KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KANOLA YAĞINDAN HİDROTALSİTE TUTUKLANMIŞ LİPAZ İLE BİYODİZEL ÜRETİMİ

HAVVA MELDA AKBİN

KOCAELİ 2012

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KANOLA YAĞINDAN HİDROTALSİTE TUTUKLANMIŞ LİPAZ İLE BİYODİZEL ÜRETİMİ

HAVVA MELDA AKBİN

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

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

Doç.Dr. Sevil YÜCEL
Jüri Üyesi, YTÜ .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 30.01.2012

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmam sırasında bilgi ve tecrübesiyle yanımda olan danışmanım Sayın Yard. Doç.Dr. Nurcan Kapucu'ya,

Danışman hocam kadar beni destekleyen hocalarım Sayın Yard. Doç.Dr. Başar Uyar ve Sayın Yard. Doç.Dr. Oğuzhan İlgen'e,

Bölümde her zaman yaşam tecrübesiyle yanımda olduğunu hissettiğim Sayın Yard. Doç.Dr. Ayşe Aytaç'a

Tüm bölüm hocalarıma,

Polimer grubu arkadaşlarım Nevin Gamze Karslı Yılmaz, Şebnem Kemaloğlu Doğan, Dilek Turan ve Hümeyra Şirin'e ve aynı odayı paylaştığım oda arkadaşlarım Bahar Gürkaya Kutluk ve Merve Ercan Kalkan'a,

Bölümde yoğun çalışmalardan bunalınca yanına gidip dertleştiğim, bize yemek sonrası o güzel kahveleri pişiren Nurdan Öztemel'e, gittiğimiz kongrelerde bizi yalnız bırakmayan Togayhan Kutluk'a,

Bu zorlu yolda beni destekleyen aileme çok teşekkür ederim…

Haziran - 2012 Havva Melda Akbin

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 5
1.1. Biyodizel 5
1.1.1. Biyodizelin teknik özellikleri 5
1.2. Biyodizel ve Çevre 7
1.2.1. Biyodizel üretiminde kullanılan yağlar 10
1.2.2. Kanola yağının biyodizel üretiminde kullanımı 11
1.3. Lipazlar 13
1.3.1. Spesifik olmayan lipazlar 15
1.3.2. 1,3-Spesifik lipazlar 16
1.3.3. Yağ asidi spesifik lipazlar 16
1.4. Enzim Tutuklama Yöntemleri 18
1.4.1. Adsorpsiyon 18
1.4.2. Çapraz bağlama 19
1.4.3. Hapsetme 19
1.4.4. Kapsülleme 20
1.5. Biyodizel Üretim Yöntemleri 22
1.5.1. Seyreltme 22
1.5.2. Mikroemülsiyonlar 22
1.5.3. Piroliz 22
1.5.4. Hidroişlem 22
1.5.5. Transesterleşme 23
1.5.6. Süperkritik akışkanlarla transesterleşme 25
2. TRANSESTERLEŞME TEPKİMESİNDE KULLANILAN KATALİZÖRLER 27
2.1. Homojen Katalizörler 27
2.2. Heterojen Katalizörler 28
2.3. Asit Katalizörler 29
2.4. Baz Katalizörler 30
2.5. Enzim Katalizörler 31
2.5.1. Enzim katalizli biyodizel üretimine etki eden faktörler 33
2.5.1.1. Yağ seçimi 33
2.5.1.2. Alkol seçimi 36
2.5.1.3. Enzim ve tutuklama desteği seçimi 39
2.5.1.4. Su miktarı 43

2.5.1.5. Yağ/ metanol mol oranı 45
2.5.1.6. Sıcaklık 48
2.5.1.7. Süre 51
3. MALZEME VE YÖNTEM 55
3.1. Malzemeler 55
3.1.1. Kimyasallar 55
3.1.2. Cihaz ve araç-gereçler 56
3.2. Yöntemler 61
3.2.1. Deneysel yöntemler 57
3.2.1.1. Üre hidrolizi ve yanma yöntemleriyle Mg- Al hidrotalsit hazırlama 57
3.2.1.2. Mg-Al hidrotalsit üzerine lipaz tutuklanması 58
3.2.1.3. Kanola yağından biyodizel üretimi 59
3.2.2. Analiz yöntemleri 60
3.2.2.1. Protein tayini 60
3.2.2.2. Enzimatik aktivite tayini 61
3.2.2.3. BET yüzey alanı ölçümü 61
3.2.2.4. Metil ester dönüşümü tayini 61
3.2.3. İstatistiksel Deney Tasarımı (Yüzey Cevap Yöntemi, RSM) 61
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA 63
4.1. Destek Hazırlama, Enzim Tutuklama ve Farklı Parametrelerin EnzimTutuklamaya Etkisi 63
4.1.1. Lipaz tutuklama 63
4.1.1.1. Farklı yöntemlerle hazırlanmış Mg-Al hidrotalsitlerin enzim tutuklama performanslarının karşılaştırılması 64
4.1.1.2. Enzim miktarı 65
4.1.1.3. pH 67
4.1.1.4. Sıcaklık 70
4.2. Kanola Yağından Biyodizel Üretimi 71
4.2.1. Su miktarının etkisi 71
4.2.2. Sıcaklığın etkisi 73
4.2.3. Katalizör miktarının etkisi 74
4.2.4. Yağ/metanol mol oranının etkisi 75
4.2.5. Farklı sıklıkta metanol eklemenin etkisi 76
4.3. Yüzey Cevap Yöntemi (RSM) 77
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 83
KAYNAKLAR 85
EKLER 96
ÖZGEÇMİŞ 101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Petrol kökenli dizel ile CO_2 arasındaki ilişki……..... 9
Şekil 1.2. Biyodizel ile CO_2 arasındaki ilişki……9
Şekil 1.3. Biyodizel ve dizel emisyonlarının karşılaştırılması……... 9
Şekil 1.4. Alternatif yakıt emisyonlarının karşılaştırması…… 10
Şekil 1.5. Kanola, aspir, mısır, soya bitkileri……... 10
Şekil 1.6. Humicola lanuginosa üç boyutlu yapısı……... 14
Şekil 1.7. Spesifik olmayan lipazların katalizlediği hidroliz reaksiyonu……..... 15
Şekil 1.8. Yağ asidi spesifik lipazların katalizlediği reaksiyon…… 16
Şekil 1.9. Adsorpsiyon yöntemiyle enzim tutuklama…….. 18
Şekil 1.10. Çapraz bağlama yöntemi ile enzim tutuklama……. 19
Şekil 1.11. Hapsetme yöntemi ile enzim tutuklama……... 20
Şekil 1.12. Kapsülleme yöntemi ile enzim tutuklama…… 20
Şekil 1.13. Transesterleşme tepkimesi……... 23
Şekil 1.14. Transesterleşme tepkimesinin basamakları……..24
Şekil 2.1. Asit katalizörlü transesterleşme mekanizması……. 30
Şekil 2.2. Sabunlaşma tepkimesi……..31
Şekil 2.3. Lipaz katalizli transesterleşme mekanizması……... 33
Şekil 2.4. Lipaz katalizli üç basamaklı transesterleşme tepkimesine kullanılan silika miktarının etkisi……. 37
Şekil 2.5. Kanola yağının tutuklanmış *Thermomyces lanuginosus* lipazı ile metanoliz tepkimesine sürenin etkisi……... 38
Şekil 2.6. Hidrotalsit tipi anyonik kilin yapısı……..40
Şekil 2.7. Tepkime süresinin metil ester verimine etkisi……..42
Şekil 2.8. Su miktarının kolza yağı metanolizine etkisi……... 44
Şekil 2.9. Su miktarının hurma yağı metanolizini katalizleyen lipaz aktivitesine etkisi……45
Şekil 2.10. Metanol/yağ mol oranının kolza yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi……46
Şekil 2.11. Metanol/yağ mol oranının hurma yağı metanolizine etkisi……..46
Şekil 2.12. Metanol/yağ mol oranının soya yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi……47
Şekil 2.13. Alkol derişiminin soya yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi……48
Şekil 2.14. Sıcaklığın soya yağı lipaz katalizli tarnsesterleşme tepkimesine etkisi... 49
Şekil 2.15. Sıcaklığın kolza yağı metanolizine etkisi……51
Şekil 2.16. Sıcaklığın soya yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi…….51
Şekil 2.17. Tepkime süresinin atık kızartma yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi……52
Şekil 2.18. Sürenin metil ester dönüşümüne etkisi……53
Şekil 3.1. Biyodizel üretiminde yağ ve gliserol fazı…… 59
Şekil 3.2. Bradford yöntemi……. 60

Şekil 4.1. Farklı yöntemlerle üretilen hidrotalsitlere tutuklanan enzim miktarları.. 64
Şekil 4.2. Tutuklama ortamına eklenen enzim miktarının tutuklanma verimine etkisi……..66
Şekil 4.3. Tutuklama ortamına eklenen enzim miktarının desteğe yüklenen protein miktarına etkisi…… 66
Şekil 4.4. Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100L'nin miktarının aktiviteye etkisi……... 67
Şekil 4.5. Lipazın hidrofobik yüzeye adsorplanması……... 68
Şekil 4.6. Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100L'nin aktivitesinin pH'a göre değişimi…….. 69
Şekil 4.7. Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100L'nin spesifik aktivitesinin pH'a göre değişimi…….. 69
Şekil 4.8. Hidrotalsite lipaz tutuklanmasında sıcaklığın tutuklanma verimine etkisi……..70
Şekil 4.9. Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100L'nin aktivitesinin sıcaklığa göre değişimi……71
Şekil 4.10. 1/4 ve 1/16 yağ/metanol mol oranlarında artan su miktarının YAME verimine etkisi……..72
Şekil 4.11. Susuz ortamda farklı yağ/metanol mol oranlarının YAME verimine etkisi..... 73
Şekil 4.12. Sıcaklığın YAME verimine etkisi ……... 74
Şekil 4.13. Katalizör miktarının YAME verimine etkisi ……75
Şekil 4.14. Farklı yağ/metanol mol oranlarında gerçekleşen transesterleşme tepkimesine su miktarının etkisi……...76
Şekil 4.15. 1 basamaklı ve 3 basamaklı metanol eklemenin YAME verimine etkisi……77
Şekil 4.16. Farklı sıklıkta metanol eklemenin metil ester verimine etkisi…… 77
Şekil 4.17. Sıcaklık-enzim oranının metil ester verimine etkisi…….79
Şekil 4.18. Sıcaklık-yağ/alkol mol oranının metil ester verimine etkisi…… 80
Şekil 4.19. Sıcaklık-su oranının metil ester verimine etkisi……...80
Şekil 4.20. Enzim oranı-yağ/alkol mol oarnının metil ester verimine etkisi…….81
Şekil 4.21. Enzim oranı-su oranının metil ester verimine etkisi…… 81
Şekil 4.22. Yağ/metanol mol oranı-su oranının metil ester verimine etkisi……...82

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. ASTM standartlarına göre biyodizel ve dizel yakıt içeriklerinin sınır değerleri……..5
Tablo 1.2. Biyodizel ve dizelin element bazında karşılaştırması…… 6
Tablo 1.3. Biyodizel ve dizel yakıtların karşılaştırılması……7
Tablo 1.4. Biyodizel üretiminde kullanılan yağlar……11
Tablo 1.5. Kanola yağının özellikleri…… 12
Tablo 1.6. Biyodizel üretiminde çözücülü ve çözücüsüz ortamda kullanıla mikrobiyal kaynaklı lipazlar…….....15
Tablo 1.7. Bazı mikrobiyal lipazların optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık ve pH değerleri…… 17
Tablo 1.8. Farklı tekniklerle tutuklanmış lipaz enzimi ile biyodizel üretimi…… 21
Tablo 1.9. Biyodizel üretim yöntemlerinin karşılaştırılması…….25
Tablo 2.1. Homojen asit ve baz katalizörlü biyodizel üretimi..... 29
Tablo 2.2. Farklı heterojen katalizör ile bitkisel yağın transesterleşmesi…… 29
Tablo 2.3. Farklı katalizör tiplerinin karşılaştırılması……...32
Tablo 2.4. Farklı alkollerle gerçekleşen lipaz katalizli transesterleşme tepkimeleri..... 36
Tablo 2.5. Basamaklı metanol eklemeli enzimatik transesterleşme tepkimeleri….. 39
Tablo 2.6. Farklı lipaz enzimleriyle biyodizel üretimi.....42
Tablo 2.7. Su miktarının kanola yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi.....44
Tablo 2.8. Sıcaklığın pamuk tohumu yağı metanolizine etkisi……49
Tablo 2.9. Sıcaklığın kanola yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi..... 50
Tablo 2.10.Tepkime süresinin rafine pamuk tohumu yağı metanolizine etkisi……. 52
Tablo 2.11. Lipaz katalizli farklı biyodizel üretim çalışmaları…….. 53
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar…..... 59
Tablo 3.2. 1/4 yağ/metanol mol oranında yapılan deney parametreleri…… 60
Tablo 3.3. Farklı yağ/metanol mol oranlarıyla yapılan deney parametreleri..... 60
Tablo 3.4. 1/16 yağ/metanol mol oranında yapılan deneylerin parametreleri…….. 60
Tablo 4.1. Farklı yöntemlerle hazırlanan hidrotalsit desteklerin BET yüzey alanı…..... 65
Tablo 4.2. pH'ın hidrotalsite tutuklanan enzim miktarına etkisi……...68
Tablo 4.3. pH'ın hidrotalsite tutuklanan enzim verimine etkisi.....69
Tablo 4.4. Hidrotalsite lipaz tutuklanmasında sıcaklığın desteğe yüklenen enzim miktarına etkisi……..70
Tablo 4.5. RSM analizi için seçilen noktalar…… 77
Tablo 4.6. Bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu, deneysel ve tahmini cevaplar……..... 78
Tablo 4.7. İkinci dereceden model için varyans analizi (ANOVA)..... 79

KANOLA YAĞINDAN HİDROTALSİTE TUTUKLANMIŞ LİPAZ İLE BİYODİZEL ÜRETİMİ

ÖZET

Bu çalışmada hidrotalsite tutuklanmış lipaz enzimi ile çözücüsüz ortamda kanola yağından biyodizel üretimi amaçlanmıştır. Lipazlar (Lipozyme TL *Thermomyces lanuginosa, Candida antarctica, Rhizomucor miehei*) desteğe tutuklanarak katalizör olarak kullanılmıştır. Bir destek malzemesi olarak Mg-Al hidrotalsit, üre hidrolizi ve yanma yöntemleri ile sentezlenmiştir. Tampon pH'ı, sıcaklık, enzim miktarı, tutuklama süresi gibi parametrelerin tutuklama üzerine etkileri incelenmiştir. Katalizör, Lipozyme TL 100L'nin üre hidroliz yöntemi ile hazırlanan Mg-Al hidrotalsite tutuklanması ile elde edilmiştir. Tutuklama koşulları; pH 8,5 tris HCl tampon, 37 ^{0}C ve 50 µl enzim/0.01 g hidrotalsittir. 24 saat sonunda tutuklama verimi % 90, tutuklanan enzim miktarı 82 mg protein/g destek, hidrolitik aktivite 9 U/g destektir. Daha sonra su içeriği, sıcaklık, enzim miktarı, yağ/metanol mol oranı, tek basamaklı ve üç basamaklı metanol ekleme ve farklı sıklıklarda metanol ekleme gibi parametrelerin metil ester dönüşümüne etkisi incelenmiştir. Yüzey cevap yöntemi ile optimum koşullar belirlenmiştir. % 100 metil ester dönüşümüne ulaşılmıştır. Koşullar; 25 ^{0}C , 1/4 yağ/metanol mol oranı, % 3 katalizör , % 0,8 su ve 24 saattir. RSM sonucu elde edilen metil ester dönüşümü ise % 96,4'tür ve tepkime koşulları 35 ^{0}C, 24 saat, % 5,25 enzim, 1/5 yağ/metanol mol oranı, % 5 sudur. Sonuç olarak oda sıcaklığında yüksek metil ester dönüşümü (% 100) elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyodizel, Hidrotalsit, Kanola Yağı, Lipaz.

BIODIESEL PRODUCTION FROM CANOLA BY IMMOBILIZED LIPASE ON HYDROTALCITE

ABSTRACT

In this study, biodiesel production from canola oil by lipase immobilized on hydrotalcite without any solvent is aimed.. Lipases (Lipozyme TL *Thermomyces lanuginosa*, *Candida antarctica*, *Rhizomucor miehei*) were used as a catalyst by immobilized on a support. Mg-Al hydrotalcite as a support material were synthesized by urea and combustion methods. The parameters affecting immobilization such as buffer pH, temperature, amount of enzyme, time of immobilization were investigated. The catalyst were obtained by immobilizing of Lipozyme TL 100L on Mg-Al hydrotalcite prepared by the method of urea hydrolysis. The immobilization conditions were pH 8,5 tris HCl buffer, 37 ^{0}C and 50 µl enzyme/0.01 g hydrotalcite. Immobilization efficiency was % 90, the amount of immobilized enzyme was 82 mg protein/g support, hydrolytic activity was 9 U/g support at the end of 24 hour. Afterwards, the effects of parameters such as conversion of metyl ester such as water content, temprature, amount of enzyme, oil/methanol mol ratio, adding a methanol in a different way and addig of methanol in different frequencies were investigated. The optimum conditions were determined by response surface methodology. % 100 conversion of methyl ester was reached. The conditions are 25 ^{0}C, 1/4 oil/methanol mol ratio, % 3 catalyst,% 0,8 water and 24 hours. Conversion of methyl ester obtained by the RSM is % 96,4 and the reaction conditions are 35 ^{0}C, 24 hour, % 5,25 enzyme, 1/5 oil/methanol mol ratio, % 5 water. As a result, high methyl ester conversion was obtained at room temperature.

Key Words: Biodiesel, Hydrotalcite, Canola Oil, Lipase.

GİRİŞ

Son 25 yıldır yaşam koşullarının iyileşmesi, taşımacılığın artması, plastik ve petrokimyasalların kullanımının artışı sebebiyle dünya çapında petrol tüketimi sürekli artış göstermektedir (URL-1). 1985 yılında dünyada toplam petrol tüketimi 2807 milyon ton iken, 2008 yılında bu değer 3928 milyon tona çıkmıştır (URL-2). Yakıt kaynağı olarak petrol, oldukça kısıtlı ve pahalıdır (Demirbaş, 2009). Ayrıca atmosferdeki CO_2 emisyonunun başlıca kaynağı petrol kökenli ürünlerdir. Bugün dünya genelinde taşımacılık sektörünün büyük kısmı petrol kökenli yakıta bağımlıdır. Dünya CO_2 emisyonlarının 1/5'i taşımacılık sektöründen kaynaklanır (Goldemberg, 2008), bu da dünya yağ tüketiminin % 60'ına karşılık gelmektedir (International Energy Agency, 2008). Tüm dünyada 2007 yılı itibariyle 806 milyon araba ve hafif kamyon bulunmaktadır. Bu sayının 2030 yılında 1,3 milyar, 2050 yılında 2 milyara çıkacağı tahmin edilmekte. Bu artış dünya yağ rezervlerini etkilediği gibi dünya iklimi ve ekosistemi de etkileyecektir (Balat ve Balat, 2009a, 2009b). Fosil yakıta olan ilginin azaltılıp, alternatif, sürdürülebilir yakıt kaynaklarına yönelmenin sağlanması için aktif araştırma programları bulunmaktadır (Namasivayam ve diğ., 2010).

Rüzgar, güneş, jeotermal ve biyokütle gibi birçok alternatif enerji kaynağı bulunmaktadır. Bunların arasından biyokütle sürdürülebilir enerji kaynağı olması açısından önemlidir. Fakat bu alternatif enerji kaynaklarından bazıları da ekonomik uygunluk açısından öne çıkmaktadır. Ancak önemli olan her iki kriteri de sağlayabilen bir enerji kaynağı olmasıdır ki o da biyoyakıttır. Biyokütle her türlü bitkisel maddeyi içerir. Biyokütlenin diğer maddelerden en belirgin farkı, biyolojik ve termokimyasal dönüşüm ile çeşitli katı, sıvı, gaz yakıtların elde edilebilmesidir. Biyokütle, dünyanın toplam birincil enerji kaynağının % 10,4'ü, yenilenebilir enerji kaynağının % 77,4'ünü oluşturur (Carlos ve Khang, 2008).

Biyoyakıtın dizel motorunda kullanımı ilk olarak 1900 yılında, dizel motorunun muciti Rudolf Diesel'in fıstık yağını dizel motorda yakıt olarak kullanması şeklinde olmuştur. Ancak daha sonra petrodizel kaynaklarının bol miktarda olmasıyla, bitkisel yağ yakıtlar ile ilgili araştırma ve geliştirmeler yavaşlamıştır. Son zamanlarda petrol kökenli yakıtların hızla azalması sebebiyle çevre dostu, yenilenebilir kaynaklı biyoyakıtlar tekrardan gündeme gelmiştir (Agarwal ve Das, 2001; Murugesan ve Umarani, 2009). Biyoyakıtlar çeşitli biyohammeddelerden üretilebilmektedir ve bu yakıtlar yenilenebilir, sürdürülebilir, geri dönüşümlü ve çevre dostudur. Bu özellikleri sebebiyle biyoyakıtlar yeşil endüstriyi ve çiftçiliği cesaretlendirir. Ayrıca motorlarda çok az bir değişim yapılarak veya hiçbir değişiklik olmadan biyoyakıtlar motor yakıtı olarak kullanılabilir. Brezilya, Birleşik Devletler, Almanya, Avustralya, İtalya ve Avusturya gibi ülkelerde biyoyakıt olarak biyoetanol ve biyodizel kullanılmaktadır.

Biyodizel kullanımının bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Avantajları;

- ✓ Biyodizel, dizel motorlarda herhangi bir değişiklik yapılmadan kullanılabilir.
- ✓ Petrodizelin depolandığı koşullarda depolanabilir.
- ✓ Çevreye herhangi bir zararı olmadığı için kullanımı ve taşınması oldukça güvenlidir. Ayrıca petrodizele göre yüksek parlama noktasına sahip olması yine güvenlik açısından önemlidir.
- ✓ Saf bir şekilde kullanılabileceği gibi petrodizelle de belli oranlarda karıştırılarak kullanılabilir.
- ✓ Petrodizele göre çevreye yaydığı emisyon miktarı çok daha azdır.
- ✓ Yağlayıcılık özelliği iyidir.

Dezavantajları;

- ✓ Düşük sıcaklık özelliği-özellikle hurma yağından elde edilen- memnun edici değildir.
- ✓ Yüksek viskozite
- ✓ Daha düşük enerji içeriği
- ✓ Daha yüksek nitrojen-oksit (NO_x) emisyonu
- ✓ Yüksek fiyat

✓ Yenebilir yağlardan biyodizel üretimi, dünya gıda ihtiyacının karşılanmasında sıkıntı yaratabilir.

Biyodizel üretimi, seçilen katalizöre göre kimyasal veya enzimatik yöntem ile gerçekleşebilmektedir. Enzim katalizör yerine kimyasal katalizörlerin kullanımı yüksek reaksiyon hızı ve dönüşüm için endüstride tercih edilir. Ancak; ayırma işlemlerinin maliyeti, yan ürünlerin giderilmesindeki zorluklar sebebiyle alternatif üretim yöntemleri araştırılmaktadır. Lipazlar yardımıyla gerçekleştirilen enzimatik transesterleşmede hem son ürün olarak çıkan gliserolün kolayca ayrılması hem de yüksek saflıkta ürün elde edilmesi biyodizel üretiminde dikkat çeken bir yöntemdir. Bunu yanında, enzimatik yöntemde tepkime koşulları daha ılımlıdır. Böylece daha az enerji gereksinimi sağlanır. Diğer yandan, enzimatik transesterleşme daha yavaş gerçekleşir ve pahalı bir yöntemdir. Fakat enzim uygun bir desteğe tutuklanarak tekrar tekrar kullanımı sağlandığı takdirde tepkime daha ekonomik hale gelebilir (Mittelbach ve Remschmidt, 2006).

Kanola, bitkisel yağ kaynağı olarak bugün dünyada soyadan sonra en fazla üretilen değerli bir yağ bitkisidir. Ülkemizde özellikle son yıllarda kanolaya büyük ilgi ve talep başlamış, kanola tarımını geliştirmek amacıyla 2002 yılından itibaren Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından kanola üreticilerine prim ödenmesi kararlaştırılmıştır. 2011 yılı kanola üretimi için fark ödemesi miktarı 40 Kr/kg'dır (URL-3). Konya Şeker'in tarımın sürdürülebilirliğini sağlamak ve çiftçinin gelirini arttırmak amacıyla altı yıl önce başlattığı kanola üretimi deneme çalışmaları başarıyla sonuçlanmıştır. Dünyanın değişik ülkelerinden getirilen 93 değişik tür kanola tohumu tarlalarda denenmiş, 4 yıl boyunca süren çalışmalar sonunda 5 çeşit kanola üretiminin Konya şartlarında yapılabileceği belirlenmiştir.

Bu çalışmada amacımız, sıvı formda temin ettiğimiz üç farklı serbest lipaz enzimini farklı yöntemlerle üretilen hidrotalsit desteklere tutuklamak, tutuklama işlemine etki eden parametreleri incelemek ve biyodizel üretimi için katalizör hazırlamak, ardından ürettiğimiz katalizör ile son yıllarda Türkiye ve dünyada üretimi gitgide artan kanola yağından biyodizel üretimini ve üretime etki eden farklı parametrelerin etkisini incelemektir.

Bu kapsamda Bölüm 1'de biyodizel ve biyodizel üretim sürecinde kullanılan hammaddeler ile ilgili bilgilerle, biyodizel üretim yöntemlerine değinilmiştir. Bölüm 2'de transesterleşmede kullanılan katalizör çeşitleri ve enzim katalizli transesterleşme tepkimesine etki eden parametreler ayrıntılı şekilde incelenmiş ve ilgili literatür çalışmalarına değinilmiştir.

Bölüm 3'te çalışmada kullanılan malzeme, ekipman ve analiz yöntemleri, Bölüm 4'te farklı hidrotalsit üretim yöntemleri sonucu elde edilen desteklerin karşılaştırması, Mg-Al hidrotalsite lipaz tutuklama sonuçları ve seçilen biyokatalizör ile farklı parametrelerde gerçekleştirilen transesterleşme tepkime sonuçları literatür bilgileriyle karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Bölüm 5'te ise elde edilen çalışma sonuçları ile ilgili çeşitli yorumlar, deneyler sırasında gözlemlenen eksiklikler ve bunların geliştirilmesi için bazı öneriler bulunmaktadır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Biyodizel

1.1.1. Biyodizelin teknik özellikleri

Biyodizel petrol kökenli dizel yakıtlara alternatif olabilecek temiz bir enerji kaynağıdır. Biyodizel de tıpkı dizel yakıt gibi sıkıştırma ateşlemeli motorlarda kullanılabilen bir yakıttır. Bazı ülkelerde biyodizelin başarılı şekilde tanıtımı ve ticarileştirilmesi, biyodizel ürün kalitesinin ve müşteri memnuniyetinin artmasıyla paralel bir şekilde gitmektedir. ASTM D6751 (ASTM=American Society for Testing and Materials) ve Avrupa standardı EN 14214 biyodizel ile ilgili standartlardır. Biyodizel yoğunluk, viskozite, iyot değeri, asit değeri, bulutlanma noktası, saflık noktası, bürüt yanma ısısı ve uçuculuk gibi yakıt ve fiziksel özellikleriyle vasıflandırılır. Tablo 1.1'de biyodizel ve dizel yakıtların bu özellikleri ASTM standardına göre karşılaştırmalı şekilde verilmiştir (Lotero ve diğ., 2006).

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

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

Biyodizelin dizel yakıta göre bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Taşınabilirlik, kolay elde edilebilirlik, yüksek yanma verimi, düşük sülfür ve aromatik içerik, yüksek setan sayısı ve biyobozunabilirlik gibi özellikler biyodizelin avantajları arasında sayılabilir (Demirbaş, 2009). Dezavantajları ise; yüksek viskozite, düşük enerji içeriği, yüksek bulutlanma noktası ve akma noktası, yüksek nitrojen oksit emisyonu, düşük motor hızı ve gücü, enjektörde koklaşma, yüksek fiyat ve motor aşınımı şeklindedir (Demirbaş, 2008). Biyodizelin dizel yakıta göre parlama noktası daha yüksektir. Bu özellik yakıtın depolanması ve taşınımı sırasında güvenlik açısından önemlidir (Demirbaş ve Balat, 2006). Biyodizelin setan sayısı (~50) dizel yakıttan daha yüksektir (Balat ve Balat, 2008), aromatik bileşik ve sülfür içermez, kütlece % 10-11 oranında oksijen barındırır (Chhetri ve diğ., 2008). Setan sayısı dizel yakıtın kalitesini, özellikle tutuşma kalitesini belirleyen bir özelliktir. Diğer bir ifadeyle, yakıtın motora enjekte edildiği anda tutuşmaya olan yatkınlığının ölçüsüdür. Biyodizelin tutuşma kalitesi, içeriğindeki yağ asidi metil esterinin yapısı ile belirlenir (Bamgboye ve Hansen, 2008). Viskozite de biyodizel için önemli bir özelliktir. En çok yakıt enjeksiyon ekipmanına etki eder ve düşük sıcaklıklarda yakıt viskozitesinin artması akışkanlık özelliğini değiştirir. Yüksek viskozite yakıt sprey atomizasyonunu kötü etkiler (Balat, 2008).

Tablo 1.2 ve 1.3'te biyodizel ve dizel yakıtın içeriğindeki element ve bileşik miktarları verilmiştir. Yapısında bulunan elektronegatif element oksijen sebebiyle biyodizel dizel yakıta göre daha polar bir yapıdadır ve bu sebeple biyodizelin viskozitesi daha yüksektir. Ayrıca bu elemental oksijen biyodizelin dizel yakıta oranla daha düşük ısıl değere sahip olmasının nedenidir (Kulkarni ve diğ., 2008). Isıl değer yakıtın enerji içeriğinin bir ölçüsüdür. Biyodizelin düşük ısıl değeri (LHV) No. 2 dizel yakıtın LHV değerinden kütle bazında % 12 daha azdır (16.000 Btu/lb, 18.300 Btu/lb) (Gerpen, 2009; Capehart, 2007).

Tablo 1.2. Biyodizel ve dizelin element bazında karşılaştırması (Kulkarni ve diğ., 2008)

Elementler	İçerik (%)	
	Biyodizel	Dizel yakıt
Karbon (C)	79,6	86,4
Hidrojen (H)	10,5	13,6
Oksijen (O)	8,6	-

Tablo 1.2. (Devam). Biyodizel ve dizelin element bazında karşılaştırması (Kulkarni ve diğ., 2008)

Nitrojen (N)	1,3	-
C/H	7,6	6,5

Tablo 1.3. Biyodizel ve dizel yakıtların karşılaştırılması (Kulkarni ve diğ., 2008)

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

Biyodizel saf halde veya dizel yakıtla belli oranlarda karıştırılarak kullanılabilir. En çok kullanılan biyodizel karışımları B2 (% 2 biyodizel, % 98 dizel), B5 (% 5 biyodizel, % 95 dizel), B20 (% 20 biyodziel, % 80 dizel) dir. Bu karışımların soğuk havalarda yakıt donması, düşük enerji yoğunluğu ve uzun süreli depolanmalarda yakıt bozulması gibi teknik dezavantajları bulunmaktadır (Balat, 2006). B20 karışım oranına kadar olan biyodizel/dizel karışımları neredeyse her tip dizel ekipmanda kullanılabilir, ayrıca depo ve taşıma araçlarının birçoğuyla uyumludur. Daha yüksek oranlı karışımlar ve B100 yakıtı, dizel motorda az bir değişiklik veya hiçbir değişim olmadan kullanılabilir. Fakat B100'ün depolanması ve nakliyesi için özel donanıma ihtiyaç vardır (Pandey, 2008).

1.2. Biyodizel ve Çevre

1. Biyodizelin çevre açısından en önemli avantajlarından biri yenilenebilir hammaddelerden elde edilerek sürdürülebilir bir enerji potansiyeline sahip olmasıdır.

2. Doğada biyolojik olarak hızlı ve kolay bozunabildiği için birikerek toksik etki yaratmamaktadır. Yapılan çalışmalarda biyodizelin suda 28 günde %95'inin, dizelin ise %40'ının bozunabildiği gösterilmiştir.

3. Atık bitkisel ve hayvansal yağlardan üretilebildiği için oluşan atık miktarı azaltılabilir. Böylece biyodizel üretimi, atıklardan enerjinin geri kazanıldığı çevre dostu bir proses olarak görülebilir.

4. Biyodizel emisyonları kimyasal olarak dizelden farklıdır; genellikle daha düşük CO, CO_2, SO_x, poliaromatik ve partiküler madde emisyonları içerir. AB tarafından yayınlanan araştırma raporu sonuçlarına göre; 1 litre dizel tüketiminden 3.2 kg CO_2 emisyonu meydana gelirken, biyodizel tüketiminde bu miktar 0.7 kg/L seviyesine kadar düşmektedir.

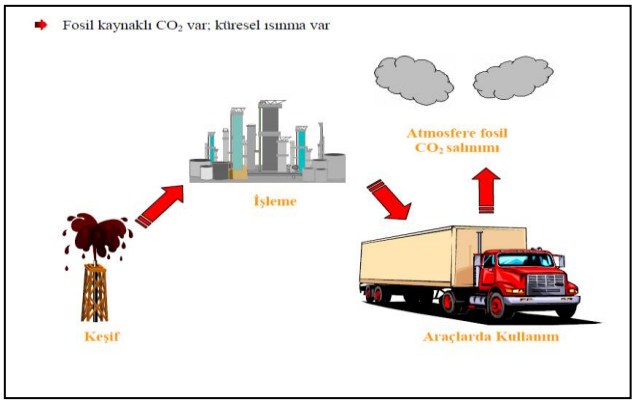
5. Sera gazları içinde büyük bir orana sahip olan CO_2 dünyanın en önemli çevre sorunlarından biri olan küresel ısınmaya neden olmaktadır. Yine CO_2 ile birlikte yanma sonucu açığa çıkan ve sera gazları arasında yer alan CO, NO_x, SO_x, emisyonları da sera gazı etkisini hızlandırmakta ve insan sağlığını tehdit etmektedir (Şekil 1.1). Biyodizel, tarımsal bitkilerden elde edilmesi nedeniyle, biyolojik karbon döngüsü içinde, fotosentez ile CO_2'i dönüştürüp karbon döngüsünü hızlandırdığı için sera etkisini artırıcı yönde etki göstermez (Şekil 1.2). Ayrıca CO, SO_x emisyonlarının, partikül madde ve yanmamış hidrokarbonların (HC) daha az salındığı kanıtlanmıştır.

