



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ENZİMLERİ KULLANARAK BİYODİZEL ÜRETİMİ  
VE BİYODİZEL ÖZELLİKLERİNİN ANALİTİK  
METOTLARLA ARAŞTIRILMASI**

**Yasin YÜCEL**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**BURSA-2008**



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ENZİMLERİ KULLANARAK BİYODİZEL ÜRETİMİ  
VE BİYODİZEL ÖZELLİKLERİNİN ANALİTİK  
METOTLARLA ARAŞTIRILMASI**

**Yasin YÜCEL**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**BURSA-2008**



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ENZİMLERİ KULLANARAK BİYODİZEL ÜRETİMİ  
VE BİYODİZEL ÖZELLİKLERİNİN ANALİTİK  
METOTLARLA ARAŞTIRILMASI

Yasin YÜCEL

Prof.Dr. Cevdet DEMİR  
(Danışman)

DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2008

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ENZİMLERİ KULLANARAK BİYODİZEL ÜRETİMİ  
VE BİYODİZEL ÖZELLİKLERİNİN ANALİTİK  
METOTLARLA ARAŞTIRILMASI

Yasin YÜCEL

DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez ..../...../200... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Cevdet DEMİR    Prof. Dr. Necdet COŞKUN    Prof. Dr. Yücel TAŞDEMİR  
(Danışman)

Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR    Prof. Dr. Bülent KESKİNLER

## ÖZET

Tüklenen petrol kaynakları ve buna bağlı enerji krizleri nedeniyle son yıllarda alternatif enerji kaynakları önemli araştırma alanı haline gelmiştir. Biyodizel, yenilenebilen, düşük emisyon profiline sahip ve biyolojik olarak parçalanabilen yakıt olması nedeniyle petrol esaslı yakıtlara alternatif bir yakıttır. Biyodizel trigliseridlerin metanol ile transesterleşmesiyle elde edilen yağ asidi metil esterleri olarak tanımlanabilir. Son zamanlarda yağ asidi metil esterlerinin saf olarak elde edilmesi, gliserolün yan ürün olarak kolaylıkla ayrılması gibi nedenlerle biyodizel yakıt üretiminde lipaz kullanılarak enzimatik transesterleşme metodu çok daha cazip hale gelmiştir. Fakat yüksek enzim maliyetleri endüstriyel uygulamalar için dezavantajdır. Üretim maliyetinin düşürülmesi için enzim uygun bir taşıyıcı üzerine tutturulabilmeli ve tekrar kullanılabilmelidir.

Bu çalışmada, *Candida antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) ve *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM) immobilize lipazlarının metanol beraberinde kanola yağını transesterleşme reaksiyonu araştırıldı. Reaksiyon süresi, sıcaklık, enzim miktarı ve metanol-yağ molar oranı gibi kanola yağını transesterleşme reaksiyonu ile metil esterlerine dönüştürmede etkin olan parametreler merkezi kompozit dizayn ve yüzey analizleri kullanılarak incelendi.

Transesterleşme reaksiyonunda optimum koşullar, yağ ağırlığının (%4-%21)' i oranında enzim, (1:1,6-1:4,1) yağ-alkol molar oranı, (34°C-55°C) reaksiyon sıcaklığı ve (4-6) saat reaksiyon süresi olarak belirlendi. En yüksek biyodizel dönüşümü (%97,2) enzim karışımı kullanılarak elde edildi.

Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmak üzere mikro gözenekli polimer matriks stiren divinil benzen kopolimerinden sentezlendi. Lipozyme TL-100L ve Novozyme 388 lipazları celite 545, silikajel ve stiren divinil benzen kopolimerleri üzerine absorpsiyon ve kovalent bağlama metotları kullanılarak immobilize edildi. Enzimlerin immobilizasyon verimliliği ve aktiviteleri belirlendi. Destek maddeleri ve immobilize edilmiş türevleri taramalı elektron mikroskobu ve fourier transform infrared spektrometresi (FTIR) ile incelendi.

Biyodizel üretimi kanola yağı ve metanol karışımının bir peristaltik pompa yardımıyla mikro gözenekli polimer kolon içinden 24 saat sürede devridaimi ile yapıldı. Gaz kromatografi analiz sonuçlarına göre en yüksek metil ester dönüşümü %97 olarak hesaplandı. Tekrar kullanım açısından mikro gözenekli polimer üzerine tutturulan lipaz 10 kez kullanılmasına rağmen önemli bir aktivite kaybı gözlenmedi.

**Anahtar Kelimeler:** Transesterifikasyon, Lipaz, İmmobilizasyon, Kanola yağı, Biyodizel, Stiren-Divinilbenzen,

**ABSTRACT**

Alternative energy resources have become more important research area in recent years because of exhausting petroleum resources and energy crises. Biodiesel is an alternative fuel to petroleum based fuels because of renewable, has a low emission profile and biodegradable fuel. Biodiesel can be defined as fatty acid methyl esters from triglycerides by transesterification with methanol. Recently, enzymatic transesterification using lipase has become more attractive for biodiesel fuel production, since the glycerol produced as a by product can easily be recovered and the purification of fatty acid methyl esters is simple to accomplish. However the high cost of enzyme remains a barrier for its industrial applications. In order to decrease the cost of the process, the enzyme must be immobilized in a suitable carrier and reused.

In this study, the abilities of three immobilized lipases from *Candida antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) and *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM) to catalyze the transesterification of canola oil with methanol were investigated. Response surface methodology (RSM) and central composite design (CCD) were employed to evaluate the effects of reaction parameters, such as reaction time, temperature, enzyme amount, molar ratio of methanol to canola oil on percentage weight conversion to canola oil methyl ester by transesterification.

The optimum conditions of the transesterification reaction were as follows: enzyme amount based on oil weight (4%-21%), oil/alcohol molar ratio (1:1,6-1:4,1), temperature (34°C -55°C), and reaction time (4h-6h). The highest conversion (%97,2) of canola oil to biodiesel was obtained by using mixture of lipases.

Micro porous polymeric matrix was synthesized from styrene-divinylbenzene copolymers for using to immobilization of enzymes. Two different lipase from Lipozyme TL-100L and Novozyme 388 were immobilized onto three different carriers using both adsorption and covalent method: celite 545, silica gel and styrene-divinyl benzene copolymer. Immobilization efficiency and activity of enzymes determined. The properties of the support and immobilized derivatives were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

Biodiesel production was performed by circulating canola oil and methanol mixture into micro porous polymer column by a peristaltic pump for 24 hours. According to gas chromatography analysis results the highest yield of methyl ester was calculated as %97. The immobilized lipase onto the micro porous polymer proved to be stable after even 10 reused and lost little activity when was subjected to repeated use.

**Key Words:** Transesterification, Lipase, Immobilization, Canola oil, Biodiesel, Styrene-divinyl benzene.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>TEZ ONAY SAYFASI</b> .....	<b>II</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>V</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>XI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>XIV</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>1. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>3</b>
1.1. BİTKİSEL YAĞLAR.....	7
1.1.1. Kanola Yağı .....	11
1.1.2. Ayçiçek Yağı .....	13
1.1.3. Soya Yağı.....	14
1.1.4. Palm Yağı .....	15
1.1.5. Pamuk Yağı .....	16
1.1.6. Yağ Asitleri .....	18
1.1.6.1. Doymuş Yağ Asitleri .....	20
1.1.6.2. Doymamış Yağ Asitleri .....	20
1.1.6.3. Hidroksi Yağ Asitleri ..	21
1.1.6.4. Karboksilik Yağ Asitleri ..	21
1.1.7. Gliserin.....	22
1.1.8. Gliseridler.....	22
1.1.9. Yağların Diğer Bileşenleri.....	25
1.1.9.1. Fosfolipidler.....	25
1.1.9.2. Sfingolipidler.....	26
1.1.9.3. Yağ Alkolleri.....	26
1.1.9.4. Steroller.....	27
1.1.9.5. Hidrokarbonlar.....	28
1.1.9.6. Renk Maddeleri.....	28
1.1.9.7. Yağda Çözünen Vitaminler.....	29
1.1.9.8. Antioksidanlar.....	30
1.1.9.9. Tat ve Koku Maddeleri.....	30
1.1.9.10. Mineraller.....	30
1.2. HAYVANSAL YAĞLAR.....	31
1.3. ATIK YAĞLAR.....	31
1.4. YAĞ BİLEŞENLERİNİN BİYODİZEL ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ.....	34
1.5. ENZİMLER.....	36
1.5.1. Enzimlerin Yapısı .....	36
1.5.2. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	37

## VI

1.5.3. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Faktörler.....	38
1.5.3.1. Sıcaklık.....	38
1.5.3.2. pH.....	39
1.5.3.3. Enzim/Substrat Değişimi.....	39
1.5.3.4. Su Etkisi.....	40
1.5.3.5. İnhibitör (Önleyici) Etkisi.....	40
1.5.3.6. Aktivatör (Aktifleyici) Etkisi.....	40
1.5.4. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği.....	41
1.5.5. Enzim Aktivite Ölçüm Yöntemleri .....	42
1.5.5.1. Spektrofotometrik Yöntem.....	43
1.5.5.2. Manometrik Yöntem.....	43
1.5.5.3. Thunberg Yöntemi.....	43
1.5.5.4. Elektrot Yöntemi.....	43
1.5.5.5. Polimerik Tayin Yöntemi.....	44
1.5.5.6. Kromatografik Yöntem.....	44
1.5.5.7. Kimyasal Tayin Yöntemi.....	44
1.5.6. Lipaz Enzimleri.....	45
1.5.7. Lipaz Enzimlerinin Özellikleri.....	46
1.5.8. Lipazların Kullanım Alanları.....	49
1.5.8.1. Süt Ürünleri Endüstrisinde Lipazlar.....	50
1.5.8.2. Deterjanlarda Lipazlar.....	50
1.5.8.3. Oleokimyasal Endüstrisinde Lipazlar.....	51
1.5.8.4. Trigliseridlerin Sentezinde Lipazlar.....	51
1.5.8.5. Yüzey Aktif Maddelerin Sentezinde Lipazlar.....	52
1.5.8.6. Kişisel bakım ürünleri içeriğini oluşturan maddelerin sentezinde lipazlar.....	52
1.5.8.7. İlaç Sanayisinde ve Tarım Kimyasallarında (Agrokimyasallar) Lipazlar.....	53
1.5.8.8. Polimer Sentezlerinde Lipazlar.....	53
1.5.9. Lipaz Enzimiyle Transesterifikasyon Reaksiyon Uygulamaları.....	54
1.6. ENZİM İMMOBİLİZASYONU.....	60
1.6.1. İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Maddeleri.....	61
1.6.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	63
1.6.3. Fiziksel Metotlar.....	65
1.6.4. Adsorpsiyon ile İmmobilizasyon.....	65
1.6.5. Hapsetme ile İmmobilizasyon.....	66
1.6.5.1. Kafes Tipi Hapsetme Metodu.....	66
1.6.5.2. Mikrokapsül İle Hapsetme Metodu.....	67
1.6.6. Kimyasal Metotlar.....	68
1.6.6.1. İyonik Bağlama.....	68
1.6.6.2. Kovalent Bağlama.....	69
1.6.6.3. Çapraz Bağlama.....	71
1.6.7. Destek Maddesi Aktivasyon Yöntemleri.....	72
1.6.7.1. Siyanojen Bromür.....	72
1.6.7.2. Karbodiimid Aktivasyonu.....	73
1.6.7.3. Diazotlama.....	73
1.6.7.4. Alkilleme ve Arilleme.....	73
1.6.7.5. Aldehit Kondenzasyonu.....	74
1.6.8. Destek Maddesine Enzim İmmobilizasyonu.....	74
1.7. BİYODİZEL.....	78
1.7.1. Biyodizel Özellikleri.....	79



1.7.2. Biyodizel Üretim Yöntemleri.....	83
1.7.3. Türkiyede Biyodizel.....	88
1.7.4. Dünyada Biyodizel.....	90
1.8. DENEYSEL DİZAYN.....	94
1.8.1. Merkezi Kompozit Dizayn.....	95
1.8.2. Karışım Dizayn.....	97
1.8.2.1. Simplex Centroid Dizayn.....	98
1.8.2.2. Simplex Lattice (Örgü) Dizayn.....	99
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>101</b>
2.1. Materyal.....	101
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler .....	101
2.1.1.1. Kimyasallar.....	101
2.1.1.2. Çözeltiler.....	104
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Aletler.....	105
2.1.3. Deney Düzeneği.....	106
2.2. Yöntem.....	107
2.2.1. Polimer Destek Maddesinin Hazırlanması.....	107
2.2.2. Polimer Destek Maddesinin Modifikasyonu.....	110
2.2.3. Destek Maddesine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonu.....	110
2.2.3.1. Enzimlerin Destek Maddesine Adsorpsiyon ile İmmobilizasyonu.....	111
2.2.3.2. Enzimlerin Destek Maddesine Kovalent Bağlama ile İmmobilizasyonu.....	112
2.2.4. Kantitatif Protein Tayini.....	113
2.2.4.1. Bradford Boyasının Hazırlanması.....	114
2.2.4.2. Bradford Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması.....	114
2.2.4.3. Standart Tayin Prosedürü.....	115
2.2.5. Enzim Aktivite Tayini.....	115
2.2.6. Biyodizel Üretimi.....	116
2.2.6.1. Sürekli Sistem Deney Düzeneği Kullanılarak Biyodizel Üretimi.....	117
2.2.6.2. Kesikli Sistem Deney Düzeneği Kullanılarak Biyodizel Üretimi.....	117
2.2.7. Standart Yağ Asidi Metil Esteri Grafiklerinin Çıkarılması.....	117
2.2.8. İnce Tabaka Kromatografisi İle Biyodizel Tayini.....	118
2.2.9. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi ile Biyodizel Tayini.....	119
<b>3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>120</b>
3.1. Alkali Biyodizel Ön Çalışması.....	120
3.2. Enzimatik Biyodizel Yağ Asidi Metil esterleri Pikleri.....	121
3.3. Biyodizel Sentezine Alkol Türünün Etkisi.....	121
3.4. Biyodizel Sentezine Su Etkisi.....	122
3.5. Biyodizel Sentezine Organik Solvent Etkisi.....	123
3.6. Adım Adım Metanol İlavesinin Biyodizel Verimine Etkisi .....	124
3.7. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanımı.....	125
3.8. Enzimatik Biyodizel Sentezinin Kemometrik Optimizasyonu.....	130
3.8.1. Candida Antarctica (Novozym 435) Enziminin Kemometrik Optimizasyonu.....	130
3.8.2. Thermomyces Lanuginosus (Lipozyme TL-IM) Enziminin Kemometrik Optimizasyonu.....	132
3.8.3. Rhizomucor Miehei (Lipozyme RM-IM) Enziminin Kemometrik Optimizasyonu.....	134
3.9. Mixture Dizayn İle Biyodizel Sentezinin Kemometrik Optimizasyonu.....	136
3.10. Enzimatik Biyodizel Sentezinin ANOVA Analiz Sonuçları.....	139
3.11. Biyodizel Yakıtın TSEN 14214 Analizleri.....	151

## VIII

3.12. Destek Maddesinin SEM Analizi İle Yüzey Karakterizasyonu.....	152
3.13. Destek Maddesinin FTIR Analizi İle Yapı Karakterizasyonu.....	155
3.14. Kantitatif Protein Analiz Sonuçları.....	160
3.15. Enzim Aktivite Analiz Sonuçları.....	162
3.16. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Analiz Sonuçları.....	165
3.17. Biyodizel Gaz Kromatografisi Analiz Sonuçları.....	165
<b>4. SONUÇ.....</b>	<b>170</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>172</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>179</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>184</b>

**KISALTMALAR DİZİNİ**

AB	-	Avrupa Birliği
ADP	-	Adenozin difosfat
ANOVA	-	Varyans analizi
ATP	-	Adenozin trifosfat
BSA	-	Bovin Serum Albumin
CBB	-	Coomassie Brilliant Blue
DEAE	-	Dietilaminoetil,
DG	-	Digliserid;
E.İ.E	-	Elektrik işleri Etüt İdaresi
EDC	-	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EDTA	-	Etilendiamin tetra asetik asit
EPDK	-	Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu
ES	-	Enzim-substrat kompleksi
FFA	-	Serbest yağ asidi
FTIR	-	Fourier transform infrared spektrometresi
GC-MS	-	Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
Lipozyme RM-IM	-	Rhizomucor miehei enzimi
Lipozyme TL-IM	-	Thermomyces lanuginosus enzimi
MG	-	Monogliserid
Novozym 435	-	Candida antarctica enzimi
PETDER	-	Petrol Sanayi Derneği
pNP	-	para-nitro fenol
pNPP	-	Paranitrofenilpalmitat

RMSE	-	Ortalama karekök hata
SEM	-	Taramalı elektron mikroskobu
STR-DVB	-	Stiren-divinilbenzen
STR-DVB-GA	-	Stiren-divinilbenzen-glutaraldehit
STR-DVB-PGA	-	Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit
TG	-	Trigliserid;
TLC	-	İnce Tabaka Kromatografisi
TSE	-	Türk Standartları Enstitüsü
U	-	nite (Birim)
UV	-	Ultraviyole
YAME	-	Yağ asidi metil esteri

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

Sayfa

Çizelge 1.1.1. Dünyada en fazla üretim yapılan yağ bitkileri ve yağ içerikleri.....	14
Çizelge 1.1.2. Dünyada en fazla üretim yapılan yağ bitkileri ve yağ içerikleri.....	15
Çizelge 1.1.3. Bazı bitkisel yağların içerdiği yağ asitleri ve yüzdeleri.....	16
Çizelge 1.1.4. 2004-2005 Dünya bitkisel yağ üretim değerleri.....	17
Çizelge 1.1.5. 2004-2005 Türkiye bitkisel yağ üretim değerleri.....	17
Çizelge 1.1.1.1. 1999-2003 yılları arasında Dünya ve Türkiye'de kanola tohumu üretim verileri (bin ton).....	19
Çizelge 1.1.2.1. 2001-2005 yılları arasında Dünya ve Türkiye'de ayçiçek tohumu üretim verileri (bin ton).....	20
Çizelge 1.1.3.1. 2001-2005 yılları arasında Dünya ve Türkiye'de soya tohumu üretim verileri (bin ton).....	22
Çizelge 1.1.4.1. 2001-2005 yılları arasında Dünya ve Türkiye'de palm tohumu üretim verileri (bin ton).....	23
Çizelge 1.1.5.1. 2001-2005 yılları arasında Dünya ve Türkiye'de pamuk tohumu üretim verileri (bin ton).....	24
Çizelge 1.1.6.1. Bitkisel ve hayvansal yağlarda en çok bulunan yağ asitleri ve özellikleri.....	26
Çizelge 1.1.6.1.1. Hayvansal ve bitkisel yağlarda en çok bulunan başlıca doymuş yağ asitleri.....	27
Çizelge 1.1.6.2.1. Hayvansal ve bitkisel yağlarda en çok bulunan başlıca doymamış yağ asitleri.....	28
Çizelge 1.1.9.3.1. Bazı yağ alkolleri.....	34
Çizelge 1.1.9.6.1. Bazı karotinoidler ve kapalı formülleri.....	35
Çizelge 1.2.1. Bazı hayvansal kaynaklı yağların yağ asitleri içeriği.....	38
Çizelge 1.5.8.1. Lipazların kullanım alanları.....	55
Çizelge 1.6.1. Enzimlerin immobilize edilerek çeşitli destek maddelerine tutturulması ile sağlanan avantajla.....	61
Çizelge 1.6.1.1. İmmobilizasyon yöntemi ve matriks seçimindeki dikkat edilecek noktalar.....	62

Çizelge 1.6.1.2. Enzim immobilizasyonunda kullanılan çeşitli destek maddeleri.....	63
Çizelge 1.6.2.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması.....	64
Çizelge 1.6.6.2.1. Kovalent bağlanma yöntemleri.....	70
Çizelge 1.6.8.1. Proteinlerin içerdikleri fonksiyonel gruplar.....	75
Çizelge 1.6.8.2. Protein immobilizasyonu için destek maddesinin fonksiyonel grupla kaplanması.....	76
Çizelge 1.6.8.3. Proteinlerin destek maddesi üzerine kovalent bağ ile bağlanması.....	77
Çizelge 1.7.1.1. TS EN 14214 otomotiv yakıtları yağ asidi metil esterleri (YAME) dizel motorlar için belirlenen standart özellikler.....	80
Çizelge 1.7.1.2. TS EN 14213 ısıtma yakıtları yağ asidi metil esterleri (YAME) standartları.....	81
Çizelge 1.7.1.3. Biyodizel yakıtın özellikleri.....	82
Çizelge 1.7.1.4. Dizel yakıt ile biyodizel yakıt özelliklerinin karşılaştırılması.....	83
Çizelge 1.7.2.1. Biyodizel üretim yöntemlerinin karşılaştırılması.....	88
Çizelge 2.1.1.1.1. Çalışmada kullanılan enzimler ve özellikleri.....	101
Çizelge 2.1.1.1.2. Çalışmada kullanılan yağ asidi metil esteri karışımı standartları.....	102
Çizelge 2.1.1.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	103
Çizelge 2.1.2.1. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler.....	105
Çizelge 2.2.7.1. GC-MS sıcaklık programı.....	118
Çizelge 2.2.9.1. QP5000 model GC-MS cihazı çalışma şartları.....	120
Çizelge 2.2.9.2. QP5000 model GC-MS cihazı sıcaklık programı.....	120
Çizelge 3.8.1. Merkezi kompozit dizayn için kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeler.....	135
Çizelge 3.8.1.1. Candida Antarctica (Novozym 435) enziminin merkezi kompozit dizayn tablosu ve deneysel sonuçlar.....	136
Çizelge 3.8.2.1. Thermomyces Lanuginosus (Lipozyme TL-IM) enziminin merkezi kompozit dizayn tablosu ve deneysel sonuçlar.....	138
Çizelge 3.8.3.1. Rhizomucor Miehei (Lipozyme RM-IM) enziminin merkezi kompozit dizayn tablosu ve deneysel sonuçlar.....	140

Çizelge 3.9.1. <i>Candida Antarctica</i> (Novozym 435), <i>Thermomyces Lanuginosus</i> (Lipozyme TL-IM) ve <i>Rhizomucor Miehei</i> (Lipozyme RM-IM) enzimlerinin simplex örgü dizayn tablosu ve deneysel sonuçlar.....	143
Çizelge 3.10.1. <i>Candida Antarctica</i> (Novozym 435) enzimi için ANOVA analiz sonuçları.....	144
Çizelge 3.10.2. <i>Thermomyces Lanuginosus</i> (Lipozyme TL-IM) enzimi için ANOVA analiz sonuçları.....	145
Çizelge 3.10.3. <i>Rhizomucor Miehei</i> (Lipozyme RM-IM) enzimi için ANOVA analiz sonuçları.....	146
Çizelge 3.10.4. <i>Candida Antarctica</i> (Novozym 435), <i>Thermomyces Lanuginosus</i> (Lipozyme TL-IM) ve <i>Rhizomucor Miehei</i> (Lipozyme RM-IM) enzimlerinin kullanıldığı mixture dizayn verileri için ANOVA analiz sonuçları.....	146
Çizelge 3.11.1. Optimum deneysel koşullarda enzimatik transesterleşme reaksiyonu ile sentezlenen biyodizel yakıtın TSEN 14214 analiz sonuçları.....	156
Çizelge 3.14.1. Destek maddelerine immobilize olan Novozyme 388 enziminin protein analiz sonuçları.....	165
Çizelge 3.14.2. Destek maddelerine immobilize olan Lipozyme TL-100L enziminin protein analiz sonuçları.....	166
Çizelge 3.15.1. Destek maddelerine immobilize olan Novozyme 388 enziminin protein analiz sonuçları.....	168
Çizelge 3.15.2. Destek maddelerine immobilize olan Lipozyme TL100L enziminin protein analiz sonuçları.....	168
Çizelge 3.17.1. Stiren-divinilbenzen (STR-DVB) destek maddesine immobilize olan TL 100L ve N 388 enzimleriyle sentezlenen biyodizelin GC-MS analiz sonuçları.....	172
Çizelge 3.17.2. Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) destek maddesine immobilize olan TL 100L ve N 388 enzimleriyle sentezlenen biyodizelin GC-MS analiz sonuçları.....	172
Çizelge 3.17.3. Silikajel destek maddesine immobilize olan TL 100L ve N 388 enzimleriyle sentezlenen biyodizelin GC-MS analiz sonuçları.....	173
Çizelge 3.17.4. Celite 545 destek maddesine immobilize olan TL 100L ve N 388 enzimleriyle sentezlenen biyodizelin GC-MS analiz sonuçları.....	173

<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	Sayfa
Şekil 1.1. Gliserin ve yağ asitlerinden trigliserid oluşumu.....	12
Şekil 1.1.7.1. Gliserinin açık formülü.....	29
Şekil 1.1.8.1. $\alpha$ ve $\beta$ monogliserid formülleri.....	30
Şekil 1.1.8.2. 1,2-digliserid ve 1,3-digliserid formülleri.....	30
Şekil 1.1.8.3. Basit ve karışık trigliserid formülleri.....	31
Şekil 1.1.8.4. Trigliserid molekülünün hidroliz reaksiyonu.....	31
Şekil 1.1.8.5. Trigliserid molekülünün sabunlaşma reaksiyonu.....	31
Şekil 1.1.9.1.1. Diğer adı lesitin olan fosfotidil kolin molekülü.....	32
Şekil 1.1.9.2.1. Sifingomiyelin molekülünün açık yapısı.....	33
Şekil 1.1.9.4.1. Kolesterol molekülünün açık yapısı.....	34
Şekil 1.1.9.7.1. D vitamini molekül yapısı.....	36
Şekil 1.1.9.7.2. E vitamini molekül yapısı.....	36
Şekil 1.5.7.1. Trigliseridlerden enzimatik katalizle yağ asidi metil esteri (YAME) üretim mekanizması.....	55
Şekil 1.6.4.1. Adsorpsiyon ile immobizasyon.....	65
Şekil 1.6.5.1.1. Kafes Tipi Hapsetme Metodu.....	67
Şekil 1.6.5.2.1. Mikrokapsül ile hapsetme metodu.....	68
Şekil 1.6.6.1.1. İyonik bağlama ile immobilizasyon metodu.....	69
Şekil 1.6.6.2.1. Kovalent bağlama ile immobilizasyon metodu.....	70
Şekil 1.6.6.3.1. Çapraz bağlama ile immobilizasyon metodu.....	71
Şekil 1.6.7.1.1. Siyanojen bromid ile destek aktivasyon şeması.....	72
Şekil 1.6.7.2.1. Karbodiimid ile destek aktivasyon şeması.....	73
Şekil 1.6.7.5.1. Enzim moleküllerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanması.....	74



Şekil 1.7.1. Stokiyometrik transesterifikasyon reaksiyon şeması.....	78
Şekil 1.7.2. Baz katalizli transesterleşme reaksiyon mekanizması verilmiştir.....	79
Şekil 1.7.2.1. Transesterleşme yöntemiyle biyodizel üretim şeması.....	84
Şekil 1.7.2.2. Alkali katalizör yöntemiyle biyodizel üretim şeması.....	85
Şekil 1.7.2.3. Enzimatik biyodizel üretim şeması.....	87
Şekil 1.8.1.1. Merkezi kompozit dizaynnoktaları.....	95
Şekil 1.8.1.2. Merkezi kompozit dizayn şeması.....	96
Şekil 1.8.2.1. Üç bileşenli karışım dizayn şeması görülmektedir.....	97
Şekil 1.8.2.1.1. Üç bileşenli simplex centroid dizayn şeması.....	98
Şekil 1.8.2.1.2. Üç bileşenli simplex centroid dizaynı.....	99
Şekil 1.8.2.2.1. Üç bileşenli simplex lattice (örgü) dizayn şeması.....	100
Şekil 1.8.2.2.2. Üç bileşenli simplex lattice (örgü) dizaynı.....	100
Şekil 2.1.3.1. Biyodizel üretiminde kullanılan deney düzeneği şeması.....	106
Şekil 2.1.3.2. Biyodizel üretiminde kullanılan deney düzeneği resmi.....	107
Şekil 2.2.1.1. Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimerizasyon şeması.....	108
Şekil 2.2.1.2. Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimer destek maddesinin polimerizasyon reaksiyonu.....	109
Şekil 2.2.1.3. Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimer destek maddesinin resmi.....	109
Şekil 2.2.3.1. Lipaz enzimlerinin adsorpsiyon ve kovalent bağlama metotlarıyla destek maddelerine immobilizasyon şeması.....	111
Şekil 2.2.3.1.1. Enzimlerin polimer destek maddesine adsorpsiyon ile immobilizasyon şeması.....	112

Şekil 2.2.3.2.1. Enzimlerin polimer destek maddesine kovalent bağlama ile immobilizasyon şeması.....	114
Şekil 2.2.4.2.1. Bradford kalibrasyon grafiği.....	115
Şekil 2.2.5.1. Enzim aktivite kalibrasyon grafiği.....	117
Şekil 2.2.7.1. Standart yağ asidi metil esterleri pikleri.....	119
Şekil 3.1.1. Alkali katalizör beraberinde kanola yağı ile sentezlenen biyodizelin yağ asidi metil esteri pikleri.....	121
Şekil 3.2.1. İmmobilize Candida Antarctica (Novozym 435) enzimi beraberinde kanola yağı ile sentezlenen biyodizelin yağ asidi metil esteri pikleri.....	126
Şekil 3.3.1. Biyodizel sentezine farklı alkol türlerinin etkisi.....	127
Şekil 3.4.1. Biyodizel sentezine su etkisi.....	128
Şekil 3.5.1. Biyodizel sentezine organik solvent etkisi.....	129
Şekil 3.6.1. Biyodizel sentezine adım adım metanol ilavesi etkisi.....	130
Şekil 3.7.1. Ticari immobilize enzimlerin tekrar kullanımı.....	131
Şekil 3.7.2. İmmobilize lipozyme TL-100L ve novozyme 388 enzimlerinin rölatif transesterleşme aktiviteleri.....	132
Şekil 3.7.3. Celite 545, silikajel ve STR-DVB kopolimer destek maddelerine kovalent bağlama (glutaraldehit ile aktive edilmiş) metoduyla immobilize edilen lipozyme TL-100L ve novozyme 388 lipaz enzimlerinin tekrar kullanım kapasiteleri.....	134
Şekil 3.7.4. Celite 545, silikajel ve STR-DVB kopolimer destek maddelerine fiziksel adsorpsiyon (glutaraldehit ile aktive edilmemiş) metoduyla immobilize edilen lipozyme TL-100L ve novozyme 388 lipaz enzimlerinin tekrar kullanım kapasiteleri.....	134

Şekil 3.9.1. Üçlü enzim karışımının karışım dizayn şeması ( $x_1$ : novozym 435; $x_2$ : lipozyme TL-IM; $x_3$ : lipozyme RM-IM).....	142
Şekil 3.9.2. Lipazların ternary grafiği.....	142
Şekil 3.10.1. <i>Candida Antarctica</i> (Novozym 435) enziminin kullanıldığı biyodizel sentez reaksiyonlarında önemli faktör etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkilerini gösteren yüzey grafikleri.....	149
Şekil 3.10.2. <i>Thermomyces Lanuginosus</i> (Lipozyme TL-IM) enziminin kullanıldığı biyodizel sentez reaksiyonlarında önemli faktör etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkilerini gösteren yüzey grafikleri.....	152
Şekil 3.10.3. <i>Rhizomucor Miehei</i> (Lipozyme RM-IM) enziminin kullanıldığı biyodizel sentez reaksiyonlarında önemli faktör etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkilerini gösteren yüzey grafikleri.....	155
Şekil 3.12.1. Stiren-divinilbenzen (STR-DVB) polimerinin SEM görüntüsü.....	158
Şekil 3.12.2. Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimerinin SEM görüntüsü .....	159
Şekil 3.13.1. Stiren-divinilbenzen (STR-DVB) kopolimerinin FTIR spektrumu.....	161
Şekil 3.13.2. Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) kopolimerinin FTIR spektrumu.....	163
Şekil 3.13.3. Celite 545 destek maddesinin FTIR spektrumu.....	164
Şekil 3.16.1. TL 100L ve N 388 enzimleriyle sentezlenen biyodizel örneklerinin TLC analiz sonuçları.....	170
Şekil 3.17.1. Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) destek maddesine tutturulan Lipozyme TL-100L enzimi ile sentezlenen biyodizel örneği.....	171

**SİMGELER DİZİNİ**

$\text{Ca}(\text{Ac})_2$	-	Kalsiyum asetat
CNBr	-	Siyanojen bromür
$\text{H}_2\text{S}$	-	Hidrojen Sülfür
$\text{H}_2\text{SO}_4$	-	Sülfürik Asit
$\text{H}_3\text{PO}_4$	-	Fosforik asit
HCl	-	Hidrojen Klorür
k	-	Faktör sayısı
KCN	-	Potasyum Siyanür
KOH	-	Potasyum Hidroksit
m	-	Kombinasyon sayısı
N	-	Deney sayısı
NaOH	-	Sodyum Hidroksit
$\text{NH}_2$	-	Amin
-OH	-	Hidroksil

## GİRİŞ

Günümüzde petrol, doğalgaz ve kömür gibi fosil kökenli enerji kaynaklarının azalması, bunun yanında dünyadaki enerji ihtiyacının hızla artması nedeniyle yenilenebilir enerji kaynaklarının değerlendirilmesine yönelik ilgi giderek artmakta ve bu alandaki çalışmalar önem kazanmaktadır. Yenilenebilir enerji kaynakları içinde biyodizel önemli potansiyele sahiptir. Son yıllarda bitkisel ve hayvansal kaynaklı yağlardan elde edilen, çevreye zarar vermeyen ve yenilenebilir kaynaklardan üretilen biyodizel, petrol kökenli dizel yakıtlara en önemli alternatif enerji kaynağı olmuştur.

Biyodizel bitkisel yada hayvansal kökenli yağlardan elde edilen uzun zincirli yağ asitlerinin metil esterleri olarak tanımlanabilir. Biyodizel yakıtların yenilenebilir, biyoparçalanabilir, zehirsiz ve çevreci olmaları onları daha da önemli hale getirmiştir. Tüm dünyada alternatif enerji kaynaklarına doğru hızlı bir yöneliş söz konusudur. Bunun başlıca nedenleri, küresel ısınma, dünyamızın enerji ihtiyacının yaklaşık %90'ını karşılayan fosil kökenli yakıtlardan petrol rezervlerinin 40, doğalgaz rezervlerinin 62, kömür rezervlerinin ise önümüzdeki 204 yıl içinde tükeneceğinin tahmin edilmesi, fosil kökenli yakıtların çevreyi kirletici etkileri ayrıca alternatif enerji kaynaklarının yeni iş imkanları doğurması ve ülkelerin enerji ihtiyacındaki dışa bağımlılığı azaltmasıdır. Petrol tüketiminin ancak %10'unun yerli üretimle sağlandığı ülkemizde biyodizel mevcut olanaklarla uygulamaya alınabilecek en önemli alternatif enerji seçeneklerinden biridir. Ülkemizde kara taşımacılığının önemli bölümünde ve deniz taşımacılığında dizel motorlu taşıtlar kullanılması ayrıca endüstride dizel yakıt kullanımı her geçen gün hızla artması biyodizel üretimini daha da önemli hale getirmektedir. Biyodizel üretimi ve kullanımının dünya çapında hızla arttığı bir ortamda ülke genelinde biyodizel üretimi ve kullanımının yaygınlaştırılması ile petrol tüketiminde önemli azalma sağlanacak, egzoz gazları ve çevre kirliliğinde belirgin bir düşüş gerçekleşecek ve en önemlisi yeni iş olanaklarının oluşturulması ile ülke ekonomisine katkı sağlanacak ve enerji ihtiyacındaki dışa bağımlılığı azaltacaktır.

