KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOYAĞLAMA YAĞLARININ TUTUKLANMIŞ LİPAZ KATALİZLİ ÜRETİMİ

Kimya Müh. Bahar GÜRKAYA KUTLUK

KOCAELİ 2012

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOYAĞLAMA YAĞLARININ TUTUKLANMIŞ LİPAZ KATALİZLİ ÜRETİMİ

Bahar GÜRKAYA KUTLUK

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

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

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

Tezin Savunulduğu Tarih: 27.06.2012

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince danışmanlığımı yapan, çalışma konum hakkında bana yol gösteren, tez çalışmam boyunca yürüttüğü projesinde de yer almamı sağlayan ve maddi manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Nurcan KAPUCU'ya,

Tez çalışmam boyunca her türlü yardım ve desteklerini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Başar UYAR' a,
Çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yanımda olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuzhan İLGEN'e,

Kocaeli Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyeleri'ne ve güler yüzlü destekçimiz Nurdan ÖZTEMEL'e,

Çalışmalarım sırasında güler yüzleri ile beni yalnız bırakmayan N.Gamze KARSLI YILMAZ'a, Şebnem KEMALOĞLU DOĞAN'a ve Hümeyra ŞİRİN'e kısacası polimer laboratuarındaki bütün arkadaşlarıma,

Birlikte aynı projede çalıştığım ve laboratuarda her türlü deneysel mücadeleye beraber atıldığımız sevgili arkadaşım H.Melda AKBİN'e,

Biyoteknoloji araştırma grubumuzun fahri üyesi ve en büyük destekçimiz Merve ERCAN KALKAN'a,

Sevgi ve iyi niyetini benden hiç esirgemeyen bir zamanlar aynı sıraları paylaştığımız sevgili Filiz UĞUR NİGİZ'e,

Bu tezin hazırlanmasında, görev aldığım proje nedeniyle katkısı bulunan TÜBİTAK'a,

Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi manevi hiçbir yardımı esirgemeyen, bugünleri bana hediye eden ve bunun için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan babam Halil GÜRKAYA ve annem Sefide GÜRKAYA'ya ve tabii ki canlarım, biricik kız kardeşlerim Tülin ve Güzin'e,

Her zaman olduğu gibi enzim macerasında da beni yalnız bırakmayan, en büyük desteğim, dostum, can yoldaşım, sevgili eşim Togayhan KUTLUK'a,
Sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

Haziran – 2012 Bahar GÜRKAYA KUTLUK

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ vii
SİMGELER viii
ÖZET ix
ABSTRACT x
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 3
1.1. Yağlayıcı İle İlgili Genel Kavramlar 3
1.2. Yağlayıcıların Fiziksel Özellikleri 4
1.3. Yağlayıcı Çeşitleri 5
1.3.1. Mineral yağlar 6
1.3.2. Sentetik yağlar 7
1.4. Biyoyağlayıcı 13
1.4.1. Biyoyağlayıcı kullanımının tarihçesi, kullanım alanları, avantajları ve dezavantajları 16
1.4.2. Dünyada biyoyağlayıcılar ile ilgili yasa ve düzenlemeler 17
1.5. Biyoyağlayıcı Üretim Yöntemleri 20
1.5.1. Biyoyağlayıcı için bitkisel yağların modifikasyonu 22
1.5.1.1. Epoksidasyon 22
1.5.1.2. Polimerizasyon 23
1.5.1.3. Esterleşme/Transesterleşme ile organik polyester sentezi 24
1.5.2. Enzim katalizörlü biyoyağlayıcı üretimi 25
1.5.2.1. Lipazlar 27
1.5.2.2. Biyoyağlayıcı üretimine etki eden parametreler 30
1.6. Bitkisel yağlar, fiziksel ve kimyasal özellikleri 32
1.7. Oleyik asit 35
1.8. Trimetilolpropan (TMP) 36
1.9. Konu İle İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar 38
2. MALZEME VE YÖNTEM 55
2.1. Malzeme ve Kullanılan Cihazlar 55
2.2. Yöntem 56
2.2.1. Üre hidrolizi yöntemiyle hidrotalsit hazırlama 56
2.2.2. Çitosan desteğin hazırlanması 56
2.2.3. Desteklere lipaz tutuklama 56
2.2.4. Protein tayini 57
2.2.5. Lipaz aktivitesi tayini 57
2.2.6. Trimetilolpropan oleat üretimi 58
2.2.7. Trimetilolpropan ester analizi 59
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 61
3.1. Celite'e Lipaz Tutuklama 62

3.1.1. Enzim derişiminin etkisi 62
3.1.2. Tampon türü ve pH'ının etkisi 64
3.1.3. Sıcaklığın etkisi 66
3.1.4. Celite'e tutuklanmış lipaz için aktivite tayini 68
3.2. Çitosana Lipaz Tutuklama 69
3.2.1. Enzim derişiminin tutuklamaya etkisi 70
3.2.2. Tampon türü ve pH'ının etkisi 74
3.2.3. Sıcaklığın etkisi 76
3.2.4. Çitosana tutuklanmış lipaz için aktivite tayini 77
3.3. Oleyik Asidin Esterleşme Reaksiyonu için Bulgular 78
3.3.1. Ortamdan suyun uzaklaştırılması ve başlangıç su içeriğinin etkisi 78
3.3.2. Asit/TMP mol oranının etkisi 80
3.3.3. Reaksiyon sıcaklığının etkisi 81
3.3.4. Enzim miktarının etkisi 83
3.3.5. Karıştırma hızının etkisi 84
3.3.6. Reaksiyon süresinin etkisi 85
3.3.7. Kullanılan alkol türünün etkisi 86
3.3.8. ÜHT-TL 100 L tutuklu lipazının diğer ticarı lipaz formları ile karşılaştırılması 89
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 91
KAYNAKLAR 96
EKLER 101
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER 112
ÖZGEÇMİŞ 113

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya'da yağlayıcı kullanımının bölgesel dağılımı 4
Şekil 1.2. Dünya genelinde bitkisel ve hayvansal yağların tüketim alanları 15
Şekil 1.3. Almanya'da yağların işlenmesinin yıllara göre dağılımı 16
Şekil 1.4. Kimyasal katalizörler varlığında oleik asidin epoksidasyonu ve ester eldesi 23
Şekil 1.5. Oleik asit estolidlerinin sentezi 24
Şekil 1.6. TMP ile karboksilik asit arasındaki esterleşme tepkimesi 24
Şekil 1.7. Lipaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar 26
Şekil 1.8. Yağ asidi ve herhangi bir alkol arasındaki esterleşme reaksiyonu 26
Şekil 1.9. Enzim-Substrat ilişkisi 28
Şekil 1.10. Reaksiyon sistemindeki su içeriği ve tutuklanmış enzimin davranışı 31
Şekil 1.11. Oleyik asidin şematik gösterimi 35
Şekil 1.12. Baz katalizör varlığında TMP elde edilmesi 37
Şekil 1.13. Palm yağı TMP esterlerinin HPLC analizi 40
Şekil 1.14. Farklı sıcaklıklarda TMP esterleri sentezi 42
Şekil 1.15. Destek türünün TMP-triester dönüşümüne etkisi 42
Şekil 1.16. Kullanılan tutuklu lipaz türünün zamanla ürün derişimine etkisi 43
Şekil 1.17. Reaksiyon sıcaklığı ve basıncın bir fonksiyonu olarak TMP triester oluşumu (%) 45
Şekil 1.18. Oleik asit ile TMP'nin esterleşmesinde toplam asit dönüşümünün zamanla değişimi 46
Şekil 1.19. 70 °C (A) ve 100 °C(B) sıcaklıklarında oleik asit, TMP, mono-, di- ve triester derişiminin zamanla değişimi 47
Şekil 1.20. Yağ asidinin TMP ile esterleşme reaksiyonu 48
Şekil 1.21. Kaprilik asitin TMP ile esterleşmesine sıcaklığın etkisi (▲toplam dönüşüm, ■TMP triester dönüşümü) 49
Şekil 2.1. Deneysel çalışmada kullanılan ekipmanlar ve deney düzeneği, (a) çalkalamalı inkübatör, (b) mikrofantrifüj), (c) reaksiyon kapları (deney düzeneği), (d) ÜHT-TL100L tutuklanmış lipazı (katalizör) 55
Şekil 2.2. (a) Reaksiyon karışımı, (b) ve (c) ürünlerin santrifüj sonrası görünümü 58
Şekil 3.1. Lipaz miktarının Celite'e tutuklamaya etkisi 63
Şekil 3.2. Celite'e lipaz tutuklanmasında tampon türü ve pH'ının tutuklanmaya etkisi 65
Şekil 3.3. Celite kullanımında tutuklama sıcaklığının protein miktarına etkisi 67
Şekil 3.4. Celite'e tutuklanmış Lipozyme CALB L için aktivite ve spesifik aktiviteye enzim derişimi ve sıcaklığın etkisi 69
Şekil 3.5. Lipozyme TL 100 L'nin ıslak ve kuru çitosana tutuklanmasında enzim miktarının desteğe yüklenen protein miktarına etkisi 71
Şekil 3.6. Lipozyme TL 100 L'nin ıslak ve kuru çitosana tutuklanmasında enzim miktarının tutuklama verimine etkisi 72

Şekil 3.7. Lipozyme CALB L ve Palatase 20000 L lipazlarının ıslak çitosana tutuklanmasında enzim derişiminin protein miktarına etkisi 73
Şekil 3.8. Farklı lipazların ıslak çitosana tutuklanmasında enzim derişiminin tutuklanma verimine etkisi 74
Şekil 3.9. Çitosana lipaz tutuklanmasında sıcaklığın etkisi 76
Şekil 3.10. Reaksiyon kabının atmosfere açık ve kapalı olmasının oleik asit dönüşümüne etkisi 79
Şekil 3.11. Farklı su içeriklerinde asit/TMP oleyik asit dönüşümüne etkisi..... 80
Şekil 3.12. Reaksiyon sıcaklığının farklı su içeriklerinde oleik asit dönüşümüne etkisi..... 82
Şekil 3.13. Reaksiyonda kullanılan enzim miktarının oleik asit dönüşümüne etkisi..... 83
Şekil 3.14. Farklı karıştırma hızlarının oleik asit dönüşümüne etkisi..... 85
Şekil 3.15. Reaksiyon süresinin oleyik asit dönüşümüne etkisi 86
Şekil 3.16. Farklı alkoller ile oleik asidin esterifikasyonunda dönüşümün zamanla değişimi..... 87
Şekil 3.17. Oleyik asitin palmitil alkol ve stearil alkol ile esterleşmesi reaksiyonlarında kullanılan lipaz türünün oleyik asit dönüşümüne etkisi 88
Şekil 3.18. Enzim türünün ve tutuklamanın oleyik asit dönüşümüne etkisi 89

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Bazı sentetik yağlayıcı tipleri ve kullanım alanları 8
Tablo 1.2. Avrupa'da kullanılan biyoyağlayıcı* pazar payının ülkelere göre dağılımı (%) 14
Tablo 1.3. USDA'ya göre A.B.D.'de yerel yönetimler için ürünlere getirilen yasal karışım oranlarının miktarları 19
Tablo 1.4. C_6-C_{26} yağ asitlerinin enzimatik esterifikasyonu ile elde edilen ürünler 32
Tablo 1.5. Çeşitli bitkisel yağların yağ asidi bileşimi 34
Tablo 1.6. Oleik asidin bazı fiziksel özellikleri 36
Tablo 1.7. Trimetilolpropanın fiziksel ve kimyasal özellikleri 37
Tablo 1.8. Litearatürde enzim katalizli polyol esterler ve vaks esterler üzerine yapılmış bazı çalışmalar 53
Tablo 3.1. Çitosana lipaz tutuklanmasında pH'ın desteğe yüklenen enzim miktarına etkisi 75
Tablo 3.2. Çitosana lipaz tutuklanmasında pH'ın tutuklanma verimine etkisi 75
Tablo 3.3. Çitosana tutuklanmış lipazların aktivite ve spesifik aktiviteleri 77

SİMGELER

M	: Molekül kütlesi (g/mol)
m	: Örnek kütlesi (g)
°C	: Sıcaklık (Celcius)

Kısaltmalar

AB	: Avrupa Birliği
A.B.D.	: Amerika Birleşik Devletleri
CLA	: Conjugated Linoleic Acid (Konjuge Linoleik Asit)
DE	: Dibazik Ester
FAME	: Fatty Acid Methyl Ester (Yağ Asidi Metil Esteri)
FFA	: Free Fatty Acid (Serbest Yağ Asidi)
HOVO	: High Oleic Vegetable Oil (Yüksek Oleik Asitli Bitkisel Yağlar)
HTF	: Heavy Trigliseride Fraction (Ağır Trigliserid Fraksiyonu)
NPG	: Neopentil Glikol
OA	: Oleik asit
PA	: Palmitik asit
PAG	: Polialkilen Glikol
PAH	: Poliaromatik Hidrokarbon
PAO	: Polialfaolein
PE	: Penta Eritritol
PETDER	: Petrol Sanayi Derneği
PIB	: Poli İzobüten
PKOME	: Palm Kernel Oil Methyl Esters (Palm Çekirdeği Yağı Metil Esteri)
POME	: Palm Oil Methyl Esters (Palm Yağı Metil Esteri)
PU	: Poliüretan
SA	: Stearik asit
SN	: Solvent Neutrals (Nötral Çözücüler)
TMP	: Trimetilolpropan
ÜHT	: Üre hidrolizinden elde edilen Mg-Al Hidrotalsit
ÜHT-TL100L	: Üre hidrolizi Mg-Al Hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100 L

BİYOYAĞLAMA YAĞLARININ TUTUKLANMIŞ LİPAZ KATALİZLİ ÜRETİMİ

ÖZET

Günümüzde petrol kaynaklarının hızla azalması ve çevreye karşı duyarlılığın artması sebebiyle bitkisel yağların sentetik esterlerinin biyoyağlama yağı olarak kullanımı yaygınlaşmaktadır. Bu çalışmada oleik asidin bir polyol alkol olan trimetilolpropan (TMP) ile transesterleşmesi sonunda biyoyağlama yağı (TMP ester) üretimi incelenmiştir. Üre hidrolizi yöntemiyle sentezlenen Mg-Al hidrotalsit desteğe tutuklanmış olan *Thermomyces lanuginosa* lipazı (ÜHT-TL100L) reaksiyonda katalizör olarak kullanılmıştır. Reaksiyonda sıcaklık, yağ asidi/alkol mol oranı, katalizör miktarı, çalkalanma hızı ve ortamdaki su içeriğinin TMP-ester verimine etkisi incelenmiştir. Reaksiyonlar ağzı açık ve kapalı olmak üzere 25 ml hacmindeki erlenlerde 24 saat süre ile gerçekleştirilmiş, böylece reaksiyon ilerledikçe oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılmasının dönüşüme etkisi gözlemlenmiştir. Başlangıçta ortama eklenen su miktarı (ağ. % substrat) %0-20 aralığında değiştirilerek asit/alkol mol oranının 3/1, 4/1 ve 6/1 olduğu koşullarda deney yapılmıştır. Sıcaklık 30-60 °C aralığında değiştirilmiştir. Enzim miktarının etkisinin incelendiği deneylerde, enzim tepkime ortamına ağırlıkça %1-9 aralığında farklı oranlarda eklenmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda 30 °C sıcaklıktaki farklı başlangıç su içeriğine sahip deney setlerinde elde edilen bulgular bu sıcaklığın yüksek dönüşümler elde etmek için yetersiz kaldığını göstermiştir. %1'in üzerinde su içeriğinin değiştirilmesi ise dönüşüme bir etki sağlamamıştır. 24 saatlik reaksiyon süresi içerisinde 3/1 asit/alkol mol oranı ile 40 °C sıcaklıkta, %5 enzim miktarı, %1 su içeriği ve 320 rpm çalkalama hızı, %90'ın üzerinde TMP ester verimi sağlamıştır.

Anahtar kelimeler: Biyoyağlayıcı, Hidrotalsit, Lipaz, Polyol Esterler, *Thermomyces lanuginosa*.

BIOLUBRICANT PRODUCTION BY IMMOBILIZED LIPASE CATALYSIS

ABSTRACT

Today, the rapid decline in oil supplies due to increased sensitivity to the environment is expanding the use of synthetic esters of vegetable oils, as biolubricant. In this study, transesterification of oleic acid with trimethylolpropane (TMP), which is a polyol alcohol, to produce biolubrication oil (TMP ester) was studied. *Thermomyces lanuginosus* lipase was immobilized on urea hydrolyzed Mg-Al hydrotalcite (UHT- TL100L) used as catalyst. The effect of reaction temperature, fatty acid/alcohol molar ratio, amount of the catalyst and amount of water on TMP ester yield were examined. The reactions were carried out in the 25 ml volumed open and closed flasks for 24 hours to observe the effect on the oleic acid conversion of evaporation of the water generated in the reaction. Initial water content of the media (% substrate, w/w) in the range of 0-20%, by changing the acid/alcohol molar ratio 3/1, 4/1 and 6/1 under conditions in which tests were carried out. The temperature was varied between 30-60 °C. Tests examined the effect of the amount of enzyme, the enzyme was added to the reaction medium at different rates in the range of 1-9% by weight. As a result of experimental studies at 30 °C with different initial water content of the findings are inadequate to achieve this temperature showed higher conversions. Changing of the water content of more than 1% did not change the conversion. When the reaction time of 24 hours in 3/1 acid/alcohol molar ratio at 40 °C with 5% the amount of enzyme, 320 rpm agitation speed and 1% water content, the yield of ester is more than 90%.

Keywords: Biolubricants, Hidrotalcite, Lipase, Polyol esters, *Thermomyces lanuginosus*.

GİRİŞ

Son yıllarda petrol kaynaklarının büyük ölçüde azalması ve çevreye olan duyarlılığın artması sebebiyle biyobozunur ürünler üzerine yapılan araştırmalarda önemli bir artış olduğu görülmektedir. Devlet politikaları ve yaptırımlar sonucu biyobozunur ürünler hemen her alanda kullanılmaya başlandıysa da halen petrol türevli ürünlerle kıyaslandığında birçoğu pahalıdır. Bu nedenle yaygın olarak kullanılmasalar da her geçen yıl hızlı bir artış ile dünya pazarında yerlerini almaktadırlar.

Bu anlamda artan talebin karşılanmasının yanı sıra yeni ve daha ekonomik ürünler elde edilmesi üzerine yapılan çalışmalar ağırlıktadır. Yağlayıcıların doğaya verdiği tahribat göz önüne alındığında biyoyağlayıcılar bu araştırma konularının en önemli başlıklarından biridir. Bu araştırmalar sonucunda doğada kısa sürede %100 bozunur yağlayıcıların elde edilebileceği, bu yağlayıcıların mineral yağlarla yarışabilecek tribolojik özelliklere sahip olabileceği görülmektedir.

Bu tez çalışmasında, öncelikle Lipozyme TL 100 L (*Thermomyces lanuginosa*), Lipozyme CALB L (*Candida antarctica* type B) ve Palatase 20000 L (*Rhizomucor miehei*) serbest lipazlarının Celite ve çitosan desteklere tutuklanması incelenmiş; tutuklama işlemine etki eden sıcaklık, enzim derişimi, tampon türü ve pH'ı gibi parametreler incelenerek biyoyağlayıcı üretimi için yüksek aktiviteye sahip bir tutuklanmış lipaz elde edilmesi amaçlanmıştır.

Elde edilen tutuklu lipazların performansı hidrolitik aktivite ve tutuklanan protein miktarı açısından önceki çalışmalarla elde edilen tutuklu lipazla karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve çalışmanın sonraki aşamalarında üre hidrolizi yöntemiyle elde edilmiş Mg-Al hidrotalsite tutuklu Lipozyme TL 100 L (ÜHT-TL 100 L) kullanılmasına karar verilmiştir.

Daha sonra elde edilen tutuklanmış lipaz ile önemli bir yağ asidi olan oleyik asit ile yine önemli bir polyol alkol olan trimetilolpropan (TMP) arasındaki esterleşme reaksiyonu ile biyoyağlayıcı üretimi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon parametrelerinin

yağ asidi dönüşümü üzerindeki etkileri adım adım incelenmiştir. Bunun için öncelikle reaksiyonda oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılmasının dönüşüme etkisinin belirlenebilmesi için açık ve kapalı kaplar kullanılmış, ardından ortamın başlangıç su içeriği, asit/alkol mol oranı, sıcaklık, enzim miktarı, karışma hızı, alkol türü ve reaksiyon süresi parametrelerinin yağ asidi dönüşümü üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Son olarak, biyoyağlayıcı üretimi için belirlenen en uygun koşullarda ÜHT-TL 100 L tutuklanmış lipazı, serbest haldeki Lipozyme TL 100 L ve bu lipazın ticari tutuklanmış formu olan Lipozyme TL IM ile karşılaştırılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Yağlayıcı ile İlgili Genel Kavramlar

Makine bileşenlerinin yüzeyleri çıplak gözle oldukça iyi görünür. Ancak yakından bakıldığında kusurlar görünmeye başlar. Bu mikroskobik yükseltiler ve girintiler pürüz olarak adlandırılır. Kuru yüzey hareket etmeye başladığında bu pürüzlü kısımlar birbirine kilitlenebilir ve küçük kırılmalara yol açabilir. Aşınma, sert kirletici parçacıkların karşılıklı iki yüzey arasında engel oluşturması ile gerçekleşir ve makine yüzeyinde ince çizgiler oluşturur. Bu sürtünme olayı aynı zamanda hareket enerjisinin ısı enerjisine dönüşmesine ve dolayısıyla enerji kaybına yol açar.

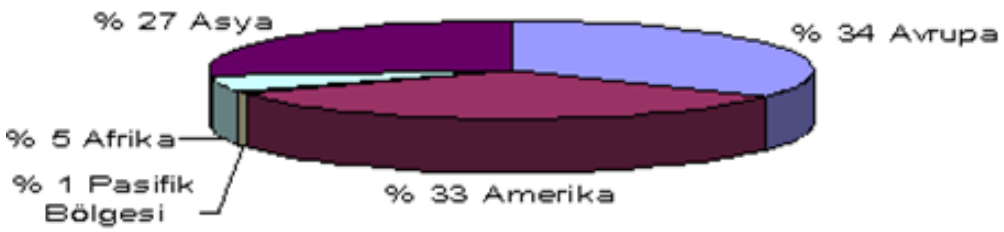
Yağlayıcılar öncelikli olarak bu sürtünme, aşınma ve enerji kaybını engellemek için yüzeyler arasında kayganlaşmayı sağlayıcı ince bir film tabakası oluştururlar. İkincil görevleri ise, metal yüzeylerde zamanla meydana gelebilen korozyonu önlemektir. Modern yağlayıcılar içerdikleri katkılar sayesinde metal yüzey ile kimyasal bağlar oluşturarak su moleküllerine karşı bir bariyer görevi görür.

Yağlayıcıların en geniş uygulamalarından biri olan motor yağı, motorlu taşıtlarda içten yanmalı motoru ve elektrikli ekipmanları korur.

Tipik olarak yağlayıcıların %90'ı baz yağ iken %10'u veya daha da az bir kısmını ise katkıları oluşturur. Bitkisel yağlar veya poliolefinler, esterler, silikonlar ve florokarbonlar gibi sentetik akışkanlar ve bunların benzerleri baz yağ olarak kullanılırlar. Katkılar sürtünme ve aşınmayı azaltırken viskozite, viskozite indeksi ve oksidatif kararlılığı arttırır, malzemenin yaşlanmasını, kirliliğini ve korozyonunu azaltır (Directions of Commander, 1993).

Yağlayıcıların dünya genelinde yıllık 37 milyon ton ile oldukça yüksek bir kullanım miktarı vardır. Otomotivde kullanımı en büyük payı oluştururken bunun ardından ikinci sırayı hidrolik akışkanları alır (Directions of Commander, 1993). En popüler kullanıma sahip yağlayıcıların %70-90 oranını baz yağ oluşturur. Geri kalan kısmında ise, kullanım alanına göre değişen çeşitli katkı maddeleri vardır. Bu

katkılar baz yağın doğal özelliklerinden olan viskozite, viskozite indeksi, hidrolitik kararlılık, oksidatif kararlılık, soğuktaki kararlılık gibi özelliklerini kullanım alanına göre değiştirirler. En çok kullanılan baz yağlar ise, mineral yağlardır. Şekil 1.1. ile dünyada yağlayıcı kullanımının bölgelere göre dağılımı gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Dünya'da yağlayıcı kullanımının bölgesel dağılımı (Salimon, 2010)

1.2. Yağlayıcıların Fiziksel Özellikleri

Bir yağlayıcının en önemli özelliği viskozitesidir. Uygun viskozitede yağ seçimi yapılırken metal yüzeylerde aşınmayı önlemek için yüksek bir temas yüzeyi sağlarken ısı kaybının en az olması gerekmektedir.

Petrol türevli yağlayıcılar temelde bir karışım oldukları için kesin bir donma noktası göstermezler. Daha ziyade içeriğindeki vaks gibi bileşenler yağ soğutuldukça sıvı içinde çökelti oluşturarak bulutumsu bir görüntü oluştururlar. Bulutun oluştuğu bu sıcaklık yağın bulutlanma noktası olarak adlandırılır. Bu noktadan daha ileriye soğutma yapıldığında yağ daha fazla akmaz veya pompalanamaz. Bu sıcaklık ise yağın akma noktası olarak adlandırılır. Bu özellik vaks içeriği yüksek baz yağlarda daha çok görülür ve bulutlanmayı engellemek için katkı maddelerinin eklenmesi gerekir. Yağın akma noktasındaki davranışı daha çok yağın düşük sıcaklıklara maruz kaldığı soğutucu kompresörlerinin yağlanmasında önemlidir.

Bir yağlayıcı ısıtıldığında, içeriğindeki alevlenebilir bileşenler buharlaşmaya başlar. Yağlayıcı yüzeyinde yeterli derişimde buharının oluştuğu sıcaklıkta eğer yağlayıcı üzerine bir alev kaynağı yaklaştırılırsa bu nokta ürünün parlama noktasıdır. Tutuşma noktası ise, yağ yüzeyinde yeterli derişimde bulunan buharın parlama sonucunda yanmaya devam etmesidir. Parlama ve tutuşma noktası ürünün depolanması ve diğer ürünlerle etkileşimi ile ilgili bize bilgi verir.

Petrol ürünleri yüksek sıcaklıklara çıkarıldıklarında yağ içindeki organik asitler nedeniyle oksidasyona maruz kalırlar. Asiditedeki artış, yağın suyu ayırma yeteneğini azaltır ve korozyonun da artmasına neden olur. Yağdaki mevcut asit miktarı nötralizasyon sayısı ölçülerek belirlenir. Bu aynı zamanda Toplam Asit Sayısı olarak adlandırılır.

İçten yanmalı motorlarda ise, yanmanın yan ürünü olarak açığa çıkan asidi nötralize etmek için baz katkıları eklenir. Bu katkının miktarı Toplam Baz Sayısı ile belirlenir. Bütün bunların yanında bir yağlayıcının su içeriği, suyla karışmama özelliği, damlama noktası, suyla yıkanma ve yük taşıma kabiliyeti gibi özellikleri de önem taşır.

1.3. Yağlayıcı Çeşitleri

Yağlayıcılar kullanılacağı yere, yağlama yapılacak yüzeyin yapısına, makinenin tasarımına ve yağlamanın yapılma sıklığına bağlı olarak yağlayıcı yağlar, gresler ve katı yağlayıcılar olarak çeşitlendirilir (Directions of Commander, 1993).

Yağlama yağları en çok kullanım alanına sahip olan yağlayıcılardır. Viskozitelerine ve içerdikleri katkılara bağlı olarak taşıdıkları özelliklerine göre çeşitlilik gösterirler. Buhar türbini yağlayıcıları, pistonlu içten yanmalı motor yağlayıcıları, gaz türbini ve soğutucu kompresör yağlayıcıları ile dişli yağlayıcıları bu sınıfa girerler.

Gresler; yağlama yağlarının yeterli olmadığı makine yüzeylerinde kullanılırlar. Yağ ve kıvam arttırıcı bir karışımdan meydana gelirler. Yağ kısmını mineral ya da sentetik yağlar oluşturur. Rulman yatakları, elektrik motorları ve piston valflerinde kullanım alanları vardır.

Katı yağlayıcılar, genellikle sıcaklık ve çevre koşullarının olumsuz olduğu durumlarda, bitişik metal yüzeyler arasında kuru bir yağlayıcı film oluşturur. Yağlayıcı ya doğrudan toz halinde uygulanır ya da izopropanol gibi bir çözücü ile kolloidal bir karışım halinde püskürtülür. Güvenlik kilitlerinin yağlanmasında, yüksek sıcaklıkta kızgın buharın dolaştığı çelik dişli, somun ve civataların yağlanmasında kullanılır (Directions of Commander, 1993).

Buraya kadar bahsedilen yağlayıcılar petrol türevli mineral yağlar ile sentetik yağlayıcıların günümüze kadar ne şekilde kullanıldıklarına dair kısa bir bakış açısı sunar.

Modern yağlayıcılar genel olarak bir baz akışkan ve katkı maddelerinden oluşur. Baz akışkanın birçok önemli işlevinin yanı sıra hareketli yüzeyleri akışkan bir yüzey ile birbirinden ayırması yağlama işleminde esas görevidir. Ayrıca ısınma ve aşınmadan oluşan parçacıkları uzaklaştırarak sürtünmeyi azaltıcı görev yapar.

Baz yağ katkıları, yağın çeşitli özelliklerinin öne çıkmasını sağlayarak kullanım alanlarında ihtiyaca uygun çözümler yaratır. Baz akışkanlar en çok ham petrolden elde edilirler. Dünya üzerinde petrol türevli baz yağ kullanımı 1990 yılında 35 000 ton olarak kayıtlara geçmiş ve günümüze kadar (2010) da yaklaşık olarak sabit kalmıştır. Petrol türevli baz yağ kullanımı, performansı, kolay elde edilmesi (ulaşılması, tedarik) ve fiyatı nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Petrol türevli olmayan baz yağlar ise özel bir özelliğin istendiği kullanım alanlarında, petrol türevli baz yağların tedariğinin sınırlı olduğu yerlerde ve doğal ürünlerin kullanılabildiği durumlarda daha çok tercih edilir.

1.3.1. Mineral yağlar

Yağlayıcılar baz yağın türüne göre mineral, sentetik ve biyobozunur yağlar olarak üçe ayrılır. Mineral yağları kendi içinde parafinik ve naftenik yağlar olmak üzere iki alt sınıfa ayırmak mümkündür.

Parafinik yağlar; iyi viskozite/sıcaklık karakteristiği, yüksek viskozite indeksi, iyi düşük sıcaklık özellikleri ve kararlılıkları bakımından öne çıkmaktadırlar. Yağ endüstrisi terminolojisinde sıklıkla nötral çözücüler olarak kullanılır. Burada çözücünün anlamı baz yağın rafine çözücü olduğu anlamına gelirken nötral kelimesi ise doğal pH değerini ifade eder.

Naftenik yağlar; parafinik yağlara göre daha sınırlı miktarlarda elde edilebilirler. Kullanılan ham petrolün çok az bir kısmı naftenik yağların üretiminde kullanılır. En önemli özelliği doğal halde iken düşük akma noktasına sahip olmasıdır. Bunun sebebi vaks içermemesi ve ucuz olmasıdır. Viskozite/sıcaklık özellikleri ise parafinik

yağlardan daha alt seviyededir. En büyük üreticileri Kuzey ve Güney Amerika'dadır çünkü en önemli hammadde kaynakları bu bölgededir. Vaks içermediği için ayrıca bir işlem gerektirmez, ancak çözücü ekstraksiyonu ya da sulu işlemden geçirilerek polisiklik aromatik gruplardan mümkün olduğunca uzaklaştırılır (Mortier ve diğ., 2009).

1.3.2. Sentetik yağlar

Petrol kaynaklarının günümüzde giderek azalması, toksik özelliği ve düzensiz yapısı nedeniyle petrol türevli baz yağlara alternatif olarak sentetik yağlayıcılar kullanılmaktadır. Sentetik yağlayıcılar 1930'lardan itibaren kullanılmakta olup, sentetik hidrokarbon ve esterlerden oluşmaktadır. İlk olarak Almanya ve Amerika'da eş zamanlı olarak üretimi gerçekleştirilmiştir.

Olefinlerin (alkenlerin) katalitik polimerizasyon prosesindeki gelişme ile düşük sıcaklıklardaki performansı geliştirilerek A.B.D.'de krank mili yağlayıcısı olarak kullanılmıştır. Yeni sentetik baz akışkanların geliştirilmesine rağmen, maliyetlerinin yüksek olması ve mineral baz yağların performansındaki gelişmeler sonucu ticarileşememiştir.

Almanya'da benzer ürünler, düşük sıcaklık performansları geliştirilerek giderek azalmakta olan petrol kaynaklarına alternatif olarak kullanılmıştır. 2. Dünya Savaşı'ndaki özel tedarik durumlarının haricinde, savaş sonrasına kadar belirgin bir şekilde ticari olmamıştır. İlk üretilen sentetik baz yağların özellikleri geliştirilebilmişse de mineral yağlara göre maliyeti oldukça yüksek olmuştur. Yağlayıcıların artan sıcaklık aralıklarında gerek duyulan performansı devam ettirebilmesi nedeniyle askeri ve uçak motorlarında kullanılmış; bu yağlayıcıların geliştirilmesi konusuna öncülük etmiştir. Bazı sentetik yağlayıcı tipleri ve bunların kullanım alanları Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Bazı sentetik yağlayıcı türleri ve kullanım alanları (Salimon ve ark., 2010)

Sınıfı	**Türü**	**İşletim sıcaklık aralığı (°C)**	**Uygulama alanları**	**Mineral yağlara göre avantajları**	**Sınırlayıcı özellikleri**
Sentezlenmiş hidrokarbon akışkanları	Polialfaoleinler, alkillenmiş aromatik, polibüten, sikloalifatik	-45 - 155	Makine dönel parçaları, soğuk bölge motorları, conveyörler, mil yatağı	Yüksek sıcaklık kararlılığı, düşük sıcaklık akışkanlığı, uzun ömürlü, düşük uçuculuk, yüksek viskozite indeksi, suya karşı zararsız, ekonomik	Çözünürlük/deterjanlık, sızdırmazlık uyumu
Organik esterler	Dibazik asit esterleri, polyol esterler	-35 - 204	Ticari manuel transmisyon	Vaks içermez, yüksek ısıl kararlılık, uzun ömür, düşük sıcaklık akışkanlığı, çözünürlük/deterjanlık	sızdırmazlık uyumu, mineral yağ uyumluluk, hidrolitik kararlılık, boya uyumluluk
Fosfat esterleri (fosforik asit esterleri)	Triarilfosfat ester, trialkil fosfat ester, karıştırılmış alkilaril fosfat esterler	-18 – 180	Hidrolik sistemler	Fiber direnç, üstün yağlayıcılık	sızdırmazlık uyumu, düşük viskozite indeksi, boya uyumlu, metal korozyon, hidrolitik kararlılık,
Poliglikoller	Polialkilen, polioksalkilen, polieterler, glikoller	-20 - 245	Gaz türbinleri	Sudan etkilenmez, yüksek viskozite indeksi, vaks içermez, pas önleyici	Boya uyumluluk, mineral uyumluluk, oksidatif kararlılık

Günümüzde sentetik yağlayıcılar, otomobiller, traktörler, deniz motorları, transmisyon ve endüstriyel yağlayıcılar olarak kullanılmasının yanı sıra, havacılık sektöründe de öne çıkmaktadır. Sentetik baz yağlar, yapılan araştırmalar sonucunda temel olarak yedi başlık altında sınıflandırılabilir:

- Polialfaolefinler,
- Alkilleşmiş aromatikler,
- Polibütenler,
- Alifatik diesterler,
- Polialkilen glikoller,
- Fosfat esterleri,
- Polyol esterler.

Bunların yanında sentetik esterler olarak silikonlar, borat esterleri, perfloroeterler ve polifenileneterler de sayılabilir. Ancak, kullanım alanlarındaki sınırlamalar ve yüksek maliyet sebebi ile gelişimleri sınırlı kalmıştır.

Polialfaolefinler (PAO); hidrojenlendirilmiş bir α-olefinin, genellikle α-decene'in oligomerlerinden oluşurlar. Oligomerizasyon genellikle 3 farklı yöntemle gerçekleştirilir ve ürün yüksek saflıkta elde edilebilir. Oligomerizasyon sonucunda üründeki dallanma derecesi beklenenden yüksek olduğunda ve özellikle içeriğindeki

vaks uzaklaştırıldıktan sonra oldukça iyi düşük sıcaklık özellikleri verir. Aynı viskoziteye sahip mineral yağlara göre uçuculuğu daha düşüktür ve daha geniş sıcaklık aralıklarında çalışılabilmektedir. Ancak, katkı maddeleri eklenmeden yapılan oksidasyon testlerinde (DSC-Differential Scanning Calorimetry) mineral yağların daha kararlı olduğu görülmektedir. PAO, düşük polaritesi sebebi ile özellikle motor yağlayıcı olarak formüle edilen yağlayıcıların yüksek polaritedeki katkıları ile iyi bir çözünme sağlayamaz. Bu durum aynı zamanda sızdırmazlık performansını da olumsuz etkiler. Bu sebeple PAO baz yağlar alifatik esterler ve mineral yağlarla karıştırılarak kullanılırlar. Yaygın olan kullanım alanları roket, transmisyon ve hidrolik sistemlerdir.

Alkilleşmiş aromatikler; alkil benzenlerin üç türü yağlayıcı veya yağlayıcı katkısı olarak kullanılır. Bunlar,

- Lineer dodesil benzen veya tridesil benzen üretiminde yan ürün olarak oluşan dialkil benzen, anyonik deterjan üretimindeki bir sülfonasyon hammadesi.
- Bu deterjan alkilatlarının α-olefinlerle reaksiyonu sonucunda oluşan dialkil benzen.
- Propilen gibi kısa zincirli olefin ve benzenden özel üretilen alkil aromatikler.

Bu yağların karakteristik özellikleri ayrı ayrı veya bir arada kullanılarak sülfür içermeyen proseslerde kullanılır. Düşük akma noktası ve iyi ısıl kararlılığı ile minearl yağlarla kıyaslanabilecek konumdadır.

Dialkil benzenler genellikle deterjan üretiminde lineer mono alkilat üretiminin yan ürünü olarak elde edilirler ve en ucuz yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Daha özel alkil benzenler benzen ve propilenden katalizör ve reaksiyon koşullarına göre molekül ağırlığı ve kimyasal yapısı kontrol altında tutularak üretilirler.

Ucuz dialkil benzenler çeşitli endüstri ve metal işleme proseslerinde farklı uygulama alanları bulur. Bakır işleme yapılan sülfür içermeyen proseslerde geniş kullanıma sahiptir. Özel üretilen alkil benzenler ise genellikle PAO'lardan daha zayıf özelliklere sahiptir. Ancak, yüksek çözünürlükleri ve düşük akma noktaları ile aşırı düşük sıcaklık gerektiren soğuk iklim gresleri, zincir yağları, hidrolik ve güç transmisyon yağları olarak kullanımları oldukça yaygındır.

Polibütenler; yağlayıcı olarak kullanılan polibütenler genellikle izobüten ve daha çok tercih edilen poli izobüten (PIB)'den elde edilirler. Yağlayıcı olarak geniş uygulama alanına sahiptir. Özellikle viskozite indeksini geliştirmek ve seyreltici/inceltici katkı olarak kullanılırlar. Polibütenler hem yağ, gazyağı katkısı hem de fiziksel özelliklerinin kullanılabileceği çok geniş kapsamlı kullanım alanlarına sahiptir. Genellikle akaryakıt ve yağlayıcılarda, asfalt ve kauçuk işlenmesinde, yapıştırıcı ve dolgu macunlarında, pas önleyici kaplamalarda, boyalarda, mürekkeplerde kullanılır.

Polialkilen glikoller; polimerik moleküllerin kimyasal yapılarına bağlı olarak fiziksel özelliklerinin değiştiği geniş kapsamlı bir tanımdır. Katı veya sıvı, suda çözünen ya da çözünmeyen yapıda ve istenen her viskozitede üretilebilirler. Genellikle zincir yağları ve gresleri, kompresör yağları, metal işleme yağları, alevlenme önleyici hidrolik akışkanları, tekstil ve ısı transfer yağları olarak kullanılırlar. Baz katalizör ya da tersiyer aminlerin varlığında aktif hidrojen atomları içeren alkol, su gibi bileşiklerin alkilen oksitleri ile tepkime vermesi ile elde edilirler. Etilen oksitleri ve propilen oksitleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu oksitler ile tepkimeler oldukça ekzotermik gerçekleşir. Ürün özellikleri başlatıcı molekülün çeşidine, kullanılan alkilen oksidin türüne ve ürünün molekül ağırlığına göre değişir. Molekül ağırlığı ise kullanılan katalizör ve reaksiyonun tamamlanma süresine bağlıdır. Ürün özellikleri moleküllerin ortalama ağırlığı ya da ürünün viskozitesine göre tanımlanır (Direction of Commander, 1993).

Fosfat esterleri ise, 1920'li yıllardan itibaren plastikleştirici, yağlayıcı katkısı, aşınma önleyici, hidrolik ve kompresör yağlayıcıları için baz yağ olarak kullanılmak üzere üretimleri yapılmaktadır. Son gelişmelerle birlikte II. Dünya Savaşı'ndan itibaren alev önleyici özelliği ile roket hidrolik akışkanı olarak kullanılmaktadır. Fosforil klorürlerin alkol ya da fenollerle tepkimesi ile elde edilirler. Düşük molekül ağırlıklı trialkil esterler suda çözünebilir. Reaksiyon sıcaklığı mümkün olduğunca düşük tutulmaya çalışılarak transesterleşmenin önüne geçilmeye çalışılır. Alkilaril ester karışımı bir ürün elde etmek için fenol ve alkol kısmi olarak eklenir. Düşük viskoziteli suda çözünebilir özellik gösteren fosfat esterleri, yüksek viskoziteli ve çözünmeyen özellik gösteren yapılara kadar çeşitlendirilebilir. Fosfat esterlerin kullanılması ile alevlenme direnci yüksek ürünler ve yağlayıcılar elde edilir. Isıl kararlılıklarının yüksek olmasının yanında; düşük sıcaklık özellikleri ve viskozite

indeksi oldukça iyidir. Aril esterlerin hidrolik kararlılıkları, alkil esterlere göre daha iyi olup, zincir uzunluğu ve dallanma derecesine göre farklılık göstermektedir.

Sentetik esterler, 19.yüzyıl öncesinden itibaren hayvansal yağlardan balina yağı ve domuz yağı, bitkisel yağlardan kolza yağı ve hint yağı gibi doğal esterler, yağlayıcı ana akışkanı olarak kullanılmıştır. II. Dünya Savaşı boyunca birçok sentetik yağlayıcı geliştirilmiş, uzun zincirli alkoller ile asitlerin oluşturduğu düşük sıcaklık yağlayıcıları hepsinin önüne geçmiştir. Savaş sonrası bu esterler geliştirilerek hava araçlarındaki gaz türbinlerinde kullanılmaya başlanmıştır. 1960'lardan itibaren neopolyol esterleri düşük uçuculuk, yüksek parlama noktası ve ısıl kararlılıkları nedeniyle ağırlıklı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Otomotiv ve deniz motoru yağlarında, kompresör yağları ve hidrolik akışkanlarında, zincir yağları ve greslerde kullanımı yaygındır. Biyobozunur ester yapıda olmaları nedeniyle ayrıca önem kazanmaktadırlar. Ester grubu, yapısına göre, yağlayıcının uçuculuğunu düşürmesi, parlama noktasını yükseltmesi gibi parametreleri öncelikli olarak etkiler. Bunların yanında, yukarıda da bahsedildiği gibi, ısıl ve hidrolitik kararlılığa, yağlayıcılığa, çözünürlüğe ve biyobozunurluğa etkisi vardır.

Esterleşme tepkimeleri için asit, baz ya da enzim katalizörleri kullanılabilir. Sülfirik asit, p-toluen sülfonik asit, tetraalkil titanat, susuz sodyum hidrojen fosfat, fosfor oksitleri ve kalaylı oktanat bileşikleri içeren katalizörler sıklıkla kullanılır. Tepkimede kullanılmayan asidi uzaklaştırmak için sodyum karbonat ya da sodyum hidroksit ile nötralleştirilerek filtre edilir. En çok kullanılan neopolyol alkoller trimetilolpropan (TMP), neopentilglikol (NPG) ve pentaeritritol (PE) gibi polihdrik alkollerdir. Bu alkoller değişebilir bir hidrojen atomuna sahip olan (monobazik, örneğin; asetik asit, benzoik asit) asitler ile tepkime vererek ester yapılarını oluşturur. Asidin alkolden daha uçucu olması nedeniyle tepkimede sitokiyometrinin fazlası kullanılan asitten ester ürünü kolayca ayrılabilir.