6. Biyodizelin NO_x emisyonları dizel yakıta göre daha fazladır. Emisyon miktarı motorun biyodizel yakıta uygunluğuna bağlı olarak değişir. NO_x emisyonlarının %13 oranına kadar arttığı test edilmiştir. Bununla birlikte biyodizel kükürt içermez. Bu yüzden NO_x kontrol teknolojileri biyodizel yakıtı kullanan sistemlere uygulanabilir. Konvansiyonel dizel yakıtı kükürt içerdiği için NO_x kontrol teknolojilerine uygun değildir.

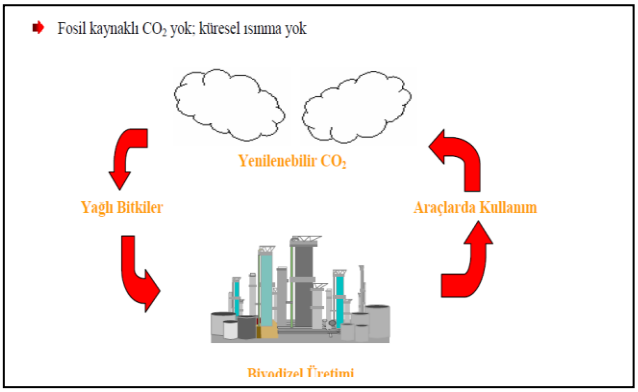
7. Ozon tabakasına olan olumsuz etkiler biyodizel kullanımında dizel yakıta nazaran % 50 daha azdır. Asit yağmurlarına neden olan kükürt bileşenleri biyodizel yakıtlarda yok denecek kadar azdır.

8. Biyodizel yakıtlarının yanması sonucu ortaya çıkan CO (zehirli gaz) oranı dizel yakıtların yanması sonucu oluşan CO oranından %50 daha azdır.

9. Ayrıca, biyodizelin sudaki canlılara karşı herhangi bir toksik etkisi yoktur. Buna karşılık 1 litre ham petrol 1 milyon litre içme suyunun kirlenmesine neden olabilmektedir (Dizge ve diğ., 2005).

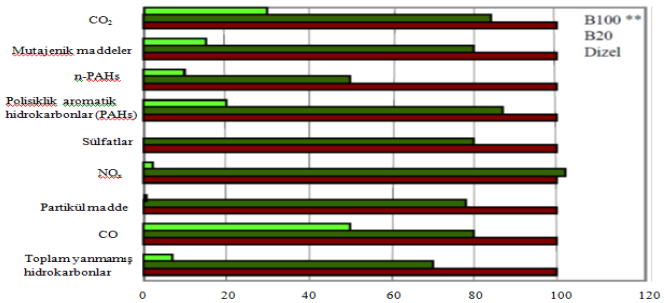


Şekil 1.1. Petrol kökenli dizel ile CO_2 arasındaki ilişki (Dizge ve diğ., 2005)

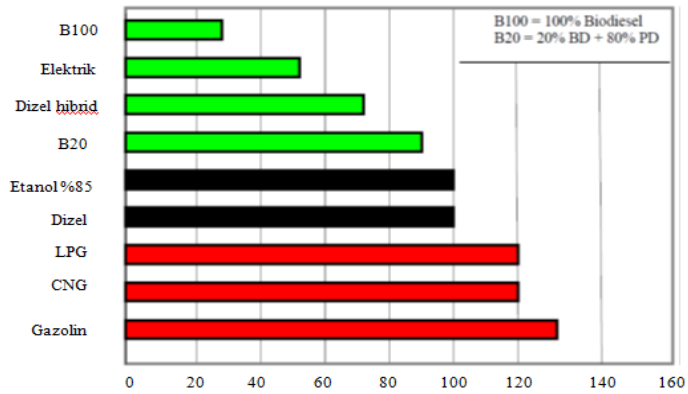


Şekil 1.2. Biyodizel ile CO_2 arasındaki ilişki (Dizge ve diğ., 2005)

Şekil 1.3'te B100 ve B20 emisyonlarının dizel emisyonları ile karşılaştırılması verilmiştir. Biyodizel ve dizel-biyodizel karışımı kullanımı ile CO, kanserojenik maddeler, CO_2, PAHs emisyonlarında azalma, NO_x emisyonlarında ise artma görülmektedir. Şekil 1.4'te biyodizel ile diğer alternatif yakıtların emisyonları karşılaştırılmıştır.



Şekil 1.3. Biyodizel ve dizel emisyonlarının karşılaştırılması (Dizge ve diğ., 2005)



Şekil 1.4. Alternatif yakıt emisyonlarının karşılaştırılması (Dizge ve diğ., 2005)

1.2.1. Biyodizel üretiminde kullanılan yağlar

Biyodizel; Şekil 1.5'te gösterilen ayçiçek, kanola, soya, aspir, pamuk, mısır gibi yağlı tohum bitkilerinden ham veya rafine olarak elde edilen bitkisel veya hayvansal yağların bir katalizör (asidik, bazik veya enzimatik) eşliğinde bir alkol ile (metanol veya etanol) reaksiyonu sonucunda açığa çıkan ve yakıt olarak kullanılan yenilenebilir bir üründür (Dizge ve diğ., 2005). Tablo 1.4'te biyodizel üretiminde kullanılan yağlar gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Kanola, aspir, mısır, soya bitkileri

1.2.2. Kanola yağının biyodizel üretiminde kullanımı

Kolza yağı, Cruciferae familyasından, Brassica napus ile campestris tohumlarından elde edilen bir yağdır. Kolza bitkisi toprak ile iklim koşulları bakımından fazla seçici olmadığı için tarımı bütün dünyada yapılabilmektedir. Kolza tohumu üretimin en yaygın olduğu ülkeler Çin, Hindistan, Pakistan, Japonya, İsveç, Polonya, Almanya, Şili, Fransa ve Kanada'dır. Ülkemizde de Bursa, İzmir, Van ile Akdeniz Bölgesinde tarımı yapılmaktadır. Kolza tohumlarının yağ miktarı yüzde 30-42 arasında değişmektedir. Genel olarak kolza yağı, yüzde 20-55 gibi yüksek orandaki erüsik asit içeriği ile bilinen bitkisel kaynaklı bir yağ çeşidir. Ancak tohum ıslah çalışmaları ile erüsik asit içeriği yüzde 0.1 değerine kadar düşürülebilmiştir. Bu tohumlardan elde edilen yağlar kanola yağı (canola oil) olarak bilinmektedir (URL-4).

Kanola yağı % 51–71 oranında oleik asit ve %15–30 linoleik asit içeren bir yağdır. Araştırma ve uygulamalar, kimyasal yapı olarak uzun, dallanmış ve tek çift bağlı yağ asitlerini içeren yağların uygun dizel yakıtı alternatifi olduğunu ve artan doymamışlık derecesinin setan sayısını olumsuz yönde etkilediğini ortaya koymuştur. Bu durum oleik asitçe zengin yağların alternatif yakıt olarak ön plana çıkmasına sebep olmuştur. Yüksek oleik asitli bitkisel yağların oksitlenme direnci daha iyidir. Her bir yağda yağ asidi zincirinin farklı tiplerinin oranı olarak bitkisel yağların kompozisyonları değişmektedir. Monodoymamış zincirler oksitlenme direnci için iyidir. Polidoymamış zincirler fakir oksitlenme direnci verir, fakat düşük sıcaklıkta davranış özelliği iyileşmektedir. Doymuş yağ asidi zincirinin düşük sıcaklık direnci çok azdır. Bu yüzden istenen yağ çoğunlukla monodoymamış, polidoymamış zincirler ve minimum doymuş zincirlerin karışımına sahip olacaktır. Bitkisel yağların transesterleşmedeki temel amaç; yağ içerisindeki gliserini ayırmak, yağın kaynama noktasını, parlama noktasını, akma noktasını ve özellikle viskozitesini düşürmektir (Oğuz, 2004). Tablo 1.5'te kanola yağının bazı özellikleri ile ilgili bilgi verilmiştir.

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

Yağ çeşidi	Yağ kaynağı
Başlıca yağlar	Hindistan cevizi, mısır, pamuk çekirdeği, kanola, zeytin, fıstık, aspir, susam, soya, ayçiçeği

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

Fındık yağları	Badem, kaju, fındık, pekan cevizi, antep fıstığı, ceviz
Diğer yenebilen yağlar	Kayısı, enginar, avakado, defne, kişniş tohumu, çam fıstığı, üzüm çekirdeği, limon çekirdeği, bamya tohumu, pirinç kepeği, don yağı, buğday tohumu
Yenemeyen yağlar	Alg, babassu ağacı, jatropa, kauçuk tohumu

Tablo 1.5. Kanola yağının özellikleri (URL-5)

Kanola yağı	
Özgül ağırlık, D_{20}	0,914-0,920
Kırılma İndisi, ND 40°C	1,465-1,467
Sabunlaşma Sayısı	182-193
İyot Sayısı	105-126
Major yağ asitleri bileşimi (%)	
Palmitik asit	2,5-7,0
Stearik asit	0,8-3,0
Oleik asit	51,0-70,0
Linoleik asit	15,0-30,0
Linolenik asit	5,0-14,0
Araşidik asit	0,2-1,2
Gadoleik asit	0,1-4,3

Düşük sıcaklıklarda petrol kökenli dizel jelleşerek veya kristalleşerek motorun durmasına sebep olur. Yakıt performansının bir ölçüsü de bulutlanma noktasıdır. Bulutlanma noktası yakıt içerisinde oluşan küçük katı kristallerin oluştuğu sıcaklıktır. Kanola yağından elde edilen biyodizelin bulutlanma noktası -3 $^{\circ}$C iken yenebilir donyağından ve soya yağından üretilen biyodizelin bulutlanma noktaları sırasıyla 19 $^{\circ}$C ve 3 $^{\circ}$C'dir. Oksidasyon sonucu aşındırıcı asitlerin oluşması ve birikmesi motorun yakıt pompası ve enjektöründe tıkanmalara neden olabilir. Genel olarak, düşük iyot değeri yağı daha kararlı yapar, düşük oksidayona ve daha az motor

tortusuna neden olur. Kanola için 114 olan iyot değeri soya yağı için 130'dur. EN 141214 standardı kanola ve ayçiçeği yağından üretilen biyodizel kullanılarak oluşturulmuştur (URL-6).

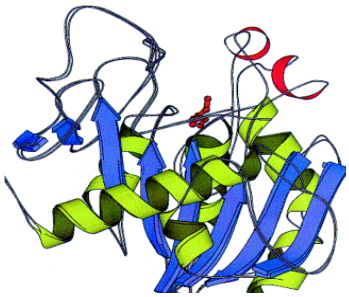
Kanola yağının bir diğer çok önemli avantajı dekar başına elde edilen yağ içeriğidir. Yağlı tohum pazarı için yapılacak öngörüde biyodizel için doğru yağlı tohum seçimi oldukça önemlidir. Doğru yağlı tohum tanımında ürün verimi oldukça önemlidir. Kanola % 42 yağ içeriği ile dikkat çekmektedir (URL-7). Özellikle Çin, Almanya, Hindistan ve Kanada dünyanın en önemli kanola yağı üreticileri ve tüketicileridir. Dünyada soyadan sonra en fazla üretilen değerli bir yağ bitkisi olan kanola soyadan farklı olarak daha çok ılıman ve serin iklim bölgelerinin bitkisidir. Ülkemizde, kanola gibi kışlık olarak başarıyla yetiştirilebilen yağ bitkisi sayısı oldukça sınırlıdır (Baydar, 2005; URL-8).

1.3. Lipazlar

Lipazlar hayvansal, bitkisel ve doğal veya genetik olarak iyileştirilmiş mikroorganizmalardan elde edilebilir. Bunların arasından, kolay üretilmesi ve pek çok hidrolitik ve sentetik reaksiyonu katalizlemesinden dolayı en fazla kullanılan ise mikrobiyal kaynaklı lipazlardır. Lipaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar doğal metabolik reaksiyonlara benzemesinden dolayı kimyasal reaksiyonlara oranla daha çevre dostu olarak tanımlanırlar. Düşük aktivasyon enerjileri sebebiyle lipazın katalizlediği reaksiyonlar daha düşük sıcaklık ve nötral pH gerektirir, enerji gereksinimi düşüktür ve de ürün ve substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir. Lipazlar genellikle optimum aktivitelerini 30-40 °C arasında göstermektedir. Lipazların elde edildiği kaynak, optimum aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık aralığını etkilemektedir (Kurashige ve diğ., 1989).

Lipazların esnek protein yapısına sahip olmaları; hidroliz, interesterleşme, transesterleşme (asidoliz, interesterleşme, alkoliz), aminoliz, oksimoliz ve tiotransesterleşme gibi pek çok reaksiyonu katalizlemelerini sağlar. Lipaz enziminin su kullanarak triaçilgliserolün ester bağlarını bölmesi olayına hidroliz denir. Transesterleşme ise açil radikallerinin bir ester ve bir asit (asidoliz), bir ester ve diğer bir ester (interesterleşme) veya bir ester ve bir alkol arasında değişimi olarak tanımlanabilir (Öztürk, 2001).

Lipazlar, suda çözünmeyen substrat fazı (trigliseridin olduğu faz) ile su fazının (enzimin bulunduğu faz) ara yüzeyindeki ester bağlarını hidrolizlerler. Lipazın bu ara yüzeydeki katalitik etkisi substratın nasıl kümeleneceğine bağlıdır (Erdoğan, 2003). 1990 yılında lipaz enziminin üç boyutlu yapısının (Şekil 1.6) ilk kez tanımlanmasından sonra ara yüzey aktivasyonu olayının, çözelti içindeki enzimin aktif merkezini bir kapak gibi çevreleyen ampifilik peptidik yapıdaki bir halkadan kaynaklandığı düşünülmüştür. Ara yüzeyin olmaması durumunda lipaz ikincil yapı elemanlarına sahiptir ve bu yapı enzimin substrata ulaşmasını engeller. Fakat, hidrofobik bir ara yüzey ile karşılaşması durumunda lipaz "açık yapı" durumuna geçer ve aktif hale gelir. Bu şekilde lipazlar katalitik merkezi çevreleyen hidrofobik alanlar aracılığıyla hidrofobik yüzeylere güçlü bir şekilde adsorbe olur (Öztürk, 2001).



Şekil 1.6. Humicola lanuginosa üç boyutlu yapısı (Karaca, 2006)

Bu enzim dünya çapındaki enzim satışlarının sadece % 4'lük kısmına sahiptir (Balcao ve Malcata, 1998; Paiva ve diğ., 2000). Enzimlerin sanayide kullanımının yaygınlaşmasını engelleyen en önemli nedenler ise düşük dayanım, aktivite ve seçicilikleridir. Bu sebeple, son yıllarda, lipazların hidroliz ve sentez reaksiyonlarındaki katalitik özelliklerinin geliştirilmesi için bazı kimyasal ve fiziksel işlemlere tabi tutulması gündeme gelmiştir (Öztürk, 2001). Buna ilave olarak moleküler biyoloji yolu ile enzimin maliyeti de düşürülebilir. Böylece de genetik özellikleri geliştirilmiş olan lipazın büyük miktarlarda üretimi sağlanabilir (Villeneuve ve diğ., 2000).

Biyodizel üretiminde lipaz enziminden bazıları kullanılabilirken bunlardan da sadece bir kısmı hem organik çözücü içersinde hem de çözücüsüz ortamda biyodizel

üretiminde kullanılabilmektedir (Tablo 1.6). Bu lipazların çoğu ticari amaçlı hücre dışı enzimler olup farklı desteklere tutukludur (Iso ve diğ., 2001; Adamczak ve Bednarski, 2004).

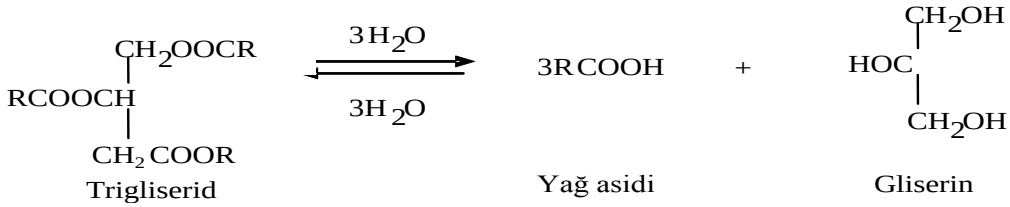
Tablo 1.6. Biyodizel üretiminde çözücülü ve çözücüsüz ortamda kullanılan mikrobiyal kaynaklı lipazlar

Organik çözücüde kullanılanlar	Çözücüsüz ortamda kullanılanlar
Pseudomonas fluorescens	*Pseudomonas fluorescens*
Pseudomonas cepacia	*Candida antarctica*
Rhizopus delemar	*Rhizopus oryzae*
Candida antarctica	*Candida rugosa*
Rhizopus oryzae	*Mucor miehei*
Mucor miehei	*Rhizomucor miehei*
Geotrichum candidum	*Thermomyces lanuginosa*
Candida rugosa	*Aspergillus niger*
	Pseudomonas cepacia

Enzimleri kimyasal reaksiyonlardan ayıran en önemli özellikleri seçicilikleridir. Lipazın seçicilik özelliği ise enzimin moleküler özellikleri, substratın yapısı ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörler tarafından kontrol edilir. Lipazların yağ asidi seçiciliği, tıbbi gıdalar için yağ üretimi ve yağın besin değerini arttırmak için yağ asitleri ile zenginleştirmek çin kullanılmaktadır. Lipaz spesifikliği üç ana grupta toplanır; spesifik olmayan lipazlar, 1,3-spesifik lipazlar, yağ asidi spesifik lipazlar (Öztürk, 2001; Telefoncu, 1995).

1.3.1. Spesifik olmayan lipazlar

Bu gruba giren lipazlar trigliseridlerin tüm pozisyonlarındaki açil gruplarını koparabilme yeteneğine sahip olup sonuçta trigliserid gliserin ve serbest yağ asitlerine parçalanır (Şekil 1.7). Reaksiyonda ara ürün olarak diaçil ve monoacilgliserinler oluşur.



Şekil 1.7. Spesifik olmayan lipazların katalizlediği hidroliz reaksiyonu

Candida cylindracae, Corynebacterium acnes, Staphylococcus aureus, Choromobacterium viscosum, Geotrichum candidum ve *Penicillium cyclopium* tarafından üretilen lipazlar bu gruba girer (Erdoğan, 2003; Telefoncu, 1995).

1.3.2. 1,3-Spesifik lipazlar

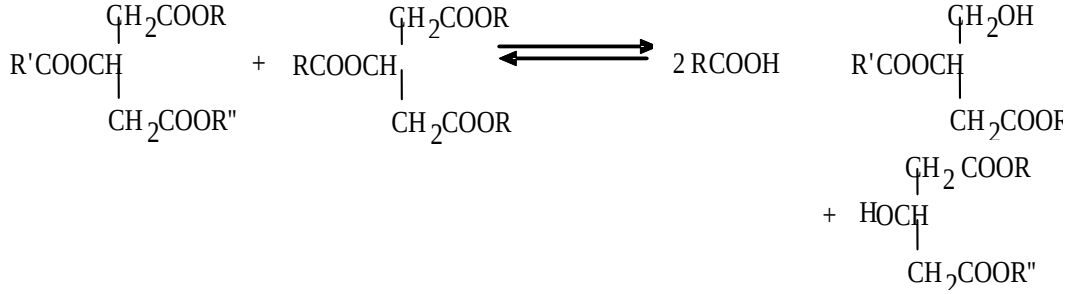
Bu gruptaki lipazlar nötral yağları eşdeğer konumda olan 1 ve 3 pozisyonlarından spesifik olarak hidrolizlerler. Reaksiyon sonunda triaçilgliserinlerden yağ asitleri, 1,2 (2,3) diaçilgliserinler ve 2-monoaçilgliserinler oluşur. 1,2 (2,3) diaçilgliserinler ve özellikle 2-monoaçilgliserinler kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3-diaçilgliserinlere ve 1(3)-monoaçilgliserinlere izomerleşirler.

Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılır ve 1,3 spesifik lipazlar da spesifik olmayan lipazlar gibi trigliseridleri serbest yağ asitleri ve gliserine kadar parçalarlar (Erdoğan, 2003; Telefoncu, 1995).

Domuz pankreas lipazı, *Aspergillus niger, Pseudomonas fluorescens, Humicola Lanuginosa, Rhizopus delemar, R. Japonicus, R. arrhizus* ve *Mucor javanicus* 1,3 spesifik lipazlara örnektir (Iwai ve Tsujisaka, 1984).

1.3.3. Yağ asidi spesifik lipazlar

Bu gruba ait lipaz türleri açilgliserinlerdeki bazı yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar. Şekil 1.8'de yağ asidi spesifik lipzların hidroliz reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 1.8. Yağ asidi spesifik lipazların katalizlediği reaksiyon

Lipazlar elde edildikleri kaynağa göre mikrobiyal, hayvansal ve bitkisel lipazlar olmak üzere üç grupta toplanırlar. Farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar arasında

üretimi ve uygulamadaki kolaylığı bakımından mikrobiyal lipazlar önde gelir. Bu lipazlar, birçok mantar, küf ve bakteriden elde edilmektedir (Erdoğan, 2003; Shahani, 1975).

Mikrobiyal lipazların molekül ağırlıkları genellikle 20.000 ile 60.000 arasındadır. Spesifik aktiviteleri ise 500 ile 10.000 U/mg protein dir. Bitki ve hayvan kaynaklı lipazlara göre termal kararlılıkları daha fazladır. Büyük çoğunluğu optimum aktivitelerini pH 5-7 arasında göstermektedir, fakat kullanılan substrata ve ortamda bulunan tuzlara bağlı olarak optimum pH değişebilmektedir. Tablo 1.7'de bazı mikrobiyal lipazların optimum pH ve sıcaklık aralıkları gösterilmektedir (Al-Taweel, 1995).

Tablo 1.7. Bazı mikrobiyal lipazların optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık ve pH değerleri (Al-Taweel, 1995)

Lipaz	Kaynağı	Optimum Sıcaklık (^{0}C)	pH
Lipaz A	*Aspergillus niger*	30-40	5,0-7,0
Lipaz M	*Mucor javanicus*	40-45	5,5-8,5
Lipaz P	*Pseudomonas sp.*	40-65	5,0-9,0
Lipaz F	*Rhizopus javanicus*	30-45	5,0-7,5
Lipaz D	*Rhizopus delemar*	30-45	5,0-7,0
Lipaz AY	*Candida cylindracea*	30-50	5,0-8,0
Lipaz L	*Candida lipolytica*	25-35	5,0-8,0
Lipaz G	*Penisillium cylopium*	30-50	4,5-7,5
Lipaz R	*Penisillium roquefoni*	25-35	6,0-8,0
Lipaz CE	*Humicola lanuginosa*	40-60	5,5-8,5
Lipaz CES	*Pseudomonas sp.*	50-65	5,0-10,0
Lipaz GC	*Geotrichum candidum*	40-50	5,0-8,0
Lipaz N	*Rhizopus niveus*	30-45	5,0-7,0
Lipaz AK	*Pseudomonas sp.*	45-55	9,0-11,0

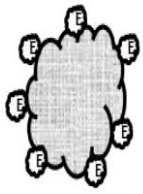
1.4. Enzim Tutuklama Yöntemleri

Ürün ayırmanın kolay olması, atık su işlemenin azalması, gliserol ayırma işleminin kolaylığı ve yan ürün oluşumunun olmaması gibi avantajlarından dolayı lipaz katalizli biyodizel üretimi kimyasal katalizörlü transesterleşmeye alternatif olarak düşünülebilir (Ravindra, 2006). Lipaz enziminin tepkimede serbest halde kullanılması ürünün enzim kalıntılarıyla kirlenmesi, maliyet gibi problemlere sebep olmaktadır (Al- Zuhair, 2007). Bu sorunları ortadan kaldırmak için enzim katı bir desteğe tutuklanarak kullanılabilmektedir. Bu şekilde enzim tekrar tekrar kullanılarak maliyet düşürülmüş ve ürün kalitesi arttırılmış olmaktadır. Destek seçiminde önemli olan bazı faktörler vardır: mekanik dayanıklılık, mikrobiyal direnç, kimyasal dayanıklılık, kimyasal işlevsellik (hidrofobik/ hidrofilik yapı), yüklenme kapasitesi ve maliyet endüstriyel üretim için önemli etkenlerdir (Karube ve diğ., 1977).

Biyodizel üretiminde kullanılan lipazın tutuklanması için birçok yöntem vardır. Bunlar; adsorpsiyon, çapraz bağlama, hapsetme, kapsüllemedir.

1.4.1. Adsorpsiyon

Şekil 1.9'da görüldüğü gibi adsorpsiyonla tutuklama yönteminde enzim, destek yüzeyine van der Waals veya London kuvvetleri gibi zayıf bağlar ile bağlanır. Bu yöntem en basit tutuklama yöntemidir ve maliyeti düşüktür. Adsorpsiyon yönteminde herhangi bir toksik kimyasal kullanılmamaktadır ve tutuklu enzimde çapraz bağlama ve hapsetme yöntemlerindeki gibi kütle transferi sınırlaması yoktur. Pek çok bitkisel yağ ve atık yağlardan biyodizel üretiminde, adsorpsiyon ile tutuklu lipaz kullanılarak % 76-100 dönüşüm elde edilir (Yang ve diğ., 2006).

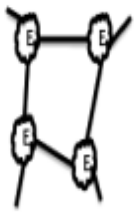


Şekil 1.9. Adsorpsiyon yöntemiyle enzim tutuklama (Jegannathan ve Abang, 2008)

Adsorpsiyon yönteminin ticari elverişliliği ve biyodizel üretiminde yüksek dönüşümler elde edilmesi gibi avantajlarının yanında, tepkime sırasında pervanenin destek yüzeyine uyguladığı doğrudan kesme kuvvetiyle zayıf bağlar ile tutuklu enzim, destek yüzeyinden ayrılabilir. Sonuç olarak, enzim aktivitesinin azalması enzimin bozulmasıyla değil sıyrılma ile gerçekleşir (Yadav ve Jadhav, 2005).

1.4.2. Çapraz bağlama

Çapraz bağlama yönteminde; gluteraldehit, bis azo benzidin, hekzametilen diizosiyanat gibi fonksiyonel reaktifler yardımıyla enzim molekülleri arasında çapraz bağların oluşumu gerçekleşir (Şekil 1.10). Tutuklamanın ilk aşamasında enzim aseton ile çöktürülerek enzim kümesi oluşturulur. Ardından, bu küme gluteraldehitle çapraz bağlanarak daha sert bir yapı elde edilir (Kumari ve diğ., 2007). Çapraz bağlı enzim tarnsesterleşme hızını arttırır. Yapılan çalışmalarda, bu yöntemle elde edilmiş lipaz ile biyodizel üretiminde % 92 dönüşüm sağlanmıştır.



Şekil 1.10. Çapraz bağlama yöntemi ile enzim tutuklama (Jegannathan ve Abang, 2008)

Çapraz bağlı enzimin parçacık boyutu genellikle 10 μm' den küçük olduğu için heterojen tepkime ortamındaki substrat ile enzim parçacıkları neredeyse aynı boyutta olurlar. Bu durum enzimin üründen ayrılmasında soruna sebep olur (Cao ve diğ., 2003).

1.4.3. Hapsetme

Hapsetme, enzimin polimer matrisi ile yakalanması esasına dayanır (Şekil 1.11) (Xavier ve diğ., 1990). Hapsetme yöntemiyle tutuklanmış lipaz fiziksel adsorpsiyon ile tutuklanmış lipazdan daha kararlıdır. Çapraz bağlama ile lipaz tutuklama yönteminden daha basit bir işlemdir ve aynı zamanda enzimin aktivitesi ve kararlılığı değişmez (Kennedy ve diğ., 1990).

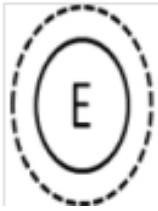


Şekil 1.11. Hapsetme yöntemi ile enzim tutuklama (Jegannathan ve Abang, 2008)

Hsu ve arkadaşları (2001), *Pseudomonas cepacia* lipazını başlatıcı olarak tetrametilortosilikat kullanarak filosilikat soljel matriks ile hapsetmişler. Lipaz, hidrolize tetrametilortosilikat ve izo-bütiltimetoksisilanın polikondenzasyonu ile hapsedilmiştir. Tutuklu enzim soya yağının transesterleşmesinde kullanılmış ve % 67 dönüşüm elde edilmiştir. Hapsetme yöntemiyle tutuklu lipaz ile ester dönüşümünün düşük olması, destek yüzeyinden enzimin difüzyonunun zayıf olmasından kaynaklanmaktadır (Noureddini ve diğ., 2005).

1.4.4. Kapsülleme

Kapsülleme, enzimin delikli membran ile çift kat oluşturarak hapsedilmesidir (Şekil 1.12). Bu yöntem, enzimin yığın ile direk temasını engeller. Kapsülleme yöntemi ile bir kafes oluşturularak enzimin destekten sıyrılması engellenmiş olur (Yadav ve Jadhav, 2005). Biyodizel üretiminde silika köpükle kapsüllenmiş lipaz kullanılarak % 56 dönüşüm elde edilmiştir. Bu enzim birçok defa aşınma yoluyla mekanik parçalanmaya uğramadan geri kazanılmıştır. Diğer yandan, kapsüllenmiş lipazın yüksek protein içeriğinden dolayı destek üzerindeki gözenekler tıkanır ve difüzyon kısıtlaması meydana gelir. Kütle transferi problemini ortadan kaldırmak için lipaz daha küçük parçalar halinde kapsüllenir ve gözeneklerin tıkanmaması için enzim saflaştırılır (Orçaire ve diğ., 2006).



Şekil 1.12. Kapsülleme yöntemi ile enzim tutuklama (Jegannathan ve Abang, 2008)

Tablo 1.8'de farklı yöntemlerle tutuklanmış lipaz enzimleri ile yapılan biyodizel üretim çalışmalarından örnekler verilmiştir.

Tablo 1.8. Farklı tekniklerle tutuklanmış lipaz enzimi ile biyodizel üretimi (Jegannathan ve Abang, 2008)

Tutuklama yöntemi	Destek	Enzim kaynağı	a	Yağ	Alkol	Çözücü	b	c	d	% Dönüşüm
Adsorpsiyon	Toyonit-200M	*Pseudomonas fluorescens*	9.4	Ayçiçeği	1-propanol		1:3	60	20	91
Adsorpsiyon	Selit	*Pseudomonas cepacia*	10	Jatropa	Etanol		1:4	50	12	98
Adsorpsiyon	Makro gözenekli anyon reçine	*Mucor miehei*	20	Ayçiçeği	Etanol	Petrol eteri	1:11	45	5	82
Adsorpsiyon		*Candida antarctica*	1.6	Pamuk tohumu	Metanol	t-bütanol	1:4	35	12	95
Adsorpsiyon		*Candida antarctica*	3	Kolza	Metanol	t-bütanol	1:4	35	12	95
Adsorpsiyon	Makro gözenekli akrilik reçine	*Candida antarctica*	10	Jatropa	Etil asetat		1:11	50	12	91.3
Adsorpsiyon	Polipropilen EP100	*Pseudomonas fluorescens*	10	Ayçiçeği	Metanol	Hekzan	1:4.5	40	48	91
Adsorpsiyon	Akrilik reçine	*Candida antarctica*	4	Hurma	Metanol	THF	1:3	40	40	97
Adsorpsiyon	Silika jel	*Candida antarctica*	5	Soya yağı koku giderici distilat	Metanol	t-bütanol	1:3.9	40	25	94
Adsorpsiyon	Akrilik reçine	*Candida antarctica*	2	Soya	Metanol	İyonik sıvılar	1:4	50	12	80
Adsorpsiyon	Celit-545	*Chromobacterium viscosum*	10	Jatropa	Etanol		1:4	40	10	92
Adsorpsiyon	Anyon reçine	*Porcine pancreatic*	10	Ayçiçeği	Etanol		1:3	45	7	80
Adsorpsiyon		*Candida antarctica*	30	Soya	Metil asetat		1:12	40	14	92
Adsorpsiyon	Apolar reçine	*Candida sp. 99-125*	25	Soya	Metanol	Hekzan	1:3	40	28	98,8
Adsorpsiyon	Diatome toprak	*P.cepacia*	1.46	Ayçiçeği	2-bütanol		1:3	40	6	100
Adsorpsiyon	Akrilik reçine	*Candida antarctica*	30	Soya	Metil asetat		1:12	40	14	92
Adsorpsiyon	Makro gözenekli anyon reçine	*Candida antarctica*	5	Palmiye Kern	Etanol	Süperkritik CO_2	1:10	40	4	63
Adsorpsiyon	Hidrotalsit	*Thermomyces lanuginosus*	4	Atık yağ	Metanol		1:4	45	10	92,8
Çapraz bağlama	Gluteraldehit	*P.cepacia*	10	Madhuka	Etanol		1:4	40	2.5	92
Hapsetme	Hidrofobik sol jel	*P.cepacia*	5	Soya	Metanol		1:7.5	35	30	56
Hapsetme	Filosilikat soljel	*P.cepacia*	57.4	Donyağı ve gres	Etanol		1:4	50	20	94
Kapsülleme	Silika köpük	*Burkholderia cepacia*	2,4	Ayçiçeği	Metil asetat	İzooktan	1:3		30	64

a) Kütlece yağa göre % enzim miktarı, b) Yağ:alkol mol oranı, c) Sıcaklık (^{0}C), d) Süre (saat), THF) Tetrahidrofuran

1.5. Biyodizel Üretim Yöntemleri

1.5.1. Seyreltme

Bitkisel yağlar dizel motor yakıtı olarak kullanılabilirler. Fakat viskozitelerinin yüksek olmasından dolayı motorda bazı değişiklikler yapılması gerekir. Bitkisel yağların viskozitesi belli oranda dizel yakıt ile karıştırılarak düşürülebilmektedir (Bartan, 2009).