Günümüzde biyodizel yakıt ile ilgili en önemli sorun üretim maliyeti olmakla birlikte üretim yönteminden gelen düşük uçuculuk, yüksek viskozite, motorda karbon birikimi ve üründeki safsızlıklar gibi olumsuz yönlerin giderilmesi gerekmektedir. Biyodizel üretiminde dört temel yol mevcuttur. Bunlar; direkt kullanma ve karıştırma,

mikroemülsiyon, termal kraking (Piroliz) ve transesterifikasyon yöntemleridir. Bu yöntemler arasında en yaygın olanı transesterifikasyon metodudur.

Son yıllarda kimyasal proseslerin yüksek enerji maliyeti ve ek gliserin saflaştırma adımları nedeniyle biyodizel üretiminde lipaz enzimlerinin kullanımı önemli hale gelmiştir. Enzimatik transesterifikasyon yönteminde kimyasal katalizör nedeniyle oluşan dezavantajlar lipaz enzimleri kullanılarak büyük ölçüde aşılmıştır. Lipaz enzimi ılımlı reaksiyon koşullarına izin vermekte, ilave işlemler gerekmesizin gliserin geri kazanımı sağlanmakta ve geride kimyasal artık ürün oluşturmamaktadır. Ayrıca enzimli reaksiyon ile alkali sabun oluşmadığı için daha saf esterler oluşmaktadır.

Enzim izolasyonu ve arıtılması oldukça maliyetlidir. Bu nedenle enzimlerin bir destek maddesi üzerine tutturularak kullanılması son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Böylece enzimler tek kullanım yerine defalarca kullanılarak ekonomik açıdan büyük avantaj sağlanmaktadır. Biyodizel üretiminde enzimatik esterleşme reaksiyonlarının destek maddeleri üzerine immobilize edilen lipazlarla yapılması enzimlerden kaynaklanan yüksek üretim maliyetini azaltmakta ve enzimlerin kullanımını yaygınlaştırmaktadır. Bunun yanında immobilize edilmiş enzimlerin kararlılığının artması, ısı, pH ve organik reaktiflere karşı daha dayanıklı hale gelmesi ve aktifliğini daha uzun süre koruyor olması yöntemin avantajlarından birkaçıdır.

Bu çalışmada *Candida antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) ve *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM) immobilize lipazlarının metanol beraberinde kanola yağını transesterleşme reaksiyonu ve reaksiyonda etkili olan parametrelerin kemometrik analiz yöntemleri kullanılarak optimize edilmesi, *Thermomyces lanuginosus 100 L* ve *Novozyme 388* serbest lipaz enzimlerinin farklı destek maddeleri üzerine absorpsiyon ve kovalent bağlama metotları kullanılarak immobilize edilerek tekrar kullanım özelliklerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Bunun yanında enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmak üzere mikro gözenekli polimer destek maddesi sentezlenerek immobilizasyon verimliliği, aktivite ve tekrar kullanım özelliklerinin incelenmesi hedeflenmektedir. Ayrıca endüstriyel alanda uygulanabilir biyodizel üretim düzeneği kurulması amaçlanmaktadır.

## 1. KAYNAK ÖZETLERİ

Günümüzde petrol, doğalgaz ve kömür gibi fosil kökenli enerji kaynaklarının azalması, petrol yakıtlarından kaynaklanan emisyonların çevreye verdiği zararlar bunun yanında dünyadaki enerji ihtiyacının hızla artması nedeniyle yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelik ilgi giderek artmakta ve bu alandaki çalışmalar önem kazanmaktadır. Bitkisel yağların dizel yakıtlarla uygun oranlarda karıştırılarak direkt kullanımı yüksek viskozite, asit korozyonu, polimerleşme ve karbon birikimi gibi problemlerden dolayı uygun değildir. Yenilenebilir enerji kaynakları içinde bitkisel ve hayvansal kaynaklı yağlardan elde edilen, çevreye zarar vermeyen ve yenilenebilir kaynaklardan üretilen biyodizel, petrol kökenli dizel yakıtlara en önemli alternatif enerji kaynağı olmuştur (Fukuda ve ark. 2001). Biyodizelin bitkisel kökenli olması nedeniyle yanması durumunda atmosferdeki net CO<sub>2</sub> seviyesini değiştirmemesi, ılımlı reaksiyon koşullarında üretilmesi, biyoparçalanabilir özellik göstermesi ve çevreci yakıt özellikleri son yıllarda biyodizel üretimine yönelik ilgiyi daha da artırmıştır (Ranganathan ve ark. 2008).

Bitkisel yağlardan biyodizel yakıt üretilmesi amacıyla piroliz, mikro emülsiyon ve transesterifikasyon olmak üzere başlıca üç yöntem kullanılmaktadır (Ma ve Hanna 1999).

Kraking olarak ta bilinen piroliz ısı etkisiyle kompleks yapıların basit bileşenlere dönüşmesi olayıdır. Yöntemde bitkisel yağ viskozitesinin düşmesi ve setan sayısının artması için yüksek ısıda parçalanmaktadır. Parçalanmış ürün alkan, alken ve karboksilik asitlerin karışımını içerir. Soya yağı, pamuk yağı ve kolza yağı ile diğer yağlar uygun katalizör beraberinde biyodizel olarak kullanılmak amacıyla parçalanmışlardır (Ma ve Hanna 1999). Piroliz metodu yakıtın akış özellikleri ve viskozitesindeki azalma nedeniyle avantajlı fakat yüksek maliyet, ayrıntılı fraksiyonlama basamakları ve yakıtın sülfür içermesi nedeniyle dezavantajlıdır (Ranganathan ve ark. 2008).

Mikro emülsiyon bir diğer biyodizel yakıt üretim tekniğidir. Bu yöntemde biyodizel mikro emülsiyonu uygun oranlarda bitkisel yağ, dizel yakıt, alkol, surfaktan ve setan sayısını artırıcı madde içerir. Yöntemde metanol, etanol ve propanol gibi alkoller viskozite düşürücü olarak daha yüksek alkoller ise surfaktan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca alkil nitratlar setan sayısının artması amacıyla karışıma eklenir.

Mikro emülsiyon metodunda düşük viskozite, yüksek setan sayısı ve iyi spreyci özellikleri yöntemin olumlu yönlerini oluştururken özellikle uzun süreli kullanımlarda enjektörde meydana gelen ateşleme problemleri, karbon birikimi ve tamamlanmamış yanma yöntemin olumsuz yönlerini oluşturmaktadır (Ma ve Hanna 1999).

Biyodizel üretiminde en popüler yöntem bitkisel yağların transesterleştirilmesidir. Bu yöntemde biyodizel yakıt yüksek yağ asitlerinin mono alkil ester karışımını içerir. Reaksiyonda yüksek viskoziteye sahip gliserol ayrılarak düşük viskoziteye sahip fosil yakıtı benzer yakıt elde edilir. Transesterleşme metodu alkali katalizör, asit katalizör, biyokatalizör, heterojen katalizör yada süper kritik alkol gibi çeşitli katalizörler kullanılarak yapılabilmektedir (Ma ve Hanna 1999, Fukuda ve ark. 2001). Genel reaksiyon bitkisel yağ ve alkolün katalizör beraberinde yağ asidi alkil esterleri ve gliserin oluşturmaktadır.

Alkali katalizör metodunda sodyum hidroksit (NaOH) yada potasyum hidroksit (KOH) metanol yada etanol beraberinde katalizör olarak kullanılarak bitkisel yağın biyodizel ve gliserin dönüşmesi sağlanır. Reaksiyon sonunda gliserin yoğunluğunun fazla olması nedeniyle dipte toplanır. Yöntem yüksek ester dönüşümü, düşük sıcaklıkta (60°C) gerçekleşmesi, üretim maliyetinin düşük olması ve kısa sürede sonlanması gibi avantajlarının yanında gliserin ayrılmasındaki güçlükler, reaksiyon ortamının serbest asit yada su içermesi durumunda sabunlaşma görülmesi ve ürün saflaştırılmasının zorlaşması gibi dezavantajlara sahiptir. (Ma ve Hanna 1999, Fukuda ve ark. 2001, Barnwal ve Sharma 2005).

Transesterleşme metodu ile biyodizel üretilmesinde kullanılan bir başka yöntem ise asit katalizör kullanılmasıdır. Yöntemde herhangi bir mineral asidi kullanılabilir. Sülfürik ve sülfonik asit metotta sıklıkla kullanılan asitlerdir. Yöntem yüksek oranda ester oluşturmaya rağmen asitlerin korozyon etkileri, motor parçalarının zarar görme ihtimali, ortamda bulunması muhtemel suyun girişim etkisi ve gliserolün ayrılmasındaki güçlükler gibi dezavantajlara sahiptir (Freedman ve ark. 1984).

Biyodizel üretiminde amorf zirkon, titanyum, alüminyum ve potasyum dolgulu zirkonlar gibi heterojen katalizörlerin kullanıldığı transesterleşme metodu da oldukça popüler olmuştur. Araştırmalar halen ilerleme aşamasında olup yöntemde karşılaşılan

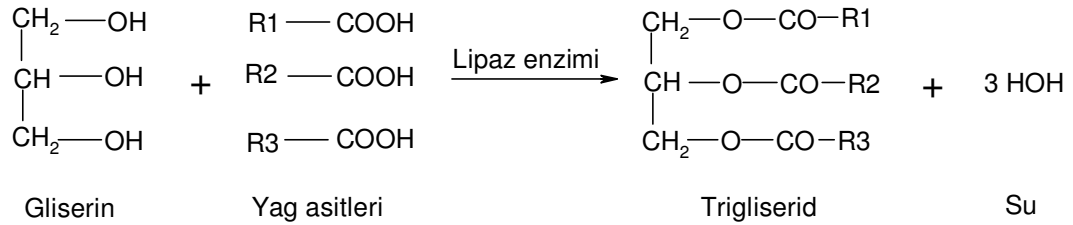


katalizörün tükenmesi ve yüksek ester dönüşümü sağlanamaması gibi problemlerin çözülmesine çalışılmaktadır (Furuta ve ark. 2006).

Transesterleşme prosesi katalizör kullanmadan da yapılabilmektedir. Yöntemde oldukça yüksek reaksiyon sıcaklığına ihtiyaç duyulmaktadır. 350°C nin altındaki sıcaklıklarda oldukça düşük ester dönüşümü gözlenmektedir. Fakat 400°C nin üzerindeki sıcaklıklarda esterlerde ısıl bozulmalar gözlemlendiği rapor edilmiştir (Demirbaş 2006). Son yıllarda alkollerin süper kritik noktada oldukları reaksiyon koşullarında biyodizel üretilmesine yönelik çalışmalar artmaktadır. Yöntemin etkinliği kalsiyum oksidin katalizör olarak kullanılmasıyla artırılabilir (Demirbaş 2006).

Biyodizel üretiminde kullanılan temel hammadde yağlardır. Yağların yapısında bulunan maddeler biyodizel sentezinde önemlidir. Canlılar için en önemli temel ihtiyaç maddelerinden biri olan yağlar C, H ve O gibi atomlardan meydana gelmiş olup çeşitli yağ asitlerinin gliserinle oluşturduğu esterler olarak bilinirler.

Gliserin yağ asitleri ile lipaz enzimi beraberinde Şekil 1.1.' de verildiği gibi trigliserid ve su oluşturur. Yağların %98' ini trigliseridler, %2' lik kısmını ise mono ve digliseridler, serbest yağ asitleri, mumlar, fosfatidler, glikolipitler, yağda çözünen vitaminler ve izopren türevi lipitler oluşturur (Başoğlu 2002).



Şekil 1.1. Gliserin ve yağ asitlerinden trigliserid oluşumu

Yağ moleküllerinde hem apolar hem de polar gruplar bulunmaktadır. Yağlar suda çözünmezler ve sudan düşük yoğunluğa sahiptirler. Bunun yanında yağlar etil alkol, kloroform, heksan ve benzen gibi organik çözücülerde çözünebilirler. Trigliseridler yağların en büyük kısmını oluştururlar. Trigliseridler gliserinin yağ asitleri ile oluşturduğu triesterler olarak tanımlanırlar. Trigliseridlerin yapısında bulunan yağ asitlerinin üçü de birbirinin aynı olabileceği gibi, ikisi aynı biri farklı veya her üçü de farklı olabilir. Doğal trigliseridlerde en sık görülen doymuş yağ asitleri butirik, kaproik, kaprilik, kaprik, miristik, palmitik, stearik ve araşidik asitler, doymamış yağ asitleri ise

palmitoleik, oleik ve linoleik asitlerdir. Yağı oluşturan yağ asitlerinin cinsi, miktarı ve trigliserid molekülündeki yeri o yağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirler. Yağda kısa zincirli veya doymamış yağ asitleri ne kadar çok ise yağın çözünürlüğü o kadar çok, erime noktası o kadar düşüktür. Hayvansal yağlarda ise büyük miktarda stearik, palmitik ve oleik asitleri ihtiva eden trigliseridler bulunur (Tekman ve Öner 1998).

Yağların yapısında bulunan bir diğer bileşen ise mumlardır. Mumlar yağ asitleri ile yüksek molekül ağırlıklı alifatik monoalkollerin teşkil ettiği esterlerdir. Mumların bileşiminde bulunan alkollerin karbon atomları sayısı 14-30 arasındadır. Bazı böceklerin salgısında, hayvan deri ve tüylerinde, bazı bitkilerin yaprak ve meyvalarının koruyucu kabuğunda bulunan mumlar doğada çok yaygındır.

Biyodizel yakıtların içindeki fosforun kaynağı olan fosfotidler her tür yağda az miktarda bulunmaktadır. En fazla soya yağında bulunmakla birlikte yağın rafinasyon işlemi sırasında ortamdaki uzaklaştırılır.

Monosakkarid birimlerini ihtiva eden glikolipidlerin bileşiminde sfingozin, yağ asidi ve bir mono- veya oligosakkarid kalıntısı vardır. Glikolipitlerin yapısında serebrozidler ve ganglozidler olmak üzere alt gruplar vardır. Özellikle beyin ak maddesinde çok miktarda bulunan serebrozidler sfingozin, yağ asidi ve genel olarak bir mol galaktoz ihtiva eder.

Yağların bileşiminde az da olsa yağda çözünen vitaminler (A, D, E ve K) bulunur. Yemelik yağlar içinde daha çok A, D ve E vitaminlerine rastlanırken K vitamini daha çok bitkilerin yeşil kısımlarında yer almaktadır (Başoğlu 2002).

Birde yağların yapısında izoprenidler ve steroidlerden oluşan izopren türevi lipitler bulunurlar. Bu maddeler yağ asitleri ile doğrudan doğruya ilgileri olmadığı halde benzer çözünürlük özellikleri gösterdikleri için lipid sayılırlar. Serbest izopren (2-metil-1,3-butadien)'in şimdiye kadar bitki ve hayvanlarda bulunduğu kanıtlanmadığı halde, karbon iskeletleri izopren türevi olan maddeler doğada çok yaygındırlar (Tekman ve Öner 1998).

Bunların dışında yağların bileşiminde renk maddeleri, yağ alkolleri ve hidrokarbonlar gibi yapılara da rastlanmaktadır. Yağların yapısında bulunan trigliseridler, mono- ve digliseridler, serbest yağ asitleri, fosfolipidler ve mumlar sabunlaşan maddeler, steroller, tokoferoller, renk maddeleri, yağ alkolleri ve hidrokarbonlar ise sabunlaşmayan maddelerdir. Yağlar genel olarak bitkisel kökenli ve

hayvansal kökenli olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Fakat biyodizel yakıtlara hammadde kaynağı olarak yağlar bitkisel, hayvansal ve atık yağlar olmak üzere üçe ayrılmaktadırlar.

### 1.1. Bitkisel Yağlar

Dünyada yaklaşık 250000 bitki türü olduğu bilinmektedir. Bunlardan 4500 adedinin yağları incelenmiş ve incelenen türlerden ancak 100 kadarının ticari açıdan önemli olduğu ve sağlıklı beslenmede kullanılabileceği bulunmuştur. Bunların da sadece 22 tanesinin dünyada ticari olarak geniş bir alanda üretimi yapılmaktadır. Bugün dünyada elde edilen yağın %95'i 12 bitki türünden elde edilmektedir. Ülkemizde tropik yağlık bitkiler (Hindistan cevizi ve palm çekirdeği) dışındaki bütün yağlık bitkiler yetişmektedir (Başoğlu 2002).

Bitkisel yağ kaynakları kendi içinde ikiye ayrılırlar. Bunlar yağlı tohumlardan elde edilen yağlar (Ayçiçeği, çığit, susam, kolza, aspir, soya fasulyesi gibi tohumlardan elde edilen yağlar) ve yağlı meyvelerden elde edilen yağlardır. (Zeytin, badem, fındık, palm meyvesi, hindistan cevizi, ceviz, avokado gibi meyvelerden elde edilen yağlar) Dünyada en fazla üretimi yapılan yağ bitkileri ve yağ oranları Çizelge 1.1.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 1.1.1.** Dünyada en fazla üretim yapılan yağ bitkileri ve yağ içerikleri

Yağ bitkisi	Ortalama yağ oranı (%)
Hindistan cevizi (Kopra)	65-68
Brezilya palmı (Babassa)	60-65
Susam	50-55
Palm meyvesi	45-50
Palm çekirdeği (Palm kernel)	45-50
Amerikan yer fıstığı	45-50
Kolza tohumu	40-45
Ayçiçek tohumu	35-45
Aspir tohumu	30-35
Zeytin (meyvede)	25-30
Pomuk tohumu (Çığit)	18-20
Soya fasulyesi	18-20

**KAYNAK: BAŞOĞLU, F., 2002.** Yemelik Yağ Teknolojisi. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları No: 91, Bursa. s. 64

Başta gıda olmak üzere bir çok alanda kullanılan yağlara ait bazı fiziksel ve kimyasal özellikler Çizelge 1.1.2.'de verilmiştir. Ayrıca bitkisel yağların gerek beslenme değerleri açısından gerekse bitkisel yağın fiziksel özelliklerinin oluşumunda ve yağların sınıflandırılmasında önemli yere sahip olan yağ asitleri bileşimleri Çizelge 1.1.3.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.2.** Dünyada en fazla üretim yapılan yağ bitkileri ve yağ içerikleri

<b>Özellikler</b>	<b>Hindistan Cevizi</b>	<b>Palm Çekirdek Yağı</b>	<b>Pamuk Tohum Yağı</b>	<b>Yer Fıstığı Yağı</b>
<i>Özgül ağırlık</i>	0.917-0.919 (25/15.5°C'de)	0.860-0.873 (99/15.5°C'de)	0.916-0.918 (25/25°C'de)	0.910-0.915 (25/25°C'de)
<i>Refraktif indeks</i>	1.448-1.450 (40°C'de)	1.449-1.452 (40°C'de)	1.446-1.472 (40°C'de)	1.467-1.470 (40°C'de)
<i>İyot sayısı</i>	7.5-10.5	14-22	99-113	84-100
<i>Sabunlaşma sayısı</i>	250-264	245-255	189-198	188-195
<i>Sabunlaşmayan madde%</i>	0.5'den az	0.8'den az	1.5'den az	1.0'den az
<i>Titre (°C)</i>	20-24	24-26	30-37	26-32
<i>Donma noktası (°C)</i>	21.8-23	20-26	-	-
<b>Özellikler</b>	<b>Aspir Yağı</b>	<b>Ayçiçek Yağı</b>	<b>Susam Yağı</b>	<b>Mısır Yağı</b>
<i>Özgül ağırlık</i>	0.919-0.924 (25/25°C'de)	0.915-0.919 (25/25°C'de)	0.914-0.919 (25/25°C'de)	0.915-0.920 (25/25°C'de)
<i>Refraktif indeks</i>	1.472-1.475 (25°C'de)	1.472-1.474 (25°C'de)	1.470-1.474 (25°C'de)	1.470-1.474 (25°C'de)
<i>İyot sayısı</i>	140-150	125-136	103-116	103-128
<i>Sabunlaşma sayısı</i>	186-197	188-194	188-195	187-193
<i>Sabunlaşmayan madde%</i>	1.5'den az	1.5'den az	1.8'den az	2.0'den az
<i>Titre (°C)</i>	-	16-20	20-25	14-20
<i>Donma noktası (°C)</i>	-	-	-	-
<b>Özellikler</b>	<b>Kolza Tohumu Yağı</b>	<b>Keten Tohumu Yağı</b>	<b>Soya Yağı</b>	<b>Zeytin Yağı</b>
<i>Özgül ağırlık</i>	0.906-0.910 (25/25.°C'de)	0.931-0.936 (15/15°C'de)	0.917-0.921 (25/25°C'de)	0.909-0.915 (25/25°C'de)
<i>Refraktif indeks</i>	1.470-1.475 (25/25 °C'de)	1.477-1.482 (25°C'de)	1.470-1.476 (25°C'de)	1.469-1.470 (40°C'de)
<i>İyot sayısı</i>	97-108	165-204	120-140	80-88
<i>Sabunlaşma sayısı</i>	170-180	189-195	188-195	188-196
<i>Sabunlaşmayan madde%</i>	1.5'den az	1.7'den az	1.5'den az	1.8'den az
<i>Titre (°C)</i>	11.5-15	19-21	24	17-26
<i>Donma noktası (°C)</i>	-	-	-	-

**KAYNAK: BAŞOĞLU, F., 2002.** Yemeklik Yağ Teknolojisi.Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları No: 91, Bursa. s. 69

**Çizelge 1.1.3.** Bazı bitkisel yağların içerdiği yağ asitleri ve yüzdeleri

	Doymuş Yağ Asitleri (%)					Tekli Doymamış Yağ Asitleri (%)	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (%)	
	Miristik	Palmitik	Stearik	Araşidik	Erüsik	Oleik	Linoleik	Linolenik
<b>Yağ Çeşidi</b>	<b>14:0</b>	<b>16:0</b>	<b>18:0</b>	<b>20:0</b>	<b>22:0</b>	<b>18:1</b>	<b>18:2</b>	<b>18:3</b>
Soya Yağı	0.1	11	4	0.3	0.1	24	54	7
Fındık Yağı	-	11	2	1	-	48	32	-
Zeytin Yağı	-	13	3	1	0.9	71	10	1
Kanola Yağı	-	4	2	0.6		62	22	10
Mısır Yağı		12	2	0.1	-	25	60	1
Safran Yağı	-	7	2	-		13	78	-
Ayçiçek Yağı	0.1	7	5	0.4		19	68	1

**KAYNAK:** ALLEN, C.A.W, K.C. WATTS, R.G. ACKMAN, M.J. 1999. Pegg. Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition. Fuel 78, p. 1319-1326.

Dünya genelinde üretilen bitkisel yağ türleri ülkelere göre farklılık göstermektedir. ABD’ de en önemli bitkisel yağ soya iken Fransa, Almanya, Polonya ve Avusturya gibi Avrupa ülkelerinde kanola ilk sırayı almaktadır. Rusya, Ukrayna, Arjantin, İspanya ve Türkiye gibi ülkelerde ise ayçiçeği üretiminin ilk sırayı aldığı görülmektedir. Çizelge 1.1.4.’ de 2004-2005 döneminde dünya bitkisel yağ üretim değerleri gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.4.** 2004-2005 Dünya bitkisel yağ üretim değerleri

ÜRÜNLER	ÜRETİM (Ton)
Palm Yağı	33.392.000
Soya Yağı	32.860.000
Kanola Yağı	15.732.000
Ayçiçek Yağı	9.404.000
Pamuk Yağı	5.013.000
Yerfıstığı Yağı	4.453.000
Palm Çek. Yağı	3.948.000
Hindistan cevizi Yağı	3.162.000
Zeytinyağı	3.020.000
Mısır Yağı	2.081.000
Susam Yağı	837.000
Keten Yağı	619.000
Hint Yağı	545.000
<b>TOPLAM</b>	<b>115.066.000</b>

KAYNAK: <http://www.worldoil.com.html>, 2006.

Ülkemizde ise 2004-2005 döneminde toplam bitkisel yağ üretimi 1.061.000 ton olarak gerçekleşmiştir. Bitkisel yağ üretiminde ayçiçek yağı yaklaşık %45,6 ile ilk sırayı alırken, %20,6 ile pamuk çiğidi yağı ikinci sırayı almıştır. Çizelge 1.1.5.' te 2004-2005 döneminde Türkiye bitkisel yağ üretim değerleri gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.5.** 2004-2005 Türkiye bitkisel yağ üretim değerleri

ÜRÜNLER	ÜRETİM (Ton)
Soya Yağı	150.500
Pamuk Yağı	218.200
Ayçiçek Yağı	473.000
Kanola Yağı	9.100
Susam Yağı	24.200
Mısır Yağı	34.300
Zeytin Yağı	152.500
<b>TOPLAM</b>	<b>1.061.800</b>

KAYNAK: <http://www.worldoil.com.html>, 2006.

### 1.1.1. Kanola Yağı

Kolza veya son yıllarda yağ kalitesi yönünden geliştirilmiş ticari ismi ile Kanola bitkisi ülkemizde önemi giderek artan bir bitkidir. Türkiye’de bitkisel yağ açığını kapatmak amacıyla ayçiçeği, soya, yanında kanola tarımının da yaygınlaşması için çalışmalar yapılmaktadır. Ülkemizde rapiska, rapitsa, kolza isimleriyle de bilinen kanola, kışlık ve yazlık olmak üzere iki fizyolojik döneme sahip bir yağ bitkisidir. Kanola çeşitlerinden elde edilen bitkisel yağ besin değeri ve içeriği bakımından zeytinyağı ve yerfıstığı yağının kalitesine yakın olup, dünya kanola üretiminin önemli bir kısmı insan beslenmesinde kullanılmaktadır. Kanola tohumlarında yağ çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspe değerli bir hayvan yemidir. Küspesinde %38-40 protein bulunduğundan soya küspesi ile karıştırılıp hayvan yemi olarak kullanılabilir (Algan, 1990, Shahidi, 1990).

Kanola 23.1 milyon hektar ekim alanı, 36.5 milyon ton üretim ve 158.3 kg/ da verimi ile Dünyada yetiştirilen en önemli yağ bitkilerinden biridir. Dünyada üretim bakımından soya fasulyesi ve çığitten sonra üçüncü sırada yer alırken ekim alanı bakımından beşinci sırada yer almaktadır. En çok üreten ülkelerden ekim alanı bakımından Çin 7.2 milyon ha ile ilk sırayı alırken %20’lik paya sahiptir. Bu ülkeyi sırasıyla Kanada 4.6 (%13), Hindistan 4.4 (%12), Almanya 1.2 (%3) milyon hektar ekim alanı ile takip etmektedir (<http://www.fao.org.>, 2005).

Kanola (*Brassica napus Oleifera* sp.) ülkemize balkanlardan gelen göçmenlerle kolza adı ile 1960 yıllarında getirilmiş ve Trakya’da ekim alanı bulmuştur. Ancak kolza ürününün yağında insan sağlığına zararlı Erusik asit, küspesinde de hayvan sağlığına zararlı Glukosinolat bulunması nedeniyle 1979 yılında ekimi yasaklanmıştır. Kolza’da erusik asit ve glukosinolat ihtiva etmeyen çeşitler araştırmalar sonucu geliştirilmiştir. Bu çeşitler ilk önce Kanada’da ıslah edilmesi nedeniyle kanola adı verilmiştir. Ülkemizde bitkisel yağ açığını kapatmak amacıyla kanola tarımının yaygınlaşması için çalışmalar yapılmaktadır. Kolza bitkisi toprak ve iklim koşulları bakımından fazla seçici olmadığı için ziraati bütün dünyada yapılabilir. Çizelge 1.1.1.1.’de 1999-2003 yılları arasında Dünya ve Türkiye’de kanola tohumu üretim verileri verilmiştir. Kanola bitkisinin kışlık çeşitlerinin ülkemizde uygun iklim koşullarında buğday ile ekim nöbetine girmesi sonucu ekim nöbeti zenginleşebileceği gibi yağ açığının kapatılmasına

da önemli katkısı olacaktır. Bu bitkinin yetişmesi için uygun iklim koşulları Ege, Çukurova, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu'nun pamuk, Marmara bölgesinin Trakya kesiminde ise ayçiçeği ve buğday ekilen alanlarında mevcuttur.

**Çizelge 1.1.1.1.** 1999-2003 yılları arasında Dünya ve Türkiye'de kanola tohumu üretim verileri (bin ton).

Ülkeler	1999	2000	2001	2002	2003
Çin	10.132	11.381	11.332	10.552	11.500
Kanada	8.798	7.205	5.017	4.178	6.669
Hindistan	5.664	5.788	4.187	5.040	3.650
Almanya	4.284	3.586	4.160	3.847	3.640
Fransa	4.391	3.477	2.877	3.317	3.321
İngiltere	1.733	1.157	1.157	1.468	1.837
Polonya	1.132	958	1.063	953	754
Amerika	621	909	908	706	686
Pakistan	363	297	262	259	250
Macaristan	327	179	205	201	70
Meksika	3	14	13	14	14
Japonya	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7
TÜRKİYE	0.330	0.187	0.650	0.200	0.200
TOPLAM	43.172	39.511	35.916	34.000	35.932

**KAYNAK:** <http://www.fao.org.html>, 2006

Kanada ve Avrupa ülkelerinde ıslah edilmiş erüsik asitsiz, yağ ve protein oranı yüksek yeni kolza çeşitleri kanola ismiyle ekilmektedir. Kanola çeşitlerinden elde edilen bitkisel yağ besin değeri ve içeriği bakımından zeytinyağı ve yerfıstığı yağının kalitesine yakın olup, dünya kanola üretiminin önemli bir kısmı insan beslenmesinde kullanılmaktadır (Atakişi 1991).

Kolza yağı, Cruciferae familyasından, Brassica napus ve campestris tohumlarından elde edilen bir yağdır.

Kanola tohumu sifra yakın erüsik asit içeriği ve yüzde 41 yağ içeriği ile ayçiçeğine yakın bir tohumdur. Kolza yağının toplam doymuş yağ asidi içeriği %5.4-9.5 toplam doymamış yağ asidi içeriği ise %90.5-94.2 arasında değişmektedir. Düşük erüsik asitli kolza yağlarının bileşiminde yer alan en önemli yağ asitleri ise oleik ve linoleik asitlerdir. Nötralize edilmiş yüksek erüsik asitli kolza yağının sabunlaşmayan bileşenleri



(%0.8) arasında %0.03 oranındaki triterpenler ve %0.50 ile steroller yer almaktadır (Gümüşkesen 1999).

### 1.1.2. Ayçiçek Yağı

Ayçiçek yağı *Helianthus annuus* bitkisinin tohumlarından elde edilen bir yağdır. Ayçiçeğinin yağ oranı %39 – 45 arasında değişir. Dünyada ayçiçeği ekimi yapılan başlıca ülkeler; Rusya, Ukrayna, Arjantin, Macaristan, Fransa, İspanya, Hindistan ve Türkiye'dir. Çizelge 1.1.2.1.'de 2001-2005 yılları arasında Dünya ve Türkiye'de ayçiçek tohumu üretim verileri gösterilmiştir.

Ülkemizde yağlı tohumlu bitkiler arasında yağ üretimi bakımından %73 oran ile ayçiçek yağı ilk sırayı almaktadır. Ağırlıklı olarak Trakya ve Marmara bölgelerimizde üretilmekte olup üretimin %30.8'ini Tekirdağ, %20.1'ini Edirne ve %11.2'sini ise Kırklareli karşılamaktadır. (Onurlubaş, 2006)

**Çizelge 1.1.2.1.** 2001-2005 yılları arasında Dünya ve Türkiye'de ayçiçek tohumu üretim verileri (bin ton).

Ülkeler	2001	2002	2003	2004	2005
Rusya	3915	2670	3685	4850	4750
AB-25	3980	3836	3713	4035	4181
Diğerler Ülkeler	2012	2095	2554	3000	3081
Arjantin	3050	3844	3700	3240	3600
Ukrayna	3457	2251	3270	4252	3050
Hindistan	1250	1450	1625	1700	1750
Çin	1954	1478	1946	1743	1690
Romanya	717	744	890	1400	1425
ABD	1608	1551	1112	1209	929
Güney Afrika	664	930	642	651	665
TÜRKİYE	575	520	820	600	650
TOPLAM	23182	21369	23957	26680	25771

**KAYNAK:** ANONİM. USDA-FAS, Oilseed: World Market and Trade, 2007.

Ayçiçek yağı %15 doymuş, %85 doymamış yağ asidi içermekte, doymamış yağ asitlerinin %14-43'ünü oleik asit, %44-75'ini linoleik, en fazla %0.7'sini de linolenik asit oluşturmaktadır. Yağın %0.025–0.31 hidrokarbonlar, %0.542–0.584 steroller, %0.008–0.044 vakslar olmak üzere sabunlaşmayan maddeleri içermektedir. Toplam tokoferol içeriği ise yaklaşık 640 mg/kg yağ olup, tokoferollerin %96'sını a-tokoferol oluşturmaktadır. Sıvı olarak ve margarin hammaddesi katı yağ üretiminde yaygın kullanım alanı bulan ayçiçek yağı açık sarı renkli, rafine edilerek kullanılabilen bir yağdır. Ayçiçek yağı üretiminde çözgen ekstraksiyonu işleminden sonra elde edilen yağsız küspe yan ürün olarak hayvan yemi üretiminde kullanılmaktadır. Yüksek protein içeriği nedeniyle ayçiçeği küspesi oldukça değerli bir yan üründür (Gümüskesen 1999).

### 1.1.3. Soya Yağı

Soya yağı, Leguminosae familyasından *Glycine max* türlerinin tohumlarından elde edilir. Soya tarımının yaygın olarak yapıldığı başlıca ülkeler Amerika, Brezilya, Arjantin, Çin ve Japonya'dır. Çizelge 1.1.3.1.'de 2001-2005 yılları arasında Dünya genelinde soya tohumu üretim verileri gösterilmiştir.

Soya yağının ülkemizde ayçiçeği yağının liderliğinin sürdüğü sıvı yağ pazarı içindeki payı ise çok düşük seviyededir. Soya tohumunun protein içeriği (%40) yüksek olan küspesi için ekimi yapılan soya tohumunda %18–20 oranında yağ bulunmaktadır. Yağ içeriği düşük olmasına rağmen üretiminin fazla olması nedeniyle dünya yağ ihtiyacının karşılanmasında önemli payı vardır.

Soya yağı %4–11 linolenik, %44–62 linoleik asit içeriği ile linolenik grubu yağlar arasında yer almaktadır. Soya yağının toplam doymuş yağ asidi içeriği ise %9–20 arasında değişmektedir. Soya yağı triterpenler, steroller ve tokoferoller gibi yağın sabunlaşmayan bileşenlerini değişik oranlarda içermektedir. Nötr soya yağının %0.06 triterpenleri ve %0.42 sterolleri içerdiği, rafine soya yağının toplam tokoferol içeriğinin ise 600–1000 mg/kg yağ olduğu belirtilmektedir.

