. Bu nedenle merkezi kompozit dizayn tablosunda bu faktörler kullanılmıştır.

Çizelge 4.6'da lif kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için kullanılan Plackett-Burman dizayn metodu sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.6. Lipaz enziminin lif kabağı desteğine immobilizasyonu için Plackett-Burman dizayn sonuçları

Deney No	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	İmmobilize Enzim Miktarı (mg enzim/g destek)	Lipaz Aktivitesi (umolNP/gDestek.dk)
1	3	5	5	25	100	16	12	4,70	4,81
2	8	10	7	25	150	16	12	18,80	8,04
3	3	10	7	45	100	32	12	20,50	6,34
4	3	5	7	45	150	16	24	54,50	5,09
5	8	5	5	45	150	32	12	29,80	5,60
6	3	10	5	25	150	32	24	57,50	7,02
7	8	5	7	25	100	32	24	28,20	6,28
8	8	10	5	45	100	16	24	29,60	6,05

Lif kabağı destek maddesi ile ilgili Plackett-Burman analiz sonuçlarına göre lipaz enziminin destek maddesine immobilizasyonunda X₁ (Enzim Konsantrasyonu), X₂ (Glutaraldehit konsantrasyonu) ve X₄ (İmmobilizasyon Sıcaklığı (°C)) faktörleri en önemli faktörler olarak bulunmuştur. Bu nedenle merkezi kompozit dizayn tablosunda bu faktörler kullanılmıştır.

Çizelge 4.7’de talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için kullanılan Plackett-Burman dizayn metodu sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.7. Lipaz enziminin talaş desteğine immobilizasyonu için Plackett-Burman dizayn sonuçları

Deney No	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	İmmobilize Enzim Miktarı (mg enzim/g destek)	Lipaz Aktivitesi (umolNP/gDestek.dk)
1	3	5	5	25	100	16	12	4,20	1,49
2	8	10	7	25	150	16	12	18,00	2,83
3	3	10	7	45	100	32	12	9,20	2,31
4	3	5	7	45	150	16	24	29,50	1,47
5	8	5	5	45	150	32	12	26,00	1,49
6	3	10	5	25	150	32	24	47,00	2,35
7	8	5	7	25	100	32	24	18,40	2,36
8	8	10	5	45	100	16	24	21,70	2,22

Talaş destek maddesi ile ilgili Plackett-Burman analiz sonuçlarına göre lipaz enziminin destek maddesine immobilizasyonunda X₂ (Glutaraldehit konsantrasyonu), X₃ (İmmobilizasyon pH değeri) ve X₄ (İmmobilizasyon Sıcaklığı (°C)) faktörleri en önemli faktörler olarak bulunmuştur. Bu nedenle merkezi kompozit dizayn tablosunda bu faktörler kullanılmıştır.

4.1.2. Doğal Destek Maddelerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonu İçin Merkezi Kompozit Dizayn Analiz Sonuçları

Çizelge 4.8'de çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için kullanılan merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.8. Çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları

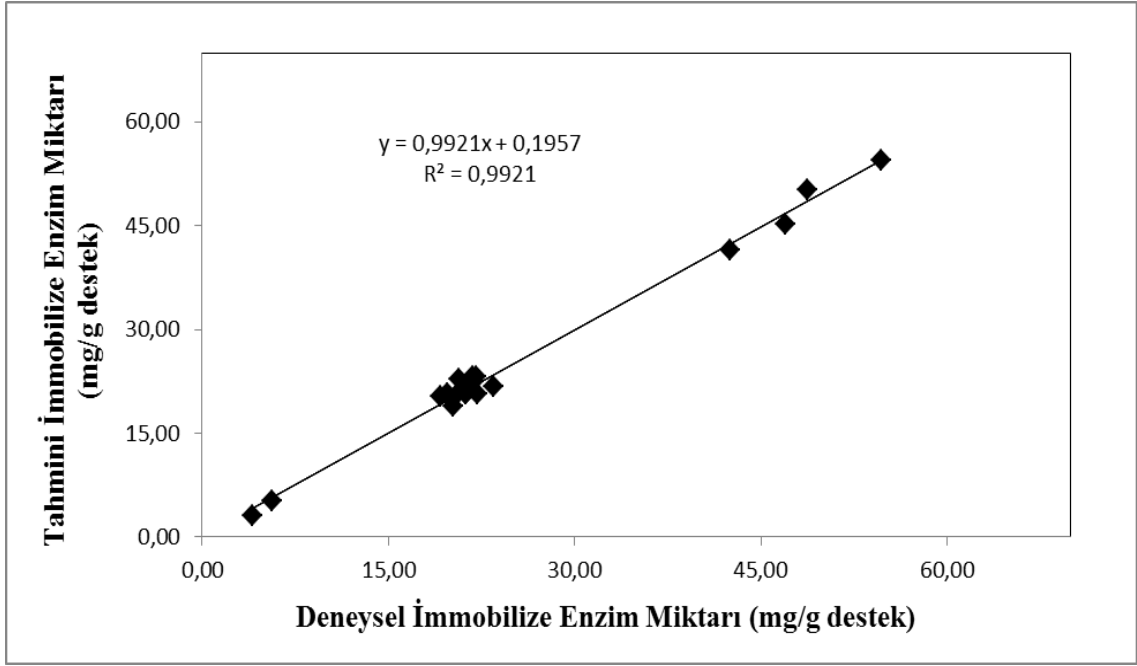
Deney No	X ₁ Glutaraldehit konsantrasyonu (% v/v)	X ₂ Destek- Glutaraldehit aktivasyon süresi (Saat)	X ₃ Enzim Konsantrasyonu (% v/v)	İmmobilize Enzim Miktarı (mg enzim/g destek)	Lipaz Aktivitesi ($\mu\text{molNP/gDestek.dk}$)
1	6	14	3	19,20	2,03
2	9	14	3	21,40	2,26
3	6	22	3	23,50	1,67
4	9	22	3	21,90	2,88
5	6	14	7	20,20	2,60
6	9	14	7	22,10	2,54
7	6	22	7	42,50	2,76
8	9	22	7	47,00	3,15
9	5	18	5	48,75	2,42
10	10	18	5	54,75	2,56
11	7,5	11,3	5	4,00	2,65
12	7,5	24,7	5	20,70	2,82
13	7,5	18	1,6	5,60	1,90
14	7,5	18	8,4	21,80	3,24
15	7,5	18	5	21,20	2,47
16	7,5	18	5	21,2	2,72
17	7,5	18	5	19,8	2,69
18	7,5	18	5	19,8	2,79
19	7,5	18	5	22,2	2,31
20	7,5	18	5	20,6	2,63

Çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonunun kemometrik optimizasyonunda immobilize enzim miktarı değerlerine göre b katsayıları kullanılarak oluşturulan model denklemi aşağıda verilmiştir.