Ürünün viskozitesi, ester molekülünün zincir uzunluğu değiştirilerek (kullanılan asit ya da alkolün karbon zinciri uzunlukları ya da ester grubu sayısını arttırarak), dallanma derecesi ve uzunluğu değiştirilerek, halkalı yapıların zincire eklenmesiyle ya da dipolar etkileşimlerin arttırılması ile kontrol edilebilir.

Akış özelliklerini değiştirmek için, asit ve alkol zincir uzunluğunu arttırılmasıyla, molekülü daha doğrusal bir yapıya getirmeyle ya da alifatik gruplardan daha düşük viskozite indeksine sahip olan halkalı yapılar kullanılmamasıyla viskozite indeksi arttırılabilir.

Akma noktasının düşmesi için, dallanma arttırılabilir, zincirin orta noktalarında dallanma gerçekleştirilir, asit molekül zinciri kısaltılabilir ve molekülün iç simetrisi azaltılabilir. Hidrolitik kararlılık için, proses parametreleri ve molekül geometrisi değiştirilir.

Sentetik esterler, polialfaolefinlerle karıştırılarak motor yağlarında mineral yağlara göre oldukça üstün özellikler gösterirler ve özelikle otomotiv sektöründe tercih edilirler. Düşük sıcaklık viskozitesi, özellikle motor soğuk halde iken, ilk çalışma anında en yüksek aşınma gerçekleştiği için hızlı ve etkin bir dolaşım ile motorun hızlı yağlanması için önemli bir özelliktir. Esterler aslında yağa düşük sıcaklık akışkanlığını sağlamalarının yanında düşük uçuculuk sağlamaları ile yüksek sıcaklık koşullarında yağlayıcılık özelliğini kaybetmelerini engeller. Düşük uçuculuk aynı zamanda yeni tasarımlarda yağ haznelerinin giderek küçülmesine ve yağ değişimi için servis süresinin uzamasına neden olur.

Özellikle C_{36} dimer esterleri ve polioleatlar, iki zamanlı dizel motorlarında mineral yağlara göre daha avantajlıdır. Ayrıca polar yapıları sayesinde, daha etkin bir yağlanma ve yakıtta daha yüksek bir seyrelme faktörüne sahiptirler. Bu sayede çevreye saygılı bir yanma sağladıkları için, deniz motorları ve dişli yağlayıcıları olarak kullanımları öne çıkmaktadır. Soğuk iklimlerde düşük sıcaklık yağlayıcılığının önemli olduğu kar araçlarında bu tür esterler için önemlidir. Özellikle -56 $^{\circ}$C'nin altındaki akma noktaları sayesinde bu tip kullanımlar için ideal hale gelirler. Egzoz emisyonlarındaki poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) değeri mineral yağlar yerine karboksilik esterler kullanıldığında yaklaşık %25 oranında azalır. PAH'lar kansere neden olan egzoz emisyonlarının başında gelir. Diester ve polyol esterleri, kompresör yağlarında PAO'lar ile karışım oluşturularak kullanımı yaygındır. Disterler, doğal yapıları gereği viskoziteleri nedeniyle mineral yağlara göre %3-10 daha az uçucu olup, oksidasyon direnci de aynı zamanda yüksektir. Parlama ve kendiliğinden alevlenme noktasının yüksek olması, buharı, yutulması ve

cilt ile temasının düşük toksik özellik göstermesi nedeniyle mineral yağlara göre daha güvenli yağlayıcılar olarak bilinirler. Isıl iletkenliklerinin mineral yağlara oranla oldukça yüksektir. Bu nedenle ısı kaynaklarından fazla ısıyı hızlıca uzaklaştırırlar ve düşük sıcaklıkta işletilmeleri gereken kompresör gibi ekipmanlarda kullanılırlar. Polyol esterler düşük toksik özellikleri ve biyobozunur olmaları, çevresel anlamda özellikle de son dönemde daha da önemli olmuşlardır. Havacılıkta ise, hem askeri hem de sivil alanda gaz türbinlerinde kullanımları yaygındır. Özellikle yüksek sıcaklıklardaki kullanım avantajı sayesinde polyol esterler, mineral yağların önüne geçmektedir. Son dönemde bu ısıl kararlılık ile aynı zamanda diesterlerin de önüne geçmektedirler. Çevresel gereksinimlerin de etkisi ile bu tip esterlerin üretim yöntemlerinde iyileştirmeler yapılarak doğaya saygılı, biyobozunur, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen üstün nitelikli yağlayıcılar geliştirilmektedir (Mortier ve diğ., 2009).

1.4. Biyoyağlayıcı

Çevrenin özellikle mineral bazlı yağlama ve hidrolik yağlarının yarattığı kirliliğe karşı korunması için kullanım esnasında oluşabilecek kayıpların mümkün olduğunca azaltılması ve yağın tekrar kullanılabilir özellikte olması gerekmektedir (Schneider 2006).

Yapılan araştırmalara göre, yağlayıcı ve hidrolik akışkanların büyük miktarı kullanım esnasında doğaya karışmaktadır. 1990 yılındaki veriler bu kaybın kullanılan toplam yağ miktarının AB ülkelerinde %13 ve ABD'de ise %32'si kadar olduğunu göstermektedir. Bu kayıplar, hidrolik akışkanlarında %70-80 oranına ulaşmaktadır. Kayıpların kontrol altına alınmasındaki en büyük problem, takibinin zor olduğu hidrolik hortumlarının yırtılması ve kazalardır. Bu şekilde yaşanan kayıplar sebebiyle toprak, su ve hava doğrudan kirlenmektedir.

Mineral yağların toksik özellikleri sebebiyle çevreye verdiği zarar oldukça yüksektir. Ayrıca doğada uzun yıllar bozunmadan kalabilir. Mineral yağların özellikle memeliler, balıklar ve bakteriler üzerinde doğal yaşamları için büyük tehdit oluşturduğu bilinmektedir. Bu makinelerin yağ karterlerinin hacmi de göz önünde bulundurularak doğal yaşam alanlarını temizleme işlemi de ek bir maliyet

yaratmaktadır (Wagner ve ark., 2001). Bu nedenle mineral yağlara alternatif olarak biyoyağlayıcı kullanımı giderek önem kazanmaktadır.

Formülasyonunda büyük oranda bitkisel yağ ya da bitkisel yağın yerini tutabilecek sentetik yağların baz akışkan olarak kullanıldığı yağlayıcılar biyoyağlayıcılar olarak adlandırılmaktadır (Wagner ve ark.,2001; Bokade ve ark., 2007). Başka bir deyişle çevre ile uyumlu, su, toprak ve havanın doğal yapısına zarar vermeyen yağlayıcılar çevre dostu biyoyağlayıcılar olarak adlandırılır (IENICA, 2004).

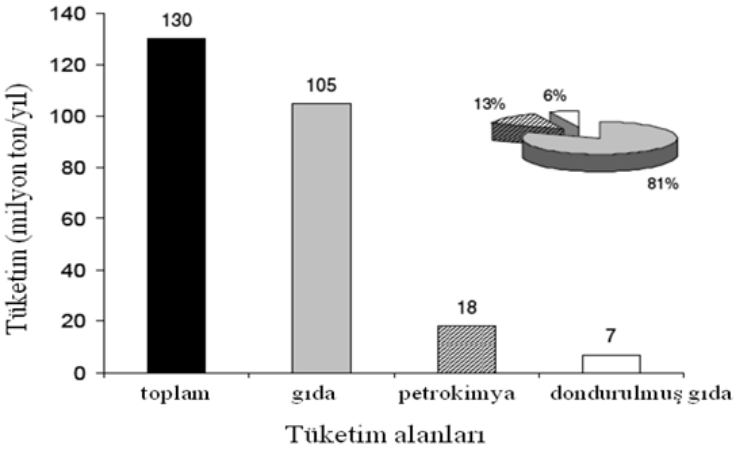
Son yıllarda doğal trigliseridler ve bunlardan elde edilen yağ asitlerine olan ilgi, ucuz, yenilenebilir olması ve potansiyel kullanım alanları sebebiyle oldukça artmıştır. Doğal yağlar ve bunlardan elde edilen ürünlerin çevre dostu olmaları bu malzemeleri bir kat daha değerli yapmaktadır. Hidrokarbon temelli sentetik yağlayıcılara göre daha ucuz, yenilenebilir, doğaya saygılı ve biyobozunur olmaları sebebiyle biyoyağlayıcıların kullanımında son yıllarda artış gözlenmektedir. Sentetik yağlayıcılar madeni yağlara göre yaklaşık sekiz kat daha pahalıdır. Bitkisel yağlar ise, sentetik yağların yarısı kadar bir maliyete sahiptir ancak, düşük akma noktası ve hızlı bozunması bir dezavantajdır (Gunam-Resul, 2009). Tablo 1.2'de ülkeler bazında biyoyağlayıcı kullanımının dağılımı verilmiştir (Schneider, 2006).

Tablo 1.2. Avrupa'da kullanılan biyoyağlayıcı* pazar payının ülkelere göre dağılımı (%) (Schneider, 2006)

Yıllar	Almanya	Fransa	Benelux[a]	İskandinavya	İtalya	İsviçre-Avusturya
2000	4,0	0,1	0,2	9,0	1,3	5,7
2006	15,1	0,3	0,4	10,8	2,0	8,4

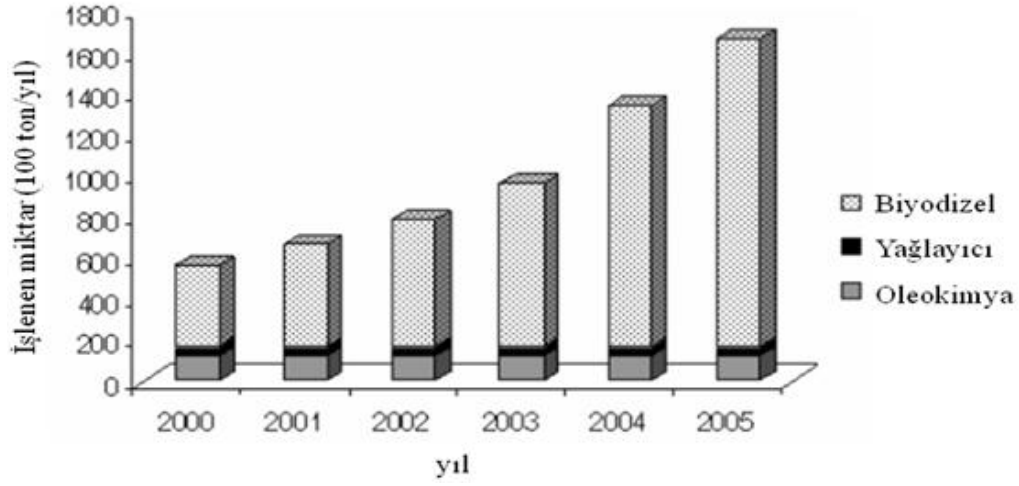
* hayvansal ve bitkisel yağ içeren yenilenebilir kaynaklardan elde edilmiş biyobozunur yağlayıcılar, [a]: Belçika, Hollanda, Lüksemburg

Bitkisel ve hayvansal yağlar, biyoyağlayıcı üretiminde en önemli doğal kaynaklardır. Şekil 1.2'de dünyada bitkisel ve hayvansal yağların kullanıldığı endüstrilere göre dağılımları verilmiştir. Petrokimya endüstrisinde kullanılan payın düşük olması ile beraber özellikle biyoyağlayıcı üretimi için atık yağların kullanıldığı bilinmektedir (Petran ve diğ., 2008).



Şekil 1.2. Dünya genelinde bitkisel ve hayvansal yağların tüketim alanları (Petran ve diğ., 2008)

Avrupa, yıllık 172 000 ton biyoyağlayıcı kullanımı ile dünya genelinde en büyük tüketicidir. Almanya ve İskandinav ülkeleri bu ülkeler içinde ilk sıradadırlar. Şekil 1.3 ile Almanya'da biyodizel, biyoyağlayıcı ve oleokimyasal olarak işlenenen yağ miktarının yıllara göre değişimi verilmektedir. Bitkisel yağdan doğrudan biyoyağlayıcı üretimi için serbest yağ asitlerinin yüksek sıcaklık ve basınçta elde edilmesi gerekir. Oysa, 60-100 °C gibi bir sıcaklık aralığında bitkisel yağdan elde edilen metil esterleri daha ılımlı koşullara sahiptir. Ayrıca bu esterleşme reaksiyonu enzimatik olarak gerçekleştirilirse sıcaklık daha da düşecektir. Bu nedenle grafikte en büyük payı alan yağ asidi metil esterleri (biyodizel), biyoyağlayıcı üretiminde popüler bir hammadde olmaya başlamıştır. (Petran ve diğ., 2008).



Şekil 1.3. Almanya'da yağların işlenmesinin yıllara göre dağılımı (Petran ve diğ., 2008)

1.4.1. Biyoyağlayıcı kullanımının tarihçesi, kullanım alanları, avantajları ve dezavantajları

Bitkisel ve hayvansal yağlar 19.yy.'dan beri yağlayıcı teknolojisinde kullanılarak zamanla petrol türevli yağlayıcıların yerini almaya başlamıştır. Son yıllarda doğaya saygılı, biyobozunur malzemelerin kullanımına olan ilginin artması ile farklı kaynaklardan elde edilen biyoyağlayıcıların özellikle denizcilik, tarım ve kamusal alanlarda kullanımı oldukça yaygındır (Gryglewicz ve diğ., 2003). Doğada çok hızlı bir bozunma gerçekleştirmeleri sebebiyle bu alanlarda kullanımları önemlidir (Luna ve diğ., 2011).

Biyobozunur yağlayıcıların %95'i doğada bir yıl içerisinde bozunmaya uğrar. Biyobozunur yağlayıcıların kullanımı, toplam yağlayıcı kullanımının %2'si kadar olup, yaklaşık %5-10 oranında yıllık artış olmaktadır (Schneider, 2006). Mineral yağlara kıyasla, düşük toksik özellikleri ve hızlı biyobozunur olmalarının yanı sıra düşük ısıl özellikleri sayesinde kullanımdan kaynaklanan kayıpları azaltmaları da oldukça önemlidir. Bu sayede, hidrolik akışkanı için yoğun olarak ihtiyaç duyulan kazı makineleri, toprak işleme makineleri ile traktörler ve yer altı su kaynakları ile temas eden yüzey (toprak) işleme araçları gibi hassas alanlarda kullanımları gittikçe artmaktadır.

Hidrolik akışkanı olarak kullanımındaki artış biraz daha yüksek olsa da fiziksel özelliklerinin geliştirilmesi, performansının arttırılması ve maliyetinin düşürülmesi ile pazar içindeki payı arttırılmaya çalışılmaktadır. Mineral yağ bazlı hidrolik akışkanlar, maliyet açısından halen uygun olmasına rağmen, petrol türevli bir ürün olduğu için yıllar geçtikçe fiyatlarında artış gözlenmektedir.

Bitkisel kaynaklı akışkanlar, yağlayıcı ve hidrolik akışkanların temel işlevleri olan enerjinin aktarımı, korozyonu önleme, sürtünme ısı kaybını azaltma gibi özellikleri en iyi şekilde karşılamaları ile öne çıkmaktadırlar. Mükemmel tribolojik özellikleri (yağlama), mineral bazlı akışkanlara göre düşük sürtünme katsayılarına sahip olmaları, mineral yağlardan yaklaşık %20 daha az uçucu olmaları, birçok yağa göre yüksek viskozite ve biyobozunurluk, düşük parlama noktası ve özellikle suyu kirletme bakımından en alt sıralarda olması önemli avantajları arasındadır.

Bitkisel yağların kaynak olarak kullanıldığı biyoyağlayıcıların teknik özellikleri, mineral yağlarla yarışabilecek kadar iyi olmasına rağmen, ısıl kararlılıkları ve düşük sıcaklıklardaki davranışları başlıca dezavatajlarıdır. Ayrıca, hidrolize karşı duyarlı olup, oksidasyona girme eğilimleri yüksektir. Bu dezavantajlar; gliserinin diğer polyol alkollerle (özellikle TMP) yer değiştirmesi, çoklu doymamış yağ asitlerinin uzaklaştırılması ya da değiştirilmesi ya da katkı maddelerinin eklenmesi ile ortadan kaldırılabilir (Schneider, 2006).

1.4.2. Dünyada biyoyağlayıcılar ile ilgili yasa ve düzenlemeler

Yönetimler kullandıkları yağları doğaya bırakan kullanıcılar üzerine baskı kurmakta ve yaptırımlar uygulamaktadır (Nagendramma ve diğ., 2012). Sadece birkaç ülkede doğaya uyumlu endüstriyel ürünler için özel etiketlemeler yapılmaktadır. Örneğin ilk olarak Almanya'nın böyle bir sisteme geçmesiyle kullanılmaya başlanan "Blue Angel (Mavi Melek)" ile yine benzer şekilde İskandinavya'da, A.B.D.'de, Japonya'da ve Hindistan'da "White Swan", "Green Cross" ve "Ecomark" etiketleri sırasıyla kullanılmaktadır. Bu etiketleme sistemi ile ekolojik olarak ihtiyaç duyulan testler, yasaklamalar ve üreticilerin bildirimleri ile bilgiler sürekli güncellenmektedir (Bremmer ve Plonsker, 2008).

Almanya, Avusturya ve İsviçre'de denizyolları ve ormanlık alanlarda mineral yağ kullanımı kanunlarla yasaklanmıştır. Almanya hükümeti buna ek olarak "Biyoyağlayıcı ve Biyoyakıtların Pazar Araştırması Programı (MIP)" ile mineral yağlar yerine %50'den fazla yenilenebilir baz yağ içeren yağlayıcılarının kullanılmasının getirdiği maliyetin geri ödenmesini sağlayan bir mekanizma oluşturmuştur. Almanya Yenilenebilir Kaynaklar Ajansı tarafından yürütülen bu program ile özellikle hidrolik akışkanlar için önemli bir başarı sağlanmıştır.

İsveç'in Göteborg şehrinde imalat sanayinin biyoyağlayıcı kullanımına teşvik edilmesi amacıyla yağlayıcılar için bir danışma ve teknoloji merkezi kurulmuştur. "Jen Smörja" yani "Temiz Yağlayıcılar" adı ile kurulan bu sistemde belediye, bilirkişi ve endüstri arasında bir işbirliği sağlanmış; yağlayıcılar, gresler ve hidrolik akışkanları için çevrenin korunmasını amaçlayan ölçütler oluşturulmuştur. Bu ölçütler, günümüzde İsveç Standartları'na dâhil edilmiştir. İskandinavya'da biyoyağlayıcı kullanımına vergi indirimi sağlanmaktadır.

İtalya'da mineral yağ kullanımında ek vergi uygulanmaktadır.

Portekiz ise 1991 yılında deniz motorları ve iki zamanlı motorlarda biyoyağlayıcı kullanımını zorunlu hale getiren bir yasal düzenlemeyi uygulamaya koymuştur.

Belçika'da ise deniz taşımacılığına uygun olmayan tüm sular ve yakınındaki bütün yerlerde biyoyağlayıcı kullanma zorunluluğu vardır.

Hollanda'da ilgili bakanlıkların kararı ile 1996 yılında biyoyağlayıcı kullanımıyla ilgili bir politika ve eylem planı hazırlamıştır. Biyoyağlayıcı kullanımının getirdiği vergi indirimi ile çevre yatırımları hızlandırılmıştır (Bremmer ve Plonsker, 2008).

Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2002'de imzalanan Tarım Güvenliği ve Kırsal Yatırım Yasası'nda Bölüm 9002, 2005 yılındaki Enerji Politikası Yasası ve 2008'de düzenlenmiş Gıda, Toprak ve Enerji Yasası gereği; yerel yönetimlere satın alma ile ilgili biyo kökenli ürünleri kapsayan bir genelge yayınlamıştır. Bu genelge Birleşik Devletler Tarım Bakanlığı (U.S. Department of Agriculture (USDA)) tarafından hazırlanmış ve yönetimlerce onaylanmıştır. Bu biyoürünlerin kullanım alanlarındaki

performans standartlarını sağlamayan ürün olması ya da gereksiz fiyat artışı sebepleri ile dönemsel olarak kullanımlarına ara verilebilir.

USDA, üreticiler için gönüllü bir program oluşturarak biyokökenli ürün ölçütlerinin "ABD Tarım Bakanlığı sertifikalı biyokökenli ürün" etiketleri ile belirlenmesini sağlamıştır.

Bölüm 9002'yi uygulamak için, USDA özel bir programı (BioPreferredSM Programme) hayata geçirmiş, bu program ile gerekli yasal zorunluluklar 33 ayrı kategoriye ayrılmış ve bunların dokuz tanesi yağlayıcı, gres ve akışkan ürün kategorisidir (Bremmer ve Polonsker, 2008). Bu sınıflandırma Tablo 1.3'te verilmiştir.

Günümüzde beş biyobozunur baz yağ kullanılmaktadır. Bunlar yüksek doymamış ve ya yüksek oleik asitli bitkisel yağlar, düşük viskoziteli polialfaolefinler, polialkilen glikoller, dibazik asit esterleri ve polyol esterler olarak sayılabilir (Nagendramma ve diğ., 2012).

Tablo 1.3. USDA'ya göre A.B.D.'de yerel yönetimler için ürünlere getirilen yasal karışım oranlarının miktarları (Bremmer ve Polonsker, 2008)

Ürün tipi	**İçermesi gereken en az biyokökenli ürün miktarı (%)**
Mobil ekipmanlar için hidrolik akışkanı	44
Kesici yağlayıcılar	68
Sentetik ester temelli güç aktarıcı akışkanlar	66
Bitkisel yağ temelli güç aktarıcı akışkanlar	95
İki zamanlı motor yağları	34
Metal işleme akışkanları (saf yağlar)	66
Metal işleme akışkanları (çözünebilir, yarı sentetik ve sentetik yağlar)	57
Metal işleme akışkanları (yüksek çözünürlükte, yarı sentetik ve sentetik yağlar)	57
Sabit cihazlar için hidrolik akışkanlar	44
Ateşli silah yağlayıcıları	49
Gresler (gıda saflığında)	42
Gresler (çok amaçlı gresler)	72
Ray tekerlerinde kullanılan yağlayıcılar	30
Kamyon gresleri	71
Başka yerde sınıflandırılmamış gresler	75

1.5. Biyoyağlayıcı Üretim Yöntemleri

Bitkisel yağlar, havalı ve havasız ortamlarda üstün bozunabilme özelliği ve bitki tohumlarından elde edilmesi nedeniyle biyoyağlayıcı üretiminde kullanılırlar. Biyoyağlayıcı olarak özellikle bitkisel yağların doğrudan kullanımı uygun değildir. Bitkisel yağların yağlayıcı olarak kullanımında başlıca öne çıkan sorun, düşük sıcaklıktaki akış özellikleri ve yüksek sıcaklıklardaki oksidasyona karşı düşük direnç göstermeleridir. Yapılarındaki gliserolün tersiyer β-hidrojen ısıl kararlılığı olumsuz etkiler. Bu durum, merkezdeki ester bağının zayıflamasına neden olur. Yapıdaki bu bozulma ile ester yapısı karboksilik asit ve gliserole parçalanır. Karbon zinciri yapısındaki çift bağların reaktif özellikleri sebebiyle oksijen ile tepkime gerçekleşir ve yağ bozularak polimerleşir. Bu polimerizasyon yağın viskozitesinin artışına ve diğer fiziksel özelliklerini kaybetmesine neden olur. Yüksek sıcaklıklarda bozulma ve polimerizasyon hızlanır (Nagendramma ve Kaul, 2012).

Katılma reaksiyonları ile yapıda çift bağların oluşturulması ile bitkisel yağların yağlayıcı olarak kullanılmaları mümkündür. Katkı maddelerinin eklenmesi ve yapıda kimyasal ya da biyoteknolojik modifikasyonların gerçekleştirilmesi ile yapıda kararlılık ve yüksek yağlayıcılık perfonması elde edilebilir. Literatürde bunun için çoklu doymamışlık problemine alkilleme, transesterleşme, hidrojenasyon, hidroformülasyon, epoksidasyon ve oligomerizasyon (polimerizasyon) gibi çeşitli yöntemler önerilmektedir. Bu sayede yeşil kimya için uygun bitkisel yağ temelli biyoyağlayıcılar elde edilir (Salimon, 2010).

Hem mineral yağlayıcıların hem de biyo kökenli yağlayıcıların formülasyonları tescilli reçetelerle belirtilmiştir. Bu ürünlerin nitelik ve katkı maddelerinin çeşitlerinin bulunabilmesi oldukça zordur. Patentler ise bütün detayları vermekle beraber patent literatüründeki bazı araştırmacılar, bu farklılığın katkı maddelerinden kaynaklandığını göstermektedir (Bremmer ve Plonsker, 2008).

Bitkisel yağların yağlayıcı olarak kullanımında belirtilen olumsuzlukları gidermek için çeşitli katkılar kullanılır. Katkı maddelerinin miktarı, hidrolik akışkanlarda toplam hacmin %1-2'si kadar iken, motor yağlarında bu oran %10 kadardır. Transfer yağlarında ise %30 oranına kadar katkılar kullanılabilir. Katkılar genellikle antioksidan, aşınma ve korozyon önleyici, emülsifier ve hidroliz önleyici olarak

kullanılırlar. Çoğu katkı maddeleri hem mineral hem bitkisel yağlarda kullanılır. Ancak, biyobozunur yağlarda kullanılan katkı maddeleri için halen toksik özelliğe sahip olmayan yeni alternatif katkı maddelerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Halen kullanılan toksik antioksidanlara karşılık, tokoferol (E vitamini), L-askorbik asit (vitamin C), gallik asit esterleri, sitrik asit türevleri ya da lipidi modifikasyona uğramış EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) türevleri, metal temizleyici yeni nesil doğal antioksidanlar olarak kullanılabilir (Salimon, 2010).

Katkı maddelerinin yarattığı farklılığın yanında bitkisel yağın yapısındaki düzenlemeler için de birçok yöntem vardır. Ancak, polimerizasyon dışında bilinen ticari bir üretim yöntemi yoktur. Kaldıraç uygulamalarındaki hidrolik akışkanlar için polimerizasyon yöntemi kullanılabilir. Araştırmalara göre polimerizasyon ürünün amaçlanan bazı uygulamalar için kabul edilebilir olmasının yanı sıra, kararlı yapıları da standartları karşılamaktadır. Ancak, bütün bunların yanı sıra polimerizasyon işlemi ek bir maliyet getirerek ticari olarak yaygın bir şekilde kullanılmasını engellemektedir. Dow Chemicals, şimdilik yalnızca plastik ürünler için soya monomerinden geliştirilmiş bir soya polyolü elde etmiştir. Dow'a göre bu kimyasal yağlayıcı pazarında önemli bir yere gelebilecek özelliklere sahiptir.

Bitkisel yağların genetik modifikasyonu üzerine çalışmalar uzun süredir devam etmekte ve doymamış ve çoklu doymamış yağ asitlerinin azaltılarak soğuk akış özelliklerinin ve oksidatif kararlılığının azaltılması yönünde yoğunlaşmaktadır (Bremmer ve Plonsker, 2008).

Bitkisel yağların yağlayıcılık ve oksidatif kararlılıkları için polyol bileşiklerle epoksidasyon ya da esterleşme/transesterleşme reaksiyonları gerçekleştirmeleri gerekir.

Transesterifikasyon yöntemi, polimarizasyon yöntemi ile tam olarak uyum sağlamasa da birçok biyoyağlayıcı ürün üretiminde kullanılmaktadır. Bu yöntemde, bitkisel yağdaki gliserol, trimetilolpropan, neopentil glikol ya da pentaeritritol gibi diğer bir polyol alkolle değiştirir. Kısa zincirli yapıdan uzun zincirli yapıya kadar (C_5 - C_{18}) karboksilik asit içeren sentetik esterler çeşitli yağlama uygulamalarında rahatlıkla kullanılabilirler. Transesterifikasyon reaksiyonları kimyasal ya da enzimatik olarak

gerçekleştirilebilir. Bu yolla elde edilen ürün, yarı sentetik olup biyobozunur bir yapıya sahiptir (Bremmer ve Plonsker, 2008).

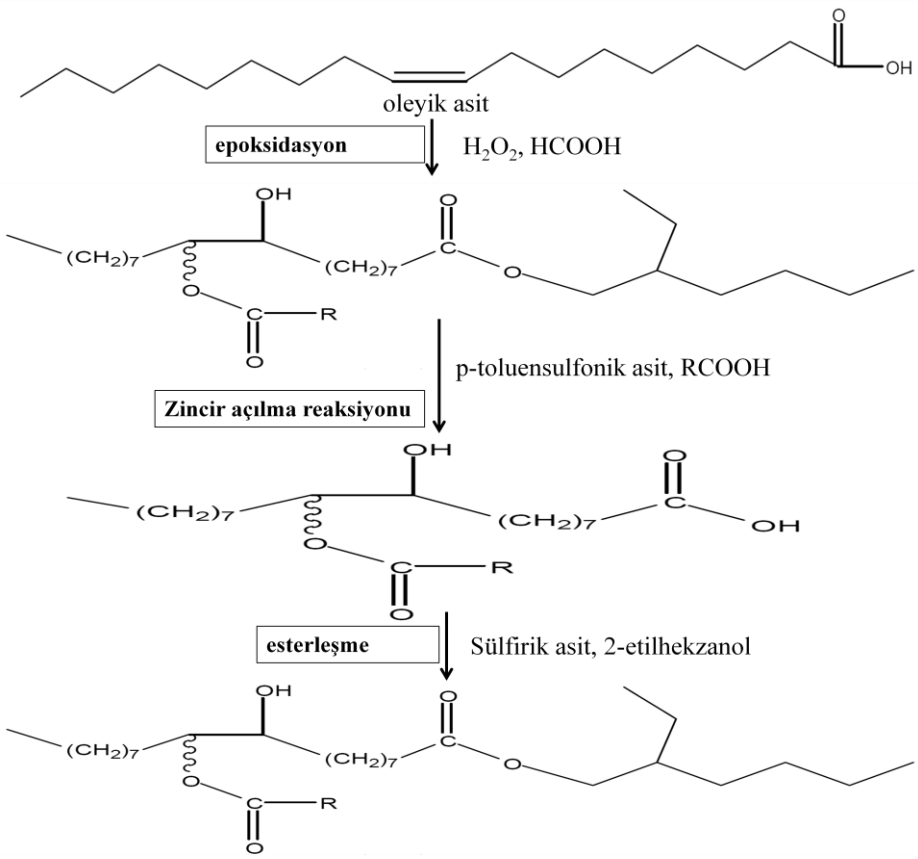
1.5.1. Biyoyağlayıcı için bitkisel yağların modifikasyonu

Yağlardaki gliserolün yapısında ısıl olarak kararsız olan tersiyer β-hidrojen bulunur. Bitkisel yağlarda bulunan çift bağlarda katılma reaksiyonlarının uygulanmasıyla yağın kimyasal yapısı değişir ve yağlayıcı olarak kullanıma uygun hale gelirler (Salimon, 2010).

1.5.1.1. Epoksidasyon

Epoksidasyon, estolid oluşumu, transesterifikasyon gibi bitkisel yağların polyol alkollerle kimyasal modifikasyonları ile her türlü yağlayıcı uygulaması için uygun ürünler elde edilebilir.

Bitkisel yağlar düşük sıcaklıklarda makrokristal yapılar oluşturarak akış özelliklerini olumsuz etkileyecek şekilde triaçilgliserol yapısında kümelenme meydana getirir. Bu sebeple ticari olarak elde edilen oleik asit ve diğer yağ asitleri ile diester bileşikleri sentezlenir. Oleokimyasal diesterler üç basamakta gerçekleşir. Bu reaksiyonlardaki kilit basamak epokside oleik asidin diğer yağ asitleri (oktanoik, nonanoik, laurik, miristik, palmitik, stearik ve behenik asit) ile p-toluensülfonik asit katalizörü varlığında zincir açılma reaksiyonu gerçekleştirerek monoester bileşiklerinin oluştuğu basamaktır. Bu reaksiyonlar Şekil 1.4'te verilmiştir (Salimon, 2010).

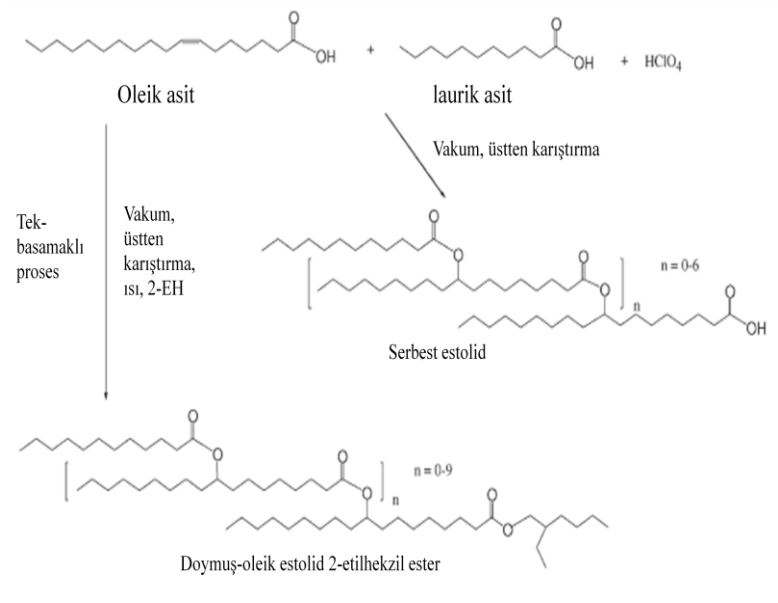


Şekil 1.4. Kimyasal katalizörler varlığında oleik asidin epoksidasyonu ve ester eldesi (Salimon, 2010)

Esterleşme reaksiyonları bu yağ asitleri ile bütanol, izobütanol, oktanol ve 2-etil-1-hekzanol gibi alkollerle yaklaşık %10 oranında H_2SO_4 katalizörü ile gerçekleşirler ve diester bileşikleri oluştururlar. Orta zincirdeki uzunluk artışı ile düşük sıcaklıklarda makrokristal yapıların oluşması zorlaşır ve düşük sıcaklık özelliklerinde iyileşme sağlanır. Zincir sonundaki dallanmanın artışının başka bir olumlu etkisi ise düşük sıcaklıklardaki akış özelliklerine olumlu katkı sağlayacak mikrokristallerin oluşmasına yardımcı olmasıdır.

1.5.1.2. Polimerizasyon

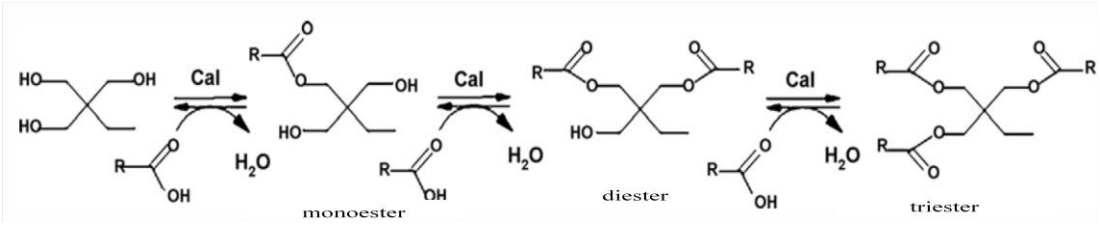
Bitkisel yağ temelli esterlerin bir sınıfı olan estolidler, doymamış tarafta bir karbokatyon oluşumu ile sentezlenir. Reaksiyon Şekil 1.5'te verilmiştir. Estolidler, bitkisel yağların kötü ısıl oksidatif kararlılık ve zayıf düşük sıcaklık özellikleri gibi durumların üstesinden gelmek için geliştirilmiştir. Buna rağmen bazı özelliklerin iyileştirilmesi için, maliyet, biyobozunurluk ve toksisiteye rağmen katkı maddeleri kullanılır (Salimon, 2010).



Şekil 1.5. Oleik asit estolidlerinin sentezi (Salimon, 2010)

1.5.1.3. Esterleşme/transesterleşme ile organik polyester sentezi

Bitkisel yağlar yerine bunlardan elde edilen yağ asitlerinin de bu reaksiyonlarda kullanılmaları mümkündür. Oleik asidin TMP ile gerçekleştirdiği ester ürünü genellikle hidrolik akışkanı olarak kullanılır. Bu tepkime Şekil 1.6'da verildiği gibi gerçekleşir.



Şekil 1.6. TMP ile karboksilik asit arasındaki esterleşme tepkimesi (Nagendramma ve Kaul, 2012)

Sözü edilen esterleşme tepkimesi, genellikle p-toluensülfonik asit gibi bir asit katalizörle sentezlenir. Bunun yanında silika-sülfirik ve Amberlist-15 gibi heterojen katalizörler de yaygın olarak kullanılır.

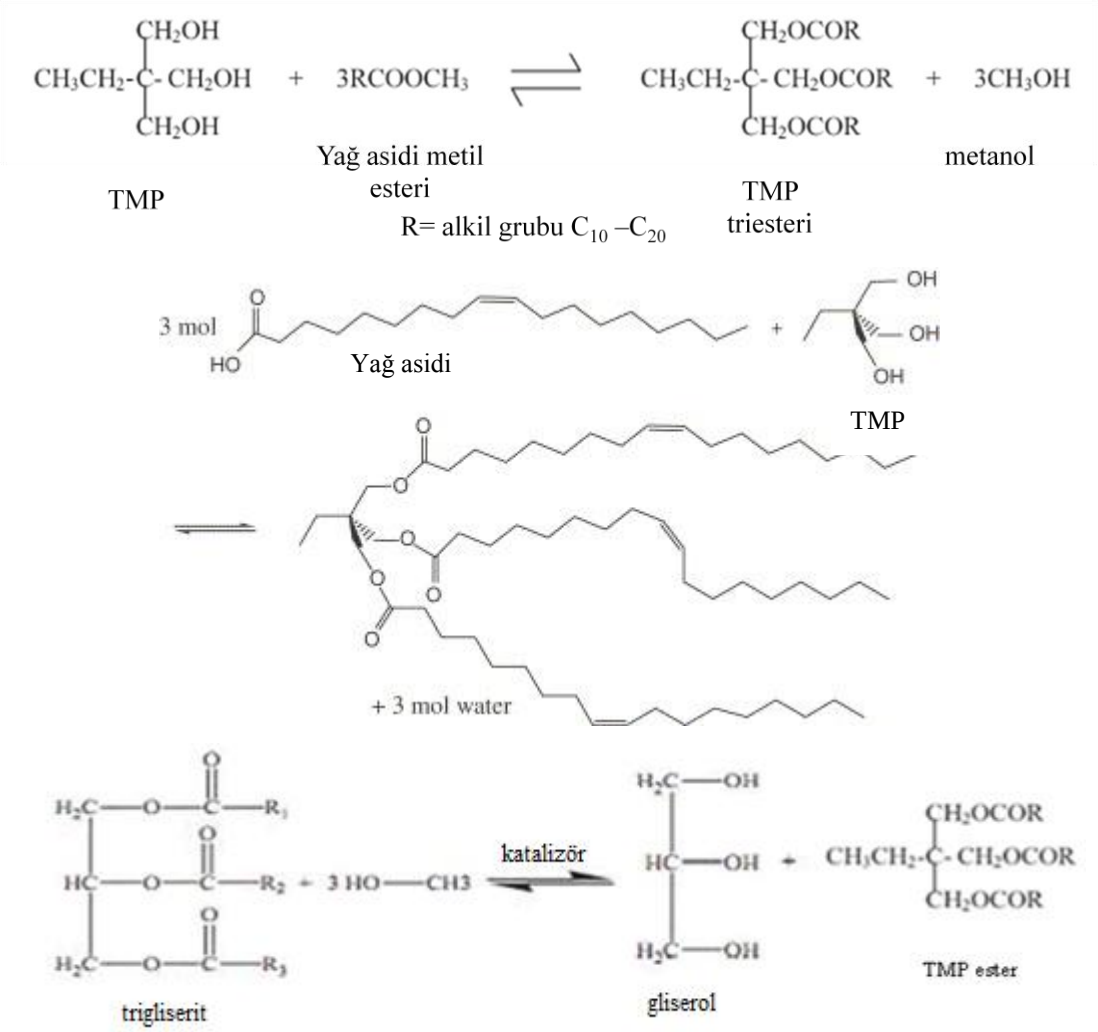
Biyobozunur organik polyester sentezi bitkisel yağların TMP gibi neopolyoller ile tepkimesinden meydana gelirler ve çok çeşitli kullanım alanları bulurlar. Bu yöntem hem kimyasal hem de enzimatik katalizle gerçekleştirilebilir. Kimyasal katalizör

olarak sodyum metilat kullanılırken enzim katalizli tepkimelerde lipaz kaynağı olarak farklı mikrororganizmalar tercih edilebilir. Birçok araştırmaya göre, kimyasal kataliz ile gerçekleşen reaksiyonlarda sıcaklık oldukça yüksek olup süre kısadır. Lipaz katalizörlerle düşük sıcaklıklarda daha uzun sürede tepkimeye girer. Hayvansal yağların kullanıldığı durumlarda sodyum metoksit katalizörü de kullanılabilir ancak, reaksiyon süresi diğer kimyasal katalizörlere göre daha uzundur. Ayrıca, yağlar yerine yağ asitleri ya da yağ asidi metil esterleri de kullanılabilir. Her iki katalizör ile esterleşme tepkimesi indirgen basınçta gerçekleşmesi açığa çıkacak olan suyun uzaklaşmasına yardımcı olur ve ester verimi artar (Salimon ve diğ., 2010).

Lipazlara alternatif olan kimyasal katalizörler, homojen katalizörler (p-toluen sülfonik asit, sülfirik asit, sodyum hidroksit ve sodyum metoksit) ve heterojen katalizörler (Sn-okzalat ya da iyon değiştirici reçineler, vb.) olabilir (Hayes, 2004).

1.5.2. Enzim katalizörlü biyoyağlayıcı üretimi

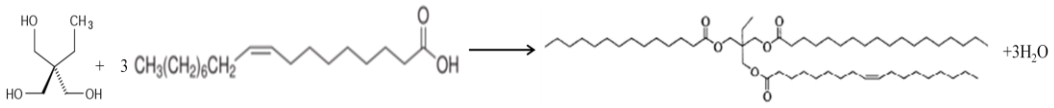
Biyoyağlayıcıları üretiminde, dünyada son dönemde büyük ilgi görmeye başlayan enzim katalizörler kimyasal katalizörlere alternatif olarak kullanılmaktadır. Bunun için esterleşme, transesterleşme (interesterleşme) ve hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen lipaz enzimleri kullanılır. Lipazlar, yağların digliseridlere, monogliseridlere, gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini katalizler. Bu reaksiyonlar tersinir olup aynı şekilde gliserol ve yağ asitlerinden gliserid oluşumunu da gerçekleştirebilirler. Biyoyağlayıcı için gliserol yerine neopolyol alkol kullanımı giderek artmaktadır. Bu tepkimede yağ asitleri yerine yağın kendisi ya da yağ asidi metil esterleri de kullanılabilir. Şekil 1.7'de yağ asidi metil esterlerinden TMP esterlerinin elde edilme reaksiyonu verilmiştir.



Şekil 1.7. Lipaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Yunus ve diğ., 2002)

Tutuklama tekniklerinin geliştirilmesi ile lipazlar kimyasal bir katalizör gibi endüstriyel proseslerde kullanılabilirler. Enzim katalizi sayesinde yalnızca istenen ürün sentezleneceği için kimyasal katalizörün getirdiği bir dizi ayırma işlemine ihtiyaç duyulmamaktadır. Tutuklanmış lipaz tepkime ortamından kolayca ayrılabildiği için bir sonraki tepkimede rahatlıkla tekrar kullanılabilmektedir (Bremmer ve Plonsker, 2008).

Lipazlar, yalnızca gliseridlerin hidrolizini katalizlemez, aynı zamanda yağ asitleri ve alkollerin farklı esterler oluşturmalarını da sağlarlar (Şekil 1.8).