**Çizelge 1.1.3.1.** 2001-2005 yılları arasında Dünya ve Türkiye'de soya tohumu üretim verileri (bin ton).

Ülkeler	2001	2002	2003	2004	2005
ABD	75055	78672	75010	66778	85484
Brazilya	39500	43500	52000	50500	51000
Arjantin	27800	30000	35500	33000	39000
Çin	15400	15400	16510	15304	18000
Hindistan	5250	5400	4000	6800	5500
Diğer ülkeler	3088	3156	3436	3915	4388
Paraguay	3502	3547	4500	3911	3800
Canada	2703	1635	2336	2263	3050
Bolivya	1030	1240	1650	1850	2030
Endonezya	1020	870	780	820	825
AB-25	1188	1309	888	633	793
Rusya	342	350	423	393	450
TOPLAM	175878	185080	197033	186257	214320

**KAYNAK:** ANONİM. USDA-FAS, Oilseed: World Market and Trade, 2007.

#### 1.1.4. Palm Yağı

Palm yağı, *Elaeis guineensis* olarak bilinen, Malezya, Batı ve Orta Afrika ile Endonezya'da ekimi yaygın olarak yapılan yağlı meyvenin pulp kısmından (yağ oranı % 50) elde edilen bir yağdır. Meyvenin çekirdeğinden elde edilen ve laurik asit (%40–52) içeriği yüksek olan yağ ise palm çekirdeği yağı olarak bilinmektedir. Çizelge 1.1.4.1.'de 2001-2005 yılları arasında Dünya genelinde palm tohumu üretim verileri gösterilmiştir.

Palm meyvesi özellikle hasat ve işleme sırasında kuvvetli enzimatik hidroliz reaksiyonlarına maruz kaldığı için bazı durumlarda palm yağının serbest yağ asidi içeriği %50'ye kadar yükselebilmektedir. İyi kaliteli meyvelerden elde edilen palm yağının bile serbest yağ asidi içeriği diğer bitkisel kaynaklı yağlardan daha yüksektir. Palm yağı %38–52 oleik, %5–11 linoleik asit içeriği ile oleik-linoleik grubu yağlar arasında yer almaktadır. Palm yağının doymuş yağ asitlerinden palmitik asit içeriği ise %32–45 arasında değişmektedir. Yarı katı haldeki palm yağında doymamış yağ asitlerinin %85'den fazlası gliserol molekülünün 2-pozisyonunda yer almaktadır.

**Çizelge 1.1.4.1.** 2001-2005 yılları arasında Dünya ve Türkiye'de palm tohumu üretim verileri (bin ton).

Ülkeler	2001	2002	2003	2004	2005
Malezya	11973	11858	13180	13420	15200
Endonezya	8300	9200	9800	10600	11600
Diğer Ülkeler	2188	2319	2354	2522	2472
Nijerya	730	760	770	780	790
Tayland	580	780	640	840	760
Kolombiya	560	518	540	614	653
Dünya Toplamı	24295	25435	27284	28776	31575

**KAYNAK:** ANONİM. USDA-FAS, Oilseed: World Market and Trade, 2007.

Trigliserid yapısı ve serbest yağ asidi içeriği ise palm yağının erime ve plastik özelliklerini etkilemektedir. Palm yağının %0.2–1.0 arasında değişen sabunlaşmayan maddelerinin %0.03–0.15'ini karotenoidler, %0.003–0.11'ini tokoferoller, %0.03-0.10'unu steroller, %0.05–0.10'unu fosfatidler, %0.08'ini alkoller oluşturmaktadır.

### 1.1.5. Pamuk Yağı

Pamuk yağı; *Gossypium hirsutum* (Amerikan) veya *Gossypium barbadense* (Mısır) tohumlarından elde edilen, karakteristik tadı ve kokusu olan, oldukça koyu renkli (kırmızı-kahverengi) bir yağdır.

Ülkemizde pamuk yağı genellikle margarin hammaddesi katı yağ üretiminde kullanılmaktadır. Pamuk yağı %13–44 oleik ve %33–58 linoleik asit içerdiği için oleik-linoleik asit grubu yağlar arasında yer almaktadır. En önemli doymuş yağ asidi ise % 17–29 oranındaki palmitik asittir. Çizelge 1.1.5.1.'de 2001-2005 yılları arasında Dünya genelinde palm tohumu üretim verileri gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.5.1.** 2001-2005 yılları arasında Dünya ve Türkiye'de pamuk tohumu üretim verileri (bin ton).

Ülkeler	2001	2002	2003	2004	2005
Çin	900	1116	1010	1024	1284
Hindistan	530	550	488	619	822
Diğer ülkeler	600	642	605	656	762
Pakistan	305	308	289	281	421
ABD	384	398	329	398	406
Brazilya	208	172	204	208	301
Özbekistan	210	228	210	203	277
Türkiye	194	208	218	220	228
AB-25	82	92	72	72	86
Meksika	78	70	55	59	80
Avustralya	50	75	50	39	75
Dünya Toplamı	3541	3859	3530	3867	4742

**KAYNAK:** ANONİM. USDA-FAS, Oilseed: World Market and Trade, 2007.

Bitkisel kaynaklı yağların sabunlaşmayan maddeleri arasında yer alan en önemli bileşen, antioksidan etkisi nedeniyle tokoferollerdir. Ham pamuk yağı doğal tokoferollerce oldukça zengin bir yağdır. Ancak doğal tokoferoller rafinasyon işlemi sırasında tahrip oldukları için ham pamuk yağının, rafine pamuk yağı ile karşılaştırıldığında oksidasyon stabilitesi daha yüksektir. Ham pamuk yağı toplam % 0.110 oranında tokoferol içerirken, rafine pamuk yağı %0.087–0.095 oranında tokoferol içermektedir. Ham pamuk yağındaki toplam tokoferollerin %0.076'sı a-tokoferol, % 0.034'ü ise y-tokoferoldür. 300 mg/kg oranında a-tokoferol içeren rafine pamuk yağının 97°C sıcaklıktaki indüksiyon periyodu 3 saat olarak belirtilmektedir. Yağın sabunlaşmayan bileşenlerinden sterollerin ham pamuk yağındaki miktarı 0.574 mg/100 mg yağ olarak belirtilmektedir. Bu miktar rafinasyon işlemi ile 0.397 mg/100 mg yağ değerine düşürülmektedir.

### 1.1.6. Yağ Asitleri

Genel olarak çift karbon sayılı, -cis konfigürasyonunda, dallanmamış ve düz zincirli monokarboksilik asitler yağ asitleri olarak adlandırılır. Birkaç yağ asidi ise hidroksi, keto, metil vb. gruplar ihtiva ederler. Halka ihtiva eden yağ asitleri de vardır. Bilinen yağ asitlerindeki karbon atomlarının sayısı 4-34 arasında değişmektedir. Yağ asidi molekülünde karbon sayısı 6 dan az ise “kısa”, 6-10 arasında ise “orta” ve 12 ile daha fazla ise “uzun zincirli” yağ asidi olarak sınıflandırılabilir (Tekman ve Öner 1998).

Yağların hem fiziksel hem de kimyasal özellikleri içerdikleri yağ asitlerinin yapısına bağlıdır. Bitkisel ve hayvansal yağlarda en çok bulunan yağ asitleri ve bunların bazı özellikleri Çizelge 1.1.6.1.’de gösterilmiştir. Yağ asitleri, doymuş yağ asitleri, doymamış yağ asitleri, hidroksi yağ asitleri ve karboksilik yağ asitleri olmak üzere dört grupta incelenebilir.

**Çizelge 1.1.6.1.** Bitkisel ve hayvansal yağlarda en çok bulunan yağ asitleri ve özellikleri

Yağ Asiti	C atomu sayısı	$E_n / K_n$ noktası(°C)	Viskozite (mPa s)	Başlıca Kaynakları
<b>a) Doymuş (sature) yağ asitleri</b>				
Butiric (Butanoic)	4	Sıvı (-8.0)	-	Süt
Caproic (Hexanoic)	6	Sıvı (-3.4)	-	Süt
Caprilic (Octanoic)	8	16.7	0.99	Süt, hindistan cevizi (kopra)
Capric (Decanoic)	10	31.6	1.40	Süt, hindistan cevizi
Lauric (Dodecanoic)	12	44.2	1.95	Hindistan cevizi, Brezilya palmyesi (babassu) ve palm çekirdeği
Myristic (Tetradecanoic)	14	54.4	2.69	H. cevizi, tereyağı ve balık yağı
Palmitic (Hekzadecanoic)	16	62.9	3.60	Palm (meyve), çığıt ve hayvansal yağlar
<i>Margaric</i>	17	61.3	-	Domuz yağı ( <i>Lard</i> )
Stearic (Octadecanoic)	18	69.6	4.74	Ayçiçeği, aspir, susam, palm (meyve), kabak çek. ve hayvansal yağlar
Arachidic (Eikosanoic)	20	75.4	-	Yerfıstığı yağı
Behenic (Docosanoic)	22	80.0	-	Yerfıstığı yağı
Lignoceric (Tetracosanoic)	24	84.2	-	Kolza (kanola), yerfıstığı, balmumu
Serotik (Hekzacosanoic)	26	87.7	-	Balmumu
<b>b) Doymamış (unsature) yağ asitleri</b>				
Kaproleic ( <i>Decenoic</i> )	10:1	-	-	Süt
Lauroleic ( <i>Dodecenoic</i> )	12:1	-	-	Süt
Myristoleic (Tetradecenoic)	14:1	-4.0	-	Süt, balık yağları
Palmitoleic (Hexadecenoic)	16:1	0.5	-	Bazı balık yağları, zeytin, süt
Margaroleic	17:1	57.5	-	Domuz yağı ( <i>lard</i> )
Oleic (cis-9, oktadecenoic)	18:1	16.3	3.73	Zeytin, aspir, ayçiçeği, haşhaş, soya, çığıt, mısır
Petroselenic (cis-6, oktadecenoic)	18:1n-9	33.0	-	Maydanöz tohumu yağı
Elaidic (trans-9, oktadecenoic)	18:1	43.7	-	Süt
Vaccenic ( <i>trans-11</i> , oktadecenoic)	18:1	44.0	-	Süt
Ricinoleic ( <i>12-hydroxy-9-oktadecenoic</i> )	18:1	-10.0	-	Hintyağı <sup>1</sup>
Linoleic (cis, cis-9, 12)	18:2n-6	-7.0	3.05	Aspir, ayçiçeği, haşhaş, bitkisel yağlar
Octodecadienoic	18:2n-9	-	-	-
$\alpha$ -Linolenic (cis,cis,cis-9, 12, 15) DGLA	18:3n-3	-13.0	2.65	Keten, ceviz, kanola, kenevir
$\gamma$ -Linolenic (cis, cis, cis-6, 9, 12)	18:3n-6	48.0	-	Hayvansal yağlar
$\alpha$ -Eleostearic (cis, trans, trans-9, 11, 13)	18:3	-	-	Tung yağı <sup>2</sup> , nadir bazı bitkisel yağlar
$\beta$ -Eleostearic (trans,trans,trans-9,11,13)	18:3	71.0	-	A izomerlerinin izomerizasyonu
Octodecatetraenoic	18:4n-3	-	-	-
Gadoleic (9, Eicocenoic)	20:1	-	-	Bazı balık yağları, yerfıstığı, kanola
Eicosadienoic	20:2n-9	-	-	Domuz yağı
Eicosatrienoic	20:3n-9	-	-	-
Dihomo- $\gamma$ -linolenic	20:3n-6	-	-	-
Arachidonic (5,8,11,14)	20:4n-6	-49.5	-	Domuz yağı
Eicosapentaenoic (5,8,11,14,17) EPA	20:5n-3	-	-	Bazı balık yağları
Erucic (cis-13) (Docosenoic)	22:1	33.5	5.91	Crambe, kolza
Docosantrienoic	22:3n-9	-	-	Domuz yağı
Docosatetraenoic	22:4n-6	-	-	-
Docosapentaenoic	22:5n-3	-	-	-
Docosapentaenoic	22:5n-6	-	-	-
Docosaheksaenoic(4,7,10,13,16,19)DHA	22:6n-3	-	-	Bazı balık yağları
Tetracosenoic	24:1	-	-	Kolza, hardal

( $E_n$ : Yağ asitlerinin erime derecesi;  $K_n$ : Yağ asitlerinin katılma derecesi)

**KAYNAK: DİZGE, N. 2005.** Bitkisel yağ ve atıklarından yeni mikro poroz polimerik enzim reaktörleri ile biyodizel üretimi. 171 s.

### 1.1.6.1. Doymuş Yağ Asitleri

Karbon atomları arasında çift bağ içermeyen uzun zincirli yağ asitleridir. Moleküllerindeki karbon sayıları 4 den 26 ya kadar olan doymuş yağ asitleri hem bitkisel hem de hayvansal yağlarda, karbon sayısı 34 e kadar olan uzun zincirli yağ asitleri ise mumlarda bulunur. Hayvansal ve bitkisel yağlarda en çok bulunan başlıca doymuş yağ asitleri Çizelge 1.1.6.1.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 1.1.6.1.1.** Hayvansal ve bitkisel yağlarda en çok bulunan başlıca doymuş yağ asitleri

Yağ asidi	Kapalı Formül	Açık Formül
<b>Bütirik Asit</b>	$C_4H_8O_2$	$CH_3 (CH_2)_2 COOH$
<b>Kaproik Asit</b>	$C_6H_{12}O_2$	$CH_3 (CH_2)_4 COOH$
<b>Kaprilik Asit</b>	$C_8H_{16}O_2$	$CH_3 (CH_2)_6 COOH$
<b>Kaprik Asit</b>	$C_{10}H_{20}O_2$	$CH_3 (CH_2)_8 COOH$
<b>Laurik Asit</b>	$C_{12}H_{24}O_2$	$CH_3 (CH_2)_{10} COOH$
<b>Miristik Asit</b>	$C_{14}H_{28}O_2$	$CH_3 (CH_2)_{12} COOH$
<b>Palmitik Asit</b>	$C_{16}H_{32}O_2$	$CH_3 (CH_2)_{14} COOH$
<b>Stearik Asit</b>	$C_{18}H_{36}O_2$	$CH_3 (CH_2)_{16} COOH$
<b>Araşidik Asit</b>	$C_{20}H_{40}O_2$	$CH_3 (CH_2)_{18} COOH$
<b>Behenik Asit</b>	$C_{22}H_{44}O_2$	$CH_3 (CH_2)_{20} COOH$
<b>Lignoserik Asit</b>	$C_{24}H_{48}O_2$	$CH_3 (CH_2)_{22} COOH$
<b>Serotik Asit</b>	$C_{26}H_{52}O_2$	$CH_3 (CH_2)_{24} COOH$
<b>Montanik Asit</b>	$C_{28}H_{56}O_2$	$CH_3 (CH_2)_{26} COOH$

### 1.1.6.2. Doymamış Yağ Asitleri

Molekülünde bir veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerine doymamış yağ asitleri denir. Doğada bulunan doymamış yağ asitlerinde 1-6 kadar çift bağ vardır. Doğada en yaygın bulunan doymamış yağ asidi olan oleik asit tek çift bağ içerir (Tekman ve Öner 1998). Doymamış yağ asitleri kolaylıkla okside olabilirler. Özellikle



çift bağ sayısının artması oksidasyonu kolaylaştırmaktadır. Hayvansal ve bitkisel yağlarda en çok bulunan başlıca doymamış yağ asitleri Çizelge 1.1.6.2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 1.1.6.2.1.** Hayvansal ve bitkisel yağlarda en çok bulunan başlıca doymamış yağ asitleri

Yağ asidi	Kapalı Formül	Açık Formül
Palmitoleik Asit	$C_{16}H_{30}O_2$	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$
Oleik Asit	$C_{18}H_{34}O_2$	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$
Linoleik Asit	$C_{18}H_{32}O_2$	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
alfa -Linolenik Asit	$C_{18}H_{30}O_2$	$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
Araşidonik Asit	$C_{20}H_{32}O_2$	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_3COOH$

### 1.1.6.3. Hidroksi Yağ Asitleri

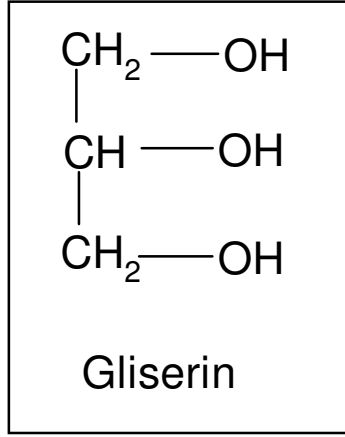
Hidrokarbon zincirindeki hidrojenlerden biri veya birkaçı yerine –OH grubu geçmiş, doymuş veya doymamış yağ asitleridir. Başlıca doymuş hidroksi yağ asitleri dihidroksistearik asit ve serebronik asit, doymamış yağ asitleri ise, risinoleik asit ve hidroksinervonik asittir. Dihidroksistearik asit ve risinoleik asit en çok hintyağında bulunurken serebronik asit ve hidroksinervonik asitler ise en fazla beyin glikolipitlerinde bulunur.

### 1.1.6.4. Karboksilik Yağ Asitleri

Başlıca karboksilik yağ asitleri hidnokarpik asit ve şolmorik asit olup şolmogra yağında bulunmaktadır. Benzer şekilde prostaglandinler olarak bilinen bir grup bileşik hormonlara benzer etki gösterirler ve karboksilik yağ asitleri türevleri olarak bilinirler. Bu yapılar organizmada 20 karbon atomlu ve üç, dört veya beş çift bağ içeren bazı doymamış yağ asitlerinden sentezlenirler. (Tekman ve Öner 1998).

### 1.1.7. Gliserin

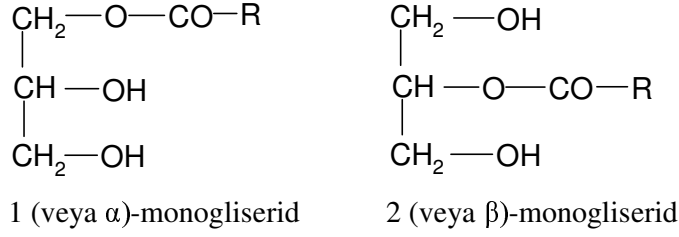
Gliserin kimyasal bileşimi  $C_3H_5(OH)_3$  olan, oda sıcaklığında koyu kıvamlı görünüşte, hafifçe tatlı viskoz sıvıdır. Gliserin her biri farklı bir karbon atomuna bağlı üç hidroksil grubu (-OH) içerdiğinden dolayı üç değerli bir alkoldür. Su ve etil alkolde her oranda karışabilir. Gliserin  $18^\circ C$ ' de erirken  $290^\circ C$ ' de kaynar. Biyodizel yakıt üretiminde yan ürün olarak elde edilir. Çok geniş kullanım alanına sahip olan gliserin 1500'den fazla üründe bulunur. Gliserin başlıca gıda, kozmetik, ilaç, lastik, tekstil ve antifriz endüstrisinde kullanılmaktadır. Gliserinin açık formülü Şekil 1.1.7.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1.7.1. Gliserinin açık formülü

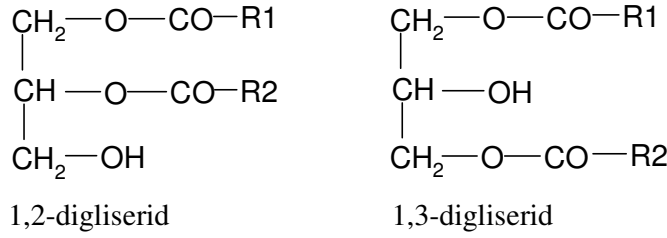
### 1.1.8. Gliseridler

Gliseridler gliserinin yağ asitleri ile oluşturduğu esterlerdir. Gliserin yapısında üç hidroksil içerdiğinden monogliserid, digliserid ve trigliserid olmak üzere üç farklı gliserid verebilir. Gliserin molekülünün bir alkol grubu bir yağ asidi ile esterleşirse monogliserid (monoaçilgliserol) meydana gelir. Yağ asidi molekülünün gliserinin uçlarındaki yada ortasındaki karbona bağlanmasına göre iki farklı monogliserid oluşabilir. Şekil 1.1.8.1.'de  $\alpha$  ve  $\beta$  monogliserid formülleri gösterilmiştir.



**Şekil 1.1.8.1.**  $\alpha$  ve  $\beta$  monogliserid formülleri

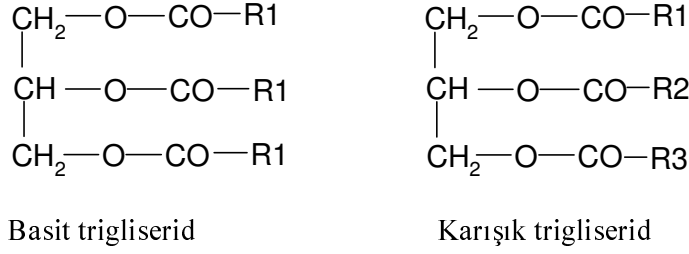
Gliserin molekülünün iki alkol grubu ile iki yağ asidi esterleşirse digliserid (diaçilgliserol) meydana gelir. Yağ asidi molekülünün gliserinin karbonlarına bağlanmasına göre iki farklı digliserid meydana gelir. Şekil 1.1.8.2.'de 1,2-digliserid ve 1,3-digliserid formülleri gösterilmiştir.



**Şekil 1.1.8.2.** 1,2-digliserid ve 1,3-digliserid formülleri

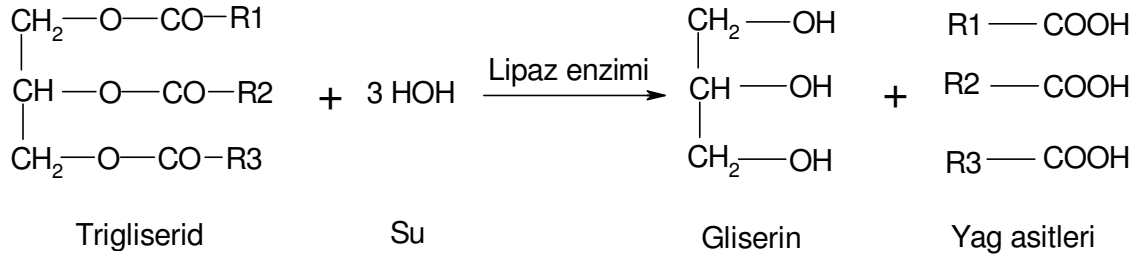
Gliserin molekülünün üç alkol grubu üç yağ asidi ile esterleşirse trigliserid (triaçilgliserol) oluşur. Triaçilgliseroller hayvansal ve bitkisel yağların en büyük kısmını oluşturur. Besin maddelerinde ve organizmada oldukça büyük miktarda bulunurlar. Trigliseridlerde gliserin ile esterleşen yağ asitlerinin üçü de aynı ise basit trigliserid olarak adlandırılır. Trigliseridlerde gliserin ile esterleşen yağ asitleri aynı değilse oluşan trigliserid karışık trigliserid olarak adlandırılır. Şekil 1.1.8.3.'de basit ve karışık trigliseridler gösterilmiştir.

Trigliseridlerin erime noktalarını yapılarını oluşturan yağ asidi komponentleri belirler. Genellikle doymuş yağ asitlerinin miktarı ve zincir uzunluğu arttıkça trigliseridlerin erime noktaları yükselir. Örneğin tripalmitin, tristearin gibi doymuş yağ asitlerinin triaçilgliserolleri vücut sıcaklığında katıyken doymamış yağ asitlerinden oluşan triolein veya trilinolein ise sıvıdır.

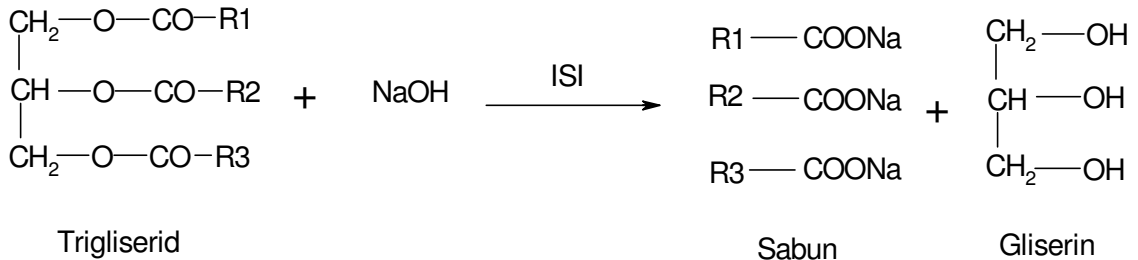


**Şekil 1.1.8.3.** Basit ve karışık trigliserid formülleri

Trigliseridler yüksek basınç altında su ile, normal basınç altında asitlerle kaynatılarak yada lipaz gibi belirli enzimlerin katalitik etkisiyle hidroliz olurlar. Hidroliz sonucu üç molekül yağ asidi bir molekül gliserin oluşur. Şekil 1.1.8.4.'de trigliserid molekülünün lipaz beraberinde hidrolizi sonucu gliserin ve yağ asitlerine parçalanma reaksiyonu verilmiştir. Ayrıca trigliseridler kuvvetli bazlarla kaynatılırlarsa sabun ve gliserine ayrılırlar. Şekil 1.1.8.5.'de trigliserid molekülünün sabunlaşma reaksiyonu görülmektedir.



**Şekil 1.1.8.4.** Trigliserid molekülünün hidroliz reaksiyonu



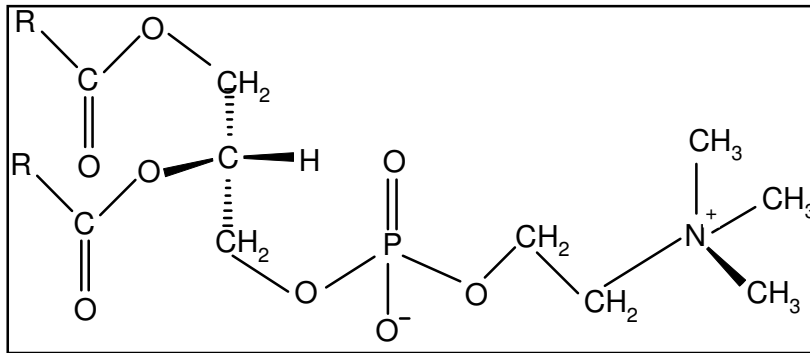
**Şekil 1.1.8.5.** Trigliserid molekülünün sabunlaşma reaksiyonu

### 1.1.9. Yağların Diğer Bileşenleri

Yağların yapısındaki bileşenler hem yağın sahip olduğu özellikler hemde yağdan elde edilen biyodizel yakıt özellikleri açısından son derece önemlidir. Bitkisel yada hayvansal kaynaklı yağlar yağ asitleri, gliserin ve gliseridler dışında bir çok farklı bileşen içermektedirler. Bu bileşenler fosfolipidler, sfingolipidler, yağ alkoller, steroller, hidrokarbonlar, renk maddeleri, yağda çözünen vitaminler, antioksidanlar, tat ve koku maddeleri ve vitaminlerdir.

#### 1.1.9.1. Fosfolipidler

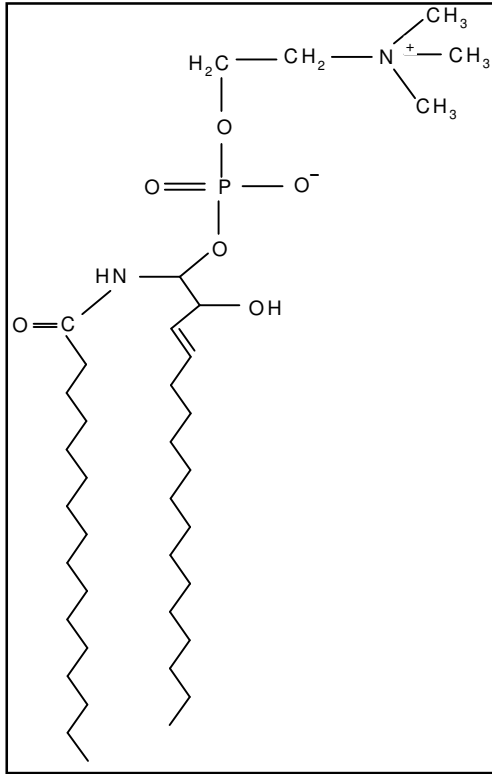
Fosfolipidler her yağda az miktarda da olsa bulunan bir bileşendir. Gliserolün iki yağ asidi ve bir fosforik asit esteri ile oluşturduğu bir kompleks yapıya sahiptirler (Türkey 2006). En fazla soya yağında bulunmaktadır. Yağın rafinasyonu işlemi ile ortamdan uzaklaştırılabilir (Başoğlu 2002). Fosfolipidler vücutta karbonhidrat ve protein taşınmasında görev alırlar. Azot ve fosfor içermeleri nedeniyle enerji metabolizmasında önemli fonksiyona sahiptirler. Kimyasal açıdan ele alındığında gliserin molekülünün  $\alpha$  pozisyonuna doymuş yağ asidi,  $\beta$  pozisyonuna doymamış yağ asidi ve  $\gamma$  pozisyonuna ise fosforik asit, kolin, kolamin ve serin esterleri gelmektedir. Bu grupta çok farklı maddeler bulunmaktadır. Şekil 1.1.9.1.1.' de bir diğer adı lesitin olan fosfatidil kolin fosfolipidlere örnek olarak verilmiştir.



Şekil 1.1.9.1.1. Diğer adı lesitin olan fosfatidil kolin molekülü

### 1.1.9.2. Sfingolipidler

Genelde hayvansal kaynaklı yağlarda bulunmakla birlikte soya yağı gibi bazı bitkisel yağlarda da mevcuttur. Bitkisel yağlarda bulunan türü fitosfingolid olarak adlandırılmaktadır. Sfingolipidler yağların rafinasyonu sırasında yağdan yapışkan maddelerin alınması esnasında ortamdan alınırlar. Sfingolipidlerin yapı taşı olan sfingosin 18 karbonlu, doymamış yapıya sahip, hidroksil ve amin grupları içeren bir hidrokarbondur (Başoğlu 2002). Şekil 1.1.9.2.1.'de sfingomiyelinin molekülünün açık yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.1.9.2.1. Sfingomiyelinin molekülünün açık yapısı

### 1.1.9.3. Yağ Alkolleri

Biyolojik açıdan önemli maddelerdir. Yağlarda serbest halde ve yağ asitleri ile esterleşmiş halde (Vaks) bulunabilirler. Hayvansal ve bitkisel yağlarda çok az miktarda bulunurlar. Yağların sabunlaşmayan kısmını oluştururlar. Yağ alkolleri yüksek molekül ağırlıklı maddelerdir. Yağ asitleri ile birleşerek esterleri meydana getirirler. Doğadaki

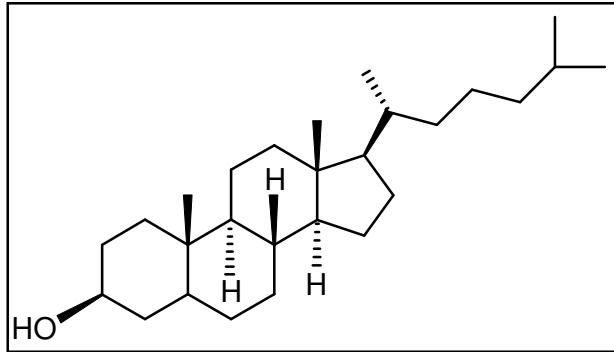
tüm bitkilerin yaprak, tohum kabukları ve meyvelerin üzerleri bu esterlerle (mumlar) kaplanmış haldedir. Çizelge 1.1.9.3.1.'de yağ alkollerinden bazıları verilmiştir.

**Çizelge 1.1.9.3.1.** Bazı yağ alkollerini

Yağ alkolünün adı	Kapalı formülü	Donma noktası (°C)
Setilalkol	$C_{16}H_{33}OH$	50
Stearilalkol	$C_{18}H_{37}OH$	58
Oleylalkol	$C_{18}H_{35}OH$	2
Miristil alkol	$C_{30}H_{61}OH$	86

#### 1.1.9.4. Steroller

Steroller steroid alkoller olup hem hayvansal hem de bitkisel yağlarda bulunurlar. Steroller steran halkası içerirler. Yağlarda serbest halde ve yağ asitleri ile esterleşmiş halde bulunabilirler. Hayvansal kaynaklı yağlarda bulunan steroller zoosteroller olarak adlandırılır. Bu grubun önemli temsilcileri kolesterol, kaprosterol ve allosteroldür. Bitkisel yağlarda bulunan sterollere fitosteroller olarak bilinirler. En önemli üyeleri sitosterol, stigmasterol ve brassikasteroldür. Mikosteroller olarak bilinen grup ise küçük yapılı bitki ve küflerin lipitlerinde bulunurlar. Ergosterol ve fuleosterol bu gruba örnek olarak verilebilir. Şekil 1.1.9.4.1.'de kolesterol molekülünün açık yapısı gösterilmiştir.



**Şekil 1.1.9.4.1.** Kolesterol molekülünün açık yapısı

### 1.1.9.5. Hidrokarbonlar

Hidrokarbonlar yağların sabunlaşmayan kısmında bulunurlar. Genellikle tek sayıda karbon atomu içerirler ve zincir yapıları dallanma gösterir. Yağların rafinasyonu sırasında ortamdaki uzaklaştırılırlar. Yağların yapısında bulunan önemli hidrokarbonlar skualen ( $C_{30}H_{50}$ ), pristan ( $C_{18}H_{38}$ ), gadusen ( $C_{18}H_{32}$ ) ve hipojen ( $C_{15}H_{30}$ )'dir.

### 1.1.9.6. Renk Maddeleri

Lipokromlar olarak bilinen renk maddeleri yağların yapısında serbest veya ester halinde bulunabilirler. Yağların yapısında bulunan renk maddeleri genelde karotinoidlerden oluşur. Karotinoidler yağlarda çözünen hidrokarbonlar veya alkoller olup çok sayıda konjuge bağ içerirler. Karotinoidler havanın oksijeni ile oksidasyona uğrayarak epoksit veya diğer oksidasyon ürünlerine parçalanırlar. Tüm karotinoidler ışığa karşı çok hassastır ve içerdikleri konjuge bağlar hidrojenle doyurulduğunda renksiz bileşenlere dönüşürler. Çizelge 1.1.9.6.1.'de karotinoidlerden bazıları gösterilmiştir.

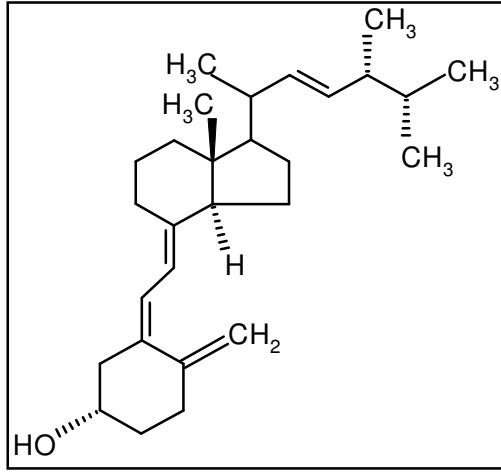
**Çizelge 1.1.9.6.1.** Bazı karotinoidler ve kapalı formülleri

Karotinoid Adı	Kapalı Formülü
Karoten	$C_{40}H_{55}$
Likopen	$C_{40}H_{56}$
Ksantofil	$C_{40}H_{56}O_2$
Biksin	$C_{25}H_{29}O_4$
Krosetin	$C_{20}H_{24}O_4$
Azafrin	$C_{27}H_{28}O_4$

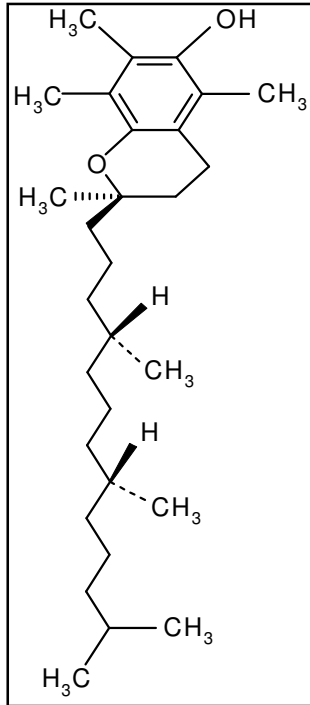


### 1.1.9.7. Yağda Çözünen Vitaminler

Yağda çözünen vitaminler A, D, E ve K vitaminleridir. Yemeklik yağlar içinde daha çok A, D ve E vitaminleri bulunurken K vitamini daha çok bitkilerin yeşil kısımlarında bulunurlar. Vücutta çok önemli biyolojik fonksiyonları bulunmaktadır. Şekil 1.1.9.7.1. ve Şekil 1.1.9.7.2.'de sırasıyla A ve E vitaminlerinin molekül formülleri gösterilmiştir.