1.5.2. Mikroemülsiyonlar

Bitkisel yağın viskozitesini düşürmek için metanol, etanol gibi kısa zincirli alkollerle mikroemülsiyon oluşturulur. Mikroemülsiyon, normalde karışmayan iki sıvı ile bir veya daha fazla amfifilin bir araya gelmesiyle oluşur. Bu yöntemle yağın viskozitesi düşürülmüş olsa da alkollerin setan sayısının düşük olması oluşturulan emülsiyonun setan sayısı düşük olacak ve düşük sıcaklıklarda karışımın ayrışma eğilimi göstermesi bir dezavantaj oluşturacaktır (Ma ve Hanna, 1999; Bartan, 2009).

1.5.3. Piroliz

Piroliz, havasız veya oksijensiz ortamda ısı yardımıyla bir maddenin başka bir maddeye dönüşmesi anlamına gelir. Bu olay sırasında kimyasal bağlar daha küçük molekül oluşturmak için kırılırlar. Bitkisel yağlar, hayvansal yağlar, doğal yağ asitleri ve yağ asitlerinin metil esterleri pirolizlenebilirler. Fakat bu yöntem pahalı bir yöntemdir (Ma ve Hanna, 1999; Bartan, 2009).

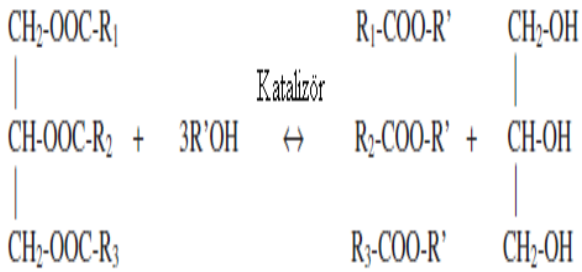
1.5.4. Hidroişlem

Biyodizel üretiminde kullanılan diğer alternatif yöntem hidroişlemdir. Hidrokarbonlar iki farklı reaksiyonla üretilir: (i)hidrooksijenleme (HDO), (ii) hidrokarboksilasyon (HDC). HDO sonucu oluşan alkanlar orijinal yağ asidi zincirlerinde olduğu gibi çift karbon sayısına sahiptirler (16 veya 18). Yan ürün olarak su ve propan açığa çıkar. Diğer yandan, HDC tepkimesiyle tek sayıda karbon(orijinal yağ asidi zincirinde bulunandan bir eksik) üretilir ve yan ürünler CO, CO_2 ve propandır (Rocha Filho ve diğ., 1993; Huber ve Dumesic, 2006; Huber ve diğ., 2007).

Hidroişlem, petrol rafinerisinde ağır gaz yağı veya vakumlu gaz yağı gibi petrol türevi hammaddelerden S, N ve metallerin ayrılmasında kullanılır (Farrauto ve Bartholomew, 1997). Hidroişlem, sıvı reçinenin yağ asidi fraksiyonundan ve diğer bitkisel yağlardan düz zincirli alkanların (n-C_{15}- n-C_{18}) üretiminde kullanılır (Craig, 1991; Stumborg ve diğ., 1996). Tipik dizel yakıtının setan sayısı 45 civarındayken, normal alkanlar yüksek setan sayısına (98'in üzerinde) sahiptirler. Normal alkanlar ayrıca iyi soğuk akım özelliğine sahiptirler. Hidroişlem prosesi sonucu oluşan kararlı ürün petrol kaynaklı dizel ile tamamen uyumludur, yüksek setan sayısına ve düşük sülfür içeriğine sahiptir.

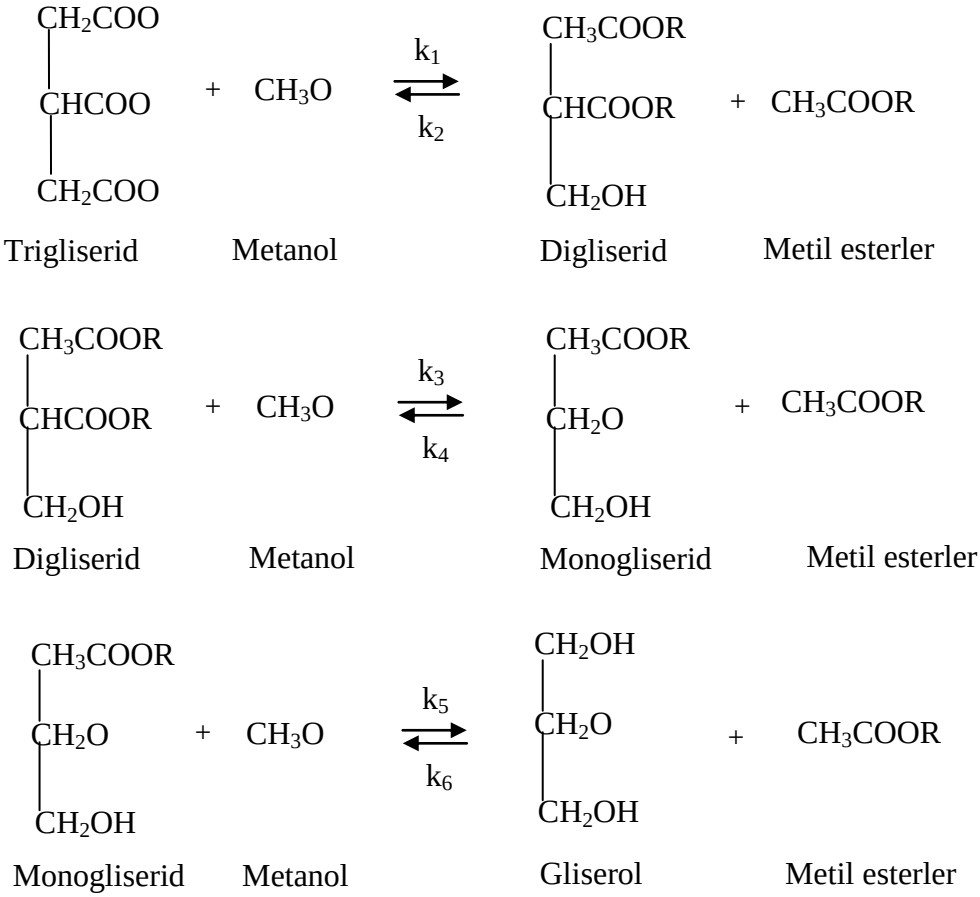
1.5.5. Transesterleşme (Alkoliz)

Transesterleşme, hayvansal ve bitkisel yağların homojen veya heterojen katalizör eşliğinde alkol ile reaksiyona girip ester ve gliserol oluşturduğu tepkimedir. Diğer bir ifadeyle; transesterleşme, esterin bir şeklinin başka bir şekline dönüşümünü ifade eder. Stokiyometrik transesterleşme tepkimesi Şekil 1.13'te görülmektedir (Meher, 2006).



Şekil 1.13. Transesterleşme tepkimesi (R_1, R_2, R_3 ve R' alkil gruplarını temsil etmektedir.)

Şekil 1.13'te verilen tepkime sırasıyla Şekil 1.14'te gösterildiği gibi üç ardışık denge tepkimesinden oluşur.



Şekil 1.14. Transesterleşme tepkimesinin basamakları

Transesterleşme reaksiyonu, tersinir bir reaksiyon olduğu için ortama fazla miktarda alkol eklemek reaksiyonun ürünler tarafına kaymasını sağlar. Metanol, etanol, propanol, bütanol ve amil alkol transesterleşmede kullanılabilen alkoller olarak sayılabilir. Metanol ve etanol en çok kullanılan alkollerdir. Kısa zincirli ve polar bir alkol olan metanol düşük maliyeti, fiziksel ve kimyasal avantajlarından dolayı çok kullanılır (Leung ve diğ., 2010). Biyodizel üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 1.9'da verilmiştir.

Reaksiyonda alkali, asidik, enzim olmak üzere başlıca üç tip katalizör kullanılır (Ma ve Hanna, 1999; Leung ve diğ., 2010). Katalizörler, kimyasal reaksiyonlarda aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonun daha kısa bir sürede gerçekleşmesini ve reaktiflerin ürünler tarafına dönüşümünü sağlayarak reaksiyonun kısa sürede dengeye ulaşmasını sağlayan maddelerdir. Bir reaksiyonu iyi katalizleyen bir katalizör, benzer reaktifleri içeren diğer bir reaksiyonu gerçekleştirmeyebilir (Bartan ve diğ., 2009).

1.5.6. Süperkritik akışkanlarla transesterleşme

Biyodizel üretiminde katalizör kullanılmadan transesterleşme, süperkritik koşullarda metanol ile mümkündür (Demirbaş, 2002; Saka ve Kusdiana, 2001). Tepkime oldukça hızlıdır, 10 dakikada % 50-95 dönüşüme ulaşılabilir, fakat bu tepkime yüksek sıcaklık (250-400 °C) ve basınçta (1200 psi) gerçekleşir (Al-Zuhair ve diğ., 2007; Gerpen ve diğ., 2004). Bu koşullar sebebiyle yüksek üretim maliyeti ve enerji tüketimi söz konusudur.

Bitkisel yağdan biyodizel üretmek için kullanılan geleneksel transesterleşme tepkimesi sonucu serbest yağ asidi ve su oluşumu istenmeyen bir durumdur çünkü tepkime ortamında sabun oluşur ve katalizör etkinliğini kaybeder. Bunun aksine, katalizörsüz süperkritik yöntemde su varlığı tepkimenin yürütülmesini sağlar. Süperkritik yöntemin katalizörlü kimyasal tepkimeye karşı bazı avantajları bulunur. Çevre dostu bir prosestir. Katalizöre ihtiyaç duyulmaması, üretim sonrası metil estere karışmış katalizör ve sabun oluşumunun ayrılmasına ihtiyaç duyulmaması sebebiyle ayırma işlemi kolaylaşır. Böylece atık su, asidik ve alkali madde içermez. Süperkritik tepkime geleneksel katalitik transesterleşme tepkimesinden daha kısa sürede gerçekleşir. Katalitik transesterleşme tepkimesinde tepkimenin dengeye ulaşması saatler sürerken, süperkritik yöntemde tepkime 2-4 dakikada dengeye gelir (Saka ve Kusdiana, 2001). Asitlik ve su içeriğinin süperkritik tepkimeyi etkilememesi biyodizel üretiminde pek çok hammadenin kullanılabilmesine olanak sağlar (Kusdiana ve Saka 2001; Kusdiana ve Saka, 2004). Örneğin kalitesiz yağ ve kızartma yağından, yüksek asit ve su içermesine rağmen süperkritik metanol ile biyodizel üretilebilir. Bu yöntemin yüksek basınç ve sıcaklık gerektirmesi, üretimde cihaz maliyetini arttırır. Bu sebeple endüstride geçerli bir yöntem değildir (Jian-Zhong, 2008).

Tablo 1.9. Biyodizel üretim yöntemlerinin karşılaştırılması (Leung ve diğ., 2010)

Yöntem	Tanım	Avantaj	Dezavantaj	Motordaki problemler
Direk Kullanma ve Seyreltme	Bitkisel yağın direk dizel yakıt olarak olarak kullanılması veya dizel yakıtla karıştırarak kullanılması	Sıvının doğası-taşınabilirlik Isı kapasitesi (dizel yakıtın % 80' i kadar)	Yüksek viskozite Düşük uçuculuk Doymamış hidrokarbon zincirlerinin reaktifliği	Kok oluşumu Karbon kalıntısı

Tablo 1.9 (Devam). Biyodizel üretim yöntemlerinin karşılaştırılması (Leung ve diğ., 2010)

Mikroemülsiyonlar	İki karışmayan sıvı ve bir veya daha fazla iyonik veya iyonik olmayan amfifilden kendiliğinden oluşan 1-150 nm büyüklüğünde mikro yapılardan oluşan optikçe izotrop akışkanın koloidal denge dağılımı	Yanma sırasında daha iyi spreyleme Daha düşük viskoiteli yakıt	Daha düşük setan sayısı Düşük enerji kapasitesi	Düzensiz enjektör iğnesinin yapışması; tam yanmanın gerçekleşmemesi Ağır karbon kalıntıları; yağlama yağının viskozitesi artar
Piroliz	Uzun zincirli ve doymuş biyokütlenin ısı ile biyodizele dönüşümü	Petrol kaynaklı benzin ve dizel yakıtlara kimyasal benzerlik	Tepkime için fazla enerji tüketimi ve bundan dolayı yüksek maliyet	-

2. TRANSESTERLEŞME TEPKİMESİNDE KULLANILAN KATALİZÖRLER

Transesterleşme tepkimesi ile biyodizel üretiminde kullanılacak katalizör seçimi yağ içersindeki serbest yağ asidi miktarına bağlıdır. Genellikle kullanılan katalizörler asit, baz ve enzimlerdir. Az miktarda serbest yağ asidi içeren trigliseridin baz katalizör ile tepkimesi ile yüksek oranda dönüşüme kısa zamanda ulaşılabilir. Asit katalizörler, yüksek oranda serbest yağ asidi içeren yağların transesterleşmesi için oldukça uygundur (Schuchardta ve diğ., 1998). Enzim katalizli biyodizel üretiminde yağın serbest yağ asidi içeriği önemli değildir. Ancak tepkime süresi uzundur (1-2 gün).

Transesterleşme tepkimesinde kullanılan katalizör homojen veya heterojen olabilir. Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de farklı homojen ve heterojen katalizörlerle gerçekleştirilmiş biyodizel üretimleri gösterilmiştir. Tablo 2.3'te ise transesterleşme tepkimesinde kullanılan katalizörlerin avantaj ve dezavantajları verilmiştir.

2.1. Homojen Katalizörler

Homojen katalizör endüstriyel ölçekli biyodizel üretiminde kullanılmaktadır. Asidik transesterleşme tepkimesinde sıklıkla kullanılan katalizör sülfürik asitken (H_2SO_4), alkali transesterleşme tepkimesinde sodyum hidroksit (NaOH) ve potasyum hidroksit (KOH) kullanılmaktadır (Sharma ve diğ., 2008). Sodyum metoksit (CH_3ONa) ve potasyum metoksit (CH_3OK) de homojen katalizör olarak kullanılır ve NaOH ve KOH göre performansları çok daha iyidir. Çünkü CH_3ONa ve CH_3OK ile yürütülen transesterleşme tepkimesinde yan ürün olarak su oluşmazken, NaOH ve KOH ile gerçekleşen tepkimede az miktarda su oluşumu gerçekleşir (Leung ve Guo, 2006). Homojen katalizörlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu katalizörlerin üründen uzaklaştırılması için çok miktarda damıtılmış suyla yıkanması gerekmektedir. Bu yıkama sonunda çok fazla miktarda atık su meydana gelir (Granados ve diğ, 2007).

Heterojen katalizör kullanılarak homojen katalizörlerin bazı dezavantajları ortadan kaldırılabilir.

2.2. Heterojen Katalizörler

Heterojen katalizörler tepkime karışımından ayrılıp tekrar kullanılabilir. Mg-Al hidrotalsit, CaO, Mg/La (magnezyum lantan oksit) gibi katalizörler heterojen katalizörlere örnek olarak verilebilir. Heterojen katalizörler de kimyasal (asidik ve bazik) ve biyokimyasal (tutuklanmış enzim/mikroorganizma) heterojen katalizörler olmak üzere sınıflandırılabilir.

Bu katalizörler daha az aşındırıcı etkiye sahip olmalarından dolayı homojen katalizörlerden daha avantajlıdırlar (Sharma ve Singh, 2009). Biyodizel üretiminde homojen sıvı katalizör yerine tekrar kullanılabilir katı heterojen katalizör kullanmak üretim maliyeti açısından büyük avantaj sağlar (Suppes ve diğ., 2004) ve ayrıca transesterleşme ve esterleşme tepkimelerinin eş zamanlı yürütülmesine olanak sağlayabilir (Furuta ve diğ., 2004). Heterojen katalizör kullanımının diğer bir avantajı daha az katalizör kullanımına olanak sağlamasıdır. Örneğin; 8000 ton biyodizel üretimi için 88 ton sodyum hidroksit gerekliyken (Mbraka ve Shanks, 2006), 100.000 ton biyodizel üretimi için sadece 5,7 ton katı MgO kullanılmaktadır (Dossin ve diğ., 2006).

Heterojen katalizör kullanımı ile, yağ ve alkolle birlikte ortamda üç faz oluşmaktadır. Bu durum difüzyon sınırlamasına sebep olur ve reaksiyon hızı düşer (Mbraka ve Shanks, 2006). Bu kütle transfer sınırlaması; ortama tetrahidrofuran (THF), dimetil sülfoksit (DMSO), n-hekzan, etanol gibi çözücüler eklenerek ortadan kaldırılabilir.

Çözücü, yağ ve alkolün birbiri içinde çözünmesini sağlayarak reaksiyon hızını arttırır. Reaksiyon ortamında katalizör desteklerinin kullanılması, özel bir yüzey alanı ve gözeneklilik sağlayarak aktif grupların büyük trigliserid moleküleriyle reaksiyona girmesine olanak sağlayarak kütle transfer sınırlamasını engeller (Zabeti ve diğ., 2009).

Tablo 2.1. Homojen asit ve baz katalizörlü biyodizel üretimi (Vays, 2010)

Yağ	Katalizör	Katalizör miktarı (%)	Alkol	Yağ/ alkol mol oranı	Tepkime koşulları	Ester verimi	Ester dönüşümü
Atık yağ	H_2SO_4	4	Metanol	1:20	95 °C, 10 saat	-	> 90
Kolza yağı	KOH	1	Metanol	1:6	65 °C, 2 saat, 600 rpm		96
Ayçiçek yağı	NaOH	1	Metanol	1:6	60 °C, 2 saat, 600 rpm	97,1	
Kullanılmış kızartma yağı	NaOH	1,1	Metanol	1:7,5	70 °C, 30 dak.	85,3	
Soya yağı	H_2SO_4	1	Metanol	1:30	65 °C, 50 saat		> 99
Soya yağı	H_2SO_4	1	Etanol		78 °C, 16 saat		> 99
Soya yağı	H_2SO_4	1	Bütanol		117 °C, 3 saat		> 99

Tablo 2.2. Farklı heterojen katalizör ile bitkisel yağın transesterleşmesi (Vays, 2010)

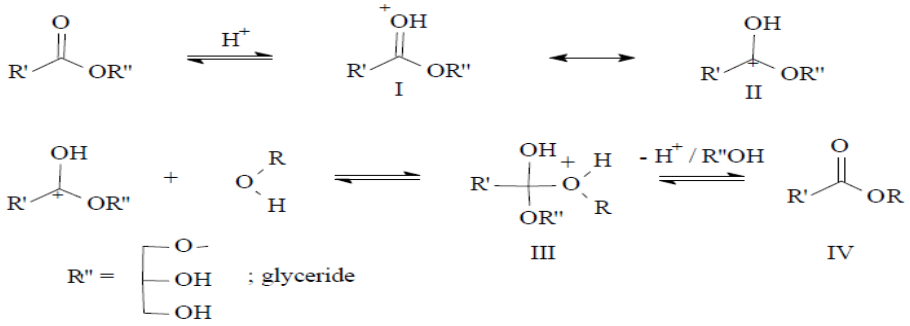
Katalizör	Katalizör miktarı (yağın kütlece %)	Yağ	Alkol	Alkol/ yağ mol oranı	Optimum tepkime koşulları	Ester dönüşümü (%)	Ester verimi
Mg/ La (magnezyum/lantan oksit)	5	Ayçiçek yağı	Metanol	53:1	65 °C, 30 dak.	-	100
Mg/ La (magnezyum/lantan oksit)	5	Ayçiçek yağı	Metanol	53:1	Oda sıcaklığı, 2,2 saat	-	100
$Ca(OCH_2CH_3)_2$ (Kalsiyum etoksit)	3	Soya yağı	Metanol	12:1	65 °C, 1,5 saat	-	95,0
KNO_3/ Al_2O_3	6,5	Soya yağı	Metanol	15:1	65 °C, 7 saat	87,0	-
KF/Eu_2O_3	3	Kolza yağı	Metanol	12:1	65 °C, 1 saat	92,5	-
Eu_2O_3/Al_2O_3	10	Soya yağı	Metanol	6:1	70 °C, 8 saat	63,0	-
Mg-Al hidrotalsit	7,5	Soya yağı	Metanol	15:1	65 °C, 9 saat	67,0	
KOH/NaX zeolit	3	Soya yağı	Metanol	10:1	65 °C, 8 saat	85,6	-
CaO	8	Soya yağı	Metanol	12:1	65 °C, 3 saat	-	95,0

2.3. Asit Katalizörler

Sülfirik asit, fosforik asit, hidroklorik asit ve organik sülfonik asit transesterleşme tepkimesinde kullanılan asitlere örnektir. Bu katalizörler ile yüksek verim elde edilebilir fakat tepkime çok yavaş ilerler (bir günden fazla sürebilir). Asit katalizörler, katalizledikleri tepkimenin uzun sürmesi yanında, fazla miktarda su ve serbest yağ asidi içeren gliseridlerin transesterleşme tepkimesi için oldukça uygun

katalizörlerdir (Felizardo ve diğ., 2006; Ma ve Hanna, 1999; Srivasta ve Prasad, 2000; Freedman ve diğ., 1984; Aksoy ve diğ., 1988).

Asit katalizörlü transesterleşme tepkime mekanizması Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Esterin karbonil grubuna proton katıldıktan sonra karbokatyon oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.1-II). Ardından alkolün nükleofilik tutunmasıyla tetrahedral ara ürün meydana gelir (Şekil 2.1-III). Son olarak, H^+ katalizörünün serbest kalması ve yeni ester oluşması için ara nüründen gliserol ayrılır (Şekil 2.1-IV).

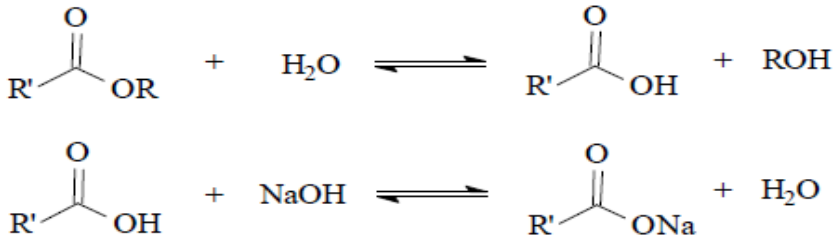


R': Yağ asidinin karbon zinciri
R: Alkolün alkil grubu

Şekil 2.1. Asit katalizörlü transesterleşme mekanizması (Schuchardt ve diğ., 1998)

2.4. Baz Katalizörler

NaOH, KOH, karbonatlar, sodyum metoksit, sodyum etoksit, sodyum propoksit, sodyum butoksit gibi alkaliler transesterleşmede kullanılan katalizörlere örnek olarak verilebilir (Fukuda ve diğ., 2001). Asit katalizöre göre, alkali katalizli transesterleşme 4000 kez daha hızlıdır ve daha az aşındırıcı etkiye sahiptir. Bu nedenle biyodizel üretiminde daha çok alkali katalizörler kullanılır. Alkali katalizör ile biyodizel üretiminde kullanılan yağ ve alkol susuz olmalıdır. Ortamda bulunan su ve serbest yağ asitleri sabun oluşumuna (Şekil 2.2) sebep olarak katalizörün etkinliğinin azalmasına ve gliserolün ayrılma güçlüğüne sebep olmaktadır (Ma ve Hanna, 1999).



R': Yağ asidinin karbon zinciri
R: Alkolün alkil grubu

Şekil 2.2. Sabunlaşma tepkimesi (Schuchardt ve diğ., 1998)

Bazik katalizör ile gerçekleşen transesterleşme tepkimesinde ilk olarak bazik katalizör ile alkol tepkimeye girerek alkoksit oluşur ve katalizöre proton transferi gerçekleşir. Oluşan alkoksit trigliseridin karbonil grubuna nükleofilik tutulma ile tutunur ve tetrahedral ara ürün meydana gelir. Bir sonraki aşamada ara üründen alkil ester ve ilgili digliseridin anyonu ayrılır. Son basamakta katalizör proton kaybederek diğer bir alkol molekülüyle tepkimeye girmek üzere aktif hale gelir. Digliseridler ve monogliseridler aynı mekanizma ile alkil ester ve gliserole dönüşürler (Schuchardt ve diğ., 1998).

Bazik katalizörler arasında, alkali metal alkoksitler (metanoliz için CH_3ONa) kısa sürede (30 dak.) yüksek verim (> % 98) elde edilebilmesi nedeniyle en aktif katalizörlerdir. Alkali metal hidroksitler (KOH, NaOH) alkali metal alkoksitlere göre daha ucuz fakat daha az aktiftirler. Ancak bitkisel yağ dönüşümünde bu katalizörler ortama daha yüksek derişimlerde eklenerek, metal alkoksitlerle elde edilen verime ulaşılabildiği için iyi birer alternatiflerdir.

2.5. Enzim Katalizörler

Enzim katalizli biyodizel üretimi hem hücre içi hem de hücre dışı lipazlarla gerçekleşebilmektedir. Hücre dışı lipaz, öncelikle sıvı besi yerindeki mikroorganizmadan elde edilen enzim daha sonra saflaştırılarak üretilir. Lipaz üreten başlıca mikroorganizmalar; *Mucor miehei, Rhizopus oryzae, Candida antarctica* ve *Pseudomonas cepacia*'dır. Hücre içi lipaz, mikroorganizmanın kendisini ifade eder. Reaksiyon ortamında mikroorganizma kullanılır.

Lipazlar trigliserid hidrolizi, transesterleşme ve esterleşme tepkimelerinde kullanılabilmektedir. Son yıllarda, kimyasal transesterleşmedeki bazı

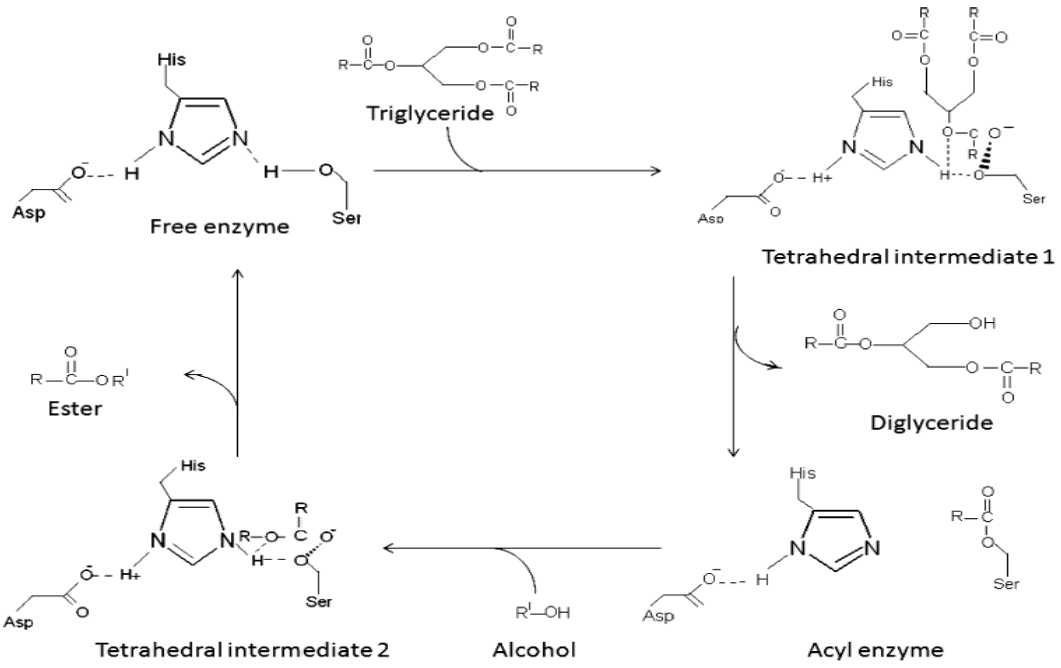
dezavantajlardan dolayı enzimatik transesterleşme birçok araştırmacının ilgi odağı olmuştur. Fazla miktarda atık su oluşumu ve gliserolün ayrılmasındaki güçlükler bu dezavantajlardan bazılarıdır. Enzim katalizli transesterleşme tepkimesi, yan ürün oluşumunun olmaması, ürünün reaksiyon ortamından kolay ayrılması, ılımlı reaksiyon koşulları, yüksek serbest yağ asidinden etkilenmemesi ve katalizörün tekrar kullanılabilirliği gibi avantajlara sahiptir (Kulkarni ve Dalai, 2006). Bu sebeple, enzim katalizli biyodizel üretimi çevre dostu bir proses olarak kimyasal proseslere alternatif olarak düşünülebilmektedir. Ancak; enzimin yüksek maliyeti, yavaş reaksiyon koşulları ve enzim etkinliğinin kaybolması gibi endüstride kullanımını engelleyen bazı etkenler bulunmaktadır (Bajaj ve diğ., 2010). Ancak, bu sorunların genetik mühendisliği teknikleri ve yeni tutuklama teknikleri ile azaltılması gelecek araştırmalar için ümit vericidir. Şekil 2.3'te lipaz katalizli transesteleşme tepkime mekanizması verilmiştir. Tablo 2.3'te farklı katalizör tiplerinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Tablo 2.3. Farklı katalizör tiplerinin karşılaştırılması

Katalizör Tipi	Avantajlar	Dezavantajlar
Homojen baz katalizör	• Çok hızlı tepkime – asit katalizli transesterleşmeden 4000 kez hızlı • Tepkime ılımlı koşullarda gerçekleşebilir • Katalizörler (KOH, NaOH) ucuz ve kolay bulunabilir	• Yağ içindeki serbest yağ asidine duyarlı • Yağın serbest yağ asidi içeriği kütlece % 2'den fazlaysa sabun oluşur • Fazla miktarda sabun oluşumu biyodizel verimini düşürür, ürün saflaştırmada sorunlara sebep olur özellikle fazla miktarda atık su oluşur
Heterojen baz katalizör	• Asit katalizli transesterfikasyona göre daha hızlı • Tepkime ılımlı koşullarda gerçekleşebilir	• Bazik özeliğinden dolayı yağın serbest yağ asidi içeriğine duyarlı • Yağın serbest yağ asidi içeriği kütlece % 2'den fazlaysa sabun oluşur
Homojen asit katalizör	• Yağın serbest yağ asidi ve su içeriğinden etkilenmez • Kalitesiz yağ kullanıldığında tercih edilen katalizördür • Eş zamanlı olarak esterleşme ve transesterleşme tepkimeleri gerçekleşir • Tepkime ılımlı koşullarda gerçekleşebilir	• Çok yavaştır • H_2SO_4 gibi katalizörler reaktör ve boru hattında korozyona sebep olur • Katalizörün üründen ayrılması zordur
Heterojen asit katalizör	• Yağın su ve serbest yağ asidi içeriğinden etkilenmez • Kalitesiz yağ kullanıldığında tercih edilen katalizördür • Eş zamanlı olarak esterleşme ve transesterleşme tepkimeleri gerçekleşir • Katalizörün üründen ayrılması kolaydır • Katalizörün tekrar kullanımı mümkündür	• Katalizör sentezinin karmaşıklığı yüksek maliyete sebep olur • Normalde, yüksek tepkime sıcaklığı, yüksek alkol/yağ mol oranı ve uzun tepkime süresi gerekir

Tablo 2.3 (Devam). Farklı katalizör tiplerinin karşılaştırılması

Enzim	• Yağın serbest yağ asidi ve su içeriğinden etkilenmez • Kalitesiz yağ kullanıldığında tercih edilen katalizördür • Transesterifikasyon tepkimesi düşük sıcaklıkta gerçekleşir- homojen baz katalizörlü tepkimeden daha düşük sıcaklık • Ürün saflaştırma kolaydır	• Tepkime hızı yavaştır- asit katalizli transesifikasyondan daha yavaştır • Yüksek maliyet • Alkole duyarlıdır- metanol enzimin bozunmasına sebep olur



Şekil 2.3. Lipaz katalizli transesterleşme mekanizması (Jegannathan ve Abang, 2008)

2.5.1. Enzim katalizli biyodizel üretimine etki eden faktörler

Enzimatik biyodizel üretimine etki eden önemli etkenler vardır. Öncelikle ekonomik üretim için uygun hammaddeler ve lipaz hazırlama yöntemi seçilmelidir. Ardından en uygun yağ/alkol mol oranı, ortama eklenecek su miktarı, sıcaklık, süre gibi parametreler belirlenmelidir.

2.5.1.1. Yağ seçimi

Biyodizel üretiminde bitkisel yağlar (rafine, ham ve yenemeyen yağlar); mikrobiyal yağlar; donyağı, domuz yağı, kızartma yağı, balık yağı gibi atık yağlar kullanılabilmektedir (Antczak ve diğ., 2009).

Laboratuvar ortamında biyodizel, serbest yağ asidi (daha çok C18:1) ve rafine yağlardan (kolza, soya, ayçiçek ve diğer) üretilir. Bu bitkisel yağlar C18 yağ asidi bakımından zengindir. Biyodizel üretiminde kullanılacak yağlar, ilgili coğrafi bölgede yetişen yağlı bitkilerden elde edilir (Antczak ve diğ., 2009).

Örneğin Güney Amerika'da (Brazilya) biyodizel çoğunlukla ayçiçek yağından üretilir. Ayçiçek yağının transesterleşme tepkimesi için, organik çözücü (hekzan) varlığında *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) (Dossat ve diğ., 2002), *Aspergillus niger, C. rugosa, P. cepacia, R. oryzae ve P. fluorescens* lipazlarının kullanımı uygun iken, çözücüsüz ortamda *R. miehei, P. fluorescens* ve *T. lanuginosa* lipazları uygundur (Soumanou ve diğ., 2003).

Güney Amerika ve ABD'de biyodizel; soya yağı ve metanol (çözücülü ortamda)/ etanolün (çözücüsüz ortamda) *M. miehei* veya *P. cepacia* lipazlarıyla transesterleşmesi sonucu elde edilir. Ayrıca, *Rhizopus delemar* lipazı ile çözücüsüz ortamda metanoliz tepkimesiyle biyodizel üretimi de söz konusudur (Nelson ve diğ., 1996).

Güney Amerika'da (Brezilya) biyodizel çoğunlukla ayçiçek yağından üretilir. Ayçiçek yağının transesterleşme tepkimesi organik çözücü (hekzan) varlığında en iyi *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM, bütanol ve metanol ile kullanımı uygun), *Aspergillus niger, C. rugosa, P. cepacia, R. oryzae ve P. fluorescens* lipazları ile gerçekleşir. Çözücüsüz ortamda ayçiçek yağının metanolizi *R. miehei, P. fluorescens* ve *T. lanuginosa* lipazları ile gerçekleşir (Soumanou ve diğ., 2003).