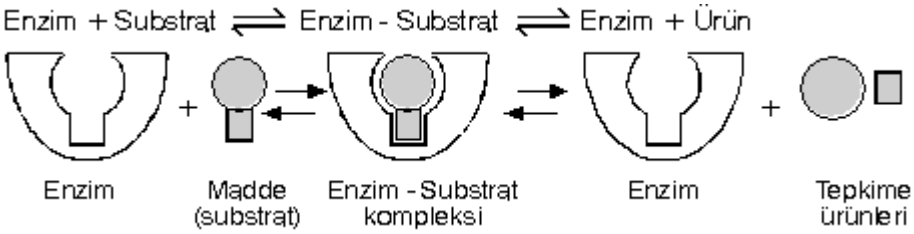
Şekil 1.8. Yağ asidi ve herhangi bir alkol arasındaki esterleşme reaksiyonu

Yağ asitlerinin özellikle metanol gibi verdiği reaksiyonun ana ürünü olan esterler de lipaz katalizli biyoyağlayıcı üretiminde hammadde olarak kullanılabilir. Trigliserid yapısından esterleşme sonucu uzaklaşan gliserolün yapısına çok benzer olan polyol alkoller, yağ asitlerine bağlanmış metil gruplarını uzaklaştırır ve gliserol yerine metanol bağlanır. Reaksiyonda yüksek triester dönüşümü için geri yöndeki reaksiyonu mümkün olduğunca baskılamak gerekir. Bunun için reaksiyon ortamı vakum altında tutulur. Bu sayede elde edilen indirgen basınç, oluşan metanolün reaksiyon ortamından eş anlı olarak uzaklaştırılmasını sağlar. Sonuç olarak, uzaklaştırılan metanolün enzim üzerindeki inhibisyon etkisinin de önüne geçilmiş olur.

1.5.2.1. Lipazlar

Biyokimyasal reaksiyonların çoğu, protein yapısında olan enzim adı verilen maddeler tarafından katalizlenir. Enzim canlı hücreler tarafından meydana getirilen, ancak etkisini gösterebilmesi için hücrenin varlığını gerektirmeyen, ısıya dayanıksız maddelerdir. Birçok reaksiyonun laboratuvar koşullarında gerçekleştirilebilmesi için yüksek ısıya belirli bir pH'a gereksinim vardır ve bu koşullar yerine getirilse bile reaksiyon ancak belirli bir sürede gerçekleşir. Oysa organizma koşullarında sıcaklık 37 °C civarında, pH neredeyse nötral ve reaksiyon son derece hızlı meydana gelir. Dolayısıyla enzimler, biyokimyasal tepkimelerin ılımlı koşullarda hızlı bir şekilde gerçekleşebilmelerini sağlayan biyokatalizörlerdir.

Enzimler genellikle renksiz olup suda çözünebilen maddelerdir. Enzimlerin etki ettiği maddelere substrat denir. Enzim substrat ilişkisi anahtar ile kilidin uyumuna benzer. Enzim molekülünde aktif bölge denilen özel bir bölüm bulunmaktadır. Enzim substrata geçici olarak aktif bölgeden bağlanır ve substrat-enzim ara bileşiği (SE) oluşur. Daha sonra substrat ürüne dönüşür. Enzim ise reaksiyondan değişmeden çıktığı için tekrar kullanılabilir. Şekil 1.9'da bu mekanizma şematik olarak özetlenmiştir. Enzimler genellikle çift yönlü çalışır yani geri dönüşümlüdür.



Şekil 1.9. Enzim-Substrat ilişkisi (Elibol ve ark., 2008)

Lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açil hidrolaz) hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bunun dışında esterleşme, transesterleşme gibi reaksiyonları da katalizlemektedir. Enzimin maliyeti yüksektir. Enzimlerin sanayide kullanımının yaygınlaşmasını engelleyen en önemli nedenler ise düşük dayanım, aktivite ve seçicilikleridir. Bu nedenle, son yıllarda lipazların katalitik özelliklerini iyileştirebilmek için bazı kimyasal ve fiziksel uygulamalar gündeme gelmiştir. Buna ilave olarak moleküler biyoloji yolu ile enzimin maliyeti de düşürülebilir. Bunun için genetik özellikleri geliştirilmiş olan lipazın büyük miktarlarda üretimi sağlanabilir.

Lipaz spesifikliği pozisyon, substrat ve stereo seçicilik olarak üç temel grupta toplanır. Bazı lipazlar yağ asitleri ile gliserid arasındaki bağları rasgele parçalar; gliserid molekülünün yerleşimi önemli değildir. *Candida rugosa, Cory mebacterium acnes, Chromobacterium spp.* ve *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar bunlara örnek olarak verilebilir. Posizyon seçiciliği olan lipazlar ise sadece sn-1,3 pozisyonundaki yani dıştaki ester bağlarını parçalar. Bu gruba örnek olarak ise *Aspergillus niger, Mucor miehei, Rhizopus arrhizus* ve *Rhizopus delemar* gibi organizmalardan elde edilen lipazlar verilebilir. Bazı lipazlar ise yağ asidinin zincir uzunluğuna göre seçicidir. Mesela, *Penicillium cyclopium* lipazı uzun zincirli yağ asitlerini parçalarken *Aspergillus niger* ve *Aspergillus delemar* lipazları ise kısa zincirli yağ asitlerine seçicilik gösterir. Bunlardan başka, yağ asidi seçici lipazlar yer alır. Bunlar ise cis-9 pozisyonuna duyarlıdır. *Geotrichum candidum* lipazı cis-9 pozisyonunda çift bağ içeren uzun yağ asitlerine seçicidir.

Günümüzde lipazlar hem sulu hem de susuz ortamda yapılması güç reaksiyonları katalizleyen en önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Lipazların geniş bir substrat spektrumunu kullanabilmeleri, pH ve organik çözücülere ve

enantiyoseçimliliğe karşı kararlılık gösterebilme yetenekleri sayesinde sağlanmaktadır. Lipazlar, gıda ve süt ürünleri (peynir olgunlaştırma, aroma geliştirme, vb.), deterjan, ilaç sanayisi (naproksen, ibuprofen), tarımla ilgili kimyasal madde (insektisit, pestisit) ve oleokimyasal (katı-sıvı yağ hidrolizleri, biyolojik yüzey aktif madde sentezleri) endüstrileri gibi çeşitli biyoteknolojik alanlarda kullanılmaktadırlar.

Düşük aktivasyon enerjileri sebebiyle lipazın katalizlediği reaksiyonlar daha düşük sıcaklık ve nötr pH gerektirir. Enerji gereksinimi düşüktür, ürün ve substratlara karsı aktiviteleri çok yüksektir. Bu aktivite özellikle de substrat (yağ)-su ara yüzeyinde en yüksek seviyeye çıkmaktadır. Bu kavram ara yüzey aktivasyonu olarak tanımlanabilir. Bu nedenle, en yüksek aktivitelere, substrat için yüksek yüzey alanına ulaşıldığı emülsiyon sistemlerinde ulaşılmaktadır.

Tüm kaynaklardan elde edilen lipazların üç boyutlu yapıları hemen hemen birbirine benzemektedir. Boyut, sıralama benzerliği, substratlar ve aktivatörler dışında çoğunluğunun benzer yapıya sahip olduğu gözlenmiştir (Elibol ve diğ., 2008).

Bu nedenle biyolojik ester katalizörleri olan lipazlar kimyasal katalizörlere alternatif olarak kullanılır. Ancak, reaksiyon parametreleri kullanılan lipazın sınırlayıcı özelliklerine göre seçilmelidir. Kimyasal katalizörlere göre pahalı ve az miktarda elde edilebilen lipazlar, yüksek seçicilikleri ile öne çıkarlar. Düşük enerji gereksinimleri ile düşük işletim maliyeti sağlarlar. Lipazlar sayesinde baz katalizörlerdeki sabunlaşmanın ve asit katalizörlerin sebep olduğu ekipmanlardaki korozyonun önüne geçilebilir (Dossat ve ark., 2002).

Endüstriyel ölçekte kullanımı yüksek maliyet gerektiren lipazlar, moleküler biyoloji ile daha kararlı lipaz üretilmesi ya da tutuklama tekniklerinin iyileştirilmesiyle kimyasal katalizörlerle yarışabilecek hale geleceği belirtilmiştir (Lamsa ve diğ., 1995).

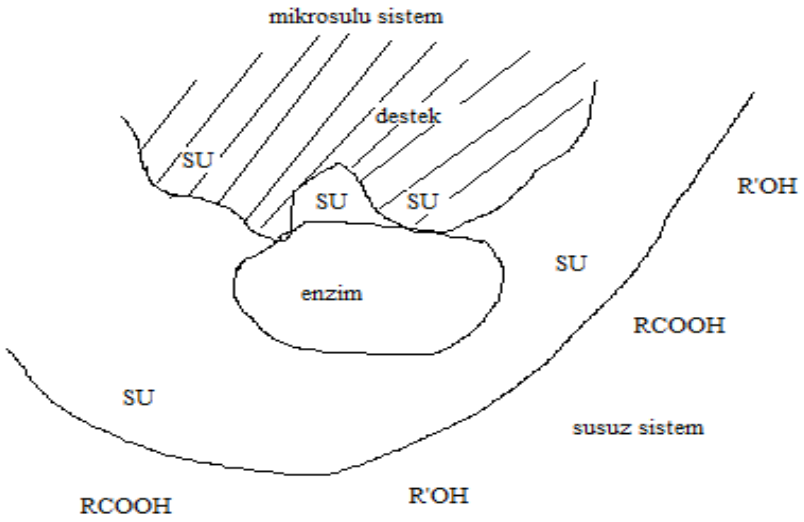
Lipazların kullanıldığı bu reaksiyonlar üzerinde yapılan çalışmalar yalnızca kesikli reaktörlerde değil sürekli çalışan akışkan ya da sabit yataklı reaktörlerde de kullanılabilmektedir. Ancak, kolaylığı nedeniyle kesikli reaktörlerin tercih edildiği bilinmektedir (Lamsa ve diğ., 1995).

1.5.2.2. Biyoyağlayıcı üretimine etki eden parametreler

Enzimatik esterleşme reaksiyonlarında reaksiyon verimi üzerinde etkili birçok parametre vardır. Hem ayrı ayrı hem de bir arada reaksiyon veriminde olumlu ve olumsuz etkileri vardır. Bunların en önemlisi reaksiyon sıcaklığıdır. Yüksek sıcaklıklar protein yapısındaki enzimin özelliğini yitirerek bozulmasına neden olur. Yapısı bozularak aktivitesi düşen enzim katalizör özelliğini yitirir. Enzimin, uzun ömürlü olması ve katalitik aktivitesinin korunması için sıcaklık o enzimin reaksiyon için ihtiyaç duyduğu sıcaklık aralığında kalmalıdır.

İkinci en önemli parametre ise reaksiyon ortamının su içeriğidir. Lipazlar susuz ortamda genellikle düşük aktivite gösterirler. Reaksiyon yağ/su arayüzeyinde gerçekleştiği için başlangıçta bir miktar suya ihtiyaç duyulur. Başlangıç su miktarı her bir lipaz için değişkenlik gösterir. Ortamdaki alkol miktarı, reaksiyon sıcaklığı, çözücü kullanılıp kullanılmadığı gibi parametreler ile ortama eklenen su miktarı değişir.

Esterleşme reaksiyonun bir ürünü olan suyun reaksiyon eşitliğini dengede tutması gibi bir rolü vardır. Verimin arttırılabilmesi için reaksiyon ortamından suyun sürekli olarak uzaklaştırılması gerekir. Diğer yandan, belli bir dinamik su ortamı enzim aktivitesinin yüksek olması için sabit tutulmalıdır. Reaksiyon sisteminden suyun uzaklaştırılma hızı enzimin kurumamasına dikkat edilerek yapılmalıdır. Bunun için kullanılan en yaygın yöntemler, vakum buharlaştırma ve membran evaporasyonu, azeotropik çözücü distilasyonu, kurutucu ajanlar ve kabarcık ya da kuru halde verilen azot olarak sıralanabilir. Enzim tutuklanmasının geliştirilmesi ile esterleşme prosesleri enzimler varlığında düşük su miktarı ile gerçekleştirilebilmektedir. Tutuklanmış enzim su tarafından destek üzerinde çevrelenirken (mikrosulu reaksiyon sistemi) sistemdeki toplam su içeriği düşük kalır. Bu yapı Şekil 1.10'da verilmiştir.



Şekil 1.10. Reaksiyon sistemindeki su içeriği ve tutuklanmış enzimin davranışı (Thomas, 2005)

Çözücü olarak, genellikle n-hekzan, heptan gibi hidrokarbonlar tercih edilir. Çözücü kullanılmasında amaç, substrat ve enzimin daha iyi etkileşebilmesidir. Ancak; bu durum reaksiyon bitiminde ürün ve enzimin çözücüden ayrılması için gerekli olan işlem basamaklarını da beraberinde getirir. Bu nedenle, esterleşme reaksiyonlarının çözücüsüz ortamda gerçekleştirilebilmesi üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Lipazlar, apolar organik sıvılarda genellikle deaktive olmalarına rağmen, aseton ya da su gibi polar çözücülerde aktivitelerini korurlar. Biyokatalizörlerin modifikasyonu aktivite kaybına karşı alınan bir önlem olarak sayılabilir. Tutuklanmış lipazlar, susuz organik çözücülerde aktivitelerini korumaya devam ederler. Bu özellik lipazlara biyokatalizör olarak farklı esterlerin sentezinde kullanım olanağı sağlar.

Enzim katalizör ile gerçekleştirilen reaksiyonlardaki bir diğer etken ise eklenen alkol miktarıdır. Alkolün fazlası ester derişimini arttırıcı yönde etki eder. Ancak aşırı miktarda alkol kullanımı, enzim üzerine inhibisyon etkisi yapar. Ayrıca bitkisel yağın çeşidi de oldukça önemlidir. Yan ürün olarak oluşan gliserol, enzim yüzeyine adsorblanarak enzimi deaktive eder (Dossat ve ark., 2002).

Tutuklama teknikleri, enzimatik esterleşme ile kimyasal esterleşmenin işletme kolaylığı ve maliyeti açısından yarışabilmesine olanak sağlar. Bir kilogram tutuklanmış lipaz ile birkaç bin kilogram ürün elde edilebilmesi, tutuklanmış

katalizörün sabit yataklı reaktörlerde ya da yığın sistemlerde birkaç ay kullanılabilmesi, enzim katalizli reaksiyonlar için umut vericidir.

Aynı zamanda enzimatik prosesler, fonksiyonellik (işlevsellik), kalite ve sağlığa uygunluk açısından saf ürünler elde edilebilmesini sağlar. Oda sıcaklığındaki yüksek aktiviteleri ve ılımlı reaksiyon koşulları altında bile stereoseçimliliklerini geniş bir substrat aralığında koruyabilmeleri ve enantiyomerik olarak saf ürünler elde edilmesini sağlar.

Bütün bunların yanı sıra çeşitli ester bileşiklerinin elde edilebilmesi için geniş bir aralıktaki alkol türleri ile etkileşime girebilir. Tablo 1.4 ile bunlara birkaç örnek verilmektedir. Teknik uygulamalar için özel yağ asitleri olefinlerden hidroformülasyon veya hidrokarboksilasyon ile elde edilirler.

Tablo 1.4. C_6-C_{26} yağ asitlerinin enzimatik esterifikasyonu ile elde edilen ürünler (Thomas, 2005)

OH kaynağı	**Ürünler/Uygulamaları**
Düz zincirli alkoller (C_1-C_{18})	Biyoyakıtlar, yumuşatıcılar, kozmetik
Düz zincirli alkoller (C_{19}-C_{28})	Vaks esterler
Dallanmış zincirli alkoller (C_3-C_8)	Vaks esterler, yağlayıcılar
Gliserol ve gliseridler	Trigliseridler, 1,3- veya 1,2-digliseridler, 1- veya 2-monogliseridler, fonksiyonel gıdalar, emülsifierler
Glikoz, fruktoz, vb.	Şeker ve fruktoz esterleri, aktif kozmetikler, emülsifierler
Steroller	Sterol esterler, fonksiyonel gıdalar
Askorbik asit	Askorbil esterleri, gıda koruyucuları
Glikoller	glikol esterleri, kozmetikler

1.6. Bitkisel Yağlar, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bitkisel yağlar kimyasal yapı olarak mineral yağlara oldukça benzeyen ve mineral yağlara alternatif olarak en büyük potansiyele sahip tarım ürünleridir. Bitkisel yağlar ve türevleri, yağlayıcı, çözücü, yüzey aktif maddeleri, boya ve yüzey kaplamaları, polimer hammaddesi, çeşitli özel kimyasallar, kozmetikler, mürekkep ve biyodizel olarak endüstriyel kullanım alanlarına sahiptir.

Bitkisel yağlar yapılarında gliserol ve yağ asitlerinin triesterleri olan trigliseritleri içerir. Trigliseritler yağılarındaki çift bağa göre doymuş (mirisik, stearik, palmitik), tekli doymamış (oleik, erusik), çoklu doymamış (linoleik, linolenik) ve farklı gruplar içerenler (risinoleik asitte hidroksil grubu, vernolik asitte epoksi grubu, vb.) olarak sınıflandırılabilir. Bazı bitkisel yağların doymuş ve doymamış yağ asidi bileşimleri Tablo 1.5 ile verilmiştir.

Bitkisel yağlar elde edildiği bitki ve bitki tohumu türüne göre içerdiği yağ asitleri açısından çeşitlilik gösterirler. Teknik açıdan içerdiği oleik asit miktarı yüksek olan bitkisel yağların yağlayıcı endüstrisinde kullanılmaları tercih edilir.

Kolza yağı %60-70 oranındaki oleik asit ve düşük erusik asit içermesi nedeniyle yağlayıcı üretimi için en uygun bitkisel yağdır. Kolza yağında bulunan ve insan sağlığı açısından zararlı olan erusik asit miktarı düşürülerek kanola yağı elde edilmiştir. Kanola yağı, ülkemizde 1960'lı yıllardan itibaren tanınmaya başlamış ve özellikle Trakya bölgesinde ekim alanı bulmuştur. Nötral yapısı ve yüksek sıcaklık özelliklerinin iyi olması nedeniyle endüstride kızartma ve konserve yağı olarak kullanılır.

Soya yağı, yaygın olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde üretilen bir yağ olup genel kullanım alanı gıda sanayidir. Endüstriyel olarak yaklaşık %4'ü kullanılır. Yüksek oksidatif kararlılık ve yüksek akma noktası, öne çıkan tribolojik özellikleridir (Thomas, 2005).

Soya yağı, keten tohumu yağı ve kolza yağı gibi yüksek derecede doymamış yağ içeren bazı bitkisel yağlar, içerdikleri linoleik, linolenik asit ve türevlerinin miktarlarına bağlı olarak, biyoyağlayıcı üretimi için tercih edilirler. Sonuçta, ısıl oksidatif kararlıkları düşük, polimerizasyona meyilli bu yapılar doymamışlık dereceleri indirgenerek uzun ömürlü yağlayıcılar olarak kullanılmalarına olanak sağlanmıştır (Kong ve diğ., 2010).

Ayçiçeği yağı ve yüksek oleyik asit içeren ayçiçeği yağı, %70-90 oranında oleik asit içermektedir. Yapıda bulunan az miktarda (%1,0 – 1,5) stearik asit sayesinde düşük sıcaklık özellikleri ile ön plana çıkmaktadır.

Tablo 1.5. Çeşitli bitkisel yağların yağ asidi bileşimi (URL-1)

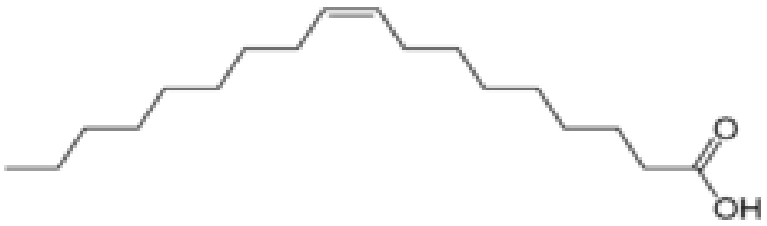
	badem	avokado	hintyağı	fındık	mısır	Pamuk çiyidi	zeytin	yerfıstığı	Pirinç kepeği	aspir	susam	soya	ayçiçeği	Rafine hurma	kanola
C8:0 Kaprilik				5-9											
C10:0 Kaprik				4-10											
C12:0 Laurik		0,2 maks.		44-52											
C14:0 Miristik	1,5 maks	0,1-2,1		13	21	0,5-2,0	0,1-1,2	<0,2	<1	<1	<0,5	<0,5	<1	0,5-5,9	
C16:0 Palmitik	3,9	7,5	25	0,8-1,8	8-11	8-19	17-29	7-16	6-15,5	12-18	2-10	7-12	2-10	32-47	3-6
C16:1 Palmitoleik	2 maks	0-8,3			<0,5	<1,5		<1	<0,5	<0,5	<1				
C18:0 Stearik	3 maks.	0,6-1,3	0,8-2,0	1-4	0,5-4	1-4	1-3	1,3-6,5	1,3	1-10	3,5-6	2-5,5	1-10	2-8	1-4
C18:1 Oleyik	60-78	42-81	3-6	5-8	19-50	13-44	65-85	36-72	40-50	7-42	35-50	19-30	14-65	34-44	55-75
C18:2 Linoleyik	10-30	6-18,5	3,5-6,8	2,5 maks.	34-65	40-63	4-15	13-45	29-42	72-81	35-50	48-58	20-75	7-12	15-25
C18:3 Linolenik	2 maks	2 maks			<2,0	0,1-2,1	<1,5	<2,0	<2,0	<1,5	<1,0	5-9	<1,5		8-22
C18:1 risinoleyik			82-95												
C20:0 Araşidik				0,4 maks	<1	0,5 maks		1-2,5	<2,5	<0,5	<1	<1	<1		
C20:1 Gadoleyik					<0,5	0,5 maks		0,5-2,1		<0,5	<0,5	<1	<0,5		
C20:4 Araşidonik								1-2,5							
C22:0 Behenik						0,5 maks		1,5-4,8			<0,5		<1		
C22:1 Erusik (maks.)															2 maks
C24:0 Lignoserik						<0,5		1,0-2,5					<0,5		
Gardner renk skalası (maks.)	4	4	3	3	5	5	8	4	4	3	4	4	3	4	4
Asit sayısı (maks.)	2,8	0,25	2	0,25	0,25	0,25	2,8	0,25	0,25	0,25	0,25	0,2	0,25	0,02	0,02
İyot sayısı	95-105	71-95	83-88	6-11	102-130	109-120	79-88	84-100	99-108	135-150	103-116	120-143	110-143	50-55	110-120
Sabunlaşma sayısı	190-200	177-196	176-182	250-264	187-193	190-198	190-195	185-195	181-189	186-194	188-195	180-200	188-194	192-209	186-198
Özgül ağırlık 25^{0}C	0,91	0,91	0,96	0,92	0,92	0,92	0,91	0,91	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92

Palm yağı, oksidatif kararlılığı nedeniyle dünyada ilk kez Castrol Ltd. tarafından 1995 yılında endüstriyel yağlama yağı olarak kullanılmıştır. Zeytinyağı ise içeriğindeki yüksek tekli doymamış yağ asitleri nedeniyle sağlık açısından gıda olarak tüketimi daha uygundur. Jojoba yağının yüksek ısıl kararlılığı jet motorları için iyi bir katkı maddesidir.

Bitkisel yağların transesterifikasyon reaksiyonlarında, *Candida rugosa, Chromobacterium viscosum, Rhizomucor miehei, Pseudomonas florescens* ve *Candida antarctica* gibi farlı mikrororganizmalardan elde edilen lipazlar kullanılmaktadır. Bunlar arasında en çok kullanılan enzimler makro gözenekli anyonik reçineye tutuklanmış *Rhizomucor miehei* lipazı (Lipozyme) ve toz haldeki *Candida rugosa* lipazıdır. Ayçiçeği yağı ve bütanol ile yapılan çalışmalarda *Candida rugosa* lipazı, *Rhizomucor miehei* lipazından daha üstün performans göstermiştir (Dossat ve ark., 2002).

1.7. Oleyik Asit

Bitkisel ve hayvansal yağlarda bulunan kokusuz ve renksiz bir yağ asididir. Ticari oleyik asit ise açık sarı renkte olabilir. Kimyasal yapı olarak tekli doymamış Omega-9 yağ asidi olarak tanımlanır. Kimyasal formülü $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$ olup oleik adının oil ya da olive kelimelerinden türetildiği belirtilmiştir. Bunun nedeni yağların büyük oranda oleyik asit türevi içermesinden kaynaklanır. Açık formülü Şekil 1.11'de gösterilmiştir.



Şekil 1.11. Oleyik asidin şematik gösterimi (Thomas, 2005)

Yağ asitleri ya da bunların tuzları doğada genellikle serbest halde bulunmazlar. Yaygın halde yağların içerisinde ester bileşikleri halinde bulunurlar. Çoğunlukla trigliseridler halinde doğal yağlarda bulunan oleyik asit, sabunlaşma reaksiyonları neticesinde serbest yağ asidi olarak açığa çıkar. Oleyik asit triesterleri zeytinyağı içeriğinin büyük çoğunluğunu oluşturur ve %2 kadarı ham zeytinyağında serbest halde bulunur. Ancak, fazlası zeytinyağının gıda olarak tüketilmesine engeldir.

Oleyik asit insan yağ dokusunda en fazla bulunan yağ asididir. Steraik asidin dehidrojenasyonu ile de elde edilebilen oleyik asit, alkenler ve karboksilik asitler ile tepkimeye girer. Oleyik asidin fiziksel özellikleri Tablo 1.6 ile verilmiştir.

Tablo 1.6. Oleik asidin bazı fiziksel özellikleri (URL-2)

Özellik	Değer
Molekül formülü	$C_{18}H_{34}O_2$
Mol ağırlığı	282,4614 g/mol
Görünüş	Açık sarı/kahverengimsi sarı, yağlı sıvı
Yoğunluk	0,895 g/ml
Erime noktası	13-14 °C
Kaynama noktası	194-195 °C
Suda çözünürlük	Çözünmez
Metanolde çözünürlük	Çözünebilir

Oleyik asidin yaygın kullanımı sodyum tuzları halinde her türlü sabunun ana maddesini oluşturmaktadır. Endüstriyel olarak üretilen oleyik asidin az bir kısmı da ilaç yapımında kullanılır. Aeresol ürünlerde çözücü ve emülsifier olarak da kullanılan oleyik asit, akciğer hasarlarının tedavisi için üretilen yeni ilaç türlerinin test aşamasında da kendine kullanım alanı bulur. Bu konuda gelişmemiş akciğerlere sahip olan prematüre bebekler için tedavi yolunu açan bileşiklerdir (Thomas, 2005).

1.8. Trimetilolpropan (TMP)

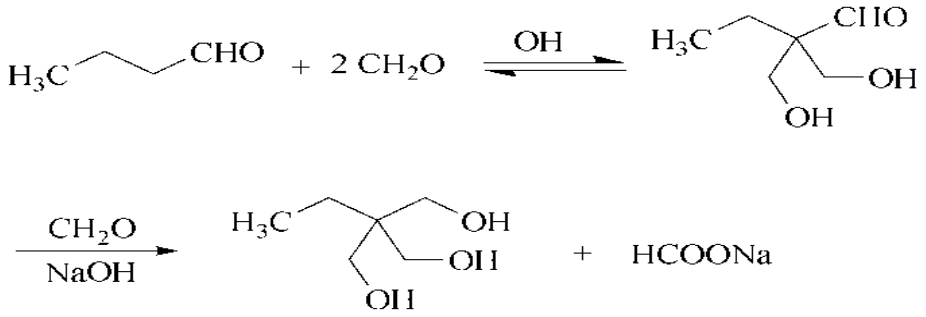
Trimetilolpropan (TMP), 2-etil-2-hidroksimetil-1,3-propandiol, $CH_3CH_2C(CH_2OH)_3$ molekül formülü ile belirtilen renksiz ve kristal yapıda bulunan triol grubundan bir polyol alkoldür. TMP suda çözünebilen organik bir bileşiktir. Üç adet birincil hidroksil grubuna sahip olan TMP, OH gruplarının katılabildiği reaksiyonlarda kullanılır. Bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 1.7 ile verilmiştir.

TMP, baz katalizli bütiraldehit ($CH_3(CH_2)_2CHO$) ile formaldehitin (CH_2O) reaksiyonu sonucunda oluşan ürüne (2,2-bis(hidroksimetil)bütanal) formaldehit katılması ile elde edilir (Şekil 1.12). Endüstriyel olarak kullanılan baz katalizörler NAOH ya da $Ca(OH)_2$'dir. Her iki baz kullanımı ile verim yaklaşık %90 olarak elde edilir. 2,2-bis(hidroksimetil)bütanal'ın katalitik hidrojenasyonu reaksiyonunda yan ürün olan formatın (metanoat-kanser yapıcı toksik bileşik) büyük miktarlarda oluşmasını engellemek için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Tersiyer aminlerin

katalizör olarak kullanılması önerilmiştir. Bu sayede oluşan amonyum format, metil format oluşturur ya da yüksek miktarlardaki format oluşumunu engeller.

Tablo 1.7. Trimetilolpropanın fiziksel ve kimyasal özellikleri (URL-3)

Özellik	**Değer**
Tutuşma sıcaklığı	375 °C (DIN 51794)
Çözünürlük	(20 °C) çözünebilir
Erime noktası	57-61 °C
Mol ağırlığı	134,17 g/mol
Yoğunluk	0,7 kg/m^3
pH değeri	6,5 (100g/L, H_2O, 20 °C)
Kaynama noktası	160 °C (6,65 hPa)
Buhar basıncı	0,0002 hPa (25 °C)
Patlama limitleri	% 2-11,8 (hacimce)
Parlama noktası	179 °C (DIN 51758)



Şekil 1.12. Baz katalizör varlığında TMP elde edilmesi (Thomas, 2005)

TMP'nin formattan ayrılması için çeşitli prosesler önerilir. Örneğin, derişik reaksiyon çözeltisi organik bir çözücü ile ekstrakte edilebilir. Bu şekilde çözücü buharlaştırıldıktan sonra ham TMP vakum distilasyonu ile (ekstraktif distilasyon) geri kazanılır. Başka bir yöntem ise, sulu reaksiyon çözeltisi format kristalleri oluşana kadar buharlaştırılır ve sıcak filtrasyonla ortamdan ayrılır. Açığa çıkan sıvı TMP, artık tuzlardan bir iyon değiştirici ile ayrılır ve distile edilir. Asetal tipi (1,3-dioksanlar, formaller) halkalı dieterler, metal katalizli hidrojenasyon ile TMP ve metanole dönüştürülebilir (Thomas, 2005).

TMP ve etoksi türevleri, büyük oranda üretanların ve polyester reçinelerin öncüleridir. Diğer bir önemli kullanım alanı, kısa ve orta yağ alkid reçineleridir. Elde edilen vernik ya da diğer adıyla lake, şeffaf görüntüsü ve bu halini korumasının yanı sıra en az bu özelliği kadar da alkali, deterjan, su ve bunlarla birlikte dışarıdan gelen darbelere dayanıklı ve aynı zamanda esnektir. TMP'nin yağ asitleri ile verdiği reaksiyon ürünleri (C_5– C_{10}) sentetik yağlayıcılar sınıfından bileşiklerdir. Toz ve yüksek katı kaplamalar TMP'nin güçlü bir potansiyel pazara sahip olduğunu işaret eder. Çünkü TMP'nin bu ürünlerde viskoziteyi düşürücü etkisi bulunmaktadır. TMP akrilatları UV kullanılan mürekkep ve kaplama sistemlerinde reaktif çözücü olarak kullanılır. Bütün bunların yanı sıra TMP alil eterleri ise doymamış polyesterlerde kullanılır. Günümüzde polyol ester karışımı ürünlerin, klor içermeyen saf florokarbon soğutma sistemlerinde kullanımı, gittikçe büyüyen bir pazara sahiptir (Thomas, 2005).

TMP için dünyadaki üretim kapasitesi, 1998 yılında 150000 ton olarak belirlenmiş; bu miktarın 67000 ton'u Batı Avrupa (üreticiler; Bayer, Perstorp ve Polioli), 60000 ton'u A.B.D. (üreticiler Perstorp ve Celanese) ve 15000 ton ise Japonya'ya (üreticiler Koei ve Mitsubishi Gas) aittir (Thomas, 2005).

1.9. Konu ile İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar

Potatov (1983), karboksilik asitlerin alkollerle reaksiyona girerek ester ürettiğini ve bu reaksiyonun esterleşme olarak adlandırıldığını belirtmiştir. Asit katalizörlüğünde yürütülen reaksiyon genellikle birkaç saat sürer. Bu reaksiyonda alkol ve asit geri akış ile ısıtılır, sülfirik ya da hidroklorik asit kullanılabilir. Denge sabiti oluşan esterin miktarını belirler. Karboksilik asit ya da alkolün fazlası ester verimini arttırıcı yönde etki yapar. Fazlası kullanılacak madde seçilirken maliyeti ve elde edilebilirliği dikkate alınır. Esterleşme reaksiyonunun verimi oluşan suyun uzaklaştırılması ile de arttırılabilir. Esterleşme tipik mekanizması açil-karbon nükleofilik yerdeğiştirme olarak açıklanmıştır. Bu reaksiyonun mekanizması tersinir olup aksi yöndeki reaksiyon ise ester hidrolizidir. Seçilen reaksiyon koşulları bu nedenle son ürünü belirler.

Reaksiyon asit tarafından katalizlendiğinde, aynı zamanda reaksiyon hızı için sınırlayıcı bir engel de oluşturur; alkol ya da asidin yanında fazla miktarlarda bulunduğunda reaksiyonu yavaşlatır.

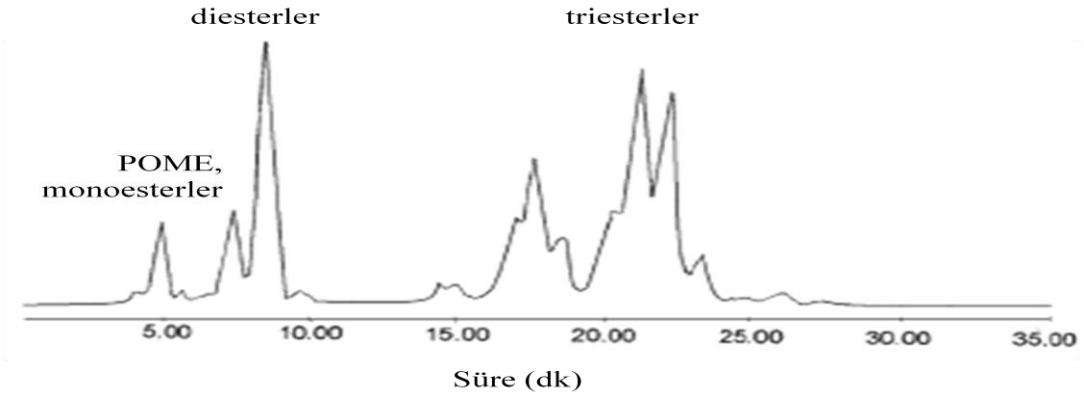
Transesterleşme ile elde edilen esterlerde dengenin ürünler yönüne kaydığı açıklanmıştır. Alkol, düşük kaynama noktasına sahip olması nedeniyle, reaksiyon karışımından rahatça uzaklaştırılabilir.

Bondioli ve diğ. (2003), kaprilik asit ve TMP arasında 150 °C sıcaklık ve kimyasal katalizör (SnO) ile gerçekleştirdikleri reaksiyonda suyu eşanlı uzaklaştırmışlar ve %99 verim elde etmişlerdir.

Grubun yaptığı diğer çalışmada ise güçlü asit iyon değiştirici reçineleri katalizör olarak kullanılmıştır. Suyun katalizör performansına büyük etkisi olduğunu belirlemişler ve uzaklaştırılması ile dönüşüm artmıştır ancak, kuru reçine hiçbir katalitik aktivite göstermemiştir. Diğer sınırlayıcı faktör ise girdilerin reçine içine difüzyonu olmuştur. Yağlı malzemeler, yüksek viskoziteleri nedeniyle bu reçinelerin kullanımını sınırlamıştır. Katalizör için gerekli yüksek performans, yüksek çapraz bağlanma derecesine sahip bir reçine seçilmesi ile sağlanabilmiştir. Toz reçineler iyonik reçinelere göre daha yüksek aktiviteye sahip olmuştur. Ester sentezi için asit-sülfonik iyon değiştirici reçine kullanımının uygun olduğu belirlenmiş; güçlü bazik iyon değiştirici reçineler popüler olsa da 40 °C üzerinde kararlılıklarını kaybeder ve düşük derişimdeki yağ asitleri ile nötralleştirdikleri belirtilmiştir. Ayrıca reaksiyon süresince oluşan gliserin reçineyi su geçirmez hale getirir (Bondioli ve diğ., 2004).

Resul ve diğ. (2012) Jatropha curcas yağı metil esteri ve TMP'nin transesterifikasyonunu, sodyum metoksit ($NaOCH_3$) katalizörü ile 120-200 °C sıcaklık aralığında ve 10 mbar basınç altında incelemişlerdir. En yüksek dönüşüm (%47) 200 °C sıcaklıkta elde edilmiş ancak, en uygun sıcaklık değeri 150 °C olarak önerilmiştir. Metil ester/TMP mol oranı 3,9/1 olarak önerilmiştir. Ürün analizleri GC ile yapılmış ve moleküler ağırlıklar yardımı ile dönüşüm hesaplanmıştır. Elde edilen Jatropha biyoyağlayıcısının akma noktası -6 °C ve viskozite indeksi (VI)'nin ise 178-183 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Sonuçta elde edilen biyoyağlayıcı özelliklerinin soya ve palm yağından elde edilen biyoyağlayıcıların özellikleri ile karşılaştırılabilir olduğu görülmüştür.

Yunus ve diğ. (2002), TMP'nin palm (hurma, palmiye) yağı metil esteri ve palm çekirdeği yağı metil esteri ile transesterifikasyonu sonucunda oluşan polyol esterlerin analizi üzerine bir araştırma yapmış, farklı kromatografik sistemleri karşılaştırmışlardır. Kimyasal kataliz ile gerçekleştirilen bu reaksiyonda katalizör olarak sodyum metoksit kullanılmıştır. Reaksiyon ürünü TLC, HPLC ve GC ile analiz edilmiş ve her biri performansları açısından değerlendirilmiştir. HPLC ile elde edilen kromatogram Şekil 1.13 ile verilmiştir.



Şekil 1.13. Palm yağı TMP esterlerinin HPLC analizi (TMP/POME:1/3,9, sodyum metoksit ağ. %0,9, 140 °C, 0,3 mbar, 5 saat) (Yunus ve diğ., 2002)

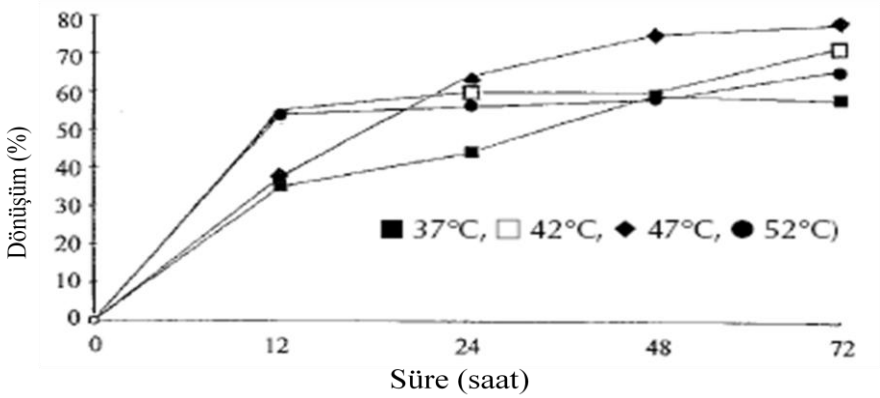
Lämsä ve diğ. (1995) bitkisel yağdan biyoyağlayıcı üretimi için hem kimyasal (baz katalizör) hem de enzim katalizör kullanmışlardır. Öncelikle kolza yağı ve 2-etil-1-hekzanolden 2-etil-1-hekzil esterleri kimyasal olarak sentezlenmiştir. Çalışmada sıcaklık, yağ/alkol mol oranı ve basınç parametreleri optimize edilmiştir. Kimyasal katalizör ile 5 saat'te %97,6 verimle gerçekleşen transesterleşme tepkimesinde lipaz kullanımıyla %87 verim elde edilmiştir. Bu çalışmada enzimatik reaksiyon için elde edilen en uygun koşullar, yağ/alkol mol oranı 1/2,8, lipaz derişimi %3,4, su miktarı %1 ve sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiştir.

Linko ve ark. (1997) TMP esterleri üretimini, kolza yağı metil esterleri ile çeşitli lipazların katalizör olarak kullanımıyla çözücüsüz ortamda gerçekleştirmişlerdir. Serbest lipaz (*Candida rugosa)* farklı inorganik desteklere tutuklanmış ve diğer iki ticari tutuklanmış lipaz (Lipozyme IM 20, Novozyme 435) ile performansı karşılaştırılmıştır. Kolza yağından öncelikle baz katalizör ile kolza yağı metil esteri elde edilmiş ve ardından bu ürün TMP esteri üretiminde hammadde olarak kullanılmıştır. Reaksiyona, vakum basıncı, sıcaklık, metil ester/alkol mol oranı,

substrat su içeriği ve reaksiyon süresinin etkileri incelenmiş, ürünler TLC ve HPLC ile analiz edilmiştir. Kullanılan enzim miktarı ise ağırlıkça %20'dir. Toplam dönüşümün %90 ve üzeri olduğu, triester veriminin ise %75 olduğu en iyi sonuç Lipozyme IM 20 katalizörlüğünde, 24 saatlik reaksiyon süresi sonunda, 58 °C, 5,3 kPa indirgen basınçta ve susuz ortamda elde edilmiş, 66 saat sonunda tri-ester verimi %90'ın üzerine çıkmıştır. Novozyme 435 lipazı yalnızca mono- ve di-ester dönüşümünü gerçekleştirebilmiş, düşük suyun eklendiği reaksiyon ortamlarında eser miktarda tri-ester oluşmuştur. Duolite 561 üzerine tutuklanmış *Candida rugosa* ile reaksiyon ortamına %13 su eklenmesiyle 78 saatte, 47 °C, 5,3 kPa indirgen basınç altında %70 triester dönüşümü elde edilebilmiştir.

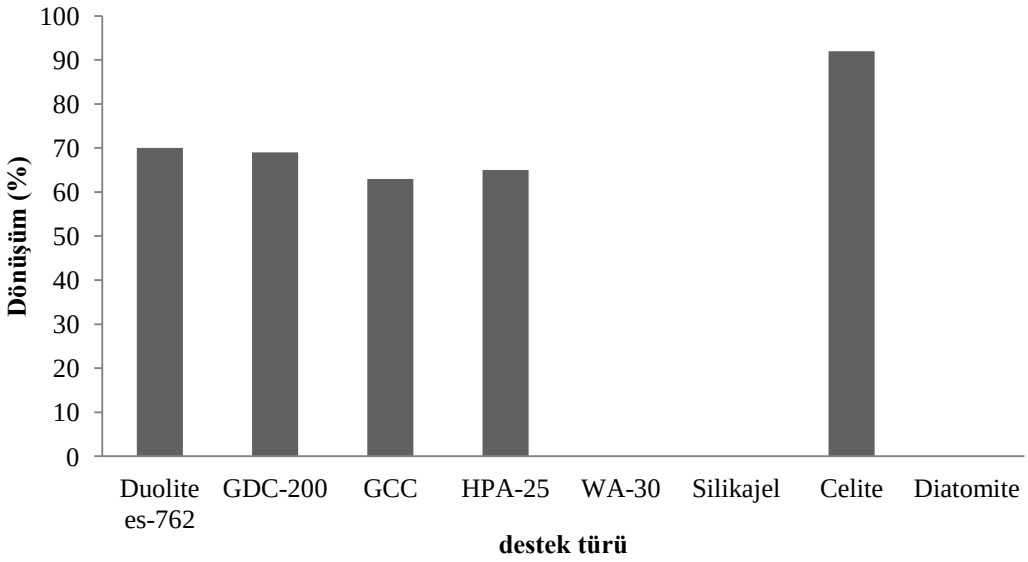
Uosukainen ve Linko (1998) düşük erusik asitli kolza (kanola) yağı metil esterleri ve TMP arasındaki transesterleşme reaksiyonunu kimyasal ve enzimatik kataliz açısından incelemişlerdir. Lipaz türü olarak serbest halde *Candida rugosa* toz halde farklı desteklere tutuklanarak kullanılmıştır. Metil ester sentezi ve TMP-esterin kimyasal sentezi için sodyum metoksit, sodyum etoksit ve sodyum hidroksit kullanılmıştır. Yan ürün olarak oluşan metanol tepkime ortamında farklı vakum basınçları çalışılarak eşanlı ortamdan uzaklaştırılmış ve yüksek ester dönüşümüne ulaşılmıştır. Hem kimyasal hem de enzimatik kataliz ile elde edilen en yüksek dönüşüm (%95) *C.rugosa* lipazı ile alkol/ester mol oranı 1/3,5 iken elde edilmiştir. Sıcaklığın TMP esterleri üretimine etkisi 37-58 °C sıcaklık aralığında incelenmiştir Dönüşümün tepkime süresi ile değişimine sıcaklığın etkisi Şekil 1.14'te verilmiştir. Sıcaklıkla dönüşüm artmış, 47 °C'nin üzerinde düşmüştür.