Şekil 1.1.9.7.1. A vitamini molekül yapısı



Şekil 1.1.9.7.2. E vitamini molekül yapısı

### 1.1.9.8. Antioksidanlar

Yağların yapısında bulunan havadaki oksijenin oksitleyici etkisini önleyici veya yavaşlatıcı fenolik yapıdaki bileşenlere doğal antioksidanlar denir. Yağın içindeki bu maddeler oksijenle birleşip parçalanırken yağın doğal yapısının bozulmasını önlerler. Bu maddelere örnek olarak bütün yağlarda farklı oranlarda bulunan tokoferoller, pamuk yağlarında bulunan gossipol ve susam yağında bulunan sesamin, sesamol ve sesamolin verilebilir.

### 1.1.9.9. Tat Ve Koku Maddeleri

Doğadaki tüm yağların kendine has tat ve kokusu vardır. Bu etkileri oluşturan tat ve koku maddeleri doğal tat ve koku maddeleri ile teknolojik işlemler yada oksidatif bozunmalar sonucu oluşan tat ve koku maddeleri olarak ikiye ayrılabilir. Doğal tat ve koku maddeleri hidrokarbonlar sınıfında polietilenik yapıdadır. Örnek olarak zeytin ve yerfıstığı yağlarından izole edilen tridekadien ( $C_{13}H_{24}$ ), pentadeken ( $C_{15}H_{30}$ ), heksadekadien ( $C_{16}H_{30}$ ), nanodeken ( $C_{19}H_{36}$ ), triakosaheksen ( $C_{23}H_{42}$ ) ve oktakosatrien ( $C_{28}H_{50}$ ) verilebilir. Teknolojik işlemler veya oksidatif bozunmalar sonucu oluşan tat ve kokular ise aldehit, keton ve alkol gibi yağın doğal yapısını bozan maddelerden kaynaklanmaktadır.

### 1.1.9.10. Mineraller

Katı ve sıvı yağlar rafinasyondan sonra fosfatid kalıntularından dolayı az miktarda fosfor içerir. Yağların nötralizasyonu işleminden sonra 5-20 ppm kadar sodyum sabunları bulunabilir. Ham bitkisel yağlarda 0,85-1,1 ppm Zn, 0,005-1,0 ppm Cu, 0,03-5 ppm Na, 0,01-4 ppm'den az Br ve 1 ppm'den az miktarda Fe, Mn ve Ni gibi metaller bulunabilmektedir.

## 1.2. Hayvansal Yağlar

Günümüzde hayvansal yağ kaynakları sınırlıdır. Bugüne kadar 1500 civarında kara ve deniz hayvanının yağı incelenmiştir. Hayvansal yağ kaynakları kendi içinde üç grupta incelenebilir. Bunlar başlıca koyun ve sığır gibi hayvanlardan elde edilen hayvan iç yağları, çeşitli balık türleri ve balina gibi deniz hayvanlarından elde edilen yağlar ve koyun, inek gibi kara hayvanlarının sütünden elde edilen tereyağlarıdır (Başoğlu 2002). Çizelge 1.2.1.'de bazı hayvansal kaynaklı yağların yağ asitleri içeriği gösterilmiştir.

**Çizelge 1.2.1.** Bazı hayvansal kaynaklı yağların yağ asitleri içeriği

Yağlı Tohum Cinsi	Doymuş Asitler					Doymamış Asitler					I.D.
	12:0 <i>Lauric</i>	14:0 <i>Myristic</i>	16:0 <i>Palmitic</i>	18:0 <i>Stearic</i>	Diğer	16:1 <i>Palmitoleic</i>	18:1 <i>Oleic</i>	18:2 <i>Linoleic</i>	18:3 <i>Linolenic</i>	Diğer	
Tereyağı ( <i>Butter</i> )	2.9	10.8	26.9	12.1	12.3 <sup>1,2,3</sup>	2.0	28.5	3.2	0.4	2.7 <sup>6,7</sup>	25-42
Balıkyacağı ( <i>sardalye</i> )	0.2	6.5	16.6	3.9	1.8	7.5	14.8	2.0	1.3	39.7 <sup>8-11</sup>	-
Domuz yağı ( <i>Lard</i> )	0.1	1.5	26.0	13.5	0.8 <sup>4,5</sup>	3.3	43.9	9.5	0.4	1.0 <sup>8,9</sup>	46-70
İçyağı ( <i>Tallow</i> )	0.1	3.2	24.3	18.6	2.2 <sup>4,5</sup>	3.7	18.6	42.6	2.6	2.0 <sup>6,12</sup>	38-48
Sığır eti yağı	-	-	29.0	20.0	-	2.0	42.0	2.0	0.5	4.5 <sup>13</sup>	-
Koyun eti yağı	-	-	-	25.0	25.0	-	39.0	4.0	0.5	1.5 <sup>13</sup>	-
Domuz eti yağı	-	-	28	13.0	-	3.0	46.0	10.0	0.7	2.0 <sup>13</sup>	-

<sup>1</sup> butyric, <sup>2</sup> capric, <sup>3</sup> caproic, <sup>4</sup> margaric, <sup>5</sup> pentadecanoic, <sup>6</sup> myristoleic, <sup>7</sup> dodecanoic, <sup>8</sup> gadoleic, <sup>9</sup> docosenoic, <sup>10</sup> docosahecezaenoic, <sup>11</sup> erusic, <sup>12</sup> margaroleik, <sup>13</sup> arachidonic

**KAYNAK: DİZGE, N. 2005.** Bitkisel yağ ve atıklarından yeni mikro poroz polimerik enzim reaktörleri ile biyodizel üretimi. 171 s.

## 1.3. Atık Yağlar

Çevre ve Orman bakanlığının 25353 sayılı atık yağların kontrolü yönetmeliğine göre atık yağ tanımı; Kullanılmış taşıt yağları (benzinli motor, dizel motor, şanzıman ve diferansiyel, transmisyon, iki zamanlı motor, hidrolik fren, antifiriz, gres ve diğer özel taşıt yağları); endüstriyel yağları (hidrolik sistem, türbin ve kompresör, kızak, açık-kapalı dişli, sirkülasyon, metal kesme ve işleme, metal çekme, tekstil, ısıl işlem, ısı transfer, izolasyon ve koruyucu, pas ve korozyon, izolasyon, trafo, kalıp, buhar silindir, pnömatik sistem koruyucu, gıda ve ilaç endüstrisi, genel amaçlı, kağıt makinesi, yatak ve diğer özel endüstriyel yağları ve endüstriyel gresleri) ve özel müstahzarları

(kalınlaştırıcı, koruyucu, temizleyici ve benzeri) ve kontamine olmuş yağ ürünlerini ifade eder şeklinde yapılmıştır.

Gıda maddelerinin kızartılması, çok uzun zamandan beri yoğun olarak kullanılan ve başlıca amacı özel bir renk, tat, doku ve kabuk oluşturarak gıdanın hızlı pişmesini sağlayan bir yöntemdir. Kızartma esnasında gıda maddesi ile kızartma yağı arasında aynı anda gerçekleşen ısı ve kütle iletimleri neticesinde hem gıda hem de yağda önemli fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelmektedir. Kızartma yönteminin gıdaların pişirilmesi için ucuz, hızlı ve verimli bir yöntem olması ve gıda yüzeyinde sterilizasyon sağlaması gibi üstünlüklerinin yanı sıra, besleyici değeri açısından da kızartılmış gıdaların diğer yöntemlerle pişirilmiş gıdalara göre bazı üstünlükleri vardır. Kızartılmış gıdalar ile birlikte tüketilen kızartma yağlarının insan sağlığı üzerinde olumsuz etki yaratmaması için kızartma yağlarının kullanım süresinin, toplam polar madde içeriklerinin çok dikkatli bir şekilde izlenmesi gerekmektedir.

Kızartma koşullarına göre farklı derecede ve farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleşen reaksiyonlar sonunda kızartma yağında yüzlerce farklı yapıda, ancak hepsi polar karakterli bozunma ürünleri oluşmaktadır. Yağdaki polar madde oranı %25'i geçtiğinde kanserojen etki başlamaktadır. Ayrıca %75'lik biyodizel yapımına uygun trigliserit miktarı azalmaktadır. Kızartmalık yağların zamanında gıda zincirinden çekilmesi hem insan sağlığının hem de biyodizel yapmaya uygun hammadde kaynağının korunması sonucunu sağlayacaktır. Gelişmiş ülkelerde belirli olan gıdada kullanılan kızartmalık yağların kriterlerinin ülkemizde de yayınlanıyor olması sevindirici bir gelişmedir. (<http://www.albiyobir.org.tr/atikyaglar/2008>)

1 lt atık yağın 1 milyon litre içme suyunu kirletebildiği bilinmektedir. Kullanılmış bitkisel atık yağlar evsel atık su kirliliğinin %25'ini oluşturmaktadır. Atık yağlar ekotoksik özelliğe sahiptir, bulunduğu ortamı kirletir ve ortamda yaşayan canlılara zarar verir. Atık su kirliliğinin %25 oranında kaynağını, kullanılmış bitkisel ve hayvansal yağlar oluşturmaktadır. Arıtılmayan atık suların içindeki bitkisel ve hayvansal atık yağlar denizlere, göllere ve akarsulara döküldüğü zaman o suyun kirlenmesi ve sudaki oksijenin azalması sonucu ortamdaki başta balıklar olmak üzere diğer canlılar üzerinde büyük tahribata yol açmaktadırlar. Atık yağların küçük fırınlarda yakılması ile içindeki ağır metal ve klor bileşimleri atık hava ile birlikte atmosfere salınarak havayı kirletir ve insan sağlığına zarar verir. Bu nedenle bu işlem

yasaklanmıştır. Kullanılmış yağlar lavaboya döküldüğü zaman dren sistemine sıvanmakta kanalizasyon borusu içindeki atıkların yapışmasına ve zamanla borunun daralmasına neden olmaktadır. Kanalizasyona dökülen atık yağlar diğer atıkları tutmakta ve kanalizasyon sisteminin kullanılmaz hale gelmesine sebep olmaktadır. Böylece atık su arıtma tesislerine zarar vermekte ve işletme maliyetini artırmaktadır. ABD’de yapılan bir araştırmaya göre lavaboya dökülen atık yağların kanalizasyon sistemlerinin %40 oranında tıkanmasına sebep olduğu bildirilmiştir (<http://www.albiyobir.org.tr/atikyaglar/2008>).

Atık bitkisel yağların biyodizel üretiminde kullanılıyor olması yağların ekonomik değeri itibariyle sağlıksız, yasadışı kullanım alanlarını engellemesi, küresel ısınmaya karşı mücadele aracı olabilmesi gibi çevresel ve ekonomik avantajlara sahiptir. Yılda 250 bin ton atık yağın biyodizele dönüştürülmesi halinde 750 bin ton/yıl karbondioksit salınımı engellenecek, uluslararası karbon piyasasından pay alınacak, yeni istihdam alanları yaratılacak ve 500 milyon Euro değerinde temiz enerji elde edilecektir (<http://www.atikbitkiselyag.com/icerikler/cevre04.htm>).

Çevre ve Orman Bakanlığı’nın atık motor yağlarının toplanması ve bertaraf edilmesi konusunda yetkilendirdiği Petrol Sanayi Derneği (PETDER) 2007 yılı boyunca başta Marmara, İç Anadolu, Ege ve Karadeniz Bölgesi’nde olmak üzere toplam 78 ilde, 10 bin 943 işletmeden 15 bin 80 ton atık motor yağı toplamıştır. Çevre ve Orman Bakanlığı’nın AB çevre yasalarına uyum sağlamak amacıyla 21 Ocak 2004 tarihinde yayınladığı yönetmelik çerçevesinde yürütülen “atık motor yağı toplama” çalışmaları kapsamında 4 yıl içerisinde toplanan atık yağ miktarı ise 34 bin 443 tonu bulmuştur. PETDER’in yaptığı hesaplamalara göre, 2007 yılı içerisinde toplanan 15 bin 80 ton atık motor yağının enerji değeri 165 milyon kwh. elektrik enerjisine denk gelmektedir. PETDER yetkilileri, sadece 2007 yılında toplanan atık motor yağları ile 90 bin kişinin bir yıllık elektrik enerjisi ihtiyacına eşdeğer bir enerji geri kazanımı elde edildiğini açıklamışlardır. En fazla Atık Yağ Araç servislerinden toplanmıştır. PETDER’in 2007 yılı boyunca topladığı atık yağların sektörel dağılımı ise şöyledir: Araç Servisleri % 64, kamu kuruluşları % 8, yağ üretim tesisleri % 7, belediyeler % 3, akaryakıt istasyonları % 1 ve fabrikalar ile diğer alanlar % 17’ dir.

#### 1.4. Yağ Bileşenlerinin Biyodizel Özelliklerine Etkisi

Türkiyede üretilen biyodizel TS EN 14214 standardına uygun olmalıdır. Bu standarda uygun üretilen biyodizel yakıtlar otomobil motorlarına herhangi bir zarar vermeden rahatlıkla kullanılabilirler. Bu standartlara uymayan yakıtlar hem ekonomik kayıplara hemde çevresel zarara neden olabilir. Bu nedenle üretilen biyodizel yakıtlarda TS EN 14214' e göre belirlenen 24 parametre çok hassas bir şekilde kontrol edilmelidir.

TS EN 14214 standardında analizler fiziksel ve kimyasal olmak üzere ikiye ayrılabilir. Yöntemde kinematik viskozite, yoğunluk, parlama noktası, karbon kalıntısı, su içeriği ve oksidasyon kararlılığı fiziksel analizler grubunda, ester içeriği, gliseridler, metanol, asit değeri, iyot değeri, kükürt, sodyum, potasyum ve fosfor analizleri ise kimyasal analiz grubunda ele alınır. Bu özelliklerden su içeriği, serbest yağ asitleri, partikül madde, fosfolipidler, kükürt ve iyot değeri yağ kalitesini belirleyen parametrelerdir. Biyodizel yakıtın kalitesini belirleyen özellikler ise hammadde kalitesi(su içeriği, serbest yağ asitleri, partikül madde, fosfolipidler, kükürt ve iyot değeri), kimyasal özelliğini belirleyen faktörler (ester içeriği, yoğunluk, alevlenme noktası, kükürt içeriği ve setan sayısı) üretim prosesi faktörleri (esterleşme reaksiyonunun tamamlanması, serbest gliserol, alkol ile katalizör kalıntısı, viskozite, iyot değeri ve asit değeri) ve üretim sonrası faktörlerdir ( su içeriği ve depolama kararlılığı). Bu faktörlerin tamamı biyodizelin kalitesini direkt olarak etkilemektedir.

Yüksek oranda doymuş yağ asitlerinden oluşan yağların viskozitesi nedeniyle; filtrede, enjeksiyon pompası ve enjektörde kolay akış sağlanamadığından problemler açığa çıkabilmektedir. Yüksek viskozite yüksek pompalama basıncı gerektirmektedir. Küçük viskoziteli yakıtlar ise; yakıt pompasında kaçaklara yol açmaktadırlar. Biyodizelin yüksek viskoziteye sahip olması esterleşme reaksiyonunun tamamlanmadığını gösterir. Yüksek viskoziteye sahip biyodizel enjektörde tıkanmaya, yetersiz püskürtme ve silindir içinde kurumlaşmaya neden olmaktadır.

Kimyasal analiz grubunda bulunan iyot değeri yağların doymuş ve doymamış yağ asidi içeriğine göre değişmektedir. Doymamış yağ oranı düşük yağlarda iyot değeri düşük buna karşın yakıtın düşük sıcaklıklarda donma olasılığı yüksektir. Yüksek iyot değerine sahip biyodizel ise tortu oluşumuna, aşırı karbon kalıntısı oluşumuna ve depolama kararlılığının düşmesine neden olmaktadır.

Biyodizel üretim aşamasında yan ürün olarak elde edilen gliserol yakıttan uzaklaştırılmadığı takdirde depoda çökmeye, yakıt viskozitesinin artmasına, yakıt filtresinin tıkanmasına ve motorda yanma problemlerine neden olmaktadır. Ayrıca yakıtın yoğunluğunun yüksek çıkmasına neden olur. Bunun dışında biyodizelden uzaklaştırılmayan metanolde yakıtın alevlenme noktasını düşürmektedir.

Biyodizelde bulunan asit değeri, hammaddeye göre değişiklik göstermektedir. Yüksek oranda serbest yağ asitleri içeren hammadde fazla miktarda baz katalizörü harcayarak sabun oluşturacaktır. Hammaddenin asit içeriği son derece düşük olmalıdır. Yağların bileşenleri içinde sabunlaşan maddeler sınıfında yer alan fosfolipidler yapışkan maddelerin giderilmesi (degumming) işlemiyle ortamdan uzaklaştırılabilirler. Kalsiyum ve magnezyum varlığında fosfolipidler emülsiyon oluşturabilmektedir.

Su biyodizel içinde ya çözünmüş halde ya da asılı damlacıklar halinde bulunur. Biyodizel su içermemelidir. Suyun varlığı enjeksiyon sistemindeki parçaların korozyonuna neden olmaktadır. Ayrıca su biyodizelde mikrobiyolojik gelişmelere katkı sağlamakta böylece biyodizelin asitlenmesine ve çamur oluşumuna neden olmaktadır.

Ayrıca biyodizel yakıtta bulunan sülfür silindirde kalıntı etkisi yaparken karbon ise motorda birikme yapmaktadır. Setan sayısının yüksek oluşu ise tutuşma ve yanma kalitesini artırmaktadır.

Biyodizel üretim süreci sonrasında dikkate alınması gereken önemli bir parametrede “depolama ömrü” dür. Bu terim, sadece üreticinin depolarında kaldığı süreyi değil aynı zamanda tüketicinin kullanım süresini de kapsayan bir özelliğe sahiptir. Çünkü depolama kararlılığı, yakıtın uzun zaman dilimi içerisinde kimyasal direncini koruyabilme yeteneği olarak düşünülse de biyodizel iyi bir çözücü özelliğine sahiptir ve aynı zamanda depolama alanındaki nem, katı partikül veya herhangi bir kirlilikten kolaylıkla etkilendiği için kararlılığı kolaylıkla değişmektedir. Bu da zamanla deponun duvarlarında birikintilerin meydana gelmesine ve yakıt filtrelerinin tıkanmasına kadar uzanan bir süreci başlatmaktadır. Her ne kadar biyodizel üreticileri üretimden kısa bir süre (4-6 ay) sonra biyodizelin tüketilmesini önerirlerse de yakıtın değişimini hızlandıran temel faktörler; yağın içerdiği çoklu doymamış yağ asidi içeriği ve transesterifikasyon yönteminden kaynaklanmakta, zamanla yakıtın viskozitesi ve asitliği de artmaktadır. Bu noktada önemli parametrelerden biriside biyodizel numunelerinin içerdiği linolenik asit miktarıdır. Kullanılan yağa bağlı olan bu

parametre, biyodizelin soğuk akış özellikleri üzerinde son derece etkilidir. Buna karşın, reaksiyon koşulları da, biyodizelin depolama karakteri üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Depolama karakteri; sadece biyodizel üreticisinin deposunda kaldığı süreci değil tüketicinin yakıt deposunda kalan süreci de kapsadığı için biyodizel üreticisi üretim anında kullandığı yağın özelliklerine bağlı olarak reaksiyon koşullarını seçmelidir. Yağın içerdiği doğal antioksidan içeriği kaybolduğu ölçüde hangi yağ kullanılırsa kullanılsın üretilen biyodizel numuneleri oksidasyon stabiliteleri konusunda standartları yakalayamayacak ve üretici antioksidan kullanarak bunu telafi etmeye çalışacaktır.

## 1.5. ENZİMLER

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları kataliz eden proteinden yapılmış moleküllerdir (Wiseman 1987). Kelime anlamı itibariyle enzim 'maya=ferment' anlamına gelmektedir. İnsanoğlu çok eski zamanlardan beri enzimatik reaksiyonlardan yararlanmışlardır. Yoğurt, ekmek, sirke, boza ve peynir yapımı bunlara örnek verilebilir. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli fizyolojik faaliyetler çeşitli enzimlerin metabolizma reaksiyonları sonucudur ve bütün bu reaksiyonlar enzimlerin katalitik etkisiyle mümkün olmaktadır.

### 1.5.1. Enzimlerin Yapısı

Enzimlerin bir bölümü yalnız proteinden oluşurken diğerleri apoenzim ve koenzim denilen iki kısımdan meydana gelmektedir. Enzimlerin etkileyerek değişikliğe uğrattığı moleküle ise substrat adı verilir. Enzimler biyokimyasal reaksiyonlarda substratı değiştirip ürüne dönüştürürken kendileri hiç değişikliğe uğramazlar. Enzimler canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentezlenirken, aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları gerekmemektedir. Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve protein yapısında olmayan genellikle metal iyonlarından meydana gelmiş olan yan gruplarına kofaktör adı verilmektedir. Enzimlerin çoğu kofaktör olarak  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  gibi iyonlara gereksinim duyar. Enzimlerin aktivite



göstermeleri için ihtiyaç duydukları organik moleküllere ise koenzim adı verilmektedir. Organik molekül enzimin protein kısmı ile oldukça sıkı birleşmiş ve dissosiyeye olmuyorsa prostetik grup adını almaktadır. Koenzimler enzimlerin kopardığı yada eklediği kimyasal grupların taşıyıcısı olan organik moleküllerdir. Koenzimlerin öncül molekülleri vitaminlerdir. Vitaminler vücutta ufak değişikliklerle koenzimleri meydana getirirler. Eğer enzim koenzimi yada kofaktörü ile birlikte ve katalitik durum bakımından tamamen aktif durumda ise enzimin bu haline holoenzim adı verilmektedir. Eğer koenzim ve kofaktör enzimden ayrılacak olursa ve enzimde inaktif hale gelirse enzimin bu haline ise apoenzim adı verilmektedir. Enzimdeki protein kısım (apoenzim kısmı) enzimin hangi maddeye etki edeceğini belirler. Enzimin koenzim kısmı ise enzimde işlev gören ve esas iş yapan kısımdır (Tekman ve Öner 1998).

### 1.5.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu enzimleri kataliz ettikleri genel reaksiyon tipinin sonuna “-az” eki getirmek suretiyle; oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı sınıfa ayırmıştır.

Oksidoredüktazlar redoks tepkimelerini katalizleyen enzim sınıfıdır. Örnek olarak Laktat, dehidrojenaz ve katalaz enzimleri verilebilir. Bu enzimler kendi içinde beşe ayrılırlar.

- a) Dehidrojenazlar: elektron kazandırıcı tepkimeleri etkilerler.
- b) Oksidazlar: Elektron kaybeden tepkimeleri etkilerler.
- c) Redüktazlar: Substratı bir redüktör aracılığıyla indirgeyen enzimlere denir. örneğin asetaldehit redüktaz, asetaldehiti alkole redükler.
- d) Transhidrojenazlar: Bir molekülden diğerine hidrojen taşıyarak onu redüklerler.
- e) Hidroksilazlar: Substratlarına bir hidroksil ya da su molekülü katan enzimlere denir, örneğin, fenilalanin hidroksilaz bir hidroksil grubunu fenilalanine ekleyerek onu tirozine dönüştürür.

Transferaz enzimleri hidrojenin dışında bir atomun veya atom grubunun (metil, karboksil, glikozil, amino, fosfat grupları) bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlayan enzimlerdir. Aspartat transaminaz, alanin transaminaz, heksokinaz ve kreatin

kinaz örnek verilebilir. Bu grup içindeki Dekarboksilazlar Karboksilik asitlerden CO<sub>2</sub> molekülünün çıkmasını sağlarlar.

Hidrolaz enzimleri bir molekül su sokmak suretiyle ya da su molekülü aracılığıyla moleküllerin yıkılmasını sağlayan enzimlerdir. Ester, peptit, asitanhidrit ve glikozidik bağlarına etki ederler. Lipaz,  $\alpha$ -amilaz tripsin, kolesterol esteraz v alkalen fosfataz örnek enzimlerdir. Bu grup içinde;

a) Esterazlar: Ester bağıny yıkan enzimler olarak bilinirler. Bunun içinde lipaz, ribonükleaz, fosfataz, pirofosfataz ve glikozidaz bulunur.

b) Proteazlar: Peptit bağıny yıkan ezimlerdir (proteinaz).

Liyazlar su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzimlerdir, örneğın C-C bağı, aldolaz ve dekarboksilazla yıkılır. Keza C-O ve C-N bağıny yıkan liyazlar da vardır. Pürivat dekarboksilaz, sitrat sentaz ve adenilat siklaz örnek verilebilir.

İzomeraz enzimleri molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişını değiştiren enzimlerdir. Örneğın rasemaz, epimeraz.

Ligazlar (Sentetazlar) ise enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını sağlarlar. Amino asitlerin ve yağ asitlerinin aktifleşmesi örnek verilebilir.

### 1.5.3. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Faktörler

#### 1.5.3.1. Sıcaklık

Enzim reaksiyonlarının hızı sıcaklık artışıyla artar. Sıcaklığın 10 °C yükselmesiyle tepkime hızı ortalama iki misli artar. Böylece tepkime hızının yükselmesi, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Fakat belirli bir noktadan itibaren reaksiyon hızı düşmeye başlar ve tamamen durur. Enzimin en iyi çalışabileceği sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Yüksek sıcaklıklarda enzimler etkisizdirler (genellikle 55-60 °C' de). Bazı ılıcalarda yosunlar 80 °C'de yaşabilirler; fakat bunun üzerindeki sıcaklıklarda enzimleri tamamen koagüle olur ve bir daha etkili hale geçemez. Optimum noktanın biraz üzerinde enzimler etkisiz olmasına karşın, sıcaklık düşünce tekrar etkili hale geçebilirler. Fakat bu sıcaklığın devamı ya da sıcaklığın biraz daha yükselmesi enzimlerin etkinliğini tamamen ortadan kaldırır. Enzimlerin etkisiz hale geçmeleri ile

proteinlerin koagüle olması arasında büyük bir ilişkinin olması, onların büyük bir kısmının proteinlerden yapıldığını kanıtlamaktadır. Doğal olarak enzimler, proteinlerin bir kısmı gibi üçüncül yapıya sahiptir veya en azından moleküllerinin bir kısmı bu yapıdadır. Fakat yüksek sıcaklıklarda bu helozonik ya da üçüncül yapı parçalandığından ya da birbiri üzerine yığıldığından, protein koagüle olur ve enzim etkisiz hale geçer. Örneğin sütün kaynatılmasında, bakteri enzimlerinin etkisiz hale geçmesi ile ekşime önlenir. Düşük sıcaklıklar enzimin etkinliğini azaltır. 0°C' de enzim ya hiç etki göstermez ya da çok az işlev gösterir. Fakat soğğun enzimin yapısını bozduğu görülmemiştir. Ortamın sıcaklığı eski hale döndüğünde etkinlik yine başlar. Dondurmak suretiyle besin maddelerinin saklanması enzimlerin etkisiz hale geçirilmesiyle sağlanır ve bu olaya örnek olarak verilebilir. İnsan vücudunda enzimler çoğunlukla 37°C' de optimum etkindirler. Daha yüksek sıcaklıklarda (çocuklarda 42°C, yetişkinlerde 41°C) enzimler etkisizleşirler ve genellikle koagüle olurlar.

### **1.5.3.2. pH**

Enzimler pH değişimine karşı çok duyarlıdırlar. Genellikle çok fazla asidik ve alkalik ortamda etkisizdirler. Bazı hallerde enzimler en yüksek etkinliği belirli bir pH derecesinde gösterirler. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir. Örneğin, proteini parçalayan pepsin, midenin pH= 2'deki asidik ortamında maksimum çalışır; buna zıt olarak pankreastan salgılanan ve yine protein sindiriminde rol alan tripsin, ancak pH'nın 8,5 olduğu ortamda optimum olarak çalışabilir. Enzimlerin reaksiyon etkinliğinin pH ile ilgili olmasının nedeni, yapılarında proteinleri taşımalarındandır. pH'a bağlı olarak protein molekülü üzerinde çeşitli elektrik yüklenmeleri ve buna bağlı olarak dış yüz şekli (üçüncül yapı) meydana gelmekte ve substratla-enzim uyuşmasını sağlamaktadır. Belki de bu elektrik yüklenmesi enzim-substrat arasındaki çekiciliği artırmaktadır. Ortamın kuvvetli asidik yada kuvvetli bazik olmasıyla enzimler koagüle olurlar.

### **1.5.3.3. Enzim/Substrat Derişimi**

Enzim reaksiyonunun hızı genel olarak enzim konsantrasyonu ile orantılıdır. Eğer pH ve sıcaklık sabit tutulursa, enzim/substrat derişimi arasındaki orana bağlı

olarak tepkime hızı gözlenebilir. Substratın ya da enzimin fazla olması bu hızı değişik şekillerde etkileyebilir. Bol substrat bulunan bir ortama eklenecek enzim, son ürünün miktarını artıracaktır. Sabit enzim konsantrasyonunda enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artmaktadır. Bundan sonra ise substrat konsantrasyonunun artması reaksiyon hızını değiştirmemektedir.

#### **1.5.3.4. Su Etkisi**

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

#### **1.5.3.5. İnhibitör (Önleyici) Etkisi**

Enzim reaksiyonlarını yavaşlatan veya engelleyen maddelere inhibitörler denir. Substratlara çok benzeyen bu maddeler enzimlerle birleşerek, enzimi etkisiz hale getirmektedirler. Bazı inhibitörler ise, enzimlerle birleşip enzimin parçalanmasına neden olmaktadır. Antibiyotiklerin vücuttaki etki mekanizması bu sisteme göre işler. Bazı maddeler ise, enzimin substratını veya aktif maddesini bozarak reaksiyonu engellemektedir. Bunlara örnek olarak bazı ilaçları (antibiyotikler), bazı zehirleri (yılan, akrep, arı zehiri, siyanür, arsenik), zirai ilaçlar ve ağır metalleri (kurşun, bakır ve civa) verebiliriz.

#### **1.5.3.6. Aktivatör (Aktifleştirici) Etkisi**

Enzim reaksiyonlarını hızlandıran maddelere "aktivatör" denir. Özellikle mangan, nikel, klor ve magnezyum iyonları enzimlerin etkinliğini artıran iyonlardır. Bazı aktivatörler, enzimin substratı ile birleşmesini kolaylaştırırken, bazıları enzimin aktif yüzeyini daha da aktif hale getirerek reaksiyon hızını artırmaktadır. Örnek olarak panzehirler, enzime bağlanmış olan zehiri kendine bağlayarak enzimin serbest kalmasını ve enzimatik reaksiyonların normal seyrinde devam etmesini sağlarlar. Özetle

aktivatörler enzim aktivitesini artıran  $H_2S$ ,  $KCN$  ve sistein gibi inorganik veya organik maddelerdir.

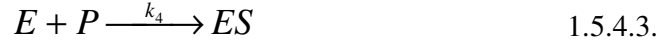
#### 1.5.4. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği

Enzim tepkimesinin hızı, enzim etkisiyle birim zamanda ortaya çıkan ürünün ya da kaybolan substratın miktarıyla ölçülerek hesaplanabilmektedir. Bir enzimin molekülse etkinliği optimum koşullarda bir enzim molekülü tarafından bir dakikada dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısıdır. Aslında etkinlik çoğu zaman özgül etkinlik biçiminde yani miligram protein başına enzim birimi sayısı ile ifade edilmektedir. Bir enzim birimi bir dakikada ve optimum koşullarda bir mikro mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

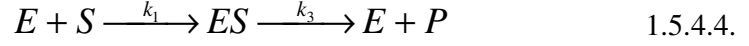
Enzim reaksiyonlarının kinetiğini açıklamak için genel olarak kabul edilen teori Michaelis-Menten teorisidir. Bu teoriye göre enzim (E)'in substrat (S) üzerine etkisi iki safhada meydana gelmektedir. Birinci safhada apoenzim, kofaktör etkileşimiyle substratla birleşir ve ara ürün olan “enzim-substrat kompleksi” (ES) meydana gelir. Buna Michaelis kompleksi adı verilir. Michaelis kompleksi teşekkül ettikten sonra substrattaki bağ kopmak üzere aktive olur. İkinci safhada ise aktive edilmiş kompleksten enzim ve enzimatik reaksiyon ürünleri (P) serbest hale geçer. Bu durum 1.5.4.1. ve 1.5.4.2. denklemlerinde gösterilmiştir.



Her iki reaksiyon da tersinir olarak kabul edilir.  $k_1$ ,  $k_3$  ve  $k_4$  ait oldukları reaksiyonların hız sabitleridir. İkinci reaksiyonun, enzim reaksiyonunun çok erken safhalarda yani çok kısa zaman incelendiği varsayılırsa reaksiyon ürününün konsantrasyonu çok düşük olacak ve bunun sonucu olarak enzim substrat kompleksinin (eşitlik 1.5.4.3.)



reaksiyonu ile son derece az olacağından bu reaksiyon ihmal edilebilir. Reaksiyonun tamamı daha basit bir şekilde eşitlik 1.5.4.4.'teki gibi yazılabilir.



### 1.5.5. Enzim Aktivite Ölçüm Yöntemleri

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

**Ünite:** Bir mikromol substratı bir dakikada ve optimal koşullarda ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir. Enzim üniteleri UI şeklinde gösterilmektedir.

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

### **1.5.5.1. Spektrofotometrik Yöntem**

Pekçok enzim substratı, ürünü veya koenzimi, görülen ışıktaki veya ultraviyole ışıktaki bir tepede değeri göstererek, absorbanı vermektir. Bu takdirde ya substratın kaybolması yada ürünün meydana gelişi gibi koenzimdeki değışiklik spektrofotometreden tayin edilir. Spektrofotometrik yöntem kolaylığı, basitliği ve hassas oluşu nedeniyle diğere yöntemlere göre daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntemde optik dansite değışimi, belirli miktardaki enzim ünitesini verir. Birçok enzimin aktivite tayini bu yöntem ile yapılmaktadır.

### **1.5.5.2. Manometrik Yöntem**

Bir komponenti gaz olan enzimlerin aktivitesini ölçmek için kullanılan yöntemdir. Örneğın oksidazlarla oksijen alınımı ve dekarboksilazlarla karbon dioksit salınımı bu yöntemle ölçülür.

### **1.5.5.3. Thunberg Yöntemi**

Çok sayıda dehidrogenaz enziminin aktivitesi bu yöntem kullanılarak ölçülür. Metilen mavisi elektron akseptörüdür. Bu bileşğin yükseltgenmiş durumu renkli, indirgenmiş durumu ise renksizdir. Enzim aktivite tayin ortamına belirli miktarda metilen mavisi ilave edilir. Göz ile renk kaybolmasındaki geçen zaman saptanır. Deney havanın oksijeninden korunmak için özel bir tüpte yapılır. Bu özel tüpe "Thunberg tüpü" denir ve yöntemde adını bu tüpten almıştır.