Avrupada biyodizel üretiminin başlıca hammaddesi kolza yağıdır. Kolza yağının metanol ve etanol ile transesterleşme tepkimesi (organik çözücülü ortamda) *M. miehei* ve *Mucor circinelloides* lipazları ile yürütülmüştür (Nelson ve diğ., 1996). Çözücüsüz ortamda kolza yağından metil ester üretimi *T. lanuginosa* (Lipozyme TL IM) lipazı ve metanol ile gerçekleşmiştir (Du ve diğ., 2003; Xu ve diğ., 2004).

Don yağının oda sıcaklığında katı halde bulunması ve atık bir yağ olmasından dolayı biyodizel üretimi için kullanımı zordur. Bu yağın *M.miehei* lipazı katalizörlüğünde metanol ve etanol ile transesterleşme tepkimesi başarıyla gerçekleşmiştir. Çözücüsüz

ortamda izopropanol ve 2-bütanol ile *C. antarctica* lipazı kullanılarak don yağından biyodizel üretimi sağlanmıştır (Nelson ve diğ., 1996).

Biyodizel üreticilerinin isteği enzimatik biyodizel üretim maliyetlerinin düşürülmesi yönündedir. Bu nedenle, Watanabe ve arkadaşları (2002), soya yağının üç farklı formunu (ham, rafine ve saf) hammadde olarak kullanarak metanoliz tepkimesini incelemişler; *C. antarctica* lipazı ile en iyi dönüşümü rafine ve saf yağ ile elde etmişlerdir. Ham yağ kullanıldığında dönüşümün rafine yağa göre üç kat daha az olduğu gözlenmiştir. Ham yağ ile gerçekleştirilen metanoliz tepkimesiyle bir seferde %10,3, beşinci seferde %7,1 dönüşüm elde edilmiştir. Watanabe ve diğ. (2002) ham yağın içinde bulunan fosfolipitlerin *C. antarctica* katalizörlüğünde transesterleşme tepkimesini kötü etkilediğini bulmuşlardır. Tepkime ortamındaki fosfolipid derişimi % 1'i geçtiğinde yağ asidi ester oluşumu tamamen durmuştur (Watanabe ve diğ., 2002).

Ön analiz maliyet raporlarına göre pahalı bir yağ olması nedeniyle yenebilir soya yağının biyodizel üretiminde kullanımı pek uygun değildir. Biyoyakıtların üretiminde yalnızca kullanılmış bitkisel yağların hammadde olarak kullanılması ekonomik bir yöntemdir. Bir grup araştırmacı pirinç kepeğinden elde ettikleri yağ ile biyodizel üretimini araştırmışlardır. Bu yağ ucuz, yenmeyen bir yağdır ve % 80 oranında yağ asidi içerir. Yüksek oranda yağ asidi içermesi nedeniyle baz katalizli biyodizel üretim yönteminde kullanılamaz (bunun yerine pahalı asit katalizör kullanılabilir), ancak enzimatik yöntemde kullanımı mümkündür (Lai ve diğ., 2005).

Biyodizel üretiminde kullanılan diğer bir hammadde ise, yenebilir yağların rafinasyonu sonucu oluşan bir atık olan aktive edilmiş ağartma toprağıdır. Yalnızca Japonya'da bu atık, yılda 50.000 ton depolanmaktadır (Pizarro ve Park, 2003).

Alkoliz tepkimesi ile jatropa yağından biyodizel üretimininin incelendiği benzer bir çalışmada, enzim olarak *Pseudomonas cepacia* lipazı (Celit-545 desteğine tutuklanmış) ve etanol kullanılmıştır. 1:4 yağ/alkol mol oranı, % 4-5 su oranı, 40 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızıyla 8 saatte % 98 biyodizel verimine ulaşılmıştır (Shah ve diğ., 2006).

2.5.1.2. Alkol seçimi

Biyodizel üretiminde kullanılan alkoller metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, n-bütanol ve isobütanoldür. Yüksek molekül ağırlıklı alkollerin yoğunluğu ve kaynama noktaları da yüksektir. Metanol ve etanol ucuz ve çok üretilen alkoller olduğu için biyodizel üretiminde daha çok tercih edilirler. Bu alkoller, uzun alifatik alkollere göre enzim aktifliğine daha çok etki ederler (Nelson ve diğ., 1996). Lipaz katalizli transesterleşme tepkimesinde kullanılan alkolün hidrokarbon zincir uzunluğu arttıkça tepkime hızı artar.

Nelson ve arkadaşları (1996), don yağının C1-C4 alifatik alkollerinin Lipozyme IM 60 (*M. miehei*) ve Novozyme SP435 (*C. antarctica*) ile transesterleşme tepkimelerini karşılaştırmışlardır. Bu tepkimeler hekzan varlığında ve çözücüsüz ortamda gerçekleşmiştir. *M. miehei* katalizli transesterleşme tepkimesi için çözücüsüz ortamdaki tepkime verimi alkolün hidrokarbon zinciri uzadıkça artmış, metanol ile % 19, etanol ile % 65,5 ve isobütanol ile % 97,4 değerlerine ulaşmış; çözücü olarak hekzan kullanıldığında metanol, etanol ve isobütanol ile transesterleşme veriminin % 95'ten büyük olduğu görülmüştür (Tablo 2.4). Diğer yandan palm çekirdeği yağının alkolizinde *P. cepacia* lipazı kullanılmış ve en yüksek transesterleşme verimine (% 72) çözücüsüz ortamda etanol kullanılarak ulaşılırken, C4 alkolleri (1- ve 2-bütanol) ile daha az verim elde edilmiştir (Akoh ve diğ., 2007). *C. antarctica* lipazının çözücüsüz ortamda isobütanol ve 2-bütanol ile ester verimi, hekzan varlığında ester veriminden daha fazladır (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Farklı alkollerle gerçekleşen lipaz katalizli transesterleşme tepkimeleri (Antczak ve diğ., 2009)

Alkol	Yağ	Lipaz	Çözücü	Süre (saat)	Verim (%)
Metanol	Donyağı	*Mucor miehei* IM60	Çözücüsüz	5	19,4
			hekzan	5	73,8
			hekzan	8	94,8
	Ayçiçek yağı	*Pseudomonas fluorescens*	Çözücüsüz	24	3,0
			Petrol eteri	24	79,0
	Koton yağı	*Candida antarctica*	Çözücüsüz	7	91,5
		(Novozyme 435)	tert-bütanol	10	90,0
	Soya yağı		Çözücüsüz	48	93,8
	Hurma yağı	*Pseudomonas cepacia*	Çözücüsüz	8	15,0
	Hindistan cevizi yağı			8	Eser miktar
Etanol	Donyağı	*Mucor miehei* IM60	Çözücüsüz	5	65,5
			hekzan	5	98,0
			Çözücüsüz	5	83,0

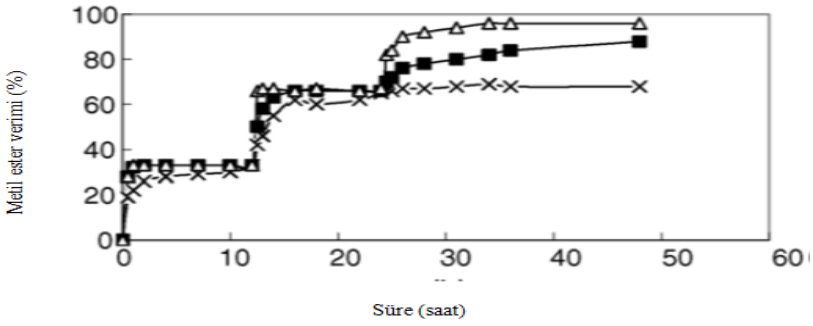
Tablo 2.4 (Devam). Farklı alkollerle gerçekleşen lipaz katalizli transesterleşme tepkimeleri (Antczak ve diğ., 2009)

Etanol	Ayçiçek yağı	*Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas cepacia*	Çözücüsüz	24	82,0
	Hurma yağı		Çözücüsüz	8	72,0
İzopropanol	Donyağı	*Candida antarctica* SP435	Çözücüsüz	16	90,3
		Pseudomonas cepacia	Hekzan	16	51,7
	Hurma yağı		Çözücüsüz	8	24
	Hindistan cevizi yağı			8	16
İzobütanol	Donyağı	*Mucor miehei* IM60	Çözücüsüz	5	97,4
	Hurma yağı	*Pseudomonas cepacia*	Çözücüsüz	8	42,0
1-bütanol	Hurma yağı	*Pseudomonas cepacia*	Çözücüsüz	8	42,0
	Hindistan cevizi yağı			8	40,0

Enzim aktifliğinin bozulması alkollerin hidrokarbon zincirleri kısaldıkça artmaktadır. Bu bozulma kısa zincirli alkollerin (metanol, etanol) basamaklı şekilde tepkime ortamına eklenmesiyle çözülebilir.

Xie ve Ma (2010), Fe_3O_4 nano parçacıklarına kovalent bağ ile tutuklanmış lipaz (Lipozyme TL) ile soya yağının alkoliz tepkimesini gerçekleştirmişlerdir. Alkol olarak metanol kullanılmış ve tepkime ortamına üç basamakta eklenmiştir. % 40 tutuklanmış lipaz kullanarak elde edilen metil ester dönüşümü % 90 kadardır.

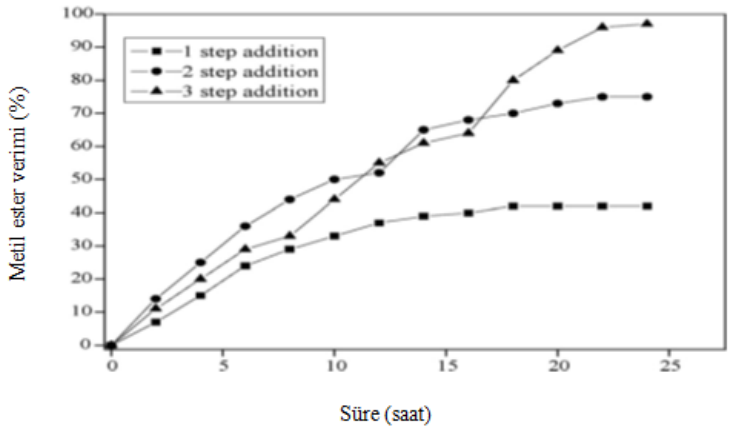
Soya ve kolza yağı karışımının metanol ile transesterleşme tepkimesini incelendiği başka bir çalışmada katalizör olarak tutuklanmış *Candida antarctica* lipazı (Novozyme 435) kullanılmıştır. Enzim inhibisyonunu engellemek için metanol üç basamaklı şekilde eklenmiştir. 1:1 yağ/metanol mol oranı, % 4 (kütlece yağ+metanol karışımına göre) tutuklanmış enzim, 30 °C sıcaklık, 130 rpm karıştırma hızıyla 48 saat sonunda % 95 üzerinde ester dönüşümüne ulaşılmıştır (Shimada ve diğ., 1999).



Şekil 2.4. Lipaz katalizli üç basamaklı transesterleşme tepkimesine kullanılan silika miktarının etkisi. (x) % 4 lipaz, (■) %4 lipaz +%6 silika jel (Du ve diğ., 2005)

Diğer bir çalışmada, soya yağının metanol ile enzimatik transesterleşme tepkimesi denenmiştir. Metanol tepkime ortamına üç basamakta eklenmiş, tepkime 1:1 yağ/metanol oranı, 40 °C ve 150 rpm koşullarında gerçekleştirilmiştir. % 4 (yağ kütlesine göre) oranında Lipozyme TL (*Thermomyces lanuginosus*) kullanılan transesterleşme tepkimesinde verim % 66 iken, % 6 (yağın kütlesine göre) oranında silikaya tutuklanmış % 4'lük Lipozyme TL ile bu değer % 90'a ulaşmıştır (Şekil 2.4) (Du ve diğ., 2005).

Dizge ve arkadaşları (2009), kanola yağından tutuklanmış *Thermomyces lanuginosus* lipazı katalizörlüğünde metanoliz tepkimesiyle biyodizel üretimini amaçlamışlardır. *Thermomyces lanuginosus* lipazı, poligluteraldehit ile aktive edilmiş stiren-divinilbenzen kopolimerine fiziksel adsorpsiyon ve kovalent bağ ile tutuklanarak kullanılmıştır. Substrat inhibisyonunu önlemek için metanol (metanol/ yağ mol oranı 6:1) üç basamakta eklenmiştir. En uygun koşullarda (50 °C, 24 saat) metil ester dönüşümü % 97'dir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Kanola yağının tutuklanmış *Thermomyces lanuginosus* lipazı ile metanoliz tepkimesine sürenin etkisi, (■) tek basamaklı metanol eklemeli biyodizel üretimi, (●) iki basamaklı metanol eklemeli biyodizel üretimi, (►) üç basamaklı metanol eklemeli biyodizel üretimi (Dizge ve diğ., 2009)

Tablo 2.5. Basamaklı metanol eklemeli enzimatik transesterleşme tepkimeleri (Jegannathan ve Abang, 2008)

Yağ	Alkol	Tutuklama tekniği	Enzim miktarı (kütlece % yağa göre)	Metanol ekleme basamak sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	1.basamak dönüşüm (%)	2.basamak dönüşüm (%)	3.basamak dönüşüm (%)
Atık yağ	Metanol	Ads.	4	3	30	48	10. saat 34	24. saat 66	48. saat 90,4
Soya yağı-Kolza yağı karışımı	Metanol	Ads.	4	3	30	48	10. saat 34	24. saat 66	48. saat 95,6
Soya yağı	Metanol	Ads.	4	3	30	3,5	1. saat 42.4	2,5. saat 69,8	3,5. saat 98,7
Soya yağı-kolza yağı karışımı	Metanol	Ads.	4	2	30	36	7. saat 32	36.saat 96,5	
Soya yağı	Metanol	-	4	3	-	-	5. saat 32	25.saat 75	45. saat 90
Domuz yağı	Metanol	Ads.	20	3	40	30	3. saat 28	18. saat 60	30. saat 87,4

Ads: Adsorpsiyon

2.5.1.3. Enzim ve tutuklama desteği seçimi

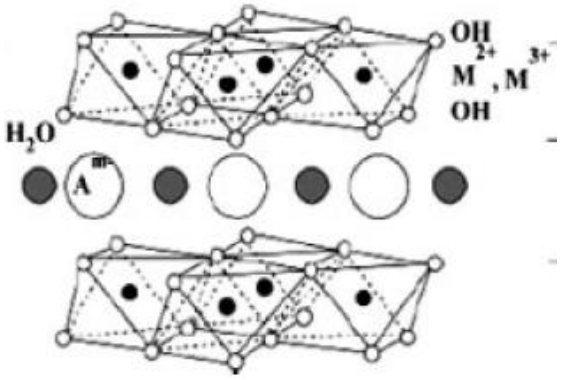
Lipaz enziminin başlıca görevi uzun zincirli trigliseridlerin hidrolizidir. Lipazları diğer enzimlerden ayıran en önemli özellik susuz ortamda önemli ölçüde aktif ve kararlı olmalarıdır. Bu sayede doğal olarak gerçekleşmeyen esterleşme ve transesterleşme tepkimelerini katalizleyebilirler (Cecilia ve diğ., 2007).

Yapılan literatür çalışmaları lipazın yapısı ile katalitik aktivitesi arasında bir ilişki olduğunu belirtmektedir. Trigliserid lipazlarının genel yapısı, katalitik dirsek olarak adlandırılan döngü içinde aktif serin bulunan merkezi L tabaka şeklindedir. Serin üzerinde hidrofobik bir yarık bulunur veya bu kısım enzim aktif hale geçtikten sonra oluşur (Svendsen, 2000). Bu hidrofobik yarık açil parçalarının sığacağı şekilde uzayan bir cep şeklindedir. Lipaz enziminin aktif duruma geçmesi için gerekli olan üzerindeki kapağın hareket etmesidir. *Thermomyces lanuginosa* aktif bölge ve yüzeyi üzerinde bir kapağa sahiptir. *Pseudomonas* ve *Candida antarctica* lipazı aktif bir bölgeye ve huni tipi bir kapağa sahiptir. *Candida rugosa* ise dış kısmındaki kapağı içinde bulunduran tünelin sonunda bir aktif bölgeye sahiptir (Pleiss ve diğ., 1998). Lipazların bu farklı yapıları, onların değişik substratlara karşı farklı aktivitelere sahip

olmalarının nedeni olabilir (Jegannathan ve Abang, 2008). Tablo 2.6'da farklı lipaz enzimleriyle üretilen biyodizel üretim çalışmaları bulunmaktadır.

Biyodizel üretiminde enzimler serbest olarak veya uygun bir desteğe tutuklanarak kullanılmaktadırlar. Fakat serbest enzimler çok hassastır ve kararsız yapılarından dolayı katalitik reaksiyonlarda kullanılmaya uygun değildirler. Tutuklama ile enzimlerin katalitik aktiviteleri, uzun süre reaksiyon parametrelerinden etkilenmeden kalabilmektedir (Rahman ve diğ., 2004). Ayrıca enzim uygun bir desteğe tutuklanarak kullanıldığında reaksiyonda tekrar kullanılabilmekte ve böylece süreç daha ekonomik hale gelmektedir (Balcao ve diğ., 1996).

Enzimin hidrofobik silika matriks ile tutuklanması, farklı kaynaklardan elde edilen lipaz çeşitlerine kolaylıkla uygulanabilir ve tutuklanmış lipazın etkinliği, ticari olarak satılan serbest enzimlerden daha yüksektir. Diğer yandan, enzim tutuklanması, biyokatalizörlerle ilgili ekonomik güçlükleri büyük oranda azaltır. Yapılan araştırmalardaki tutuklanma tekniklerinde sentetik veya doğal polimerler, gluteraldehit, çitosan, hidrotalsit, selit olarak bilinen diatomik toprak gibi inorganik malzemeler, gözenekli camlar, silika, fillosilikatlar, seramikler, sol-jel bazlı inorganik matriksler ve mikroemülsiyon bazlı jeller taşıyıcı malzeme olarak kullanılmıştır (Dumitriu ve dig., 2003).



Şekil 2.6. Hidrotalsit tipi anyonik kilin yapısı (Othman ve diğ., 2009)

Bu çalışmada lipaz enzimini tutuklamak için hidrotalsit desteği seçilmiştir. Tabakalı çift hidroksitler (LDHs) anyonik kil veya hidrotalsit benzeri malzeme olarak da bilinir. Hidrotalsitler, Mg^{+2} iyonunun M^{+3} üç değerli katyonu ile izomorfik yerdeğiştirmesinin gerçekleştiği brusite benzer [$Mg(OH)_2$] ağı ve su molekülleri

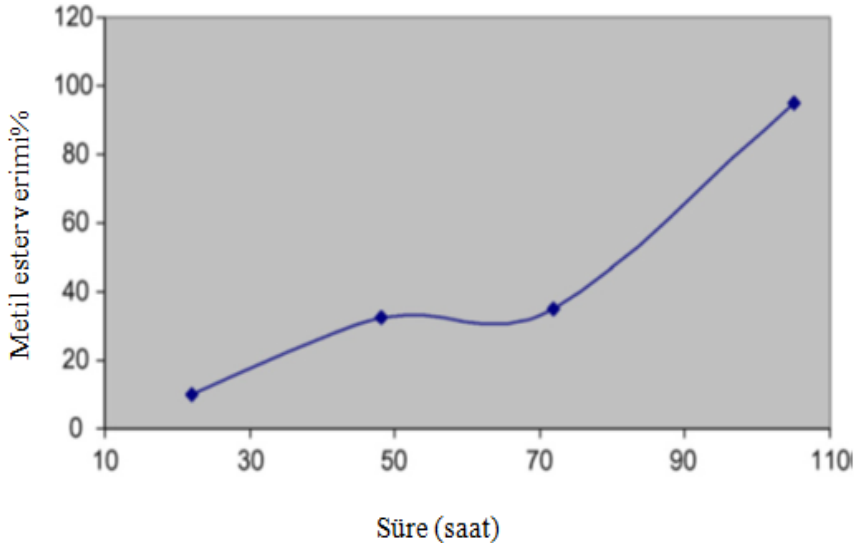
arasına yerleşmiş geçit anyonları ile karşılanan fazla pozitif yükten meydana gelir (Şekil 2.6). Hidrotalsitin organik ve inorganik anyon yakalama ve değiştirme özelliği onu benzersiz bir inorganik malzeme yapar. Hidrotalsitler; nötürleştirici, anyon değiştirici, polimer dengeleyici, anyon tutucu, katalizör ve katalizör desteği, adsorbent, elektroaktif ve fotoaktif malzeme olarak, ayrıca süzme ve eczacılık alanında kullanılırlar. Çok yönlü, basit, isteğe göre uyarlanabilen ve düşük maliyetli olma özellikleri hidrotalsitlerin sıklıkla kullanılmalarına sebep olur (Othman ve diğ., 2009).

Hidrotalsitler katalizör ve katalizör desteği olarak eşleniği malzemelere göre düşük maliyeti ve istenen şekilde değiştirilebilen özellikleri nedeniyle yaygın kullanım alanı bulmuştur. Hidrotalsitler istenen özelliklerin niteliğine göre farklı tekniklerle sentezlenebilir. Hidrotalsit hazırlamakta kullanılan kabul görmüş yöntemler olarak hidroliziz reaksiyonu, hidrotermal sentez, birlikte çöktürme sayılabilir (Tianwei ve diğ., 2010).

Yağız ve arkadaşları (2007), hidrotalsit ve zeolite tutuklanmış lipaz katalizörlüğünde çözücü kullanmadan metanol yardımıyla atık kızartma yağından biyodizel üretmişlerdir. Lipaz enzimi olarak Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosa*) kullanılmıştır. Birlikte çöktürme yöntemiyle elde ettikleri hidrotalsite tutuklanan lipaz miktarının, zeolite tutuklanan lipaz miktarından fazla olduğunu tespit etmişler ve biyodizel üretimine hidrotalsit ile devam etmişlerdir.

Metanoliz tepkimesi; 1:4 yağ/alkol mol oranı, yağa göre kütlece % 4 lipaz, 24 °C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Serbest Lipozyme TL IM kullanılarak 22-105 dakika süre aralığında metil ester dönüşümüne bakılmıştır. Şekil 2.7'de elde edilen en yüksek % 95'lik verime, serbest TL IM enzimiyle 105 saat sonunda ulaşıldığı gösterilmiştir. Aynı sürede hidrotalsite tutuklanmış TL IM ile elde edilen verim ise % 92,8' dir.

Zeng ve arkadaşları (2009), Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış *Saccharomyces cerevisiae* lipazı ile kolza yağından biyodizel üretimini inceledikleri çalışmalarında, alkol olarak metanolü kullanmışlardır. Tepkime 1:4 yağ/alkol mol oranı, atmosfer basıncı, 45 °C sıcaklık, 100 rpm karıştırma hızında 4,5 saatte gerçekleşmiştir. Ester dönüşümü % 96 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 2.7. Tepkime süresinin metil ester verimine etkisi (Yağız ve diğ., 2007)

Tablo 2.6. Farklı lipaz enzimleriyle biyodizel üretimi (Fjerbaek ve diğ., 2009)

Lipaz	Yağ	Alkol	Verim	Form	Şartlar
Pseudomonas fluorescens	Soya yağı	Metanol	%90	Serbest	35 °C, alkol yağ molar oranı 3:1. Metanol 3 adımda eklenmiştir. 90 saat, 150 rpm
Pseudomonas cepacia			>%80		
Candida rugosa			%90		
Pseudomonas fluorescens		Metanol	>%95	Tut.	40 °C, 200 rpm,30 saat. Alkol yağ molar oranı 3:1. Alkol 3 adımda eklenmiştir. Yağ kütlece %10 enzim içermektedir.
Rhizomucor miehei			>%80		
Thermomyces lanuginosa			>%60		
Candida antarctica	Ayçiçek yağı	Metanol	%93.2 (1-propanol)	Tut.	40 °C, 24 saat. Alkol yağ molar oranı 3:1. Alkol 3 adımda eklenmiştir. Yağ kütlece %10 enzim içermektedir.
Rhizomucor miehei		Etanol	%79.1 (96% EtOH)		
Thermomyces lanuginosa		1-Propanol	%89.8 (metanol)		
Thermomyces lanuginosa		2-Propanol	%72.8 (1propanol)		
Pseudomonas cepacia		1-Bütanol	%88.4(96% EtOH)		
Pseudomonas fluorescens		izobütanol	%45.3(96% EtOH)		
Pseudomonas cepacia	Mahua yağı	Ethanol	%96 (6 saat)	Tut.	40 °C, 200 rpm, yağ alkol molar oranı 4:1. Alkol 4 adımda eklenmiştir.Yağ kütlece %10 enzim içermektedir. Lipazlar pH-ayarlıdır.
			%92 (25 saat)	CLEAm	
			%99(25 saat)	PCMCn	
Domuza ait pankreatik lipaz	Babassu yağı	Bütanol	%95	Tut.	40–50° C, 150 rpm, alkol yağ molar oranı 10:1. Substrat kütlece %20 enzim içermektedir.

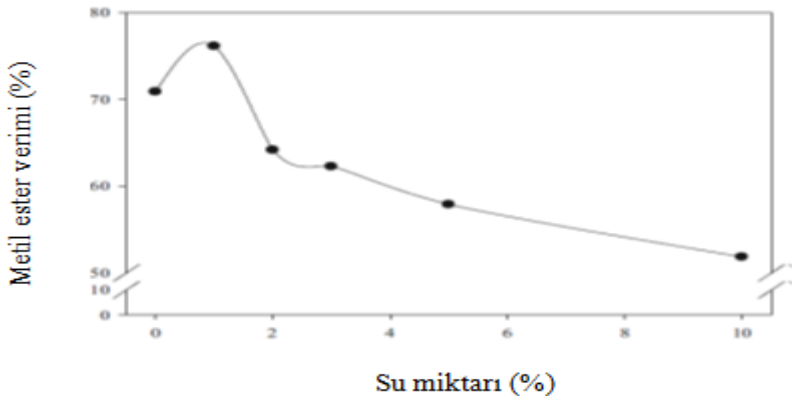
Tablo 2.6 (Devam). Farklı lipaz enzimleriyle biyodizel üretimi (Fjerbaek ve diğ., 2009)

Pseudomonas cepacia	Jatropha yağı	Etanol	%98	Tut.	50 °C, 200 rpm, 8saat. Alkol yağ molar oranı 4:1. Enzim kütlece %5 su içermektedir.Yağ kütlece %10 enzim içermektedir.
Candida antarctica	İç yağı	Metanol	%74	Tut.	30 °C, 200 rpm, 72 saat. Alkol yağ molar oranı 3:1. Metanol 3 adımda eklenmiştir. Yağ kütlece %10 enzim içermektedir.
Pseudomonas cepaciak Candida antarctica karışımı	Restorant gres yağı	Etanol %95	%96	Tut.	35 °C, 200 rpm, 24saat. Alkol yağ molar oranı 4:1. Etanol 3 adımda eklenmiştir. Yağ kütlece %5 enzim içermektedir. CA 1saat sonra eklenmiştir.

2.5.1.4. Su miktarı

Tepkime karışımındaki su derişimi, enzim katalizli transesterleşme tepkime hızı ve biyodizel üretim verimini etkileyen önemli faktörlerden biridir (Antcsak, 2009). Biyokatalizörler, aktivitelerini kaybetmemek için az bir miktar suya ihtiyaç duyarlar. Lipaz, sulu ortam ile organik faz ara yüzeyinde benzersiz bir özelliğe sahiptir ve lipaz aktivitesi bu ara yüzeye bağlıdır. Enzimin aktif hale geçmesi, yağ-su ara yüzeyinde lipaz moleküllerinin yapısal değişiklikleri sonucu aktif bölgenin açığa çıkması sonucu gerçekleşir. Tepkime ortamına su eklendikçe yağ-su damlacıkları sayısı artar ve böylece ara yüzey artar (Al-Zuhair ve diğ., 2006). Fakat sulu ortamda lipaz, hidroliz tepkimesini yürüttüğü için ortamdaki fazla su rakip hidroliz reaksiyonunu uyarır. Alkoliz tepkime ortamında bulunması gereken su miktarı, hidrolizi en aza indirgeyip, transesterleşme tepkimesi için enzim aktivitesini en yüksek değere taşıyacak miktardır (Noureddini ve diğ., 2005). Birçok araştırmacı, su miktarının enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisini incelemiştir.

Jeong ve Park (2008), tert-bütanol çözücülü kolza yağı metanolizine ortama eklenen su miktarının (% 0-10) etkisini incelemişlerdir. Katalizör olarak Novozyme 435 kullanılmıştır. Şekil 2.8'de görüldüğü gibi en yüksek biyodizel üretim verimine (% 76,1) % 1 su miktarında ulaşılmış; bu değere kadar ortama eklenen su miktarı arttıkça dönüşüm doğrusal şekilde artmış, daha sonra artan su miktarı ile dönüşüm azalmıştır.



Şekil 2.8. Su miktarının kolza yağı metanolizine etkisi. Tepkime koşulları: % 5 (yağ kütlesine göre) Novozyme 435, 3:1 metanol/yağ mol oranı, 40 °C (Jeong ve Park, 2008)

Dizge ve Keskinler (2008), tutuklanmış *Thermomyces lanuginosus* katalizörlüğünde kanola yağının metanolizine, ortama eklenen su miktarının [tepkime karışımına göre kütlece % 0/ 0,5/ 2,5/ 5,0 ve 10, (0–2 g)] etkisini araştırmışlardır. Ortama eklenen su miktarı % 0,5'e kadar, su yüzdesi arttıkça yağ asidi metil ester (YAME) miktarı artmış, % 0,5 su miktarının üzerine çıkıldıkça YAME verimi düşmüş ve serbest yağ asidi miktarı artmıştır. % 0,5 (0,1 g) su oranında en yüksek metil ester verimi (% 90) elde edilmiştir (Tablo 2.7).

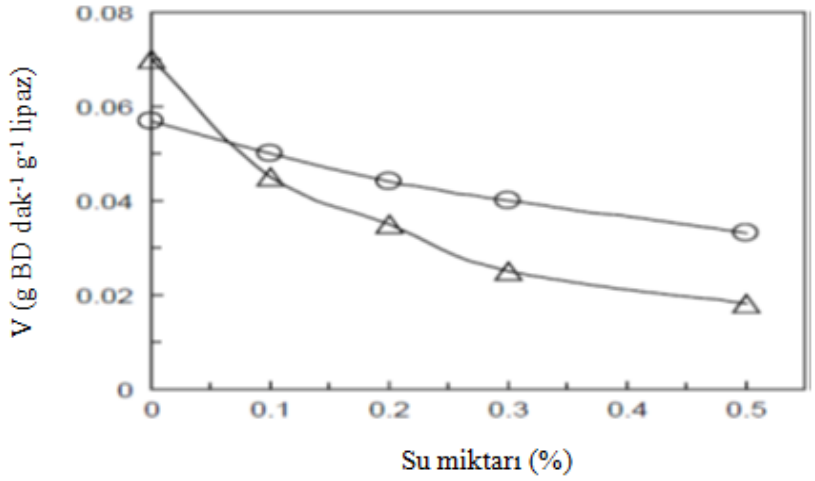
Tablo 2.7. Su miktarının kanola yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi. Tepkime koşulları: 430 µg enzim, 20 g yağ, 1:6 yağ/metanol mol oranı, 40 °C, 24 saat (Dizge ve Keskinler, 2008)

Su Miktarı (g)	Kompozisyon (kütlece %)				
	YAME[a]	TAG[b]	DAG[c]	MAG[d]	FFA[e]
0	85,8	1,8	5,5	4,1	2,8
0,1	90,0	1,3	3,4	2,4	2,9
0,5	43,0	40,2	8,4	4,7	3,7
1		42,7	9,6	5,1	4,5
2		44,1	10,0	5,3	8,7

[a] Yağ asidi metil esteri, [b] Triaçilgliserol, [c] Diaçilgliserol, [d] Monoaçilgliserol, [e] Serbest yağ asidi

Talukder ve arkadaşları (2006), tetrahidrofuran (THF) varlığında ve çözücüsüz ortamda hurma yağının metanol ile transesterleşme tepkimesine, ortama eklenen su miktarının etkisi üzerine çalışmışlardır. Tepkime karışımına % 0,009/ 0,031 ve 0,037

su ilave edildiğinde Şekil 2.9'da görüldüğü gibi lipaz aktivitesi düşmüştür. Ancak, THF varlığındaki düşüş çözücüsüz ortamdakinden daha azdır. Bunun sebebi olarak, polar yapıdaki THF çözücüsünün fazla suyu çözerek ortamdan uzaklaştırdığı düşünülmüştür.

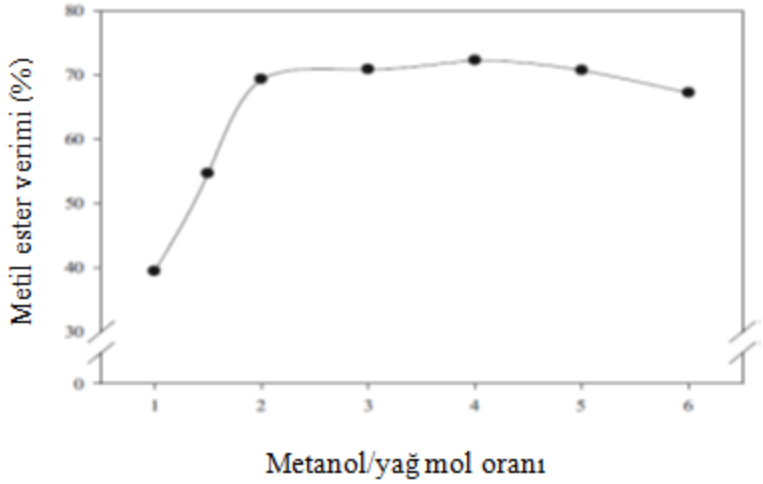


Şekil 2.9. Su miktarının hurma yağı metanolizini katalizleyen lipaz aktivitesine etkisi. Tepkime koşulları: 5 g hurma yağı, 0,2 g enzim, 2,5 ml THF, 180 rpm, 30 dak., 40 °C. THF varlığında ve çözücüsüz ortamda metanol/yağ mol oranı sırasıyla 3:1, 1:1. Δ THF olmayan ortam, ○ THF varlığında (Talukder ve diğ., 2006)

2.5.1.5. Yağ/metanol mol oranı

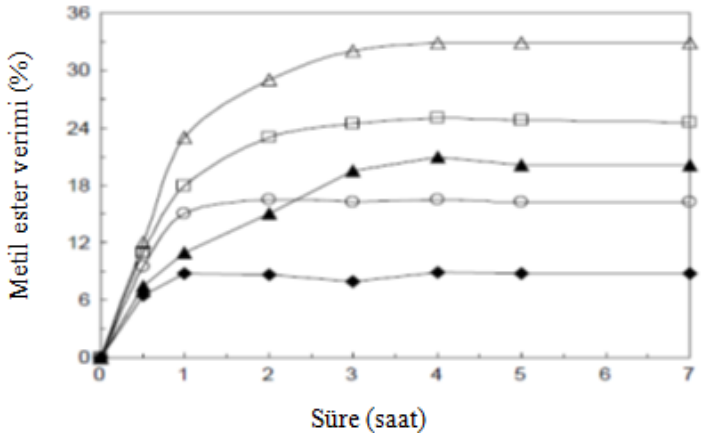
Transesterleşme tersinir bir tepkimedir ve substratlardan birinin miktarındaki artış ester veriminin artmasına sebep olur. 1 mol metil ester molekülünün tamamen dönüşmesi için gerekli metanol miktarı 3 moldür. Ancak fazla miktarda metanol kullanımı enzimin inaktive olmasına neden olmaktadır (Dizge ve Keskinler, 2008).