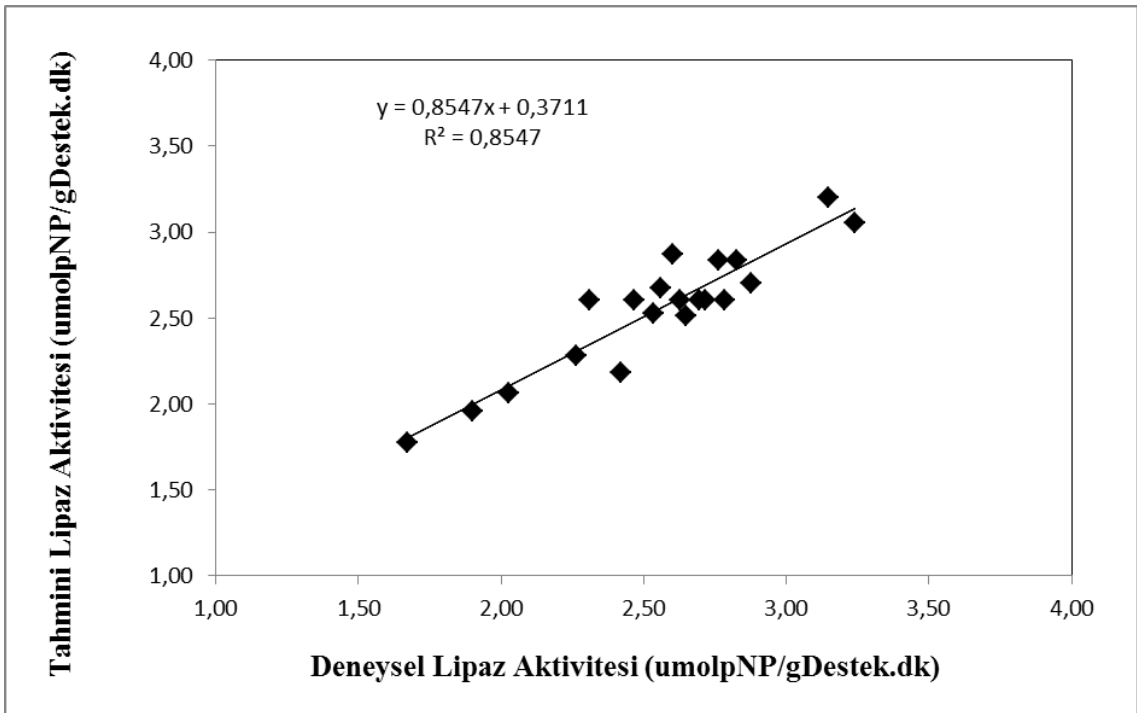
$$y = 20,77 + 1,25x_1 + 5,86x_2 + 5,35x_3 - 0,15x_1x_2 + 0,73x_1x_3 + 5,30x_2x_3 + 11,15x_1^2 - 2,78x_2^2 - 2,30x_3^2 \quad (4.1)$$

Çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı grafiği Şekil

4.1’de, deneysel aktivite değerine karşı tahmini aktivite değeri grafiği ise Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı



Şekil 4.2. Çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel lipaz aktivitesine karşı tahmini lipaz aktivitesi

Çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçlarına göre optimum koşullar: Glutaraldehit konsantrasyonu: 9,60 % v/v ; Destek-Glutaraldehit aktivasyon süresi: 23,64 saat ve Enzim Konsantrasyonu: 7,10 % v/v olarak bulunmuştur. Çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için bulunan optimum koşullarda immobilize enzim miktarı: 58,80 mg enzim/g destek ve Lipaz Aktivitesi: 3,36 umolpNP/gDestek.dk olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.9'da pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için kullanılan merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları verilmiştir.

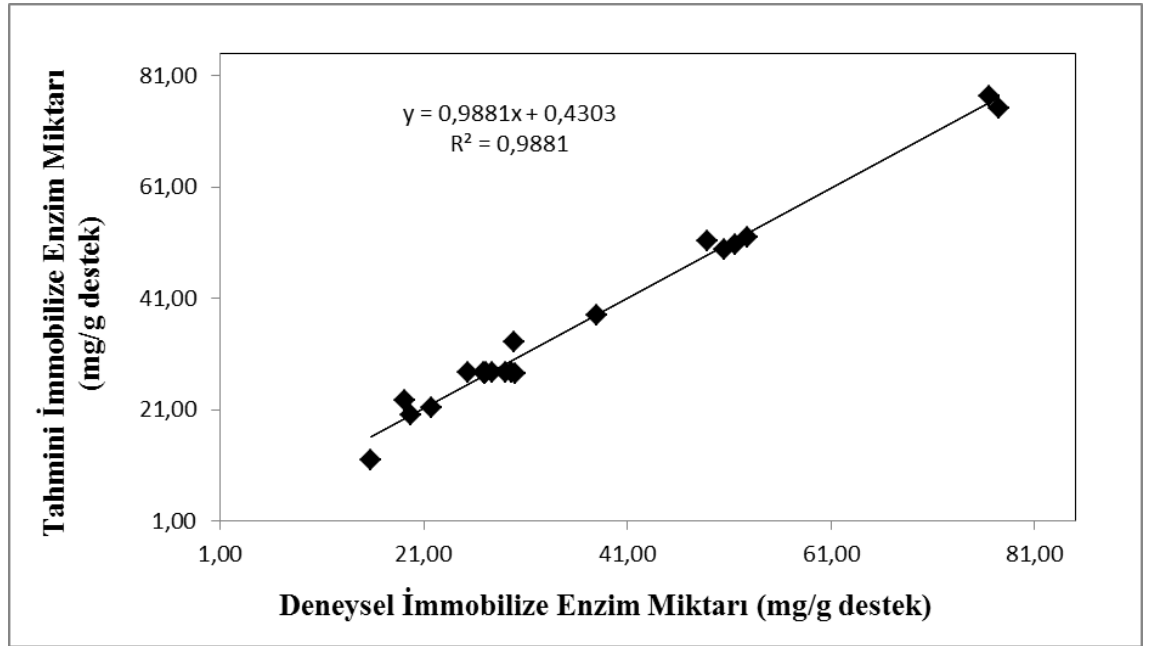
Çizelge 4.9. Pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları

Deney No	X ₁ Glutaraldehit konsantrasyonu (% v/v)	X ₂ İmmobilizasyon pH değeri	X ₃ Enzim Konsantrasyonu (% v/v)	İmmobilize Enzim Miktarı (mg enzim/g destek)	Lipaz Aktivitesi (umolpNP/gDestek.dk)
1	6	5	3	38,00	12,34
2	9	5	3	29,90	11,77
3	6	7	3	19,20	14,04
4	9	7	3	19,80	15,63
5	6	5	7	27,00	17,45
6	9	5	7	30,00	17,56
7	6	7	7	77,50	18,35
8	9	7	7	76,50	18,92
9	5	6	5	52,75	13,02
10	10	6	5	50,50	13,58
11	7,5	4,3	5	21,80	15,52
12	7,5	7,7	5	51,60	17,49
13	7,5	6	1,6	15,80	11,72
14	7,5	6	8,4	48,80	19,04
15	7,5	6	5	27,20	15,74
16	7,5	6	5	29,70	14,27
17	7,5	6	5	27,70	15,63
18	7,5	6	5	25,40	13,93
19	7,5	6	5	26,90	15,06
20	7,5	6	5	29,00	16,08