İndirgen basınç altında (5,3 kPa), 24 saat süre sonunda %75 ve 68 saat sonunda ise %90 üzerinde TMP-triester verimine ulaşılmış ve reaksiyon sonunda hiç yan ürün ya da kolza yağı metil esteri gözlenmemiştir. Ayrıca ürünün enzimatik hidrolizi de gerçekleşmemiştir. En yüksek toplam dönüşüm ise 42 °C'de %98 olarak elde edilmiştir. Kimyasal katalizde ise, 120 °C sıcaklıkta 10 saat sonunda dönüşüm %99'a ulaşmış, uygun molar oran enzim katalizdeki gibi belirlenmiştir. Bu yönden enzimatik kataliz ile uyum göstermektedir. Kullanılan enzim miktarı ağırlıkça %20-40 iken, kimyasal katalizör miktarı ise en uygun %0,7 olarak belirlenmiştir.

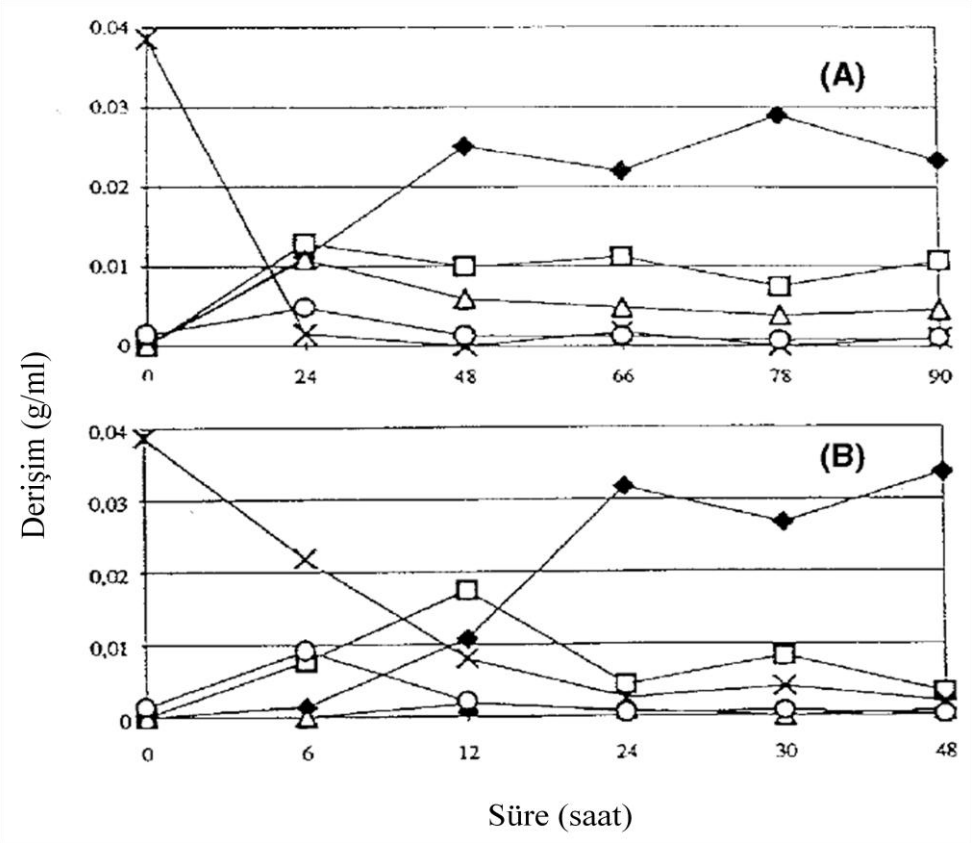


Şekil 1.14. Farklı sıcaklıklarda TMP esterleri sentezi (TMP/ester mol oranı 1/4,5, *C.rugosa* lipazı ağ. %40, ağ. %15 su, enzimatik kataliz ile 47 °C, %15 su miktarı, 5,3 kPa) (Uosukainen ve Linko, 1998)

Enzimatik sentezde verimi arttırmak için lipazın tutuklanarak kullanılması önerilmiştir. Enzim desteği olarak kullanılan diatome toprağı ile dönüşüm elde edilememiş, silika jel kullanımında ise ürün olarak yalnızca TMP-diester elde edilebilmiştir. Duolite ES-762 ve Celite destekleri ile en yüksek dönüşümler elde edilmiştir (Şekil 1.15). Duolite ES-561'e tutuklanan *C.rugosa* lipazı ile Lipozyme IM 20'nin performansları benzer olmuştur (Şekil 1.16).



Şekil 1.15. Destek türünün TMP-triester dönüşümüne etkisi (alkol/ester mol oranı 4,5/1, *C.rugosa* lipazı ağ. %40, ağ. %15 su, Enzimatik kataliz ile 47 °C, %15 su miktarı, 5,3 kPa, 42saat) (Uosukainen ve Linko, 1998)



Şekil 1.16. Kullanılan tutuklu lipaz türünün zamanla ürün derişimine etkisi (A: Duolite ES-561'e tutuklanan *C.rugosa* lipazı, 47 °C, 5,3 kPa, %40 ağ. lipaz, ağ. %15 su. B: Lipozyme IM 20, 58 °C, 5,3 kPa, %40 ağ. lipaz, susuz) ◆ TMP triesteri; ■ TMP diesteri; ▲TMP monoesteri; × kolza yağı metil esteri; ● bilinmeyen) (Uosukainen ve Linko, 1998)

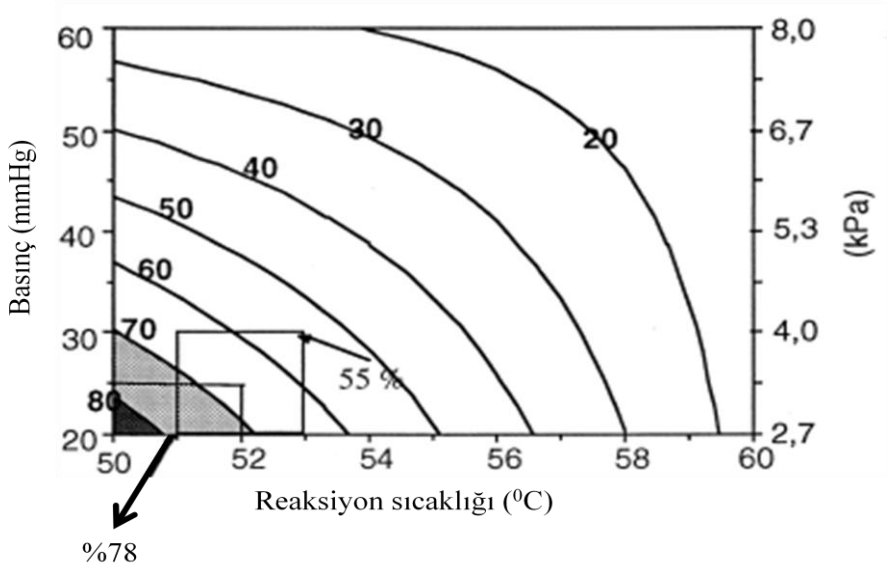
Çalışmada, Novozyme 435 lipazının ise ortamdaki suya karşı daha hassas olduğu gözlenmiştir. Reaksiyon ürünleri İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ve Yüksek Performans Jel Geçirgenlik Kromatografisi (HPGPC) ile analiz edilmiştir.

Linko ve diğ. (1998) yaptıkları bir başka çalışmada, farklı girdilerin lipaz ile katalizlenerek farklı biyobozunur malzemelerin üretilmesini amaçlamışlardır. Bu malzemelerden bir tanesi de TMP esterleri olup biyoyağlayıcı olarak kullanılması önerilmiştir. *Candida rugosa, Chromobacterium* v*iscosum, Rhizomucor miehei, Pseudomonas fluorescens* serbest lipazları ile Lipozyme IM (*R. Miehei)* ve Novozym 435 (*Candida antarctica)* ticari tutuklanmış lipazları kullanılmıştır. Kolza yağı metil esterlerinden TMP-ester sentezi için ağırlıkça %40 tutuklanmış lipaz kullanılmış ve 37-47 °C sıcaklık aralığında deneyler yapılmıştır. 5-16 kPa indirgen basınç uygulanarak TMP/metil ester mol oranı 1/3,5-1/4,5 aralığında değiştirilmiştir. TLC,

HPLC ve GPC ile ürün analizlerinin gerçekleştirildiği çalışmada, *C.rugosa* tutuklanmış lipazı ile çözücüsüz ortamda reaksiyon gerçekleştirilmiş ve bir önceki çalışmalarına göre daha yüksek derişimde ürün elde edilmiştir. Bu sayede hem sistem güvenliği artmış hem de ayırma işlemleri basitleşmiştir. 37 °C sıcaklık ile elde edilen dönüşüm oldukça düşüktür. Bunun yanında sıcaklık 47 °C'ye yükseltildiğinde ve enzim miktarı yarı yarıya düşürüldüğünde ise 68 saat sonunda %95 üzerinde kolza yağı dönüşümü elde edilmiştir. Sıcaklığın 58 °C'ye yükselmesi ile dönüşümde herhangi bir değişiklik olmamıştır. En yüksek dönüşümler ortama %15 su eklendiğinde sağlanmıştır. Suyun bu oranı ile TMP triester verimi 24 saat sonunda %60 ve toplam ester verimi %75 iken 68 saat sonundaki triester %73 ve toplam ester verimi ise %98 olarak hesaplanmıştır.

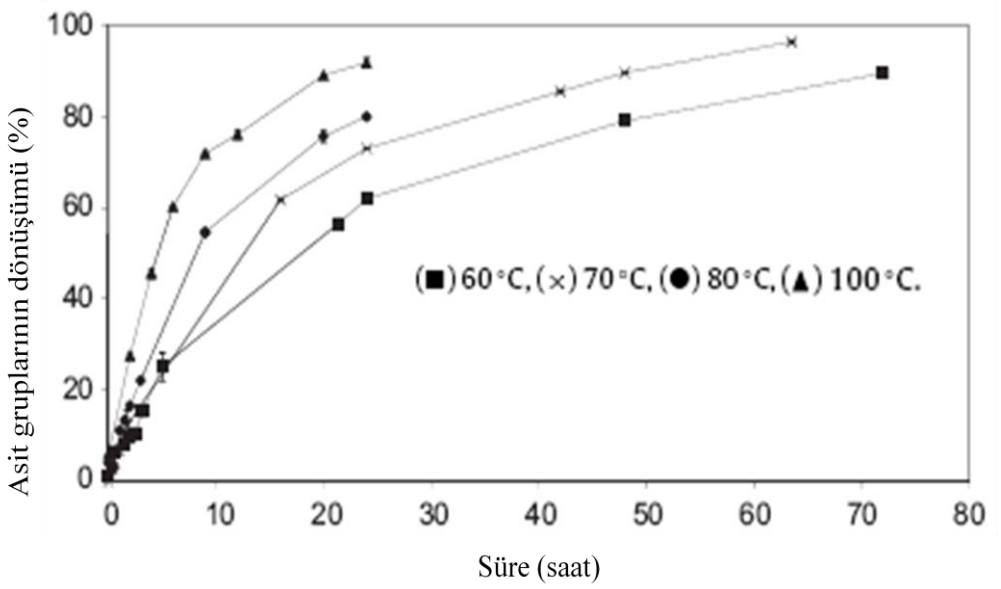
Uosukainen ve arkadaşlarının (1999) yaptığı bir diğer çalışmada ise, enzimatik transesterifikasyon için istatiksel deney tasarımı Multiple Linear Regreation (MLR) uygulanmıştır. Kolza yağı metil esterleri ile TMP arasında gerçekleşen transesterifikasyon farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilmiş tutuklanmış ve serbest lipazlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sisteme geri soğutucu altında vakum uygulanan çalışmada ürün analizi ise HPLC ile yapılmıştır. Metanolün uzaklaştırılması ile dönüşümün arttığı gözlenmiştir. Ayrıca ortama eklenen su miktarı düşük olduğunda ester yapısının daha çok diester ve triester yapısında olduğu görülmüştür. MLR ile su miktarı için doğru bir yaklaşımda bulunulamamıştır. Reaksiyon sıcaklığı ile basınç arasındaki ilişki Şekil 1.17 ile verilmiştir. Reaksiyon süresi 60 saat olarak belirlenmiş ve *Mucor miehei* lipazının uygun olduğu belirtilmiştir.

Ayrıca reaksiyon süresi ve enzim miktarı üzerine bir deneysel tasarım yapılmamıştır. Triester yapının oluşması, taşıyıcı reçinenin anlık açil göçüne neden olduğu ya da Lipozyme'in bu koşullar altında 1,3-spesifik olmadığı ile yorumlanmıştır. Bu süre sonunda toplam dönüşüm %95 ve triester verimi %90'ın üzerinde gerçekleşmiştir. Novozyme 435 kullanılan deneylerde bütün metil ester yapılarının TMP-monoesterlerine dönüştüğü görülmüştür. Bunun nedeni ise, yüksek bağıl nem (%15) ile açıklanmıştır (Uosukainen ve diğ., 1999).



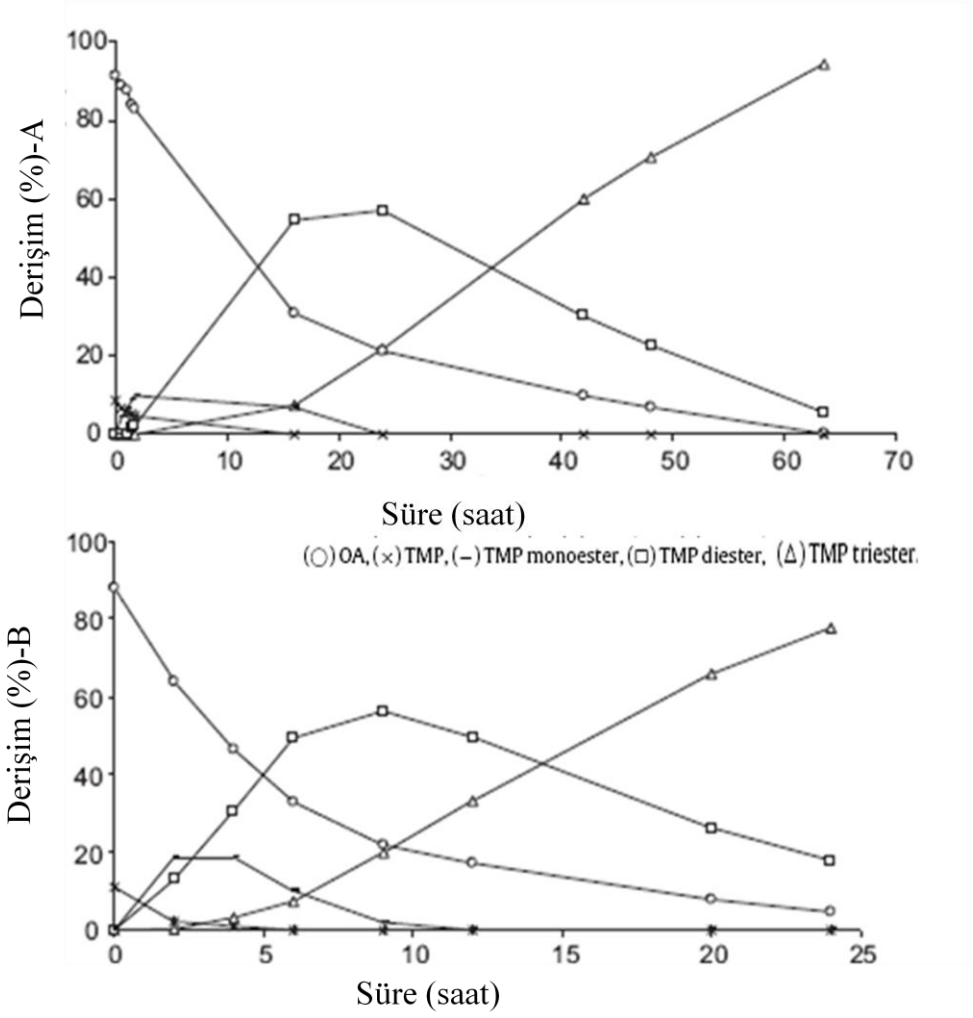
Şekil 1.17. Reaksiyon sıcaklığı ve basıncın bir fonksiyonu olarak TMP triester oluşumu (%). Su içeriği %5, yoğuşturucu sıcaklığı 15 °C, 48 saat reaksiyon süresi (Uosukainen ve diğ., 1999)

Biyoyağlayıcıların lipaz katalizli üretiminde transesterleşme yerine esterleşme tepkimeleri de gerçekleştirilebilir. Bunun için yağ asidi metil esterleri yerine yağlardan elde edilen yağ asitleri (oleyik asit, kaprilik asit, vb.) de girdi olarak kullanılabilir. Tez konusu ile ilgili olarak literatürde yer alan tek çalışma Akerman ve diğ. (2011) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, sıcaklık (60-100 °C), oleyik asit/TMP mol oranı (1/1-4,5/1) ve enzim miktarının (%0,5-7,5) TMP ester üretimine etkileri incelenmiştir. Reaksiyonlar 100 g ve 1000 g'lık ölçeklerde ticari tutuklanmış *Candida antarctica* lipazı (Novozyme 435) kullanılmıştır. Oluşan suyun uzaklaştırılarak ileri yöndeki reaksiyonun hızlandırılması için ortama vakum basıncı (20 mbar) uygulanmıştır. Enzimin tekrar kullanılabilirliğinin de incelendiği çalışmada, yağ asidi, TMP ve esterlerinin analizi için GC ve GPC kullanılmıştır. Bunun yanında ürün için *toplam asit sayısı* (TAN) ve bu değerden yola çıkarak yine dönüşüm hesaplanmıştır.



Şekil 1.18. Oleik asit ile TMP'nin esterleşmesinde toplam asit dönüşümünün reaksiyon süresi ile değişimine sıcaklığın etkisi (OA/TMP mol oranı 3/1, Novozyme 435 ağ. %2) (Akerman ve diğ., 2011)

Oleyik asit dönüşümünün sıcaklık ve tepkime süresi ile değişimine etkisi Şekil 1.18'de verilmiştir. Sıcaklığın artmasıyla asit dönüşümü artmış, tepkime süresi kısalmış ve 100 °C'de 24 saat sonunda %90 değerine ulaşmıştır. 70 °C ve 100 °C reaksiyon sıcaklıklarında mono-, di- ve triestere dönüşüm değerleri Şekil 1.19 ile verilmiştir. Her iki sıcaklıkta da triestere dönüşüm 24 saat sonunda hızla artmış, 100 °C'de 8 saat sonunda artmış ve 70 °C 64 saat sonunda %90'ın üzerinde iken 100 °C'de 24 saat sonunda aynı dönüşüm değerine ulaşılmıştır. Sıcaklığın artışı ile sürenin oldukça kısaldığı görülmüştür.



Şekil 1.19. 70 °C (A) ve 100 °C(B) sıcaklıklarında oleik asit, TMP, mono-, di- ve triester derişiminin zamanla değişimi (Akerman, 2011)

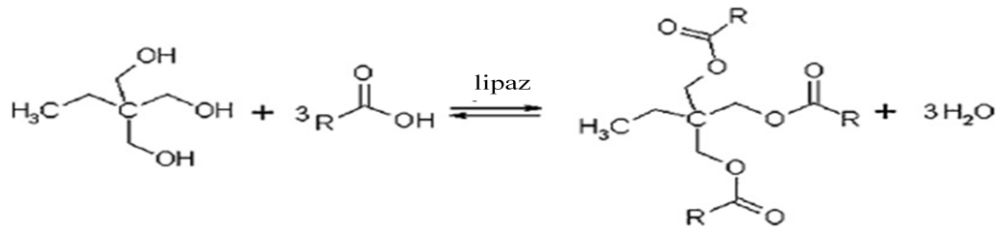
Enzim aktivitesinin 144 saat sonunda %70'ini kaybettiği belirlenmiştir. Reaksiyon sıcaklığındaki artışın aynı dönüşüm için gerekli süreyi kısalttığı görülmüştür. Ayrıca 2-propanol ile yıkanarak ve yıkanmadan tekrar kullanılan lipazların her biri 24 saat süren 7 ayrı reaksiyonda ardı ardına kullanılmasından sonra başlangıç akitivitelerinde belirli bir düşüş yaşanmış; bu düşüş 2-propanol ile yıkanan lipazda diğerine göre yarı yarıya daha az olmuştur.

Ortamdan suyun uzaklaştırılmasıyla ester hidrolizi önlenmiş, Novozyme 435'in açil alıcı özelliğinin dar ve açil donör özelliğinin geniş olmasının da hidrolizin önlenmesinde avantaj sağladığı belirtilmiştir.

Reaksiyonun gerektirdiği yüksek sıcaklık nedeniyle enzim aktivitesini hızlı kaybetmekte ve bu da maliyeti oldukça arttırmaktadır. Bunu dengeleyebilmek için

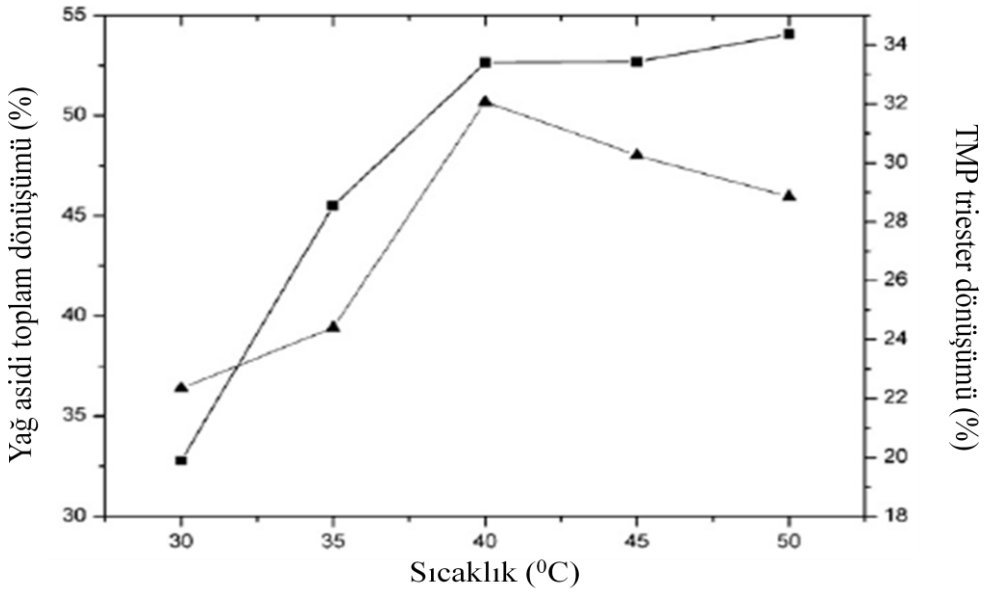
kimyasal katalizörlerin uygun fiyatı (1 €/kg) karşısında enzim fiyatlarının (900 €/kg) 30 kat düşürülmesi ve sıcaklık/kararlılık özelliklerinin iyileştirilmesi gerektiği belirtilmiştir. Bunun için enzimin matrikslere tutuklanması çözüm önerisi olarak sunulmuştur (Akerman ve diğ., 2011).

Tao ve diğ. (2012) ise yaptıkları çalışmada, TMP ile antibakteriyel özelliği de olan doymuş yağ asitlerinden kaprilik asidin çözücüsüz ortamda *Candida sp. 99–125* tutuklanmış lipazı ile esterifikasyonunu incelemişlerdir (Şekil 1.20).



Şekil 1.20. Yağ asidinin TMP ile esterleşme reaksiyonu (Tao ve diğ., 2012)

Oluşan ester yapısının yağlayıcı olarak kullanılabilmesi hedeflendiği araştırmada ester dönüşümü GC analizleri ile belirlenmiştir. Asit/alkol molar oran 10/1, sıcaklık 40 °C ve suyun %0,8 olması durumunda toplam ester verimi %96 ve triester verimi ise %93 olarak gerçekleşmiştir. 40 °C ve daha yüksek sıcaklıkta triester dönüşümünün diester derişiminin en yüksek olduğu 20 saat sonrasında hızlandığı görülmüş; reaksiyonda ilk 4 saat boyunca hiç triester olmuşmadığı belirtilmiştir. Asit/alkol mol oranının yüksek olması ile triester veriminin arttığı gözlenmiştir. Ağzı açık erlenlerde yapılan deneylerde karışımın içerdiği su miktarının 70 saat boyunca sabit kaldığı gözlenmiştir. En uygun enzim miktarı ise substrat ağırlığının %16'sı olarak belirlenmiştir. Toplam asit dönüşümü ve TMP triestere dönüşümüne sıcaklığın etkisi Şekil 1.21'de verilmiştir (Tao ve diğ., 2012).



Şekil 1.21. Kaprilik asitin TMP ile esterleşmesine sıcaklığın etkisi, (▲toplam dönüşüm, ■TMP triester dönüşümü), TMP/kaprilik asit molar oran:1/7, 0,4 g enzim, 190 rpm, 24 saat (Tao ve diğ., 2012).

Polyol esterler üzerine yapılan bu araştırmaların yanı sıra yine yağlayıcı özelliği göstermeleri nedeniyle, vaks esterlerin üretimi için yapılan araştırmalar da aynı yıllarda ortaya çıkmaya başlamıştır.

Ucciani ve diğ. (1996) bazı vaks esterlerin enzimatik sentezi üzerine çalışmalar yapmışlardır. C_6-C_{10} yağ asitleri ile C_6-C_{22} alkolleri substrat olarak, büyük gözenekli anyon değiştirici reçineye tutuklanmış Lipozyme TM (*Mucor miehei*) katalizör olarak kullanılmıştır. 20-28 karbon atomu içeren doymuş esterler %80'in üzerinde dönüşüm ile elde edilmiştir. Bu esterlerden 24 karbon ve fazlasını içerenlerin sıvı halde bulunduğu belirtilmiştir. 28-36 karbon atomu içeren tekli doymuş vaks esterler ise %70 ve üzerinde dönüşümle üretilebilmişlerdir. Risinoleyil zinciri içeren alkoliz tepkimesinde Lipozyme'in seçiciliği öne çıkmıştır. Deneysel çalışmada alkol/asit ya da alkol/metil ester mol oranı 1/1 iken gerekli durumlarda çözücü olarak n-hekzan kullanılmıştır.

Chen ve diğ. (1997), mantar hücrelerinin selüloz biyokütle desteğine tutuklanarak hücreye bağlı lipaz katalizi ile oleyik asidin laurik asit ve palmitik asit ile esterleşme reaksiyonlarını incelemişlerdir. Çözücüsüz ortamda gerçekleşen reaksiyonda, ikinci ürün olan suyun olumsuz etkisini ortadan kaldırmak için reaksiyon karışımına

moleküler elek eklenmiştir. İç ve dış kütle aktarım etkilerinin olduğu sistemde, reaksiyon hızı Ping Pong Bi-Bi mekanizması ile açıklanmış ve alkolün inhibisyon etkisi engellenmeye çalışılmıştır. Sıcaklık ve substrat derişiminin reaksiyon hızına olan etkileri incelenmiştir. Aynı koşullarda lauril oleat dönüşümü, stearil oleat dönüşümünden daha hızlı ve yüksek olarak gerçekleşmiştir. Kullanılan alkolün farklı çözücülerde farklı derişimlerde farklı hız gösterdiği belirtilmiştir.

Basheer ve diğ. (1998) tarafından, uzun zincirli yağ asitleri ile yağ alkolleri arasındaki esterleşme reaksiyonunun kinetik çalışması için, n-hekzan çözücü olarak kullanılmış, laurik asit ile dodesil alkol (lauril alkol) reaksiyon modeli çıkarılmıştır. Katalizör olarak yüzey aktif madde ile kaplı lipaz kullanılmış; 5 saatlik 40 kullanımdan sonra aktivitesini halen koruduğu gözlenmiştir. Bunun yanında yağ asidi zincirinin uzunluğu, ortamdaki su miktarı ve sıcaklık parametrelerinin reaksiyon kinetiği üzerindeki etkileri açıklanmıştır.

Hallberg ve diğ. (1999) kolza yağ asidi metil esterleri ve 1-hekzadekanolden (16:0) izo-oktan çözücü ortamında ticari tutuklanmış Lipozyme *(Mucor miehei)* ile vaks ester üretimi üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışmada, enzim/yağ oranı ağırlıkça 0,3-0,9, su aktivitesi 0,11-0,44, sıcaklık 50-80 °C aralığında seçilmiştir. Substratlar eşmolar beslenmiş, reaksiyon başlamadan önce enzimin doygun tuz çözeltileri kullanılarak vakumlu desikatörlerde dengeye gelmesi sağlanmıştır. Ürün analizi HPLC ile yapılmıştır. Oluşan metanolün uzaklaştırılması ile dönüşüm artmıştır. Başlangıç reaksiyon hızının, reaksiyon kabının ağzının kapalı ya da açık olması ile değişmediği belirtilmiştir. En yüksek başlangıç reaksiyon hızı 9,6 g vaks ester/g enzim*saat olarak verilmiştir. En yüksek enzim miktarı kullanılarak 10dk reaksiyon süresi sonunda vaks ester verimi %70 üzerinde gerçekleşmiştir. Kapalı olarak gerçekleştirilen deneylerde 80 °C sıcaklıkta %83 denge dönüşümü elde edilirken, ağzı açık gerçekleşen deneylerde metanolün buharlaşması ile aynı sıcaklıkta denge dönüşümü %90 olmuştur.

Keng ve ark. (2009) palm yağı esterlerinin üretimini, palm yağı ve oleyil alkolün Lipozyme RM IM katalizörü varlığında transesterleşmesiyle gerçekleştirmişlerdir. En uygun reaksiyon koşullarında palm yağının %80 üzerinde ester dönüşümü verdiğini açıklamışlardır. Eş anlı Diferansiyel Taramalı Kalorimetri-Isıl Gravite

(DSC-TG) ölçümleri ile elde edilen esterlerin ısıl kararlılıkları belirlenmiştir. Esterin yoğunluk, refraktif indeks, yüzey gerilimi, iyodin değeri, asit değeri, sabunlaşma değeri gibi özellikleri de ASTM standartlarına uygun olarak ölçülmüştür. Rushton türbin kullanılarak karıştırmalı tank reaktörde gerçekleştirilen deneylerde, Lipozyme RM IM miktarı palm yağının %16'sı olarak belirtilmiştir. Yağ/alkol mol oranı 1/3 ve sıcaklığın 50 °C olduğu reaksiyon n-hekzan ortamında gerçekleştirilmiştir. Karıştırma hızı 242 rpm ve tepkime süresi ise 5 saat olarak verilmiştir. Araştırmanın ilgi çekici bir yönü ise cilde uygulandıktan 90 dk sonra ciltteki nemi %47 arttırması olmuştur. Bu sonuçlara göre oluşan esterin kozmetik endüstrisinde kullanılmasının mümkün olduğu belirtilmiştir.

Yukarıda vaks esterler için yapılan enzimatik çalışmaların çözücülü ortamda gerçekleştirilmiş araştırmalarından kısaca bahsedilmeye çalışılmıştır. Çözücünün enzime olumsuz etkisi ve ortamdan tepkime sonunda uzaklaştırılması gerektiğinden çözücüsüz ortamda çalışmalar da yapılmıştır. Çünkü çözücünün uzaklaştırılması ayrıca maliyet ve enerji gerektirir. Literatürde konu ile ilgili olarak farklı lipaz, yağ, yağ asidi ve yağ alkollerinin kullanıldığı çalışmalar vardır ve farklı parametreler incelenmiştir.

Laudani ve ark. (2007) laboratuar tipi sabit yataklı reaktörde ticari tutuklanmış *Rhizomucor miehei* Lipozyme RM IM lipazı katalizörlüğünde oleyik asit ile 1-oktanol esterleşmesini CO_2 atmosferinde gerçekleştirmişlerdir. Deneylerde basınç, sıcaklık, CO_2 ve substrat akış hızı gibi parametreler incelenmiştir. En uygun koşullar 10 MPa basınç, 0 °C sıcaklık, 210 dm^3/sa CO_2 akış hızı ve 18 cm^3/sa substrat akış hızı olarak belirlenmiş ve bu koşullarda dönüşüm %93 olarak elde edilmiştir. Sürekli olarak işletilen sistemde enzim aktivitesi 50 gün boyunca aktivitesini korumuştur.

Guncheva ve diğ.(2008) *Candida Rugosa* lipazı ve *Porcine pancreas* lipaz ile vaks ester üretimi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Tutuklama destek maddesi olarak hazırlanan yüzey aktif madde (PEG_{2000}), kullanılan enzim üzerinde inhibisyon etkisi yapmamıştır. Ardı ardına gerçekleşen 7 reaksiyon sonucunda enzim aktivitesinin %83'ünü korumuştur. 1-dodekanol, 1-tetradekanol, 1-hekzadekanol, miristik asit ve palmitik asit substrat olarak kullanılmıştır. Tutuklanarak kullanılan lipaz tekrar kullanılmadan önce hekzan ile yıkanmıştır. PEG_{2000} ile aktifleştirilen lipazlar doğal

halde de reaksiyonlarda kullanılmış ve performansları karşılaştırılmıştır. 50 °C'de gerçekleşen reaksiyon çözücüsüz ortamda 10 saat sürmüş ve yaklaşık %100 verim elde edilmiştir. *Porcine pancreas* lipaz için ise deneyler 40 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Radzi ve diğ. (2010) *Candida antarctica* lipazı (Novozyme 435) varlığında oleyik asitle oleyil alkol arasındaki esterleşme reaksiyonu ile vaks ester üretimini gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen vaks ester ile iki farklı çark tipinde (Rushton türbin ve AL-deniz otobüsü) ve 2 litrelik tank reaktörlerde farklı karıştırma hızlarında deneyler yapılmıştır. Enzim miktarı, reaksiyon sıcaklığı ve farklı çark hızlarının dönüşüm üzerine etkisi incelenmiştir. Rushton türbininin düşük hızda en yüksek verimi sağladığı görülmüştür. Termodinamik parametrelerin de hesaplandığı çalışmada dönüşüm titrasyon ile hesaplanmıştır. Kinetik verilerin sonucunda Michaelis Menten kinetiği ile yapılan hesaplamalarda viyal deneyleri ile karıştırmalı tank reaktöründeki reaksiyon süresine karşı elde edilen deneysel sonuçların birbiri ile tutarlı olduğu görülmüştür. Ancak, viyal deneylerinde başlangıç reaksiyon hızının daha yüksek olduğu görülmüştür. Enzim miktarının 50 g'dan 60 g'a yükselmesi ile dönüşüm 4 kat artmış ancak, 90 g'a yükselmesi sonucunda ise dönüşümde belirgin bir değişiklik yaşanmadığı belirtilmiştir. Sıcaklığın 37 °C'den sonra 50 °C'ye kadar arttırılmasıyla dönüşüm değişmemiştir. Bütün deneylerde asit/alkol mol oranı 1/2 değerinde sabit alınmıştır. Çark hızı 0,262-1,047 m/s hız aralığında değiştirildiğinde, reaksiyonun ilk bir saati süresince dönüşümü değiştirmediği belirtilmiştir.

Nemestóthy ve Bélafi-Bakó (2010) Novozyme 435 ticari tutuklanmış lipaz katalizörlüğünde oleik asit ve fuzel yağı esterleşmesini incelemişlerdir. Toplam ester dönüşümü titrasyon ile hesaplanmıştır. Fuzel yağı esterleri aynı zamanda GC ile doğrulanmıştır. Çözücüsüz ortam koşullarında gerçekleştirilen bu çalışmada %0,5 enzim miktarı, 150 rpm çalkalanma hızı, asit/alkol mol oranı 1/2 olduğu koşullarda ve 30 °C sıcaklıkta izoamil alkol oleat verimi %60 civarında iken 60 °C'de %90 seviyesine ulaşmıştır. Mol oranının bu seviyeyi aşması durumunda, ester veriminde yine düşüş yaşanmıştır. Ester veriminin kullanılan alkolün zincir uzunluğu ve bağ yapısı ile değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir. Elde edilen esterin yağlayıcılık özellikleri ticari bir sentetik yağlayıcı olan DB-32 dikarboksilik asit ester referans alınarak değerlendirilmiştir. Çalışmada elde edilen esterin düşük akma noktası ve parlama noktası nedeni ile düşük sıcaklıklarda özellikle soğutucu yağ olarak

kullanımı önerilmiştir. Ayrıca ısıl ve oksidatif teste tabi tutulan ürünün bu özelliklerinin de referans yağa göre daha iyi olduğu bulgular arasındadır. Tablo 1.8'de polyol esterler ve vaks esterler üzerine yapılmış çalışmalardan oluşan karşılaştırmalı bir özet yer almaktadır.

Tablo 1.8. Litearatürde enzim katalizli polyol esterler ve vaks esterler üzerine yapılmış bazı çalışmalar

Kaynak	**Giren (yağ asidi/yağ asidi esteri)**	**Alkol**	**Enzim türü**	**Dönüşümün tanımı**	**Reaksiyon ortamı**
Kelly&Hayes, 2006	Ricinoleic asit (%90)	TMP ve PE	Novozyme 435 ve Lipozyme TL IM	Star polimerler, moleküler ağırlık hesaplanmış.	Çözücüsüz
Linko ve diğ., 1997	Kolza yağı metil esteri	TMP	C.rugosa (toz), Lipozyme IM 20, Novozyme 435	% TMP tri-ester ve % toplam TMP mono-, di- ve tri-esterleri	Çözücüsüz
Chen&Wang, 1997	Oleik asit	Lauril alkol&palmitil alkol	*Rhizopus niveous fungal* hücre, tutuklanmış	Palmitil oleat ve lauril oleat	Çözücüsüz, ile hekzan, heptan
Sellami ve diğ., 2011	Palm stearin	Setil alkol	*Rhizopus oryzae* lipaz $CaCO_3$ 'e tutuklanmış	Toplam dönüşüm	hekzan
Rahman ve diğ., 2011	Engkabang fat	Oleyil alkol	Lipozyme RM IM	Toplam ester verimi	heptan ve hekzan
Radzi ve diğ., 2010	Oleik asit	Oleyil alkol	Novozym 435	Toplam ester verimi	hekzan
Keng ve diğ., 2008	Palm yağı	Oleyil alkol	Lipozyme RM IM	Toplam ester verimi	n-hekzan
Keng ve diğ., 2009	Palm yağı	Oleyil alkol			
Guncheva &Zhiryakova, 2008	zeytinyağı	Farklı alkoller	*Candida rugosa* ve *Pankreas porcine* lipaz, tutuklanmış.	n-oktil oktanoat	hekzan
Basri ve diğ., 2007	Palm yağı	Oleyil alkol	Lipozyme IM	oleyil linoleat	hekzan

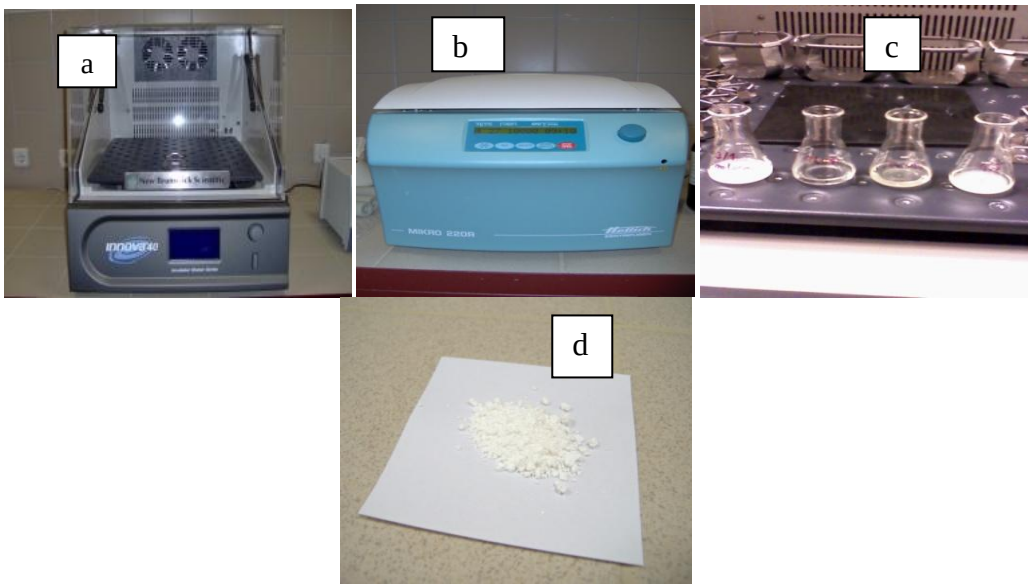
Tablo 1.8 (Devam). Litearatürde enzim katalizli polyol esterler ve vaks esterler üzerine yapılmış bazı çalışmalar

Kaynak	**Giren (yağ asidi/yağ asidi esteri)**	**Alkol**	**Enzim türü**	**Dönüşümün tanımı**	**Reaksiyon ortamı**
Knez ve diğ., 2006	Oleik asit	1-Dodecyl alcohol	(Lipozyme RM IM)	Kalan yağ asidi cinsinden	Süperkritik akışkan-CO_2
Singh ve diğ., 2007	Uzun zincirli yağ asitleri	α-Olefinler	*N*-bromosuccinimide (NBS)	Yapı karakterizasyonu yapılmış	-
Dianóczki ve diğ., 2007	CLA	Çeşitli alkoller	Novozym 435	Toplam ester	çözücüsüz
Gunawan ve diğ., 2005	Palm yağı	Oleyil alkol	Lipozyme IM	Toplam ester	n-hekzan
Salis ve diğ., 2003	koyun sütü yağından HTF	Cetyl alkol(hekzadekanol)	Lipozyme RM IM ve Novozym 435	HPLC ile cetyl oleat,palmitat,stearat,mirristat.	n-hekzan
Hadzir ve diğ., 2001	triolein	Oleyil alkol	Lipozyme Novozyme	Üründeki ester miktarı	Heptan ve hekzan
Steinke ve diğ., 2001	Crambe ve camelina yağ asitleri	Oleyil alkol	Novozyme 435 papaya latex lipaz	Üründeki ester miktarı	çözücüsüz
Steinke ve diğ., 2001	Camelina ve crambe oil	Oleyil alkol, crambe alkol, camelina alkol, n-oktanolisopropanol	Novozyme 435 papaya latex lipaz Lipozyme IM	Toplam ester verimi	çözücüsüz
Garcia ve diğ., 2000	Oleik asit	Cetyl alkol	Novozyme 435	Toplam ester verimi	çözücüsüz

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Malzeme ve Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmada kullanılan oleik asit, CHS Endüstriyel Ürünler San. ve Tic. AŞ. firmasından, Lipozyme TL 100 L (*Thermomyces lanuginosa*), Lipozyme CALB L (*Candida antarctica*), Palatase 20000 L (*Rhizomucor miehei*) serbest lipazları ile Lipozyme TL IM ve Noopazyme tutuklanmış lipazları Novozymes (Danimarka) firmasından temin edilmiştir. Serbest lipazın tutuklandığı Mg-Al hidrotalsit laboratuarda sentezlenmiştir. TMP, NaOH, fenolftalein, etanol (%99), $Mg(NO_3)_2.6H_2O$, $Al(NO_3)_3.9H_2O$, HCl, üre ve asetik asit analitik saflıkta olup Merck firmasından satın alınmıştır. Brilliant Blue G, Bovine serum albumine, Celite, çitosan, trizma baz (tampon çözelti bazı) ve glutaraldehit (GA) analitik saflıkta olup Sigma Aldrich firmasından, oleyil alkol, palmitil alkol ve stearil alkol ise Alfa Aesar firmasından, teknik etanol (%70) Labor-Teknik Laboratuar Malzemeleri ve Ekipmanları San. A.Ş. firmasından satın alınmıştır. Kullanılan malzeme ve ekipmanlar ile deney düzeneği Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Deneysel çalışmada kullanılan ekipmanlar ve deney düzeneği (a) çalkalamalı inkübatör, (b) mikrofantrifüj), (c) reaksiyon kapları (deney düzeneği), (d) ÜHT-TL100L tutuklu lipazı(katalizör)

Esterleşme deneyleri karıştırma hızı ve sıcaklık kontrollü (New Brunswick Scientific Innova 40) inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımından alınan örnekler santrifüj (Hettich Mikro 220R) ile katalizörden ayrılmış, örnekler ependorf tüplerine alınarak, -18 °C'de analiz için saklanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Üre hidrolizi yöntemiyle hidrotalsit hazırlama

Mg/Al/üre mol oranı 2/1/15 olacak şekilde $Mg(NO_3)_2.6H_2O$, $Al(NO_3)_3.96H_2O$ ve üre tartılarak 1L distile suda çözülerek 10 saat manyetik karıştırıcıda 300 rpm'le 95 °C'de karıştırılmıştır. Ardından karıştırıcı kapatılarak 6 saat daha ısıtılmıştır. Daha sonra soğutularak filtre edilmiştir. Katı çökelti 5 kez 100 ml'lik saf suyla yıkanmıştır. Daha sonra 21 saat 100 °C'de etüvde bekletilmiştir. 500 °C'de 4 saat kalsine edildikten sonra, havanda dövülerek ince toz haline getirilmiş, desikatörde saklanmıştır (Akbin (2012).