Jeong ve Park (2008), kolza yağının transesterleşme tepkimesine metanol/yağ mol oranının etkisini incelemişlerdir. % 5 (kolza yağı kütlesine göre) Novozyme 435 ile 40 ^{0}C sıcaklık ve 24 saat tepkime sonunda elde edilen dönüşüme (YAME verimi) metanol/yağ mol oranının (1:1-6:1) etkisi Şekil 2.10'da verilmiştir. Mol oranının 2:1 mol oranına kadar artmasıyla dönüşümde doğrusal bir artış gerçekleşmiş ve 2:1-5:1 aralığında en yüksek değere ulaşmıştır. 5:1 mol oranından sonra ise dönüşümde azalma meydana gelmiştir.



Şekil 2.10. Metanol/yağ mol oranının kolza yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi (Jeong ve Park, 2008)

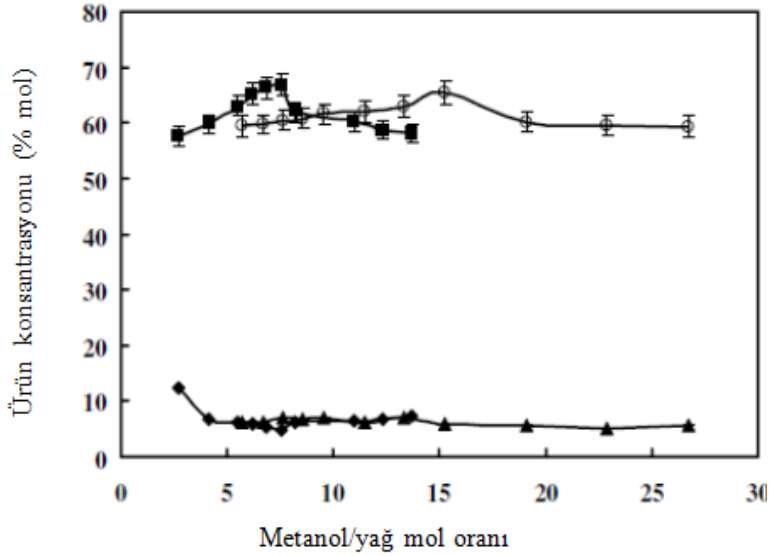
Talukder ve arkadaşları (2006), hurma yağının çözücülü ve çözücüsüz ortamda, akrilik reçineye tutuklu *Candida antarctica* lipazı ile metanolizi üzerine çalışmışlardır. Çözücüsüz ortamda metanol/yağ mol oranı 0,5:1-3:1 aralığında değiştirilerek biyodizel üretim verimleri karşılaştırılmıştır. 1:1 mol oranına kadar metanol miktarı arttıkça metanolizin hızı artmış, fakat 1:1 mol oranından yüksek mol oranlarına çıkıldıkça biyodizel üretim hızı büyük ölçüde azalmıştır. En yüksek biyodizel üretim verimine 1:1 metanol/yağ mol oranında ulaşılmıştır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11**.** Metanol/yağ mol oranının hurma yağı metanolizine etkisi. Tepkime koşulları: 5 g hurma yağı, 0,2 g enzim, 180 rpm, 40 °C. ○ 0,5:1, □ 0.75:1, Δ 1:1, ▲ 2:1, ♦ 3:1 (Talukder ve diğ., 2006)

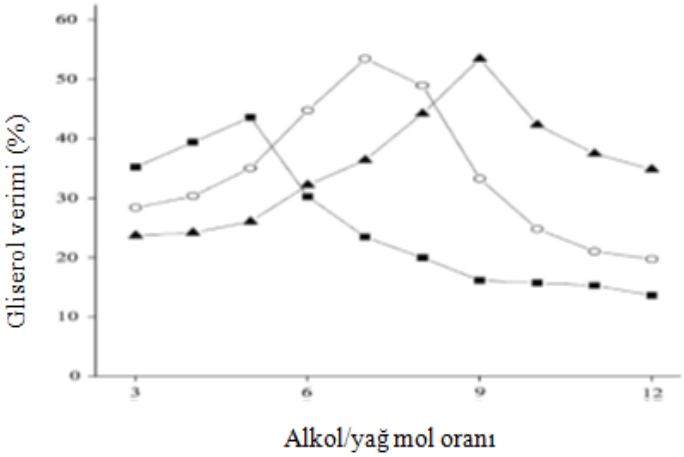
Noureddini ve arkadaşları (2005), soya yağının metanol ve etanol ile enzimatik transesterleşme tepkimesini araştırmışlardır. Bu çalışmada *Pseudomonas cepacia*

lipazı hidrofobik sol-jele tutuklanarak kullanılmıştır. Metanol miktarı 2,7-13,7 eşdeğer mol oranlarında değiştirilerek ester dönüşümlerine etkisi incelenmiştir. Metanol miktarı arttıkça metil ester üretimi artmış ve 7,5:1 metanol/yağ mol oranında en yüksek değere (% 67 mol) ulaşmıştır. Bu değerden sonra biyodizel üretimi azalmaya başlamıştır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Metanol/yağ mol oranının soya yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi. Tepkime koşulları: 3 g enzim, 10 g yağ, 700 rpm, 40 °C, 1 saat; (■) metil ester (Noureddini ve diğ., 2005)

Rodrigues ve arkadaşları (2008), üç farklı yağ (soya yağı, ayçiçek yağı, pirinç kepeği yağı), üç farklı ticari tutuklu lipaz (Novozym 435, Lipozyme TLIM ve Lipozyme RM-IM) ve dört farklı alkol (metanol, etanol, propanol, bütanol) kullanarak biyodizel üretimini denemişlerdir. Novozyme 435 en yüksek aktiviteyi düşük molekül ağırlıklı metanol ve etanol varlığında gösterirken, Lipozyme TL-IM aktivitesi için etanol, bütanol ve propanol ortamındaki tepkimelerde bir değişiklik gözlenmemiştir. Lipozyme RM-IM ise düşük molekül ağırlıklı alkoller (metanol, etanol) ile aktifliğini kaybetmiş ve bütanoliz tepkimesi sonunda yüksek % dönüşüm elde edilmiştir. Her bir tutuklu lipaz için uygun bir alkol seçilerek çalışmaya devam edilmiştir. Farklı alkoller kullanılarak ve alkol/yağ mol oranları 3:1- 12:1 aralığında değiştirilerek alkoliz tepkimeleri incelenmiştir. Novozyme 435, Lipozyme TL-IM ve Lipozyme RM-IM için en uygun mol oranları sırasıyla, 5:1 metanol/ yağ, 7:1 etanol/yağ, 9:1 bütanol/yağ olarak belirlenmiştir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Alkol derişiminin soya yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi.(■) Novozym 435, (○) Lipozyme TL-IM, (Δ) Lipozyme RM-IM. Reaksiyon koşulları: % 15 (yağ kütlesine göre), % 4 (yağ kütlesine göre) su, 30 °C, 6 saat (Rodrigues ve diğ., 2008)

2.5.1.6. Sıcaklık

Alkali katalizli transesterleşme tepkimesi metanolün kaynama noktasına yakın sıcaklıklarda gerçekleşirken, enzim katalizli biyodizel üretimi lipaz aktivitesinin korunması için düşük sıcaklıklarda gerçekleşir (Watanabe ve diğ., 2001). Biyodizel üretiminin düşük sıcakta yürütülmesi, enerji maliyetinin düşmesi açısından da istenilen bir durumdur.

Çeşitli lipazların katalizörlüğünde, çözücüsüz ortamda gerçekleşen transesterleşme tepkimesi için optimum sıcaklık aralığının 30-50 °C olduğu saptanmıştır (Antczak ve diğ., 2009).

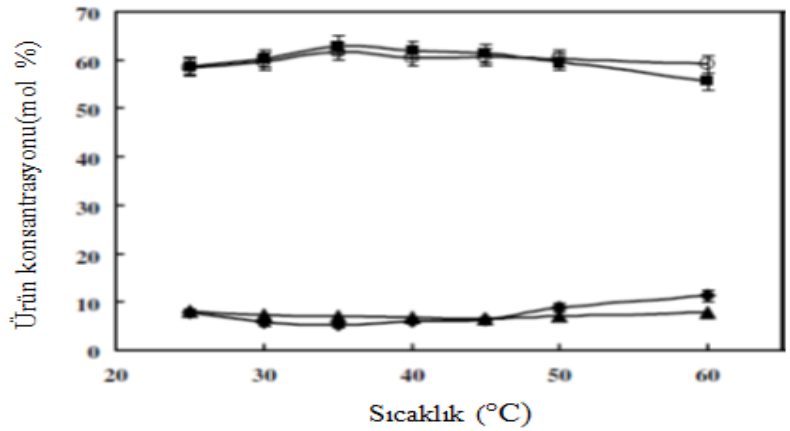
Köse ve arkadaşları (2002), sıcaklığın rafine pamuk tohumu yağının çözücüsüz ortamda alkolizine etkisini incelemişlerdir. Tepkimeler 30-70 °C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir. En yüksek metil ester verimine (% 91,5) 50 °C sıcaklıkta ulaşılmış, 50 °C'den yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça enzim aktivitesinin yüksek sıcaklıktan olumsuz etkilenmesi nedeniyle metil ester dönüşümü düşmeye başlamıştır (Tablo 2.8).

Tablo 2.8. Sıcaklığın pamuk tohumu yağı metanolizine etkisi. Tepkime koşulları: % 30 *C. antarctica* (yağ kütlesine göre), 12 g yağ+metanol, 1:4 yağ:metanol mol oranı, 7 saat (Köse ve diğ., 2002)

Sıcaklık (° C)	Kompozisyon (kütlece %)				
	ME[a]	TAG[b]	DAG[c]	MAG[d]	FFA[e]
30	84,0	10,2	3,8	1,5	0,5
40	87,4	7,3	2,8	1,9	0,6
50	91,5	3,5	2,1	2,5	0,6
60	90,0	4,9	3,0	1,4	0,7
70	87,3	4,0	5,2	1,6	1,9

[a] Metil ester, [b] Triaçilgliserol, [c] Diaçilgliserol, [d] Monoaçilgliserol, [e] Serbest yağ asidi

Noureddini ve arkadaşları (2005), hidrofobik sol-jel desteğe tutuklanmış *Pseudomonas cepacia* (PS) lipazı katalizörlüğünde, soya yağının transesterleşme tepkimesine sıcaklığın etkisini araştırmışlardır. Tepkimede alkol olarak metanol ve etanol kullanılmıştır. Şekil 2.14'te görüldüğü gibi tutuklu PS lipazının transesterleşme aktivitesinin sıcaklıkla değişimi oldukça azdır. Metanol ile yürütülen transesterleşme tepkimesi için en yüksek metil ester dönüşümü olan % 63 mol değeri 35 °C'de elde edilmiştir. Sıcaklık daha da yükseldiğinde ester dönüşümünde azalma gözlenmiştir. Etanol ile gerçekleşen tepkime için de ester dönüşümündeki davranış benzer şekilde olmuştur. En yüksek etil ester dönüşümüne (% 62 mol) 35 °C'de ulaşılmıştır.



Şekil 2.14. Sıcaklığın soya yağı lipaz katalizli transesterleşme tepkimesine etkisi. Tepkime koşulları: 3 g enzim, 10 g yağ, 700 rpm, 1 saat. (■) metil esterler ve (▲)serbest yağ asitleri: g metanol, 0,5 g su; (○) etil esterler ve (●) serbest yağ asitleri: 5 g etanol, 0,3 g su (Noureddini ve diğ., 2005)

Dizge ve Keskinler (2008), sıcaklığın hidrofilik poliüretan köpüğe tutuklu *Thermomyces lanuginosa* lipazı katalizörlüğünde kanola yağının transesterleşme tepkimesine etkisi üzerine çalışmışlardır. Biyodizel üretimi için gerçekleştirilen enzimatik transesterfikasyon tepkimesine etkisi araştırılan sıcaklık aralığı 30-70 °C'dir. Sonuçlara göre 40 °C'nin biyodizel üretimi için en uygun sıcaklık olduğu, 50 °C'nin üzerine çıkıldıkça tutuklu lipazın aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Tutuklu *T. lanigunosa* lipazı ile metanol varlığında, 40 °C'de ulaşılan metil ester verimi % 85,5'tir (Tablo 2.9). 40 °C üzerine çıkıldıkça ester verimi düşerken serbest yağ asidi miktarı artmıştır. Bu davranış, yüksek sıcaklığın hidroliz tepkimesi için daha uygun olduğunu kanıtlamıştır.

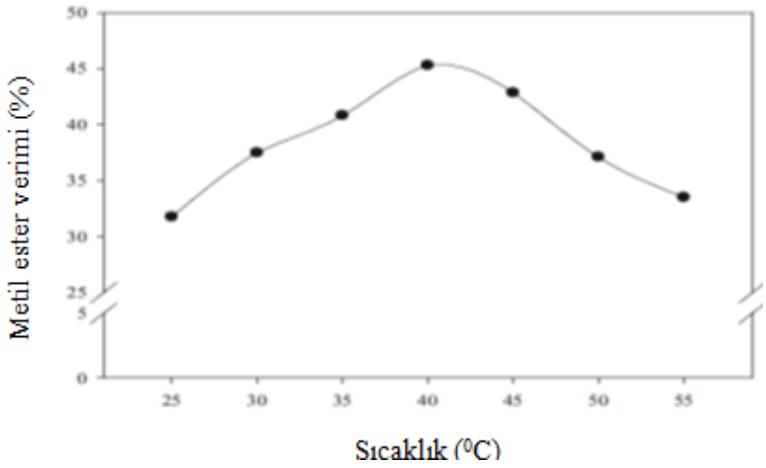
Tablo 2.9. Sıcaklığın kanola yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi. Tepkime koşulları: 430 µg enzim, 20 g yağ, 1:6 yağ/metanol mol oranı, 40 °C, 24 saat (Dizge ve Keskinler, 2008)

Sıcaklık (°C)	Kompozisyon (kütlece %)				
	YAME[a]	TAG[b]	DAG[c]	MAG[d]	FFA[e]
30	73,55	1,6	9,5	12,7	2,7
40	85,83	1,8	5,5	4,1	2,8
50	21,1	26,0	11,7	6,3	3,5
70		44,6	17,2	12,1	5,0

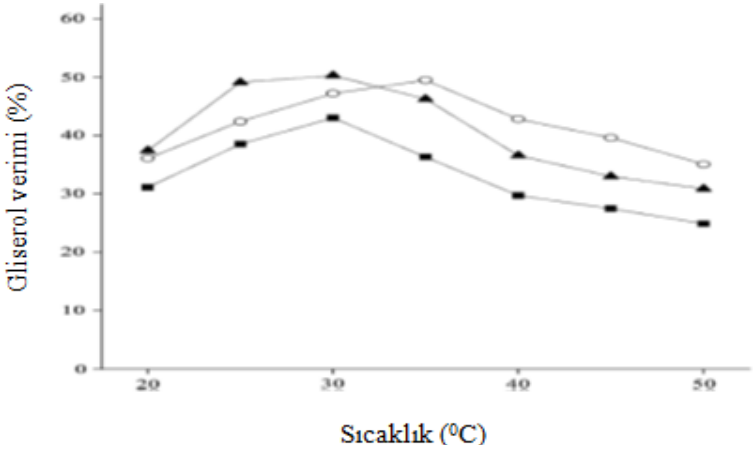
Jeong ve Park (2008), farklı sıcaklıklarda kolza yağının metanoliz tepkimesini incelemişlerdir. Çalışmada katalizör olarak Novozyme 435 kullanılmıştır. Tepkimelerde denenen sıcaklık aralığı 25-55 °C şeklindedir. Sıcaklığın dönüşüme etkisini veren Şekil 2.15 incelendiğinde 40 °C'ye kadar sıcaklık arttıkça dönüşüm artmış, 40 °C'de en yüksek değere (% 45,3) ulaşmış, bu değerin üzerinde metil ester dönüşümü düşmüştür.

Rodrigues ve arkadaşları (2008), üç farklı ticari tutuklu lipaz (Novozyme 435, Lipozyme TL-IM, Lipozyme RM-IM) katalizörlüğünde, üç farklı alkol (metanol, etanol, bütanol) ile soya yağının transesterleşme tepkimesine sıcaklığın etkisini 20-50 °C sıcaklık aralığında incelemişlerdir. Sıcaklığın dönüşüme etkisini veren Şekil 2.16 incelendiğinde her bir tutuklu lipaz için 25-35 °C sıcaklık aralığının en uygun olduğu tespit edilmiştir. Tüm durumlar için bakıldığında enzimlerin katalitik

aktiviteleri 35 °C'den azalmaya başlamıştır. Kullanılan lipaz enzimleri yüksek sıcaklıklarda aktifliklerini kaybetmeye başladıkları için, tepkime sıcaklığı 30 °C olarak seçilmiştir.



Şekil 2.15. Sıcaklığın kolza yağı metanolizine etkisi. Tepkime koşulları: 3:1 metanol/ yağ oranı, % 5 Novozyme 435 (yağ kütlesine göre), 200 rpm, 2 saat (Jeong ve Park, 2008)



Şekil 2.16. Sıcaklığın soya yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi. (■) Novozym 435, 5:1 metanol/yağ mol oranı; (○) Lipozyme TL-IM, 7:1 etanol/yağ mol oranı; (▲) Lipozyme RM-IM, 9:1 bütanol/yağ mol oranı. Tepkime koşulları: % 15 (yağ kütlesine göre) enzim, % 4 (yağ kütlesine göre) su, 6 saat (Rodrigues ve diğ., 2008)

2.5.1.7. Süre

Köse ve arkadaşları (2002), rafine pamuk tohumu yağının çözücüsüz ortamda gerçekleşen metanolizine tepkime süresinin etkisini incelemişlerdir. Tepkime

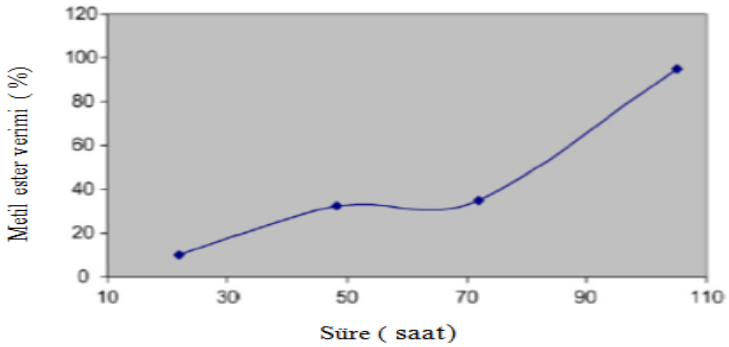
Novozyme 435 katalizörlüğünde gerçekleşmiştir. Metanol tepkime ortamına tek basamakta eklenmiştir. Tablo 2.10'da görüldüğü gibi 7. saate kadar biyodizel üretimi artmış, fakat 7-24 saat aralığında metil ester verimi % 91 civarında sabit kalmıştır. Buna göre optimum tepkime süresinin 7 saat olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 2.10. Tepkime süresinin rafine pamuk tohumu yağı metanolizine etkisi. Tepkime koşulları: 10 g yağ, % 30 Novozym 435(yağın kütlesine göre), 4:1 metanol: yağ mol oranı, 50 °C (Köse ve diğ., 2002)

Süre (saat)	Kompozisyon (kütlece %)				
	ME[a]	TAG[b]	DAG[c]	MAG[d]	FFA[e]
2	79,9	13,4	4,6	1,6	0,5
4	85,7	8,9	2,2	2,4	0,7
7	91,5	3,5	2,1	2,5	0,6
10	92,2	2,7	3,1	1,4	0,6
15	91,1	2,5	3,0	2,8	0,6
24	92,1	2,0	3,0	1,9	1,1

[a]Metil ester, [b] Triaçilgliserol, [c] Diaçilgliserol, [d] Monoaçilgliserol, [e] Serbest yağ asidi

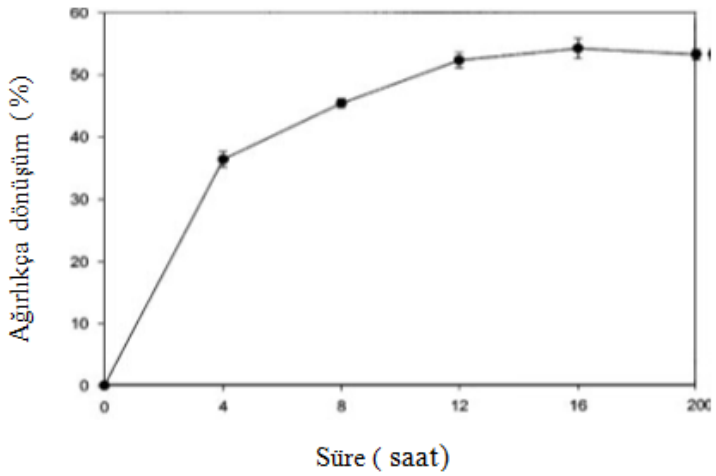
Yağız ve arkadaşları (2007), atık kızartma yağının metanol ile enzimatik transesterleşme tepkimesine süresinin etkisini araştırmışlardır. Metanol tek basamakta eklenmiştir. Lipozyme TL-IM ile 22-105 saat aralığında gerçekleşen tepkime sonucu üretilen metil ester miktarlarına bakılmıştır. Tepkime süresi arttıkça metil ester verimi sürekli artış göstermiş, 105. saatte % 95'e ulaşmıştır (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Tepkime süresinin atık kızartma yağı enzimatik transesterleşme tepkimesine etkisi. Tepkime koşulları: 9,65 g yağ, % 4 Lipozyme TL-IM (yağ kütlesine göre), 4:1 metanol/ yağ mol oranı, 200 rpm, 24 °C (Yağız ve diğ., 2007)

Chang ve arkadaşları (2005), tepkime süresinin kanola yağının transesterleşme tepkimesine etkisini araştırdıkları çalışmalarında Novozyme 435 lipazı ve açil alıcı olarak metanol kullanmışlardır. Tepkime ortamına çözücü olarak n-hekzan

eklenmiştir. Şekil 2.18'de görüldüğü gibi sürenin artmasıyla metil ester dönüşümü artmış ve 16 saat sonunda % 60 değerine ulaşmıştır. 20 saatten sonra ise dönüşümde belirgin bir değişim olmamıştır.



Şekil 2.18. Sürenin metil ester dönüşümüne etkisi. Tekime koşulları: 1 g kanola yağı, 1/4 yağ:metanol mol oranı, % 10 (yağ kütlesine göre) Novozyme 435, 3 cm^3 hekzan, 45 $^{\circ}C$ (Chang ve diğ., 2005)

Tablo 2.11. Lipaz katalizli farklı biyodizel üretim çalışmaları

Tutuklama Yöntemi	Destek	Enzim Kaynağı	Açil Aseptör	Alkol	Çözücü	Y:A	T(°C)/rpm/ t (h)	Su İçeriği	Verim (%)
Adsorpsiyon	Hidr.	*Thermomyces lanuginosa*	Atık bitkisel yağ	Metanol	Yok	1:4	24 /200 /105		92,8
Adsorpsiyon	Hidr.	*Saccharomyces cerevisiae*	Kolza yağı	Metanol	Yok		45 / 100/ 4,5	% 0,2 (yağ ağırlığına göre)	96
Adsorpsiyon	Celite-545	*Pseudomonas cepacia*	Jatropa	Etanol	Yok		50/- / 12	% 4-5(yağ ağırlığına göre)	98
Adsorpsiyon	Celite-545	*Chromobactrium viscosum*	Jatropa	Etanol	Yok	1:4	40/ -/ 10		92
Sol-gel	Celite® R632	Novozyme 435	Triolein	Metanol	Yok		40/-/ 6		60(metanol dönüşümü)
Çapraz bağlama	Çitosan	*Candida rugosa*	Kolza soapstock (yağ asidi giderilmiş kolza yağı)	Metanol	Yok	1:4	45/-/	% 6	63,6

Tablo 2.11 (Devam). Lipaz katalizli farklı biyodizel üretim çalışmaları

Tutuklama Yöntemi	Destek	Enzim Kaynağı	Açil Aseptör	Alkol	Çözücü	Y:A	T(0C)/rpm/t (h)	Su İçeriği	Verim (%)
Adsorpsiyon	Çitosan	Lipaz(kaynağı belli değil)	Ham ayçiçek yağı	Metanol	Yok	1:3	50/200/24	%20 (yağ ağırlığına göre)	33
	Çitosan	*Candida rugosa*	Kolza soapstock (yağ asidi giderilmiş kolza yağı)	Metanol	Yok	1:4,4	45/-/	% 4	75,4
Kovalent Bağ	Manyetik Fe_3O_4 nanoparçacık	*Thermomyces lanuginosa*	Soya yağı	Metanol	Yok	1:1	45/-/ 30		94
Kovalent Bağ	Lewatit-aldehit/ Anyon değiştirici reçine	*Thermomyces lanuginosus/ Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM)	Soya yağı	Etanol	Yok	1:7,5	30/ 200/10	%4 (yağ ağırlığına göre)	90
	Anyonik reçine	*Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM-77)	Soya yağı	Metanol	n-Hekzan	1:3,4	36,5/200/6	% 5,8	92,2
	Anyon değiştirici reçine	*Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM)	Kanola/ Zeytinyağ	Metanol		1:3	55/ -/ 24		85/ 82
	Akrilik reçine	*Candida antarctica* (Novozyme 435)	Soya yağı	Metanol		1:0,3	-/-/ 3,5		97
	Akrilik reçine	*Candida antarctica* (Novozyme 435)	Soya /kanola yağı	Metanol	Yok		-/-/48		>96
	Akrilik reçine	*Candida antarctica* (Novozyme 435)	Pamuk yağı	Metanol	ter-bütanol	1:4,2	50/-/500		95

Hidr: Hidrotalsit

3. MALZEME ve YÖNTEM

3.1. Malzemeler

3.1.1. Kimyasallar

Bu çalışma kapsamında yürütülen destek hazırlama, lipaz tutuklama aşamaları, transesterleşme tepkimesi ve yapılan analizlerde kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Kanola yağı yemeklik yağ olarak satılan marketlerden temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Formül	Marka
Magnezyum nitrat	$Mg(NO_3)_2.6H_2O$	Merck
Alüminyum nitrat	$Al(NO_3)_3.9H_2O$	Merck
Üre	$CO(NH_2)_2$	Merck
Şeker (Sükroz)	$C_{12}H_{22}O_{12}$	Balküpü
Lipozyme TL 100L (*Thermomyces lanuginosa*)		Novozyme
Lipozyme CALB-L (*Candida antarctica*)	-	Novozyme
Palatase 20000L (*Rhizomucor miehei*)		Novozyme
Albumin fraksiyonu V	-	Merck
Tris (hidroksimetil) aminometan	$NH_2C(CH_2OH)_3$	Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit	HCl	Merck
Sodyum hidroksit	NaOH	Merck
Coomassie Brillant Blue G20	-	Sigma
Etanol	C_2H_5OH	Merck
Metanol	CH_3OH	Merck
Fosforik asit	H_3PO_4	Merck
Para-nitrofenol	p-NP	Merck
Para-nitrofenil palmitat	p-NPP	Sigma
Kanola yağı	-	Gökkız
Metil heptadecanoat	$C_{18}H_{36}O_2$	Fluka
n-heptan	C_7H_{16}	Merck

3.1.2. Cihaz ve araç-gereçler

Destek hazırlama işlemi sırasında kalsinasyon işlemi MF 120 model (Nüve) kül fırınında, destek kurutma EV 018 model (Nüve) etüvde gerçekleşmiştir. Gemini V model (Micromeritics) Yüzey Alanı ve Gözenek Boyut Analiz Cihazı ile hidrotalsit desteklerin yüzey alanları ölçülmüştür. Üretilen hidrotalsit desteklere enzim tutuklama işlemi New Brunswick Scientific innova 40 inkübatör, protein miktarı ve enzim aktivite ölçümleri Hach DR 5000 UV-Vis spektrofotometre de yapılmıştır. Transesterleşme tepkimesi sonucu oluşan metil ester içeriğine alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 30 m x 320 µm x 0,25 µm kapiler kolon (CARBOWAX 20M) ile donatılmış Agilent 6890N GC analiz sistemiyle bakılmıştır. Bu çalışmada ayrıca, Hettich Mikro 220R santrifüj, IKA RCT classic ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, Mettler Toledo SevenEasy S20-K pH metre, Kern ABJ 320-4 analitik terazi, Brand Transferpette S otomatik mikropipet (100 µl, 1000 µl, 5 ml), USF ELGA distile su cihazı (USF ELGA kompozit filtreli) ve Vestel (BZP-M3203W model) No-Frost buzdolabı da kullanılmıştır. Kullanılan diğer araç-gereçler aşağıda sıralanmıştır:

- ✓ Kapaklı cam viyal (6 ml)
- ✓ Desikatör
- ✓ Kuartz cam küvet
- ✓ Teflon magnet
- ✓ Beher
- ✓ Erlen
- ✓ Balon joje
- ✓ Büret
- ✓ Mezür
- ✓ Ependorf tüpü
- ✓ Spatül
- ✓ Eldiven

3.2. Yöntemler

3.2.1. Deneysel yöntemler

3.2.1.1. Üre hidrolizi ve yanma yöntemleriyle Mg- Al hidrotalsit hazırlama

Biyodizel üretiminde kullanılacak Mg-Al hidrotalsitin yapılan literatür araştırması sonunda üre hidrolizi ve yanma yöntemi ile hazırlanmasına karar verilmiştir.

Hidrotalsit sentezlemede birçok yöntem kullanılır. Hidrotalsit üretim yöntemleri, hidrotalsitin fizikokimyasal (saflık, kristalleşme, yüzey alanı gibi) özelliklerini belirler. Üre hidrolizi yöntemi ile hidrotalsit üretiminde, ortam pH'ı ve sıcaklığının sabit kalması sonucunda yüksek kristallikte ve daha homojen bir destek oluşması ve daha az yıkama işlemine gerek duyulması bu yöntemin avantajlarındandır. Yanma yöntemiyle hidrotalsit üretiminde ise, kimyasal tepkimenin çok kısa sürede tamamlanması ile enerji tasarrufunun sağlanması ve hidrotalsit üretimi sırasında herhangi bir çözücüye ihtiyaç duyulmaması sonucu yıkama işleminin önemli ölçüde azalması da yanma yönteminin avantajlarıdır (Othman ve diğ., 2009).

Üre hidrolizi yöntemi Zeng ve diğ. (2009) tarafından belirtilen yöntem kullanılarak, yanma yöntemi ise Davila ve diğ. (2008) belirttiği şekilde uygulanmıştır.

Üre hidrolizi yöntemiyle Mg-Al hidrotalsit üretimi basamakları şu şekildedir;

1) 0,16/ 0,08 ve 1,2 mol oranlarında $Mg(NO_3)_2.6H_2O$, $Al(NO_3)_3.9H_2O$ ve üre 1 lt distile suda çözülür ve 95 °C, 300 rpm manyetik karıştırıcıda 10 saat karıştırılır.
2) Karıştırıcı kapatılır ve 16 saat ısıtmaya devam edilir. Suyu buharlaşan çözelti soğutularak filtre edilir.
3) Elde edilen katı çökelti 5 defa 100ml'lik saf suyla yıkanır.
4) Yıkamanın sonunda 21 saat 100 °C etüvde kurutulur.
5) 500°C kül fırınında 4 saat kalsine edilir.
6) Son olarak havanda dövülerek ince toz haline getirilir ve oda sıcaklığında desikatörde saklanır.

Yanma yöntemiyle Mg-Al hidrotalsit üretimi basamakları şu şekildedir;

1) Mg/Al mol oranı 3/1 olan $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ ve $Al(NO_3)_3.96H_2O$ katı karışımına, bu karışımın 1/5'i kadar şeker eklenerek distile suyla süspansiyon hazırlanır.
2) Süspansiyon 80°C'ye ısıtılarak suyu buharlaştırılır ve daha sonra bütün suyu giderilene kadar 120°C'deki etüvde kurumaya bırakılır.
3) Kurutmanın ardından 500^0C kül fırınında tamamen beyazlaşana kadar (~20 dak.) kalsine edilir.
4) Sırasıyla 0,1N Na_2CO_3 çözeltisi ve distile suyla yıkanır.
5) 21 saat 100 °C etüvde kurutulur ve oda sıcaklığında desikatörde saklanır.

3.2.1.2. Mg-Al hidrotalsit üzerine lipaz tutuklanması

Mg-Al hidrotalsit yukarıda belirtilen üre hidrolizi ve yanma yöntemlerine göre hazırlanmış ve enzimlerin tutuklanmasında destek olarak kullanılmıştır. Her iki şekilde hazırlanan hidrotalsite lipaz tutuklanırken aynı yöntem kullanılmıştır.