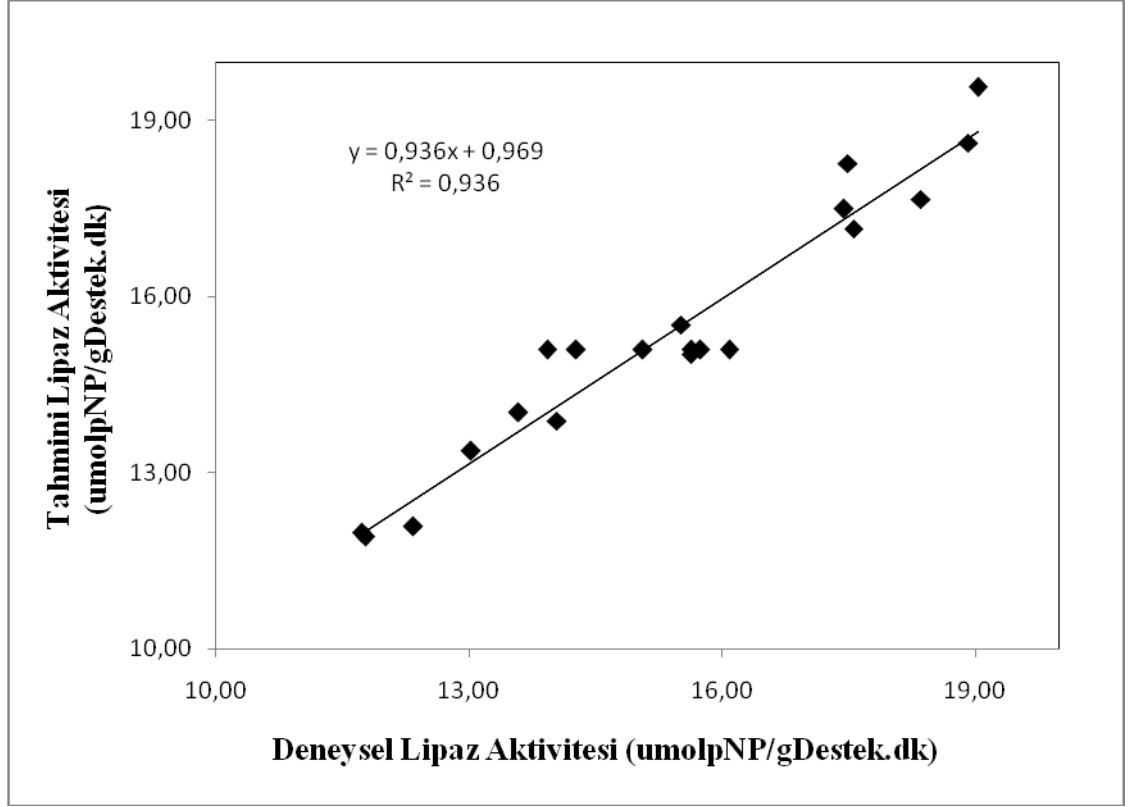
Pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonunun kemometrik optimizasyonunda immobilize enzim miktarı değerlerine göre b katsayıları kullanılarak oluşturulan model denklemleri aşağıda verilmiştir.

$$y = 27,69 - 0,68x_1 + 8,66x_2 + 11,69x_3 + 0,59x_1x_2 + 1,19x_1x_3 + 15,74x_2x_3 + 8,22x_1^2 + 2,94x_2^2 + 1,38x_3^2 \quad (4.2)$$

Pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı grafiği Şekil 4.3'de, deneysel aktivite değerine karşı tahmini aktivite değeri grafiği ise Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı



Şekil 4.4. Pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel lipaz aktivitesine karşı tahmini lipaz aktivitesi

Pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçlarına göre optimum koşullar: Glutaraldehit konsantrasyonu: 8,43 % v/v ; İmmobilizasyon pH değeri: 7,04 ve Enzim Konsantrasyonu: 8,16 % v/v olarak bulunmuştur. Pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için bulunan optimum koşullarda immobilize enzim miktarı: 91,93 mg enzim/g destek ve Lipaz Aktivitesi: 20,22 umolpNP/gDestek.dk olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10'da lif kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için kullanılan merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.10. Lif kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları

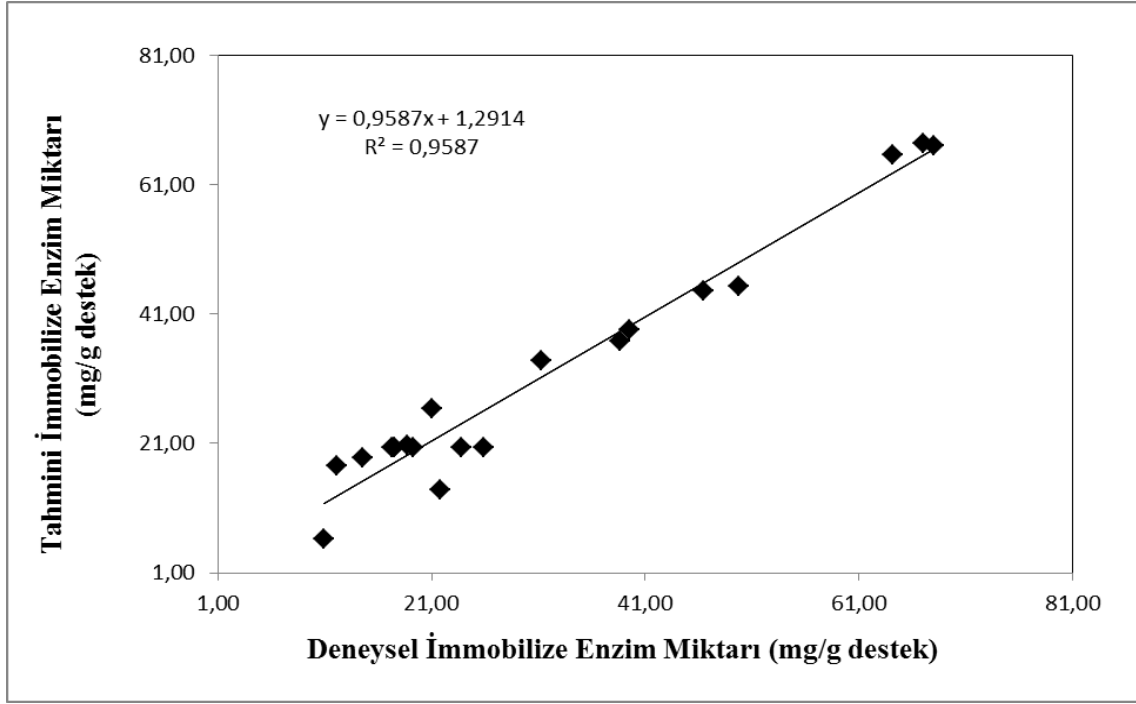
Deney No	X ₁ Glutaraldehit konsantrasyonu (% v/v)	X ₂ İmmobilizasyon Sıcaklığı (°C)	X ₃ Enzim Konsantrasyonu (% v/v)	İmmobilize Enzim Miktarı (mg enzim/g destek)	Lipaz Aktivitesi (μ molNP/gDestek.dk)
1	6	30	3	12,10	4,44
2	9	30	3	14,60	5,88
3	6	40	3	39,50	5,49
4	9	40	3	31,30	6,45
5	6	30	7	18,70	6,57
6	9	30	7	21,00	7,30
7	6	40	7	67,00	7,08
8	9	40	7	68,00	6,91
9	5	35	5	46,50	5,83
10	10	35	5	49,75	6,34
11	7,5	26,6	5	21,80	5,77
12	7,5	43,4	5	64,20	5,54
13	7,5	35	1,6	10,90	4,69
14	7,5	35	8,4	38,60	7,40
15	7,5	35	5	17,50	6,00
16	7,5	35	5	17,50	6,28
17	7,5	35	5	23,80	6,68
18	7,5	35	5	19,30	6,51
19	7,5	35	5	25,90	6,00
20	7,5	35	5	17,30	7,19

Lif kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonunun kemometrik optimizasyonunda immobilize enzim miktarı değerlerine göre b katsayıları kullanılarak oluşturulan model denklemi aşağıda verilmiştir.