2.2.2. Çitosan desteğin hazırlanması

0,1 M HCl çözeltisi içinde %1 (g çitosan/ml çözelti) oranında çitosan çözülmüştür. Elde edilen çözelti 30 °C'de 24 saat karıştırılmıştır. %2 (v/v)'lik glutaraldehit çözeltisi eklenerek 2 saat daha karıştırma işlemine devam edildikten sonra 1M'lık NaOH çözeltisi ile çitosan çöktürülerek santrifüjle ayrılmıştır. Saf suyla yıkanarak fazla glutaraldehit uzaklaştırılmış ve kurutularak tutuklama işlemine kadar serin ortamda saklanmıştır (Hung ve diğ., 2003; Chiou ve Wu, 2004; Romdhane ve diğ., 2011).

2.2.3. Desteklere lipaz tutuklama

Deneysel çalışmada kullanılan üre hidrolizi ile elde edilmiş hidrotalsite (ÜHT) tutuklanmış lipaz katalizör, Kimya Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji araştırma laboratuarında hazırlanmıştır. 0,1 M Tris-HCl tamponunda 37 °C sıcaklık, 52,5 mg serbest lipaz/3 ml tampon çözelti/0,01 g destek tartılarak 200 rpm karışma hızında, 24 saat süreyle tutuklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Enzim tutuklama için uygun koşulların belirlenmesi ve enzim aktivitesinin ölçülmesi ile ilgili detaylar Akbin (2012)'de verilmiştir.

Celite ve çitosan desteklere lipaz tutuklanmasında sıcaklık, karışma hızı, enzim çözeltisi derişimi, tampon çözelti pH'ı ve tutuklanma süresinin etkileri incelenmiştir.

2.2.4. Protein Tayini

Çözeltilerdeki protein miktarı Bradford yöntemiyle ölçülmüştür. Bradford yöntemi proteine bağlanan Coomassie Brillant Blue G250 boyasının 595 nm de absorbans vermesi ilkesine dayanan spektrofotometrik ölçüm yöntemidir (Bradford, 1976; Lucarini ve Kilikian, 1999). Referans protein olarak bovine serum albumin kullanılmıştır.

Bradford çözeltisi, 1 ml ethanol, 2 ml fosforik asit, 0,45 ml Brilliant Blue solüsyonu, 15 ml saf su karıştırılarak hazırlanmıştır. 2,4 ml Bradford çözeltisine 50 µL örnek eklenerek karıştırılarak ve 595 nm'de absorbans ölçülmüştür. Elde edilen absorbansa karşılık gelen protein miktarı hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. (Ek-A).

2.2.5. Lipaz aktivitesi tayini

Zeng ve diğ., (2009) ve Romdhane ve diğ., (2011) lipaz tutuklanması üzerine yaptıkları çalışmalarında lipaz aktivitesi için çeşitli yöntemler kullanmışlardır. Yapılan literatür araştırması sonucu en çok kullanılan bir yöntem olan spektrofotometrik ölçüm tercih edilmiştir. p-nitrofenil palmitatın (p-NPP) lipaz varlığında hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenolün (p-NP) derişiminin hesaplanması ilkesine dayanır (Kumar ve diğ., 2005). Yöntem kısaca şu şekilde uygulanmıştır:

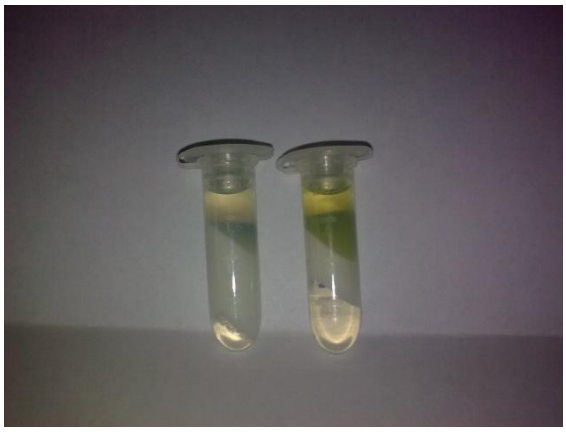
Her bir tampon için (pH 7,0 – 9,0) farklı derişimlerde hazırlanmış p-NP çözeltileri kullanılarak Lipozyme TL 100 L için oluşturulan kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir (Ek-D). Analizi yapılacak lipazdan 3 mg tartılarak üzerine p-NPP çözeltisinden 75 µl ve 2925 µl tampon çözelti eklenerek 50 °C'de 10 dk süreyle inkübe edilen örnekler, tepkimenin durdurulması için -18 °C'de 8 dk bekletilmiştir. Tepkime karışımı filtre edilerek tamponla 1/3 oranında seyreltilmiş ve 410 nm'de UV-vis spektrofotometrede absorbansı okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri ile kalibrasyon grafiği yardımıyla tepkime sonunda oluşan p-NP derişimi hesaplanmıştır.

2.2.6. Trimetilolpropan Oleat Üretimi

TMP-ester sentezi, tutuklanma deneylerinde en iyi sonuç alınan ÜHT-TL 100 L tutuklanmış lipazı ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar ağzı açık ve kapalı olmak üzere 25 ml hacmindeki erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Bu sayede reaksiyon ilerledikçe oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılmasının dönüşüme etkisi gözlemlenmeye çalışılmıştır. Ardından optimizasyonu yapılacak diğer parametreler (ortama eklenen su miktarı, kullanılan enzim miktarı, sıcaklık, çalkalanma hızı) değiştirilerek yağ asidi dönüşümü hesaplanmıştır. Reaksiyon karışımının ve örneğin santrifüjlenerek ayrılmış hali Şekil 2.2'de verilmiştir.



(a) (b)



(c)

Şekil 2.2. (a) Reaksiyon karışımı, (b) ve (c) ürünlerin santrifüj sonrası görünümü

Başlangıçta ortama eklenen su miktarı (ağ. % substrat) %0-20 aralığında değiştirilerek asit/alkol mol oranının 3/1, 4/1 ve 6/1 olduğu koşullarda deneyler yapılmıştır. Sıcaklık 30-60 °C aralığında değiştirilmiştir. En uygun sıcaklık, mol oranı ve su miktarı seçildikten sonra bu koşullarda enzim miktarı substrat ağırlığının

%1, %3, %5, %7 ve %9'u kadar olacak şekilde değiştirilerek deneyler yapılmıştır. Ayrıca, en uygun koşullarda karıştırma hızının dönüşüme olan etkisi de incelenmiştir. Bunun için 40 °C, %10 su miktarı, 4/1 mol oranı, %5 enzim miktarı ile 150, 250 ve 320 rpm çalkalanma hızlarında 24 saatlik reaksiyon süresi boyunca esterleşme gerçekleştirilmiştir.

Deneysel çalışmada oleik asit miktarı ve reaksiyon süresi her bir set için sabit tutulmuş, reaksiyon 24 saat süre ile devam etmiştir. Belirlenen şartlarda erlende karıştırılarak çözülen oleyik asit, TMP ve su tepkime sıcaklığına getirildikten sonra ortama lipaz eklenmiştir. Hazırlanan bu deney setleri çalkalamalı inkübatörde sabit hızda dairesel yörüngede çalkalanmaya bırakılmıştır. Farklı tepkime sürelerinde alınan örnekler santrifüj yardımı ile enzimden ayrılarak saklanmıştır.

2.2.7. Trimetilolpropan ester analizi

Oleyik asit dönüşümünün hesaplanabilmesi için asit-baz titrasyonu kullanılmıştır. Titrasyonda kullanılan baz çözeltisi 0,1 M derişimde laboratuarda hazırlanmış ayarlı NaOH sulu çözeltisidir. Ortamdaki serbest yağ asidi miktarı, ASTM-D5555-95 (2011)'e göre titre edilmiş ve denklem (2.1)'de verilen eşitlik ile hesaplanmıştır. Örnek hesaplama Ek-E'de verilmiştir.

$$\%FFA=\frac{V_{titrant}\times N_{titrant}\times M_{A,OA}}{m_{örnek}\times 10} \quad (2.1)$$

Oleyik asit dönüşümü için ise denklem (2.2) kullanılmıştır. Örnek hesaplama Ek-F'de verilmiştir.

$$\%\text{oleik asit dönüşümü}=\frac{FFA_0\text{-}FFA_t}{FFA_0}\times 100 \quad (2.2)$$

FFA: ortamdaki serbest yağ asidi

$V_{titrant}$: örneğin titrasyonunda harcanan NaOH çözeltisinin hacmi (ml)

$N_{titrant}$: kullanılan titrasyon çözeltisinin normalitesi (mol/L)

$M_{A,OA}$: oleik asit mol ağırlığı (g/mol)

$m_{örnek}$: titre edilen örneğin kütlesi (g)

FFA_0: reaksiyon karışımında başlangıçtaki oleik asit miktarı (%)

FFA_t: herhangi bir t anında reaksiyon karışımındaki oleik asit miktarı (%)

Titrasyon yapılacak örnek hassas terazide tartıldıktan sonra üzerine 3 ml teknik etanol eklenerek seyreltilmiştir. Saf etanolde %1'lik olarak hazırlanmış fenolftalein baz indikatöründen 2-3 damla bu karışıma damlatıldıktan sonra çözelti dönüm noktasına kadar NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Oluşan pembe rengin en az 30 sn sabit kalmasına dikkat edilmiştir. Her bir deney seti için titrasyon en az iki kez tekrar edilerek elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma 109M466 numaralı TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projesi'nin bir parçasıdır. Projenin ilk aşamasında hedef, farklı kaynaklardan elde edilen serbest lipazların hidrotalsit, Celite ve çitosan desteklere tutuklanma performansının incelenerek biyodizel üretiminde kullanılabilecek uygun enzim-destek çiftinin seçilmesidir. İkinci aşamada ise lipaz katalizi ile kanola yağından biyodizel üretilmesidir. Bu tezin konusu olan biyoyağlayıcı üretimi projenin son aşaması olup elde edilen biyodizelden biyoyağlayıcı üretimi hedeflenmiştir.

Deneysel çalışmalarda katalizör olarak kullanılacak tutuklanmış lipaz seçilmesi amacıyla, Lipozyme TL 100 L, Lipozyme CALB L ve Palatase 20000 L sıvı formdaki serbest lipazlar Celite ve çitosan desteklere tutuklanmış ve tutuklamaya etki eden enzim derişimi, tampon pH'ı, sıcaklık ve sürenin etkileri incelenmiştir. Desteğe tutuklanan protein miktarı ve tutuklanmış lipazın aktivitesi açısından daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırılarak Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100 L lipazının (ÜHT-TL 100 L) en yüksek tutuklanma performansı ve aktiviteyi gösterdiği sonucuna varılmıştır.

ÜHT-TL 100 L lipazı kullanılarak biyoyağlayıcı elde edilmesi için çeşitli parametreler incelenmiştir. Reaksiyonda girdi olarak kanola yağından elde edilen FAME (biyodizel) ile TMP kullanılması amaçlanmış ve çalışmayı hızlandırmak adına ticari bir FAME ile ön denemeler yapılmıştır. Geri soğutucu yardımıyla vakum altında gerçekleştirilen reaksiyonlarda ürünün analizlenmesi ile ilgili bazı problemlerle karşılaşılmıştır. TMP esterlerinin analizi için HPLC ve GC ile bazı yöntemler literatürde önerilmektedir ancak, henüz standart bir analiz yöntemi mevcut değildir. Analiz konusunda yol gösterici olması açısından ticari olarak TMP-trioleat temin edilmiştir. Hem ticari ürünün hem de deney numunesinden örnekler farklı analiz laboratuarlarına gönderilerek analizi talep edilmiştir.

Öncelikle TÜBİTAK-MAM'a test ve analiz hizmetleri için başvuru yapılmıştır. Merkez, önerilen testlerin yapılamayacağını belirtmiş ve bunların yerine GC-MS ile

yapı doğrulamayı denemeyi önermiştir. Ancak, GC-MS ile alınan sonuçlar kütüphaneleri ile karşılaştırıldığında yorumlanamamıştır.

İstanbul Üniversitesi İleri Analizler Laboratuarı ile konuyla ilgili irtibata geçilmiş ancak olumlu yanıt alınamamıştır.

Kocaeli Üniversitesi Alternatif Yakıtlar Araştırma Geliştirme Merkezi (AYARGEB)'nde ticari ürün ve deney numunesi GC ile analiz edilmeye çalışılmış ancak, yorumlanmaya uygun herhangi bir sonuç elde edilememiştir. Ayrıca, bölüm laboratuarlarındaki HPLC ile yayınlarda yapı olarak benzerlik gösteren mevcut GPC kolonları ile farklı koşullarda denemeler yapılmıştır. TMP'nin mono-, di- ve tri-esterlerinin üç farklı grup halinde pik vermesinin beklendiği bu kromatogramlarda birleşik ve yayvan tek bir pik elde edilmiştir. Yeni bir HPLC kolonu sipariş edilmiş ancak, henüz temin edilememiştir.

Tüm bu analiz problemleri nedeniyle hammadde olarak FAME yerine oleik asit kullanılmasına karar verilmiştir. Asit-baz titrasyonu yapılarak reaksiyondaki toplam dönüşüm hesaplanabileceği için doğrudan yağ asidi kullanılmıştır.

Deneysel çalışmalarda katalizör olarak kullanılacak tutuklanmış lipaz seçilmesi için tutuklama ile ilgili parametrelerin etkileri gözlenmeye çalışılmıştır. Desteğe tutuklanan protein miktarı ve tutuklanmış lipazın aktivitesi için en iyi sonuçları veren Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış lipaz ile esterleşme reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

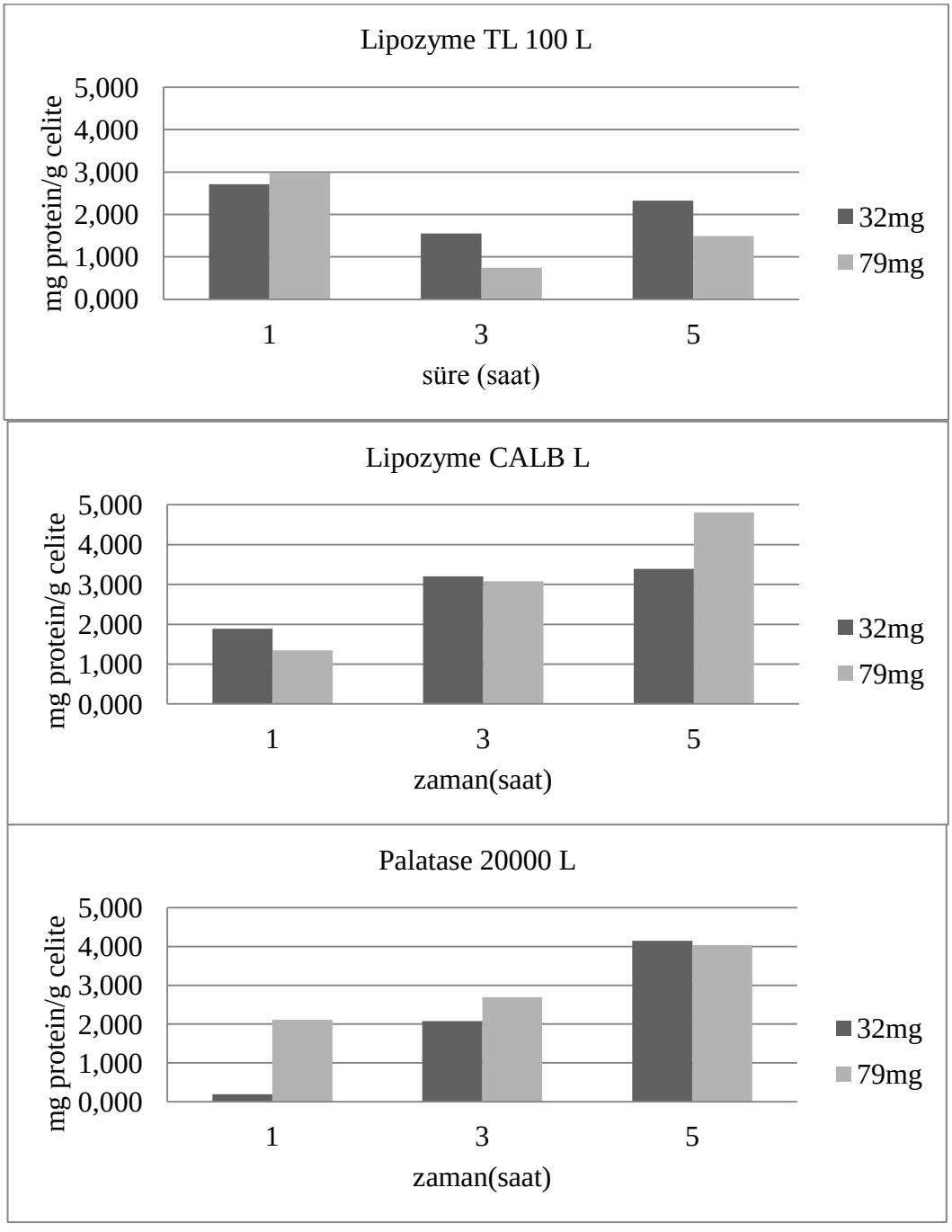
3.1. Celite'e Lipaz Tutuklama

Celite desteği üzerine Lipozyme TL 100 L, Lipozyme CALB L ve Palatase 20000 L enzimleri tutuklanmıştır. Tutuklamaya enzim derişimi, tampon pH'ı, süre ve sıcaklığın etkileri incelenmiştir.

3.1.1. Enzim derişiminin etkisi

Celite lipaz tutuklanmasında enzim derişiminin etkisinin incelenmesi için aynı tampon çözeltide hazırlanmış farklı derişimlerdeki lipaz çözeltileri kullanılmıştır. 25 °C ve 200 rpm karıştırma hızında 5 saat süre ile tutuklama işleminin gerçekleştirildiği deneylerde elde edilen desteğe tutuklanan enzim miktarının

tutuklama süresi ile değişimine enzim derişiminin etkisi Şekil 3.1'de verilmiştir. Enzim derişiminin tutuklanma verimi üzerine etkisi ise EK-B'de Şekil B.1 ile verilmiştir.



Şekil 3.1. Lipaz miktarının Celite'e tutuklamaya etkisi

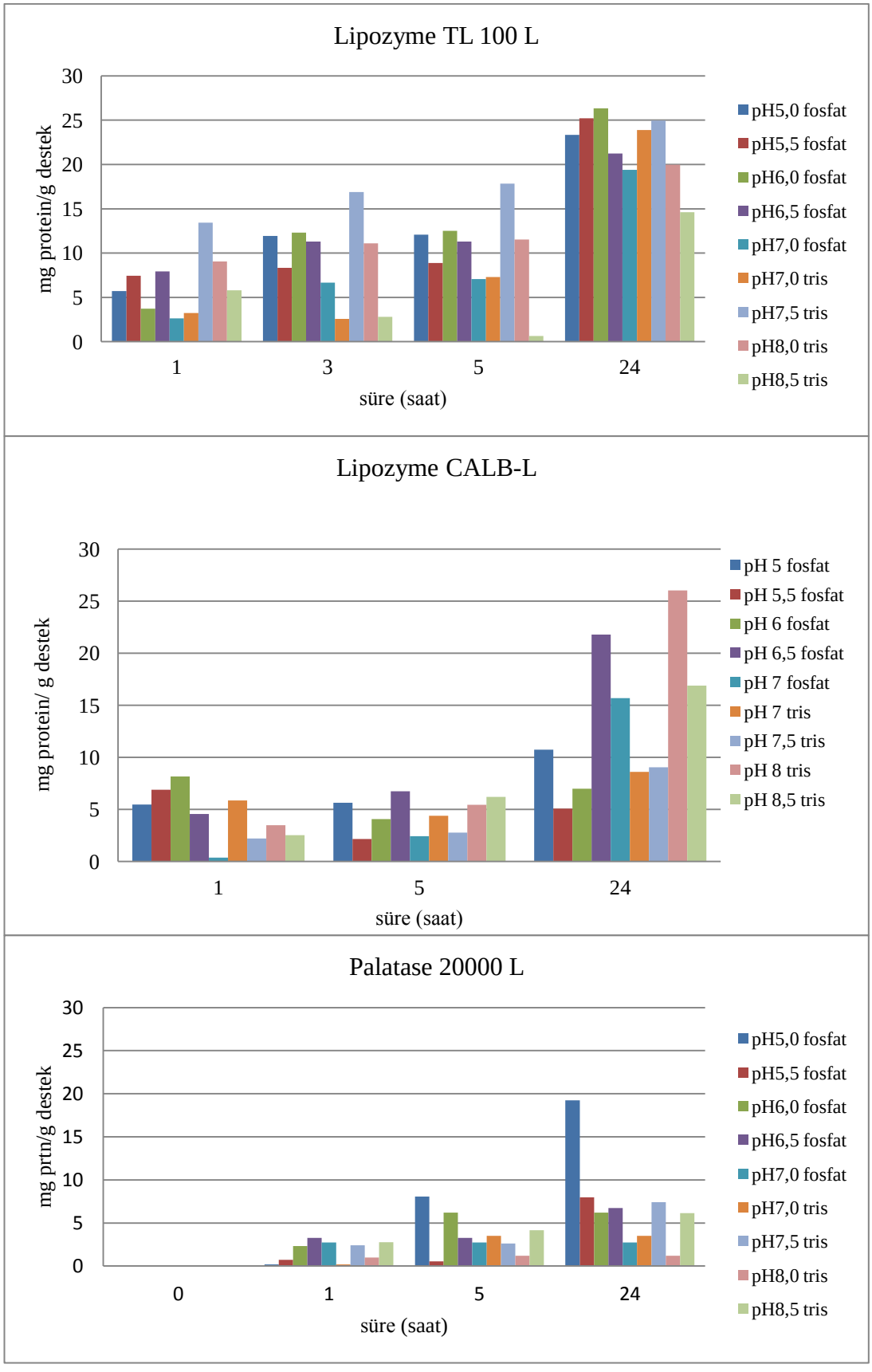
Enzim çözeltisinin derişiminin artması ile desteğe bağlanan enzim miktarında genel olarak bir artış gözlenmiştir. Ancak, tutuklama ortamındaki lipazın tamamı desteğe bağlanamadığı için tampon çözelti ile atılan lipaz miktarı da buna bağlı olarak

yüksek olmaktadır. Lipozyme TL 100 L'nin tutuklanmasında destekteki protein miktarının zamanla değişken olduğu görülmektedir. Bunun nedeni enzimin desteğe uyum sağlamamış olması ile açıklanabilir. Lipozyme CALB L ve Palatase 20000 L lipazlarında destekteki protein miktarının hem derişimin artması hem de tutuklama süresinin uzatılması ile arttığı gözlenmiştir. Celite'e tutuklanan lipaz türleri içinde Lipozyme CALB L'nin 5 saat tutuklama süresi sonunda 32 mg enzim/g destek enzim derişimi ile 3,5 mg protein/g destek değeri ile en iyi sonucu verdiği görülmektedir.

3.1.2. Tampon türü ve pH'ının etkisi

Tampon olarak fosfat tamponu (pH 5,0-7,0) ve Tris-HCl tamponu (pH 7,0-9,0) kullanılmıştır. Her bir enzimin çalışabilmesi için uygun bir pH değerine ihtiyaç vardır. Aynı durum tutuklanma işleminin gerçekleşmesi için de geçerlidir. Bu nedenle literatürde yapılan çalışmalar doğrultusunda uygun pH seçilebilmesi için aynı derişimde farklı tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Desteğe tutuklanan enzim miktarının tutuklama süresi ile değişimine tampon türü ve pH'ının etkisi Şekil 5.2'de verilmiştir. Tutuklanma verimleri ise EK-B'de Şekil B.2 ile verilmiştir.

Lipozyme TL 100 L'nin Celite'e tutuklanmasında, Tris-HCl tamponu ve fosfat tamponu pH'ının artmasıyla 24 saat sonunda desteğe tutuklanan enzim miktarının belli bir değere kadar arttığı daha sonra azaldığı görülmüştür. Tris-HCl tamponu ile pH 7,5 değerinde 25 mg protein/g destek ve tutuklanma verimi %25 iken, fosfat tamponu kullanımında ise pH 6,0 değerinde 26,5 mg protein/g destek ve tutuklanma veriminde %32 değerine ulaşılmıştır. Lipozyme CALB L kullanımında benzer olarak her iki tampon pH'ının artmasıyla tutuklama miktarı önce artmış, belli bir pH değerinden sonra azalmıştır. Tris-HCl pH 8,0 değerinde 26,5 mg protein/g destek ve %58 tutuklanma verimine ulaşılmıştır. Palatase 20000 L kullanımında diğer iki enzime karşın düşük protein miktarı elde edilebilmiştir. Palatase 20000 L kullanıldığında fosfat tamponu pH'ının artmasıyla Celite'e tutuklanan protein miktarı azalmış, pH 5,0 değerinde 19 mg protein/g Celite değeri elde edilmiştir. 24 saat, 37 °C, 17,5 mg/ml derişiminde lipaz çözeltisi ve 200 rpm karışma hızı ile gerçekleştirilen tutuklamada, Lipozyme TL 100 L ve Lipozyme CALB L için en iyi protein miktarlarına sırasıyla pH 6,0 ve pH 8,0 tamponları ile her ikisi için yaklaşık 26,5 mg protein/g destek olarak ulaşılmıştır.



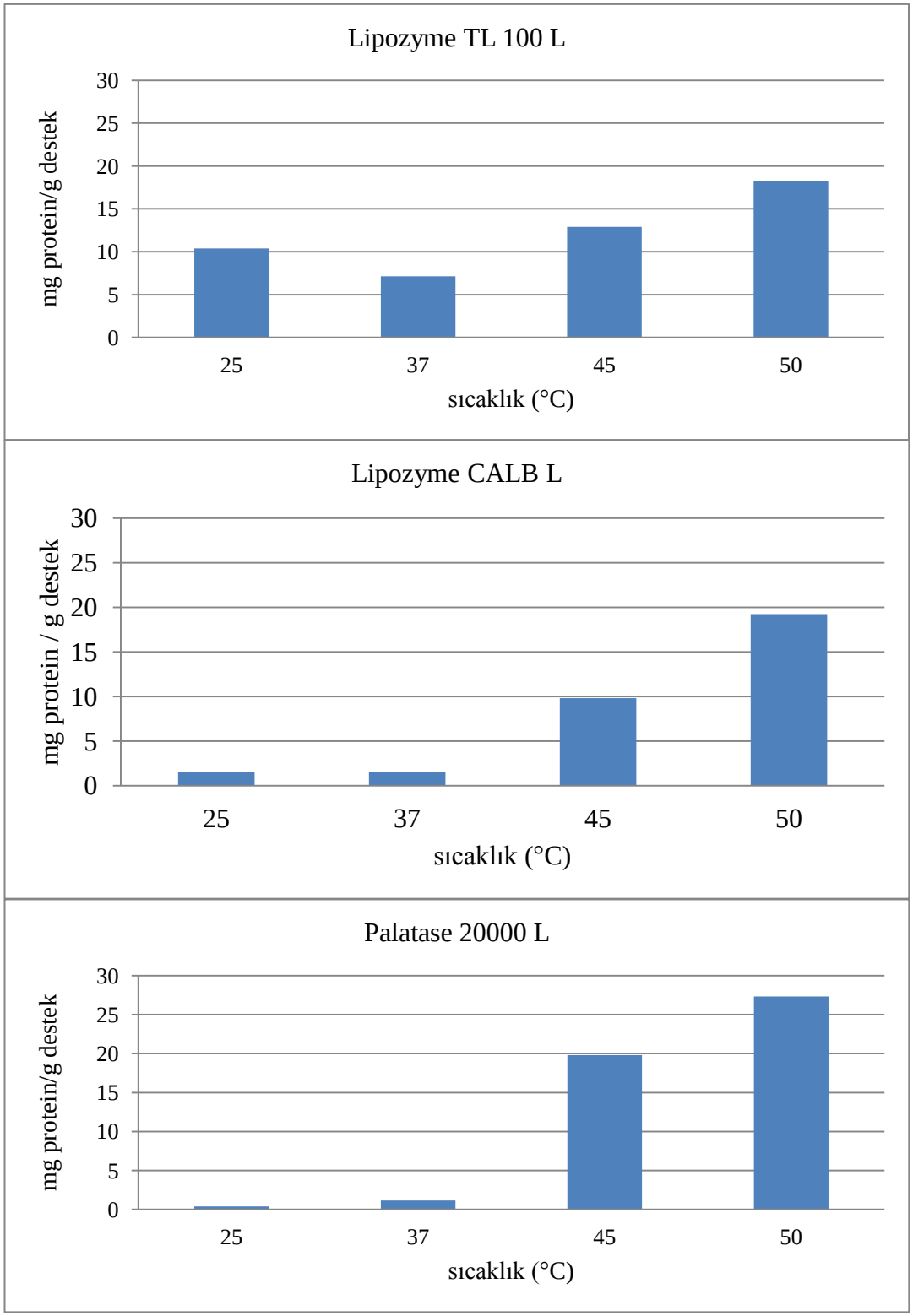
Şekil 3.2. Celite'e lipaz tutuklanmasında tampon türü ve pH'ının tutuklanmaya etkisi

3.1.3. Sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın tutuklama üzerindeki etkisini belirleyebilmek için 25-50 °C aralığındaki sıcaklıklarda 3 saat süre ile 200 rpm ve 17,5 mg/ml derişiminde lipaz çözeltisi kullanılarak tutuklama deneyleri yapılmıştır. Celite'e tutuklanan protein miktarına sıcaklığın etkisi her bir enzim türü için Şekil 3.3'te verilmiştir. Tutuklanma verimleri ise EK-B'de Şekil B.3 ile verilmiştir.

Grafiklerden görüldüğü gibi desteğe bağlanan en yüksek protein miktarına 50 °C tutuklama sıcaklığı ile ulaşılmıştır. Ancak, bilindiği gibi yüksek sıcaklıklar, enzim yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Bu nedenle mümkün olduğunca düşük sıcaklıklarda tutuklama işleminin gerçekleştirilmesi tercih edilse de düşük sıcaklıkların (25 ve 37 °C) yüksek protein miktarları için yeterli olmadığı görülmektedir. Bu noktada tutuklanmış lipazın aktivite tayini önem taşır. Amaç, az miktardaki protein ile mümkün olduğunca yüksek aktivite değeri elde edebilmektir.

Tüm bu tutuklama sonuçları doğrultusunda Celite için en uygun lipaz olarak Lipozyme CALB L seçilmiştir. Düşük enzim derişiminde (11 mg/ml), pH 8,0 Tris-HCl tamponu, 50 °C sıcaklık ile 24 saat süre en uygun tutuklama parametreleri olarak belirlenmiştir.



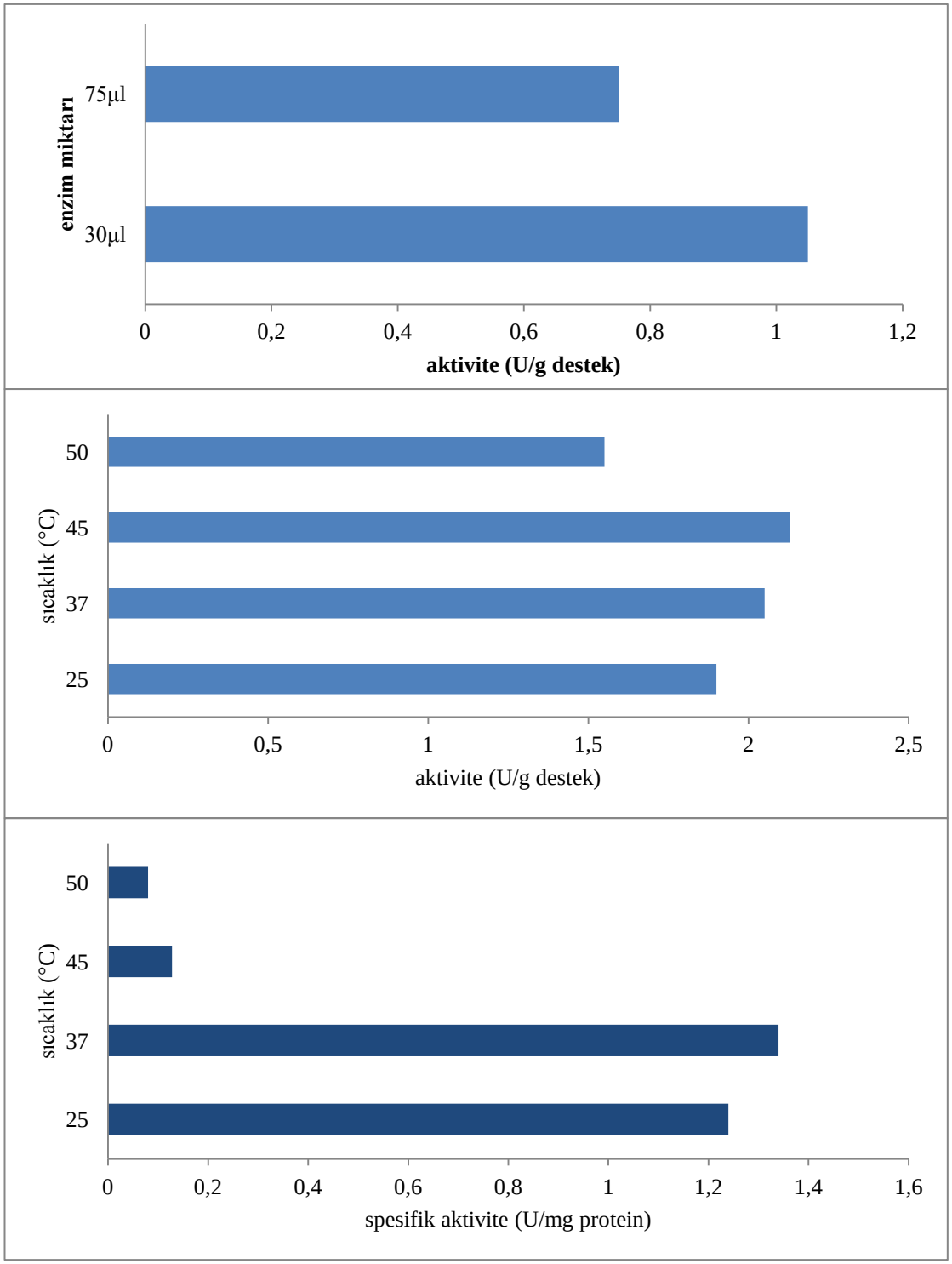
Şekil 3.3. Celite kullanımında tutuklama sıcaklığının protein miktarına etkisi

3.1.4. Celite'e tutuklanmış lipaz için aktivite tayini

En uygun koşullarda Celite'e tutuklanan Lipozyme CALB L lipazı için aktivite tayini yapılarak tutuklanmış lipazın aktivitesi ve spesifik aktivitesi hesaplanmıştır. Enzim derişimi ve tutuklama sıcaklığının aktivite üzerindeki etkisini tanımlayabilmek için, pH 8,0 Tris-HCl tamponunda, 200 rpm çalkalama hızı ile 3 saatlik tutuklanma süresi sabit tutularak deney yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 3.4 ile verilmiştir.

Elde edilen grafiklerde, enzim miktarının artması ile lipaz aktivitesinin düştüğü gözlenmektedir. Enzim çözeltisinin derişimi arttıkça desteğe daha fazla lipaz adsorblanmasına rağmen aktivitenin düşmesi, desteğin aşırı yüklenerek lipaz aktif bölgelerinin kapanması ile açıklanabilir. Substrat ile rahatlıkla yüzey teması gerçekleştiremeyen lipazın, bir reaksiyonu katalizlemesi için gerekli olan anahtar-kilit ilişkisi ile araürün oluşturması zorlaşır ve reaksiyon yavaşlar.

Tutuklama sıcaklığının arttırılması ile aktivitenin arttığı ancak, bu artışın büyük olmadığı görülmektedir. Sıcaklığın arttırılması ile aktivitedeki değişim Şekil 3.4 ile verilmiştir. 25 °C'de lipaz aktivitesi 1,9 U/g destek iken 45 °C'de ise bu değer 2,2 U/g destek değerini almıştır. Buradaki küçük artışın nedeni, sıcaklığın artışı ile desteğe daha fazla enzim tutuklanması ve bu enzimlerin birbirlerini bütünüyle etkilemeleri şeklinde yorumlanabilir. Ancak belirgin bir artış olmadığı için bu şekilde yorumlamak hatalı olabilir. Ancak, artan sıcaklık enzim tutuklanmasını arttırdığı için aynı ağırlıktaki tutuklanmış lipaz daha fazla protein içerir. Bu nedenle lipaz ünitesi aynı kalırken protein değerinin artması spesifik aktiviteyi olumsuz etkiler. Başka bir deyişle, aynı reaksiyonu daha az miktardaki lipaz katalizleyebilmektedir. Sonuçların daha sağlıklı değerlendirilebilmesi açısından deney tasarımı uygulanarak enzim-destek çiftinin etkinliği için parametrelerin kendi aralarındaki ilişkilerinin anlaşılması faydalı olacaktır.



Şekil 3.4. Celite'e tutuklanmış Lipozyme CALB L için aktivite ve spesifik aktiviteye enzim derişimi ve sıcaklığın etkisi

3.2. Çitosana Lipaz Tutuklama

Tutuklama deneylerinin ön çalışmaları sırasında çitosan hazırlanması ve aktivasyonu için verilen yöntem ile benzerlik gösteren başka bir yöntem ile hazırlanmaya

çalışılmıştır. Asit çözeltisinde çözünmüş olan çitosan, baz çözeltisine şırınga kullanılarak ince damlalar halinde püskürtülmüştür. Ancak, oluşan tanecikler düzensiz şekilli olmalarının yanı sıra öngörülenden büyük boyutta oldukları için yöntem kullanılmamıştır.

Çitosan desteğin hazırlanması için aynı şekilde asit çözeltisi içinde jelleştirilen çitosana baz çözeltisi (NaOH) eklenerek çitosanın bulutumsu şekilde çöktürülmüştür. Çitosan tutuklama performansını arttırmak için çitosan çözeltisine glutaraldehit eklenmiştir. Bu şekilde elde edilen çitosan daha küçük tanecikli bir yapıya sahip olmuş ancak, hidrotalsit ve Celite destekler ile karşılaştırıldığında daha iri taneli bir yapı elde edilmiştir. Çitosana lipaz tutuklanması kovalent bağlanma ile gerçekleşir ve bu mekanizma adsorbsiyonla karşılaştırıldığında gerçekleşmesi daha zor olsa da kimyasal bir bağlanma olduğu için daha sağlamdır.

Önceki çalışmalarda hidrotalsit ve bu tez çalışmasında Celite için incelenen tutuklama parametreleri çitosan için de incelenmiştir.

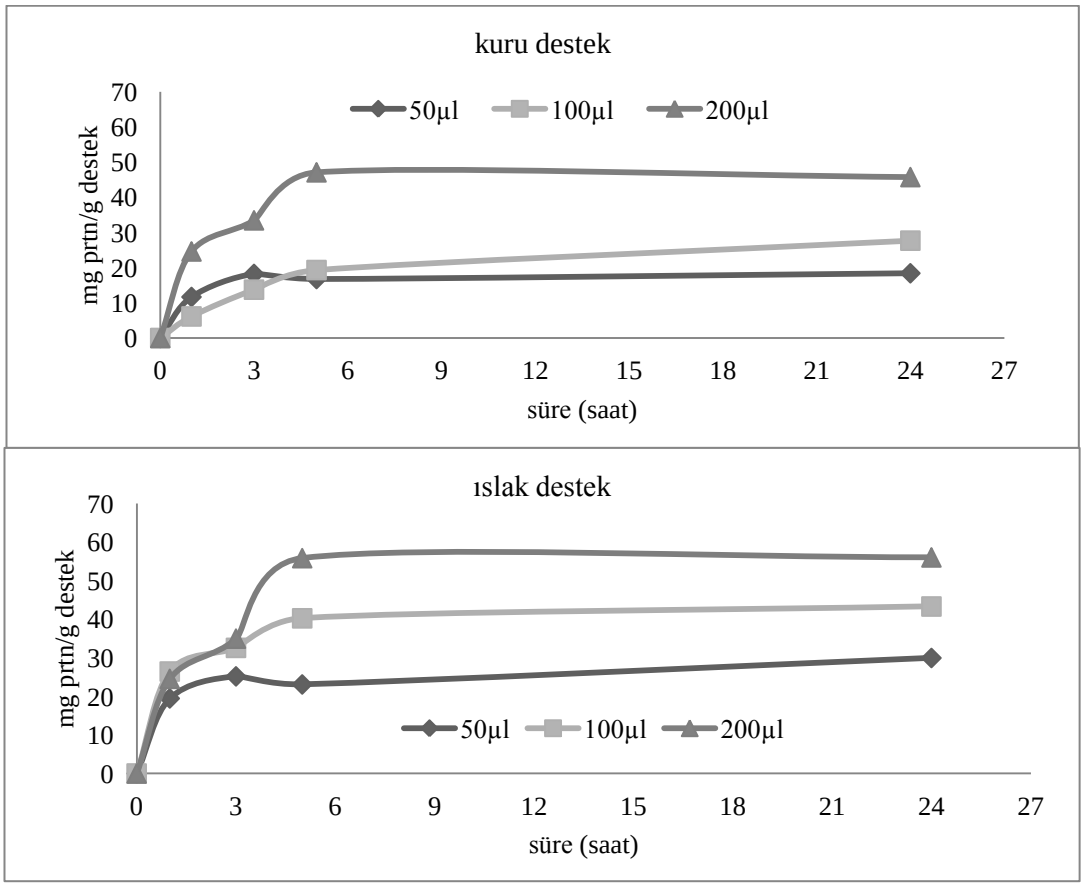
3.2.1. Enzim derişiminin tutuklamaya etkisi

Yapılan araştırmalar sonucunda çitosanın tutuklama için hem süzme işleminden sonra doğrudan, hem de sabit tartıma gelene kadar kurutularak tutuklama destek malzemesi olarak kullanıldığı görülmüştür. Kullanılan lipaz kaynağı ve tutuklama koşulları ile desteğe bağlanan lipaz miktarının değişiklik gösterdiği de bilinmektedir. Islak haldeki çitosana yapılan tutuklama işlemi sonrasında da kurutma işlemi uygulanmakta, katalizör ıslak halde reaksiyon ortamına verilmemektedir. Yapılan deneylerde kullanılan çitosan öncelikle hiçbir işlem görmeden sabit tartıma gelene kadar kurutulmuş ve kuru ağırlığının ıslak ağırlığının 1/30'una eşit olduğu görülmüştür. Ne kadar titizlikle çalışılsa da bu oran, hazırlanan her bir set aktif çitosan destek için farklılık gösterebilir.