### **1.5.5.4. Elektrot Yöntemi**

Yöntem cam elektrotlarla reaksiyon ortamında oluşan ürünlerin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Yöntemde amperometrik enzim elektrotları kullanılmaktadır. Metotta enzim stokiyometrik ilişki içerisinde hedef moleküllü veya substratı ile karşılaştığında bir elektroaktif maddeyi üretir veya tüketir. Amperometrik çevirici ise bu

elektroaktif maddenin elektrot yüzeylerinde reaksiyon vermesine neden olur. Bu sırada elektrotlar arasında geçen akım ölçülür.

#### **1.5.5.5. Polimerik Tayin Yöntemi**

Pekçok enzimin substratı optikçe aktiftir. Eğer üründe optik aktivite değişmesi görülecek olursa bu yöntem kullanılmaktadır. Substratın inaktif ve ürünün optikçe aktif olduğu durumlarda yine bu yöntem uygulanmaktadır. Eğer substrat ve ürünün ikiside optikçe inaktif ise, o zaman bu yöntemin kullanılması mümkün değildir.

#### **1.5.5.6. Kromatografik Yöntem**

Diğer yöntemlerle bir ölçme yapılamadığında bu yönteme başvurulur. Enzim substrat karışımlarından belli zaman aralıklarında örnekler alınır. Kromatografik yöntemde, substrat ve ürün kromatografi kağıdında veya ince tabaka kromatografisiyle birbirinden ayırt edilir. Bazı hallerde radyoaktif substrat kullanıldığı için ayırımdan sonra leke, ya ince tabaka kromatografisinde olduğu gibi kazınacak, yada kağıt kromatografisinde olduğu gibi kesilerek sayım şişelerine koyulacaktır. Radyoaktivite miktarı sayaçta sayılır ve tayini yapılır. Bazı enzim aktivitelerinde ürünün meydana getirdiği lekenin büyümesi ile enzim faaliyeti hakkında bilgi edinilir.

#### **1.5.5.7. Kimyasal Tayin Yöntemi**

Birçok enzim reaksiyon başladıktan sonra belirli zaman aralıklarında karışımdan örnek alıp, substrat ve ürünün kimyasal yöntem ile miktarı tayin edilir. FISKE ve SUBBAROW kolorimetrik yöntemi olarak inorganik fosfat tayinini gerçekleştirmiştir. Fosforilaz, fosfataz, nükleotidaz enzimlerinin aktivite tayinleri aynı yolla yapılır. Pirofosfat (P<sub>pi</sub>) bağı, 1 N HCl ve 100 °C 10 dakika kaynatılmakla kırılmakta ve inorganik fosfat meydana gelmektedir. İnorganik fosfatın miktarı ise, kolorimetrik yöntem ile tayin edilmektedir. Bu yöntem ATP ve ADP'nin karıştığı bazı kinaz ve sentetaz reaksiyonlarında enzim aktivitesi bu yöntem ile tayin edilir.



### 1.5.6. Lipaz Enzimleri

Lipazlar, yağ ve yağ asitlerinin esterlerini hidroliz ederler. Lipazlar suda çözünebilen enzimlerdir ve emülsiyonun su-yağ geçiş fazında katalizi gerçekleştirmektedir. Enzim reaksiyonunun hızı oluşan yüzey alanına bağlıdır. Lipazlar yağ asitlerinin zincir uzunluğu, doyma derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substratın fiziksel durumuna uygun spesifiklik gösterirler. 4-10 C atomlu yağ asitleri daha uzun C zincirli yağ asitlerinden daha hızlı şekilde hidroliz olarak yağın yapısından ayrılır ve serbest hale geçerler (Abbas ve ark. 2002).

Günümüzde lipazlar hem sulu hem de susuz ortamda yapılması güç reaksiyonları başaran en önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Bu özellik onların geniş bir substrat spektrumunu kullanabilme, aşırı sıcaklıklara, pH ve organik çözücülere karşı kararlılık gösterebilme yetenekleri sayesinde olmaktadır. Kısa bir zaman önce lipazların üç boyutlu yapılarının belirlenmesiyle eşsiz yapı-fonksiyon ilişkileri aydınlatılmıştır.

Bitki, hayvan ve mikrobiyal lipazların arasında çok geniş uygulama alanı bulan lipazlar, mikrobiyal lipazlardır. Bunun sebebi, mikropların kolay yetiştirilebilmeleri ve lipazlarının birçok reaksiyonu katalizleyebilmeleridir. Lipazlar, gıda ve süt ürünleri (peynir olgunlaştırma, aroma geliştirme), deterjan, ilaç sanayii, tarımla ilgili kimyasal madde ( insektisit, pestisit), ve oleokimyasal (katı-sıvı yağ hidrolizleri, biyolojik yüzey aktif madde sentezleri) endüstrileri gibi çeşitli biyoteknolojik alanlarda kullanılmaktadır. Lipazlar, potansiyel biyokatalizör olarak kullanıldıkları daha birçok yeni alanda başarıyla görev almaktadırlar.

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

Son on yılda lipazlar özellikle organik sentez alanında, yağ modifikasyonu, bitkisel yağ yerine kullanılan maddelerin sentezi, biyolojik yakıtların sentezi, kişisel bakım ürünlerinin sentezi ve aroma artırıcıların sentezi gibi alanlarda kullanılmışlardır.

Bu nedenle lipazlar, günümüzde, organik kimyacıların, eczacıların, biyofizikçilerin, biyokimya ve proses mühendislerinin, biyoteknologların, mikrobiyolog ve biyokimyacıların ilgi alanına girmektedir.

Lipazlar (triacilgliserol, açilhidrolazlar ) serin hidrolazları sınıfı içinde yer alırlar ve bu nedenle hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar. Lipazların doğal substratları olan triacilgliseroller, suda çok düşük çözünürlüğe sahiptir. Doğal şartlar altında lipazlar, çözünmeyen bir substratlı faz ile enzimin erimediği sıvı faz arasındaki arabirimde bulunan ester bağlarının hidrolizini katalizlemektedirler.

Lipazlar, trigliseridlerin digliseridlere, monogliseridlere, gliserol ve yağ asitlerine hidrolizlerini katalizler ve belirli şartlar altında ters reaksiyonla gliserol ve yağ asitlerinden gliseridlerin oluşumu ile esterifikasyonu yönetirler. Yağlardan biyodizel sentezi sırasında reaksiyon ortamında serbest yağ asitlerinin yada suyun varlığının lipaz mekanizmasına olumsuz etkisinin olmaması ve reaksiyonun düşük sıcaklıklarında gerçekleşmesi yöntemin avantajları arasındadır. Lipazlar ester bağlarına etki ettiği için, yağların ayrıştırılmasında, interesterifikasyonda (transesterifikasyon) peynirde farklı aromaların geliştirilmesi gibi daha birçok farklı alanda kullanılmaktadırlar.

Ticari uygulamalarda bitki, hayvan ve mikrobiyal lipazların bilhassa bakteriyel ve fungal lipazların üzerinde durulmaktadır. Her ne kadar pankreatik lipazlar çeşitli maksatlar için kullanılsa da mikrobiyal lipazların çok yönlü özellikleri, kolay nesil vermeleri gibi etkenlerden dolayı ticari uygulamalarda tercih edildikleri bilinmektedir. Endüstriyel olarak en yaygın kullanılan lipaz üreticisi mikroorganizmalar *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.* ve *Rhizopus sp.* dir.

### **1.5.7. Lipaz Enzimlerinin Özellikleri**

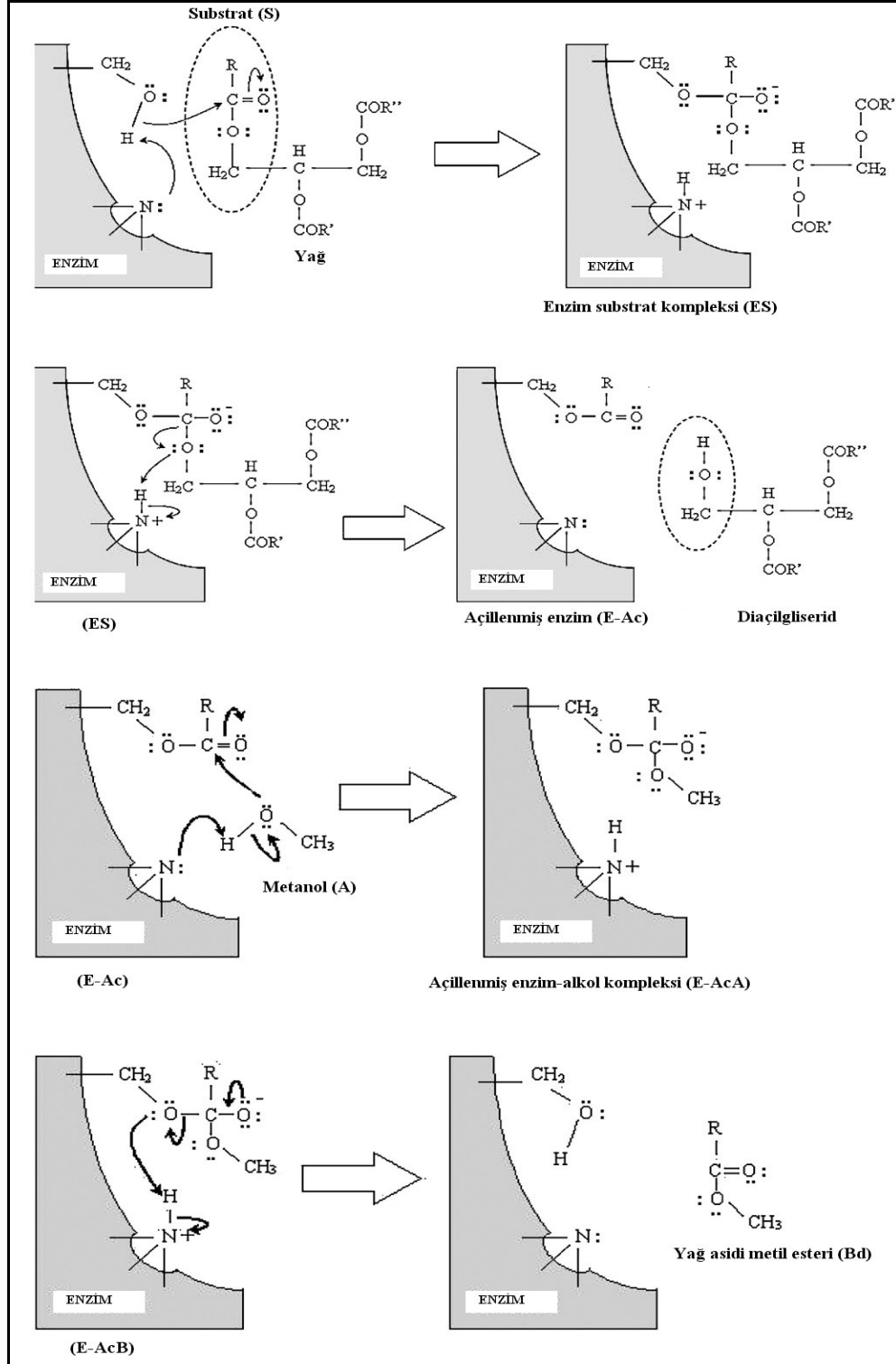
Yapılan incelemelerde lipazlar pH 4'e kadar asidik ve pH 8'e kadar bazik ortamlarda dayanıklıdırlar. Bununla birlikte en fazla stabiliteyi pH 6,0-7,5 arasında göstermektedirler. Örneğin; *A. niger*, *Chromobacterium viscosum* ve *Rhizopus* türlerinin hücre dışı lipazları asidik pH'da aktifken *P. nitroreducens*'ten izole edilen lipaz ise pH 11,0'de aktivite göstermektedir.

Lipazların çalışma ortamının sıcaklığı ve termal dengesi verimlilik açısından önemlidir. Pankreatik lipazlar stok halindeyken 40 °C sıcaklığın üzerinde düşük aktivite

gösterirler, fakat bazı mikrobiyal lipazlar sıcaklık inaktivasyonuna daha dayanıklıdırlar. Örneğin; *A.niger*, *R. japonicus* ve *C. viscosum* lipazları 50 °C’de dayanıklı olduğu halde, *H. lanuginosa* ve *P. sp.* lipazları ise sırasıyla 60 °C ve 70 °C sıcaklığa dayanıklıdırlar.

Lipaz enzimleri aktivasyonu katalizlediği reaksiyon açısından oldukça önemlidir. Bilinen lipaz aktivitesi gerçekleşmesi için kofaktörlere gerek yoktur. Ca gibi iki değerlikli iyonlar genellikle aktiviteyi uyarmaktadır. Lipaz aktivitesi, Co, Ni, Hg ve Sn tarafından kuvvetli bir şekilde; Zn, Mg, EDTA tarafından zayıf bir şekilde inhibe edilmektedir (Saxena ve ark. 1999).

Lipazların spesifitesi, enzimin moleküler özellikleriyle, substratın yapısıyla ve enzim-substrat bağlantısını etkileyen faktörlerle kontrol edilmektedir. Trigliseridlerden enzimatik katalizle yağ asidi metil esteri (YAME) üretim mekanizması Şekil 1.5.7.1.’de verilmiştir. Lipazların substrat spesifitesi, onların analitik ve endüstriyel amaçlar için kullanılabilirlikleri bakımından oldukça önemlidir. Spesifite, substratlarının hem yağlı açil ve hem de alkol gruplarıyla olan ilişkileriyle gösterilmektedir. Birçok mikrop farklı yağ asidi spesifiteleriyle iki veya daha fazla hücre dışı lipaz üretmektedir. Örneğin; Tribütirin bazı mikroplar tarafından yavaş hidroliz edilmektedir. Bunun aksine *M. miehei* lipazı düşük pH’da özellikle süt yağından bütirik asiti ayrıştırmayı tercih eder. *Geotrichum candidum*, uzun zincirli yağ asitlerine özgü esterlerin hidrolizi için bahsedilen spesifiteyi gösteren bir lipaz üretmektedir (Jacobsen ve ark. 1990). Lipazlar, substratlarının alkol kısımlarıyla ilgili hem rejiyo (bölge) hem de streospesifite göstermektedir. Lipazlar, açilgliseroller substratları meydana getiren rejiyospesifiteleri baz alınarak iki gruba ayrılabilir. Birinci grup lipazlar, reaksiyonda di-monoaçilgliserollerin aracılığıyla triaçilgliserollerin, gliserol ve yağ asitlerine tamamen yıkılmasını katalizler. Bu araçlar, triaçilgliserollerden daha çabuk hidroliz edilebildikleri için birikmezler. Birinci grup lipazlara *C. cylindracea* lipazı örnek olarak verilebilir. İkinci grup lipazlar, açilgliserollerin daha dış kısımlarında 1 ve 3. pozisyonlarından rejiyospesifik olarak yağ asitlerini serbest bırakır. Bu lipazlar, serbest yağ asitlerini, 1,2-diaçilgliserolleri ve 2-monoaçilgliserolleri vermesi için hidroliz ederler. *A. niger* ve *R. arrhizus*’tan elde edilen lipazlar gibi hücre dışı birçok mikrobiyal lipaz 1,3-(rejiyo)-spesifite göstermektedir. Yine *R. japonicus*, *M. miehei*, *H. lanuginosa*, *C. viscosum* ve *P. flourescens* tarafından dışarı atılan lipazlar da 1,3 rejiyo spesifiklerler.



**Şekil 1.5.7.1.** Trigliseridlerden enzimatik katalizle yağ asidi metil esteri (YAME) üretim mekanizması

**KAYNAK:** Al-Zuhair ve ark. 2007. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. Process Biochemistry, Vol.42, (6) p. 951-960.

### 1.5.8. Lipazların Kullanım Alanları

Günümüzde lipazlar yağların işlenmesi, deterjan endüstrisi, gıda işlenmesi, eczacılık, kağıt yapımında ve kozmetiklerin üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar. Çizelge 1.5.8.1.'de lipazların kullanım alanları gösterilmiştir. Endüstride lipazların spesifitelerine bağlı olarak hem sulu hem de organik sistemlerde çeşitli reaksiyonlardaki gereksinimleri dolayısıyla potansiyel güçleri anlaşılmıştır.

**Çizelge 1.5.8.1.** Lipazların kullanım alanları

Kullanıldığı Endüstri	Nerede Kullanıldığı	Ne İçin Kullanıldığı
Deterjan endüstrisi	Yağların hidrolizinde	Kumaşlardan yağlı boyaların giderilmesi amacıyla
Süt ve süt ürünleri endüstrisi	Süt yağının hidrolizinde, peynir üretiminde	Sütte, peynirde ve tereyağında lezzet artırıcı ajanların geliştirilmesi amacıyla
Fırıncılık endüstrisi	Pastane ve fırın ürünlerinde	Raf ömrünün uzatılması amacıyla
İçecek endüstrisi	İçeceklerde	Aroma geliştirilmesi amacıyla
Sos üretimi	Mayonez, sos ve krema yapımında	Kalite artırılması amacıyla
Doğal gıdaların üretimi	Transesterifikasyon reaksiyonlarında	Sağlıklı, doğal gıdaların üretilmesi amacıyla
Et ve balık endüstrisi	Lezzet arttırılmasında	Et ve balık ürünlerinde yağın giderilmesi amacıyla
Sıvı ve katı yağ endüstrisi	Transesterifikasyon ve hidroliz reaksiyonlarında	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol, mono ve digliserollerin üretilmesi amacıyla
Kimya endüstrisi	Enantioseçicilik ve sentez reaksiyonlarında	Kiral yapıların ve çeşitli kimyasalların elde edilmesi amacıyla
Ecza endüstrisi	Transesterifikasyon ve hidroliz reaksiyonlarında	Sindirime yardımcı ajanların geliştirilmesi amacıyla
Kozmetik endüstrisi	Sentez reaksiyonlarında	Cilt nemlendiricilerin ve emülsifiyerlerinin hazırlanması amacıyla
Deri endüstrisi	Hidroliz reaksiyonlarında	Deri üretimi amacıyla
Kağıt endüstrisi	Hidroliz reaksiyonlarında	Kağıtların kalitesinin arttırılması amacıyla
Temizlik endüstrisi	Hidroliz reaksiyonlarında	Yağların giderilmesi amacıyla

**KAYNAK: DİZGE, N. 2005.** Bitkisel yağ ve atıklarından yeni mikro poroz polimerik enzim reaktörleri ile biyodizel üretimi. 171 s.

### 1.5.8.1. Süt Ürünleri Endüstrisinde Lipazlar

Lipazlar süt yağının hidrolizi için süt ürünleri endüstrisinde geniş surette kullanılmaktadır. Günümüz uygulamaları, peynir aromasının artırılması, peynir olgunlaşmasının hızlandırılması, peynir benzeri ürünlerin imalatı ve kaymak hidrolizi işlemlerini içermektedir. Oysa, lipazların ilavesi öncelikle kısa zincirli (  $C_4$  ve  $C_6$  ) yağ asitlerinin uzaklaştırılmasıyla keskin ve hoş aromanın gelişmesine yol açar; orta zincirli (  $C_{12}$  ve  $C_{14}$  ) yağ asitlerinin uzaklaştırılması ise üründe sabunumsu bir tat oluşumuna yol açmaktadır. Katkı içeriğinde, serbest yağ asitleri, asetoasetat,  $\beta$ -keto asitleri, metil ketonları, aroma asitleri ve laktonlar gibi diğer aroma içeriklerinin sentezini başlatan basit kimyasal reaksiyonların yerini almaktadır. *Mucor miehei*, *Aspergillus niger* ve *A. oryzae* gibi tamamen bir dizi mikrobiyal lipazlardan hazırlanmış preparatlar peynir imalatı endüstrisi için geliştirilmektedir. Endüstride iyi kalite peynir sadece mikrobiyal lipazların veya çeşitli preparatlarının karışımlarının kullanımıyla üretilmiştir. Koyun veya keçi sütünden yapılan peynirlerin taklidi için geniş ölçüde lipazlar kullanılmaktadır. İnek sütüne lipaz ilavesi, koyun veya keçi sütünden elde edilen aromaya benzer bir aroma üretir. Bu; peynir üretimi için kullanılmaktadır ve böylece enzimle modifiye edilmiş peynir (EMP) olarak adlandırılmaktadır. EMP; soslar, çorbalar ve çerezler gibi diğer ürünlerde bir katkı maddesi olarak kullanılmak üzere konsantre aroma üretiminde yükseltilmiş sıcaklıklarda enzim varlığında inkübe edilen bir peynirdir (Dizge 2005).

### 1.5.8.2. Deterjanlarda Lipazlar

Yıkama tozlarında enzimlerin kullanımı hala endüstriyel enzimler için tek büyük pazar olmayı sürdürmektedir. Dünya çapında, evlerde kullanılan deterjan formülasyonu için daha düşük çamaşır yıkama sıcaklıklarına yönelme, taleplerin oldukça artmasına sebep olmuştur. Lipazlar yağ lekelerini çıkarmada etkilidir (Hiol ve ark. 2000). Yakın zamanda Novo Nordisk firmasının lipolazı (*Aspergillus oryzae*'de tanımlanan *Humicola* lipazı) gibi genetik manipülasyonların yer aldığı çeşitli preparasyonlar yoğun koruma programlarında tanıtım imkanı bulmuştur.

### 1.5.8.3. Oleokimyasal Endüstrisinde Lipazlar

Enerji biriktirdiği ve hidroliz, gliseroliz ve alkoliz reaksiyonları sırasında sıcaklık derecelerini en aza indirdiği için, lipazların oleokimyasal endüstrisinde uygulama sahası çok büyüktür. Japon Miyoshi Yağ şirketi, sabun üretiminde *Candida cylindracea* lipazının ticari bir şekilde kullanıldığını bildirmiştir. Yeni nesil ucuz ve sıcaklığa daha dayanıklı enzimlerin tanıtımı, ekonomik dengeyi lipaz kullanımının lehine değiştirebilir.

Oleokimyasal endüstrisinde bugünkü eğilim, organik çözücüler ve emülsifiyerlerin kullanımından uzaklaşma yönündedir. Hidroliz, alkoliz ve gliseroliz reaksiyonlarını içeren çeşitli reaksiyonlar, doğrudan karışık substratlar üzerinde bir dizi immobilize olmuş lipazların kullanımıyla gerçekleştirilmektedir. Bunun sonucu olarak da proses sürekli işlediği için yüksek verim elde edilmektedir. Enzimatik hidrolizler, fazla miktarda termal enerji masrafı gibi pahalı ekipmanla yapılan büyük yatırımlar olmaksızın, yağ ayrıştırma işlemlerinde başarılı olacağı şeklinde en büyük umudu vaat etmektedir (<http://www.biyotek.com.tr/2008>).

### 1.5.8.4. Trigliseridlerin Sentezinde Lipazlar

Yağların ticari değeri, yapılarındaki yağ asitlerinin düzenlenişine bağlıdır. Bitkisel yağ, çok kıymetli asimetrik trigliserid karışımına tipik bir örnektir. Unilever ve Fuji Yağ Şirketleri, bitkisel yağ yerine kullanılan maddelerin imalatı için 1,3-rejiospesifik lipazların potansiyellerini açıkça belirtmiştir. Ürün düzenlenişinin analizinin de yer aldığı bu teknoloji üzerinde kapsamlı görüşler mevcuttur. Esas itibarıyla, insan sütü yağı gibi değerli diyetik veya besleyici özelliklere sahip olan farklı yapıda diğer bir çok trigliseridlerin sentezi için de aynı yaklaşım uygulanabilmektedir. Bu trigliseridler ve fonksiyonel olarak benzer yağlar, 2-palmitol gliserid ile doymamış yağ asitlerince zengin olan palmye yağı fraksiyonlarının asidolizi ile kolaylıkla elde edilmektedir. 1,3-spesifik lipazlar tarafından katalizlenen asidoliz reaksiyonları, genellikle orta zincirli yağ asitlerini içeren besleyici yönden önemli ürünlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Araşidonik asit, eikosapentaenoik asit ve dokohekzaenoik asitler gibi oldukça değerli çoklu doymamış yağ asitleri bakımından

zengin olan yağların modifikasyonu hususunda lipazlar geniş surette incelenmektedir. Monogliseric fraksiyonlarını içeren çoklu doymamış yağ asitlerindeki mevcut zenginlik, lipazların katalizlediği alkoliz veya hidroliz işlemleriyle başarılmaktadır (Dizge 2005).

#### **1.5.8.5. Yüzey Aktif Maddelerin Sentezinde Lipazlar**

Poligliserol ve karbohidrat yağ asitleri esterleri, endüstriyel deterjanlarda ve çok çeşitli gıda formulasyonlarında emülsifiye edici maddeler olarak geniş ölçüde kullanılmaktadır. Fonksiyonel olarak yüzey aktif maddelere benzeyen enzimatik sentezler, mükemmel rejyoselektivite ile ılık sıcaklıklarda (60-80 °C) gerçekleştirilmektedir. Örneğin, erimiş yağ asitleri ve immobilize *Candida antarctica* lipazı kullanarak basit alkil-glikozidlerin esterifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Ayrıca başlangıç materyali olarak şeker asetallerinin kullanımıyla monosakkaritlerin mono- ve diesterlerinden yüksek kazanç elde edilmiştir (Fregapane ve ark. 1994). *A. terreus* lipazı, doğal yağlarla şeker alkollerini arasında gerçekleştirdiği transesterifikasyon reaksiyonuyla biyolojik bir yüzey aktif madde sentezlemektedir. Lipazlar ayrıca lizofosfolipidlerin üretiminde fosfolipazların yerine geçebilirler. *Mucor miehei* lipazı bir dizi birincil ve ikincil alkollerin içerisinde fosfolipidin transesterifikasyonu için kullanılmaktadır. Lipazlar ayrıca, amino asit bazlı esterler ve amidler olarak adlandırılan bütün bir dizi biyolojik parçalama yapan amfoterik yüzey aktif maddelerin sentezinde de kullanılmaktadır.

#### **1.5.8.6. Kişisel bakım ürünleri içeriğini oluşturan maddelerin sentezinde lipazlar**

Yakın zamanda Unichem Uluslararası Şirketi cilt ve güneş yanığı kremleri ve banyo losyonları gibi kişisel bakım ürünlerinden emollient olarak kullanmak için isopropil miristat, isopropil palmitat ve 2-etilhekzil palmitat üretimine başlamıştır. Balmumu esterleri de kişisel bakım ürünlerinde benzer uygulamaya sahiptir ve kesikli bir biyoreaktör içerisinde *C. cylindracea* lipazının kullanımıyla enzimatik yolla imal edilmektedir. Ayrıca cilt kozmetiğinde kullanılmak üzere gliserin karışımlarının üretiminde lipazlar kullanılmaktadır (Dizge 2005).



### 1.5.8.7. İlaç Sanayisinde ve Tarım Kimyasallarında (Agrokimyasallar) Lipazlar

Şıral ilaçların hazırlanmasında lipazların faydası oldukça iyi bilinmektedir ve belgelendirilmiştir. Fenoksipropiyonat herbisitlerin sentezi için başlangıç materyalleri olan 2-halopropiyonik asitlerin çözümlenmesi (S) izomer lerinin bütanolle, porsin pankreatik lipazının anhidröz hekzan içerisinde katalizlenen selektif esterifikasyonuna dayalı bir işlemdir. Lipazların rasemik karışımların içerisinde çözünmelerinde ticari uygulamasının etkileyici diğer bir örneği de epoksi ester alkollerinin hidrolizidir. Reaksiyon ürünleri, (R)-glisidil esterleri ve (R)-glisidol, optik bakımdan aktif β blokçuların ve geniş bir dizi diğer ürünlerin hazırlanması için daha cazip araçlar olan (R)- ve (S)- glisidiltosilatlarla kolaylıkla dönüştürülmektedir. benzer bir teknoloji, optikçe saf kardiyovasküler ilacı olan Diltiazem'in imalatında anahtar aracı olan 2(R), 3(S)-metilmetoksifenil glisidatın ticari üretiminde kullanılmaktadır.

Lipazlar, bazı prostaglandinlerin, steroidlerin ve karboksilik nükleosit analoglarının hazırlanmasında rasemik alkollerin çözümlenmesi için endüstriyel katalizörler olarak uygulamalara sahiptir. Çok fonksiyonlu organik bileşiklerin rejyoselektif modifikasyonu, özellikle AIDS tedavisi alanında, lipaz uygulamasının yine süratle genişleyen diğer bir alanıdır. A. carneus ve A. terreus lipazları ilaç sanayisinde önemli olan polifenolik bileşiklerin perasetatlarının hidrolizinde kemo- ve rejyospesifite göstermektedir. lipazlar ayrıca okta-asetil sukrozun rejyoselektif hidrolizi ile yapay tatlandırıcı olan sukralozun sentezinde de kullanılmaktadır (<http://www.biyotek.com.tr/2008>).

### 1.5.8.8. Polimer Sentezlerinde Lipazlar

Optikçe aktif polimerlerin sentezi için lipazların stereoselektivitesi kullanılmaktadır. Bu polimerler asimetrik ayıraçlardır ve emiciler olarak kullanılmaktadır. Sıvı kristallerin çalışma sahasında çözümlenerek rasemik alkollere eşlik edebilen alkollerin lipazlar tarafından katalizlenen transesterifikasyonu ile uygun monomerler hazırlanabilir. Ayrıca ferroelektrik sıvı kristallerin hazırlanması için şıral glisidil tosilatların kullanıldığı bildirilmiştir. Bu yüzden, bu enzim hem ölçüm hem de proses dönemlerinde çeşitli ticari kullanımlara sahiptir. Lipazlar, iyi kimyasalların ve

farmasötiklerin yüksek teknolojik üretimlerinde olduğu kadar gıda endüstrisinde de başarılı bir şekilde görev almaktadır. Üstelik, bu enzimin daha yeni alanlarda potansiyelleri mevcuttur, örneğin kağıt imalatında lipazlar başarılı bir şekilde kullanılmaktadır; görünüşe göre, kağıt hamurunun lipaz ile muamele edilmesi daha yüksek kalitede ürün oluşumuna ve azaltılmış temizleme ihtiyacına yol açar. Benzer bir şekilde, enzim, bir dondurma tesisinden yağca zengin akıntı haldeki maddelerin işlenmesi için mikrobiyal bir kokteyl ile toplanmalarında kullanılmaktadır. Bu, ayrıca bir çok gıda endüstrisinin atık maddelerinin işlenmesinde de kullanılabilir (<http://www.biyotek.com.tr/2008>).

### **1.5.9. Lipaz Enzimiyle Transesterifikasyon Reaksiyon Uygulamaları**

Son dönemde transesterleşme metodunun lipaz enzimi gibi biyokatalizörlerle yapılması önemli hale gelmiştir. Biyodizel üretiminde biyokatalizör kullanılması endüstride yaygın olarak kullanılan alkali katalizör prosesinden gelen dezavantajları elimine ederek yüksek saflıkta ürün elde edilmesini sağlamıştır (Fukuda ve ark. 2001). Enzimatik biyodizel üretiminde hem hücre dışı (extracellular) hem de hücre içi (intracellular) lipazların kullanılması mümkündür. Extracellular lipaz enzimleri kullanılarak yapılan transesterifikasyon çalışmalarında reaksiyon ortamında *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica* ve *Pseudomonas cepacia* gibi mikroorganizmalardan sentezlenen enzimler bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda daha ekonomik olması nedeniyle lipaz enzimlerini ihtiva eden mikroorganizmaların direkt kullanıldığı metot ise intracellular enzimatik yöntem ile biyodizel sentezlenmesi olarak adlandırılmaktadır (Marchetti ve ark. 2007, Ranganathan ve ark. 2008). Her iki yöntemde de enzimler uygun bir destek maddesine tutturularak defalarca kullanılabilir.

Enzimatik transesterleşme metodunda şimdiye kadar bir çok alkol kullanılmasına rağmen en yaygın olanı düşük maliyeti nedeniyle metanoldür. Yöntemin en önemli avantajı katalizör olarak kullanılan enzimin uygun bir destek maddesi üzerine bağlanarak herhangi bir ayırma gerektirmeden defalarca kullanılabilmesidir. Aynı zamanda diğer yöntemlere göre çalışma sıcaklığı oldukça düşük olup gliserin ayrılması kolaydır. Reaksiyon sonunda yüksek saflıkta ester elde edilebilmektedir. Yakın

gelecekte enzimatik biyodizel üretilmesinin endüstriyel boyutlarda uygulanması amaçlanmaktadır. Fakat üretim maliyetinin yüksek olması yöntemin en önemli dezavantajıdır. Araştırmacılar yöntemdeki problemlerin çözülmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapmış ve literatüre sunmuşlardır.

Mitellbach (1990) yaptığı çalışmada, ayçiçek yağının metanol, etanol ve butanol gibi birincil alkoller beraberinde *M. miehei* ve *C. Antarctica* enzimlerini kullanarak çözücü ortamında yada çözücsüz ortamda ester dönüşümünü incelemiş uzun zincirli alkollerin kısa zincirli olanlara göre daha yüksek ester oluşturduğunu bildirmiştir.

Nelson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada izopropanol ve 2-butanol gibi sekonder alkollerin *C. Antarctica* enzimi ile yüksek ester dönüşümü (%80) verirken, *M. miehei* enziminin ise metanol, etanol, propanol ve butanol gibi kısa zincirli birincil alkoller ile hekzan ortamında %95 ester dönüşümü sağladığını göstermiştir. Ayrıca çözücü yokluğunda metanolün yalnızca %14,4 dönüşüm sağladığını ve bunun alkolün immobilize lipazı inhibe etmesine bağlamıştır. (Nelson ve ark. 1996).

Benzer çalışmalarda Abigor ve ark. (2000) palm çekirdek yağı ile metanol ve etanol beraberinde sırasıyla %15 ve %72 ester dönüşümü elde ederken Nouredini ve ark. (2001) soya yağından immobilize *Pseudomonas fluorescens* enzimi ile metanol ve etanol beraberinde sırasıyla %67 ve %65 dönüşüm rapor etmiştir.

Linko ve ark. (1998) kolza yağı kullanarak *Pseudomonas fluorescens* immobilize enzimi ile 2-etil-1-hekzanol beraberinde %97 ester dönüşümünün mümkün olduğunu göstermiştir.

Iso ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *P. fluorescens* enzimi ile butanolün açıl akseptör olarak kullanıldığı transesterleşme reaksiyonunda bitkisel yağdan %90'nın üzerinde ester dönüşümü elde ettiklerini bildirmiştir (Iso ve ark. 2001).

Başka bir çalışmada belirlenen optimum reaksiyon koşullarında %0,3 su ortamında 60°C' de propan-2-ol beraberinde *Jatropha*, *Karanj* ve ayçiçek yağından sırasıyla %92,8, %91,7 ve %93,4 ester dönüşümü sağlanmıştır. Aynı zamanda enzimin tekrar kullanılmasıyla ilgili yapılan deneylerde propan-2-ol ile önemli bir ester kaybı olmadan 12 kez tekrar kullanım rapor edilmiştir (Modi ve ark. 2006).

Reaksiyon ortamındaki metanolün yağda çözünür olmadığı ve bu nedenle enzimi inhibe ettiği bu etkinin minimize edilmesi amacıyla transesterifikasyon reaksiyonunun

1,4-dioksan ortamında yapıldığı ve oldukça yüksek ester dönüşümü (%92) elde edildiği bildirilmiştir (Iso ve ark. 2001).