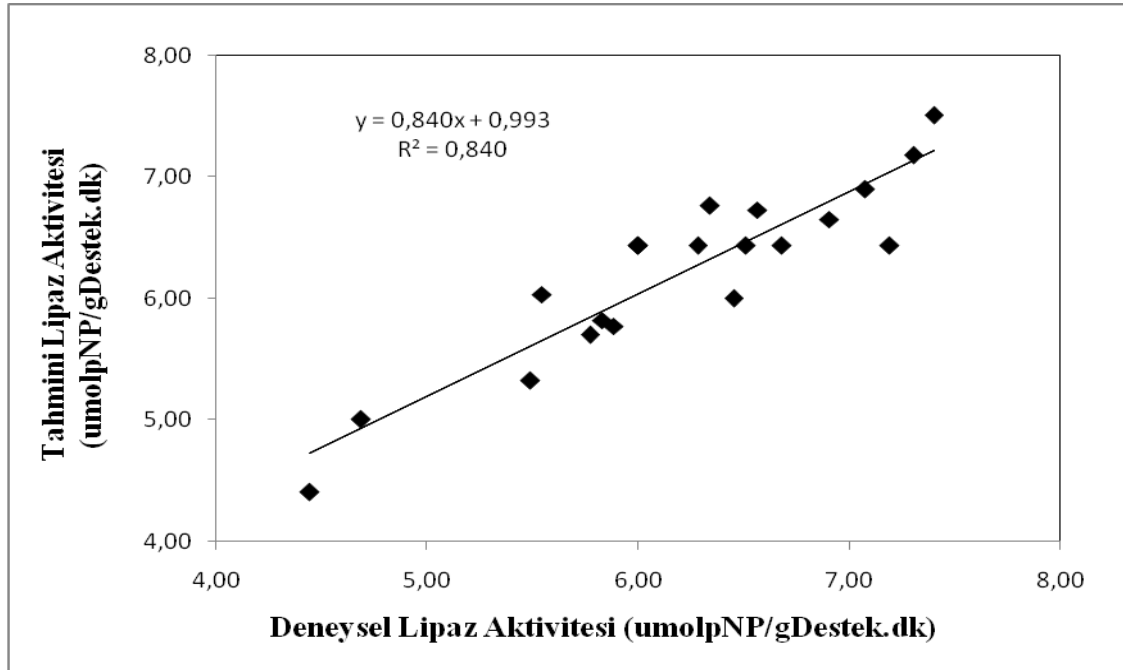
$$y = 20,40 + 0,22x_1 + 15,43x_2 + 9,06x_3 - 1,50x_1x_2 + 1,12x_1x_3 + 6,40x_2x_3 + 8,66x_1^2 + 6,85x_2^2 + 0,40x_3^2 \quad (4.3)$$

Lif kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı grafiği Şekil

4.5'te, deneysel aktivite değerine karşı tahmini aktivite değeri grafiği ise Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.5. Lif kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı



Şekil 4.6. Lif kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel lipaz aktivitesine karşı tahmini lipaz aktivitesi

Lif kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçlarına göre optimum koşullar: Glutaraldehit konsantrasyonu: 5,31 % v/v ; İmmobilizasyon Sıcaklığı: 38,25 C ve Enzim Konsantrasyonu: 8,36 % v/v olarak bulunmuştur. Lif Kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için bulunan optimum koşullarda immobilize enzim miktarı: 73,45 mg enzim/g destek ve Lipaz Aktivitesi: 7,49 umolpNP/gDestek.dk olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.11’da talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için kullanılan merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları verilmiştir.

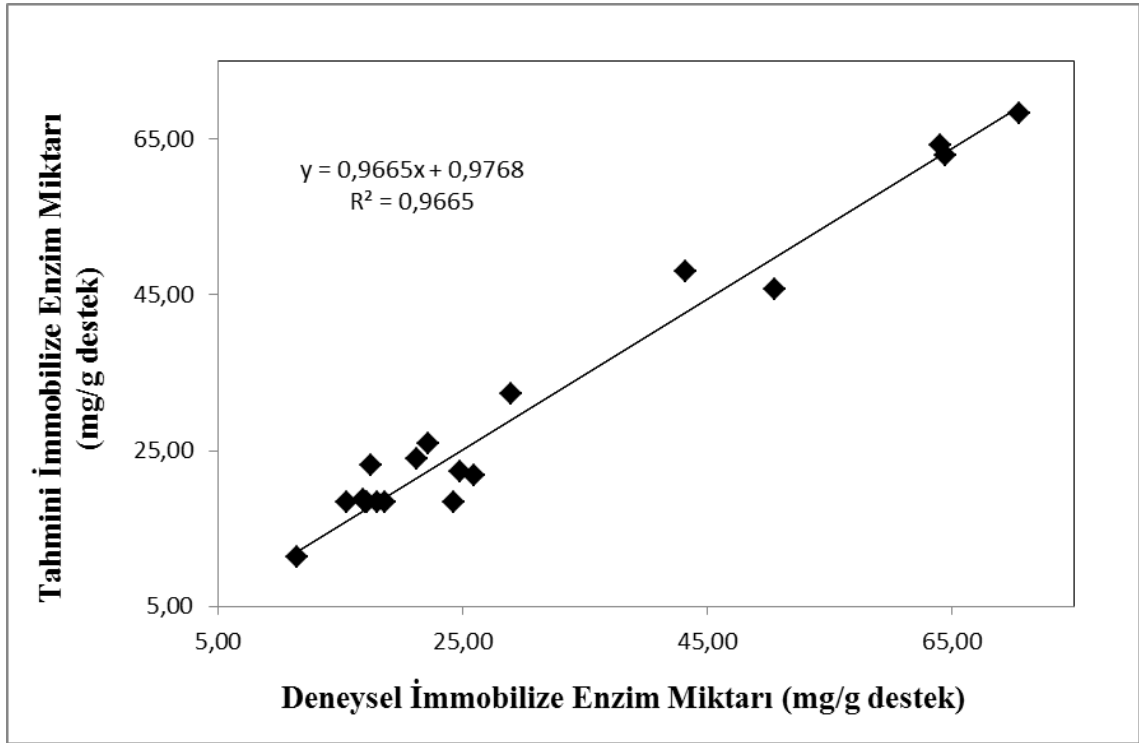
Çizelge 4.11. Talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçları

Deney No	X ₁ Glutaraldehit konsantrasyonu (% v/v)	X ₂ İmmobilizasyon Sıcaklığı (C)	X ₃ İmmobilizasyon pH değeri	İmmobilize Enzim Miktarı (mg enzim/g destek)	Lipaz Aktivitesi (umolpNP/gDestek.dk)
1	6	30	5	21,30	1,98
2	9	30	5	64,10	2,10
3	6	40	5	10,90	1,99
4	9	40	5	16,90	2,19
5	6	30	7	25,90	2,58
6	9	30	7	22,20	2,54
7	6	40	7	70,50	2,35
8	9	40	7	50,50	2,40
9	5	35	6	43,25	2,24
10	10	35	6	64,50	2,53
11	7,5	26,6	6	24,80	2,52
12	7,5	43,4	6	17,50	2,13
13	7,5	35	4,3	11,50	1,81
14	7,5	35	7,7	29,00	2,56
15	7,5	35	6	17,10	2,29
16	7,5	35	6	18,00	2,37
17	7,5	35	6	18,70	2,10
18	7,5	35	6	15,50	2,15
19	7,5	35	6	24,30	2,18
20	7,5	35	6	17,20	2,10