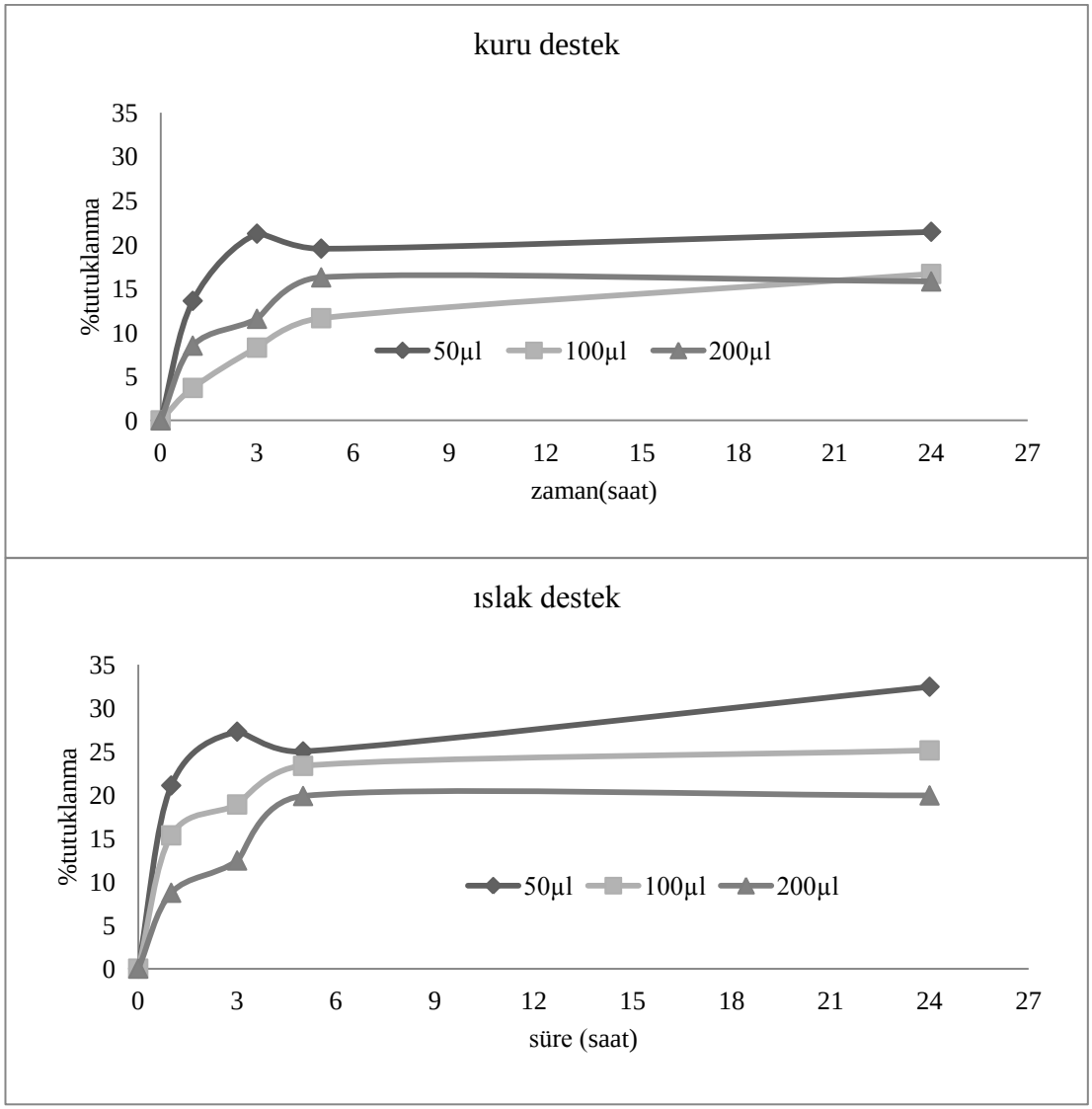
0,01 g destek için sıvı 50 µl, 100 µl ve 200 µl enzim eklenerek, 0,1M Tris-HCl pH 9,0 tampon çözeltisinde farklı derişimlerde (17,5 mg/ml, 35 mg/ml ve 70 mg/ml) lipaz çözeltileri hazırlanmıştır. 37 °C sıcaklık, 200 rpm karışma hızı, 24 saat tutuklama süresince farklı zaman aralıklarında örnekler alınarak deney yapılmıştır. Bütün deneylerde destek tartılırken, kuruduktan sonra ulaşacağı ağırlığı dikkate

alınarak (kuru ağırlıklarının eşit olacağı şekilde tartılarak) tartım yapılmıştır. Tutuklama parametreleri belirlenmeden önce Lipozyme TL 100 L lipazı ile ıslak ve kuru desteğin aynı koşullar altında tutuklama performansları incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 3.5 ile verilmiştir. Bu sonuçlara göre parametrelerin inceleneceği deneylerde kullanılan destek tipi seçilmiştir.

Grafiklerden görüldüğü gibi ıslak desteğe daha fazla protein tutuklanmıştır. Enzim derişiminin artması ile desteğe tutuklanan enzim miktarı da artmış ancak, tutuklama verimi (Şekil 3.6) düştüğü için (17,5 mg enzim/ml tampon enzim derişimi) ortama eklenen 50 µl enzim miktarı 0,3 g ıslak desteğe Lipozyme TL 100 L tutuklama işlemi için en uygun olarak belirlenmiştir. Islak formda çitosan kullanılarak Lipozyme CALB L ve Palatase 20000 L için de aynı tutuklama koşullarında enzim derişiminin etkisi incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 3.7'de verilmiştir. Lipozyme CALB L ve Palatase 20000 L için tutuklanma verimi grafikleri EK-C'de verilmiştir.

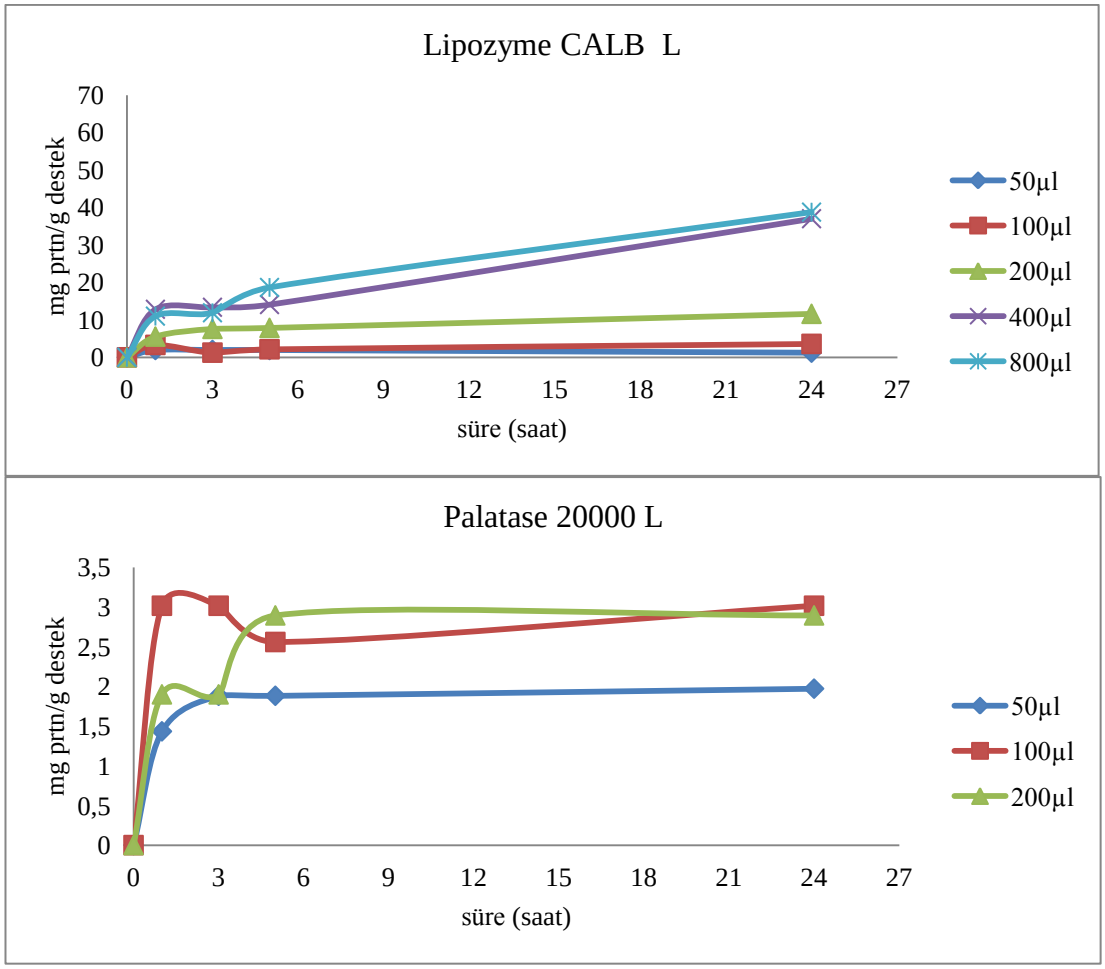


Şekil 3.5. Lipozyme TL 100 L'nin ıslak ve kuru çitosana tutuklanmasında enzim miktarının desteğe yüklenen protein miktarına etkisi



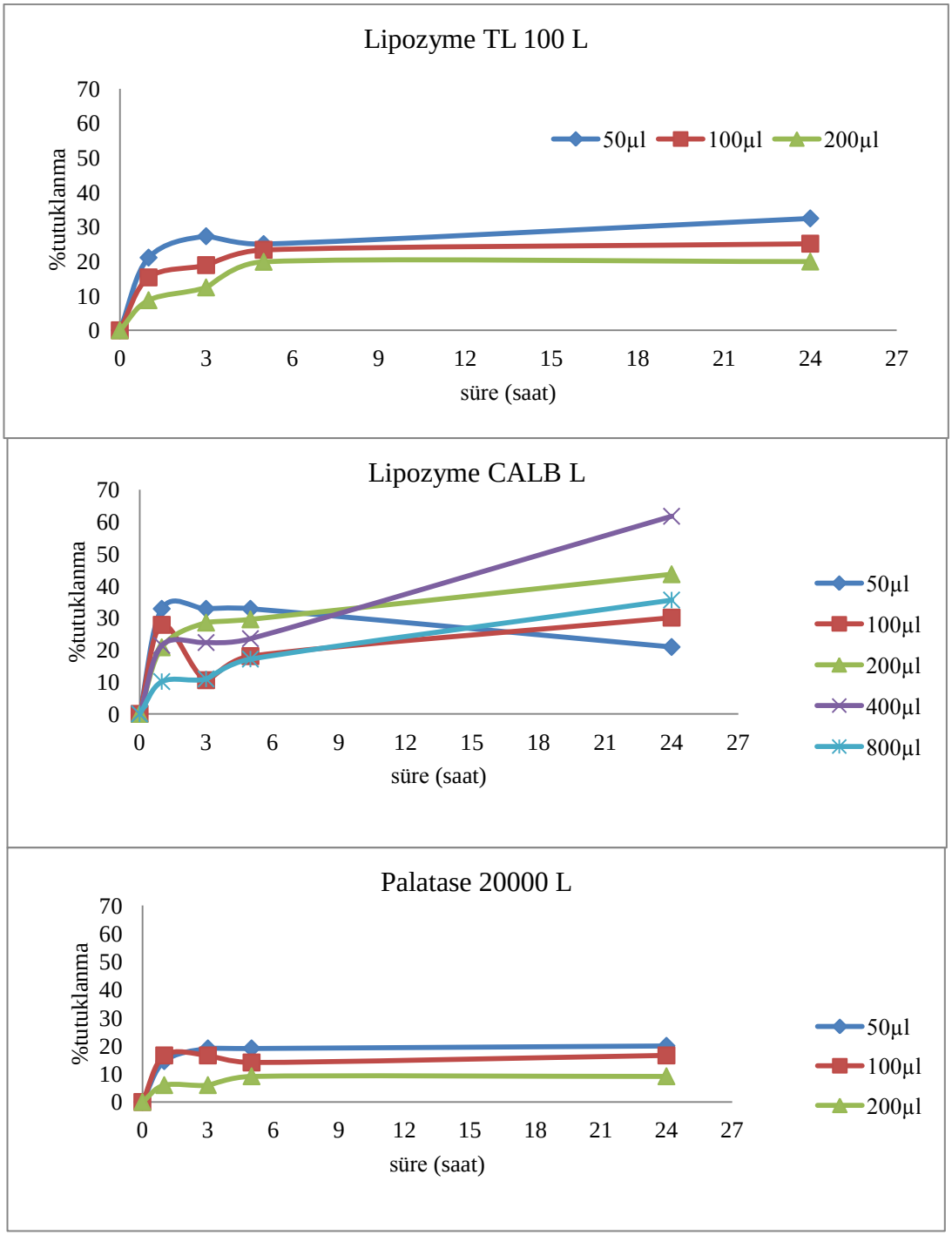
Şekil 3.6. Lipozyme TL 100 L'nin ıslak ve kuru çitosana tutuklanmasında enzim miktarının tutuklanma verimine etkisi

Grafiklerde öncelikle Lipozyme CALB L için yüksek enzim derişimlerinde yüksek protein miktarlarının desteğe tutuklandığı görülmektedir. Ancak, yukarıda da bahsedildiği gibi artan enzim derişimi bir taraftan tutuklanma veriminin (%) düşmesine neden olabilir. Tutuklanma verimleri incelendiğinde 70 mg/ml (400µl/6ml, ρ_{lipaz}=1,05) enzim derişimde yaklaşık %70 değeri ile en yüksek tutuklama verimi elde edilmiş ve en uygun enzim derişimi olarak seçilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Lipozyme CALB L ve Palatase 20000 L lipazlarının ıslak çitosana tutuklanmasında enzim derişiminin protein miktarına etkisi

Şekil 3.7'den görüldüğü gibi Palatase 20000 L için tutuklama miktarı oldukça düşük olup bu koşullarda neredeyse hiç tutuklamanın gerçekleşmediğini söylemek mümkündür. Özellikle önceki çalışmalarda 65-85 mg protein/g destek ve %90-100 tutuklama verimi elde edilen Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100 L lipazı ile ciddi bir fark ortaya çıkmıştır. Enzim derişiminin tutuklanma verimine etkisi ise Şekil 3.8'de verilmiştir. Lipozyme TL 100 L ve Platase 20000 L için enzim miktarının artmasıyla tutuklama verimi düşmüş, Lipozyme CALB L kullanımında ise verim önce artmış, belli bir enzim derişiminden (400 µl, 70 mg/ml) sonra azalmıştır. Sonuç olarak ıslak formda çitosana tutuklamada her bir lipaz için en uygun enzim derişimi değerleri, Lipozyme TL 100 L için 17,5 mg/ml (50 µl), Lipozyme CALB L için 70 mg/ml (400 µl), Palatase 20000 L için 8,75 mg/ml (25 µl) olarak belirlenmiştir. Tutuklama verimleri ise sırasıyla %33, %62 ve %20 olmuştur.



Şekil 3.8. Farklı lipazların ıslak çitosana tutuklanmasında enzim derişiminin tutuklanma verimine etkisi

3.2.2. Tampon pH'ının etkisi

Çitosana tutuklamada pH etkisini incelemek için yapılan literatür araştırması sonucunda pH 6,0-9,0 arasındaki Tris-HCl tamponları kullanılarak her bir lipaz için en uygun pH değeri belirlenmiştir. 24 saat, 200 rpm, 37 °C tutuklama sıcaklığında

tutuklama gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta ortama konulacak lipaz miktarı daha öncesinde enzim derişimini belirleyen deneysel sonuçlar doğrultusunda seçilmiştir. Her bir enzim için çitosana tutuklanan protein miktarına pH'ın etkisi Tablo 3.1'de tutuklama verimleri ise Tablo 3.2'de verilmiştir. Lipozyme TL 100 L kullanımında tutuklama, tampon pH'ının artmasıyla hem desteğe tutuklanan protein miktarı hem de tutuklama verimi azalmıştır. Lipozyme TL 100 L için desteğe yüklenen enzim miktarı (60 mg protein/g destek) ve tutuklanma verimi (%78) göz önünde bulundurularak en uygun pH7.0 olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Çitosana lipaz tutuklanmasında pH'ın desteğe yüklenen enzim miktarına etkisi

		mg protein/g destek					
pH		**6,0**	**7,0**	**7,5**	**8,0**	**8,5**	**9,0**
Enzim türü	**Lipozyme TL 100 L**	-	60	33	11	10	6
	Lipozyme CALB L	21	34	34	42	70	63
	Palatase 20000 L	12	15	9	7	5	3

Tablo 3.2. Çitosana lipaz tutuklanmasında pH'ın tutuklanma verimine etkisi

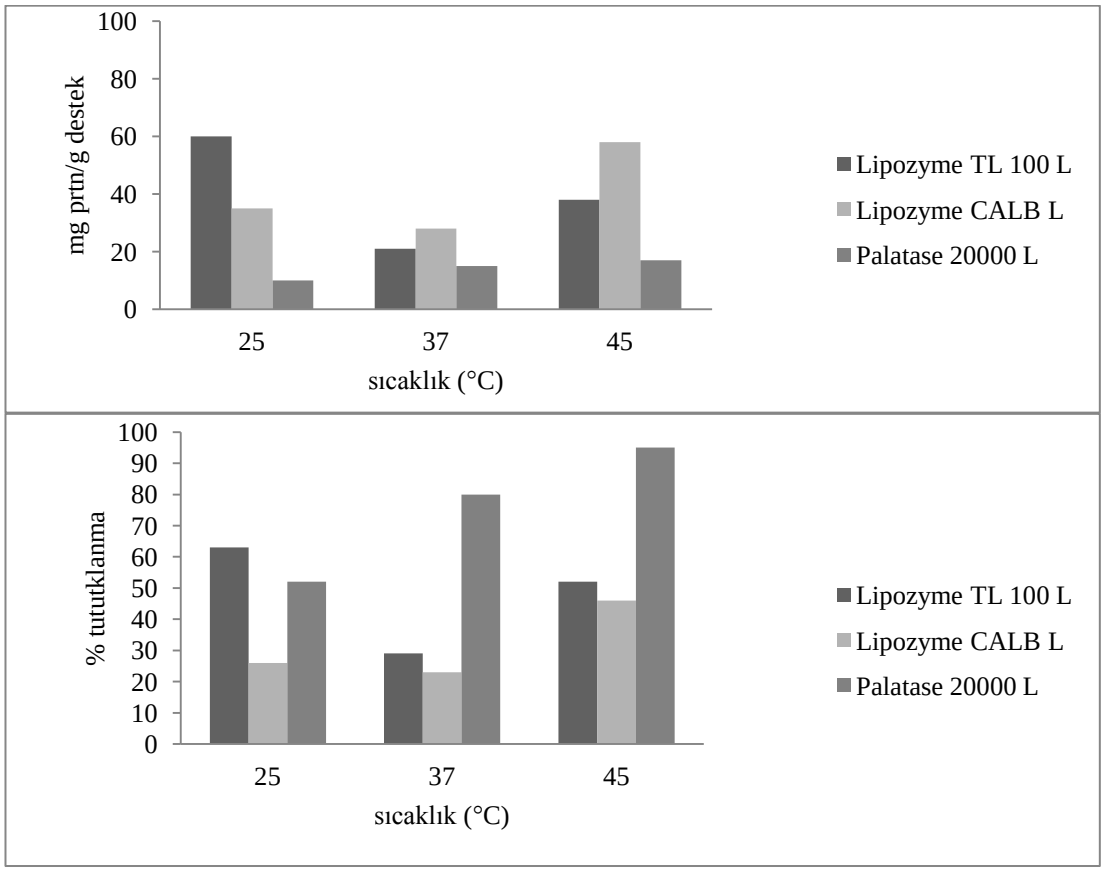
		% tutuklanma					
pH		**6,0**	**7,0**	**7,5**	**8,0**	**8,5**	**9,0**
Enzim türü	**Lipozyme TL 100 L**	-	78	44	14	12	15
	Lipozyme CALB L	20	28	26	33	57	52
	Palatase 20000 L	67	80	51	40	34	17

Lipozyme CALB L'de ise tampon pH'ının 6,0'dan 8,5 değerine arttırılmasıyla tutuklanan protein miktarı ve tutuklama verimi artarak en yüksek değerlerine (70mg protein/g destek, %57) ulaşmış, pH 9,0 değerinde ise bu değerlerde düşme gözlenmiştir. Palatase 20000 L kullanımında pH 7,0 değerinde en yüksek tutuklama değerleri (15 mg protein/g destek, %80 verim) elde edilmiş, daha yüksek pH değerlerinde tutuklama performansında düşüş gözlenmiştir. EK-C, Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'deki sonuçlar doğrultusunda destekteki protein miktarının en yüksek olduğu Lipozyme CALB L'nin pH 8,5'te tutuklandığı deneydir. Ancak buradaki tutuklanma verimi yalnızca %57'de kalmıştır. Yani tutuklamada kullanılan lipazın sadece yarısı desteğe bağlanabilmektedir. Bu sebeple verimin en yüksek olduğu Palatase 20000 L'nin pH 7,0'de çitosana tutuklandığı enzim/destek çifti daha ön

plana çıkmaktadır. Enzim derişiminin belirlendiği bir önceki bölümde tampon pH 9,0 değerinin Palatase 20000 L için uygun olmadığı görülmüş ve bu sonuçlarla pH değeri yükseldikçe çitosana tutuklanmayı engellediği belirlenmiştir.

3.2.3. Sıcaklığın etkisi

Her bir lipaz için pH deneylerinde olduğu gibi sıcaklık deneyleri de yapılırken başlangıçta belirlenen enzim destek oranları ve pH değerleri kullanılarak yalnızca sıcaklık değiştirilmiştir. Buna göre sonuçlar Şekil 3.9'da desteğe yüklenen enzim miktarı ve tutuklanma verimi cinsinden verilmektedir.



Şekil 3.9. Çitosana lipaz tutuklanmasında sıcaklığın etkisi (İnkübasyon: 200 rpm, 24 saat)

Sıcaklık artışı Palatase 20000 L lipazının tutuklanmasını belirgin bir şekilde olumlu yönde etkilerken Lipozyme TL 100 L ve Lipozyme CALB L için değişkenlik göstermektedir. Lipozyme TL 100 L ve Lipozyme CALB L kullanımında tutuklanan enzim miktarı ve tutuklama verimi, sıcaklığın 25 °C'den 37 °C'ye arttırılmasıyla biraz düşmüş, 45 °C'de ise değerlerde bir yükseliş gözlenmiştir. Palatase 20000 L

kullanıldığında ise sıcaklıkla tutuklama performansı artmıştır. Buna neden olarak her enzim için uygun bir sıcaklık olduğu söylenebilir. Tutuklama parametreleri, her bir lipaz türü için farklılık göstereceği gibi aynı lipazın farklı desteklere tutuklanmasındaki davranışlarını da etkilerler. Literatür araştırmaları bu yorumu destekleyici niteliktedir. En yüksek tutuklanma verimine Palatase 20000 L lipazı ile 45 °C'deki tutuklama deneyinde ulaşılmıştır. Lipozyme TL 100 L için 25 °C'de en yüksek değerler (60 mg protein/g destek, %62 verim) elde edilmiştir. Lipozyme CALB L (%45 verim) ve Palatase 20000 L (%90 verim) için 45 °C en uygun olmuştur.

Bu çalışmada parametre seçiminde tutuklanma verimini ön planda tutarak karar verilmiştir. Ancak, desteğe yüklenen enzim miktarının yüksek olması daha öncelikli ise bu parametreler farklılıklar gösterecektir.

3.2.4. Çitosan'a tutuklanmış lipaz için aktivite tayini

Çitosan desteğe belirlenen en uygun koşullarda Lipozyme TL 100 L (17,5 mg/ml, 25 °C, pH 7,0), Lipozyme CALB L (70 mg/ml, 45 °C, pH 8,5), Palatase 20000 L (8,75 mg/ml, 45 °C, pH 7,0) lipazları 24 saat süre ile tutuklanmış, edilen tutuklanmış lipaz sabit tartıma kadar oda sıcaklığında desikatörde kurutulmuştur. Kuruyan ve reaksiyon ortamına katılmaya hazır tutuklanmış lipaz aktivite ve spesifik aktiviteleri yöntemde belirtildiği şeklide tayin edilmiştir. Tablo 3.3'te bu değerler verilmiştir.

Tablo 3.3. Çitosana tutuklanmış lipazların aktivite ve spesifik aktiviteleri

Enzim	Aktivite (U/g destek)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
Lipozyme TL 100 L	12,3	0,30
Lipozyme CALB L	11,7	0,20
Palatase 20000L	12,7	0,76

Özellikle aktivite değerleri incelendiğinde farklı protein miktarlarına rağmen p-NPP hidrolizi aktivitelerinin birbirlerine oldukça yakın olduğu dikkati çekmektedir. Bu noktada karar vermeyi sağlayan parametre spesifik aktivite olarak düşünülebilir. En düşük protein miktarı ile en yüksek ünite (U) elde edilebilen Palatase 20000 L lipazı çitosan desteğe belirlenen koşullarda tutuklanarak kullanabilecek lipaz olarak belirlenmiştir.

3.3. Oleyik Asidin Esterleşme Reaksiyonu için Bulgular

Araştırma grubunun önceki çalışmalarında, kanola yağının metanol ile alkolizi sonucunda biyodizel üretimi için ÜHT-TL 100 L (Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100 L) katalizörünün en yüksek katalitik aktiviteyi göstermesi nedeniyle biyoyağlama yağı üretiminde de aynı tutuklanmış lipaz ile devam edilmiştir.

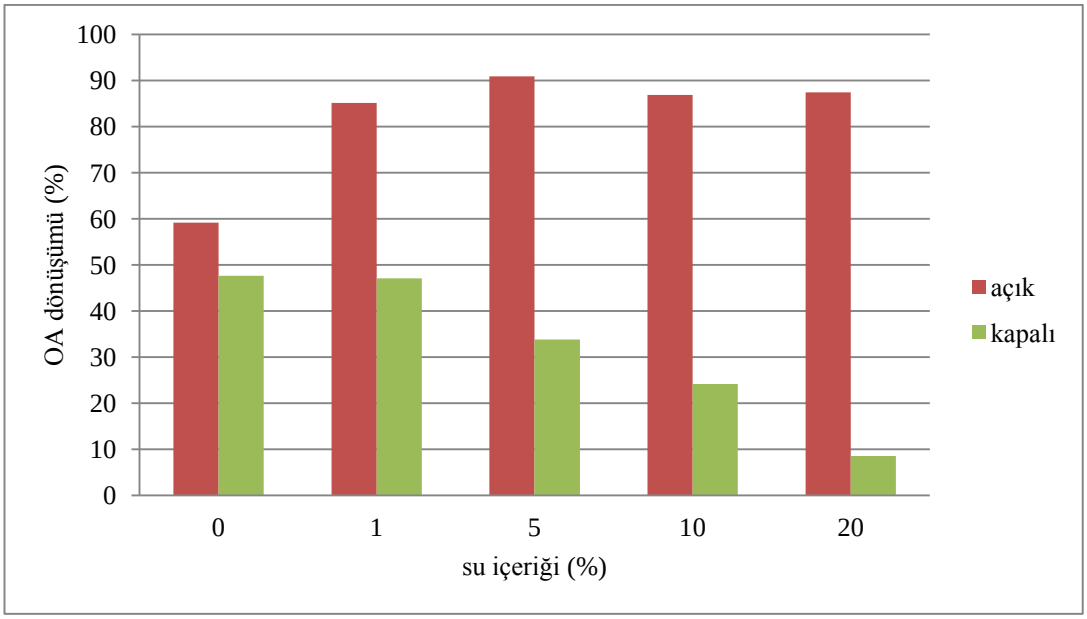
Oleyik asidin TMP ile esterleşme reaksiyonu ile biyoyağlayıcı üretimine, ortamın su içeriği, oleyik asit/TMP mol oranı, sıcaklık, enzim miktarı, süre, karıştırma hızı ve ortamdan suyun uzaklaştırılmasının etkileri incelenmiştir.

Ayrıca esterleşme reaksiyonunda TMP yerine yağ alkolleri (oleyil alkol, palmitil alkol, stearil alkol) kullanılarak tutuklanmış lipazın performansı ticari tutuklanmış lipazlarla karşılaştırılmıştır.

Son olarak, hidrotalsite tutuklanmış lipaz ileserbest lipaz ve ticari tutuklanmış lipazlar ile biyoyağlayıcı üretimleri karşılaştırılmıştır.

3.3.1. Ortamdan suyun uzaklaştırılması ve başlangıç su içeriğinin etkisi

Yapılan deneysel çalışma sonucunda aşağıda verilen bulgulara ulaşılmıştır. Deneysel çalışmanın ilk adımı reaksiyonun gerçekleştiği kabın ağzı açık ya da kapalı olmasının dönüşüme olan etkisinin incelenmesidir. Bu amaçla asit/TMP mol oranı 3/1, sıcaklık 40 °C, 320 rpm karıştırma hızı, %5 enzim miktarı ve 24 saatlik reaksiyon süresi koşullarında ortama başlangıçta eklenen su miktarı %0, %1, %5, %10 ve %20 oranlarında olduğu reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Ağzı açık ve kapalı olarak yapılan deneylerde, ortama eklenen su miktarının, oleyik asit dönüşümüne etkisi Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.10. Reaksiyon kabının atmosfere açık ve kapalı olmasının oleik asit dönüşümüne etkisi

Görüldüğü gibi reaksiyonun ağzı açık erlenlerde gerçekleştirilmesinin dönüşüm üzerindeki etkisi oldukça yüksektir. Kapalı olan erlenlerde dönüşümün başlangıçtaki su içeriğinin artması ile azaldığı ve 24 saat sonunda susuz ortamda %47 değerinden %20 su içeren ortamda %8 değerine düştüğü görülmektedir. Bunun nedeni reaksiyondaki ikinci ürün olan suyun zaten başlangıçta ortama eklenmiş olmasından kaynaklanır. Bu esterleşme reaksiyonu tersinir bir reaksiyon olduğu için yan ürün olan su reaksiyon ortamından uzaklaştırıldıkça ileri yöndeki reaksiyon hızlanacak ve dolayısıyla oluşan ester miktarı artacaktır. Burada ise, oluşan su reaksiyon kabını buharlaşma yoluyla terk edemez iken hali hazırda reaksiyon ortamı da bir miktar su içermektedir ve denge dönüşümüne ulaşılmıştır. Bu nedenle kapalı erlende başlangıçta hiç su içermeyen deney setindeki dönüşüm (%47) 24 saat sonunda diğer su içeren deney setlerine göre daha yüksek değerde olmuş ancak, yeterli verime ulaşılamamıştır.

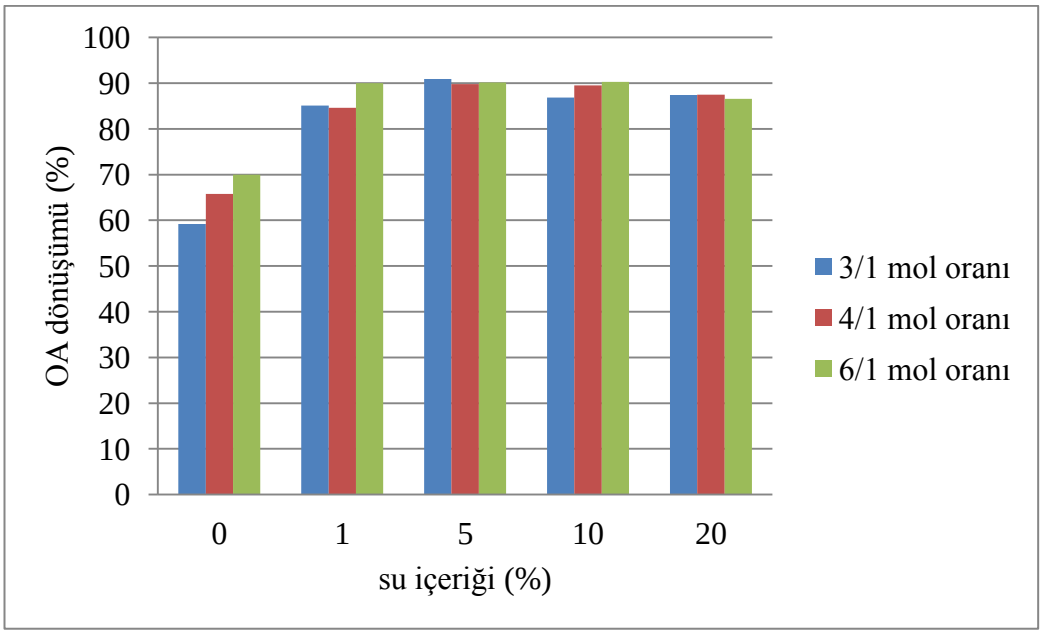
Ağzı açık erlenlerde ise ortama eklenen su miktarının artmasıyla dönüşüm artmış, %5'in üzerinde fazla etki göstermemiştir. Dönüşüm susuz ortamda %60 civarında ve diğer su içeriklerinde %80'in üzerinde gerçekleşmiştir. Bunun nedeni oluşan suyun fazlasının buharlaşarak reaksiyon kabında birikmemesi ve ileri yöndeki reaksiyonu hızlandırmasıdır.

Ayrıca ortama başlangıçta bir miktar su eklenmesinin enzimin katalitik aktivitesini olumlu yönde etkilediği açıktır (Bondioli, 2003; Bondioli, 2004; Linko, 1998). Çünkü enzim yağ/su ara yüzeyinde katalitik aktivite göstermektedir. Bu nedenle oleyik asidin TMP ile esterleşme reaksiyonu için ÜHT-TL100L tutuklu lipazı başlangıçta bir miktar suya ihtiyaç duymaktadır.

3.3.2. Asit/TMP mol etkisi

Deneysel çalışmanın ikinci kısmında ağzı açık erlenlerde, farklı asit/TMP molar oranının farklı su içeriklerinde dönüşüm üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bunun için 3/1, 4/1 ve 6/1 asit/TMP mol oranlarında ve her bir oran için farklı su içeriklerine (substrata göre ağırlıkça %0-20) sahip deney setleri hazırlanmıştır. Sıcaklığın 40 °C olduğu deneylerde, karıştırma hızı 320 rpm, %5 enzim miktarı ve reaksiyon süresi 24 saattir. Asit/TMP mol oranının ve farklı başlangıç su içeriklerinin oleyik asit dönüşümüne etkisi Şekil 3.11'de verilmiştir.

Susuz hazırlanan deney setinde her bir mol oranı için düşük dönüşüm değerine ulaşılmıştır. Molar orandaki artış ile dönüşüm (3/1, 4/1 ve 6/1 mol oranları için sırasıyla %58, %66 ve %70) artmış olsa da istenen verim elde edilememiştir. Ayrıca molar oran arttıkça ortamda dönüşmeyen oleyik asit kalmıştır. Bu durum dönüşmeden kalan asit için ayırma işlemi uygulamayı gerektirir.



Şekil 3.11. Farklı su içeriklerinde asit/TMP oleyik asit dönüşümüne etkisi

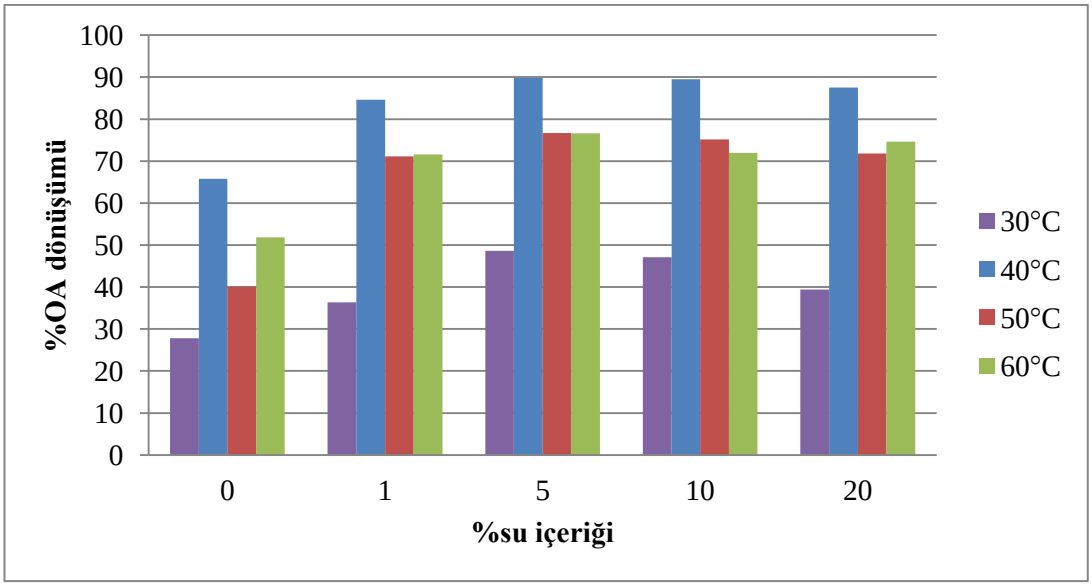
Ortama başlangıçta eklenen su miktarının %1 olması ile dönüşüm belirgin biçimde artmış (3/1 mol oranında %85 dönüşüm), %5 su içeriği ile dönüşüm en yüksek değeri olan %91 değerine ulaşmıştır. Su miktarında bu değerin üzerinde yapılan artışın dönüşüm üzerinde belirgin bir etkisi gözlenmemekle birlikte sabit kaldığı söylenebilir. Sabit kalmasının nedeni olarak ise fazla suyun reaksiyon ortamından buharlaşarak uzaklaşması düşünülmektedir. Başlangıçta ortama eklenen su içeriğinin değişmesiyle her bir mol oranı için benzer etki elde edilmiştir.

Asit/TMP oranındaki artış susuz ve %1 su içeren deney setleri haricinde dönüşümde bir farklılık oluşturmamış, her bir mol oranında estere dönüşen % oleik asit miktarı sabit kalmıştır. Buradan yola çıkarak en uygun asit/alkol mol oranının 3/1 olarak kabul edilebileceği görülmektedir. Çünkü molar orandaki her birim artış, reaksiyon sonunda ortamda dönüşmeden kalan asit miktarında da artışa neden olacaktır. Bunun sonucunda hem daha yüksek hacimlerde çalışılması gerekmektedir hem de hammadde sarfiyatı daha fazla olacaktır. Stokiyometrik oranın istenen dönüşüm için yeterli olduğu görülmektedir. Benzer bir çalışmada, Akerman ve diğ., %2 lipaz, 60 °C sıcaklık 3/1 asit/TMP mol oranı ile 24 saat sonunda %62 toplam oleyik asit dönüşümü elde etmişlerdir. Enzim miktarını %5 olması durumunda ise aynı koşullarda toplam oleyik asit dönüşümü %82 olmuştur.

3.3.3. Reaksiyon sıcaklığının etkisi

Reaksiyon sıcaklığı enzimin katalitik aktivitesi için oldukça önemli bir parametredir. Çünkü her bir çeşit lipazın kendine özgü çalıştığı uygun bir sıcaklık aralığı vardır. Bunun yanında sıcaklık, yalnızca kullanılan lipaza özgü değil, aynı zamanda bu lipazın katalizlediği reaksiyona da bağlıdır. Reaksiyondaki substrat türü ve derişimleri ile reaksiyon karışımının su içeriği de reaksiyon sıcaklığına karar verirken dikkate alınmalıdır (Yunus, 2002; Akerman, 2011).

Deneysel çalışmanın bu kısmında sıcaklığın haricindeki tüm parametreler sabit tutularak sıcaklığın oleik asit dönüşümüne etkisi incelenmiştir. Bu nedenle farklı su içeriklerine sahip ağzı açık deney setleriyle 30-60 °C sıcaklık, 4/1 asit/TMP molar oranında, 320 rpm çalkalama hızı, %5 enzim miktarı, 24 saat süreyle esterleşme yapılmıştır. Farklı su içeriklerinde reaksiyon sıcaklığının oleyik asit dönüşümüne etkisi Şekil 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3.12. Reaksiyon sıcaklığının farklı su içeriklerinde oleik asit dönüşümüne etkisi

Grafikten de açıkça görüldüğü gibi sıcaklığın artmasıyla dönüşüm önce artmış sonra azalmış; 40 °C'deki oleik asit dönüşümü diğer sıcaklıklara göre önemli ölçüde yüksek olmuştur. 30 °C'nin ÜHT-TL100L'nin katalitik aktivitesinin tamamını gösterebilmesi için yeterli olmadığı açıktır. 50 °C ve 60 °C sıcaklıklarına çıkıldığında ise dönüşümde bir düşüş yaşanmıştır.

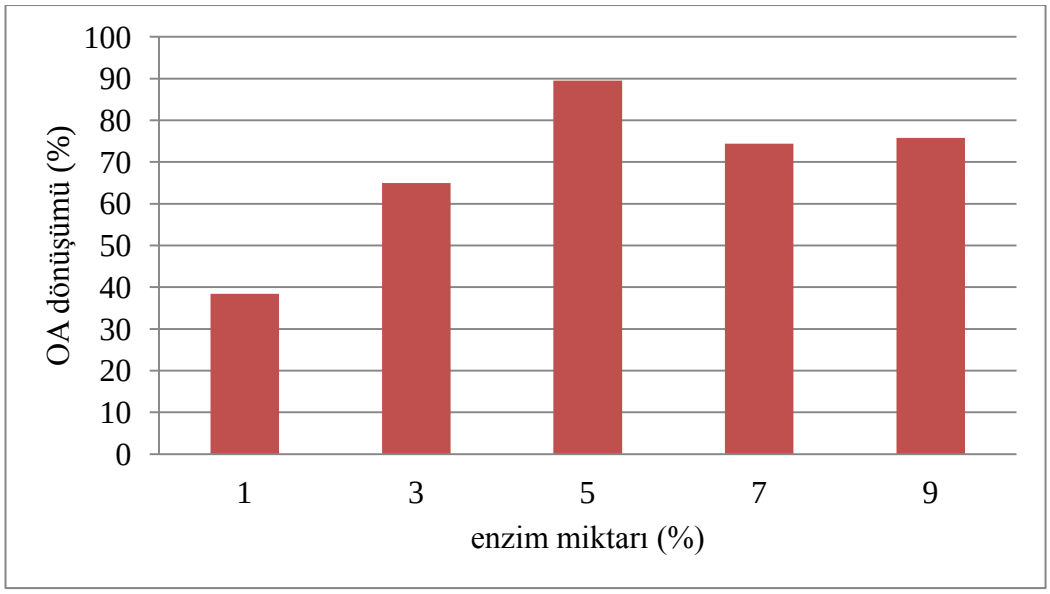
Katalitik aktivite için en uygun olan nem miktarını elde edemeyen lipazın aktivitesinde bir düşüş yaşanmıştır. Bunun nedeni, *Thermomyces lanuginosa* lipazının 40-45 °C sıcaklıklarından sonra aktivitesinin düşmeye başlamasıdır (denatürasyon). Akerman ve diğ., (2011), oleyik asitin TMP ile esterleşme reaksiyonu üzerine yaptıkları çalışmada Novozyme 435 ile 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yüksek dönüşüm (%96-99) değerlerine ulaşmışlardır.

Yine Tao ve arkadaşlarının (2012) TMP ile kaprilik asit arasındaki esterleşme reaksiyonu *Candida sp. 99–125* tutuklu lipazı ile incelenmiş ve 40 °C reaksiyon sıcaklığı en uygun olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu sıcaklıkta yapılan deneylerde erlenlere başlangıçta eklenen su miktarının 70 saat'lik reaksiyon süresi boyunca sabit kaldığı belirtilmiştir.

3.3.4. Enzim miktarının etkisi

Yapılan araştırmalar sonucunda reaksiyonda kullanılan enzim miktarının ortamdaki substrat kütlesi ile paralel biçimde değiştirilmesi gerektiği bilinmektedir. Çünkü substrat ile anahtar-kilit ilişkisi yakalayarak esterleşmeyi gerçekleştiren lipazın en uygun sürede mümkün olduğunca çok yağ asidi molekülünü esterleştirmesi gerekmektedir. Ortama fazla miktarda eklenen lipaz, enzim mailyetine ek olarak, reaksiyondaki karıştırma maliyetini arttırmasının yanı sıra reaksiyon karışımını tutuklanmış lipazdan ayırma işlemlerinin de maliyetini arttıracaktır. Zaten kimyasal katalizörlerin yanında halen pahalı bir katalizör olan enzim katalizörlerinin mümkün olduğunca az miktarda ve tutuklanmış halde kullanılması maliyeti önemli ölçüde etkileyecektir. Ancak bu noktada reaksiyon süresinin uzamamasına dikkat edilmelidir. Lipazın yeterli derişimde kullanılmaması, reaksiyon süresinin 2-3 kat artmasına yani dönüşümün yavaş gerçekleşmesine neden olacaktır.