Benzer bir çalışmada Royon ve ark. (2007) pamuk yağından optimum reaksiyon koşullarında Novozyme 435 enzimi ile tersiyer butanolün solvent olarak kullanıldığı reaksiyon koşullarında 55°C' de 24 saat süre sonunda %97 gibi yüksek ester dönüşümü elde etmişlerdir. Aynı çalışmada reaksiyon sürekli akış sistemli reaktör beraberinde optimum reaksiyon koşullarında tersiyer butanol beraberinde %95 ester dönüşümü rapor edilmiştir.

Du ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada Novozym 435 enzimi ile soya yağını transesterleştirmek için metil asetat kullanmış ve 1:1 alkol-yağ molar oranında enzimin alkol tarafından inaktive edildiğini fakat 12:1 molar oranında enzim üzerinde önemli bir negatif etki gözlenmediğini 100 tekrar kullanım sonunda dahi aktivitenin değişmediğini ve %92 ester dönüşümü elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Reaksiyon ortamında bulunan alkolün enzim üzerindeki olumsuz etkisinin giderilmesi amacıyla önerilen bir başka yöntemde metanol reaksiyon ortamına adım adım eklenmiş ve 50-100 tekrar sonunda dahi sırasıyla %95, %90 ve %97 ester dönüşümü rapor edilmiştir (Shimada ve ark. 1999, Watanabe ve ark. 2000, Samukawa ve ark. 2000).

Du ve ark. (2003) çözücüsüz reaksiyon ortamında Lipozyme TL IM enzimini kullanarak soya yağının biyodizel yakıtı dönüşümünü çalışmışlardır. Çalışmada lipazın metanolün 1.5 molardan fazla ilave edilmesiyle inaktive olduğu bildirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında yağın metil esterlerine tamamiyle dönüşümü 40°C sıcaklık, 150 rpm hız, yağın ağırlığının %10'u enzim ve metanolün toplam üç adımda birer molar eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Maksimum metil ester verimi 12 saat reaksiyondan sonra %98 olarak ölçülmüştür. Yan ürün olarak oluşan gliserolün enzimatik aktivite üzerinde negatif etkiye sahip olduğu ve gliserol giderimi için izopropanolün etkili olduğu rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda lipazın 15 tekrar kullanımından sonra dahi %94'ten fazla metil ester verimine sahip olduğu belirtilmiştir.

Bako ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada gliserolün enzim üzerindeki inhibe etkisini engellemek amacıyla reaksiyon ortamından gliserolü diyaliz ile kaldırmış 50°C' de üç adım metanol ekleme yöntemi ile reaksiyonu gerçekleştirerek %97 gibi yüksek bir ester dönüşümü elde etmişlerdir.

Intracellular lipaz enzimleri kullanılarak yapılan çalışmada *R. oryzae* mikroorganizmaları kullanılarak üç adım metanol ilavesiyle 37°C' de gerçekleştirilen reaksiyonda 165 saat sonunda ağırlıkça %71 ester dönüşümü elde edilmiştir (Matsumoto ve ark. 2001).

Ban ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada bitkisel yağın *R. oryzae* mikroorganizmaları ile transesterleşmesini incelemiştir. Reaksiyon ortamında su bulunması durumunda immobilize hücrelerin aktivitesinin daha yüksek olduğu belirterek %15 su varlığında %90 üzerinde ester dönüşümü elde edildiğini bildirmiştir.

Yapılan bir diğer benzer çalışmada *R. oryzae* mikroorganizmalarının kararlılığının artırılması amacıyla hücreler destek maddesine %0,1 glutaraldehit ile çapraz bağlanmış ve adım adım metanol eklenerek 6 tekrar sonrasında %72-83 oranında ester dönüşümü gözlenmiştir (Ban ve ark. 2001).

Buthe ve ark. (2005)'nin yapmış oldukları çalışmada 12 farklı mikrobiyal kökenli lipazın atık yağlarda uygunluğu araştırılmıştır. Alkol olarak metanol, 3-metil-1-bütanol ve 2-etil-1-hekzan gibi dallanmış alkoller kullanılmıştır. Lipazlar 50 mM kızartma yağı ve sırasıyla 150 mM metanol, 3-metil-1-bütanol ve 2-etil-1-hekzanol ile muamele edilmiştir. Enzimlerin aktivitesi oluşan ürünün gaz kromatografisi analizi ile hesaplanmıştır. En yüksek aktiviteye sahip olan *Alcaligenes sp.* lipazı seçilmiş ve sol-jel, silikon ve phyllosilikate immobilize edilmiştir. Kullanılmış kızartma yağının yağ asiti kompozisyonu miristik asit (%1.15), palmitik asit (%51.65), stearik asit (%5.98), oleik asit (%34.81) ve linoleik asit (%5.26) olarak bulunmuştur. Doymuş yağ asit oranının yüksek olmasının biyodizelin soğukta akışkan özelliğini negatif etkilediğini belirtmişlerdir.

Araştırmacılar biyodizel üretilmesinde kullanılan enzimatik transesterleşme reaksiyonunun optimum deneysel koşullarda yapılması ile ilgili çeşitli istatistik yöntemleri kullanarak bir çok çalışma yapmışlardır.

Shieh ve ark. (2003) yaptıkları optimizasyon çalışmasında soya yağından metanol beraberinde *Rhizomucor miehei* enzimi ile transesterleşme yöntemiyle biyodizel sentez koşullarında önemli parametreler olarak belirlenen reaksiyon süresi, sıcaklık, enzim miktarı, alkol-yağ molar oranı ve ortama eklenen su miktarı değerlerini optimize etmişlerdir. Çalışma sonunda optimum reaksiyon koşullarında (reaksiyon

süresi: 6,3 saat; sıcaklık: 36,5 °C; enzim miktarı: 0,9 nova birimi; alkol-yağ molar oranı: 3,4:1 ve ortama eklenen su miktarı: %5,8) %92,2 ester dönüşümü rapor edilmiştir.

Chang ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada *Candida antarctica* enzimi ile metanol beraberinde kanola yağından transesterleşme yöntemiyle ester sentezi reaksiyon koşullarını yüzey analizi ve merkezi kompozit dizayn yöntemlerini kullanarak optimize etmişlerdir. Çalışma sonunda bulunan optimum reaksiyon koşulları; reaksiyon süresi: 12,4 saat, sıcaklık: 38°C, enzim miktarı: %42,3; alkol-yağ molar oranı: 3,5:1 ve eklenen su miktarı: %7,2 olarak belirlenmiş ve bu koşullarda %97,9 ester dönüşümü elde edildiği bildirilmiştir.

Bir başka çalışmada Xu ve ark. (2006) tung yağının metanol ile nova 435 enzimiyle transesterleşme reaksiyonunda optimum reaksiyon koşullarını yüzey analizi metoduyla belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonunda bulunan optimum koşullar; karıştırma hızı: 200 r/dk., metanol-yağ molar oranı: 2,2:1, reaksiyon sıcaklığı: 38°C ve katalizör miktarı: %14 olarak bulunmuştur. Optimum deneysel koşullarda yapılan transesterleşme reaksiyonu ile %67,5 ester dönüşümü elde edilmiştir.

Jeong ve Park (2006) yaptıkları enzimatik transesterleşme çalışmasında yüzey analizi istatistik yöntemiyle optimum deneysel koşullarını belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada optimum deneysel koşullarda (reaksiyon süresi:164,25 dk.; metanol-yağ molar oranı: 3,98:1, reaksiyon sıcaklığı: 43,06°C ve katalizör miktarı: %7,47) %98,7 ester dönüşümü elde edilmiştir.

Benzer bir çalışmada Li ve ark. (2007) *R. Oryzae* enzimi ile soya yağının metanol ile tersiyer butanol ortamında esterleştirilmesi reaksiyonunda optimum reaksiyon koşullarında (ter-butanol-yağ oranı: 1:6; alkol-yağ molar oran: 5:2; su oranı: %3,1 ve enzim miktarı: %12) %72 ester dönüşümü sağlamışlardır.

Başka bir çalışmada Güvenç ve ark. (2007) *Candida antarctica* (Novozym 435) enzimi ile katalizlenen transesterleşme reaksiyon koşullarını optimize etmişlerdir. Yapılan çalışma sonunda optimum reaksiyon koşulları; sıcaklık: 30°C, alkol-yağ molar oranı: 0,8; reaksiyon süresi: 8 saat ve katalizör oranı: %12 olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum reaksiyon koşullarında %80 ester dönüşümü elde edilmiştir.

Bouaid ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada faktöriyel dizayn ve yüzey analizi yöntemlerini kullanarak ester sentezinde önemli parametrelerden sıcaklık, alkol-yağ molar oranı ve katalizör oranını optimize etmişlerdir. Araştırma sonunda ayçiçek

yağından alkali katalizör beraberinde etil ester sentezinde optimum reaksiyon koşulları; sıcaklık: 32°C, alkol-yağ molar oranı: 5:1 ve katalizör oranı: %1,5 olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda %95,57 ester dönüşümü elde edilmiştir.

Transesterleşme yöntemiyle biyodizel sentez reaksiyonlarında kullanılan lipaz enzimlerinin celite ve silika jel gibi farklı destek maddelerine adsorbsiyon ve kovalent bağlama gibi farklı immobilizasyon metotlarıyla tutturularak kullanıldığı çalışmalar özellikle ekonomik nedenlerle dikkat çekmektedir.

Soumanou ve Bornscheuer (2003) yaptıkları immobilizasyon çalışmasında *Pseudomonas fluorescens* enzimini polipropilen EP 100 destek maddesi üzerine adsorbsiyon immobilizasyon metoduyla bağlamış ve hazırlanan immobilize enzim ile metanol beraberinde palm ve ayçiçek yağını enzimatik transesterleşme yöntemiyle sırasıyla %82 ve %75 dönüşümle esterleştirmiştir.

Shah ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada *Chromobacterium viscosum*, *Candida rugosa* ve *Porcine pancreas* lipaz enzimleri Celite 545 destek maddesi üzerine adsorbsiyon metoduyla immobilize edilerek transesterleşme reaksiyonu ile sırasıyla % 71, %1 ve %1,1 oranlarında ester dönüşümü rapor edilmiştir.

Palomo ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizomucor miehei* ve *H. lanuginose* enzimleri glioksi-agaros destek maddesi üzerine Triton X-100 varlığında kovalent olarak immobilize edilmiştir. Immobilizasyon sonucu *Pseudomonas fluorescens* lipaz enzimi %75, *Rhizomucor miehei* lipaz enzimi %89 ve *H. lanuginose* lipaz enzimi ise %71 verimle destek üzerine tutturulmuştur.

Bayramoğlu ve ark. (2005) yaptıkları immobilizasyon çalışmasında glutarik dialdehit ile aktive ettikleri epoxy grubu içeren poly(GMA-HEMA-EGDMA) destek maddesine *Candida rugosa* enzimini %48 verimle kovalent olarak immobilize etmişlerdir.

Orçaire ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada *Burkholderia cepacia* ve *Candida antartica* lipaz enzimleri aero silika jel destek maddesi üzerine adsorblanarak transesterleşme yöntemiyle ayçiçek yağından %56 dönüşümle metil ester elde edilmiştir.

Shah ve Gupta (2007) yaptıkları benzer bir çalışmada *Pseudomonas cepacia* enzimini Celite 545 üzerine adsorbsiyon metodu ile immobilize ederek transesterleşme yöntemiyle etanol beraberinde %92 dönüşümle ester elde etmişlerdir.

Başka bir çalışmada Chang ve ark. (2007) *Candida rugosa* lipaz enzimini Celite destek maddesine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize etmiştir. Yapılan ölçümlerde immobilize lipazın 18,16 U/mg protein spesifik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada immobilizasyon koşulları optimize edilmiştir. Optimum çalışma koşulları; immobilizasyon süresi: 59,1 dk.; immobilizasyon sıcaklığı: 10,7°C; enzim-destek oranı: 0,5 olarak belirlenmiştir.

Benzer bir çalışmada Hung ve ark. (2003) chitosan destek maddesine *Candida rugosa* lipaz enzimini glutaraldehit beraberinde kimyasal bağ ile bağlayarak 13,8 U/g-destek değerinde enzim aktivitesi belirlemiştir.

Oliveria ve ark. (2000) tarafından yapılan başka bir çalışmada *Candida rugosa* lipaz enzimi stiren-divinilbenzen (STR-DVB) kopolimerine fiziksel adsorpsiyon metodu ile bağlanmıştır. Çalışma sonunda 65 U/g-destek enzim aktivitesi ölçülmüş esterleşme reaksiyonunda immobilize enzimin 12 tekrar sonunda aktivitesinin %77' ini koruduğu hesaplanmıştır.

## 1.6. ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Enzimlerin çeşitli metotlarla katı bir destek maddesine tutturularak immobilize edilmesi önemli araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır. Enzimlerin tekrar kullanımına ve elde edilen ürünün ortamdan kolayca ayrılmasına imkan sağladığından ucuz ve kullanıma uygun immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi özellikle endüstriyel kullanım açısından büyük önem taşımaktadır. Katalitik proseslerde enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak tekrar ve sürekli kullanımı sağlamak amacıyla bir destek maddesine fiziksel veya kimyasal tutturulmasına enzim immobilizasyonu denir. Böylece enzimlerin tek kullanım yerine defalarca kullanılmasına olanak sağlanarak ekonomik açıdan büyük avantaj elde edilmiş olur. (Öztürk, 2001). Enzimlerin immobilize edilerek çeşitli destek maddelerine tutturulması ile sağlanan avantajlar Çizelge 1.6.1.'de özetlenmiştir. Bunun yanında enzimlerin immobilize edilmesi ile enzimin aktifliğinde azalma, enzim kararlılığının sınırlanması ve destek maddesinden kaynaklanan maliyet artışı gibi bazı dezavantajlarda oluşabilmektedir. Enzim immobilizasyonunda seçilen yöntem ve kullanılan destek maddesi çok önemlidir. Immobilize enzimlerin özellikleri hem enzim hem de



immobilizasyon matriksinin özelliklerine bağlıdır. Bu iki özellik ile immobilize enzim yeni kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikler kazanmaktadır.

**Çizelge 1.6.1.** Enzimlerin immobilize edilerek çeşitli destek maddelerine tutturulması ile sağlanan avantajla

NO	İMMOBİLİZASYONUN SAĞLADIĞI AVANTAJ
1	İmmobilize edilen enzim tekrar tekrar kullanılabilir
2	Enzimin katalitik gücü önemli ölçüde stabilize edilmiş olur
3	Enzimin çevre şartlarına (pH, sıcaklık, organik reaktifler vb.) karşı dayanıklılığı artar
4	Ürünler kolaylıkla saf olarak elde edilebilir
5	Sürekli proseslere uygulanabilirler
6	Seçici olarak bazı maddelerin sentezi mümkün olur
7	Enzimler reaksiyon ortamından basit yöntemlerle ayrılabilir
8	Reaksiyon üretim maliyeti düşer
9	Ürün oluşumu kontrol altında tutularak ürün inhibisyonu önlenebilir
10	İmmobilize enzim serbest enzime göre daha kararlı hale gelir
11	Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilirler
12	Birbirini takip eden çok adımlı reaksiyonlar için uygulanabilir

**KAYNAK: ÖZTÜRK, B.** Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. Master of Science, İzmir Institute of Technology, İzmir, 2001.

### 1.6.1. İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Maddeleri

İmmobilize enzim sistemlerinin yüksek performans sağlaması için destek maddesi seçimi çok önemlidir. Seçilen destek maddesinin kararlılığı, maliyeti ve dayanıklılığı gibi önemli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bir enzim taşıyıcısını ve immobilizasyon yöntemini seçerken dikkat edilmesi gereken temel hususlar Çizelge 1.6.1.1.'de gösterilmiştir.

İmmobilizasyon sırasında enzim molekülü konformasyonel değişikliğe uğrayabilmektedir. İmmobilize enzimin kazandığı özellikler immobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi, destek maddesiyle enzimin etkileşimi, aktifleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzim etkileşimi gibi faktörlere bağlıdır. Enzimin katı destek üzerine bağlanması enzimde bazı değişiklikler oluşturabilmektedir. Reaksiyon

ortamında çözünen madde ile polimerik destek maddesi arasında hidrofobik etkileşimler olabilmekte, destek maddesinin gözenek çapı substrat molekülünden küçük ise substratın destek içine difüzyonu ve enzim ile teması geçmesi engellenerek reaksiyon oluşmamakta, enzim molekülü immobilizasyon sırasında destek üzerine çok noktadan bağlanarak aktifliğinde azalma olabilmekte, immobilize enzimin aktif uçları substrat molekülünün yaklaşmasına engel olabilmektedir (Gloger ve Tischer 1981).

**Çizelge 1.6.1.1.** Immobilizasyon yöntemi ve matriks seçimindeki dikkat edilecek noktalar

Özellik	Uygulamada dikkat edilecek hususlar
Fiziksel	Dayanıklılık, sıkıştırılmamış tanecikler, geniş yüzey alanı, şekil/form, gözenek hacmi, gözenek derecesi, suda çözünmezlik ve yoğunluk.
Kimyasal	Hidrofiliklik (matrikse su bağlanması), enzime karşı inertlik, modifikasyon için fonksiyonel gruplar
Kararlılık	Depolama, enzim aktivitesi, destek materyalinin mekanik kararlılığı ve enzim aktivitesini sürdürmesi
Dayanıklılık	Bakteriyel atak, kimyasal, pH, sıcaklık, organik solvent, enzim ve proteazlara
Güvenlik	Biyoyuğum, bileşen reaktiflerin toksisitesi, yöntemle çalışanların ve son ürünü kullananların sağlığı-güvenliği ve gıda, ilaç ve medikal kullanımlar için immobilizasyon prosesinin şartnamesi
Ekonomik	Matriks, kimyasallar, özel cihazlar, reaktifler ve gerekli teknik becerilerin kolay eldesi ve maliyeti, çevresel etki, endüstriyel ölçüde hazırlanabilirlik,
Reaksiyon	Reaksiyon kinetikleri, yan reaksiyonlar, çoklu enzim sistemleri ve kofaktör substrat ve ürün kütle transferlerinde difüzyon limitasyonları

**KAYNAK: ÖZTÜRK, B.** Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. Master of Science, İzmir Institute of Technology, İzmir, 2001.

Enzim immobilizasyonunda kullanılan çeşitli destek maddeleri Çizelge 1.6.1.2.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.6.1.2.** Enzim immobilizasyonunda kullanılan çeşitli destek maddeleri

Destek maddesinin grubu	Destek maddesi
Doğal matriks	Aktif karbon Slika jel Alumina Cam Nişasta Kil Seramik Agaroz Selüloz Dekstran Kollajen
Sentetik matriks	Akrilamit esaslı polimer Dakron Naylon Polipeptit Stiren esaslı polimer Akrilat esaslı polimer
Modifiye matriks	Concanavalin A Sepharose Tannin Aminohekzil selüloz Fenoksiasetil selüloz
Katyon değiştirici	CM-selüloz Dowex 50 Amberlite CG-50
Anyon değiştirici	DEAE-selüloz DEAE-sephadex Amberlite

**KAYNAK: BAILEY, J.E., D.F. OLLIS 1997.** Biochemical Engineering Fundamentals. Second Edition, McGraw-Hill International Editions.

### 1.6.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu için kullanılan yöntemler fiziksel ve kimyasal metotlar olmak üzere ikiye ayrılır. Fiziksel immobilizasyon yönteminde enzimle destek maddesi arasında kovalent bağ oluşmadan fiziksel etkileşimlerle tutunma gerçekleşirken kimyasal immobilizasyon yönteminde enzimle destek maddesi arasında kovalent bağ oluşumu meydana gelmektedir (Zaborsky, 1973).

İmmobilizasyon yöntemini seçerken enzimin reaksiyonun yürütüleceği koşullarda kararlı olmasına, çapraz bağlayıcı reaktiflerin enzimin aktif uçları ile reaksiyona girmemesine, yıkama işlemi sırasında enzimin zarar görmemesine ve destek maddelerinin mekanik kararlılığına dikkat edilmelidir (Taylor, 1991). Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması Çizelge 1.6.2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 1.6.2.1.** Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Özellik	Fiziksel Metotlar		Kimyasal Metotlar		
	Adsorpsiyon	Hapsetme	İyonik Bağlama	Kovalent Bağlama	Çapraz Bağlama
<b>Hazırlanması</b>	Kolay	Zor	Kolay	Zor	Zor
<b>Enzim aktivitesi</b>	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta
<b>Substrat seçiciliği</b>	Değişmez	Değişmez	Değişmez	Değişmez	Değişmez
<b>Bağlama gücü</b>	Zayıf	Güçlü	Orta	Güçlü	Güçlü
<b>Tekrar üretme</b>	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil
<b>Genel uygulamalar</b>	Düşük	Yüksek	Orta	Orta	Düşük
<b>Hidrolik özellikler</b>	İyi (gözenekli taşıyıcılara bağlı)	Orta	İdealden düşük	İyi	Kötü
<b>Sağlamlık</b>	Değişken (pH)	Uzun süreli	Değişken (pH)	Yüksek ısısal kararlılık	Yüksek ısısal kararlılık
<b>İmmobilizasyon maliyeti</b>	Düşük	Düşük	Düşük	Yüksek	Orta

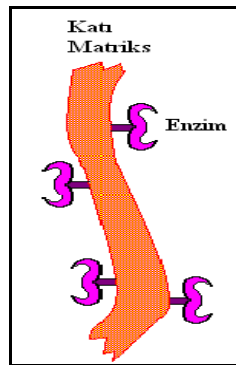
**KAYNAK:** HUANFEI J. 2002. Pretreatment of wastewater containing fats and oils using an immobilized enzyme. Department of Chemical Engineering, Curtin University of Technology.

### 1.6.3. Fiziksel Metotlar

Fiziksel metotlar enzimle destek maddesi arasında kovalent bağ oluşumuna bağlı olmadan enzimin belirli bir yere tutturulmasını içerir. Enzimlerin immobilizasyonu elektrostatik çekim, protein-protein etkileşimi ve iyonik bağ oluşumu gibi bazı fiziksel kuvvetlerin etkileşmesiyle destek maddesindeki mikro bölmeler içerisinde veya gözenekli mebranlarda tutuklanmasıyla sağlanır. Fiziksel immobilizasyon yöntemleri tersinirdir. Fiziksel immobilizasyon metodu adsorpsiyon ve hapsetme olmak üzere ikiye ayrılır (Christensen ve ark. 2003).

### 1.6.4. Adsorpsiyon ile İmmobilizasyon

Adsorpsiyon metodu bilinen en eski ve basit immobilizasyon metodudur. Adsorpsiyon ile immobilizasyon metodu suda çözünmeyen taşıyıcı matrisin enzimlerle veya mikroorganizmalarla fiziksel etkileşimler sonucu biraraya gelmesi ile sağlanmaktadır. Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyondan sorumlu kuvvetler hidrojen bağları, van der waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir. İyonik bağlanma ile immobilizasyon proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karşıt yükleri arasındaki çekim kuvvetlerine dayanır. Bu yöntemin en önemli avantajı enzimin üç boyutlu yapısında veya aktif merkezinde değişime neden olmamasıdır. Böylece enzimler oldukça serbest hareket ederek aktiviteleri yüksek olmaktadır. Bunun yanında enzim ile destek maddesi arasındaki zayıf bağlardan dolayı adsorplanan enzim kullanım sırasında taşıyıcıdan uzaklaşabilir. Bu durum yöntemin önemli bir dezavantajıdır. Şekil 1.6.4.1.'de adsorpsiyon ile immobilizasyon gösterilmiştir.



Şekil 1.6.4.1. Adsorpsiyon ile immobilizasyon

Enzimin suda çözünmeyen materyallerde adsorpsiyonu, pH, çözücü karakteri, iyonik kuvvet, protein ile adsorbanın derişimi ve sıcaklık gibi deney koşullarına bağlıdır. Adsorpsiyonla immobilizasyon metodu basit olduğu, çeşitli yüklü taşıyıcılar seçilebildiği ve taşıyıcılar farklı fiziksel şekillerde kullanılabilirdiği için avantajlıdır. Adsorpsiyon ile immobilizasyon enzim çözeltisiyle destek maddesinin karıştırılmasından ibaret olduğu için basit ve ucuz bir yöntemdir. (Öztürk 2001, Taylor 1991).

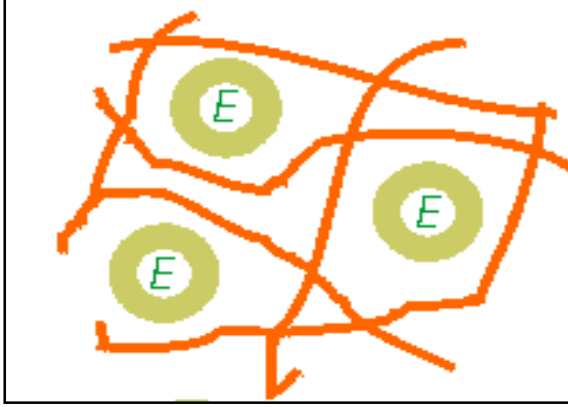
### **1.6.5. Hapsetme ile İmmobilizasyon**

Hapsetme ile immobilizasyon enzimlerin katı destek maddesinin gözenekleri veya lifleri arasına hapsedilmesi temeline dayanır. Yöntemde kullanılan katı destek maddeleri Ca-alginate, hollow fiberler, hidrofilik veya hidrofobik membranlar, N-N' metilen bisakrilamid ve çapraz bağlanmış poliakrilamidler gibi gözenekli yapıya sahip materyallerdir. Yöntemde enzim sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer oluşumu veya çapraz bağlanma ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınlarıyla başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir. Polimer matriks yapısının substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeteri derecede sıkı olması gerekir. Hapsetme metodu kafes tipi ve mikrokapsül olmak üzere iki gruba ayrılır (Christensen ve ark. 2003).

#### **1.6.5.1. Kafes Tipi Hapsetme Metodu**

Kafes tipi hapsetme metodu, suda çözünmeyen çapraz bağlı polimerin boşlukları içinde enzimin tutulması esasına dayanır. Bu metot da enzim içeren monomer veya polimer şebekesi oluşturulur. Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisinde tutulur ve jel matriksin dışına çıkamaz. Fakat substrat ve ürün bu şebeke içerisine sürekli olarak girip çıkabilir. Enzim kimyasal modifikasyona uğramaz ve enzimin özelliklerinde herhangi bir değişme gözlenmez. Bu yöntem farklı fiziksel formlarda suda çözünmeyen enzim türevlerinin hazırlanmasına olanak verir. Enzim türevlerinin jelatinimsi doğası immobilize bir enzimin hem düzenli hem de düzensiz yüzeyler

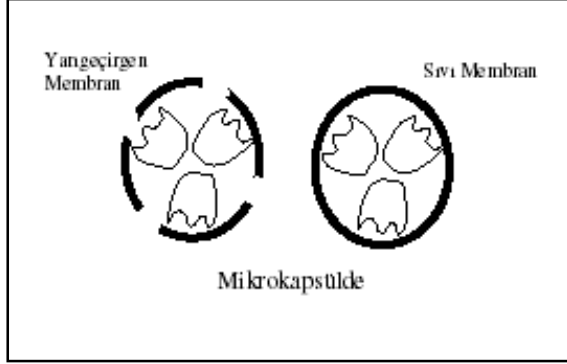
üzerinde kolayca depolanmasını sağlamaktadır (Christensen ve ark. 2003). Şekil 1.6.5.1.1.' de kafes tipi hapsetme metodu gösterilmiştir.



Şekil 1.6.5.1.1. Kafes Tipi Hapsetme Metodu

#### 1.6.5.2. Mikrokapsül ile Hapsetme Metodu

Mikrokapsül ile hapsetme metodu, 10-1000  $\mu\text{m}$  çaplı küçük yarı geçirgen membranlar içinde enzim moleküllerinin hapsedilmesini içerir. Yarı geçirgen membran, büyük protein veya enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürünlerin serbestçe girip çıkmasına izin verir. Enzimlerin mikrokapsülleme için basit iki metot vardır. Bunlar faz ayrımı ve ara yüzey polimerizasyondur. Faz ayrımı metodunda enzim ve mikrokapsülü oluşturan çözelti damlalar halinde çöktürücüye ilave edilir. İkinci metotta enzimin sulu çözeltisi suyla karışmayan organik çözelti içerisinde emülsiyeye edilir. Ortama eklene polimer çözeltisi enzim mikro damlalarının etrafında membran oluşturur. Böylece enzim polimerik membran tarafından sarılarak mikrokapsülleme olur. Bu yöntem ile büyük yüzey-hacim oranına ulaşılabilir. Yüzey-hacim oranının büyük olması mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat reaksiyonunu artırır (Taylor 1991, Christensen ve ark. 2003). Şekil 1.6.5.2.1.' de mikrokapsül ile hapsetme metodu gösterilmiştir.



Şekil 1.6.5.2.1. Mikrokapsül ile hapsedme metodu

### 1.6.6. Kimyasal Metotlar

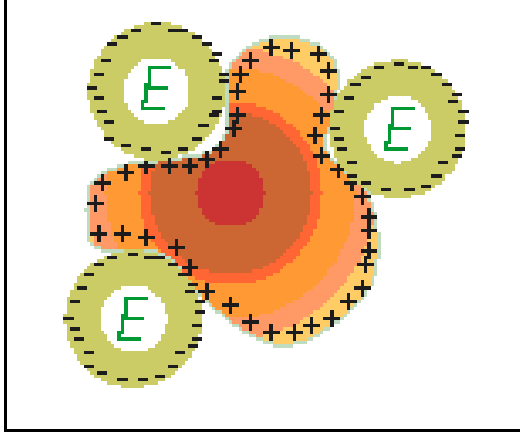
Kimyasal immobilizasyon yönteminde enzimle destek maddesi arasında kovalent bağ oluşumu meydana gelmektedir. Kimyasal tutunma çoğunlukla tersinmezdir ve serbest enzimi yeniden geri kazanmak mümkün değildir. Kimyasal bağlanma ile immobilizasyon metotlarının immobilize enzimin çok kararlı olması, destek maddesinin dayanıklı olması gibi önemli avantajları vardır. Bunun yanında immobilizasyon veriminin sınırlı olması, reaksiyon şartlarının özel olması, kimyasal olarak inert olan destek maddelerine uygulanamaması gibi bazı dezavantajlara da sahiptir. Kimyasal metotlar iyonik, kovalent ve çapraz bağlama olmak üzere üçe ayrılır (Zaborsky, 1973).

#### 1.6.6.1. İyonik Bağlama

İyonik bağlanma metodu iyon-değiştirici kalıntılar içeren suda çözünmeyen destek maddesine enzimin iyonik bağlanmasına dayanır. İyon-değiştirici merkeze sahip polisakkarit ve sentetik polimerler genellikle taşıyıcı olarak kullanılırlar. Dietilaminoetil selüloz (DEAE-selüloz) veya Sephadex gibi anyon değiştiriciler ve karboksimetil selüloz gibi katyon değiştiriciler destek materyali olarak enzimlerin adsorpsiyonu için endüstride kullanılmaktadırlar. Bu metodun avantajı taşıyıcıya enzimin bağlanması kovalent bağlanma metodu için gereken şartlardan daha ılımlı şartlarda ve daha kolay gerçekleşmesidir. İyonik bağlanma metodu enzimin aktif merkezinde ve konformasyonunda önemli değişiklikler oluşturmadığından enzim immobilizasyonu



yüksek verimle gerçekleştirilebilmektedir (Taylor 1991). Şekil 1.6.6.1.1.'de iyonik bağlama ile immobilizasyon metodu gösterilmiştir.

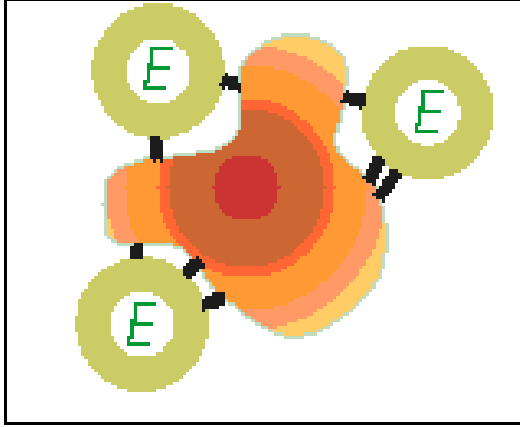


Şekil 1.6.6.1.1. İyonik bağlama ile immobilizasyon metodu

### 1.6.6.2. Kovalent Bağlama

İmmobilizasyon teknikleri içerisinde en uygun olanıdır ve bu teknikte destek maddesi ile enzim arasında kovalent bağ oluşur. Bu teknik enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözültüye geçmesini engeller. Kovalent bağlanma genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birincisi destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikincisi ise enzimin aktive olan destek maddesine kovalent bağlanması şeklindedir (Dizge ve ark. 2008, Taylor 1991).

Şekil 1.6.6.2.1.'de kovalent bağlama ile immobilizasyon metodu gösterilmiştir. Kovalent bağlanma metodu enzim ve suda-çözünmeyen taşıyıcının kovalent bağ ile bağlanması esasına dayanmaktadır. Bu bağlanma için kullanılan fonksiyonel gruplar; amino, karboksil, sülfidril, hidroksil, imidazol, fenolik, tiyol, treonin ve indol grupları olarak sıralanmaktadır. Kovalent bağlanma yöntemleri Çizelge 1.6.6.2.1.'de verilmiştir.



Şekil 1.6.6.2.1. Kovalent bağlama ile immobilizasyon metodu

Çizelge 1.6.6.2.1. Kovalent bağlanma yöntemleri

Kovalent bağlanma yöntemi	Destek maddesine bağlanma
Diazotlama Reaksiyonu	DESTEK – N = N – Enzim
Amid Bağı Oluşumu	DESTEK – CO – NH – Enzim
Alkilleme Reaksiyonu	DESTEK – CH <sub>2</sub> – NH – Enzim
Schiff Bazı Oluşumu	DESTEK – CH = N – Enzim
Amidinasyon reaksiyonu	DESTEK – CNH – NH – Enzim
Tiyol-Disülfür değişimi	DESTEK – S – S – Enzim
Bifonksiyonel kimyasallarla desteğe bağlanma	DESTEK – O(CH <sub>2</sub> )N = CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH = N – Enzim

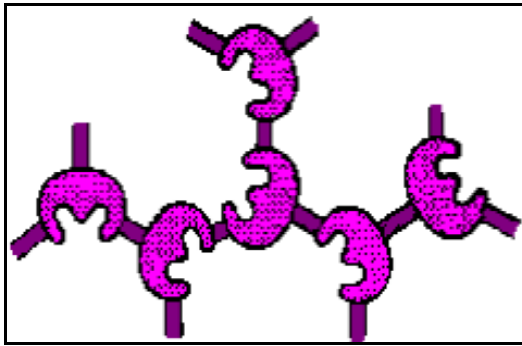
**KAYNAK: DİZGE, N. 2005.** Bitkisel yağ ve atıklarından yeni mikro poroz polimerik enzim reaktörleri ile biyodizel üretimi. 171 s.

Taşıyıcı ve enzim arasındaki bağlanmanın gücü kuvvetli olduğundan yüksek iyonik şiddete sahip substrat çözeltilerinin varlığında bile enzim kaçıışı meydana gelmez. Ancak kovalent bağlanma diğer immobilizasyon yöntemlerine göre daha pahalı ve karmaşık olup enzimin aktif merkezi ve konformasyonunda değişiklikler meydana getirebilmekte, böylece aktivite kaybına neden olabilmektedir (Taylor 1991).