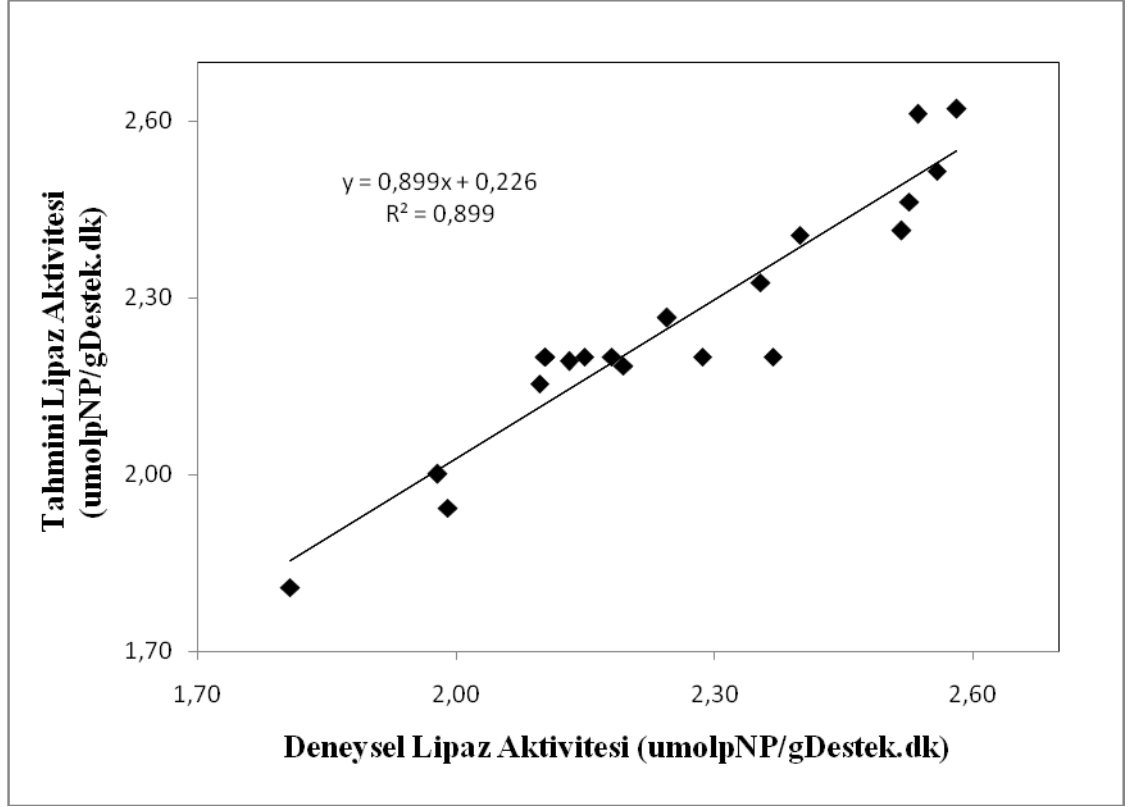
Talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonunun kemometrik optimizasyonunda immobilize enzim miktarı değerlerine göre b katsayıları kullanılarak oluşturulan model denklemleri aşağıda verilmiştir.

$$y = 18,38 + 4,45x_1 + 0,22x_2 + 6,25x_3 - 6,64x_1x_2 - 9,06x_1x_3 + 16,31x_2x_3 + 13,09x_1^2 + 1,52x_2^2 + 1,21x_3^2 \quad (4.4)$$

Talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı grafiği Şekil 4.7’de, deneysel aktivite değerine karşı tahmini aktivite değeri grafiği ise Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel immobilize enzim miktarına karşı tahmini immobilize enzim miktarı



Şekil 4.8. Talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için deneysel lipaz aktivitesine karşı tahmini lipaz aktivitesi

Talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçlarına göre optimum koşullar: Glutaraldehit konsantrasyonu: 5,04 % v/v ; İmmobilizasyon Sıcaklığı: 34,15 °C ve İmmobilizasyon pH değeri: 7,58 olarak bulunmuştur. Talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için bulunan optimum koşullarda immobilize enzim miktarı: 76,42 mg enzim/g destek ve Lipaz Aktivitesi: 2,70 umolpNP/gDestek.dk olarak hesaplanmıştır.

4.2. Enzim İmmobilizasyonunun Kemometrik Optimizasyon Sonuçları

Çizelge 4.12’de deneysel çalışmalarda kullanılan tüm destek maddeleri üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için bulunan optimum koşullar verilmiştir.

Çizelge 4.13’de deneysel çalışmalarda kullanılan tüm destek maddeleri üzerine lipaz enziminin immobilizasyonunun optimizasyonunda kullanılan model denklemleri verilmiştir.

Çizelge 4.12. Tüm destek maddeleri üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için bulunan optimum koşullar

Destek maddesinin adı	Lipaz enziminin immobilizasyonu için bulunan optimum koşullar
Çay Atığı	Glutaraldehit konsantrasyonu: 9,60 % v/v Destek-Glutaraldehit aktivasyon süresi: 23,64 saat Enzim Konsantrasyonu: 7,10 % v/v
Pamuk	Glutaraldehit konsantrasyonu: 8,43 % v/v İmmobilizasyon pH değeri: 7,04 Enzim Konsantrasyonu: 8,16 % v/v
Lif Kabağı	Glutaraldehit konsantrasyonu: 5,31 % v/v İmmobilizasyon Sıcaklığı: 38,25 °C Enzim Konsantrasyonu: 8,36 % v/v
Talaş	Glutaraldehit konsantrasyonu: 5,04 % v/v İmmobilizasyon Sıcaklığı: 34,15 °C İmmobilizasyon pH değeri: 7,58

Çizelge 4.13. Tüm destek maddeleri üzerine lipaz enziminin immobilizasyonunun optimizasyonunda kullanılan model denklemleri verilmiştir.

Destek maddesinin adı	Lipaz enziminin immobilizasyonunun optimizasyonunda kullanılan model denklemleri
Çay Atığı	$y = 20,77 + 1,25x_1 + 5,86x_2 + 5,35x_3 - 0,15x_1x_2 + 0,73x_1x_3 + 5,30x_2x_3 + 11,15x_1^2 - 2,78x_2^2 - 2,30x_3^2$
Pamuk	$y = 27,69 - 0,68x_1 + 8,66x_2 + 11,69x_3 + 0,59x_1x_2 + 1,19x_1x_3 + 15,74x_2x_3 + 8,22x_1^2 + 2,94x_2^2 + 1,38x_3^2$
Lif Kabağı	$y = 20,40 + 0,22x_1 + 15,43x_2 + 9,06x_3 - 1,50x_1x_2 + 1,12x_1x_3 + 6,40x_2x_3 + 8,66x_1^2 + 6,85x_2^2 + 0,40x_3^2$
Talaş	$y = 18,38 + 4,45x_1 + 0,22x_2 + 6,25x_3 - 6,64x_1x_2 - 9,06x_1x_3 + 16,31x_2x_3 + 13,09x_1^2 + 1,52x_2^2 + 1,21x_3^2$

Tüm destek maddeleri için bulunan optimum koşullarda lipaz enzimi destek maddelerinin üzerine immobilize edilmiştir. Bulunan optimum koşullarda elde edilen maksimum immobilize enzim miktarları ve lipaz aktiviteleri Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. Tüm destek maddeleri için bulunan optimum koşullarda maksimum immobilize enzim miktarları ve lipaz aktiviteleri

Destek maddesinin adı	İmmobilize Enzim Miktarı (mg enzim/g destek)	Lipaz Aktivitesi (umolpNP/gDestek.dk)
Çay Atığı	58,80	3,36
Pamuk	91,93	20,22
Lif Kabağı	73,45	7,49
Talaş	76,42	2,70

4.3 Enzimatik Biyodizel Üretimi

Enzimatik biyodizel sentezi beher içerisinde ham pirina yağı ve metanolün destek maddesine immobilize edilmiş lipaz enzimi beraberinde aşağıda verilen koşullardaki reaksiyonuyla gerçekleştirilmiştir.