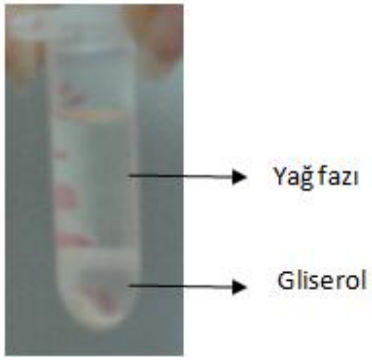
0,01 g Mg-Al hidrotalsit üzerine tutuklama işlemi Lipozyme TL 100L, Lipozyme CALB-Lve Palatase 20000L için 50-75-100 µl miktarlarında enzim, 7,0-7,5-8,0-8,5-9,0 pH değerlerinde 3 ml tris-HCl tamponu ile 6-20-37-45 °C sıcaklıklarda, 200 rpm karıştırma hızında, 24 saat inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Tutuklama sonunda 25 °C, 6000 rpm hızında, 5 dakika sentrifüjlenmiş ve desteğe tutuklanmamış lipaz enziminin ayrılması için tutuklamada kullanılan tampon ile yıkanmıştır. Kuruması için desikatöre konmuştur. Desteğe tutuklanmış enzim miktarlarına Bölüm 3.2.2.1' de anlatılan yöntem ile bakılarak hidrotalsite en iyi tutuklanan lipaz enzimine karar verilmiştir. Ardından üre hidrolizi yöntemiyle üretilen hidrotalsite en uygun lipaz enziminin 50-75-100 µl miktarı, pH 7,0-7,5-8,0-8,5-9,0 değerlerinde tampon ortamında ve 25-37-45 °C inkübasyon sıcaklıklarında aktiviteleri Bölüm 3.2.2.2'deki yöntemle tespit edilmiştir.

Farklı yöntemlerle hazırlanan Mg-Al hidrotalsitlere 5 saatlik inkübasyon süresinde tutuklanan enzim miktarlarına Bölüm 3.2.2.1'de anlatılan yöntemle bakılmış ve üre hidrolizi yöntemiyle hazırlanmış hidrotalsite tutuklanan enzim miktarı daha çok olduğu için deneylere üre hidrolizi ile üretilen hidrotalsit ile devam edilmiştir.

Hidrotalsite tutuklanmış enzimin denatürasyonunu engellemek için, daha sonra biyodizel üretiminde kullanılmak üzere 4 °C buzdolabında saklanmıştır.

3.2.1.3. Kanola yağından biyodizel üretimi

Mg-Al hidrotalsite lipaz tutuklama deneyleri sonunda deteğe tutuklanan mg protein miktarı, % tutuklanma verimi ve enzim aktivitesi sonuçlarına göre en uygun katalizör seçilmiş ve biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Biyodizel üretim deneyleri 6 ml cam viyallerde, 200 rpm çalkalama hızında inkübatörde gerçekleştirilmiştir. 2 g kanola yağı, 1/4 yağ/metanol mol oranında (3 basamaklı, 4 saatte bir metanol ekleleme) tepkime ortamına eklenen farklı su miktarı, sıcaklık ve enzim miktarlarında yapılan deneyler sonucu oluşan metil ester verimlerine bakılmıştır (Bölüm 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3). Deney parametreleri Tablo 3.2'de verilmiştir. Daha sonra yağ/metanol mol oranı değiştirilerek (3 basamaklı, 4 saatte bir metanol ekleme) ve her bir mol oranı için farklı su içeriklerinde elde edilen metil ester verimleri karşılaştırılmıştır (Bölüm 4.2.4, 4.2.5). Parametreler Tablo 3.3'te gösterilmiştir. Son olarak yağ/metanol mol oranı 1/16 (3 basamaklı metanol ekleme) değeri için su miktarı, sıcaklık ve metanol ekleme sıklığının biyodizel üretimine etkisi incelenmiştir. Bu deney için değiştirilen parametreler Tablo 3.4'te bulunmaktadır.



Şekil 3.1. Biyodizel üretiminde yağ ve gliserol fazı

Tablo 3.2. 1/4 yağ/metanol mol oranında yapılan deney parametreleri (200 rpm, 24 saat)

Parametreler	Değerler
Su miktarı (yağa göre kütlece %)	0/0,8/1,6/8,3/16,5/24,8/33,1/41,4/49,6
Sıcaklık (°C)	25/30/35/45/55
Enzim miktarı (yağa göre kütlece %)	1/2/3/6/10

Tablo 3.3. Farklı yağ/metanol mol oranlarıyla yapılan deney parametreleri (yağ kütlesine göre % 3 enzim, 25 °C, 200 rpm, 24 saat)

Parametreler	Değerler
Yağ/metanol mol oranı	1/3, 1/4, 1/6, 1/10, 1/16
Su miktarı (yağa göre kütlece %)	0/16,5/33,1/49,6

Tablo 3.4. 1/16 yağ/metanol mol oranında yapılan deneylerin parametreleri (yağ kütlesine göre % 3 enzim, 200 rpm, 24 saat)

Parametreler	Değerler
Su miktarı (yağa göre kütlece %)	0/,08/1,6/8,3/16,5/24,8/33,1/41,4/49,6
Sıcaklık (°C)	25/35/45/55
Metanol ekleme sıklığı	3 saatte bir, 4 saatte bir, 6 saatte bir

3.2.2. Analiz yöntemleri

3.2.2.1. Protein tayini

Bu çalışmada protein miktarları Bradford yöntemiyle saptanmıştır. Bradford yöntemi proteine bağlanan Coomassie Brillant Blue G250 boyasının 595 nm'de absorbans vermesi ilkesine dayanan spektrofotometrik ölçüm yöntemidir (Bradford, 1976). Referans protein olarak bovine serum albumin kullanılmıştır. Yöntemin ayrıntıları EK A'da verilmiştir.



Şekil 3.2. Bradford yöntemi (URL-11)

3.2.2.2. Enzimatik aktivite tayini

Tutuklanmış ve serbest enzimin aktivite tayini Winkler ve Stuckmann Yöntemi ile yapılmıştır (Winkler ve Stuckmann, 1979). Uygulanan yöntem ve hesaplamalar EK B'de verilmiştir.

3.2.2.3. BET yüzey alanı ölçümü

Laboratuarda üre hidrolizi ve yanma yöntemleriyle üretilen Mg-Al hidrotalsit desteklerin yüzey alanları Yüzey Alanı ve Gözenek Boyut Analiz Cihazı (Micromeritics model Gemini V) ile tespit edilmiştir.

3.2.2.4. Metil ester dönüşümü tayini

Transesterleşme tepkimesi sonunda karışımdaki metil ester dönüşümüne alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 30 m x 320 µm x 0.25 µm kapiler kolon (CARBOWAX 20M) ile donatılmış Agilent 6890N GC analiz sistemiyle bakılmıştır. Hesaplamaların ayrıntıları EK C'de verilmiştir.

3.2.3. İstatistiksel deney tasarımı (Yüzey cevap yöntemi, RSM)

RSM analizi design expert ve ikinci dereceden denklem modeli Denklem (3.1),

(3.1)

kullanılarak 30 deney ile gerçekleştirilmiştir. Biyodizel üretimi için seçilen değişkenler ve değerleri şu şekildedir: 20-42,5 $^{\circ}$C; enzim oranı % 1,5-4; yağ/alkol mol oranı 2-8; su oranı % 1-9'dir. Burada Y cevap (% YAME dönüşümü); β_{k0}, β_{ki}, β_{kii} ve β_{kj} sabit katsayılar; x_i kodsuz bağımsız değişkenlerdir.

4. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Enzim Tutuklama ve Farklı Parametrelerin Enzim Tutuklamaya Etkisi

4.1.1. Lipaz tutuklama

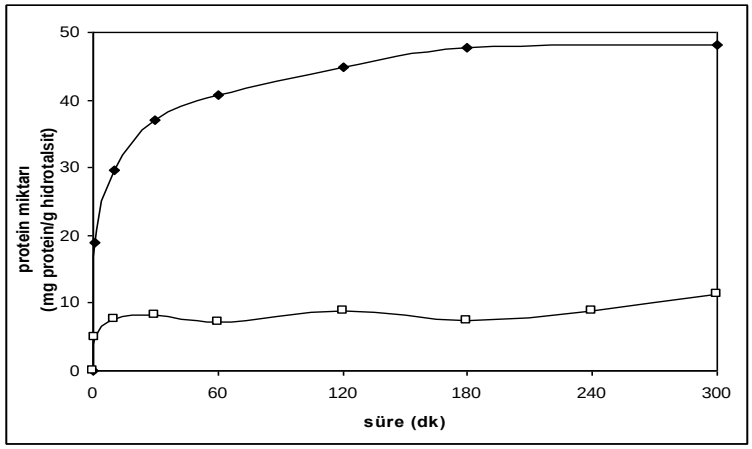
Enzimler farklı yöntemlerle destek malzemelerine tutuklanabilirler (Bölüm 2.4). Bu çalışmada lipaz enzimleri Mg-Al hidrotalsite fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle tutuklanmıştır. Organik ortamlarda kullanılan enzimler genellikle katı bir desteğe tutuklanırlar. Lipazlar organik ortamda çözünmediği için destek ve lipaz arasında kuvvetli kovalent bağa ihtiyaç duyulmamakta ve adsorpsiyon yöntemiyle tutuklama yeterli olmaktadır. Adsorpsiyonla tutuklama kolay ve ucuz bir yöntemdir. Bu yöntemde bağlanmayı sağlayan kuvvetler hidrojen bağları, Vander Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir (Chang ve diğ., 2007).

Bu çalışmada Lipozyme TL 100L (*Thermomyces lanuginosa*) Mg-Al hidrotalsite tutuklanarak elde edilen en yüksek aktivite 11.3 U/g destek tir. Hidrotalsite lipaz tutuklama işlemi ile ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte yapılan bazı çalışmalar vardır. Bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* lipazı çapraz bağlı jelatin, silika-jel, çitosan, Mg/Al mol oranı 4.0 olan Mg-Al hidrotalsit ve γ-Al_2O_3 desteklerine tutuklanmıştır ve enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır. En yüksek enzim aktivitesine (725 U g^{-1}) Mg-Al hidrotalsite tutuklu lipaz katalizör ile ulaşılmıştır (Zeng ve diğ., 2009). Bir diğer çalışmada *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL-IM) lipazı dört farklı çeşit zeolit ve Mg-Al hidrotalsite tutuklanmıştır. Desteklere tutuklanan enzim miktarları ve tutuklanma verimleri karşılaştırıldığında hidrotalsite tutuklanan enzim miktarının (13 mg protein/g destek) ve tutuklanma veriminin (% 95,8), zeolite tutuklanan enzim miktarı (9 mg protein/g destek) ve tutuklanma veriminden (% 56,1) daha fazla olduğu görülmüştür (Yağız ve diğ., 2007).

4.1.1.1. Farklı yöntemlerle hazırlanmış Mg-Al hidrotalsitlerin enzim tutuklama performanslarının karşılaştırılması

Hidrotalsitler farklı yöntemlerle üretilebilirler. Farklı sentezleme yöntemleri hidrotalsitin fizikokimyasal özelliklerine (faz saflığı, kristallik ve yüzey alanı) etki eder (Othman ve diğ., 2009).

Bu çalışmada Mg-Al hidrotalsit üre hidrolizi ve yanma yöntemleriyle üretilmiştir. Üre hidrolizi yöntemiyle üretilen hidrotalsit yüksek saflıkta tek faz şeklindedir ve yüksek yük yoğunluğuna sahiptir. Bu özellikler diğer hidrotalsit sentezleme yöntemlerinde söz konusu değildir (Prinetto ve diğ., 2000; Rao ve diğ., 2005). Yanma yöntemiyle hidrotalsit üretimi, enerji ve zaman tasarrufu açısından diğer yöntemlerden avantajlıdır. Ayrıca çözücü kullanılmadığı için destek yıkama işlemi oldukça kısa sürer (Othman ve diğ., 2009).



Şekil 4.1. Farklı yöntemlerle üretilen hidrotalsitlere tutuklanan enzim miktarları. (♦): üre yöntemiyle hazırlanan hidrotalsit, (□): yanma yöntemiyle hazırlanan hidrotalsit. (Tutuklama koşulları: 0,01 gr destek, 3ml pH 9,0 tris-HCl tampon, 50 µl enzim, 200rpm, 37°C, 5 saat)

Üre hidrolizi ve yanma yöntemleriyle hazırlanan Mg-Al hidrotalsite sıvı *Thermomyces lanuginosa* lipazı tutuklanmıştır. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi tutuklama süresinin artmasıyla her iki hidrotalsit desteğe tutuklanan enzim miktarı önce artmış, ilerleyen sürelerde sabit kalmış; üre hidrolizi ile üretilen hidrotalsite tutuklanan enzim miktarı 180 dk sonunda 47 mg protein/ g destek olarak elde edilmiştir. Bu değer, yanma yöntemi ile hazırlanan hidrotalsite tutuklanan enzim

miktarından (180 dk'da 6 mg protein /g destek) daha fazla olmuştur. Buradan üre hidrolizi ile üretilen hidrotalsitin yüzey alanının daha geniş olduğu düşünülmüştür.

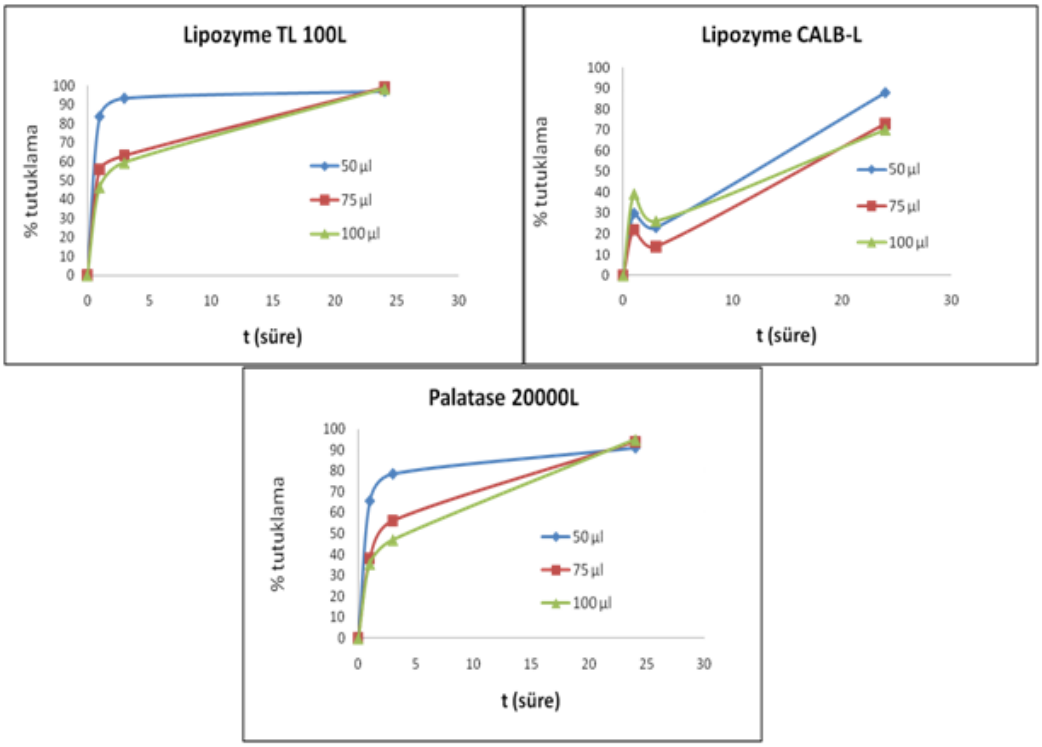
Tablo 4.1'de verilmiş olan BET analiz sonuçları da bu görüşü desteklemektedir.

Tablo 4.1. Farklı yöntemlerle hazırlanan hidrotalsit desteklerin BET yüzey alanı

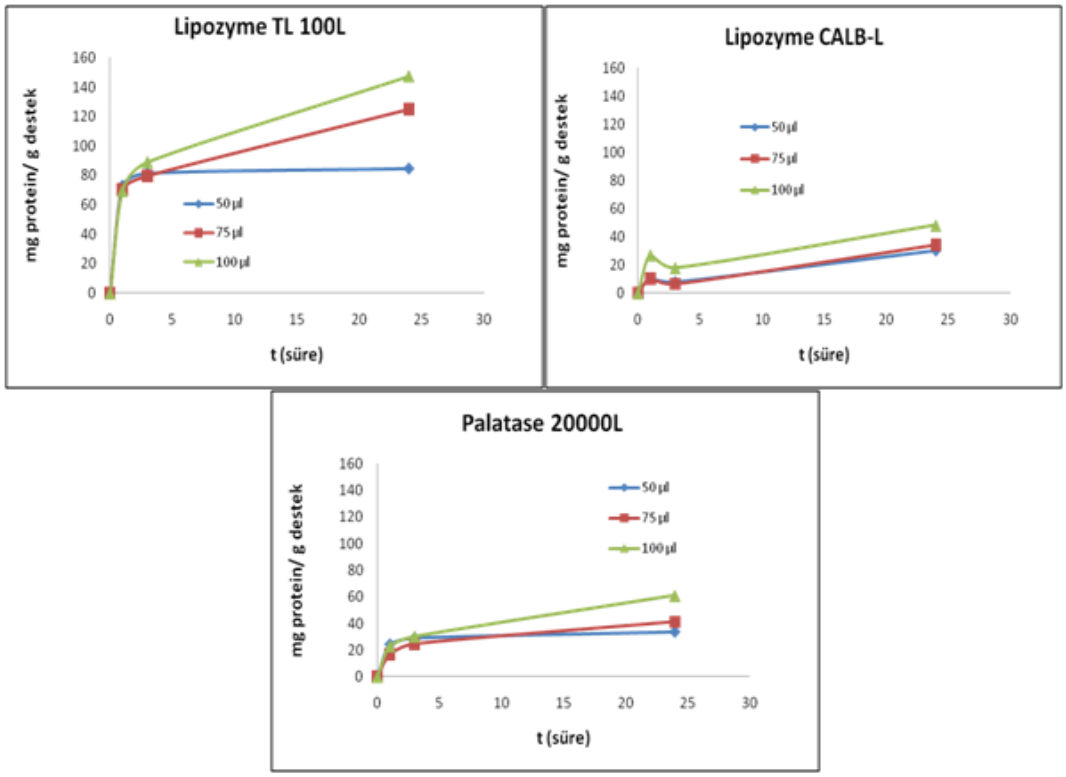
Hidrotalsit	BET Yüzey Alanı (m^2/g)
Üre hidrolizi yöntemi ile üretilen hidrotalsit	136,4
Yanma yöntemi ile üretilen hidrotalsit	5,9

4.1.1.2. Enzim miktarı

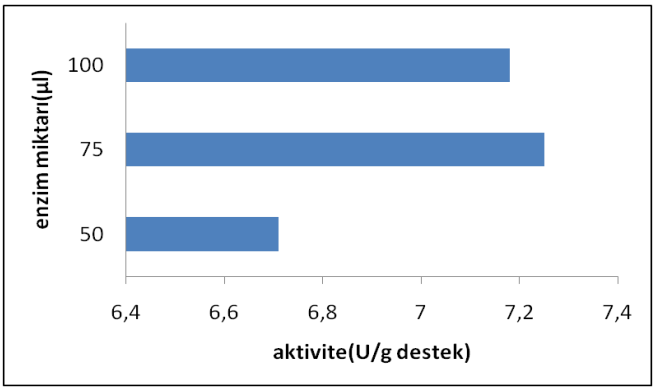
Yapılan çalışmada ortama eklenen enzim miktarı arttıkça (50-100 µl) beklendiği şekilde hidrotalsite bağlanan enzim miktarı artmıştır. Şekil 4.2'de 24 saat sonunda her üç enzim için (Lipozyme TL 100L, Lipozyme CALB L, Palatase 20000 L) farklı derişimlerde enzim miktarının tutuklanma verimleri birbirine oldukça yakındır. Lipozyme TL 100L'nin hidrotalsite tutuklanması belirlenen sürede % 100' e yakın bir değerdedir. Lipozyme TL 100L için desteğe tutuklanan enzim miktarı farklı enzim derişimlerinde 80-140 mg protein/g destek iken Lipozyme CALB-L için 20-50mg protein/g destek, Palatase 20000L için 30-60 mg protein/g destektir (Şekil 4.3). Bu sebeple bu üç lipaz enzimi arasından Lipozyme TL 100L seçilerek hidrolitik aktivite tayini Bölüm 3.2.2.2'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Şekil 4.4'te verilen aktivite tayini sonuçlarına bakıldığında ortama eklenen enzim miktarı iki katına çıkarılmasına rağmen aktivite değerinde önemli bir artış gözlenmemiştir. Bu sonuç, desteğe yüklenen enzim miktarı arttıkça enzim moleküllerinde kümelenme meydana gelerek birbirlerinin aktifliklerini engelledikleri şeklinde yorumlanmıştır. Aynı zamanda, enzimin en az miktarda kullanılması enzim maliyeti açısından da oldukça önemlidir. Bu sonuçlara göre, hidrotalsite tutuklanan enzim ve enzim miktarı; Lipozyme TL 100L, 50 µl olarak belirlenmiştir. Ancak sıcaklık ve pH' ın farklı lipaz enzimleri üzerinde farklı etkilerinin olabileceği düşüncesiyle pH ve sıcaklık parametrelerinin Lipozyme CALB L ve Palatase 20000 L'nin hidrotalsite tutuklanmasına etkileri de incelenmiştir.



Şekil 4.2. Tutuklama ortamına eklenen enzim miktarının tutuklanma verimine etkisi. (Tutuklama koşulları: pH 9,0 tris-HCl tampon, 200rpm, 37°C, 24saat)



Şekil 4.3. Tutuklama ortamına eklenen enzim miktarının desteğe yüklenen protein miktarına etkisi. (Tutuklama koşulları: pH 9,0 tris-HCl tampon, 200rpm, 37°C, 24saat)



Şekil 4.4. Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100L'nin miktarının aktiviteye etkisi. (Tutuklama koşulları: pH 9,0 tris HCl tampon, 200rpm, 37°C, 24saat)

4.1.1.3. pH

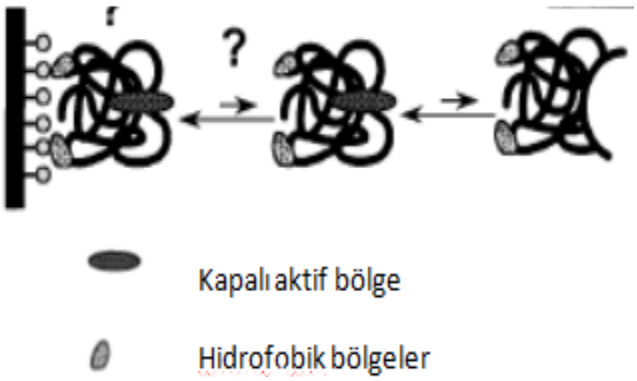
Ortam pH değeri enzim tutuklamada önemli bir parametredir. Adsorpsiyon için en uygun pH aralığında, belirli enzimler kararlıdır ve aktivite kayıpları önemsiz orandadır. pH, hidrotalsit yüzeyindeki iyonik grupların polaritesini etkilediği gibi lipaz moleküllerinin iyonik konumuna da etki eder (Zeng ve diğ., 2009).

Bu çalışmada kullanılan enzimlerden Lipozyme TL 100L ve Lipozyme CALB L için pH 7'den 9'a çıkıldıkça tutuklanma miktarı ve verimi artmış, Palatase 20000 L'de ise önemli bir değişim olmamıştır (Tablo 4.2, Tablo 4.3). Bu sonuçlara göre, bazik ortamda Lipozyme TL 100L ve Lipozyme CALB L'nin polaritesi azalmış, böylece hidrotalsit yüzeyindeki lipaz bağları artmış olabilir. Palatase 20000 L içinse, seçilen pH aralığının (pH 7.0-9.0) bu lipaz enzimine etki etmediği düşünülmektedir.

Lipazların, hidrofobik desteklere karşı özel bir ilgisi bulunmaktadır. Hidrofobik bir desteğe tutuklandıklarında aktiviteleri artar. Bunun yanında, lipazlar hidrofilik yapıdadırlar, fakat aktif bölgelerinin çevresi oldukça hidrofobik bir tabakayla çevrilidir. Lipazların hidrofobik desteklere olan ilgisi lipazların bu özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Fernandez-Lafuente ve diğ., 1998).

Lipazların hidrofobik arayüzeylerde aktif hale gelmeleri onların karakteristik özelliğidir. Bu hidrofobik arayüzey olmadığı durumda, lipazların aktif bölgelerini saran ikincil yapıları oluşur ve bu lipazın substrata etki etmesini engeller. Fakat, hidrofobik arayüzeyde lipazlar önemli yapısal değişikliğe uğrarlar. Bu yapıya "açık

yapı" denir. Şekil 4.5'te görüldüğü gibi aktif bölgeleri üzerindeki geniş hidrofobik yüzey sayesinde lipaz hidrofobik arayüzeye adsorplanır (Derewenda ve diğ., 1992).



Şekil 4.5. Lipazın hidrofobik yüzeye adsorplanması (Fernandez-Lafuente ve diğ., 1998)

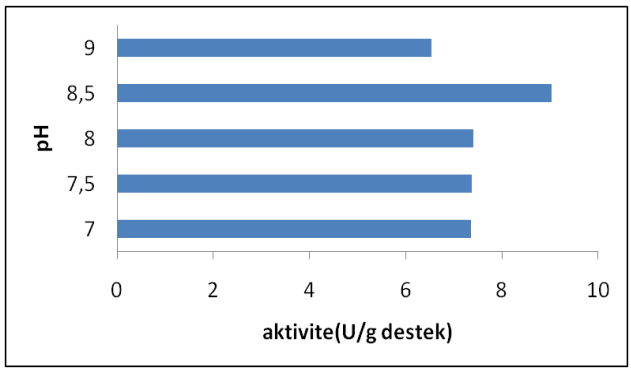
Tablo 4.2 ve Tablo 4.3 incelendiğinde, hidrotalsite tutuklama işlemi için en uygun olan lipaz enziminin Lipozyme TL 100L olduğu görülmüştür. Bu lipaz enzimi için desteğe tutuklanan enzim miktarı ve tutuklanma verimine göre pH 9.0 en iyi gibi görünmekte, fakat Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'deki aktivite tayini sonuçlarına bakıldığında pH 8,5 değerinde enzimin aktivitesi en yüksek değerine (9 U/g destek) ulaşmaktadır. pH 9,0'da enzim aktivitesi düşüş göstermiştir (6,5 U/g destek). Bu sonuca göre, pH 9.0'da desteğe yüklenen enzim miktarının en fazla olmasına rağmen enzim aktivitesinin düşmesinin sebebi fazla miktarda enzimin kümelenmiş ve birbirinin aktif bölgelerini kapatmış olabileceği düşünülmüştür. Bu sebeple Lipozyme TL 100L lipaz enziminin Mg-Al hidrotalsite tutuklanması işlemi için pH 8,5 seçilmiştir.

Tablo 4.2. pH'ın hidrotalsite tutuklanan enzim miktarına etkisi. (Tutuklama koşulları:200 rpm, 37°C, 24saat, 0,01g destek/ 3ml tris HCl tampon/ 50µl sıvı enzim)

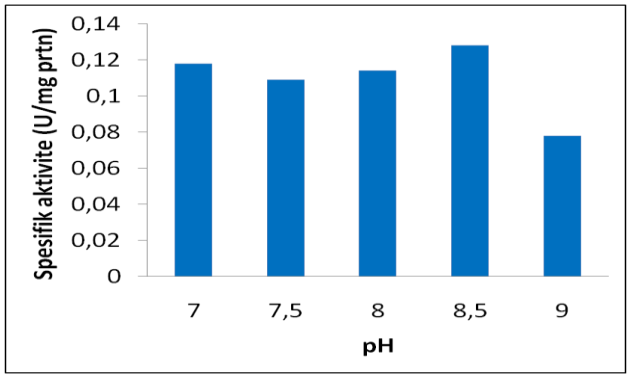
		Desteğe yüklenen enzim miktarı (mg protein/g destek)				
	pH	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
Enzim türü	Lipozyme TL 100 L	73	88	84	82	102
	Lipozyme CALB L	8	4	3	6	22
	Palatase 20000 L	26	20	25	27	28

Tablo 4.3. pH'ın hidrotalsite tutuklanan enzim verimine etkisi. (Tutuklama koşulları:200rpm, 37°C, 24saat, 0,01g destek/ 3ml tris HCl tampon/ 50µl sıvı enzim)

		% tutuklanma				
	pH	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
Enzim türü	Lipozyme TL 100 L	95	95	96	90	100
	Lipozyme CALB	21	17	13	23	76
	Palatase 20000 L	93	85	91	93	96



Şekil 4.6. Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100L'nin aktivitesinin pH'a göre değişimi. (Tutuklama koşulları: 200rpm, 37°C, 24saat, 0,01g destek/ 3ml tris HCl tampon/ 50µl sıvı enzim)



Şekil 4.7. Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100L'nin spesifik aktivitesinin pH'a göre değişimi. (Tutuklama koşulları: 200rpm, 37°C, 24saat, 0,01g destek/ 3ml tris HCl tampon/ 50µl sıvı enzim)

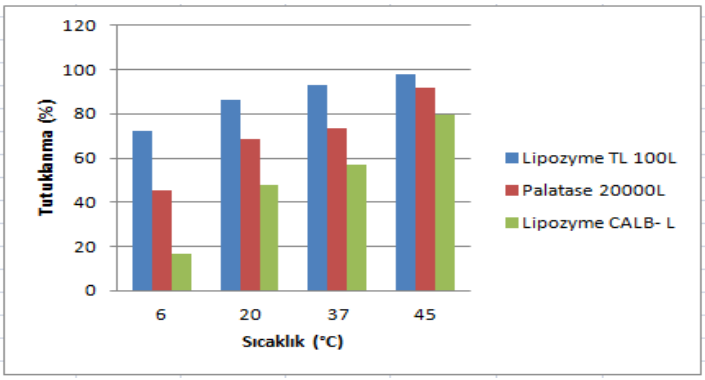
4.1.1.4. Sıcaklık

Lipaz tutuklama işlemi 6-45 °C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir ve sıcaklığın üç farklı lipaz enziminin hidrotalsit üzerine tutuklanmasına olumlu etkisinin olduğu görülmüştür (Tablo 4.4, Şekil 4.8). Sıcaklığın artmasıyla desteğe yüklenen enzim miktarı ve tutuklama veriminin her üç enzim için de arttığı görülmektedir. Lipozyme TL 100L ile 85 mg protein/g destek değeri ve % 98,14 tutuklama verimine 45 ^{o}C'de ulaşılmıştır.

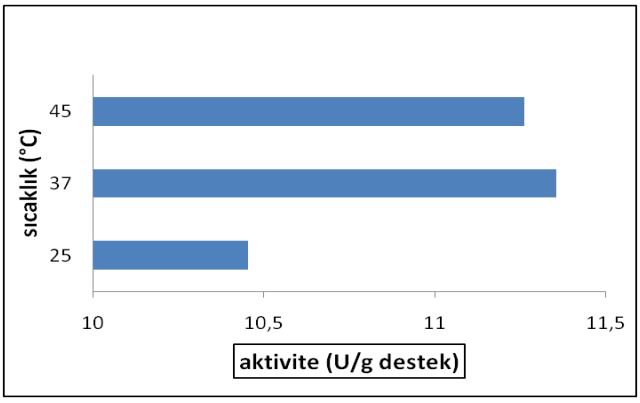
Şekil 4.9'da Lipozyme TL 100L lipazının tutuklanma sıcaklıklarının enzim aktivitesine olan etkisine bakıldığında 37 $^{\circ}$C'ye kadar sıcaklık artışının az da olsa lipaz aktivitesini arttırdığı ve 45 $^{\circ}$C'de enzim deaktivasyonu sebebiyle aktivitenin tekrar düştüğü görülmüştür.

Tablo 4.4. Hidrotalsite lipaz tutuklanmasında sıcaklığın desteğe yüklenen enzim miktarına etkisi (Tutuklama koşulları: 200rpm, 24saat, 0,01g destek/ 3ml pH 9,0 tris tampon/ 50µl sıvı enzim)

		Desteğe yüklenen enzim miktarı (mg protein/g destek)			
Sıcaklık ($^{\circ}$C)		6	20	37	45
Enzim türü	Lipozyme TL100 L	63	70	75	85
	Lipozyme CALB L	6	15	20	28
	Palatase 20000 L	14	20	22	30



Şekil 4.8. Hidrotalsite lipaz tutuklanmasında sıcaklığın tutuklanma verimine etkisi (Tutuklama koşulları: 200rpm, 24saat, 0,01g destek/ 3ml pH 9,0 tris tampon/ 50µl sıvı enzim)



Şekil 4.9. Mg-Al hidrotalsite tutuklanmış Lipozyme TL 100L'nin aktivitesinin sıcaklığa göre değişimi. (Tutuklama koşulları: 200rpm, 24saat, 0,01g destek/ 3ml pH 9,0 tris tampon/ 50µl sıvı enzim)

4.2. Kanola Yağından Biyodizel Üretimi

Tutuklanmış lipaz katalizörlülünde kanola yağının metanolizi ile biyodizel üretimine, yağ/alkol mol oranı, su miktarı, sıcaklık, tepkime süresi, enzim miktarı, metanol ekleme sıklığı gibi parametrelerin etkileri incelenmiş, elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

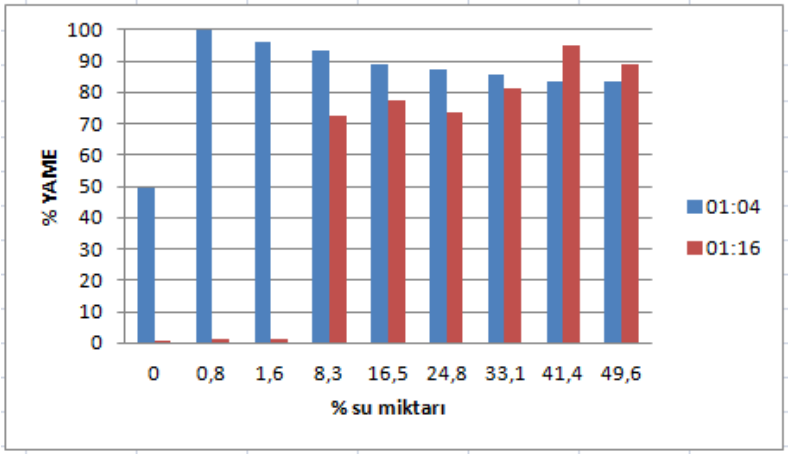
4.2.1. Su miktarının etkisi

Biyokatalizörler aktifliklerini koruyabilmek için az bir miktarda suya ihtiyaç duyarlar. Lipazlar sulu ortam ile organik faz arasında aktif olan benzersiz bir yapıya sahiptirler. Enzimin aktif hale geçmesi, yağ-su ara yüzeyinde lipaz moleküllerinin yapısal değişiklikleri sonucu aktif bölgenin açığa çıkması sonucu gerçekleşir. Tepkime ortamına su eklendikçe yağ-su damlacıkları sayısı artar ve böylece ara yüzey artar (Al-Zuhair, 2006). Fakat, sulu ortamda lipaz hidroliz tepkimesini yürüttüğü için, ortamdaki fazla su rakip hidroliz reaksiyonunu uyarır (Noureddini, 2005).