### 1.6.6.3. Çapraz Bağlama

Enzim molekülleri başka bir destek maddesi olmadan da kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlanarak immobilize olabilirler. Bu metot üç boyutlu ağ örgülü çapraz bağlanmış enzim oluşumu esasına dayanmaktadır. Çapraz bağlanma ile enzim immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulumu zordur. Bu metodun en önemli avantajı tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki yada daha çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir (Taylor 1991).

Enzimlerin güçlü bağlanmalarından dolayı desorpsiyonları çok azdır. Enzimlerin immobilizasyonu proteinin moleküler içi, diğer protein molekülleriyle ya da suda çözünmeyen bir katı destek üzerindeki fonksiyonel gruplarla çapraz bağlanmasıyla gerçekleştirilmektedir. Bir enzimin kendisiyle çapraz bağlanması hem pahalı hem de proteinlerin bir kısmı destek maddesi olarak kullanılacağından etkisiz ve bağıl olarak düşük aktiviteye sahip metot olmaktadır. Bu nedenle genellikle çapraz bağlama diğer bir metodla beraber kullanıldığında çok elverişlidir. Şekil 1.6.6.3.1.'de çapraz bağlama ile immobilizasyon yöntemi gösterilmiştir.

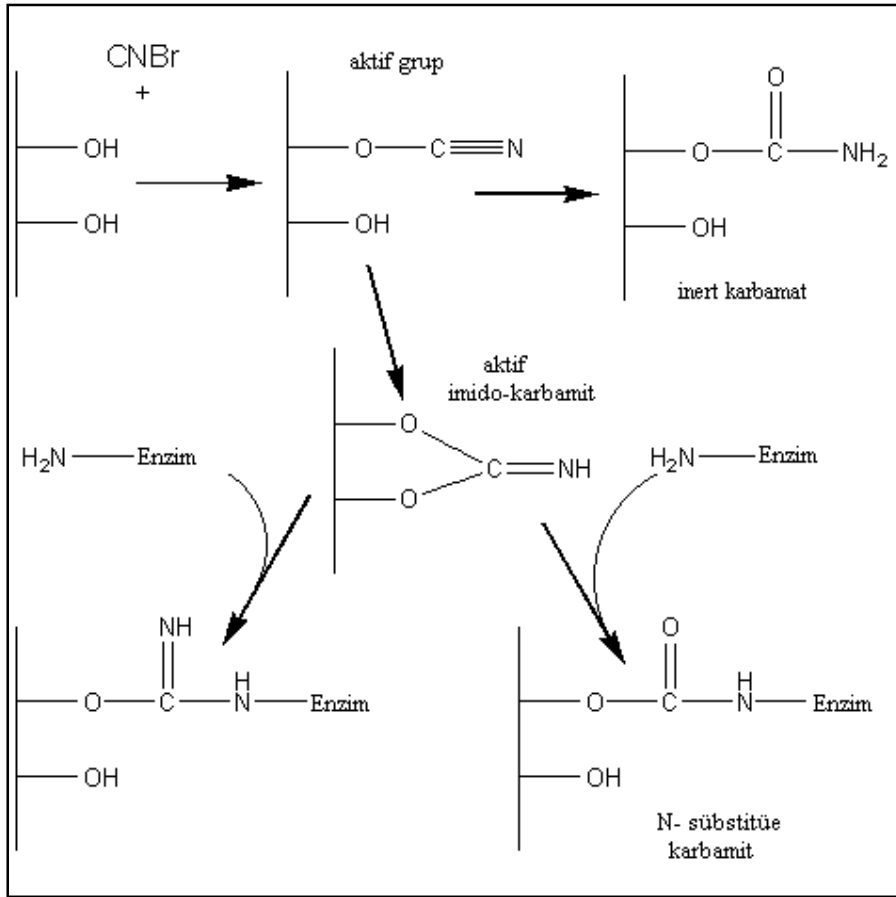


Şekil 1.6.6.3.1. Çapraz bağlama ile immobilizasyon metodu

## 1.6.7. Destek Maddesi Aktivasyon Yöntemleri

### 1.6.7.1. Siyanojen Bromür

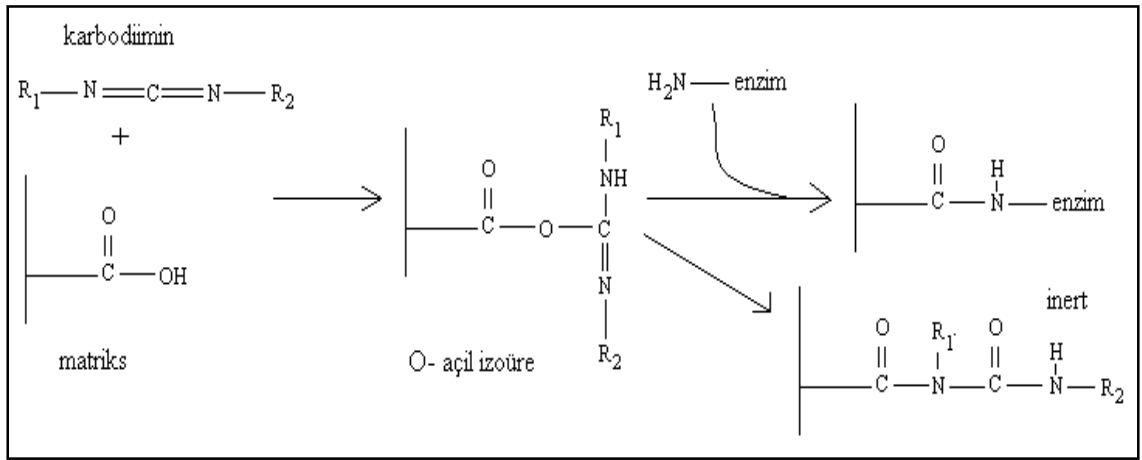
İlk olarak Axen ve grubu tarafından kullanılan CNBr metodu ile siyanojen bromür (CNBr) ile çeşitli polisakkaritlerin hidroksil grupları aktive edilerek enzimlerin amino gruplarıyla kovalent bağ oluşturmaları sağlanır. CNBr ile polisakkarit taşıyıcı materyallerinin aktivasyonu reçinenin nükleofilliğini arttırmak için kuvvetli bazik ortamda gerçekleştirilir. Şekil 1.6.7.1.1.'de reaksiyon şeması gösterilmiştir. Fakat kuvvetli bazik ortam CNBr hidrolizine ve taşıyıcı desteğe bağlanabilen reaktif siyanat esterlerin oluşumuna neden olur böylece yüksek oranda toksik belirteç miktarının fazla olmasına ve reaksiyonun düşük aktivasyon verimiyle sonuçlanmasına neden olur (Dizge 2005).



Şekil 1.6.7.1.1. Siyanojen bromür ile destek aktivasyon şeması

### 1.6.7.2. Karbodiimid Aktivasyonu

Destek maddelerinin karboksil grupları karbodiimid'ler ( $RNCNR_1$ ) ile aktive edilerek enzimlerin immobilizasyonunda kullanılırlar. Bu reaktif kararlı amid bağı vermek için başlıca aminlerle kondanse olabilen çok reaktif O-açilizoüre oluşumu için asidik pH değerlerinde ( $pH=4.75-5$ ) taşıyıcının karboksil gruplarıyla reaksiyona girer. Reaksiyon şeması Şekil 1.6.7.2.1.'de gösterilmiştir. Yaygın olarak kullanılan suda çözünebilen karbodiimid 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC)'dir (Dizge 2005).



Şekil 1.6.7.2.1. Karbodiimid ile destek aktivasyon şeması

### 1.6.7.3. Diazotlama

Aromatik primer amin grubu taşıyan polimerik taşıyıcılar diazonyum tuzu oluşturarak protein moleküllerini fenolik, imidazol ve serbest  $NH_2$  grupları üzerinden bağlayabilmektedir (Taylor 1991).

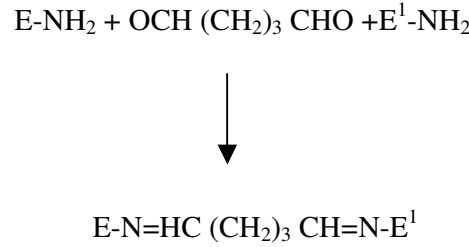
### 1.6.7.4. Alkilleme ve Arilleme

Destek maddelerinde bulunan fenolik, sülfidril veya serbest amino grupları alkilenerek destek maddeleri aktif duruma getirilirler. Özellikle halojen substitüe aromatik halkalar enzim molekülünü serbest amin grupları üzerinden bağlarlar. Serbest hidroksil grubu taşıyan doğal veya sentetik polimerler s-triklorotriazin ile aktive edilebilmektedirler. Arilleme ve alkilleme reaksiyonu açılmeden daha yavaştır ve

protonlanmamış nükleofillere gereksinim duyar. Dolayısıyla pH'ya çok bağımlıdırlar. (Taylor 1991).

### 1.6.7.5. Aldehit Kondenzasyonu

Amino grupları içeren destek maddeleri monomerik ya da polimerik glutaraldehit ile aktive edilerek enzimlerin desteğe kovalent olarak bağlanması sağlanır. Ticari olarak kullanılan aldehit türevi çapraz bağlayıcı reaktifler arasında, hızlı ve etkili bir protein bağlayıcı olduğu için glutaraldehit en çok tercih edilen reaktiftir. Şekil 1.6.7.5.1.'de enzim moleküllerinin glutaraldehit ile çapraz bağlama şeması gösterilmiştir.

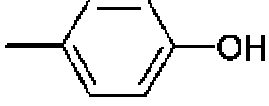
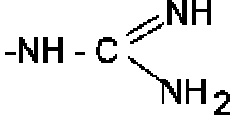
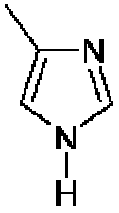
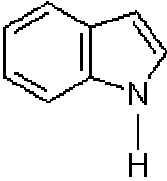


Şekil 1.6.7.5.1. Enzim moleküllerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanması

### 1.6.8. Destek Maddesine Enzim İmmobilizasyonu


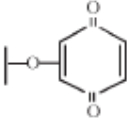
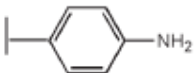
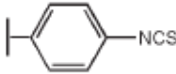
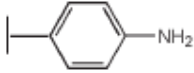
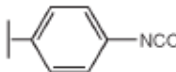
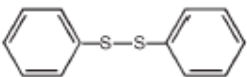
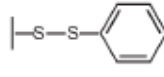
Enzimlerin destek maddelerine ılımlı reaksiyon koşullarında sağlam bir şekilde bağlanabilmesi için enzimdeki proteinin içerdiği fonksiyonel grup destek maddesinin yüzey yapısına uygun olmalıdır. Çizelge 1.6.8.1.'de proteinlerin içerdikleri fonksiyonel gruplar gösterilmiştir. Aynı zamanda protein immobilizasyonu için destek maddesi uygun bir fonksiyonel grupla kaplanarak daha sonra enzim ılımlı reaksiyon koşullarında destek maddesindeki fonksiyonel gruplar üzerinden bağlanabilir. Çizelge 1.6.8.2.'de protein immobilizasyonu için destek maddesinin fonksiyonel grupla kaplanması görülmektedir.

**Çizelge 1.6.8.1.** Proteinlerin içerdikleri fonksiyonel gruplar

Kimyasal yapı	Fonksiyonel grup	Aminoasit
-NH <sub>2</sub>	amin	alkalin amino asitler
-SH	sülfidril	sistein
-COOH	karboksil	asidik amino asitler
	fenolik	tirosin
	guanidin	arginin
	imidazolil	histidin
-S-S-	disülfür	sistein
	indole	triptofan
-S-CH <sub>3</sub>	tioeter	metionin
-CH <sub>2</sub> OH	metil	serin, treonin

**KAYNAK:** NOROUZIAN, D., 2003. Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology. Iranian Journal of Biotechnology, Vol. 1, No. 4, 197-206.

**Çizelge 1.6.8.2.** Protein immobilizasyonu için destek maddesinin fonksiyonel grupla kaplanması

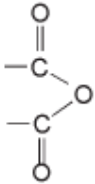
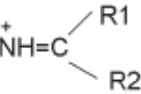

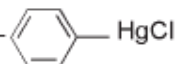
Destekteki nükleofilik grup	Aktivasyon işlemi	Aktif yüzey
$\begin{array}{ c} \text{-OH} \\ \text{-OH} \end{array}$	CNBr	$\begin{array}{ c} \text{O} \\ \text{C-NH} \\ \text{O} \end{array}$
$\begin{array}{ c} \text{-OH} \\ \text{-OH} \end{array}$	$\text{ClO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	$\begin{array}{ c} \text{O} \\ \text{CH-O} \\ \text{O} \end{array}$
$\begin{array}{ c} \text{-OH} \end{array}$		
$\begin{array}{ c} \text{-OH} \\ \text{-OH} \end{array}$	$\text{IO}_4^-$	$\begin{array}{ c} \text{-COH} \\ \text{-COH} \end{array}$
$\begin{array}{ c} \text{-NH}_2 \end{array}$	$\text{Cl}_2\text{CS}$	$\begin{array}{ c} \text{-NCS} \end{array}$
	$\text{Cl}_2\text{CS}$	
	$\text{Cl}_2\text{CO}$	
$\begin{array}{ c} \text{-CONHNH}_2 \end{array}$	$\text{NaNO}_2$	$\begin{array}{ c} \text{-CON}_3 \end{array}$
$\begin{array}{ c} \text{-COOH} \end{array}$	$\text{R-N}+\text{C}+\text{N-R}', \text{H}^+$	$\begin{array}{ c} \text{-COOH} \end{array}$
$\begin{array}{ c} \text{-COOH} \end{array}$	$\text{CH}_3\text{OH}, \text{NH}_2\text{NH}_2, \text{HNO}_2$	$\begin{array}{ c} \text{-CON}_3 \end{array}$
		

**KAYNAK:** NOROUZIAN, D., 2003. Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology. Iranian Journal of Biotechnology, Vol. 1, No. 4, 197-206.



Enzim immobilizasyon yöntemleri içinde özellikle kovalent bağlama yönteminde proteinin içerdiği fonksiyonel grup daha da önemli hale gelmektedir. Çizelge 1.6.8.3.'de proteinlerin destek maddesi üzerine kovalent bağ ile bağlanması gösterilmiştir.

**Çizelge 1.6.8.3.** Proteinlerin destek maddesi üzerine kovalent bağ ile bağlanması

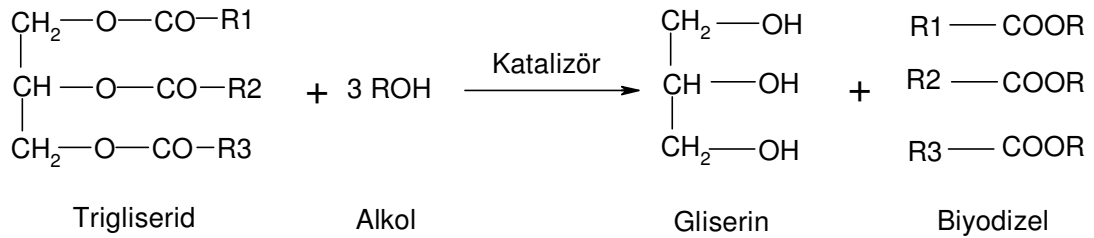
Bağlama reaksiyonu	Proteindeki reaktif grup	Desteğe bağlanma yöntemi
$-O-CH_2-CH_2-SO_2-CH+CH_2$ 	$-NH_2$ $-SH$ $-OH$	Konjugasyon
$-CHO$ Aldehid	$-NH_2$	Schiff bazı
$+NH=C$  İminium	$-CH_2H$ $-NH_2$	Ugi reaksiyonu
$\begin{array}{c} NH \\    \\ -C-OC_2H_5 \end{array}$ İmidoester	$-NH_2$	Amidınasyon
$-S-S-$  Disulfid formasyonu	$-SH$	Tiyodisülfür iç değişimi
	$-SH$	Cıva-enzim reaksiyonu

**KAYNAK:** NOROUZIAN, D., 2003. Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology. Iranian Journal of Biotechnology, Vol. 1, No. 4, 197-206.

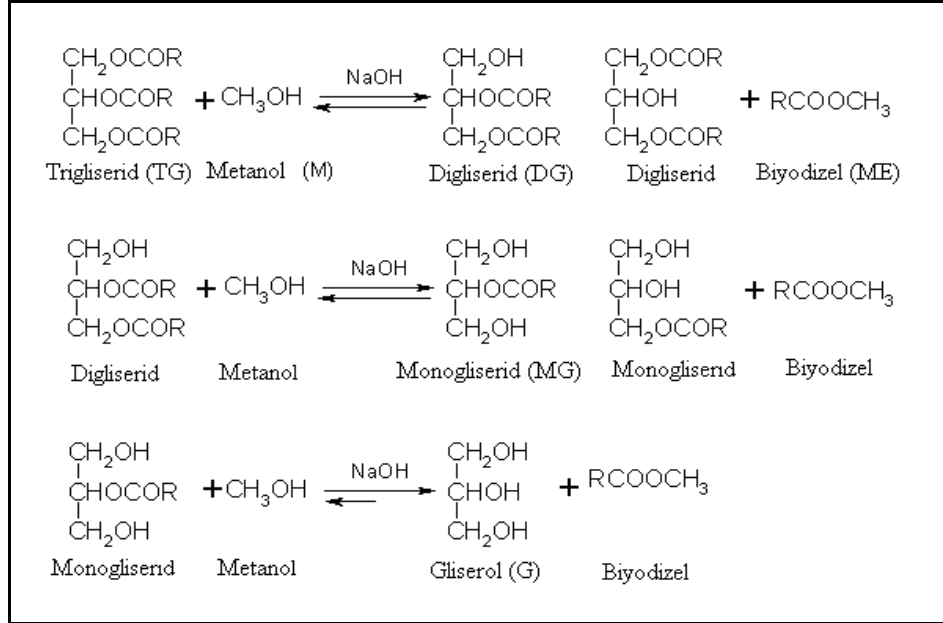
## 1.7. BİYODİZEL

Ayçiçek, soya, kolza ( kanola), aspir gibi yağlı tohum bitkilerinden elde edilen yağların veya hayvansal yağların asidik, bazik veya enzimatik bir katalizör eşliğinde metanol gibi kısa zincirli bir alkol ile reaksiyonu sonucu açığa çıkan yağ asidi metil esterleri biyodizel olarak adlandırılırlar (Ranganathan ve ark. 2008, Fukuda ve ark. 2001). Evsel kızartma yağları ve hayvansal yağlar da biyodizel hammaddesi olarak kullanılabilir. Enzimatik ve süper kritik yöntemle de biyodizel elde etmek mümkün olmasına rağmen biyodizel üretiminde kullanılan en yaygın yöntem transesterifikasyon yöntemidir. Transesterifikasyon reaksiyonunda yağ, monohidrik bir alkolle (etanol, metanol), katalizör (asidik, bazik katalizörler ile enzimler) varlığında ana ürün olarak yağ asidi esterleri ve gliserin vererek esterleşir (Ma ve Hanna 1999).

Stokiyometrik transesterifikasyon yönteminde bir mol yağ için üç mol mono alkol kullanılır. Ürünler ise üç mol yağ asidi mono alkil esteri (biyodizel) ve yan ürün olan bir mol gliserindir. Şekil 1.7.1.'de reaksiyon şeması görülmektedir. Metanol, gibi alkoller transesterifikasyon yönteminde kullanılabilir ve elde edilen ürün sırasıyla metil ester adını alır. Ayrıca esterleşme reaksiyonunda yan ürün olarak di ve monogliseridler, reaktan fazlası ve serbest yağ asitleri oluşur. Şekil 1.7.2.'de baz katalizli transesterleşme reaksiyon mekanizması verilmiştir. Reaksiyonu hızlandırmak için baz (NaOH, KOH), asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl) veya enzim (biyolojik katalizör) kullanılabilir. Asit ve enzim katalizörler, baz katalizörlere oranla çok daha yavaşlardır.



**Şekil 1.7.1.** Stokiyometrik transesterifikasyon reaksiyon şeması



Şekil 1.7.2. Baz katalizli transesterleşme reaksiyon mekanizması verilmiştir.

Biyodizel (Yağ Asitleri Metil Esteri) saf olarak kullanılabilceği gibi petrolden elde edilen dizel yakıtla belirli oranlarda karıştırılarak da kullanılabilir. Biyodizelin hammadde kaynakları, bitkisel ve hayvansal yağlar ile bunların kullanılmış atıklarıdır.

Dünyada toplam 108 milyon ton bitkisel yağ üretilmekte olup bunun 6 milyon tonu biyodizel üretiminde kullanılmaktadır. Esasen Dünyada üretilen tüm bitkisel yağların tamamı biyodizele çevrilse dünya dizel yakıt ihtiyacının ancak %7'sini karşılayabilmektedir (<http://www.albiyobir.org.tr/biyodizel.htm>, 2008).

### 1.7.1. Biyodizel Özellikleri

Biyodizel yakıt dizel motorlarda herhangi bir değişiklik yapılmadan kullanılabilir. Biyodizelin herhangi bir problemle karşılaşmadan etkin bir şekilde kullanılabilmesi için belirlenmiş uluslar arası standartlara uyması gerekmektedir. Enerji piyasası düzenleme kurumu tarafından yayınlanan ve 01.01.2006 tarihinde yürürlüğe giren tebliğe göre otomotiv yakıtları için TS EN 14214 otomotiv yakıtları yağ asidi metil esterleri (YAME) dizel motorlar için belirlenen özellikler ve deney yöntemleri standartları Çizelge 1.7.1.1.'de yakıt olarak kullanılan biyodizel için ise TS EN 14213 ısıtma yakıtları yağ asidi metil esterleri (YAME) standartları Çizelge 1.7.1.2.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.7.1.1.** TS EN 14214 otomotiv yakıtları yağ asidi metil esterleri (YAME) dizel motorlar için belirlenen standart özellikler

Analiz Adı	Birim	En Az (min.)	En Çok (max.)	Deney Yöntemi
Ester muhtevası	% (m/m)	96,5	-	EN 14103
Yoğunluk , 15°C'ta	kg/m <sup>3</sup>	860	900	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viskozite , 40°C'ta	mm <sup>2</sup> /s	3,5	5	EN ISO 3104
Parlama noktası	°C	120	-	EN ISO 3679
Kükürt muhtevası	mg/kg	-	10	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Karbon kalıntısı (%10 damıtma kalıntısında)	% (m/m)	-	0,3	EN ISO 10370
Setan sayısı		51		EN ISO 5165
Sülfatlanmış kül muhtevası	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Su muhtevası	mg/kg	-	500	EN ISO 12937
Toplam kirlilik	mg/kg	-	24	EN 12662
Bakır şerit korozyonu (50°C'ta 3 saat)	derece	1	-	EN ISO 2160
Oksidasyon kararlılığı , 110°C'ta	h	6	-	EN 14112
Asit sayısı	mg KOH/g	-	0,5	EN 14104
İyot sayısı	g iyot/100 g	-	120	EN 14111
Linolenik asit metil esterleri	% (m/m)	-	12	EN 14103
Metanol muhtevası	% (m/m)	-	0,2	EN 14110
Monogliserit muhtevası	% (m/m)	-	0,8	EN 14105
Digliserit muhtevası	% (m/m)	-	0,2	EN 14105
Trigliserit muhtevası	% (m/m)	-	0,2	EN 14105
Serbest gliserol	% (m/m)	-	0,02	EN 14105 EN 14106
Toplam gliserol	% (m/m)	-	0,25	EN 14105
Grup I metalleri (Na+K)	mg/kg	-	5	EN 14108 EN 14109
Grup II metalleri (Ca+Mg)	mg/kg	-	5	prEN 14538
Fosfor muhtevası	mg/kg	-	10	EN 14107
Soğuk Filtre Tıkanma Noktası (CFPP)		-	-10	EN 116

**KAYNAK:** Türk Standartları Enstitüsü (TSE)

**Çizelge 1.7.1.2.** TS EN 14213 ısıtma yakıtları yağ asidi metil esterleri (YAME) standartları

Analiz Adı	Birim	En Az (min.)	En Çok (max.)	Deney Yöntemi
Ester muhtevası	% (m/m)	96,5	-	EN 14103
Yoğunluk , 15°C'ta	kg/m <sup>3</sup>	860	900	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viskozite , 40°C'ta	mm <sup>2</sup> /s	3,5	5	EN ISO 3104 ISO 3105
Parlama noktası	°C	120	-	EN ISO 3679
Kükürt muhtevası	mg/kg	-	10	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Karbon kalıntısı (%10 damıtma kalıntısında)	% (m/m)	-	0,3	EN ISO 10370
Sülfatlanmış kül muhtevası	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Su muhtevası	mg/kg	-	500	EN ISO 12937
Toplam kirlilik	mg/kg	-	24	EN 12662
Oksidasyon kararlılığı , 110°C'ta	h	4	-	EN 14112
Asit sayısı	mg KOH/g	-	0,5	EN 14104
İyot sayısı	g iyot/100 g	-	130	EN 14111
Monogliserit muhtevası	% (m/m)	-	0,8	EN 14105
Diğliserit muhtevası	% (m/m)	-	0,2	EN 14105
Trigliserit muhtevası	% (m/m)	-	0,2	EN 14105
Serbest gliserol	% (m/m)	-	0,02	EN 14105 EN 14106
Soğuk filtre tıkanma noktası (SFTN)	°C		*	EN 116
Akma noktası	°C		0	ISO 3016
Net yanma ısısı (hesaplanmış)	MJ/kg	35	-	DIN 51900-1 DIN 51900-2 DIN 51900-3

\* 01.04-30.09 (± 15 gün) min. +5°C / 01.10.31.03 (± 15 gün) max.-10° C

**KAYNAK:** Türk Standartları Enstitüsü (TSE)

Çevresel, ekonomik ve teknik özellikler düşünüldüğünde biyodizel yakıtların sahip olduğu özellikler Çizelge 1.7.1.3.'de özetlenmiştir. Dizel yakıt ile biyodizel yakıtın özellikleri karşılaştırıldığında aralarında çok büyük farklar olmadığı görülmektedir. Dizel yakıt ile biyodizel yakıt özelliklerinin karşılaştırılmasını içeren tablo Çizelge 1.7.1.4.'de görülmektedir.

**Çizelge 1.7.1.3. Biyodizel yakıtın özellikleri**

<b>Biyodizel Yakıtın Özellikleri</b>
Çevre dostu bir yakıttır
Yenilenebilir hammaddelerden elde edilebilmektedir
Atık bitkisel ve hayvansal yağlardan üretilebilir
Anti-toksik etkiye sahiptir
Biyolojik olarak hızlı ve kolay bozunabilmektedir
Kanserojenik madde ve kükürt içermemektedir
Yüksek alevlenme noktası ile kolay depolanabilir, taşınabilir ve kullanılabilirler
Yağlayıcılık özelliği mükemmeldir
Motor ömrünü uzatır
Motor karakteristik değerlerinde iyileşme sağlar
Kara ve deniz taşımacılığında kullanılabilir
Isıtma sistemleri ve jeneratörlerde kullanıma uygundur
Stratejik özelliklere sahiptir
Mevcut dizel motorlarında hiçbir tasarım değişikliği gerektirmeden kullanılabilir
Ticari başarıyı yakalamış bir yeşil yakıttır
Petrol dizelin depolanma koşullarında depolanabilir
Küçük işletmelerde lokal olarak üretimi mümkündür
Petrol dizeline oranla daha iyi bir yağlayıcı olduğundan motorun ömrünü uzatır
Taşınması ve depolanması güvenli bir yakıttır. Ayrıca yüksek alevlenme noktasına (149 °C) sahiptir. Bu diğer petrol dizeli için 125 °C'dir
Üretimin tamamıyla yerli olabilmesi sebebiyle ithal bağımlılığını ortadan kaldırır
Amerika'da, Çevre Koruma Ajansı (EPA) Temiz Hava Kanunları (Clean Air Act) tarafından, çevre ve insan sağlığına diğer yakıtlara kıyasla daha az zarar verdiği kabul edilmiştir
Yerli üretim bitkisel yağlardan (ayçiçek yağı, soya yağı, kolza yağı ) kolaylıkla elde edilebilirler. Ayrıca kullanılmış ve çevre için zararlı olan kızartma atık yağlarından da biyodizel üretilebilmektedir

**KAYNAK:** ([http://www.eie.gov.tr/biyodizel/bd\\_teknikoz.html](http://www.eie.gov.tr/biyodizel/bd_teknikoz.html), 2008)

**Çizelge 1.7.1.4.** Dizel yakıt ile biyodizel yakıt özelliklerinin karşılaştırılması

<b>Yakıt Özellikleri</b>	<b>Motorin</b>	<b>Biyodizel</b>
Yakıt Standardı	ASTM D975	ASTM D6751-02
Isıl değer, Btu/gal	131.295	117.093
Kin. Viskozite, 40 ° C'de	1.9 – 4.1	1.9 – 6.0
Yoğunluk, lb/gal, 15 ° C'de	7.079	7.323
Su, % hacim	0.05	0.05
Karbon, % ağırlık	87	77
Hidrojen, % ağırlık	13	12
Oksijen, % ağırlık	0	11
Kükürt, % ağırlık	0.05	0.05
Alevlenme noktası, ° C	60 - 80	100 – 170
Bulutlanma noktası, ° C	-15 – 5	-3 – 12
Akma noktası, ° C	-35 – -15	-15 – 6
Setan sayısı	40 - 55	48 – 60

**KAYNAK:** ([http://www.eie.gov.tr/biyodizel/bd\\_teknikoz.html](http://www.eie.gov.tr/biyodizel/bd_teknikoz.html), 2008)

## 1.7.2. Biyodizel Üretim Yöntemleri

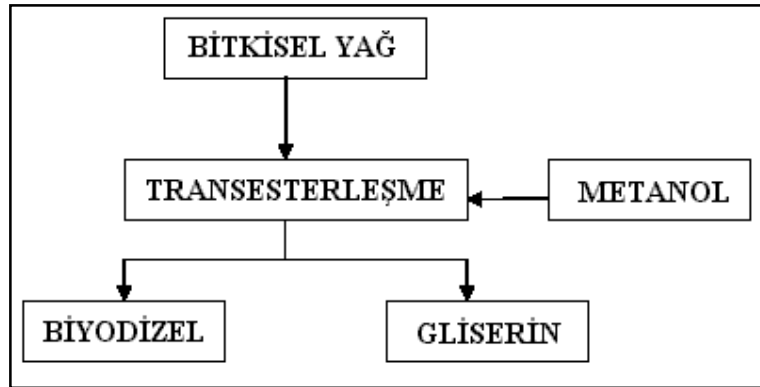
Bitkisel yağlardan biyodizel yakıt üretilmesinde piroliz, mikroemülsiyon ve transesterifikasyon olmak üzere başlıca üç yöntem kullanılmaktadır (Ma ve Hanna 1999).

Kraking olarak bilinen piroliz ısı etkisiyle kompleks yapıların basit bileşenlere dönüşmesi olayıdır. Yöntemde bitkisel yağ, vizkozitesinin düşmesi ve setan sayısının artması için yüksek ısıda parçalanmaktadır. Parçalanmış ürün alkan, alken ve karboksilik asitlerin karışımını içerir. Soya yağı, pamuk yağı ve kolza yağı ile diğer yağlar uygun katalizör beraberinde biyodizel olarak kullanılmak amacıyla parçalanmışlardır (Ma ve

Hanna 1999). Piroliz metodu yakıtın akış özellikleri ve vizkozitesindeki azalma nedeniyle avantajlı fakat yüksek maliyet, ayrıntılı fraksiyonlama basamakları ve yakıtın sülfür içermesi nedeniyle dezavantajlıdır (Ranganathan ve ark. 2008).

Mikroemülsiyon bir diğer biyodizel yakıt üretim tekniğidir. Bu yöntemde biyodizel mikroemülsiyonu uygun oranlarda bitkisel yağ, dizel yakıt, alkol, surfaktan ve setan sayısını artırıcı madde içerir. Yöntemde metanol, etanol ve propanol gibi alkoller vizkozite düşürücü olarak, daha yüksek alkoller ise surfaktan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca alkil nitratlar setan sayısının artması amacıyla karışıma eklenir. Mikroemülsiyon metodunda düşük vizkozite, yüksek setan sayısı ve iyi sprey özellikleri yöntemin olumlu yönlerini oluştururken özellikle uzun süreli kullanımlarda enjektörde meydana gelen ateşleme problemleri, karbon birikimi ve tamamlanmamış yanma yöntemin olumsuz yönlerini oluşturmaktadır (Ma ve Hanna 1999).

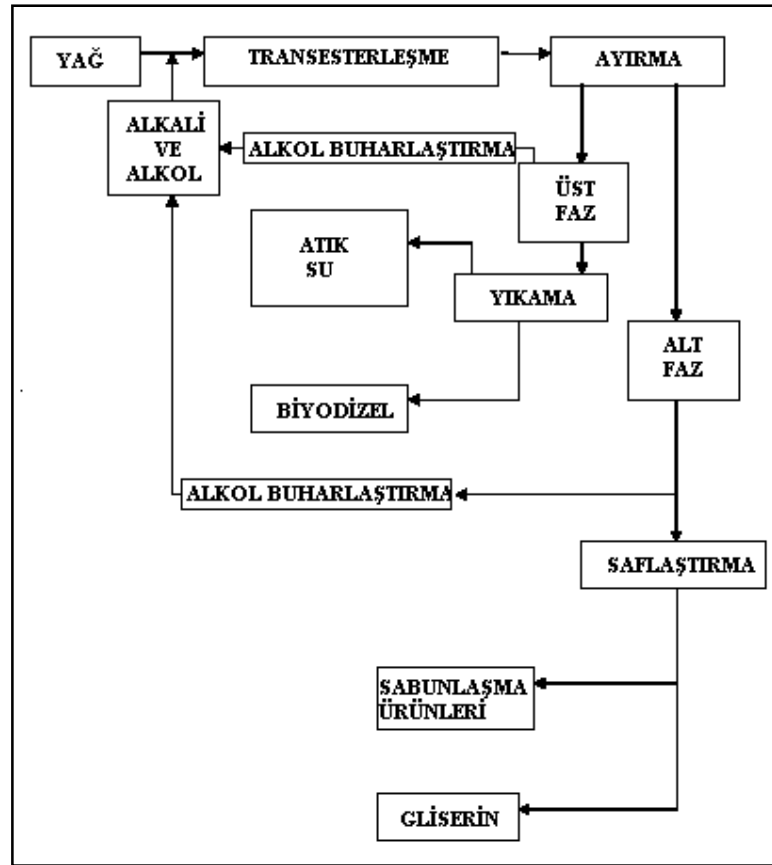
Biyodizel üretiminde en popüler yöntem ise bitkisel yağların transesterleştirilmesidir. Bu yöntemde biyodizel yakıt yüksek yağ asitlerinin mono alkil ester karışımını içerir. Reaksiyonda yüksek vizkoziteye sahip gliserol ayrılarak düşük vizkoziteye sahip fosil yakıtı benzer yakıt elde edilir. Transesterleşme metodu alkali katalizör, asit katalizör, biyokatalizör, heterojen katalizör yada süperkritik alkol gibi çeşitli katalizörler kullanılarak yapılabilmektedir (Ma ve Hanna 1999, Fukuda ve ark. 2001). Genel reaksiyon bitkisel yağ ve alkolün katalizör beraberinde yağ asidi alkil esterleri ve gliserin oluşturmasıdır. Şekil 1.7.2.1.'de transesterleşme yöntemiyle biyodizel üretim şeması görülmektedir.