Biyodizel sentezi için 250 mL'lik beher içine yağ ağırlığının %10'u oranlarında immobilize enzim ve 3'e 1 metanol/yağ molar oranı karışımı 3'er saat ara ile üç aşamada ilave edilmiştir. Karışım 35 °C'de inkübatör içinde 200 rpm hızla sürekli karıştırılmıştır. Reaksiyon sonunda elde edilen yağ asidi metil esterleri analiz edilmek üzere 1.8 ml kapaklı şişelerde +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Biyodizel tayini ince tabaka kromatografisi ile yapılmıştır. Sentezlenen biyodizel örnekleri ve standart biyodizelden Hamilton enjektör yardımıyla 1 µL alınmış Whatman K5 TLC plakala üzerine damlatılarak kurutulmuştur. Daha sonra sentezlenen biyodizel örnekleri ve standart biyodizel 90/15/4 (v/v) hekzan/dietileter/asetik asit çözelti sistemi kullanılarak plaka üzerinde yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonunda plaka üzerindeki noktalar % 95 etil alkol - % 5 H₂SO₄ ve % 0,5 a-naftol karışımına daldırılıp 150 °C'de 10 dk ısıtılarak görünür hale getirilmiştir. Son olarak elde edilen noktalar standart biyodizel örneği ile karşılaştırılmıştır. Bunun yanında sentezlenen biyodizel örnekleri GC-MS ile analiz edilmek üzere 1.8 ml kapaklı şişelerde +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Çeşitli denemeler sonunda çay atığı destek maddesi ile % 42,8±4,15; pamuk destek maddesi ile % 61,2±4,66; lif kabağı destek maddesi ile % 58,4±4,67 ve talaş destek maddesi ile % 50,8 ±3,19 ester dönüşümü elde edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada doğal destek maddesi olarak çay atığı, pamuk, lif kabağı ve talaş kullanılmıştır. Çay atığı, pamuk, lif kabağı ve talaş numuneleri beherlere koyulduktan sonra taze hazırlanmış poliglutaraldehit çözeltisi ile muamele edilerek aktive edilmiştir. Daha sonra lipaz enzimi doğal destek maddelerine (çay atığı, pamuk, lif kabağı ve talaş) immobilize edilmiştir. Lipozyme TL-100L lipaz enziminin destek maddelerine immobilizasyonunda desteğe tutturulan protein miktarı Bradford Metodu ile tayin edilmiştir. Numunelerin enzim aktivitesi spektrofotometrik metotla belirlenmiştir.

Enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak kullanılan çay atığı, pamuk, lif kabağı ve talaş üzerine lipaz enziminin tutunmasında etkili olan faktörlerin belirlenmesinde Plackett-Burman dizayn metodu kullanılmıştır. Belirlenen önemli faktörlerin optimizasyonu 3 faktörlü 5 seviyeli merkezi kompozit dizayn yöntemi ile yapılmıştır. Plackett-Burman dizayn metodunda Enzim Konsantrasyonu (% v/v); Glutaraldehit konsantrasyonu (% v/v); İmmobilizasyon pH değeri; İmmobilizasyon Sıcaklığı (°C); Karıştırma Hızı (rpm); Destek-Enzim temas süresi (Saat) ve Destek-Glutaraldehit aktivasyon süresi (Saat) olmak üzere yedi faktör incelenmiştir.

Çay atığı destek maddesi ile ilgili Plackett-Burman analiz sonuçlarına göre lipaz enziminin destek maddesine immobilizasyonunda Enzim Konsantrasyonu, Glutaraldehit konsantrasyonu ve Destek-Glutaraldehit aktivasyon süresi faktörleri en önemli faktörler olarak bulunmuştur. Pamuk destek maddesi ile ilgili Plackett-Burman analiz sonuçlarına göre lipaz enziminin destek maddesine immobilizasyonunda Enzim Konsantrasyonu, Glutaraldehit konsantrasyonu ve İmmobilizasyon pH değeri faktörleri en önemli faktörler olarak bulunmuştur. Lif kabağı destek maddesi ile ilgili Plackett-Burman analiz sonuçlarına göre lipaz enziminin destek maddesine immobilizasyonunda Enzim Konsantrasyonu, Glutaraldehit konsantrasyonu ve İmmobilizasyon Sıcaklığı faktörleri en önemli faktörler olarak bulunmuştur. Talaş destek maddesi ile ilgili Plackett-Burman analiz sonuçlarına göre lipaz enziminin destek maddesine immobilizasyonunda Glutaraldehit konsantrasyonu İmmobilizasyon pH değeri ve İmmobilizasyon Sıcaklığı faktörleri en önemli faktörler olarak bulunmuştur.

Çay atığı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçlarına göre optimum koşullar: Glutaraldehit

konsantrasyonu: 9,60 % v/v ; Destek-Glutaraldehit aktivasyon süresi: 23,64 saat ve Enzim Konsantrasyonu: 7,10 % v/v olarak bulunmuştur. Belirlenen optimum koşullarda immobilize enzim miktarı: 58,80 mg enzim/g destek ve Lipaz Aktivitesi: 3,36 umolpNP/gDestek.dk olarak hesaplanmıştır. Pamuk destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçlarına göre optimum koşullar: Glutaraldehit konsantrasyonu: 8,43 % v/v ; İmmobilizasyon pH değeri: 7,04 ve Enzim Konsantrasyonu: 8,16 % v/v olarak bulunmuştur. Belirlenen optimum koşullarda immobilize enzim miktarı: 91,93 mg enzim/g destek ve Lipaz Aktivitesi: 20,22 umolpNP/gDestek.dk olarak hesaplanmıştır. Lif kabağı destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçlarına göre optimum koşullar: Glutaraldehit konsantrasyonu: 5,31 % v/v ; İmmobilizasyon Sıcaklığı: 38,25 °C ve Enzim Konsantrasyonu: 8,36 % v/v olarak bulunmuştur. Belirlenen optimum koşullarda immobilize enzim miktarı: 73,45 mg enzim/g destek ve Lipaz Aktivitesi: 7,49 umolpNP/gDestek.dk olarak hesaplanmıştır. Talaş destek maddesi üzerine lipaz enziminin immobilizasyonu için merkezi kompozit dizayn analiz sonuçlarına göre optimum koşullar: Glutaraldehit konsantrasyonu: 5,04 % v/v ; İmmobilizasyon Sıcaklığı: 34,15 °C ve İmmobilizasyon pH değeri: 7,58 olarak bulunmuştur. Belirlenen optimum koşullarda immobilize enzim miktarı: 76,42 mg enzim/g destek ve Lipaz Aktivitesi: 2,70 umolpNP/gDestek.dk olarak hesaplanmıştır.

Çalışmanın son bölümünde yağ asidi metil esteri sentezi yapılmıştır. Sentez doğal destek maddelerine immobilize edilmiş olan lipaz enziminin pirina yağı ve metanol beraberinde reaksiyonu sonucu gerçekleştirilmiştir. Biyodizel üretimi 250 mL'lik beher içine yağ ağırlığının %10'u oranlarında immobilize enzim ve 3 aşamada eklenen 3'e 1 metanol/yağ molar oranına uygun matanolün 35 °C'deki inkübatör içinde 200 rpm hızla sürekli karıştırılması ile yapılmıştır. Çay atığı destek maddesi ile % 42,8±4,15; pamuk destek maddesi ile % 61,2±4,66; lif kabağı destek maddesi ile % 58,4±4,67 ve talaş destek maddesi ile % 50,8 ±3,19 ester dönüşümü elde edilmiştir.