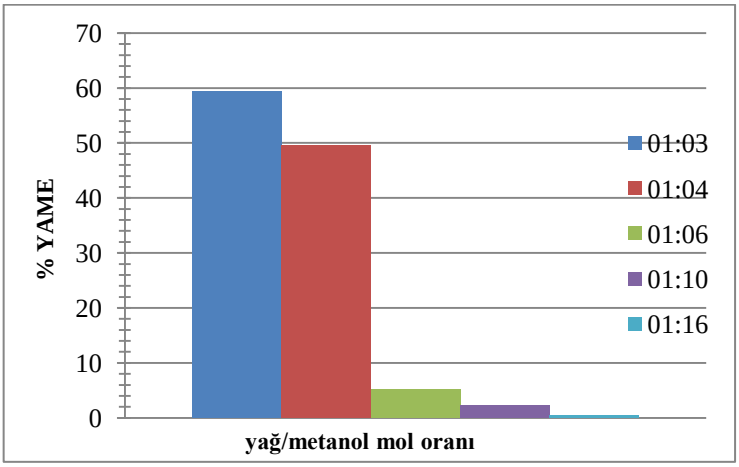
Bu çalışmada, farklı yağ/metanol mol oranlarında (1/4, 1/16) ortama eklenen su miktarının YAME dönüşümüne etkisi incelenmiş ve Şekil 4.10'daki grafik elde edilmiştir. 1/4 yağ/metanol mol oranlı deneyde su miktarı % 0,8 iken en yüksek YAME dönüşümüne (% 100) ulaşılmış ve su miktarı arttırılmaya devem ettiğinde verim yavaş yavaş azalmış ve % 83 civarında sabitlenmiştir. 1/16 yağ/metanol mol

oranında da benzer şekilde su miktarı % 41,4 miktarına kadar arttırıldıkça YAME dönüşümü % 94,9'a ulaşmış ve su miktarı daha da arttırıldığında dönüşüm %88.9'a düşmüştür.

Ayrıca susuz ortamda farklı yağ/metanol mol oranlarında elde edilen YAME dönüşümleri de karşılaştırılmıştır. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi yağ/metanol mol oranı 1/3'ten 1/16 değerine arttırıldıkça susuz ortamda üretilen YAME miktarı % 59,5'ten % 0,5'e düşmüştür. 1/3 yağ/metanol mol oranında tepkime ortamına su eklenmemiş olmasına rağmen % 59,4 YAME dönüşümüne ulaşılmış olmasının sebebinin tutuklu enzim veya kanola yağının bir miktar su içeriyor olduğu düşünülmüştür. Ayrıca metanol miktarı arttıkça, ortamda bulunan su molekülleri alkol içinde çözünerek su-yağ arayüzeyinin oluşumu önlenmiş olabilir.



Şekil 4.10. 1/4 ve 1/16 yağ/metanol mol oranlarında artan su miktarının YAME dönüşümüne etkisi. (Tepkime koşulları: yağa göre % 3 tutuklanmış enzim, 25 °C, 24 saat, 200 rpm)



Şekil 4.11. Susuz ortamda farklı yağ/metanol mol oranlarının YAME dönüşümüne etkisi. (Tepkime koşulları: yağa göre % 3 tutuklanmış enzim, 25 °C, 24 saat, 200 rpm)

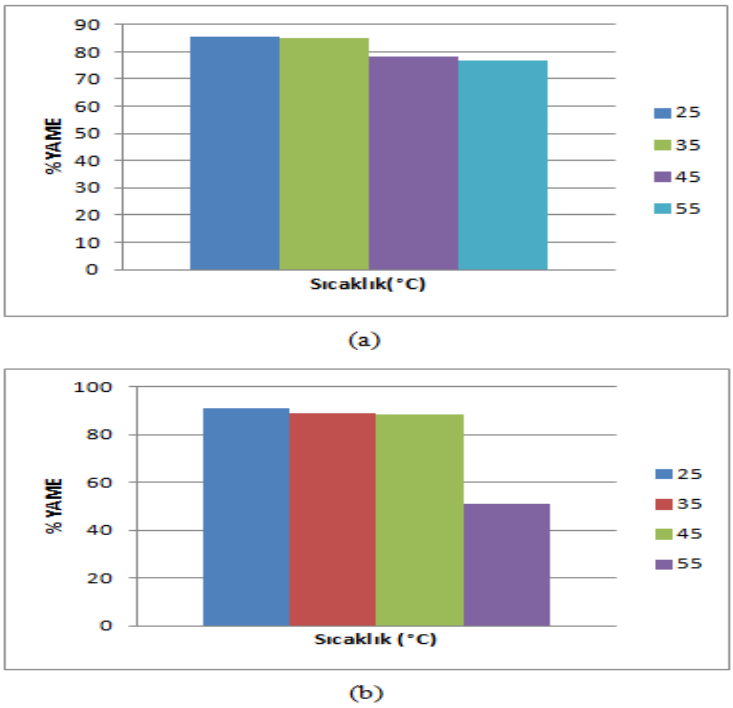
4.2.2. Sıcaklığın etkisi

Farklı lipaz enzimleriyle katalizlenen transesterleşme tepkimesi için en uygun sıcaklık aralığı 30-50 °C'dir (Anczak ve diğ., 2009). *Thermomyces lanuginosa* IM lipazı ile biyodizel üretilen bir çalışmada tepkime hızında 30 °C'den 40 °C'ye çıkıldığında büyük oranda artış gözlenirken, 50 °C'nin üstünde biyodizel üretim hızında artış görülmemiştir (Xu ve diğ., 2004). Bir diğer çalışmada üç farklı lipaz (Novozyme 435, Lipozyme TL-IM, Lipozyme RM-IM) ile soya yağının metanolizine sıcaklığın etkisi incelendiğinde en uygun sıcaklık aralığının 25-35 °C olduğu, 40 °C'den sonra enzimin termal bozunmaya uğraması sebebiyle katalitik aktivitesinde düştüğü saptanmıştır (Rodrigues ve diğ., 2008).

Bu çalışmada, Şekil 4.12'deki verilere bakıldığında YAME dönüşümü için en uygun sıcaklık aralığının 25-35 °C olduğu, 35 °C üzerinde YAME dönüşümünde azalma olduğu görülmüştür. Elde edilen en yüksek YAME dönüşümleri 1/4 yağ/metanol mol oranında % 88,4, 1/16 yağ/metanol mol oranında ise % 91,2'dir. Bu çalışma ile birlikte literatür bilgilerine bakıldığında farklı desteklere tutuklu lipaz enzimleri için en uygun sıcaklık değeri değişmektedir.

1/16 yağ/metanol mol oranlı biyodizel üretiminde 55 °C'de yüksek bir düşüş gerçekleşmiştir. Yüksek metanol miktarı, sıcaklık artışının enzim aktivitesine olumsuz etkisini daha da arttırmış olabilir. Çünkü benzer şekilde, Xu ve

arkadaşlarının *Thermomyces lanuginosa* IM lipazı ile gerçekleştirdikleri transesterleşme tepkimesinde de yüksek yağ/metanol mol oranlı tepkimede sıcaklık artışıyla enzim aktivitesinin daha çok düştüğü gözlemlenmiştir (Xu ve diğ., 2004).



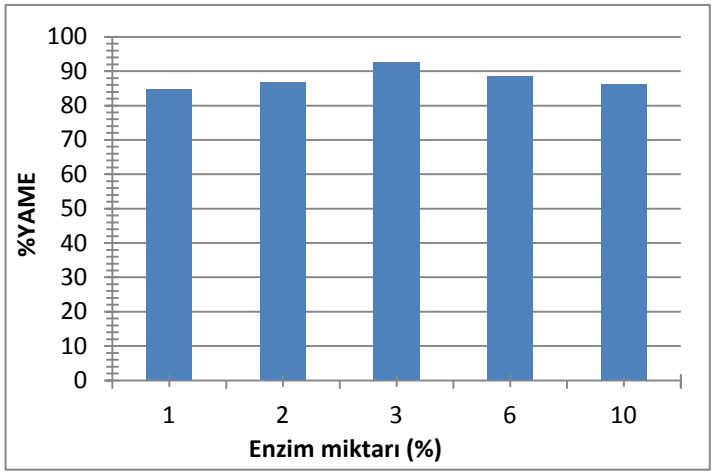
Şekil 4.12. Sıcaklığın YAME dönüşümüne etkisi. (a) 1/4 yağ/metanol mol oranı, (b) 1/16 yağ/metanol mol oranı. (Tepkime koşulları: yağa göre % 3 tutuklanmış enzim, % 33,1 su , 24 saat, 200 rpm)

4.2.3. Katalizör miktarının etkisi

Enzimatik transesterleşme tepkimesinde ortama eklenen enzim miktarı arttıkça metil ester verimi artmaktadır (Li ve diğ., 2006; Jeong ve Park, 2008; Dizge ve Keskinler, 2008). Bu çalışmalar ortak bir şekilde yorumlandığında enzimatik tepkimede en yüksek verime ulaşmak için enzim miktarı belli bir değere kadar arttırılmalıdır. Fakat enzim miktarı daha fazla arttırılmaya devam edilirse tepkime verimi ya sabit kalmakta ya da gerilemektedir.

Bu çalışmada Şekil 4.13 incelendiğinde, enzim miktarı % 3'e (kütlece yağa göre) kadar arttırıldıkça YAME dönüşümü de artmış fakat % 3'ün üzerine çıkıldıkça YAME dönüşümü azalmaya başlamıştır. En yüksek YAME dönüşümüne (%93) % 3 enzim miktarıyla ulaşılmıştır. Enzim miktarı %3'ün üzerine çıktığında karışmanın etkili olmadığı görülmüş ve muhtemelen enzim moleküllerinde kümelenme oluşması

sebebiyle tepkime gerilemiştir. Benzer davranış başka bir çalışmada da gözlenmiştir (Dizge ve Keskinler, 2008).



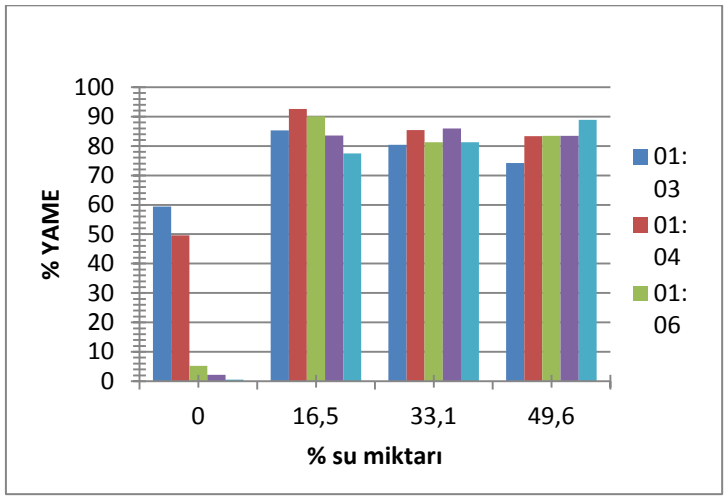
Şekil 4.13. Katalizör miktarının YAME dönüşümüne etkisi. (Tepkime koşulları: 1/4 yağ/metanol mol oranı, 25 °C, 24 saat, 200 rpm)

4.2.4. Yağ/metanol mol oranının etkisi

Enzimatik transesterleşme tepkimesinde ortamda bulunan fazla alkol tepkime verimini arttırır, fakat eğer alkol tepkime ortamında çözünmüyorsa enzim aktivitesini bozabilir. Metanol ve bitkisel yağ 1:1 mol oranına yakın değerlerde 40 °C'de çözelti oluşturur. Ortama organik çözücü eklenmesi alkolün çözücülüğünü arttırır ve enzim aktivitesinin bozulmasını engelleyerek tek basamaklı enzimatik transesterleşmeye olanak sağlar (Antczak ve diğ., 2009). *Thermomyces lanuginosus* (poliüretan köpüğe tutuklu) lipazı ile farklı yağ/alkol mol oranlarında yapılan deneyler sonucu yağ/alkol mol oranı 1:1-1:6 aralığında metil ester verimi artarken 1:10 mol oranında verimin oldukça düştüğü belirlenmiştir (Dizge ve Keskinler, 2008).

Bu çalışmada Şekil 4.14'te görüldüğü gibi yağ/alkol oranının artışı belli oranda metil ester dönüşümünü arttırmış fakat 1:16 mol oranına çıkılmış olmasına rağmen metil ester dönüşümünde azalma gözlenmemiştir. İlk olarak, metanol üç basamaklı şekilde eklendiği için bu sonuca ulaşıldığı düşünülmüş, fakat Dizge ve Keskinler'in (2008) çalışmasında da üç basamaklı metanol ekleme olmasına karşın metil ester oluşumu belli bir metanol değerinden sonra düşüş göstermiştir. Ardından başka bir yaklaşım getirilmiştir. Poliüretan köpük ve metanol hidrofilik yapıdayken bizim lipaz enzimini tutukladığımız hidrotalsit hidrofobiktir. Metanol belli bir değere ulaştıktan sonra

hidrofilik yapılı poliüretan köpüğe tutuklu enzime etki ederek aktifliğini bozarken, hidrofobik yapılı hidrotalsite tutuklu enzim ile temas edemediği ve metil ester veriminin bu sebeple azalmadığı düşünülmüştür.

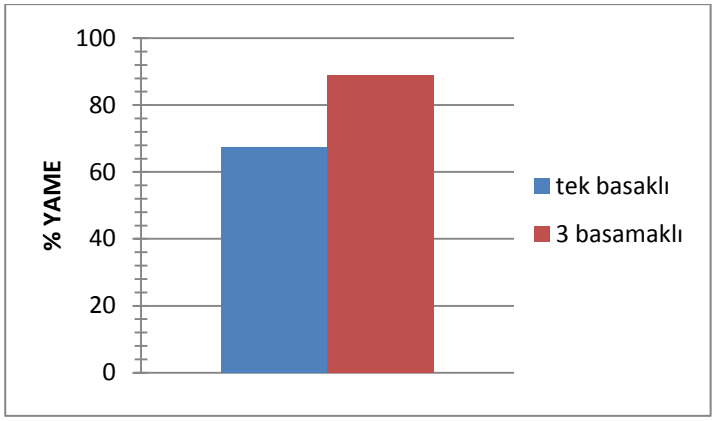


Şekil 4.14. Farklı yağ/metanol mol oranlarında gerçekleşen transesterleşme tepkimesine su miktarının etkisi. (Tepkime koşulları: yağa göre kütlece % 3 tutuklanmış enzim, 25 °C, 24 saat, 200 rpm)

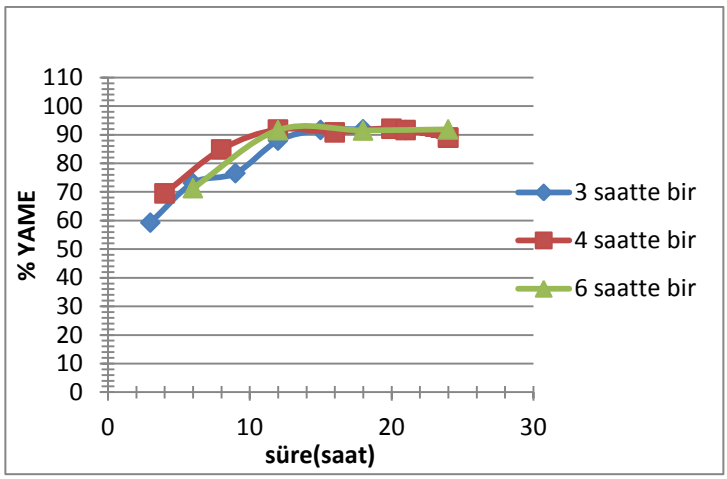
4.2.5. Farklı sıklıkta metanol eklemenin etkisi

Bazı enzimler yüksek derişimli alkole (düşük molekül ağırlıklı) maruz bırakıldığında deaktive olurlar. Alkolün basamaklı eklenmesi enzimin deaktive olmasını engeller (Hernandez-Martin ve Otero, 2008; Dizge ve diğ., 2009).

Metanol önce tek basamaklı daha sonra üç basamaklı eklenmiş ve ester dönüşümleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.15). Beklendiği gibi alkolün ortama üç basamaklı eklenmesi ester dönüşümünü % 67,5'ten % 89 değerine arttırmıştır. Ardından üç basamaklı metanol ekleme işlemi farklı sıklıklarda gerçekleştirilmiş, ancak Şekil 4.16'da görüldüğü gibi bu işlemin YAME dönüşümüne belirgin bir etkisi olmamıştır.



Şekil 4.15. 1 basamaklı ve 3 basamaklı metanol eklemenin YAME dönüşümüne etkisi (Tepkime koşulları: 1/16 yağ/metanol mol oranı, yağa göre kütlece % 33,1 su, 25 °C, 24 saat, 200 rpm)



Şekil 4.16. Farklı sıklıkta metanol eklemenin metil ester dönüşümüne etkisi. (Tepkime koşulları: 1/16 yağ/metanol mol oranı, yağa göre kütlece % 33,1 su, 25 °C, 24 saat, 200 rpm)

4.3. Yüzey Cevap Yöntemi (RSM)

RSM analizi değişkenleri için seçilen minimum, maksimum ve orta değerler Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. RSM analizi için seçilen noktalar

	x_1:SICAKLIK	x_2 :ENZIM ORANI	x_3 :YAG/ALKOL	x_4 :SU ORANI
Max.	50	5,25	8	9
Min.	35	2,75	5	5
Medium	20	0,25	2	1

Tablo 4.5'te optimizasyon ve analiz sonucu elde edilen deneysel ve tahmini cevaplar (% yağ asidi metil ester dönüşümü) verilmiştir.

Tablo 4.6. Bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu, deneysel ve tahmini cevaplar

Deney No	x_1: Sıcaklık	x_2: Enzim Oranı	x_3: Yağ/alkol	x_4: Su oranı	R_1	TahminiR_1
1	27,5	1,5	3,5	3	90,4	80,9
2	42,5	1,5	3,5	3	90,7	78,7
3	27,5	4	3,5	3	89,4	87,5
4	42,5	4	3,5	3	91,3	82
5	27,5	1,5	6,5	3	80,1	79
6	42,5	1,5	6,5	3	80,8	76,5
7	27,5	4	6,5	3	94,9	95
8	42,5	4	6,5	3	94,1	89,4
9	27,5	1,5	3,5	7	88,8	87,3
10	42,5	1,5	3,5	7	85,7	78,5
11	27,5	4	3,5	7	89,3	86,5
12	42,5	4	3,5	7	79,6	74,6
13	27,5	1,5	6,5	7	92,6	94,8
14	42,5	1,5	6,5	7	90,3	86
15	27,5	4	6,5	7	87,8	103
16	42,5	4	6,5	7	89,2	91,6
17	20	2,75	5	5	96,1	94,1
18	50	2,75	5	5	64,1	76,7
19	35	0,25	5	5	73,2	83,4
20	35	5,25	5	5	96,4	97,5
21	35	2,75	2	5	55,8	73,8
22	35	2,75	8	5	93,5	88,8
23	35	2,75	5	1	64,4	79,2
24	35	2,75	5	9	89,2	87,7
25	35	2,75	5	5	90,6	91,3
26	35	2,75	5	5	91,9	91,3
27	35	2,75	5	5	91,3	91,3
28	35	2,75	5	5	89	91,3
29	35	2,75	5	5	91,7	91,3
30	35	2,75	5	5	93,3	91,3

Yapılan deneyler sonunda en yüksek metil ester dönüşümü (% 96,4) Deney No 20'de (35 ^{0}C, 24 saat, % 5,25 enzim, 1/5 yağ/metanol mol oranı, % 5 su), en düşük metil ester dönüşümü (% 55,8) Deney No 21'de elde edilmiştir. RSM analizinde kullanılan ikinci dereceden Denklem (4.1) aşağıdaki gibidir.

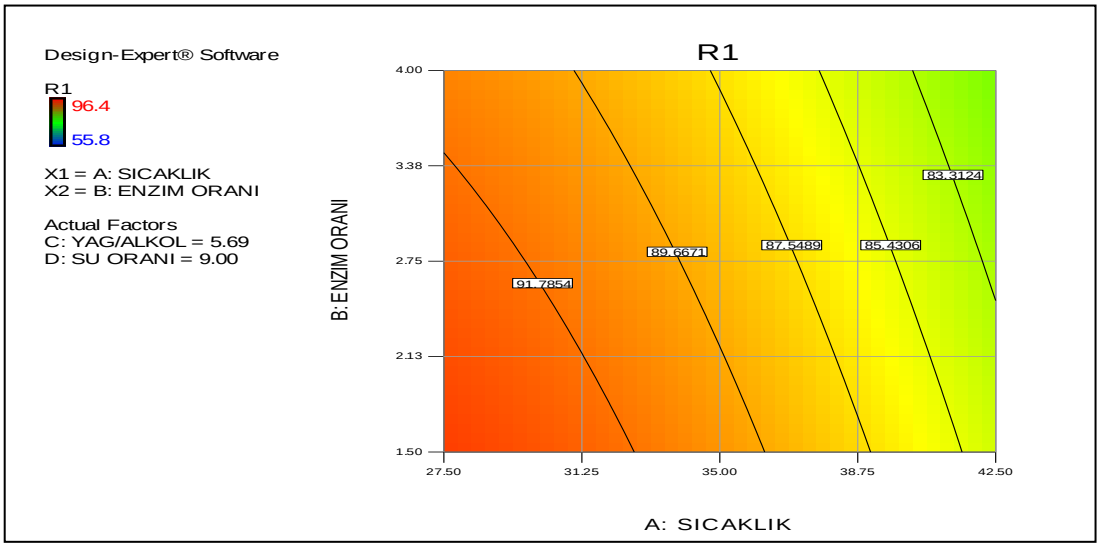
- - - -
(4.1)
- - - -

Değişiklik analizi (ANOVA) sonuçlarına göre ikinci dereceden denklem modeli bu çalışma için uygun değildir. Tablo 4.6'da da görüldüğü gibi p değeri (0,4269) oldukça yüksektir. R^2 (0,50) değeri de modelin bu çalışma için uygun olmadığını göstermektedir.

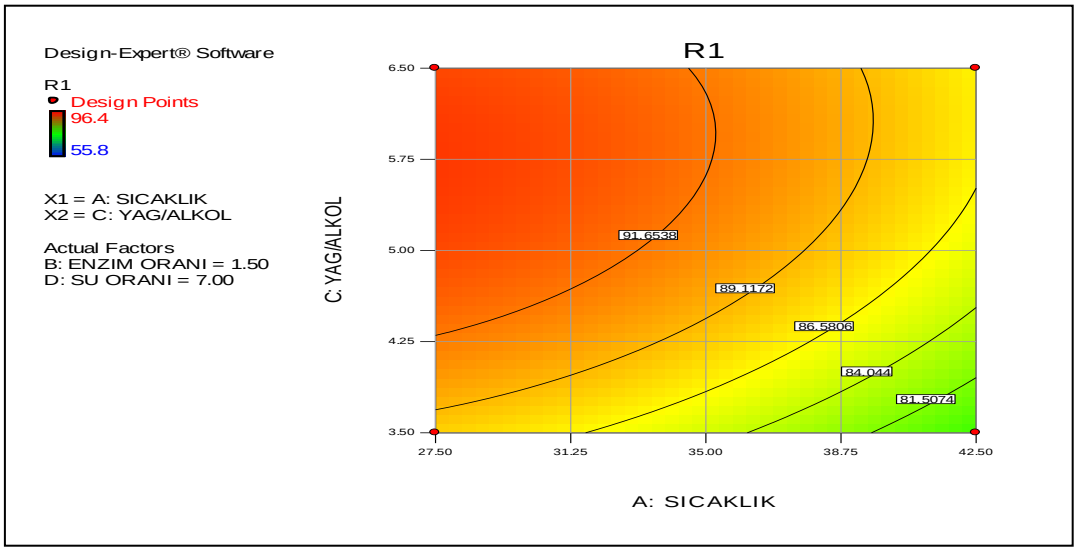
Tablo 4.7. İkinci dereceden model için varyans analizi (ANOVA)

Değişimin Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kare	F-testi	Probability (P değeri)	R^2
Model	1530	14	109,3	1,09	0,4269	0,5
Error	10,3	5	2,06			
Toplam	3020	29				

Model sonuçları garfiklerle açıklanmıştır. Şekil 4.17'de sıcaklık-enzim oranı etkenlerinin metil ester dönüşümüne etkileri gösterilmiştir. Sıcaklık ve enzim oranı azaldıkça metil ester dönüşümünde artış olmaktadır. Sıcaklık ve enzim oranı arttıkça da verim düşmeye başlamaktadır. En yüksek metil ester dönüşümüne 27,5 °C ve % 1,5 enzim oranında ulaşılmıştır.



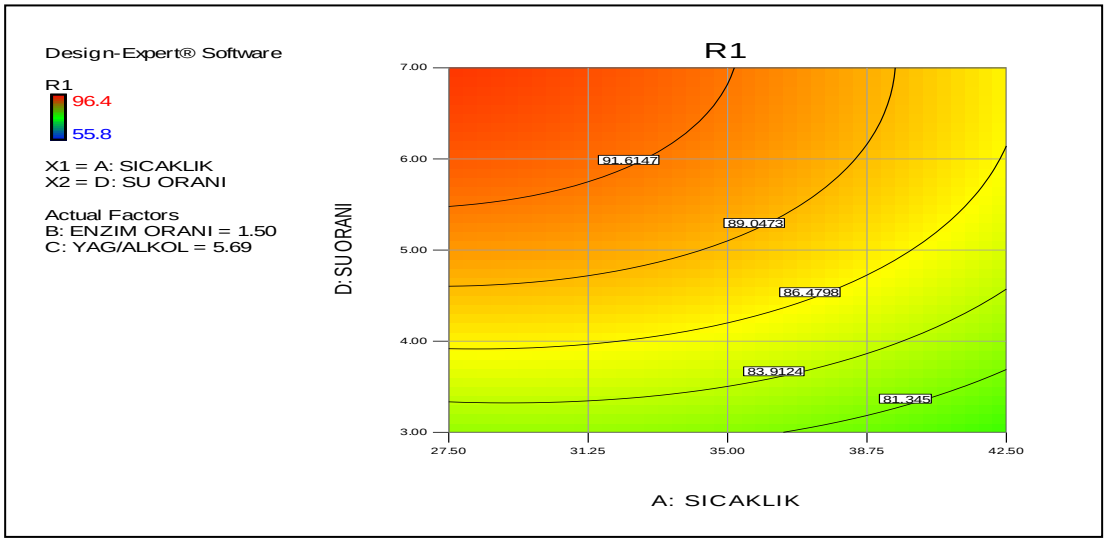
Şekil 4.17. Sıcaklık-enzim oranının metil ester dönüşümüne etkisi



Şekil 4.18. Sıcaklık-yağ/alkol mol oranının metil ester dönüşümüne etkisis

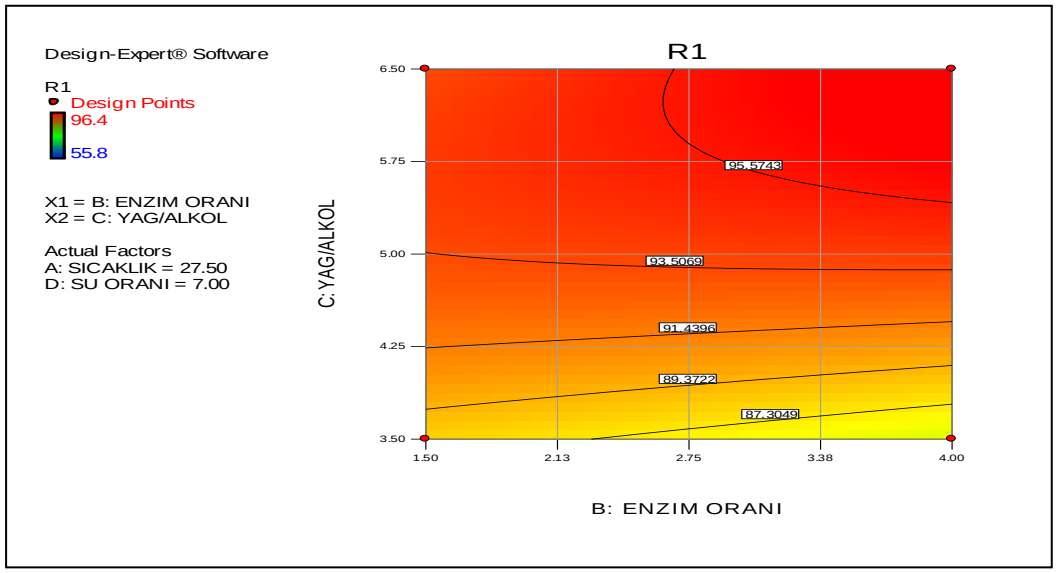
Şekil 4.18'de sıcaklık ve yağ/alkol mol oranının metil ester dönüşümüne etkisi gösterilmiştir. Sıcaklık azaldıkça ve yağ/alkol mol oranı arttıkça metil ester dönüşümü artmaktadır. En yüksek metil ester dönüşümüne 27,5 °C ve 1/6,5 yağ/alkol mol oranında ulaşılmıştır.

Sıcaklık-su oranı değişkenlerinin metil ester dönüşümlerine bakıldığında (Şekil 4.19) sıcaklık azalıp su oranı arttıkça metil ester dönüşümünde artış olmaktadır. En yüksek metil ester dönüşümüne 27,5 °C ve % 7 su oranında elde edilmiştir.



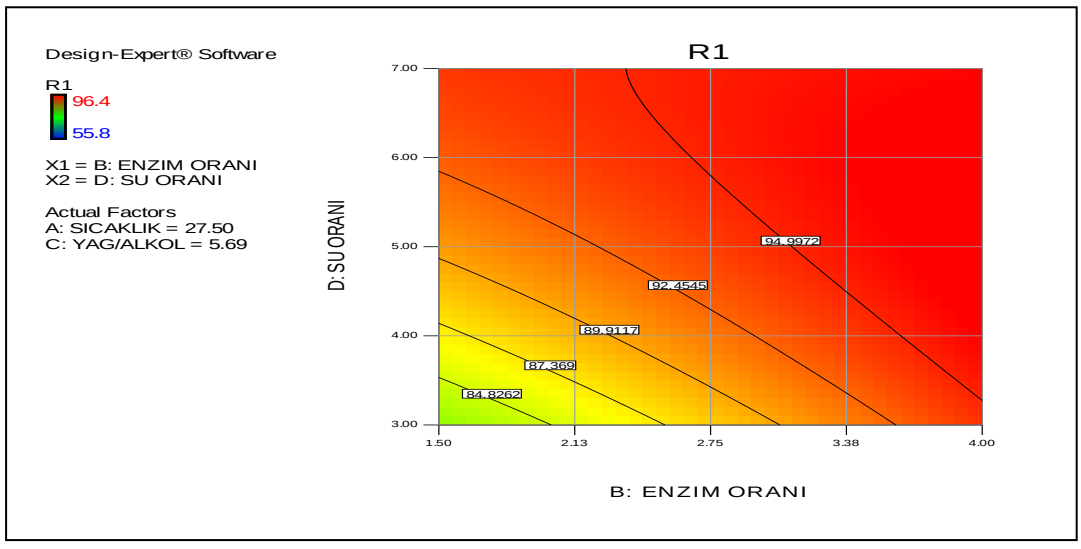
Şekil 4.19. Sıcaklık-su oranının metil ester dönüşümüne etkisi

Yağ/alkol mol oranı ve enzim oranının metil ester dönüşümü üzerine etkisi incelendiğinde enzim oranı ve yağ/alkol mol oranı arttıkça metil ester dönüşümü artış göstermektedir (Şekil 4.20). En yüksek metil ester dönüşümü 1/6,5 yağ/alkol mol oranı e % 10 enzim oranında görülmektedir.



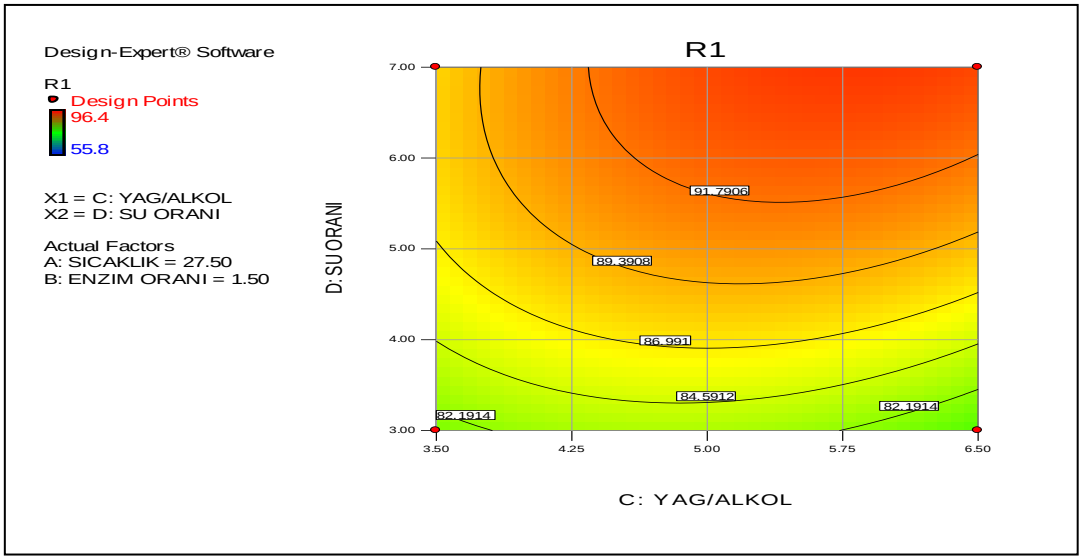
Şekil 4.20. Enzim oranı-yağ/alkol mol oranının metil ester dönüşümüne etkisi

Şekil 4.21'de enzim oranı ve su oranı değişkenlerinin metil ester dönüşümüne etkileri incelenmiştir. Her iki değişken miktarı arttıkça metil ester dönüşümü de artmaktadır. En yüksek metil ester dönüşümüne % 10 enzim oranı, % 7 su oranında ulaşılmıştır.