Bu doğrultuda deneysel çalışmanın bir bölümünde enzim derişiminin dönüşümdeki etkisi incelenmiştir. Bunun için diğer tüm koşullar sabit tutularak enzim miktarı substrat ağırlığının %1, %3, %5, %7 ve %9'u olacak şekilde değiştirilmiştir. 40 °C sıcaklık, 320 rpm çalkalanma hızı, 4/1 asit/TMP mol oranı, %10 su miktarı ile 24 saat süren deneyler yapılmıştır. Reaksiyonda kullanılan enzim miktarının oleik asit dönüşümüne etkisi Şekil 3.13 ile verilmiştir.



Şekil 3.13. Reaksiyonda kullanılan enzim miktarının oleik asit dönüşümüne etkisi

Enzim miktarının artmasıyla oleyik asit dönüşümü önce artmış, %5'in üzerinde enzim kullanıldığında ise dönüşüm düşmüştür. Enzim miktarındaki artışın karışma problemlerine neden olduğu ve dolayısıyla kütle aktarımında bir engel oluşturduğu tahmin edilmektedir. Yağ/su ara yüzeyinde esterleşme reaksiyonunu gerçekleştiren lipazlar için kütle aktarımı bu yönden oldukça önemli bir parametredir.

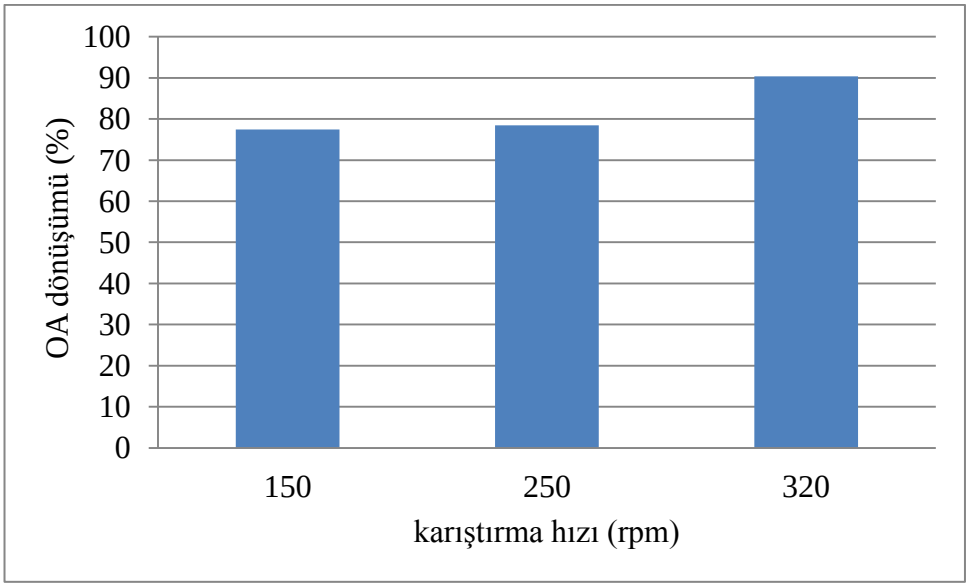
Literatürde kullanılan lipaz miktarının %20-40 olduğu çalışmalar ağırlıktadır ancak, bu çalışmalarda genellikle girdi olarak yağ asitleri değil yağ asitlerinin metil esterleri kullanılmıştır. Akerman (2011), oleik asit ile TMP arasındaki esterleşme reaksiyonu üzerine yaptığı çalışmada enzim miktarını optimize etmek için %0,5-7,5 aralığındaki oranlarda lipaz ile esterleşme reaksiyonunu gerçekleştirmiştir. Düşük enzim miktarlarında daha yüksek başlangıç reaksiyon hızına ve enzim verimliliğine ulaşıldığını belirtmiştir. Lämsä (1995) yaptığı bir çalışmasında kolza yağından 2-etil-1-hekzil esterlerini elde etmiş ve yine substrat ağırlığının %3,4'ü kadar *Candida rugosa* lipazı kullanılmasının yeterli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

3.3.5. Karıştırma hızının etkisi

Enzim miktarının etkisinin incelenmesinde reaksiyon kabında etkin bir karışma sağlanmasının gerekli olduğu belirtilmişti. Etkin karışma sayesinde kap içerisindeki kütle aktarım kısıtlamalarının önüne geçilerek yağ/su ara yüzeyinde gerçekleşen esterleşme için uygun koşullar sağlanmış olur.

Düşük karıştırma hızlarında tutuklanmış lipazın sıvı faz içinde homojen dağılamaması ya da yüksek hızlarda tutuklu lipazın kap çeperlerinin yukarısına doğru yönlenerek sıvı fazdan ayrılması ve yapışması da birer karışma problemidir.

En uygun karıştırma hızı ile mümkün olduğunca düşük hızda ancak etkin bir karışmanın gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu amaçla deneysel çalışmanın bu bölümünde 150, 250 ve 320 rpm olarak belirlenen üç farklı karıştırma hızında çalışılmış ve her biri 24 saat süren deneyler yapılmıştır. Diğer reaksiyon parametreleri, 40 °C sıcaklık, 4/1 molar oran, %10 başlangıç su içeriği olarak sabit tutulmuştur ve ağzı açık erlenler kullanılmıştır. Farklı karıştırma hızlarının oleik asit dönüşümüne etkisi Şekil 3.14'te verilmiştir.

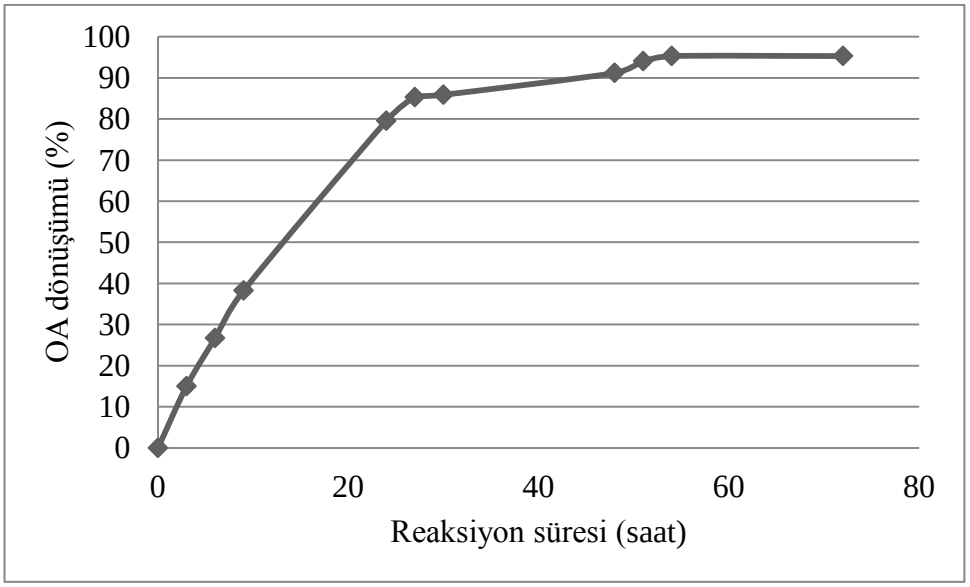


Şekil 3.14. Farklı karıştırma hızlarının oleik asit dönüşümüne etkisi

Elde edilen bu sonuçlara göre fazarası kütle aktarım kısıtlamalarını yenebilmek için 150 ve 250 rpm karıştırma hızları yetersiz kalmaktadır. 320 rpm ile bu engelin aşıldığı görülmektedir. Daha detaylı bir sistem kurulması amaçlandığında ve maliyet hesabı yapılırken ara değerlerdeki hızlar da dikkate alınmalı ve eşik değer belirlenmelidir. Bu sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalar ile de uyumludur. Akerman ve diğ., (2011), manyetik karıştırma ile 400 rpm sabit karıştırma hızında çalışmalarını yürütmüşlerdir.

3.3.6. Reaksiyon süresinin etkisi

Daha önce yapılan bütün deneysel çalışmalar ile verilen sonuçlarda süre 24 saat ile gerçekleştirilmiştir. Ancak, zaman ilerledikçe oleik asit miktarındaki değişimi gözlemlemek ve kesin reaksiyon süresini belirlemek gerekmektedir. Bu amaçla farklı tepkime sürelerinde örnek alınarak deney yapılmıştır. Deneysel koşullar 3/1 molar oran, 40 °C sıcaklık, 320 rpm karıştırma hızı, %1 su ve %5 enzim miktarı ile ağzı açık erlende 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Oleyik asit dönüşümüne reaksiyon süresinin etkisi Şekil 3.15'te verilmiştir.



Şekil 3.15. Reaksiyon süresinin oleyik asit dönüşümüne etkisi

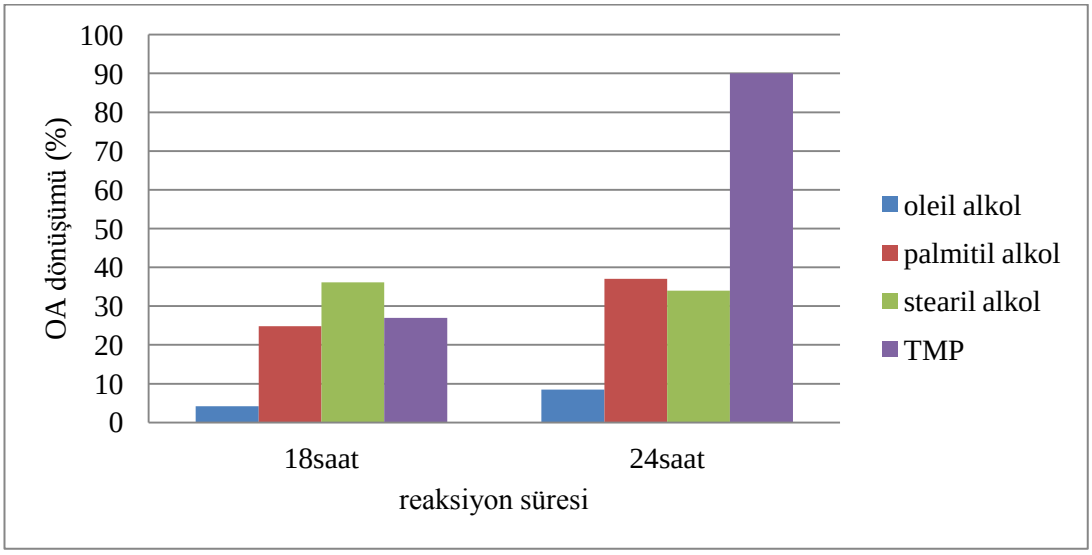
Grafikte de görüldüğü gibi ilk 12 saat boyunca hızlı bir dönüşümün gerçekleştiği reaksiyonda 24 saat sonunda %85 dönüşüm elde edilmiştir. Bu noktadan sonra olukça yavaş ilerleyen reaksiyonda en yüksek dönüşüm değeri, 54 saatin sonunda %96 olarak elde edilmiş ve 72 saatin sonunda dönüşüm halen sabit kalmıştır.

Benzer bir çalışmada (Akerman ve diğ., 2011), sisteme vakum uygulanarak oluşan su eş anlı olarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Novozyme 435'in kullanıldığı oleik asit ile TMP'nin esterleşme reaksiyonunun enzimatik olarak gerçekleştirildiği tek çalışma olan bu yayında sıcaklık da oldukça yüksek (60-100 °C) olarak tercih edilmiştir. 100 °C sıcaklıkta 24 saatte ve 70 °C sıcaklıkta 64 saat sonunda %95'in üzerinde toplam ester dönüşümüne ancak ulaşılabilmiştir. Bu açıdan ÜHT-TL100L hem ılımlı reaksiyon koşulları hem de 10 saat daha kısa reaksiyon süresi açısından avantajlıdır.

3.3.7. Kullanılan alkol türünün etkisi

Bu bölüme kadar yapılan deneysel çalışmalarda polyol bir alkol olan TMP kullanılmıştır. ÜHT-TL100L ile katalizlenen bu reaksiyonda aynı koşullar altında üç adet hidroksil grubuna sahip olan bu alkolün yerine düz zincirli yağ alkollerinin kullanılması ile vaks esterler üretilerek dönüşümün nasıl değişeceğini göstermek için bir çalışma yapılmıştır. İleri yöndeki reaksiyon hızını arttırabilmek için oleyik asidin fazlası kullanılmıştır. Yağ alkollerinden oleyil alkol (C18:1), palmitil alkol (C16:0) ve stearil alkolün (C18:0) kullanıldığı deney setlerinde, 3/1 asit/alkol molar oranı,

40 °C sıcaklık, 320 rpm çalkalama hızı, %1 su ve %5 enzim miktarı ile 24 saat süren esterleşme deneyinde 18. ve 24. saatler sonucunda elde edilen oleyik asit dönüşüm değerleri her bir alkol için Şekil 3.16 ile verilmiştir.

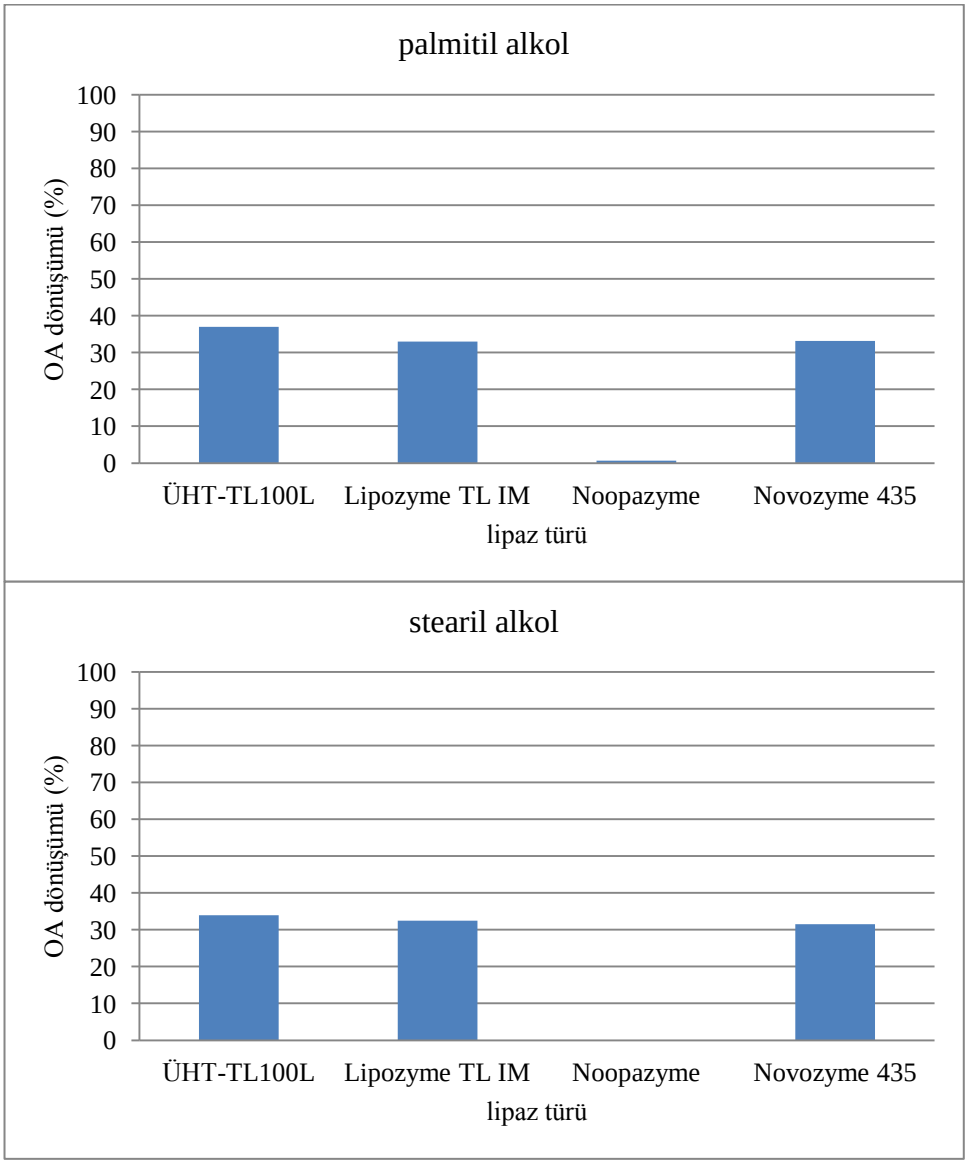


Şekil 3.16. Farklı alkoller ile oleik asidin esterifikasyonunda dönüşümün zamanla değişimi

Burada TMP polyol alkolünün kullanıldığı deney setinden alınan sonuçların diğerlerine göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni TMP dışındaki yağ alkollerinin kullanıldığı deneylerde asit sitokiyometrik oranın 3 katı kadar ortama eklenmiştir. TMP ile yapılan deneyde ise molar oran 6/1'dir. Oleil alkol ile oleik asit arasındaki reaksiyon için bu deneyde uygulanan koşulların yeterli olmadığı görülmektedir. Palmitil ve steril alkolün kullanıldığı deneylerde ise alkollerin tamamen kullanılarak tükendiği tahmin edilmektedir. Görülen yağ asidi dönüşüm değerleri bunu destekler niteliktedir. TMP'nin kullanıldığı deneylerde sitokiyometrinin üzerine çıkılmasının dönüşüme etkisinin olmadığı görülmektedir (Şekil 3.11).

Aynı koşullarda (asit/alkol mol oranı 3/1, 40 °C sıcaklık, 320 rpm çalkalama hızı, %1 su, %5 enzim miktarı, 24 saat), yağ alkolleri kullanılarak deneyler yapılmış ve katalizör olarak farklı ticari tutuklanmış lipazlar (Lipozyme TL IM, Noopazyme ve Novozyme 435) kullanılmıştır. Noopazyme kullanılan reaksiyonlarda hiçbir yağ alkolü ile dönüşüm elde edilememiştir. Oleyik asitin, oleyil alkol ile esterleşmesinde ÜHT-TL 100 L dışında, Lipozyme TL IM ve Novozyme 435 tutuklanmış lipazları ile

dönüşüm elde edilmemiştir. Palmitil alkol ve stearil alkol ile oleyik asidin esterleşmesi reaksiyonlarında ise dönüşüm değerleri Şekil 3.17'de verildiği gibi değişmektedir.



Şekil 3.17. Oleyik asitin palmitil alkol ve stearil alkol ile esterleşmesi reaksiyonlarında kullanılan lipaz türünün oleyik asit dönüşümüne etkisi

Laudani (2007) sabit yataklı reaktörde oleik asitin 2-etil-1-hekzanol (izooktanol) ile esterleşme reaksiyonunda Lipozyme RM IM lipazını kullanmışlar; CO_2 atmosferinde %93 verim ile gerçekleşen reaksiyon için 0 °C ve 10 MPa basınç gerekmiştir.

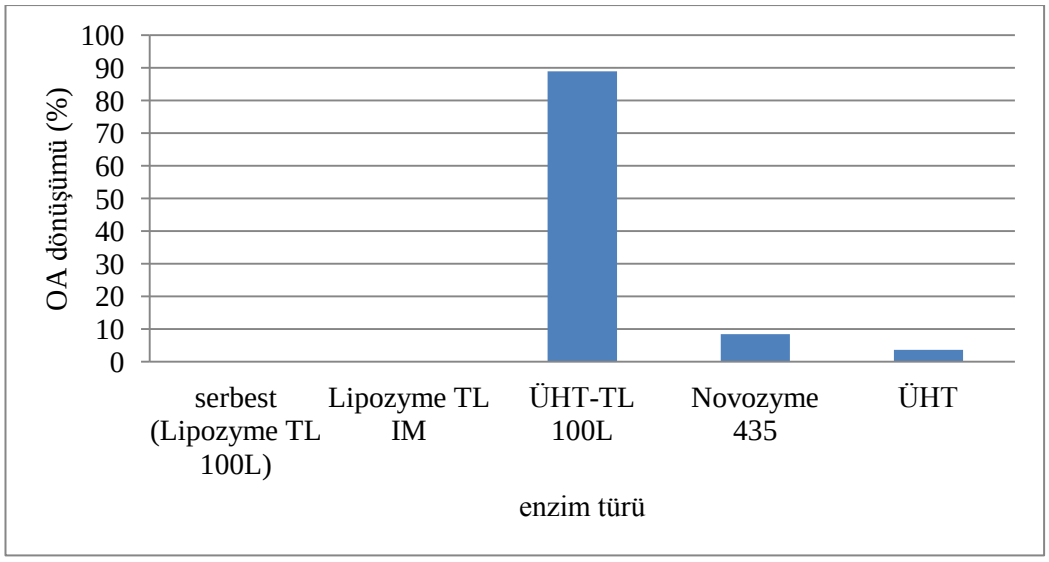
Radzi (2010) ise, *Candida antarctica* lipazı (Novozyme 435) varlığında oleik asit ile oleil alkol arasındaki esterifikasyon ile vaks ester üretimi üzerine yaptığı çalışmada

bir saatlik reaksiyonda asit/alkol molar oran 1/2, 30-50 °C aralığında ve 0,393 m/sn karışma hızı ile en yüksek dönüşüme (%95) ulaşılmıştır.

Oleik asit ile fuzel yağı arasındaki esterifikasyonda ise (Bélafi-Bakó, 2010) 1/2 mol oranında 30 °C'de dönüşüm %60 değerinde kalırken, 60 °C'de ancak %90 üzerinde dönüşüme ulaşılabilmiştir. Ancak enzim miktarı bu çalışmada oldukça düşük (% 0,5) tutulmuştur.

3.3.8. ÜHT-TL 100 L tutuklu lipazının diğer ticarı lipaz formları ile karşılaştırılması

Çalışmanın son aşamasında bütün deneysel çalışma boyunca katalizör olarak kullanılan laboratuar koşullarında tutuklanmış ÜHT TL 100 L lipazı ile bu lipazın serbest formu olan Lipozyme TL 100 L, yine ticari olarak kullanılan anyonik reçineye tutuklanmış hali olan Lipozyme TL IM ve Akerman ve ark. (2011)'nın oleik asit ile TMP esterleşmesi üzerine yaptıkları çalışmada kullanılan *Candida antarctica* (Novozyme 435) ticari tutuklu lipazı ile aynı reaksiyon koşullarında karşılaştırılmıştır. Tutuklanmış lipazlar ağırlıkça aynı tutulmuş olup serbest lipazın miktarı ise ÜHT-TL 100 L'nin içerdiği protein miktarı ile eşit tutularak hesaplanmıştır. 3/1 asit/alkol mol oranı, %1 başlangıç su içeriği, 40 °C reaksiyon sıcaklığı ile 320 rpm çalkalanma hızında 24 saat süre ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda enzim türünün oleyik asit dönüşümüne etkisi Şekil 3.18'de verilmiştir.



Şekil 3.18. Enzim türünün ve tutuklamanın oleyik asit dönüşümüne etkisi

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda anyonik reçineye tutuklanmış Lipozyme TL IM'nin bu reaksiyon için uygun olmadığı görülmektedir. Bu lipaz türünün spesifikasyonu gıdada kullanılabilecek saflıkta olduğunu belirtmektedir. Ancak reaksiyondaki girdilerin, özellikle alkolün, yapı olarak bu lipazın bu tutuklanmış türü ile uyum sağlayamadığı düşünülmektedir.

Katalizör olarak çalışmanın tamamında tutuklanarak kullanılan lipazın ticari serbest sıvı formu olan Lipozyme TL 100 L'nin bu reaksiyonda hiç aktivite göstermemesi ise bu reaksiyonda enzimin çalışması için gerekli olan yağ/su arayüzeyinin kütle aktarımında yetersiz kalması ile açıklanmaktadır.

Novozyme 435, Akerman ve diğ. (2011)'nin çalışmasında kullanılan lipaz türüdür ve bu reaksiyonu katalizlediği bilinmektedir. Bu enzimin araştırmamızda düşük dönüşüm sağlamasının nedeni sıcaklığın düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü vakum altında suyun da uzaklaştırıldığı araştırmada, 60-100 °C sıcaklık aralığında çalışmış, 60 °C, 3/1 mol oranında elde edilen oleik asit dönüşümü %62 olmuştur. Bu bağlamda Novozyme 435 için daha yüksek sıcaklıklara (70 °C ve üzerine) çıkılması gerekmektedir.

Destek malzemesi olan Mg-Al hidrotalsitin bu esterleşme reaksiyonundaki katalitik aktivitesinin de gözlenmesi için, tutuklama yapılmamış, desikatörde saklanan hidrotalsit, tutuklu lipaz ile aynı miktarda tartılarak aynı koşullar altında reaksiyon gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik reaksiyon süresi sonunda, destek malzemesi başlangıçta reaksiyon ortamında bulunan oleyik asidin %3,6'sının TMP ile esterleşmesini sağlamıştır. Hidrotalsitin farklı formlarının heterojen katalizör olarak kullanıldığı bilinmektedir. Hidrotalsit sentezlenirken farklı parametreler uygulanarak fiziksel özellikleri değiştirilebilir. Bu sayede pek çok reaksiyonda kullanılabilirler. Bunların yanında hidrotalsitin ucuz olması da yaygın kullanımının diğer bir nedenidir. Oldukça gözenekli ve anyonik katyonları yakalama özelliği ile hem katalizör hem de katalizör desteği olarak kullanılmaktadırlar.

Sonuç olarak, oleyik asitin TMP ile esterleşmesi tepkimesinde, serbest halde aktivite göstermeyen Lipozyme TL 100 L lipazının, Mg-Al hidrotalsit desteğe tutuklanmasıyla ticari olarak kullanılan diğer lipaz türleri ile yarışabilen bir biyolojik katalizör geliştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kullanılan lipazın, serbest halde iken reaksiyonda aktivasyon göstermemesi en önemli bulgulardan biridir. Serbest halde iken aktivitelerini ve kararlılıklarını koruyamayan lipazlar, tutuklama sonucu kararlı, ortam koşullarına dayanıklı, tekrar tekrar kullanılabilen bir yapıya sahip olurlar. Bu nedenle serbest lipazın tutuklama işleminden sonra oleyik asit TMP esterlerini sentezleyebilmesi beklenen bir durumdur. Ancak, dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta aynı lipaz türünün ticari tutuklanmış formunun bu reaksiyonu katalizlememesidir. Dolayısıyla lipazın tutuklandığı desteğin, reaksiyonlara uygun olarak da seçilebileceği söylenebilir.

Hammadde seçimi, bir tepkimenin endüstriyel olarak uygulanabilmesinde oldukça önemlidir. Yağ asitlerinin eldesi ayrı bir maliyet getireceğinden, doğrudan yağın kullanılabileceği prosesler geliştirilmesi yerinde olacaktır. Ayrıca, çevre dostu işletmelerin kurulması ve atıkların geri kazanımı amacıyla yağ kaynağı olarak atık yemeklik yağlar ya da mikrobiyal yağlar kullanılabilir. Atık yemeklik yağların tercih edilmesi ile toplumda çevreye duyarlılık bilinci geliştirilebilir. Kullanılan yağ asidi ya da yağ kaynağı ve polyol alkol türü değiştirilerek, ürünün özellikleri kullanılacağı alana göre değiştirilebilir.

Deneysel çalışmalar sonucunda, TMP esterlerinin elde edilebilmesi için en uygun koşullar belirlenmiştir. 3/1 asit/TMP mol oranı ile 24 saat reaksiyon süresi sonunda 40 °C sıcaklıkta, %5 enzim miktarı, %5 su içeriği, 320 rpm karıştırma hızı ile %90'ın üzerinde oleyik asit dönüşümü elde edilmiş; 54 saat sonunda ise bu değer %96'ya ulaşmıştır. Literatürde buna benzer esterleşme ve transesterleşme reaksiyonlarında sitokiyometrinin biraz üzerinde alınan substrat miktarı ile istenen dönüşümlere ulaşılabilmiştir. Ancak bu çalışmada sitokiyometrinin üzerinde alınan oleik asidin dönüşümü arttırıcı yönde bir katkısı olmamıştır. Sonuçta, artan oleik asidin reaksiyon karışımından ayrılması için gerekli olan ayırma işlemleri de azaltılmıştır.

Reaksiyonun açık ve kapalı kaplarda gerçekleştirilmesi, tasarlanması planlanan bir pilot tesis ya da çalışmanın geliştirilmesinde önemli bir başlangıç noktası ve yol

göstericidir. Kapalı kapta dönüşümün düşük olması, geri yöndeki reaksiyon (hidroliz) hızını arttırmanın yanı sıra enzimin ihtiyaç duyduğu suyun fazlasının reaksiyon karışımında olması nedeniyle enzimin aktivite kaybetmesinden kaynaklanabilir. Bu nedenle kullanılan tutuklanmış lipazın ömrü kısalacak, daha fazla katalizöre ve dolayısıyla lipaza ihtiyaç duyulacaktır. Bu da henüz saflaştırma işlemlerindeki bir dizi basamaklar nedeniyle halen pahalı bir girdi olan lipazın, kimyasal katalizörler ile yarışabilmesinde engel teşkil edecek bir durumdur.

30 °C sıcaklıktaki farklı başlangıç su içeriğine sahip deney setlerinde elde edilen bulgular, bu sıcaklığın yüksek dönüşümler elde etmek için yetersiz olduğunu göstermiştir. 40 °C ile en yüksek dönüşüme (%90) ulaşılmıştır. Bu sıcaklık birçok kimyasal prosese göre oldukça ılımlıdır. Enerjiden büyük ölçüde tasarruf sağlayan olan bu sıcaklık güvenli bir sistemde çalışma imkânı sağlar.

Su içeriğinin %5 ve üzerinde değiştirilmesinin dönüşüme bir etkisi olmadığı bulgular arasındadır. Literatürde TMP'nin girdi olarak kullanıldığı çeşitli esterleşme reaksiyonları üzerine yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında, gerekli olan su miktarı daha düşüktür. Bu sayede işletimi daha kolay olan, daha düşük enerji ve hacimde reaksiyonun gerçekleştirilebileceği bir proses tasarlanabilir. Ancak bu noktada başlangıçta ortama su eklenmesi yerine, reaksiyonda oluşan suyun istenen dönüşüm için yeterli olacağı bir proses tasarımı yapılarak daha etkin bir sistemde esterleşme reaksiyonu gerçekleştirilebilir. Böylelikle fazla bir girdiye ihtiyaç duyulmadan, istenen ürün doğrudan elde edilebilir ve yeterli dönüşüm ile neredeyse saf olarak son ürün alınabilir.

Öncelikle, katalizör olarak kullanılan lipazın tutuklanması işlemleri tekrar gözden geçirilebilir. Fakat bu yapılırken enzimin aktivitesini kaybetmemesi ve destek ile uyumlu yapısının bozulmaması gibi önemli detaylara dikkat edilmelidir. En ekonomik ve yüksek enzim aktivitesi sağlayacak yöntem kullanılarak katalizör maliyeti oldukça düşürülebilir. Ayrıca, enzimin tekrar kullanılabilirliği araştırılarak, uygun geri kazanım yöntemi ile katalizör ömrü uzatılabilir.

Mg-Al hidrotalsit, önceki çalışmalardan yola çıkılarak enzim desteği olarak tercih edilmiştir. Ancak; Celite ve çitosan desteklere tutuklanmış lipazların oleyik asit ile TMP arasındaki esterleşme reaksiyonundaki katalitik aktivitesi incelenmemiştir.

Çalışma bu yönde genişletilerek, reaksiyonda alternatif bir tutuklama desteği ve lipaz türü kullanılabilir.

Ortama eklenen enzim miktarı için deneysel bulgulara göre en uygun oran substrat miktarının ağırlıkça %5'i kadardır. Bu miktarın üzerine çıkıldığında dönüşümün azaldığı görülmektedir. Bunun nedeni, karışma problemleri ve dolayısıyla kütle aktarım kısıtlamalarının olmasıdır.

Buna ek olarak ortama eklenen enzim miktarı arttıkça enzimin ihtiyaç duyacağı başlangıçtaki su miktarı da artacaktır. Çünkü ÜHT-TL100L susuz reaksiyon ortamında oldukça düşük bir aktivite göstermektedir. Genel olarak enzimler optimum bir neme ihtiyaç duyar. Bu açıdan farklı su içeriklerinde bu deney tekrar edilebilir ancak, artan enzim aynı zamanda kullanılan suyun da artmasına neden olacağından herhangi bir deney tekrarı ve metot değişikliği gerekli görülmemiştir. Çünkü aynı zamanda hammadde, katalizör gibi girdilerin miktarındaki artış maliyetin de artmasına neden olacaktır. Oysaki şu andaki koşullarda da %90 ve üzerinde bir dönüşüme ulaşılabilmiştir ve bu kabul edilebilir bir değerdir. Aynı zamanda literatürdeki çalışmalar ile de uyumlu ve tutarlıdır.

Reaksiyon karışımı orbital çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Farklı hızlarda gerçekleşen reaksiyonların karşılaştırılmasının sonucunda en yüksek dönüşümün (%96) 320 rpm çalkalanma hızında olduğu görülmektedir. Buradan yola çıkarak reaksiyondaki etkin karışma için 150 rpm çalkalanma hızının yetersiz kaldığı söylenebilir. Enerji maliyetinin düşürülmesi açısından ara değerlerdeki çalkalanma hızlarında da deneyler yapılabilir. Çalışmanın ilerletilerek endüstriyel anlamda uygulanabilir hale gelmesinde bu önemli bir parametredir.

Aynı zamanda, sadece çalkalama ile değil değişik boyut ve şekillerdeki karıştırıcı ve engeller içeren tanklar ile bu deneyler tekrar edilerek reaksiyon için en uygun yöntem belirlenebilir. Dönüşümde olumsuz bir etki oluşmazsa, karıştırmanın kanatlı pervaneler ve çarklar ile yapılması endüstriyel anlamda daha uygulanabilir bir yöntemdir.

Diğer bir önemli parametre olan reaksiyon süresi için belli sürelerde tepkime ortamından örnekler alınmış ve 54 saat sonunda oleyik asit dönüşümünde bir değişim

gözlenmemiştir. Bu süre sonunda %96 dönüşümün gerçekleşmesi, lipaz katalizli yağlayıcı ve vaks ester reaksiyonlarında önemli bir bulgu olsa da kimyasal katalizörler ile gerçekleşen reaksiyonların yanında oldukça uzun bir süredir. Reaksiyon süresi bu açıdan bir dezavantaj oluştursa da sonuçta elde edilen ürünün kalitesi, enzimin doğal seçimliliği nedeniyle kimyasal kataliz ile elde edilen ürünün kalitesi ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde yüksektir. Bu da ürünün viskozitesinde, akma noktasında, ısıl ve oksidatif kararlılığında olumlu bir fark yaratmaktadır.

Bu çalışmada, elde edilen ester yapısının yağlayıcı özellikleri incelenmemiştir. Böyle bir detay da çalışmaya eklenerek, ASTM standartlarında bir yağlayıcı üretilip üretilemediği ile ilgili olarak kesin bir bilgiye sahip olmak, çalışmanın detaylandırılması ve uygulamaya geçirilebilmesi açısından ışık tutacak önemli bir nokta olacaktır.

Deneysel bulguların toplam ester verimi üzerinden verilmesi ise diğer bir zayıf noktadır. TMP esterleri genel olarak yağlayıcı olarak kullanılabilseler de genellikle beklenti TMP triesterlerinin en yüksek oranda olmasıdır. Bu konuda yapılan deneysel çalışma sürecinde ürünün analizlenebilmesi ile ilgili sorunlarla karşılaşılmıştır. Bu tür büyük esterler için rutin bir analiz yönteminin geliştirilmemiş olması nedeniyle analizin yapılabildiği bir analiz ya da araştırma laboratuarı ülkemizde bulunmamaktadır. TÜBİTAK-MAM ve İstanbul Üniversitesi İleri Analizler Laboratuarı'na konu ile ilgili başvurulmuş ise de olumlu bir sonuç alınamamıştır.

Literatürde yapılan çalışmalarda mono-, di- ve tri-esterlerin tayin edilebildiği HPLC ve GC'de uygulanabilen birkaç analiz metodu bulunmakla birlikte standartlar ile belirlenmiş bir yöntem henüz uygulanmamaktadır. Bahsedilen yöntemlerin uygulanmasında ise bölümün araştırma laboratuarlarının kısıtlı imkânları nedeniyle başarılı sonuçlar elde edilememiştir.

Bunun yanında, literatürde biyoyağlayıcı ve yağlayıcı katkı maddesi eldesi için yapılan çalışmalarda, oleik asidin titrasyonla dönüşümünün hesaplandığı çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmaların bazılarındaki bulgular yalnızca asit-baz titrasyonu sonuçlarına dayanmaktadır. Bazılarında ise titrasyon ile elde edilen değerler HPLC ya da GC analizleri ile karşılaştırılarak kendi aralarındaki tutarlılığı belirtilmiştir. Ayrıca toplam dönüşümün %90 ve üzerinde olduğu durumlarda ürünün %70-75'inin

triester olduğu ve hemen hemen hiç monoester içermediği de belirtilmiştir. Bu detay ile çalışmada elde edilen ürünün de yüksek oranda triester içerdiği düşünülmektedir. TMP-triesterleri makine ve ekipmanlarında doğrudan yağlayıcı baz akışkanı olarak kullanılabilmektedir. Diğer mono- ve di-esterleri ise daha çok katkı maddesi olarak önerilmektedir.

Bitkisel yağlar ve bunların yağ asitlerinin biyoyağlayıcı üretiminde kullanımı, 1980'li yıllardan itibaren araştırılmaya başlanmıştır. İlk yıllarda kimyasal katalizörlerin kullanıldığı bu araştırmalarda enzim katalizörlerin kullanılması ile ilgili ilk yayınların ortaya çıkması 90'lı yılların ortalarını bulmuştur. Daha çok yağ asitleri metil esterlerinin hammadde olarak kullanıldığı bu çalışmalarda, doğrudan bitkisel yağların kullanıldığı çalışmalar daha az sayıdadır. Yağ asitlerinin çeşitli alkollerle ester oluşturduğu çalışmalar olsa da, bunlar arasında daha çok vaks esterler biyoyağlayıcı özellik gösterirler.

En çok kullanılan polyol alkollerin TMP, PE ve NPG olduğu polyol esterleri eldesine yönelik çalışmalardan TMP'nin kullanıldığı enzimatik çalışmaların yalnızca bir tanesinde oleik asit kullanılmıştır.

Literatürde oleyik asit ile TMP arasında enzimatik olarak gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonu üzerine bir çalışma bulunmaktadır. 2011 yılında Akerman ve arkadaşları tarafından yayınlanan bu çalışmada, tutuklanmış *Candida antarctica* lipaz B (Novozyme 435) katalizör olarak kullanılmıştır. *Thermomyces lanuginosa* lipazının katalizör olarak kullanıldığı bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Ayrıca, serbest lipazın farklı desteklere tutuklanarak ticari tutuklu lipazlar ile TMP-ester üretimindeki performanslarının karşılaştırıldığı tek bir çalışma bulunmaktadır. *Candida rugosa* serbest lipazının kullanıldığı sözü edilen çalışmada, kullanılan destekler arasında Mg-Al hidrotalsitin yer almamasının yanı sıra, girdi olarak kolza yağı metil esteri kullanılmıştır. Bütün bu detaylar ile literatürde yeni bir çalışmadır.

Sonuç olarak bu çalışma, konu ile ilgili planlanan diğer çalışmalara ışık tutabilecek ön bilgiyi içeren bir kaynak olarak literatürde yerini alacaktır. Konunun oldukça yeni olması nedeniyle böyle bir kaynak, literatürdeki konu ile ilgili boşluğun doldurulmasında küçük bir yapıtaşı olabilir.

KAYNAKLAR

Åkerman C. O., Hagström A. E. V., Mollaahmad M. A., Karlsson S., Hatti-Kaul R., Biolubricant synthesis using immobilised lipase: Process optimisation of trimethylolpropane oleate production, *Process Biochemistry*, 2011, **46**, 2225–2231.

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

Ası T., *Tablolarla Biyokimya*, 1. Baskı, Ankara Üniversitesi, Ankara, 1999.

ASTM D5555-95, Standard Test Method for Determination of Free Fatty Acids Contained in Animal, Marine, and Vegetable Fats and Oils Used in Fat Liquors and Stuffing Compounds, 2011.

Athenstaedt K., Daum G., The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation, *Cellular And Molecular Life Sciences*, 2006, **63**, 1355–1369.

Basheer S., Cogan U., Nakajima M., Esterification Kinetics of Long-Chain Fatty Acids and Fatty Alcohols with a Surfactant-Coated Lipase in *n*-Hexane, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, **75**(12), 1785-1790.

Basri M., Abd Rahman R. N. Z. R., Ebrahimpour A., Salleh A. B., Gunawan E. R., Abd Rahman M. B., Comparison of estimation capabilities of response surface methodology (RSM) with artificial neural network (ANN) in lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester, *BMC Biotechnology*, 2007, **7**, 53-58.

Bokade V. V., Yadav G. D., Synthesis of bio-diesel and bio-lubricant by transesterification of vegetable oil with lower and higher alcohols over heteropolyacids supported by clay (K-10), *Process Safety Environment Protection*, 2007, **85**, 372–377.

Bondioli P., Della Bella L., Manglaviti A., Synthesis of Biolubricants with High Viscosity and High Oxidation Stability, *OCL*, 2003, **10**, 150-154.

Bondioli P., The Preaparation of Fatty Acid Esters by Means of Catalytic Reactions, *Topics in Catalysis*, 2004, **27**, 77-81.

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

Bremmer, B. J., Plonsker, L., Bio-Based Lubricants-A Market Opportunity Study Update, 1st ed., United Soybean Board, Omni Tech International, USA, 2008.

Chen J-P., Wang J-B., Wax Ester Synthesis by Lipase-Catalyzed Esterification with Fungal Cellulose Biomass Support Particles, *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, **20**, 615-622.

Chiou S. C., Wu W. T., Immobilization of Candida rugosa lipase on chitosan with activation of hydroxyl groups, *Biomaterials*, 2004, **25**, 197–204.

Dianóczki C., Recseg K., Kővári K., Poppe L., Convenient enzymatic preparation of conjugated linoleic acid alkyl esters with C6–C22 alcohols, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, **45**, 45–49.

Dossat V., Combes D. & Marty, A., Lipase-Catalyzed Transesterification of High Oleic Sunflower Oil, *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **30**, 90-94.

Elibol M., Yaşa İ., Karaçancı Ş., Çoban I., Özsoy G., Zeytinyağı İşletmeleri Katı(Pirina) ve Sıvı(Karasu) Atıklarından Mikrobiyal Lipaz Üretimi, *TÜBİTAK*, 106M464, 7-25, 2008.

Garcia T., Coteron A., Martinez M., Aracil J., Kinetic model for the esterifcation of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst, *Chemical Engineering Science*, 2000, **55**, 1411-1423.

Gryglewicz S., Piechocki W., Preparation of polyol esters based on vegetable and animal fats, *Bioresource Technology*, 2003, **87**, 35–39.

Gunam-Resul M. F. M., Ghazi T. I. M., Idris A., Kinetic study of jatropha biolubricant from transesterification of jatropha curcas oil with trimethylolpropane: Effects of temperature, *Industrial Crops and Products*, 2009, **38**, 87– 92.

Gunawan E.R., Basri M., Abdul Rahman M.,B., Salleh A. B., Abdul Rahman R. N. Z., Study on response surface methodology (RSM) of lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester, *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, **37**, 739–744.

Guncheva M. H., Zhiryakova D., High-yield synthesis of wax esters catalysed by modified Candida rugosa lipase, *Biotechnology Letters*, 2008, **30**, 509–512.

Guncheva M., Tashev E., Zhiryakova D., Tosheva T., Tzokova N., Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis, *Process Biochemistry*, 2011, **46**, 923–930.

Hadzir N.M., Basri M., Abd Rahman M. B., Abdul Razak C.N., Abd Rahman R. N. Z., Salleh A.B., Enzymatic alcoholysis of triolein to produce wax ester, *Journal of Chemical Biotechnology*, 2001, **76**, 511-515.

Hallberg M. L., Wang D., Härröd M., Enzymatic Synthesis of Wax Esters from Rapeseed Fatty Acid Methyl Esters and a Fatty Alcohol, *Journal of the American Oil Chemists' Society***,** 1999, **76**, 183–187.