Enzimlerin çeşitli metotlarla katı bir destek maddesine tutturularak immobilize edilmesi önemli araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır. Enzimlerin tekrar kullanımına ve elde edilen ürünün ortamdan kolayca ayrılmasına imkân sağladığından ucuz ve kullanıma uygun immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi özellikle endüstriyel kullanım açısından büyük önem taşımaktadır. İmmobilize enzim

sistemlerinin yüksek performans sağlaması için destek maddesi seçimi çok önemlidir. Seçilen destek maddesinin kararlılığı, maliyeti ve dayanıklılığı gibi önemli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Tüm bu sebeplerden dolayı lipaz immobilizasyonunda verim artırıcı yaklaşımlara önem vermesi ve bu çalışmaların olabildiğince desteklemesi gerekmektedir. Ayrıca bu araştırma sonuçlarının her geçen gün daha da ilgi çeken özellikle yenilenebilir enerji alanındaki çalışmalara önemli bir katkı sağlayacağını ve hem bu çalışmada kullanılan hem de benzer doğal destek maddelerinin biyokatalizör olarak endüstride daha büyük ölçekli kullanımına ışık tutacağını düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- Abdel Naby, M.A., Ismail, A-M.S., Ahmed, S.A., Abdel Fattah, A.F., 1998. Production and Immobilization of Alkaline Protease from *Bacillus Mycoides*, **Bioresource Technology**, 64, 205-210.
- Akbin, H.M., 2012. **Kanola Yağından Hidrotalsite Tutuklanmış Lipaz ile Biyodizel Üretimi**. Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli
- Aksoy, C., 2003. **Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu**. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul. s.10.
- Alagöz, D., 2007. **b-Galaktozidaz ve Glukoz İzomeraz'ın Eupergit Desteğe Kovalent İmmobilizasyonu ve İmmobilize Enzimlerin Laktoz Hidrolizi ve Glukoz İzomerizasyonunda Kullanılması**. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Anonim, 2008. **Dizel ve Biyodizel Yakıt Özelliklerinin Karşılaştırılması** www.eie.gov.tr
- Aybastier, Ö., 2010. **Bitkisel Atık Yağların Karakterizasyonu ve Biyodizel Üretiminde Değerlendirilmesi**. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Bursa.
- Aydın, Y., 2012. **İletken Polimerlerin İçerisinde Enzim Tutuklanmasıyla Yapılan Biyosensörler**. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı., Karaman.
- Ayla, A., 2011. **Cu (II) Bağlı Poli (Hema-Mah) Mikroküreler Üzerine α -Amilaz Enziminin İmmobilizasyonu, Optimizasyonu ve Kinetik Parametrelerinin İncelenmesi**. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır.
- Barnwal, B.K., Sharma, M.P., 2005. Prospects of Biodiesel Production from Vegetable Oils in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 9(4):363-378.
- Bartan, A.,2009. **Biyodizel Üretiminde Heterojen Katalizör Geliştirilmesi**, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bai, Y.X., Li, Y.F., Yang, Y., Yi, L.X., 2006., Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized nanoscale SiO sub spheres, **Process Biochem.**, 41, 770-777.
- Bailey, J.E., D.F. Ollis. *Biochemical Engineering Fundamentals*. TP248 .3 .B34 (1997).
- Bryjak, J., Anilyteb, J., Liesieneb.J.,2007. Evaluation of man-tailored cellulose-based carriers in glucoamylase immobilization. **Carbohydrate Research**, 342, 1105–1109.
- Bora,U., Kannan, K., Nahara, P.,2005. A simple method for functionalization of cellulose membrane for covalent immobilization of biomolecules. **Journal of Membrane Science** 250,

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* 72, 242-254.
- Brereton, G. R., 1990. Chemometrics Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems. **Ellis Horwood Limited**, England. 307p
- Brereton, G. R., 2003. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. **John Wiley & Sons**, Ltd, England. 489p.
- Cao, L., 2005. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. **Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kga**, Weinheim, 580p.
- Chae, H.J., In, M-J., Kim, E.Y., 1998. Optimization of Protease Immobilization by Covalent Binding Using Glutaraldehyde, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 73,195-204.
- Chang, T.M.S., 1976. Microencapsulation of Enzymes and Biologicals. K.Mosbach. **Methods Methods in Enzymology**. Academic Pres, New York. pp:201–218.
- Chang, F., Chang, S., Yen, Y.,1997. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM, **Applied Clay Science**, 67-73.
- Chang, S.W., Shaw, J.F., Yang, K.H., Chang, S.F., Shieh, C.J., 2007. Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(c-glutamic acid) by RSM. **Bioresource Technology**, 99.2008-2005.
- Çanakçı, M., Özsezen, A.N., 2005.valuating waste cooking oils as alternative diesel fue, **G.U. Journal of Science**, 18 (1): 81-91.
- Demir, C., 1997. **Dedetection of Metabolites by GC-MS and Analysis of Mixtures by Chemometrics**. Doktora Tezi, Bristol, 236p.
- Devlin, T., 1997. Text book of Biochemistry with clinical correlations 136-139.
- Demir, C. ve Özdemir, D., 2012. Kemometri eğitimi ders notları, 2-10, 17-21
- Dizge, N., Keskinler, B., Tanriseven, A., 2009. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene–divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal** 44, 220–225.
- Dizge, N., Keskiner, B.,2008.Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy. Accepted**.32, 1274-1278.
- Enweremadu, C.C., Mbarawa, M.M., 2009. Technical Aspects of Production and Analysis of Biodiesel From Used Cooking Oil-A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, In Pres.
- Fukuda, H., Kondo,A., Noda, H., 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and. Bioengineering**. 92(5):405-416.
- Gao, S., Wang, Y., Wang, T., Luo, G., Dai, Y.,2009. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. **Bioresource Technology** 100, 996–999.
- Haşimoğlu, C., İcingür, Y., Özsert, İ.,2008.Turbo şarjlı bir dizel motorda yakıt olarak biyodizel kullanılmasının motor performans ve egzoz emisyonlarına etkis, **Gazi Üniv. Müh. Mim. Fak. Der.**, 23 (1): 207-213.