Şekil 4.21. Enzim oranı-su oranının metil ester dönüşümüne etkisi

Şekil 4.22'de su oranı ve yağ/alkol mol oranı etkileri üzerine çalışılmıştır. Her iki değişken arttıkça metil ester dönüşümü de artmaktadır.



Şekil 4.22. Yağ/metanol mol oranı-su oranının metil ester dönüşümüne etkisi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

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

Bu çalışmada yenilenebilir bir kaynak olan kanola yağından çevre dostu lipaz katalizörlüğünde biyodizel üretimi amaçlanmıştır. Transesterleşme tepkimesinde kullanılacak katalizör, laboratuar ortamında Lipozyme TL 100L, Lipozyme CALB-L ve Palatase 20000L lipaz enzimleri laboratuarda üretilen Mg-Al hidrotalsite tutuklanarak üretilmiştir. Destek malzemesi olarak kullanılan Mg-Al hidrotalsit üre hidrolizi ve yanma yöntemleriyle üretilmiş ve üre hidrolizi yöntemiyle üretilen hidrotalsitin lipaz tutuklaması için daha uygun özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. Her bir enzimin hidrotalsite tutuklanmasına enzim miktarı, pH ve sıcaklığın etkileri denenmiş ve Mg-Al hidrotalsite en iyi tutuklanan lipaz enziminin Lipozyme TL 100 L,en iyi tutuklanma koşullarının da pH 8,5, 37 $^{\circ}$C, 50 µl/0,01 g destek olduğu görülmüştür.

Biyodizel üretimi kısmına laboratuarda üretilen katatalizör ile devam edilmiştir. Su miktarı, sıcaklık, katalizör miktarı, yağ/metanol mol oranı, tek basamaklı ve üç basamaklı metanol ekleme ve farklı sıklıklarda metanol eklemenin lipaz katalizli biyodizel üretimine etkisi incelenmiştir. 25 $^{\circ}$C sıcaklık, 1/4 yağ/metanol mol oranı, yağa göre kütlece % 3 biyokatalizör, yağa göre kütlece % 0,8 su ilavesi ile 24 saatte

% 100 metil ester dönüşümüne ulaşılmıştır. İstatistiksel deney tasarımı sonuçlarına göre en iyi metil ester dönüşümüne (%96,4) 35 °C, 24 saat, % 5,25 enzim, 1/5 yağ/metanol mol oranı, % 5 su oranı ile ulaşılmıştır.

Yapılan deney sonuçlarına göre Lipozyme TL 100L lipazının hidrotalsite tutuklanma verimi oldukça yüksektir. Bu yüzden Mg-Al hidrotalsiti ile lipaz tutuklama işlemi üzerine farklı çalışmalar yapılabilir. Üre hidrolizi yöntemiyle oldukça iyi yüzey özelliklerine sahip destek malzemesi üretilmiştir. Fakat bu yöntemle destek hazırlama sırasında desteğin yıkanma işlemi oldukça uzun sürmüştür. Bu esnada büyük oranda saf su kullanılmıştır. Lipaz tutuklanması için aynı yüzey özelliklerine sahip hidrotalsit hazırlamak için, üre hidrolizi yöntemi yerine yıkama işleminin daha az veya hiç olmadığı başka bir yöntem kullanılabilir.

Üretim koşulları düşünüldüğünde ileriki çalışmalarda biyokatalizör hazırlama aşaması için belirlenen sürenin ve buna bağlı olarak harcanan enerjinin azaltılması için istatistiksel deney tasarım yöntemlerinden faydalanarak optimum tutuklama koşulları tespit edilebilir. Böylece biyokatalizör hazırlama maliyeti düşürülebilir.

Mg-Al hidrotalsite enzim tutuklanarak hazırlanan biyokatalizörün kuruması işlemi de oldukça zaman almıştır. Kurutma işlemi, katalizör enzim içerikli olduğu için yüksek sıcaklıklarda yapılamamıştır. Biyokatalizör, liyofilizasyon sistemi kullanılarak yapılırsa kurutma süresi kısaltılmış olur.

KAYNAKLAR

Adamczak M., Bednarski W., Enhanced activity of intracellular lipases from Rhizomucor miehei and Yarrowia lipolytica by immobilization on biomass support particles, *Process Biochem.*, 2004, **39**, 1347–1361.

Akoh C. C., Chang S. W., Lee G-Ch., Shaw J. F., Enzymatic approach to biodiesel production, *J. Agric. Food. Chem.*, 2007, **55**, 8995–9005.

Aksoy H. A., Kahraman I., Karaosmanoğlu F., Civelekoğlu F., Evaluation of Turkish sulphur olive oil as an alternative diesel fuel, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1988, **65**, 936-938.

Al-Taweel R., Sungur S., Lipaz Enzimleri ile Yağların Modifikasyon Teknolojisi, *Gıda,* 1995, **20**(5), 299-304.

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

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

Amish P. V., Subrahmanyam N., Payal A. P., Production of biodiesel through transesterification of jatropha oil using KNO_3/Al_2O_3 solid catalyst, *Fuel*, 2009, **88**, 625–628.

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

Babu N. S., Rekha S., Prasad P. S. S., Lingaiah, N., Room-temperature transesterification of edible and non edible oils using a heterogeneous strong basic Mg/La catalyst, *Energy Fuels*, 2008, **22**, 1965–1971.

Bajaj N., Lohan P., Jha, P. N., Mehrotra, R., Biodiesel production through lipase catalyzed transesterfication: overwiew, *J. Mol. Catal. B. Enzyme*, 2010, **62**, 9-14.

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

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

Balat M., Balat H., A critical review of biodiesel as a vehicular fuel, *Energy Convers. Manage.*, 2008, **49**, 2727–2741.

Balat M., Balat M., Political, economic and environmental impacts of biomassbased hydrogen, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2009a, **34**, 3589–3603.

Balat M., Balat H., Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel, *Appl. Energy*, 2009b, **86**, 2273–2282.

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

Bamgboye A. I., Hansen A. C., Prediction of cetane number of biodiesel fuel from the fatty acid methyl ester (FAME) composition, *Int. Agrophys.*, 2008, **22**, 21–29.

Bartan A., Biyodizel Üretiminde Heterojen Katalizör Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009.

Baydar H., Isparta Koşullarında Kanola (Brassica napus L.) Çeşitlerinin Verim ve Kalite Özellikleri, *SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2005, **9**(3), 1-6.

Beisson F., Gardies A. M., Teissere M., Ferte N., Noat G., An esterase neosynthesized in post-germinated sunflower seed is related to a new family of lipolytic enzymes, *Plant Phisyal. Biochem.*, 1997, **35**(10), 761-765.

Bournay L., Casanave D., Delfort B., Hillion G., Chodorge J. A., New heterogeneous process for biodiesel production: a way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants, *Catal. Today*, 2005, **106**, 190–192.

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.

Cao L. Q., Langen V. L., Sheldon, R. A., Immobilized enzymes:carrier-bound or carrier-free, *Curr. Opin. Biotech.*, 2003, **14**, 387–394.

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

Carlos R. M., Khang D. B., Characterization of biomass energy projects in Southeast Asia, *Biomass Bioenergy*, 2008, **32**, 525–32.

Cecilia G. A., Amalia A. C., Ferreira M., Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids, *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, **41**, 35–43.

Chang H. M., Liao H. F., Lee C. C., Shieh C. J., Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2005, **80**, 307–312.

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

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

Craig W., Production of hydrocarbons with a relatively high cetane rating, *United States Patent* , 1991, **992,** 605.

Davila V., Lima E., Bulbulian S., Bosch P., Mixed Mg(Al)O oxides synthesized by the combustion method and their recyristallization to hydrotalcites, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008, **107**, 240-246.

Demirbas A., Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol, *Energy Conv. Mgmt.*, 2002, **43**, 2349–2356.

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

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

Demirbas M. F., Balat M., Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: a global perspective, *Energy Convers. Manage.* , 2006, **47**, 2371–81.

Di S. M., Riccardo T., Lu P., Elio S., Heterogeneous catalysts for biodiesel production, *Energy Fuels*, 2008, **22**, 207–17.

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

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

Doğan A., Tekin A., Yağların Fiziksel Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Anakara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1991.

Dora E. L., James G. G., David A. B., Edgar L., Transesterification of triacetin with methanol on solid acid and base catalysts, *Appl. Catal. A: Gen.*, 2005, **295**, 97–105.

Dossat V., Combes D., Marty A., Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil, *Enz. Microb. Technol.*, 2002, **30**, 90–94.

Dossin T. F., Reyniers M. F., Berger R. J., Marin G. B., Simulation of heterogeneously MgO-catalyzed transesterification for fine-chemical and biodiesel industrial production, *Appl. Catal. B: Gen.*, 2006, **67**, 136–148.

Du W., Xu Y., Liu D., Lipase-catalysed transestrification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2003, **38**, 103–6.

Du W., Xu Y., Liu D., Zeng J., Comparative study on lipasecatalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors, *J. Mole. Catal. B: Enzyme*, 2004, **30**, 125–129.

Du W., Xu Y., Liu D., Li Z., Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production, *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, 2005, **37**, 68-71.

Erdoğan G., Lipaz Enzimi Katalizörlüğünde Bitkisel Yağlardan Biyodizel Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 2003.

Farrauto R. J., *Bartholomew C., Introduction to Industrial Catalytic Processes*, Chapman & Hall, London, 1997.

Fjerbaek L., Christensen K. V., Norddahl B., A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification, *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, **102**(5)**,** 1298-1315.

Freedman B., Pryde E. H., Mounts T. L., Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils, *JAOCS*, 1984, **61**(10),1638–1643.

Freedman B., Butterfield R., Pryde E., Transesterification kinetics of soybean oil, *JAOCS*, 1986, **63**(10),1375–1380.

Fukuda H., Kondo A., Noda H., Biodiesel fuel production by transesterification of oils, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, **92**(5), 405-416.

Furuta S., Matsuhashi H., Arata K., Biodiesel fuel production with solid superacid catalysis in fixed bed reactor under atmospheric pressure, *Catal. Commun.*, 2004, **5**, 721–723.

Gerpen J. V., Shanks B., Pruszko R., Clements D., Knothe G., Biodiesel Production Technology, *National Renewable Energy Laboratory*, NREL/SR-510-36240, 2004.

Goldemberg J., Environmental and ecological dimensions of biofuels, *Conference on the ecological dimensions of biofuels*, Washington, 10-12 Mart 2008.

Granados M. L., Poves M. D. Z., Alonso D. M., Mariscal R., Galisteo F. C., Tost R. M., et al., Biodiesel from sunflower oil by using activated calcium oxide, *Applied Catalysis B Environmental*, 2007, **73**, 317–326.

Güvenç A., *Oleyil Oleatın Süperkritik CO_2 Ortamında Enzimatik Üretimi*, Ankara Üniversitesi, 10.1501/ankara-511, 113-119, 2004.

Haas M. J., Cichowics D. J., Dicrov J. K., Lipolytic activity of Californial-Lurel (Umbrellularia californial) seeds, *JAOCS*, 2000, **77**(4), 877.

Helwani Z., Othman M. R., Aziz N., Fernando V. J. N., Kim J., Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review, *Fuel Processing Technology*, 2009, **90**, 1502–1514.

Hsu A. F., Jones K., Marmer W. N., Foglia T. A., Production of alkyl esters from tallow and grease using lipase immobilized in a phyllosilicate sol-gel, *JAOCS*, 2001, **78**, 585–588.

Iso M., Chen B., Eguchi M., Kudo T., Shrestha S., Production of of biodiesel fuel from tyriglycerides and alcohol using immobilized lipase, *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, 2001, **16**, 53-58.

Iwai M., Tsujisaka Y., Fungal lipase, Editors: Borgstrom B., Brockman H. L., *Lipases*, Elsevier, Amsterdam, 443-469, 1984.

Jegannathan K. R., Abang S., Poncelet D., Chan E. S., Ravindra P., Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase—A Critical Review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2008, **28**, 253–264.

Jeong G. T., Park D. H., Ryu H. W., Lee W. T., Park K., Kang C. H., Hwang B., Woo J. C., Optimum conditions for transformed Panax ginseng hairy roots in flux culture, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, **114**, 747–758.

Jeong G. T., Park D. H., Lipase catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert-butanol, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2008, **148**, 131-139.

Jian-Zhong Y., Min X., Ji-Bin. S., Biodiesel from soybean oil in supercritical methanol with co-solvent, *Energy Convers. Manage.*, 2008, **49**, 908–12.

Karaca N., Poli(N,N-Dimetilakrilamit-ko-akrilamit ve Poli(N- İzopropilakrilamit-ko-akrilamit)/κ -Karragenan Polimerleri Kullanılarak Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.

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

Kennedy J. F., Melo E. H. M., Jumel K., Immobilized enzymes end cells, *Chem. Eng. Porg.*,1990, **86**, 81–89.

King J. W., Mohamed A., Taylor S. L., Mebrahtu T., Paul C., Supercritical fluid extraction of *Veronia galamensis* seeds, *Industrial Crops and Products*, 2001, **14**, 241-249.

Köse Ö., Tüter M., Aksoy H. A., Immobilized Candida antarctica lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium, *Bioresource Technology*, 2002, **83**, 125–129.

Kulkarni M. G., Dalai A. K., Waste cooking oil- an economical source for biodiesel: a review, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2006, **45**, 2901-2913.

Kulkarni B. M., Bujar B. G., Shanmukhappa S. Investigation of acid oil as a source of biodiesel, *Indian J. Chem. Tech.* , 2008, **15**, 467–71.

Kumari V., Shah S., Gupta M. N., Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*, *Energy & Fuels*, 2007, **21**, 368–372.

Kurashige J., Matsuzaki N., Makabe K., Modification of fats and oils by lipases, *J. Dispersion Science and Technology*, 1989, **10**, 531-559.

Kusdiana D., Saka S., Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuels as treated in supercritical methanol, *Fuel*, 2001, **80**, 693–698.

Kusdiana D., Saka S., Two-step preparation for catalyst-free biodiesel fuel production: hydrolysis and methyl esterification, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2004, **115**, 781–791.

Lai C., Zullaikah S., Vali S. R., Ju Y., Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil, *J. Chem. Technol. Biotechnol*., 2005, **80**, 331–337.

Leung D. Y. C., Guo Y., Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production, *Fuel Process Technol.*, 2006, **87**, 883–890.

Leung D. Y. C., Wu X., Leung M. K. H., A review on biodiesel production using catalyzed transesterification, *Applied Energy*, 2010, **87**, 1083–1095.

Li L., Du W., Liu D., Wang L., Li Z., Lipase catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvents as the reaction medium, *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, 2006, **43**, 58–62.

Lotero E., Goodwin J. G., Bruce D. A., Suwannakarn K., Liu Y., Lopez D. E., The catalysis of biodiesel synthesis, *Catalysis*, 2006, **19**, 41–83.

Lu J., Nie K., Xie F.,Wang F., Tan T., Enzymatic synthesis of fatty acids methyl esters from lard with immobilized *Candida sp*. 99–125, *Process Biochem.*, 2007, **42**, 1367–1370.

Ma F., Hanna M. A., Biodiesel Production: a rewiev , *Bioresource Technology*, 1999, **70**, 1-15.

Meher L. C., Sagar D. V., Naik S. N., Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2006, **10**, 248-268.

Mbaraka I. K., Shanks B. H., Conversion of oils and fats using advanced mesoporous heterogeneous catalysts, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2006, **83**, 79–91.

Ma F., Hanna M. A., Biodiesel Production: a review, *Bioresource Technology*, 1999, **70**, 1-15.

Meher L. C., Dharmagadda Vidya S. S., Naik S. N., Optimization of alkali-catalyzed transesterification of Pongamia pinnata oil for production of biodiesel, *Bioresour. Technol.*, 2006, **97**, 1392–1397.

Man Kee L., Keat Teong L., Abdul Rahman M., Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review, *Biotechnology Advances*, 2010, **28**, 500–518.

Mittelbach M., Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil, *JAOCS*, 1990, **67**, 168–170.

Mittelbach M., Remschmidt C., *Biodiesel-the comprehensive handbook*, 3rd ed., self-published , Austria, 2006.

Mukesh K. M., Reddy J. R. C., Rao B. V. S. K., Prasad R. B. N., Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor, *Biotechnol. Lett.*, 2006, **28**, 637–640.

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

Nelson L .A, Foglia T. A., Marmer W. N., Lipase-catalyzed production of biodiesel, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, **73**, 1191–1195.

Namasivayam A .M., Korakianitis T., Crookes R. J., Bob-Manuel K. D. H., Olsen J., Biodiesel, emulsified biodiesel and dimethyl ether as pilot fuels for natural gas fuelled engines, *Appl. Energy*, 2010, **87**, 769–778.

Oğuz H., Tarım kesiminde yaygın olarak kullanılan dizel motorlarında fındık yağı biyodizelinin yakıt olarak kullanım imkanlarının incelenmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2004.

Oliveira J. V., Oliveira D., Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and $SCCO_2$., *J. Supercritical Fluids*, 2001, **19**, 141–148.

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

Othman M. R., Helwani Z., Martunus Fernando J. W. N., Synthetic hydrotalcites from different routes and their application as catalysts and gas adsorbents: a review, *Appl. Organometal. Chem.*, 2009, **23**, 335–346.

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

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

Paiva A. L., Balcao V. M., Malcata F. X., Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, *Enzyme and microbial technology*, 2000, **27**, 187-204.

Pizarro A. V. L., Park E. Y., Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth, *Process Biochem.,* 2003, **38**, 1077–1082.

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

Prinetto F., Ghiotti G., Graffin P., Tichit D., Synthesis and characterization of sol±gel Mg/Al and Ni/Al layered double hydroxides and comparison with co-precipitated samples, *Micropor. Mesopor.Mater.*,2000, **39**, 229-247.

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

Rao M. M., Reddy B. R., Jayalaksmi M., Jaya V. S., Sridhar B., Hydrothermal synthesis of Mg–Al hydrotalcites by urea hydrolysis, *Mater.Res. Bull.*, 2005, **40**, 347.

Ravindra P., Biofuels scenario in Asian countries, *Proceedings of 2006 World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing*, Toronto, Canada, 2006.

Rocha Filho G. N., Brodzki D., Djega-Mariadassou G., Formation of alkanes, alkylcycloalkanes and alkylbenzenes during the catalytic hydrocracking of vegetable oils, *Fuel*, 1993, **72**, 543–549.

Rodrigues R. F., Volpato G., Wada K., Ayub M. A. Z., Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2008, **85**, 925–930.

Romdhane I. 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,** 230-238.

Saka S., Kusdiana D., Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol, *Fuel*, 2001, **80**, 225–231.

Satoshi F., Hiromi M., Kazushi A., Biodiesel fuel production with solid super acid catalysis in fixed bed reactor under atmospheric pressure, *Catal. Commun.*, 2004, **5**, 721–723.

Schuchardta U., Serchelia R.,Vargas R. M., Transesterification of vegetable oils: a Review, *J. Braz. Chem. Soc.*, 1998, **9**, 199–210.

Selmi B., Thomas D., Immobilized-lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1999, **75**, 691–695.

Shah S., Sharma S., Gupta M. N., Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil, *Energy & Fuels*, 2004, **18**, 154–159.

Shah S., Gupta M. N., Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system, *Process Biochem.*, 2006, **42**, 410–414.

Shahani K. M., Lipases and esterases, Editors: Reed G., *Enzymes in Food Processing*, 2nd ed., Academic Press, Neew York, 181-217, 1975.

Shieh C. J., Liao H. F., Lee C. C., Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology, *Bioresource Technology*, 2003, **88**, 103–106.

Sharma Y. C., Singh B., Upadhyay S. N., Advancements in development and characterization of biodiesel: a review, *Fuel*, 2008, **87**, 2355–2373.

Sharma Y. C., Singh B., Development of biodiesel: Current scenario, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2009, **13**, 1646–1651.

Shao P., Meng X., He J., Sun P., Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock, *Food and Bioproducts Processing*, 2008, **86**, 283-289.

Shimada Y., Watanabe Y., Samukawa T., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y., Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1999, **76**, 789–793.

Shimada Y.,Watanabe Y., Sugihara A., Tominaga Y., Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing, *J. Molec. Catal. B: Enzym*., 2002, **17**, 133–142.

Sonntag N. O. V., New Developments in the Fatty Acid İndustry in America, *JAOCS*, 1984, **61**, 229-232.

Soumanou M. M., Bornscheuer U. T., Improvement in lipasecatalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 97–103.

Srivastava A., Prasad R., Trigliserides- based diesel fuels, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2000, **4**, 111-133.

Stumborg M.,Wong A., Hogan E., Hydroprocessed vegetable oils for diesel fuel improvement, *Bioresource Technol.*, 1996, **56**, 13–18.

Suppes G. J., Dasari M. A., Doskocil E. J., Mankidy P. J., Goff M. J., Transesterification of soybean oil with zeolite and metal catalysts, *Appl. Catal. A: Gen.*, 2004, **257**, 213–223.

Svendsen A., Lipase protein engineering, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000, **1543**, 223–238.

Talukder M. M. R., Puah S. M., Wu J. C., Won C. J., Chow Y., Lipase-catalyzed methanolysis of palm oil in presence and absence of organic solvent for production of biodiesel, *Biocatalysis and Biotransformation*, 2006, **24**(4), 257-262.

Telefoncu A., *Biyoteknoloji*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, 1995.

Tianwei T., Jike L., Kaili N., Li D., Fang W., Biodiesel production with immobilized lipase', *Biotechnology Advances*, 2010, **28**, 628–634.

URL-1: www.usaee.org/usaee2007/submission./Bunnell (Ziyaret Tarihi: 27 Aralık 2011).

URL-2: bp.com/statisticalreview (Ziyaret Tarihi: 27 Aralık 2011).

URL-3: http://www.canola-council.org/uplouds/17016foundationrev1.pdf (Ziyaret tarihi: 04 Ocak 2012).

URL-4: http://www.biodieselmagazine.com/article.jsp?article_id=762 (Ziyaret tarihi: 04 Ocak 2012).

URL-5: http://www.ito.org.tr/ITOPortal/Dokuman/15.49.pdf (Ziyaret tarihi: 04 Ocak 2012).

URL-6: http://onderciftci.com/index.php/kanola-ueretm.html (Ziyaret tarihi: 05 Ocak 2012).

URL-7: http://www.albiyobir.org.tr/trde_b.htm (Ziyaret tarihi: 02 Ocak 2012).

URL-8: http://www.gidatarim.com/IcerikDetay.asp?IcerikId=19284&UstKatId=25&KatId=42&AltKatId=&tur=1 (Ziyaret tarihi: 05 Ocak 2012).

URL-9: www.usaee.org/usaee2007/submissions/.../Bunnell> (Ziyaret tarihi: 05 Ocak 2012).

URL-10: www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/36242 (Ziyaret tarihi: 05 Ocak 2012).

URL-11: www.dglink.net/page2-2-4.html (Ziyaret tarihi:06 Ocak 2012).

Villeneuve P., Muderhwa J. M., Graille J., Haas M. J., Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of molecular catalysis B:enzymatic*, 2000, **9**, 113-148.

Wang Y., Ou S., Liu P., Xue F., Tang S., Comparison of two different processes to synthesize biodiesel by waste cooking oil, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2006, **252**, 107–112.

Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Tominaga Y., Enzimatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed bed bioreactor, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001, **78**, 703–707.

Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Tominaga Y., Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase, *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, 2002, **17**, 151-155.

Winkler U. K., Stuckmann M., Glycogen, Hyaluronate and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by Serratia marcescens, *Journal of Bacteriology*, 1979, **138**(3), 663-670.

Xavier M. F., Hector R. R., Hugo S. G., Charles G. H., Clyde H. A., Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils- a review, *JAOCS*, 1990, **67**, 890–910.

Xie W. L., Ma N., Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles, *Biomass & Bioenergy*, 2010, **34**, 890-896.

Xu Y., Du W., Liu D., Zeng J., A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium, *Biotechnol. Lett.*, 2003, **25**, 1239–1241.

Xu Y., Du W., Zeng J., Liu D., Conversion of soybean oil to biodiesel fuel using lipozyme TL IM in a solvent-free medium., *Biocatal. Biotransformation*, 2004, **22**, 45–48.

Yang G., Tian-Wei T., Kai-Li N., Fang W., Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media, *Chin. J. Biotech.*, 2006, **22**, 114–118.

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

Yesiloglu Y., Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil, *JAOCS*, 2004, **81**, 157–160.

Zabeti M., Daud W. M. A. W., Aroua M. K., Activity of solid catalysts for biodiesel production: a review, *Fuel Process. Technol.*, 2009, **90**, 770–777.

Zeng H., Deng X., Wang Y., Liao K., Preparation of Mg-Al Hydrotalcite by Urea Method and Its Catalytic Activity for Transesterification, *AIChE Journal*, 2009, **55** (5), 1229-1235.

EKLER

EK A. Protein Tayini Hesaplamaları

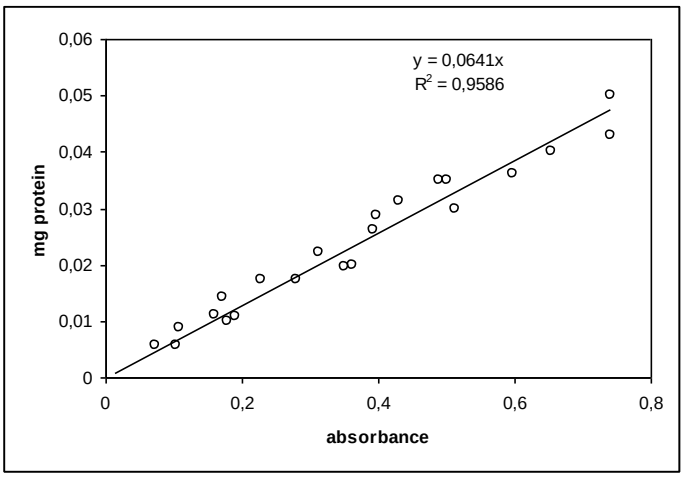
Protein tayininde izlenen yöntem şu şekildedir;

1) 1 ml etanol, 2 ml fosforik asit, 0,45 ml brilliant blue solüsyonu, 15 ml saf su karıştırılarak Bradford çözeltisi hazırlanır.

2) Spektrofotometre 595 nm' ye ayarlanır, kuartz cam küvete 2,4 ml Bradford çözeltisi ve örnek hacmi kadar saf su eklenir (örneğin 50 µL) ve spektrofotometre sıfırlanır.

3) 2,4 ml bradford çözeltisine 50 µL örnek konur (örnek, tutuklama ortamının sıvı kısmından alınır), karıştırılır, 5 dakika beklenir, spektroda absorbans ölçülür.

4) Örneğin absorbansı ölçüldükten sonra kalibrasyon grafiğinden absorbansa karşılık gelen protein miktarı bulunur.



Şekil A.1. Bradford kalibrasyon grafiği

Spektrofotometrede ölçtüğümüz örnek miktarı 100µl'dir. Kalibrasyon grafiğinden okunan protein miktarı (mg) 100 µl numune içindir. Bu değer 3 ml karışım ortamı için hesaplanır.

m_0: t=0 anında 3 ml ortamda bulunan protein miktarı (mg)

m_1: t=1 saat için 3 ml ortamda bulunan protein miktarı (mg)

d: 3ml ortamda bulunan destek miktarı (g)

EK B. Aktivite Tayini

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

1) 3mg tutuklu lipaz üzerine p-NPP çözeltisinden 75µl ve 2925µl tampon çözelti eklenir.

2) 50^0C'de 10dk süreyle inkübe edilir. Tepkimenin durdurulması için -18^0C'de 8dk bekletilir.

3) Tepkime karışımı tamponla 1/3 oranında seyreltilir ve 410nm'de UV-vis spektrofotometrede absorbansı okunur.

4) Elde edilen absorbans değerleri ile kalibrasyon grafiği yardımıyla tepkime sonunda oluşan p-NP derişimi hesaplanır.

5) Enzim aktivitesi (U), standart koşullarda (50 ^{o}C sıcaklık ve farklı pH değeri) birim hacimde 1dk'da 1µmol p-NP üreten enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Örnek Aktivite Hesabı

Absorbans değeri: 1,247 (pH 9,0; 1 ml örnek)

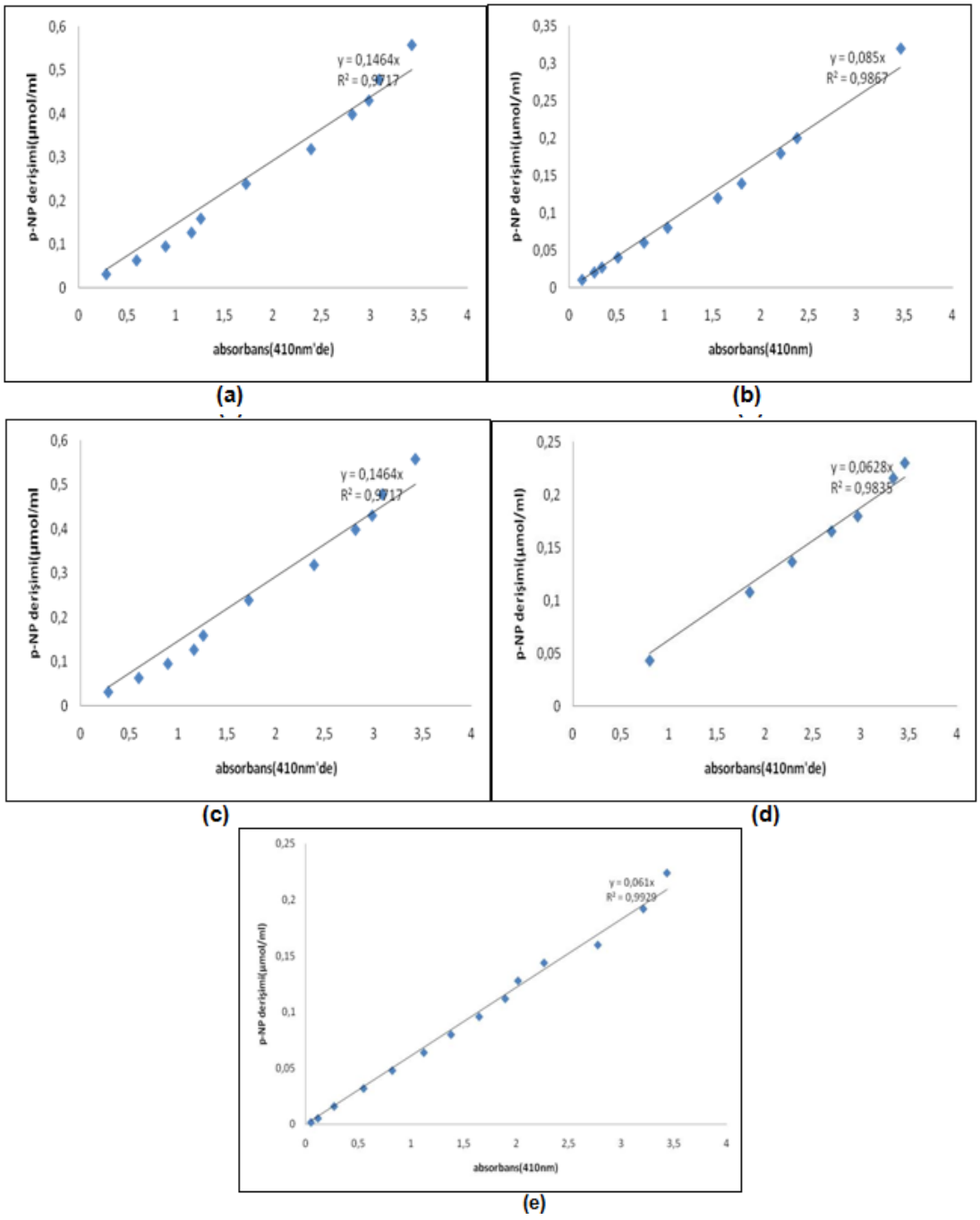
Absorbans değeri x kalibrasyon grafiğinin eğimi (Şekil B.1.e): 1,247x 0,061=0,076 µmol/ml p-NP

0,076x3= 0,228 µmol p-NP (3 ml örnek için)

Ünite hesabı: 0,228/10 dk.= 0,023 p-NP/dk (U)

Ünite/destek miktarı: 0,023/0,003= 6,71 U/g destek

Her bir tampon için o tamponda farklı derişimlerde hazırlanmış p-NP çözeltileri kullanılarak kalibrasyon grafikleri çizilir. pH 7,0-9,0 arasındaki Tris-HCl tamponları için hazırlanan enzim aktivite kalibrasyon grafikleri Şekil EK B.1'de verilmiştir.



Şekil B.1. Tris-HCl tamponları için kalibrasyon grafikleri (**a)** pH7,0; (**b)** pH7,5; (**c)** pH8,0;(**d)**pH8,5;(**e)**pH9,0

EK C. Metil Ester Verimi Hesaplamaları

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

$$\frac{\Sigma A - A_{MH}}{A_{MH}} \cdot \frac{C_{MH} \cdot V_{MH}}{m}$$

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

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

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

(mg/ml) 10 mg/ml çözelti.

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

m = örneğin kütlesi (mg).

ÖZGEÇMİŞ

Havva Melda Akbin, 1981 yılında Taşköprü'de doğdu. İlköğretimini Seka Çocuk Dostları İlköğretim Okulun'da, lise eğitiminin 1,5 yılını Kocaeli Körfez Fen Lisesi'nde diğer 1,5 yılını İnkılap Lisesi'nde tamamladı. 1999 yılında girdiği Ege Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden 2006 yılında mezun oldu. 2007 Aralık-2008 Haziran tarihleri arasında Köseköy İlköğretim Okulunda sınıf öğretmenliği, 2008 Eylül-2009 Haziran tarihleri arasında Hızır Reis İlköğretim Okulu'nda İngilizce öğretmenliği yaptı. 2009 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümü'nde başladığı yüksek lisans eğitimine ve aynı yıl 109M466 nolu Tübitak projesinde başladığı proje asistanlığı görevine halen devam etmektedir.