Hayes D. G., Review-Enzyme-Catalyzed Modification of Oilseed Materials to Produce Eco-Friendly Products, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2004, **81**(12), 1077–1103.

Hung T. C., Giridhar R., Chiou S. H., Wu W. T., Binary Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, **26**, 69–78.

IENICA, Biolubricants- Market Data Sheets, *Interactive European Network for Industrial Crops and Applications*, 2004, 1-7.

Kelly A. R., Hayes D.G., Lipase-Catalyzed Synthesis of Polyhydric Alcohol-Poly(ricinoleic acid) Ester Star Polymers, *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, **101**, 1646–1656.

Keng P.S., Basri M., Ariff A.B., Abdul Rahman M.B., Abdul Rahman R.N.Z., Salleh A.B., Scale-up synthesis of lipase-catalyzed palm esters in stirred-tank reactor, *Bioresource Technology*, 2008, **99**, 6097–6104.

Keng P. S., Basri M., Zakaria M. R.S., Abdul Rahman M. B., Abdul Rahman A. R. N. Z., Salleh A. B., Newly Synthesized Palm Esters for Cosmetics Industry, *Industrial Crops and Products*, 2009, **29**, 37-44.

Knez Z., Laudani C. G., Habulin M., Reverchon E., Exploiting the Pressure Effect on Lipase-Catalyzed Wax Ester Synthesis in Dense Carbon Dioxide, *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, **97**, 1366–1375.

Kong W., Li X. H., Ruan M., Ma F. M., Jiang Y. F., Chen M. Z. L. Y., Zuo X. H., Green waxes, adhesives and lubricants, *Philosophical Transaction of the Royal Society A*, 2010, **368**, 4869-4890.

Kumar S., Kikon K., Upadhyay A. S., Kanwar S., Gupta R., Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3, *Protein Expression and Purification*, 2005, **41**, 38–44.

Lämsä M., Environmentally Friendly Products Based on Vegetable Oils, D. Sc. Thesis, *Helsinki University of Technology*, Helsinki, Finland, 1995, 20-34.

Linko Y.-Y., Tervakangas T., Lämsä M., Linko P., Production of trimethylolpropane esters of rapeseed oil fatty acids by immobilized lipase, *Biotechnology Techniques*, 1997, **11**, 889–892.

Linko Y. Y., Lämsä M., Wu X., Uosukainen E., Seppälä J., Linko P., Biodegradable products by lipase biocatalysis, *Journal of Biotechnology*, 1998, **66,** 41–50.

Lucarini A.C., Kilikian B.V., Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances, *Biotechnology Techniques*, 1999, **13**, 2, 149-154.

Luna F. M. T., Rocha B. S., Rola Jr. E. M., Albuquerque M. C. G., Azevedo D. C. S., Cavalcante Jr. J. L., Assessment of biodegradability and oxidation stability of mineral, vegetable and synthetic oil samples, *Industrial Crops and Products*, 2011, **33**, 579–583.

Mortier R. M., Fox M. F., Orzsulik S. T., Chemistry and Technology of Lubricants, *Springerlink*, 2009, **3**(2), 3-35.

Nagendramma P., Kaul S., Development of ecofriendly/biodegradable lubricants: An overview, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2012, **16**, 764– 774.

Naval Ships' Technical Manual, Lubricating Oils, Greases, Specialty Lubricants and Lubrication Systems, *Direction of Commander, Naval Sea Systems Command*, 1993, **262**, 1-7.

Nemestóthy N., Bányai T., Bélafi-Bakó K., Bartha L., Gubicza L., Biotechnological Utilisation of Fusel Oil for Biolubricant Production, *Food Industrial Processes – Methods and Equipment*, 2010, **8**, 121-141.

Öztürk B., Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri Ve Uygulama Alanları, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, İzmir, 2000.

Potapov V. M., Tatarinchik Y. S. N., *Química Orgánica*, 2nd. ed., Editorial Mir Moscú, SSCB, 1983.

Radzi S. M., Mohamad R., Basri M., Salleh A. B., Ariff A., Rahman M. B. A., Rahman R. N. Z. R. A., Kinetics of Enzymatic Synthesis of Liquid Wax Ester from Oleic Acid and Oleyl Alcohol, *Journal of Oleo Science*, 2010, **59**, 127-134.

Rahman N. F. A., Basri M., Rahman M. B. A., Rahman R. N. Z. R. A., Salleh A. B., High yield lipase-catalyzed synthesis of Engkabang fat esters for the cosmetic industry, *Bioresource Technology*, 2011, **102**, 2168–2176.

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

Salimon J., Salih N., Yousif E., Review Article-Biolubricants: Raw materials, chemical modifications and environmental benefits, *European Journal of Lipid Science Technology*, 2010, **112**, 519–530.

Salis A., Solinas V., Monduzzi M., Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilised lipases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, **21**, 167–174.

Schneider M. P., Plant-oil-based lubricants and hydraulic fluids, *Journal of Science and Food Agricultural*, 2006, **86**, 1769–1780.

Sellami M., Aissa I., Frikha F., Gargouri Y., Miled N., Immobilized *Rhizopus oryzae* Lipase Catalyzed Synthesis of Palm Stearin and Cetyl Alcohol Wax Esters: Optimization by Response Surface Methodology, *BMC Biotechnology*, 2011, **11**(68), 2-8.

Silva J. A. C., Biodegradable Lubricants and Their Production via Chemical Catalysis, *Petróleo, Brasileiro S. A.*, Petrobras/Research Center, CENPES, Brazil.

Singh S., Bhadani A., Singh B., Synthesis of Wax Esters from α-Olefins, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2007, **46**, 2672-2676.

Steinke G., Kirchhoff R., Mukherjee K. D., Lipase-Catalyzed Alcoholysis of Crambe Oil and Camelina Oil for the Preparation of Long-Chain Esters, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2000, **77**, 361–366.

Steinke G., Weitkamp P., Klein E., Mukherjee K. D., High-Yield Preparation of Wax Esters via Lipase-Catalyzed Esterification Using Fatty Acids and Alcohols from Crambe and Camelina Oils, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2001, **49**, 647-651.

Tao Y., Chen B., Liu L., Tan T., Synthesis of trimethylolpropane esters with immobilized lipase from Candida sp. 99–125, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, **74**, 151– 155.

Thomas A., Fats and Fatty Oils, *Ullmans' Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley*, Unimills International, Hamburg, Federal Republic of Germany, 1-49, 2005.

Ucciani E., Schmitt-Rozieres M., Debai A., Comeau L. C., Enzymatic Synthesis of Some Wax Esters, *Lipid/Fett*, 1996, **98**(16), 206-210.

Uosukainen E., Linko Y. Y., Lämsä M., Tervakangas T., Linko P., Transesterification of Trimethylolpropane and Rapeseed Oil Methyl Ester to Environmentally Acceptable Lubricants, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, **75**, 1557–1563.

URL-1: http://www.welch-holme-clark.com/index.html, (Ziyaret tarihi: 08.01.2011).

URL-2: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/o1008?lang=en&region=TR, (Ziyaret tarihi: 30 Mayıs 2012).

URL-3: http://www.merckmillipore.com/turkey/chemicals/2-ethyl-2-hydroxymethyl-1-3-propanediol/MDA_CHEM-808394/p_uuid, (Ziyaret tarihi: 22 Mayıs 2012).

Wagner H, Luther R., Mang T., Lubricant Base Fluids Based on Renewable Raw Materials. Their Catalytic Manufacture and Modification, *Applied Catalysis A: General*, 2001, **221**, 429-442.

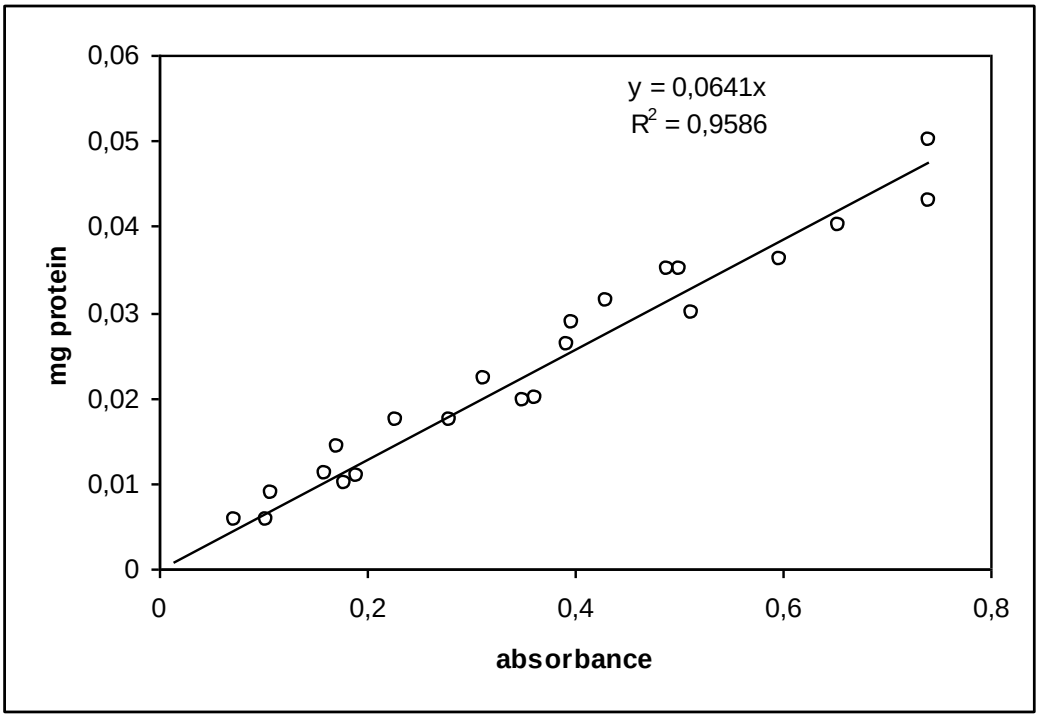
Winkler K. W., Ulrich K., Stuckmann M., *Journal of Bacteriology*, 1979, **138**, 663–670.

Yunus R., Lye O. T., Fakhru'l-Razi A., Basri S., "A Simple Capillary Column GC Method for Analysis of Palm Oil-Based Polyol Esters", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2002, **79**, 1075–1080.

Zeng H-Y., Liao K-B., Deng X., Jiang He., Zhang F., *Process Biochemistry*, 2009, **44**, 791–798.

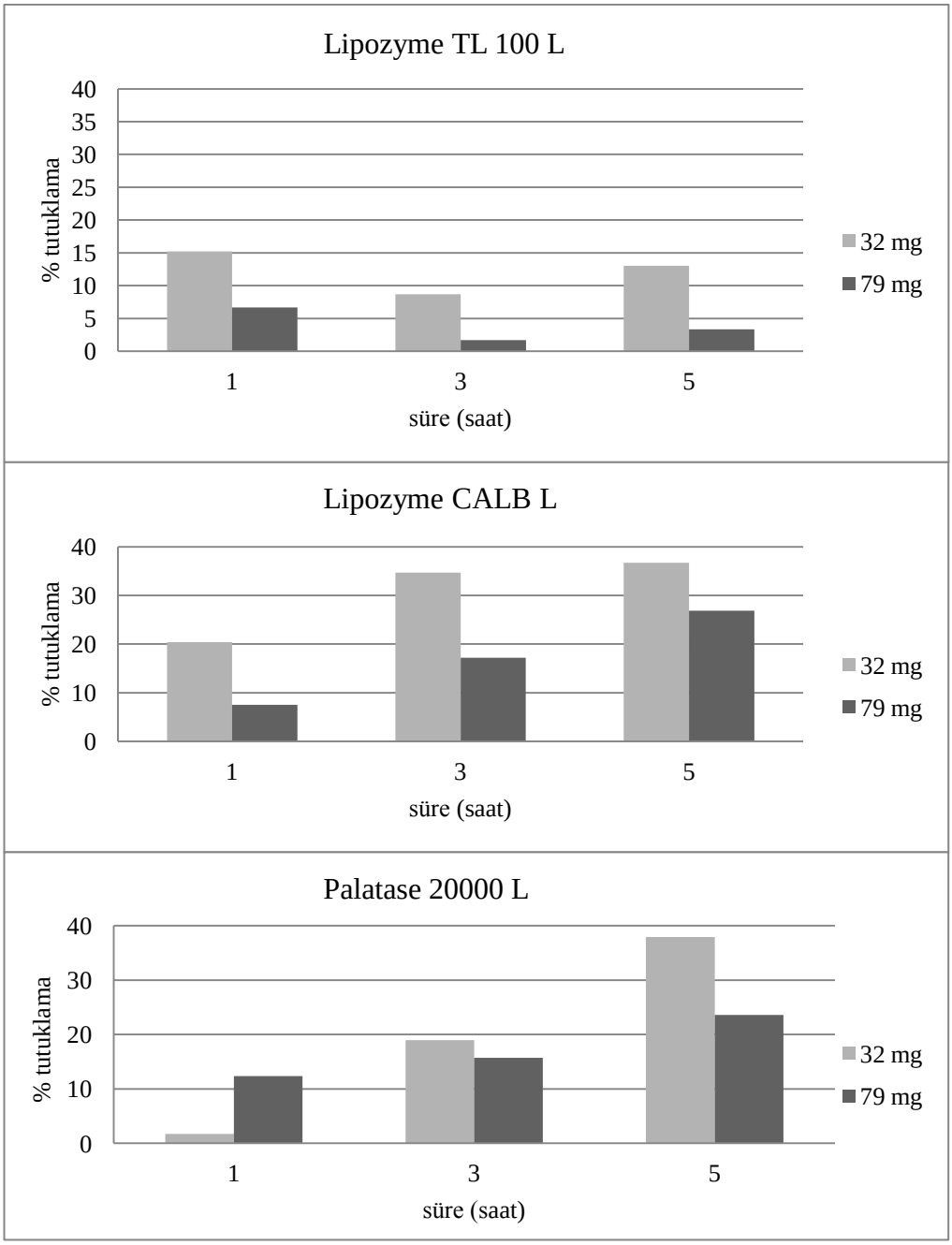
EKLER

EK-A

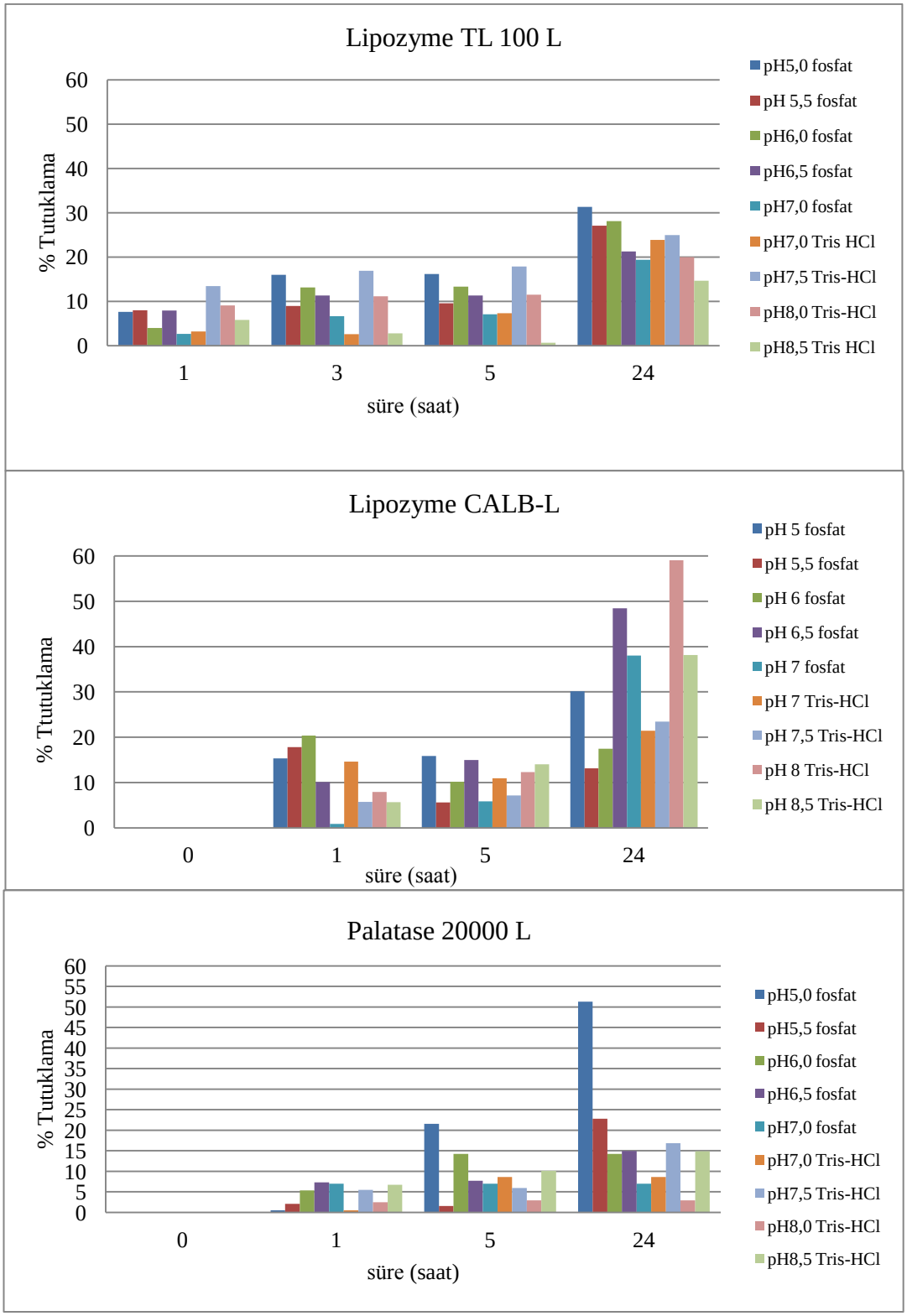


Şekil A.1. Bradford Kalibrasyon Grafiği

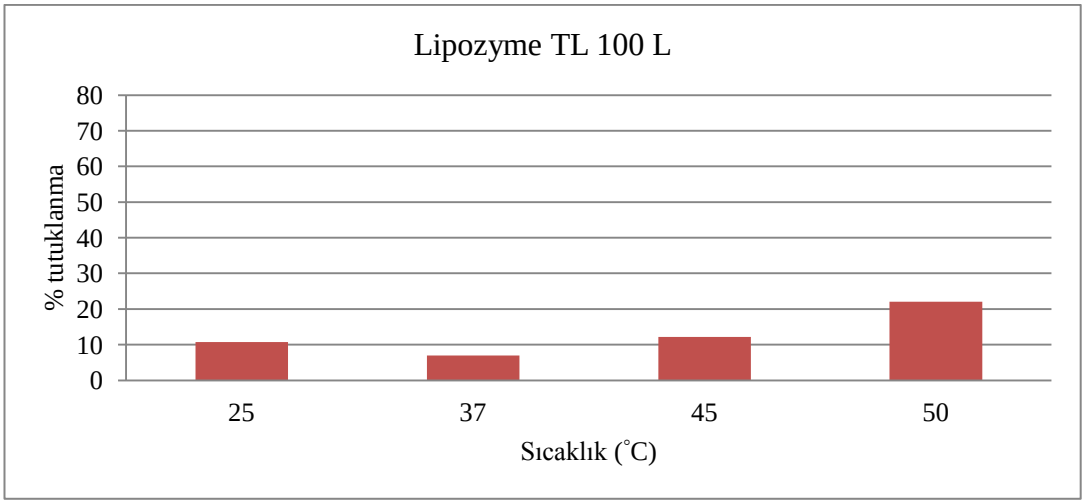
EK-B

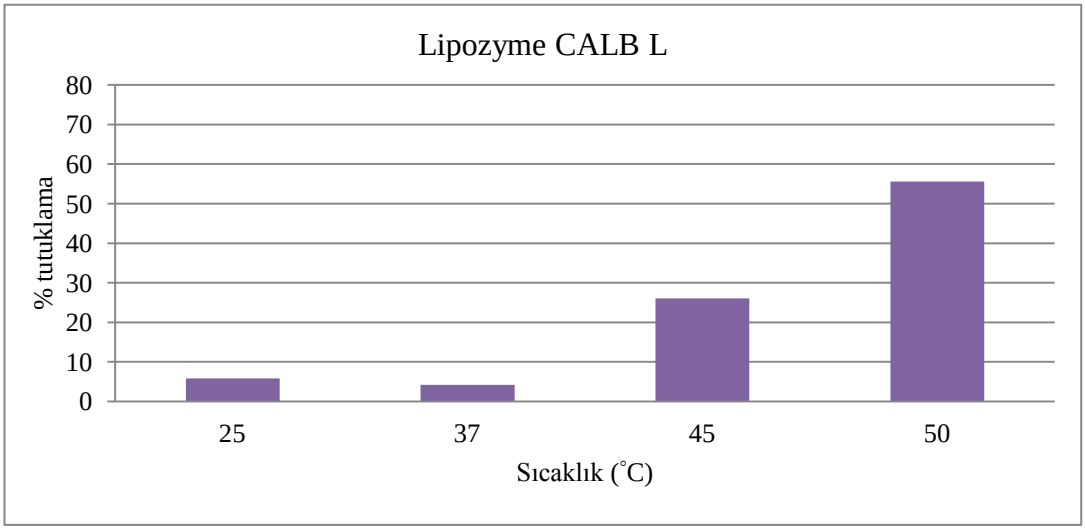


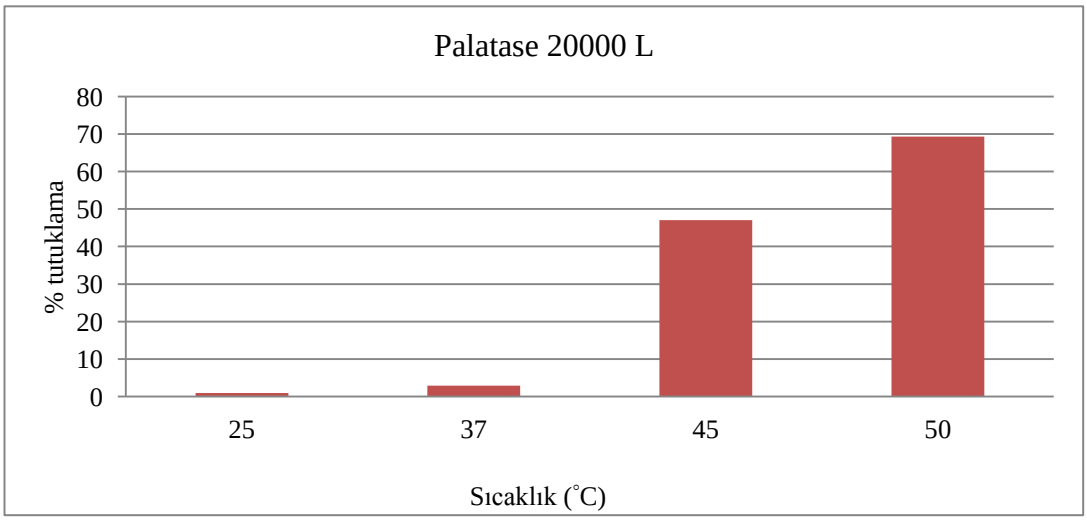
Şekil B.1. Celite'e lipaz tutuklanmasında enzim derişiminin tutuklanma verimine etkisi



Şekil B.2. Celite'e lipaz tutuklanmasında tampon türü ve pH'ının tutuklanma verimine etkisi

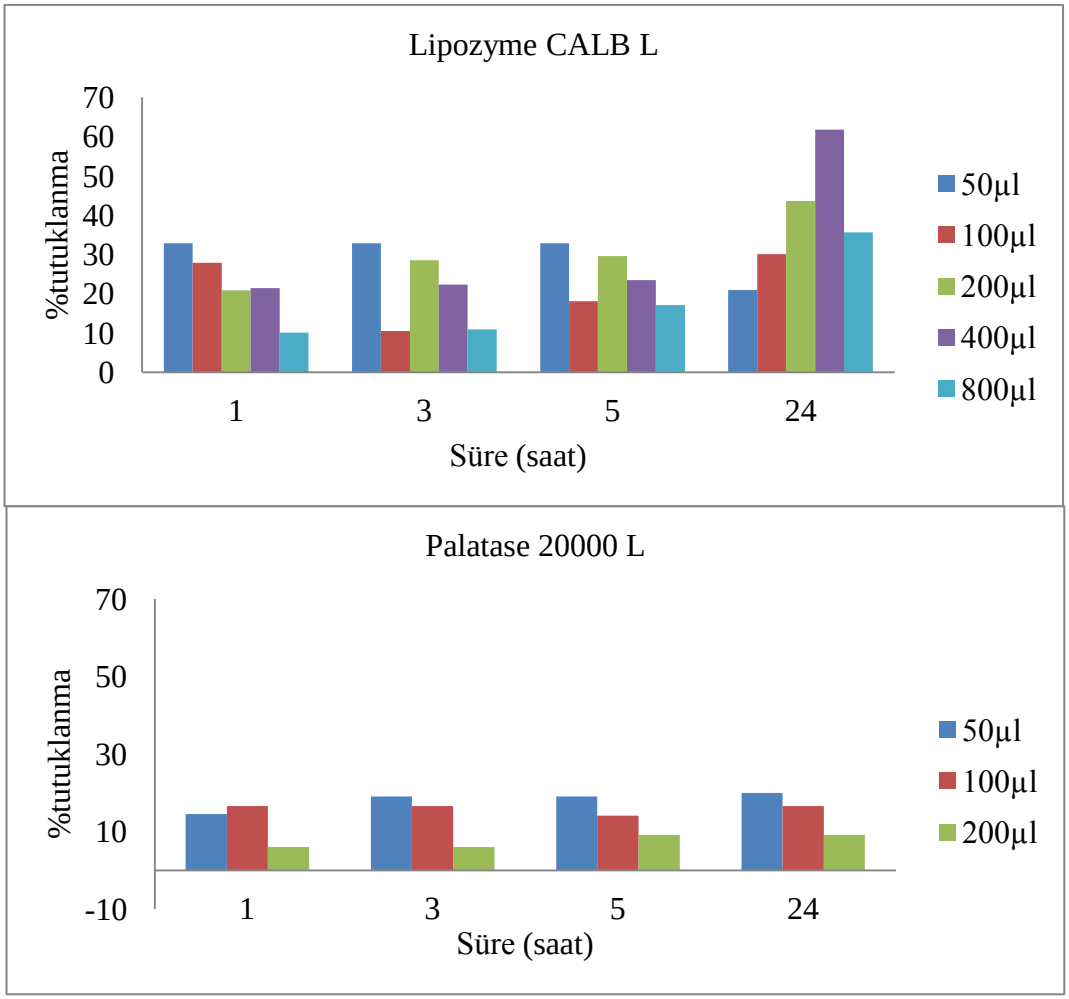




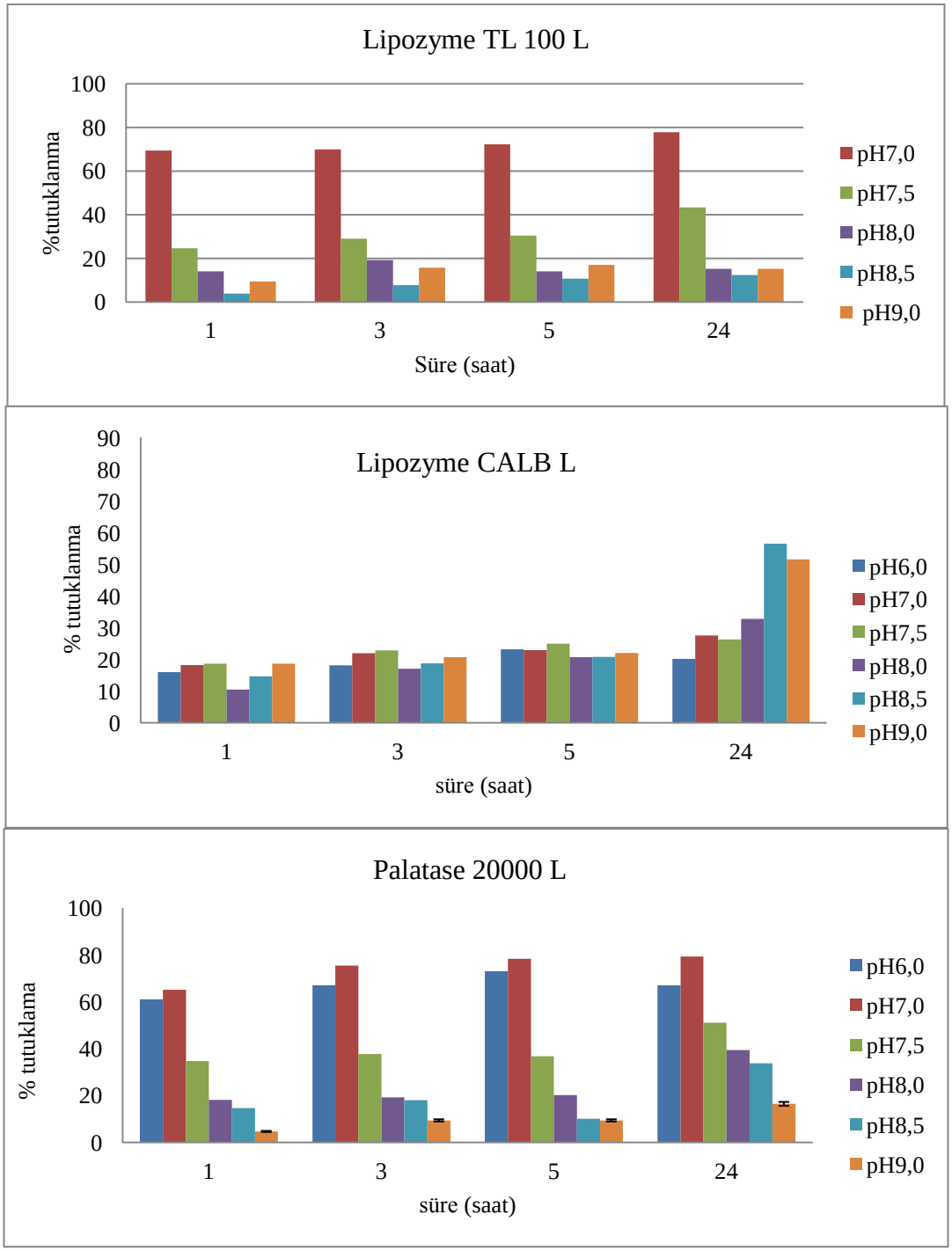


Şekil B.3. Celite'e lipaz tutuklanmasında sıcaklığın tutuklanma verimine etkisi

EK-C

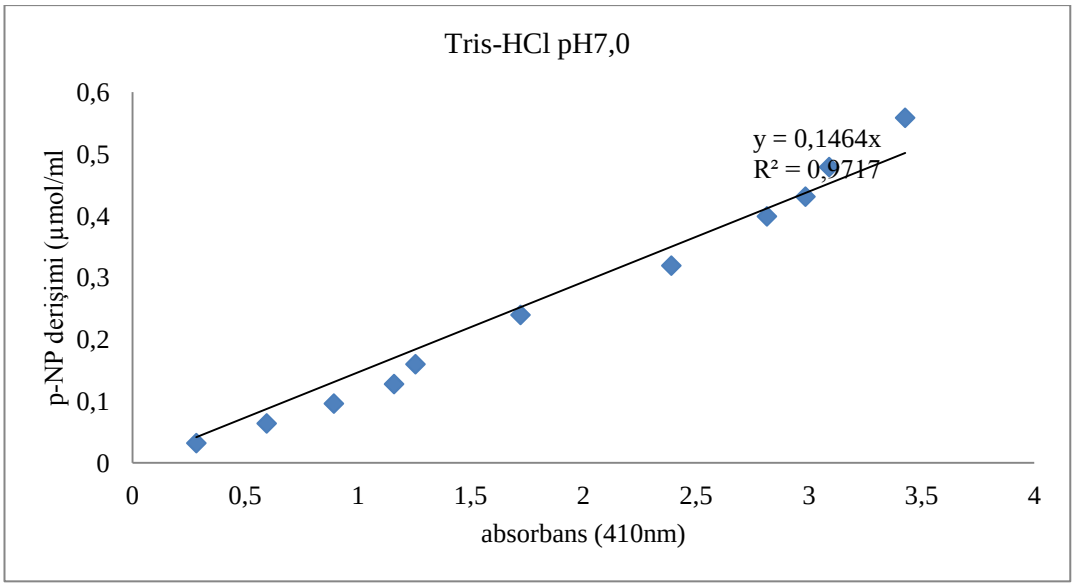


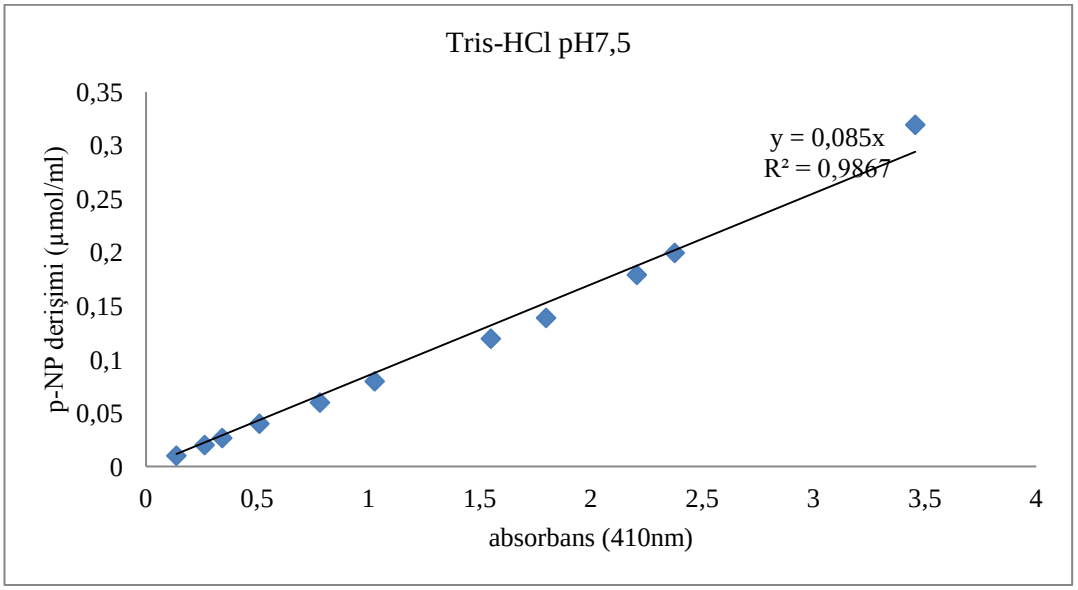
Şekil C.1. Çitosana Lipozyme CALB L ve Palatase 20000 L tutuklanmasında enzim derişiminin tutuklanma verimine etkisi



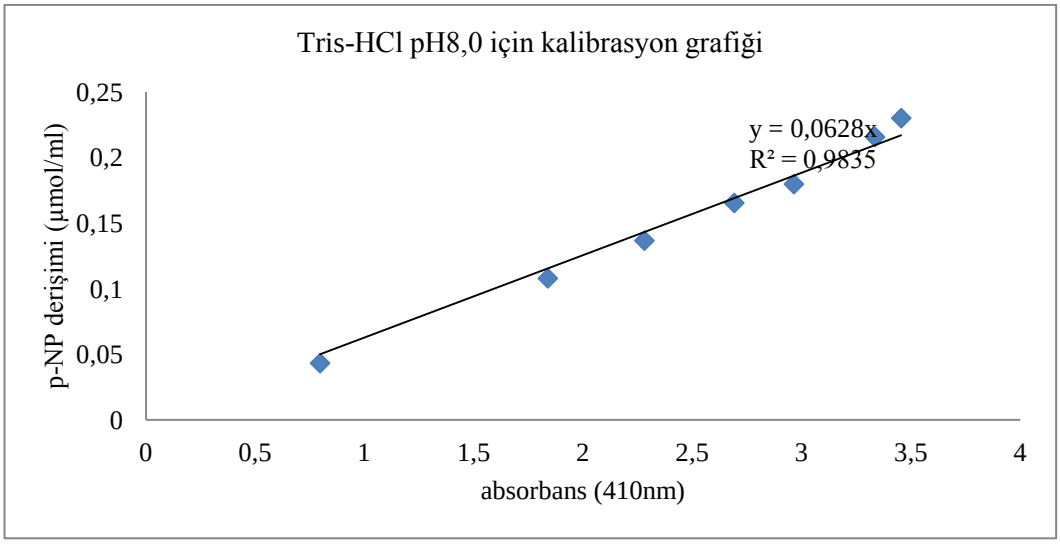
Şekil C.2. Çitosana lipaz tutuklanmasında tampon pH'ının tutuklanma verimine etkisi

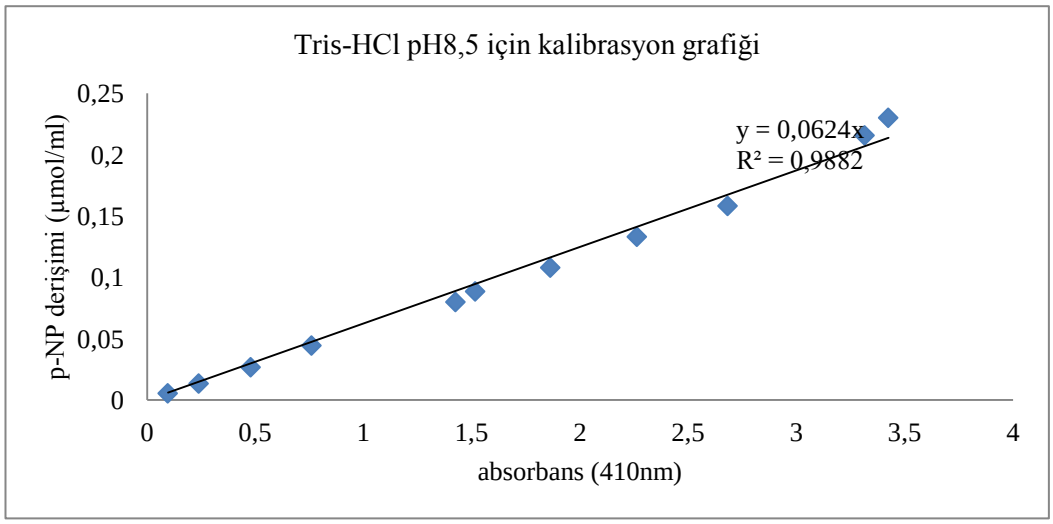
EK-D

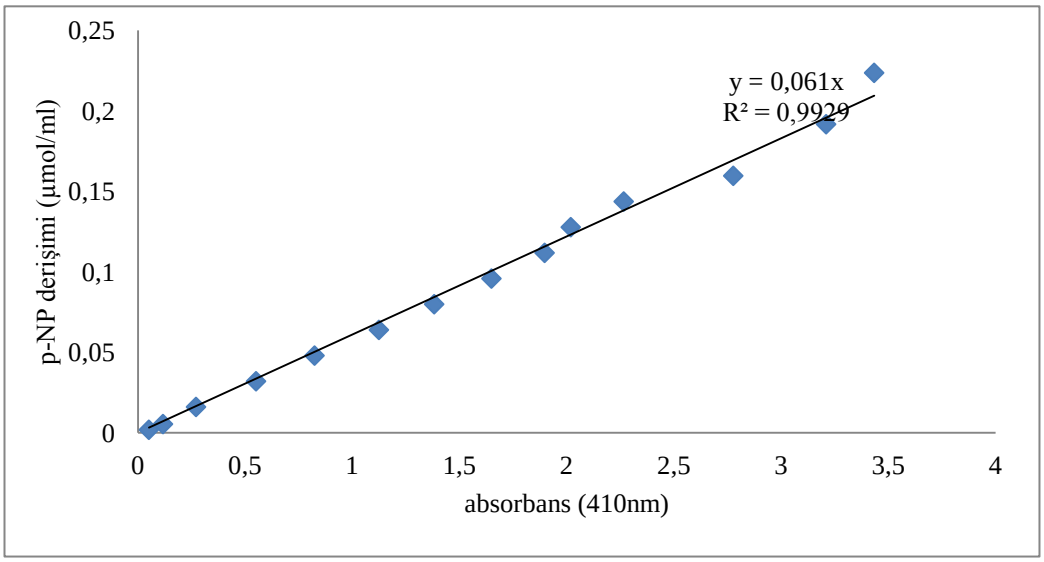




Şekil D.1. Enzim aktivitesi hesaplamasında pH7,0 ve pH7,5 0,1M Tris-HCl tampon çözeltilerinde kullanılan kalibrasyon grafikleri







Şekil D.2. Enzim aktivitesi hesaplamasında pH8,0 pH8,5 ve pH9,0 0,1M Tris-HCl tampon çözeltilerinde kullanılan kalibrasyon grafikleri

EK-E

% Serbest Yağ Asidi Tayini Örnek Hesaplama

$$\%FFA=\frac{V_{titrant}\times N_{titrant}\times M_{A,OA}}{m_{örnek}\times 10}$$

$V_{titrant}$=6,2ml

$N_{titrant}$=0,1N

$M_{A,OA}$= 282,47 g/mol

$M_{örnek}$= 0,58g

$$\%FFA=\frac{6,2ml\times\frac{0,2mol}{L}\times\frac{282,47g}{mol}}{0,58g\times 10}=\%30,1$$

EK-F

Oleik Asit Dönüşümünün Hesaplanması (%)

$$\%\text{oleik asit dönüşümü} = \frac{FFA_0 - FFA_t}{FFA_0} \times 100$$

FFA_0=%90 (reaksiyon karışımında başlangıçtaki yağ asidi oranı)

FFA_t=%63 (herhangi bir t anında alınan örnekteki serbest yağ asidi oranı)

$$\%\text{oleik asit dönüşümü} = \frac{0,9-0,63}{0,9} \times 100 = \%30$$

KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

[1] **Gürkaya, B.,** Akbin, H., M., Uyar, B., Kapucu. N., Biyodizel Üretimi İçin *Thermomyces lanuginosa* Lipazının Farklı Desteklere Tutuklanması, *4.Enerji Verimliliği ve Kalitesi Sempozyumu,* TMMOB Elektrik Mühendisleri Odası, Kocaeli, Türkiye, 12-13 Mayıs 2011.

[2] **Gürkaya, B.,** Akbin, H., M., Uyar, B., Kapucu. N., İlgen, O., Biodiesel Production by Lipase on Different Orgins Immobilized on Mg-Al Hydrotalcite , *Energy Challenges for Advenced Meterials and Proceses Harvesting Storage and Efficient Utilization*, Kapadokya, Türkiye, 25-29 Mayıs 2011.

[3] **Gürkaya, B.,** Akbin, H., M., Uyar, B., Kapucu. N., Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Lipazların Hidrotalsit, Celite ve Çitosana Tutuklanma Performansı, *25.Ulusal Kimya Kongresi,* Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye, 27 Haziran - 02 Temmuz 2011.

[4] **Gürkaya, B**., Akbin, H., M., Uyar, B., Kapucu. N., Mg-Al Hidrotalsite Tutuklanmış Lipaz Katalizli Transesterifikasyon, *25.Ulusal Kimya Kongresi,* Erzurum, Türkiye, 27 Haziran - 02 Temmuz 2011.

[5] **Gürkaya, B**., Akbin, H., M., İlgen, O., Uyar, B., Kapucu. N., Biodiesel Production from Canola Oil by Thermomyces Lanuginose Immobilized on Mg-Al Hydrotalcite, *4th National Catalyst Conference***,** Kataliz Derneği, Kocaeli, Türkiye, 21-24 Mart 2012.

ÖZGEÇMİŞ

Bahar Gürkaya Kutluk, 1 Eylül 1986 yılında İzmir ili Bergama ilçesinde dünyaya gelmiştir. İlkokulu, Karaveliler Köyü Birleştirilmiş Sınıflı İlkokulu'nda 1997 yılında tamamlamıştır. Orta öğrenimini Yukarıbey İlköğretim Okulu'nda tamamlamıştır. Lise öğrenimini 2004 yılında Bergama Akif Ersezgin Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2009 yılında T.C. Kocaeli Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden mezun olmuştur. Akabinde yüksek lisans eğitimine T.C. Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda başlamıştır. Danışmanı Yrd. Doç. Dr. Nurcan Kapucu yürütücülüğünde "Biyodizel Yakıt ve Biyoyağlayıcıların Yenilenebilir Kaynaklardan Lipaz Katalizli Üretimi" başlıklı Tübitak Destekli Bilimsel Araştırma Projesi'nde görev almıştır. Aynı bölümde araştırma görevlisi olan Kimya Mühendisi Togayhan Kutluk ile evlidir.