- Huang, X, J., Yu, A.G., Xu, Z, K., 2008. Covalent Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* onto poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) Electrospun Fibrous Membranes for Potential Bioreactor Application. **Bioresource Technology**, 99:5459–5465.
- <http://www2.aku.edu.tr/~mkonuk/enzimler.pdf>
- http://www.albiyobir.org.tr/trde_b.htm
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., and Shrestha, S.,2001. roduction of Biodiesel Fuel From Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipas, **J. Mol. Catal. B Enzymatic**, Vol.16, 53-58.
- İmamoglu, Ö., 2011. Biyokimya Ders Notları, Muğla Üniversitesi, **Biyoloji Bölümü**, Muğla
- Kafadar, A.B.,2010. **Yağlardan biyodizel eldesine etki eden faktörlerin araştırılması**, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Diyarbakır, 4-10, 17-24.
- Kanışlı, M. E.,2010. **Çeşitli Yapıdaki İplikli Destek Materyallerine Lipaz Tutuklanması**. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Müh. Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van .
- Karaca, N., 2006. **Poli(N,N-Dimetilamit-ko-Akrilamit) ve Poli(N-İzopropilakrilami-ko-Akrilamit)/ k-Karragenan Polimerleri Kullanılarak Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu**. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Karabulut, A.F., 2008. **Pamuk Yağından Biyodizel Üretiminin Otimizasyonu**. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Karaosmanoğlu, F., 2003. Biyomotorin - Türkiye, Enerji ve Tabii Kaynaklar, Bakanlığı Petrol İşleri Genel Müdürlü Araştırma-Planlama Koordinasyon Raporu, Ankara, 20-22.
- Karra-Chaabounia, M., Bouaziz, I., Boufib, S., Maria Botelho, A., Gargouria.Y.,2008. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 66, 168–177.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö., 2004. Biyokimya, **Aktif Yayın Evi** . Erzurum.
- Klibanov, A.M., 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents.**Nature** 409, 241–246.
- Kennedy, J, F., Cabral, J, M, S., Scouten, W, H., 1983. **Immobilized Enzymes in Solid Phase Biochemistry**. Chemical Analysis, John Wiley and Sons, New York, 253–392 p.
- Luisi, P. L., Magid, L., 1986. Solubilization of Enzymes and Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar Solutions. **CRC Critical Reviews in Biochemistry**, 20:409–474.
- Mateo, C, Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M. Fernandez-Lafuente, R., 2007. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity Via

- Immobilization Techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, 40:1451–1463.
- Monier, M., El-Sokkary, A.M.A., Sarhan, A.A.,2010. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on modified natural wool fibers. **Reactive & Functional Polymers** 70, 122–128.
- Naby, A.M., İsmail. A-M.S., Ahmed.S.A., Abdel. F., 1998. Production and Immobilization of Alkaline Protease from *Bacillus Mycoides*, **Bioresource Technology** 64, 205-210
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2004. Lehninger - **Principles of Biochemistr.** p.193.
- Noureddin, H., Gao, X., Philkana, R. S., 2005. . Immobilized *Pseudomonas cepacia* Lipase for Biodiesel Fuel Production from Soybean Oil. **Bioresource Technology**, 96:769–777.
- Ölcüm, T., 2006. **Biyodizel Teknolojisi**. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Makine Müh. Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Öztürk, N., Akgöl, S., Arısoy, M., Denizli, A., 2007. Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres. **Separation and Purification Technology**, 58:83–90.
- Özçömlekçi, E., 2006. **Proteaz Enziminin Gluteraldehit Tutuklanarak Kovalent Bağlama İle İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi**, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
- Pahujani, S., Kanwar, S.S., Chauhan, G., Gupta, R.,2008. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. **Bioresource Technology** 99, 2566–2570.
- Rajakumara, E., Acharya, P., Ahmad, S., Sankaranaryanan, R., Rao, N, M.. 2008. **Structural basis for the remarkable stability of *Bacillus subtilis* lipase (Lip A) at low pH**. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784:302–311.
- Sabancı, A., Ören M.N., Yaşar B., Öztürk M. M., Atal M., 2006. **Türkiye’de Biyodizel ve Biyoetanol Üretiminin Tarım Sektörü Açısından Değerlendirilmesi**.
- Şeker, S., 2008. **Biyodizel Üretimi Ve Katkı Maddelerinin Yakıt Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi**, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sen, S., 2012. **Hayvansal Yağlardan Biyodizel Üretimi ve Dizel Motor Performans ve Emisyonlarına Etkisinin Araştırılması**. Karabük Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Makine Mühendisliği Anabilim Dalı. Karabük, 914.3.026.
- Şengül, A., 2012. **Lipaz Enziminin Magnetik Nanopartiküllere Farklı Kollar Üzerinde İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu**. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Adana.
- Schwab, A.W., Bagby, M.O., Freedman, B., 1987. Preparation and properties of diesel fuels from vegetables oils. **Fuel** 66 (10), 1372–1378.

- Schmidt, R.D., Verger, R., 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37,1608.
- Shu, C., Cai, J., Haung, L., Zhu, X., Xu, Z., 2011. Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilize *Candida rugosa* lipase on cotton cloth. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72,139-144.
- Taylor, R.F., 1991. Protein Immobilization Fundamentals and Applications. Marcel Dekker Inc. **United States of America**, p.73-139.
- Tekman, Ş., Öner.N., 1994. Genel Biyokimya Dersleri. İstanbul Üniversitesi Yayınları, Eczacılık Fakültesi, İstanbul.
- Telefoncu, A. 1997. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji.Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, **Ege Üniversitesi Basımevi**, İzmir.
- Vecchia, R.D., Sebrao. D., Nascimento. M.G., Soldi. V., 2005. Carboxymethylcellulose and Poly (vinyl alcohol) Used As a Film Support For Lipases Immobilization. *Journal of Biotechnology.* 40 2677-2682
- Vicente, G. F., 2007, Use Of Lipases In Organic Synthesis, Industrial. Enzymes. **Wiley-Vch, Weinheim**, 301s.
- Villalonga, R., Fujii, A., Shinohara, H., Tachibana, S., Asano, Y., 2008. Covalent immobilization of phenylalanine dehydrogenase on cellulose membrane for biosensor construction. *Sensors and Actuators B* 129, 195–199.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.,2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9:113-148.
- Wu, S., Lia, Y.,2008. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 54, 103–108.
- Wang, S, S., 1993. **Chemistry of Protein Congution and Cross Linking**. CRC Press, Boca Raton. USA
- Winkler, U.K., Stuckmann, M., 1979. Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 138, 663-679.
- Xu, Y., Du, W., Liu, D., Zeng, J., 2003. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent- free medium. *Biotechnology Letters.* (25): 1239-1241.
- Yağız, F., 2006. **Hidrotalsit ve Zeolit Üzerine Tutuklanmış Lipaz ile Yemeklik Atık Yağlardan Biyodizel Üretimi**. Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Müh. Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli.
- Yang, G., Wu, J., Xu, G., Yang, L.,2009.. Enhancement of the activity and enantioselectivity of lipase in organic systems by immobilization onto low-cost support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57, 96–103.
- Yaşar, B.,2009. **Alternatif Enerji Kaynağı Olarak Biyodizel Üretim ve Kullanım Olanaklarının Türkiye Tarımı ve AB Uyum Süreci Açısından**

Değerlendirilmesi Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Adana.

- Yücel, Y., 2013. The Enzymatic Production of Biodiesel from Pomace Oil Using Immobilized *Thermomyces lanuginosus*, Energy Sources, **Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, 35:4, 370-375.
- Yücel, Y., 2011. Biodiesel Production From Pomace Oil By Using Lipase Immobilized Onto Olive Pomace. **Bioresource Technology**. 102. 3977–3980.
- Yücel, Y., 2008. **Bazı Enzimleri Kullanarak Biyodizel Üretimi ve Biyodizel Özelliklerinin Analitik Metotlarla Araştırılması**, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Bursa.
- Zaidan, U.H., Abdul Rahman, M.B., Othman, S.S., Basri, M., Abdulmalek, E., Abdul Rahman, R., Zaliha, R.N., Salleh, A.B., 2012. Biocatalytic production of lactose ester catalysed by mica-based immobilised lipase. **Food Chemistry** 131, 199-205.

8. ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1985 yılında Hatay'ın İskenderun ilçesinde doğdu, Lise öğrenimini aynı ilde, Şemsettin Mursaloğlu Lisesi'nde tamamladı, 2004 yılında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümünde lisans eğitimine başladı, 2005 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesine yatay geçiş yaptı. 2008 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2009 yılında; Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Bölümü Yüksek Lisans Programını kazandı.