Şekil 1.7.2.1. Transesterleşme yöntemiyle biyodizel üretim şeması



Alkali katalizör metodunda sodyum hidroksit (NaOH) yada potasyum hidroksit (KOH) metanol yada etanol beraberinde katalizör olarak kullanılarak bitkisel yağın biyodizel ve gliserole dönüşmesi sağlanır. Reaksiyon sonunda gliserol yoğunluğunun fazla olması nedeniyle dipte toplanır. Şekil 1.7.2.2.'de alkali katalizör yöntemiyle biyodizel üretim şeması görülmektedir. Yöntem yüksek ester dönüşümü, düşük sıcaklıkta (60°C) gerçekleşmesi, üretim maliyetinin düşük olması ve kısa sürede sonlanması gibi avantajlarının yanında gliserolün ayrılmasındaki güçlükler, reaksiyon ortamının serbest asit yada su içermesi durumunda sabunlaşma görülmesi ve ürün saflaştırılmasının zorlaşması gibi dezavantajlara sahiptir. (Ma ve Hanna 1999, Fukuda ve ark. 2001, Barnwal ve Sharma 2005).



Şekil 1.7.2.2. Alkali katalizör yöntemiyle biyodizel üretim şeması

Transesterleşme metodu ile biyodizel üretilmesinde kullanılan bir başka yöntem ise asit katalizör kullanılmasıdır. Yöntemde herhangi bir mineral asidi kullanılabilmektedir. Sülfürik ve sülfonik asit metotta sıklıkla kullanılan asitlerdir. Yöntem yüksek oranda ester oluşturmaya rağmen asitlerin korozyon etkileri, motor parçalarının zarar görme ihtimali, ortamda bulunması muhtemel suyun girişim etkisi ve gliserolün ayrılmasındaki güçlükler gibi dezavantajlara sahiptir (Freedman ve ark. 1984).

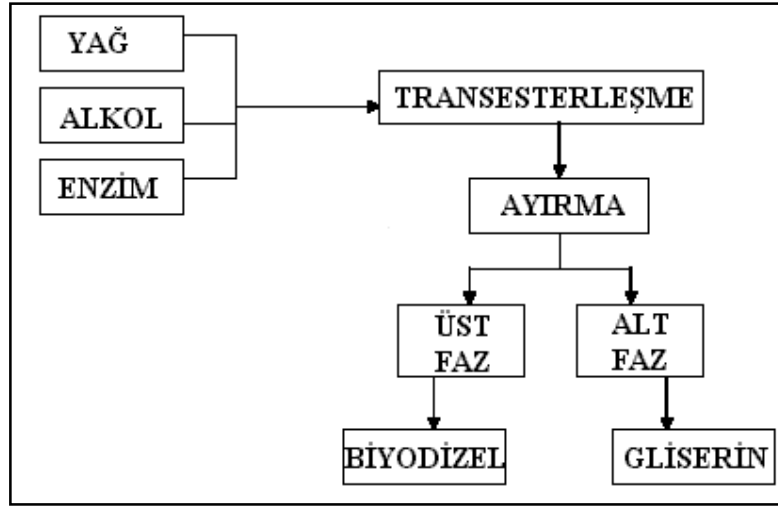
Biyodizel üretiminde amorf zirkon, titanyum, alüminyum ve potasyum dolgulu zirkonlar gibi heterojen katalizörlerin kullanıldığı transesterleşme metodunda oldukça popüler olmuştur. Araştırmalar halen ilerleme aşamasında olup yöntemde karşılaşılan katalizörün tükenmesi ve yüksek ester dönüşümü sağlanması gibi problemlerin çözülmesine çalışılmaktadır (Furuta ve ark. 2006).

Transesterleşme prosesi katalizör kullanmadan da yapılabilmektedir. Yöntemde oldukça yüksek reaksiyon sıcaklığına ihtiyaç duyulmaktadır. 350°C nin altındaki sıcaklıklarda oldukça düşük ester dönüşümü gözlenmektedir. Fakat 400°C nin üzerindeki sıcaklıklarda esterlerde ısıl bozulmalar gözlemlendiği rapor edilmiştir (Demirbaş 2006).

Son dönemde transesterleşme metodunun lipaz enzimi gibi biyokatalizörlerle yapılması önemli hale gelmiştir. Biyodizel üretiminde biyokatalizör kullanılması endüstride yaygın olarak kullanılan alkali katalizör prosesinden gelen dezavantajları elimine ederek yüksek saflıkta ürün elde edilmesini sağlamıştır (Fukuda ve ark. 2001). Enzimatik biyodizel üretiminde hem hücre dışı (extracellular) hem de hücre içi (intracellular) lipazların kullanılması mümkündür. Extracellular lipaz enzimleri kullanılarak yapılan transesterifikasyon çalışmalarında reaksiyon ortamında *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica* ve *Pseudomonas cepacia* gibi mikroorganizmalardan sentezlenen enzimler bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda daha ekonomik olması nedeniyle lipaz enzimlerini ihtiva eden mikroorganizmaların direkt kullanıldığı metot ise intracellular enzimatik yöntem ile biyodizel sentezlenmesi olarak adlandırılmaktadır (Marchetti ve ark. 2007, Ranganathan ve ark. 2008). Her iki yöntemde de enzimler uygun bir destek maddesine tutturularak defalarca kullanılabilmektedir (Dizge ve Keskinler 2008). Enzimatik transesterleşme metodunda şimdiye kadar bir çok alkol kullanılmasına rağmen en yaygın olanı düşük maliyeti

nedeniyle metanoldür. Yöntemin en önemli avantajı katalizör olarak kullanılan enzimin uygun bir destek maddesi üzerine bağlanarak herhangi bir ayırma gerektirmeden defalarca kullanılabilmesidir. Aynı zamanda diğer yöntemlere göre çalışma sıcaklığı oldukça düşük olup gliserolün ayrılması kolaydır. Reaksiyon sonunda yüksek saflıkta ester elde edilebilmektedir. Şekil 1.7.2.3.'de enzimatik biyodizel üretim şeması görülmektedir.

Şekil 1.7.2.3. Enzimatik biyodizel üretim şeması



Yakın gelecekte enzimatik biyodizel üretilmesinin endüstriyel boyutlarda uygulanması amaçlanmaktadır. Fakat üretim maliyetinin yüksek olması yöntemin en önemli dezavantajıdır. Araştırmacılar yöntemdeki problemlerin çözülmesi amacıyla çalışmalarını sürdürmektedirler. Çizelge 1.7.2.1.'de biyodizel üretim yöntemlerinin karşılaştırılması görülmektedir.

**Çizelge 1.7.2.1.** Biyodizel üretim yöntemlerinin karşılaştırılması

Özellik	Bazik kataliz	Enzimatik kataliz	Süperkritik alkol	Asidik kataliz
Reaksiyon sıcaklığı (°C)	60-70	30-40	239-385	55-80
Ham madde içindeki serbest yağ asidi	Sabunlaşma ürünleri	Metil esterler	Esterler	Esterler
Ham madde içindeki su	Reaksiyona girişim etkisi	Etki etmez	-	Reaksiyona girişim etkisi
Metil ester dönüşümü	Normal	Yüksek	İyi	Normal
Gliserin geri kazanımı	Zor	Kolay	-	Zor
Metil esterlerin saflaştırılması	Tekrarlı yıkama	Yok	-	Tekrarlı yıkama
Üretim maliyeti	Ucuz	Çok pahalı	Orta	Ucuz

**KAYNAK:** MARCHETTİ, J.M., V.U. MİGUEL, A.F. ERRAZU. 2007. Possible methods for biodiesel production. Renewable sustainable energy reviews, 11:1300-1311.

### 1.7.3. Türkiye de Biyodizel

Petrol ihtiyacının % 90'ının ithalat yoluyla karşılandığı ülkemizde biyodizel yakıtlara ilgi giderek artmaktadır. Türkiye'de biyodizel ile ilgili ilk çalışmalar Avrupa Birliğinden önce 1934 yılında Atatürk Orman Çiftliğinde yapılan "Bitkisel Yağların Tarım Traktörlerinde Kullanımı" adlı toplantıyla başlamıştır (<http://www.albiyobir.org.tr/biyodizel.htm>, 2008).

Türkiye'de biyodizel konusu dünyadaki gelişmelerin paralelinde 2000'li yılların başında gündeme gelmiş ve üniversitelerdeki çalışmalar hızla gelişmiştir. 2001 yılında Sanayi ve Ticaret Bakanlığında "Biyodizel Çalışma Grubu" oluşturulmuştur. İlk kez biyodizel ve ismi 4.12.2003 tarihinde 5015 Sayılı Petrol Piyasası Kanunu'nda harmanlanan ürünler arasında yer almıştır. Bu tarihten sonra biyodizel yakıtlara yönelik yatırımlar dünyaya paralel biçimde hızla artmıştır. 10.09.2004 tarihli ve 25579 sayılı resmi gazetede "Petrol Piyasasında Uygulanacak Teknik Kriterler Hakkında Yönetmelik ve 17/06/2004 tarihli Petrol Piyasası Lisans Yönetmeliği ile biyodizel akaryakıt olarak kabul edilmiş ve ithalatı, dağıtımı, taşınması ve son kullanıcıya satışı lisans kapsamına alınmıştır.

Elektrik İşleri Etüd İdaresi Genel Müdürlüğü tarafında 2003 yılında teklif edilen Biyodizel Standartları (TSEN 14214 ve TSEN 14213) 2005 Eylül ve Ekim ayında TSE tarafından AB standartlarının aynı olarak TSE Standardı olarak yayınlanmıştır. EPDK 05.01.2006 tarihli tebliğleri ile Motorin Türlerinin Üretimi, Yurtdışı ve Yurtiçi Kaynaklardan Temini ve Piyasaya Arzına İlişkin Teknik Düzenleme Tebliği kapsamında biyodizelin % 5'e (% v/v) kadar motorin ile harmanlama yapılmasına imkan tanımıştır. Ayrıca Otobiyodizel'in üretimi, Yurtdışı ve Yurtiçi Kaynaklardan Temini ve Piyasaya Arzına İlişkin Teknik Düzenleme Tebliği ile Otobiyodizelde TS EN 14214 standartları aynen kabul edilmiştir. Yakıtbiyodizel'in üretimi, Yurtdışı ve Yurtiçi Kaynaklardan Temini ve Piyasaya Arzına İlişkin Teknik Düzenleme Tebliği ile de TS EN 14213 standardı kabul etmiştir. Bu tebliğ ile yakıt biyodizelin kırmızıyla işaretlenerek piyasaya sunulması kararlaştırılmıştır. Bunun yanında 05/01/2006 tarih ve 630/26 sayılı Kurul Kararı ile biyodizel üreticileri biyodizel işleme lisansı kapsamına alınmıştır (<http://www.albiyobir.org.tr/biyodizel.html>, 2008).

Ülkemizde petrol piyasasında faaliyet gösteren rafinerici ve dağıtıcılar, tamamen yerli tarım ürünlerini kullanarak üretim yapan biyodizel üreticilerinden temin edecekleri biyodizeli akaryakıt ile en az yüzde iki oranında harmanlayabilmektedirler. Harmanlama oranları ile ilgili denetimler EPDK tarafından yapılmaktadır. Atık bitkisel yağlardan biyodizel üretimi EPDK'dan alınacak Biyodizel İşleme Lisansı dışında T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı'nın Bitkisel Atık yağların Kontrolü Yönetmeliği'ne uygun olarak E.İ.E ve Tübitak'tan alınacak Teknik Uygunluk raporlarının EPDK'ya işlenmesi sonucunda da yapılabilmektedir.

Bugün Türkiye'de 1,5 milyon ton kurulu biyodizel kapasitesi bulunmaktadır. Bu verilerle ülkemiz kurulu biyodizel üretim kapasitesi itibarı ile Almanya'dan sonra Dünyada ikincisi sırada yer almaktadır. Türkiye'de 150' ye yakın biyodizel üreten firma olmasına karşın T.C. Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu verilerine göre ülkemizde lisans almış 55 biyodizel üreticisi mevcuttur (<http://www.epdk.gov.tr/lisans.html>, 2008).

Bu tesisler ülkemizin dört bir yanına dağılmıştır. Bölgesel yaygınlığı "Enerjinin Verimliliği" açısından son derece yararlı olduğu düşünülebilecek biyodizel yatırımı yapan firmalarımızın % 65'i tarımdan gelmiş ve bunların % 50'si yağ sıkma fabrikalarıdır. Bu dönüşümün ana sebebi atıl kapasitelerinin değerlendirilerek, sürekli

istihdam sağlayabilmektir. Tarımsal Üretici Birliklerimizde biyodizel konusuna ilgi duymakta ve girişimde bulunmaktadır.

#### 1.7.4. Dünya da Biyodizel

Rudolf Diesel (1858-1913), 1893'te bitkisel yağlara göre tasarladığı motorunun denemesini gerçekleştirmiş ve 1900 yılında Paris Dünya Fuarı'nda yakıt olarak yer fıstığının yağını kullanan motorunu sergilemiştir. R. Diesel 1911'de "Bitkisel yağların motor yakıtı olarak kullanımının tarımın gelişiminin ciddi bir katkısı olacağını" ifade etmiş ve 1912'de "Bitkisel yağların motorlarda kullanımı günümüzde önemsiz görünebilir, ancak bitkisel yağlar zamanla petrol ve kömür katranı kadar önem kazanacak" demiştir. Bitkisel yağların doğrudan yakıt olarak kullanımındaki zorluklara, petrol ürünlerinin kullanımının yaygınlaşması eklenince konu gündemden düşmüştür.

Ancak, Biyolojik yağların yakıt olarak kullanılabilmesi için bünyesindeki gliserinin uzaklaştırılması alanındaki akademik çalışmalar yinede devam etmiş ve bugün "BİYODİZEL" olarak adlandırılan yakıt için ilk patent Belçika'daki Brüksel Üniversitesi'nden G.Chavanne tarafından 31 Ağustos 1937 tarihinde alınmıştır.

1994'lü yıllarda yaşanan petrol krizleri alternatif enerji arayışlarını hızlandırmış ve "BİYODİZEL" tekrar gündeme taşınmıştır. Biyodizelin ön plana çıkmasıyla bu alandaki yatırımlar hızlanmıştır.

##### Dünyada Biyodizelin Süratle Yükselmesinin Sebepleri;

- Fosil yakıtların tükeniyor olması ve bu nedenle petrol fiyatlarının giderek yükselmesi
- Fosil yakıtların kullanımından doğan büyük çevre zararları ve bunların telafisi için yapılan büyük harcamalar
- Ülkelerin enerji kaynaklarını çeşitlendirme ve enerjide dışa bağımlılıktan kurtulabilme strateji ve çabaları
- Savaş ve zorunlu hallerde stratejik yakıt olma özelliği
- Tarım ürünlerinin sanayiye entegrasyonunu sağlayarak ülkelerin tarımsal kalkınmasını çarpan etkisiyle hızlandırması
- Motorlar üzerinde sağladığı avantajlar; setan sayısının petrol dizeline göre yüksek oluşu, yağlayıcılık özelliği nedeniyle motorlara yanma ve kullanım açısından sağladığı faydalar

-İnsan sağlığı ve çevreye zararlı bitkisel atık yağları geri kazanarak katma değer yaratması

-Taşıma ve depolanması itibarıyla dünya standartlarında “Tehlikeli Madde” kapsamında yer almaması, güvenli yakıt kabul edilmesi olarak ifade edilmesi olarak sıralanabilir.

AB’de 2003 yılından bu yana biyoyakıtlar ve biyodizel için pek çok özendirici ve teşvik edici çalışmalar yapılmaktadır. AB Komisyonu Şubat 2006’da Biyoyakıtlarla ilgili 3 ana amacı ifade eden bir stratejiyi hayata geçirmiştir. Bu amaçlar;

-AB’de ve gelişmekte olan ülkelerde biyoyakıtların daha fazla teşvik edilmesi, pozitif çevresel etkinin temin edilmesi

-Hammadde maliyetinin rekabet edilebilir bir seviyeye getirilmesi, 2. kuşak biyoyakıtların AR-GE çalışmaları ve pazara girmelerinin desteklenmesi

-Biyoyakıt hammaddesi ve biyoyakıtlarla ilgili gelişmekte olan ülkelerdeki fırsatların araştırılması

şeklinde sıralanmaktadır.

AB biyodizel stratejisi 7 politika ekseni üzerine oturtulmuştur. Bunlar;

1. Biyoyakıt üretim teşvikleri: Biyoyakıt Direktifinin 2006 revizyonu, biyoyakıtlarla ilgili vergi teşviki, biyoyakıtlar için ulusal hedeflerin belirlenmesi (zorunluluk), sürdürülebilir üretimin temini, kamu alımlarında temiz ve verimli taşıtların alınmasının teşvik edilmesi

2. Çevresel faydaların yakalanması :Biyoyakıtların CO<sub>2</sub> emisyon azaltım hesabındaki yerinin test edilmesi, Benzin ve motorindeki biyoetanol/biyodizel limitlerinin emisyonlarının test edilmesi

3. Biyoyakıtların üretim ve dağıtımının geliştirilmesi: Biyoyakıtlara dayalı kırsal gelişim politikaları ve uyumluluk konusunda üye ülkelerin cesaretlendirilmeleri

4. Hammadde üreticilerinin yaygınlaştırılması,enerji tarımının geliştirilmesi

5. Ticaret imkanlarının artırılması

6. Gelişmekte olan ülkelerin desteklenmesi: Tutarlı bir Biyoyakıt Yardım Paketinin geliştirilmesi. Ulusal biyoyakıt platformlarının ve bölgesel biyoyakıt hareket planlarının geliştirilmesine yardımcı olunması

7. Araştırma Geliştirme çalışmalarının desteklenmesi. Çerçeve Programı kapsamında biyoyakıtların desteklenmesi, biyoyakıt teknoloji platformlarının bir endüstri dalı olarak geliştirilmesinin cesaretlendirilmesi.

Bu çerçevede biyoyakıtları ve biyodizel sürekli desteklenmiş kapalı su havzalarında, orman arazilerinde, gıda işletmelerinde, maden ocaklarında, karbondioksit emisyonları yüksek kentlerde toplu taşımacılıkta zorunlu kullanımlar getirilmiştir. Üye ülkelerden ilerleme raporlarında ulusal hedefleri belirlemeleri istenmiştir. AB’de biyoyakıtlar enerji güvenliği, tarımsal kalkınma ve küresel ısınmayla mücadele açısından büyük önem taşımaktadır. Enerji politikalarında vergilendirmede “kirleten öder” kriterini kullanmaktadırlar. AB Biyoyakıt kullanım hedefleri 2007 yılında %5, 2010 yılında %7,75, 2020 yılında %20 ve 2030 yılında ise %30 olarak belirlenmiştir.

Almanya AB’de ve dünyada biyoyakıtlar ve biyodizel konusunda öncü bir ülkedir. Almanya’da biyoyakıtlar ve biyodizel “ Yenilenebilir Enerji Kaynaklarına Öncelik Tanıma Yasası” kapsamı içinde değerlendirilmektedir. 2007’den itibaren biyoyakıtlara kademeli vergi uygulamasına başlamış ancak biyodizelin çiftçi yakıtı olarak kullanımında vergi istisnası getirerek enerji tarımını desteklemiştir. Almanya’nın milyon tonluk biyodizel üretimini her geçen yıl artırmaktadır. Avrupa Birliğinde biyoyakıtların öncüsü olan Almanya 01.01.2007’den geçerli olmak üzere Enerji Vergisi Kanunu ile biyoyakıtlara mecburi kota getirmiştir. Buna göre motorinde %4,4 (Enerji Değeri = %5 Hacim), Benzinde %1,2 (2007), %2 (2008), 2,8 (2009), %3,6 (2010) dan itibaren zorunlu karışım getirilmiştir. 01.01.2007’den itibaren biyodizelde % 5 karışım zorunlu kılınmıştır.

Fransa’da yıllık üretim 450000 ton olup, vergiden muaf %5 harmanlamayla kullanılmaktadır. Peugeot, Citroen, Renault gibi otomobil firmaları yanı sıra TOTAL gibi petrol şirketlerinin desteklediği projelerle üretimi artırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Avusturya’da biyodizel alanında bilinçli araştırmalar yapılarak hammadde organizasyonu sağlanmıştır. Ülkede yıllık 100000 ton olan biyodizel üretimi program çerçevesinde her yıl artırmakta ve Almanya’ya ihracat yapmaktadır.

İtalya 100000’den fazla nüfuslu yerleşim alanlarında belediye araçlarında biyodizel kullanımını teşvik ederek başlattığı projeyi başarıyla devam ettirmekte ve özellikle biyodizeli konut ısınması amacıyla desteklemektedir.



İspanya vergi teşviki yanı sıra özellikle ayçiçeği yağı kullanımını teşvik için biyodizeli AB standardı dışına çıkarmıştır. Tüm itirazlara rağmen iyot sayısını 140 değerinde tutarak kendi standardını uygulamaya devam etmektedir.

İngiltere bölgesel uygulama yapmakta, ülkenin bazı bölgelerinde biyodizel kullanımını vergiden muaf tutmaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri biyodizeli "Enerji Arzında Güvenliği Ulusal Güvenliğin Unsuru" olarak gören ve "25x25" sloganıyla 2025 yılında toplam enerji tüketiminin % 25'ini yenilebilir enerjilerden karşılamayı hedefleyen ve bu yönde projeler geliştiren bir ülke olarak biyodizel konusunda kendi milli sistemini kurmuştur. Öncelikle, milli bitkisel yağı olan, soya yağına göre uygulanabilir ASTM-6751 standardını belirlemiştir. AB standardına göre daha basit ve piyasada uygulanabilir olan standartlarında sadece; biyodizelin yakıt özelliklerini almıştır. Ancak, bu standartların yaygınlaşması, biyodizel üreticilerinin adaptasyonu için 10 yıllık bir geçiş süreci koymuş olup, halen standart uygulaması zorunlu değildir. Bunda gerekçe; hem biyodizel üreticisinin piyasa koşullarında marka yapma gayretini teşvik etmek, hem de tüketiciyi bilinçlendirerek piyasanın kendi oto kontrol sistemini kurmasını sağlamaktır. ABD'de %5 biyodizel harmanlanmış B5 şekli istasyonlarda yaygın olarak satılırken, özellikle çiftçilere boyanmak suretiyle verilen ve vergiden muaf tutulan %100 biyodizel kullanımını teşvik edilmektedir.

Malezya Dünyanın en büyük palm yağı ihracatçısı olduğu gibi, önemli petrol rezervlerine sahip bir ülkedir. Malezya ülke çapında palm dikimine ciddi teşvikler getirmiş ayrıca biyodizel yatırımı için 73 firmaya yatırım lisansı vermiştir.

Brezilya biyoetanol de %80'lere varan kullanım oranıyla büyük bir başarıya imza atmış aynı zamanda biyodizel konusunda ciddi yatırımlar yapmıştır. Büyük ihracatçısı olduğu soya ve soya yağı kullanımını biyodizele kaydırmıştır. Ayrıca palm ağacı dikimini de teşvik ederek planlı gelişimini sürdürmektedir.

## 1.8. DENEYSEL DİZAYN

Dünyada ve ülkemizde modern analitik tekniklerin değişik araştırma alanlarında kullanımı hızla artmaktadır. Gelişen teknolojiye paralel olarak analitik cihazlardan elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve yorumlanması deneysel çalışmaları yapmak kadar büyük önem taşımaktadır. Üretilen veriler çok değişkene bağlı olarak elde ediliyorsa uygun veri değerlendirme metotlarının kullanılması zorunlu olmaktadır. Bu metotlar arasında 1970'li yıllardan sonra araştırma ve endüstriyel alanlarda kullanılmakta olan kemometrik yöntemler büyük yer işgal etmektedir. Kemometri; bilgisayar, istatistik ve matematiksel yöntemlerin kimyasal verilere uygulanması olarak tanımlanmaktadır. Ne var ki, tüm bu metotların limitleri ve varsayımları tam olarak anlaşılmadan kimyasal problemlerin çözümüne yönelik istatistiksel metotların kullanılması uygun olmamaktadır. Kimyasal veriler tek değişkenli olabildiği gibi çoğu zaman bir çok değişkene bağlı olabilmektedir. Bu değişkenlerin her birinin analiz başlangıcında eşit öneme sahip olduğu önemle düşünülen bir noktadır. Çok değişkenli verilerin analizinde çoğu zaman kemometrik metotlar kullanılmaktadır (Demir 1997).

Deneysel parametrelerin klasik yöntemlerle optimizasyonunda değişkenlerden biri sabit tutulurken diğer değişkenler farklı oranlarda alınarak bu değişkenlerin etkileri incelenir. Bu işlem her bir değişken için tekrarlanır. Fakat klasik yöntemlerde parametreler arasında da etkileşim olabileceği ve eğer etkileşim oluyorsa bu iki parametre arasındaki etkileşimin diğerlerini etkileyebileceği hesaplanamamaktadır. Bu nedenle bu yöntem yeterli olmamaktadır. Kemometrik tekniklerde ise; hangi parametreler etkilidir, bu parametrelerin etkisi ne kadardır ve bu parametrelerin etkileşim miktarları ne ölçüdedir gibi sorulara yanıt aranmaktadır. Bu amaca yönelik bir çok kemometrik optimizasyon tekniği geliştirilmiştir. Kemometrik optimizasyon tekniklerinde optimum koşulların sağlanabilmesi için deneysel dizaynlar oluşturulur. Bu dizaynlar deneysel çalışmanın planlı bir şekilde, zaman kaybı olmadan ve yeterli sayıda yapılmasını sağlar. Değişik amaçlara yönelik çeşitli deneysel dizayn yöntemleri geliştirilmiştir.

### 1.8.1. Merkezi kompozit Dizayn

Merkezi kompozit dizaynlar fraksiyonel faktöriyel dizayn, ful faktöriyel dizayn, star dizayn ve merkezi tekrar dizayn bileşiminden oluşmaktadır. Faktöriyel dizaynlar her bir faktörün etkilerini genel olarak inceleyen yöntemlerdir. Her bir faktörün optimum koşullarının bulunması merkezi kompozit dizayn yöntemi ile yapılır. (Brereton, 1990). Yapılacak deney sayısı 1.8.1.1.'deki formüle göre belirlenir.

$$\text{Deney sayısı} = 2^k + 2k + 1 \quad (k: \text{faktör sayısı}) \quad 1.8.1.1.$$

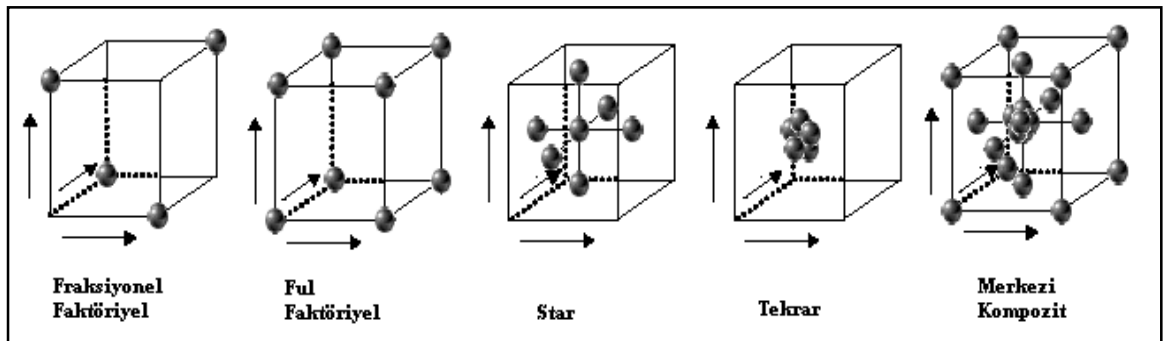
Formüldeki  $2^k$  full faktöriyel veya fraksiyonel faktöriyel dizayndaki deney sayılarını,  $2k$  star dizayn deney sayısını ve 1 ise orta seviyedeki deney sayısını gösterir.  $2^k$  daki seviyeler (-1) ve (+1),  $2k$ 'dakiler  $\pm\alpha$ , 1'deki ise (0) dır.  $\alpha$  değeri dairesel ve ortogonal dizayna göre farklı seviyeler alır. Şekil 1.8.1.1.'de deneysel dizayn noktaları gösterilmiştir.

Dairesel dizaynda  $\alpha$  1.8.1.2.'deki formüle göre hesaplanır.

$$\alpha = \mp \sqrt[4]{2^k} \quad 1.8.1.2.$$

Ortogonal dizaynda ise  $\alpha$  1.8.1.3.'deki formüle göre hesaplanır.

$$\alpha = \mp \sqrt{k} \quad 1.8.1.3.$$



Şekil 1.8.1.1. Merkezi kompozit dizayn noktaları (Her eksen bir faktöre karşılık gelmektedir)



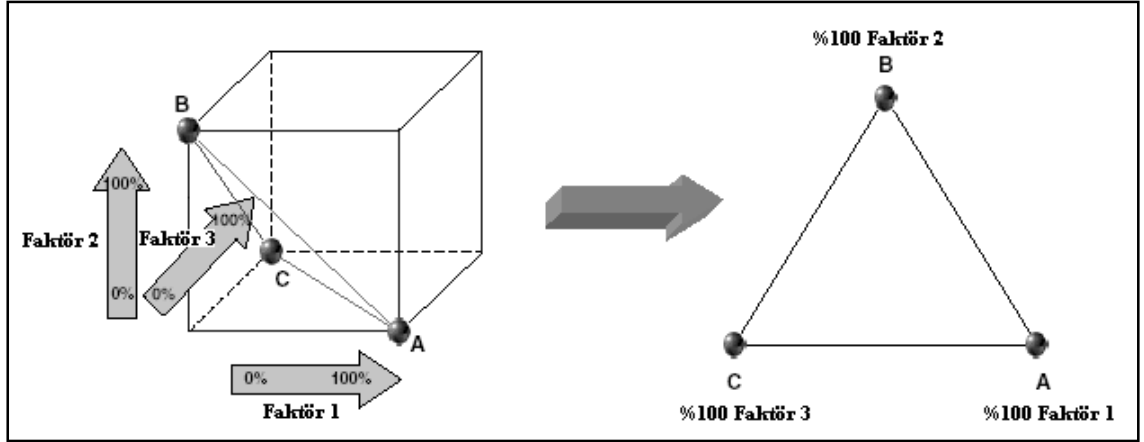
formülünden hesaplanır.  $b$  katsayıları doğru denkleminde yerine konulduğunda aşağıdaki model denklemi elde edilir.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad 1.8.1.6.$$

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

### 1.8.2. Karışım Dizayn

Karışım dizayn metodu uygulamalarında bir karışım söz konusudur. Bu karışım ikili, üçlü yada daha çok olabilir. Bahsedilen bu karışımlar daha çok ilaç sanayii, tekstil endüstrisi ve sıvı kromatografi tekniklerinde sıkça kullanılmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta kullanılan bu karışımların oranlarının hangi miktarlarda olacağıdır. Bu oranların bulunmasında karışım dizayn metodu kullanılır. Karışım dizaynında bileşenlerin toplamı belli bir rakama normalize olmak zorundadır. Yani  $N$  bileşen toplamı 100% yada 1 olmalıdır (Brereton, 1990). Şekil 1.8.2.1.'de üç bileşenli karışım dizayn şeması görülmektedir.



Şekil 1.8.2.1. Üç bileşenli karışım dizayn şeması görülmektedir.

Karışım dizaynı Simplex Centroid ve Simplex Lattice (Örgü) dizayn olmak üzere ikiye ayrılır.

### 1.8.2.1. Simplex Centroid Dizayn

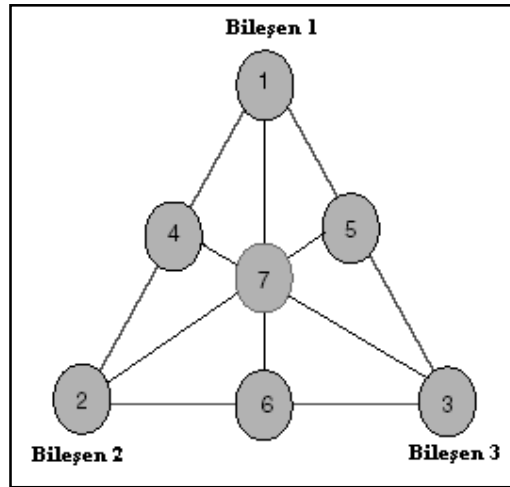
Her bir bileşen bir faktör olarak alınır. Faktör sayısı k olmak üzere  $(2^k-1)$  adet deney yapılır. Örneğin üç farklı bileşen içeren karışım için faktör sayısı  $k = 3$ 'tür. Böylece yapılması gereken deney sayısı  $(2^3-1= 7)$  olmalıdır.

Üç bileşenli karışıma ait simplex centroid karışım dizaynı aşağıdaki gibi uygulanabilir. Model şeması Şekil 1.8.2.1.1.'de gösterilmiştir.

Faktör sayısı (k) =3

Deney sayısı =  $2^3-1= 7$

Faktörler = 1, ½, 1/3, 0



Şekil 1.8.2.1.1. Üç bileşenli simplex centroid dizayn şeması

Üç bileşenli karışıma ait oluşturulan model denklemi aşağıdaki gibi oluşturulur.

$$y = c_0 + c_1x_1 + c_2x_2 + c_3x_3 + c_{11}x_1^2 + c_{22}x_2^2 + c_{33}x_3^2 + c_{12}x_1x_2 + c_{13}x_1x_3 + c_{23}x_2x_3 \quad 1.8.2.1.1.$$

Elde edilen üç bileşenli simplex centroid dizaynı Şekil 1.8.2.1.2.'deki gibi oluşturulur.

Deneyler	Bileşen 1	Bileşen 2	Bileşen 3
1)	1	0	0
2) <b>Tek bileşen</b>	0	1	0
3)	0	0	1
4)	1/2	1/2	0
5) <b>İkili</b>	1/2	0	1/2
6)	0	1/2	1/2
7) <b>Üçlü</b>	1/3	1/3	1/3

Şekil 1.8.2.1.2. Üç bileşenli simplex centroid dizaynı

### 1.8.2.2. Simplex Lattice (Örgü) Dizaynı

Bu dizayn yönteminde k faktör sayısını, m kombinasyon sayısını belirtmek üzere deney sayısı N aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$N = \frac{(k + m - 1)!}{(k - 1)!m!} \quad 1.8.2.2.1.$$

Üç bileşenli karışım için faktör sayısı  $k = 3$ ,  $m = 3$  için, 10 adet deney yapılması gerekir.

$$N = \frac{(3 + 3 - 1)!}{(3 - 1)!3!} = 10 \quad 1.8.2.2.2.$$

Bileşen 1, bileşen 2 ve bileşen 3'ten oluşan karışım için Simplex Lattice (Örgü) Dizaynı aşağıdaki gibi uygulanabilir.

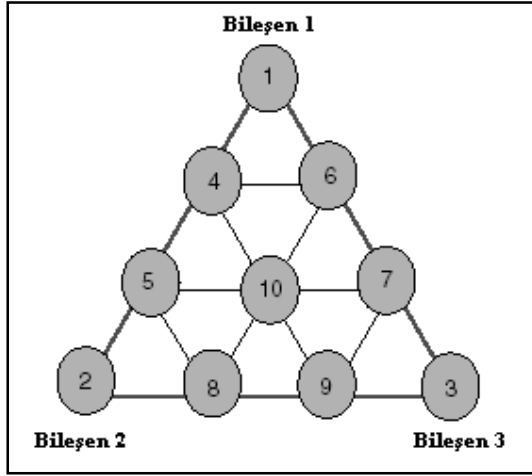
Faktör sayısı ( $k$ ) = 3,

Kombinasyon sayısı ( $m$ ) = 3,

Faktörler = 1, 1/3, 2/3, (3/3=1), 0

$$\text{Deney sayısı} = N = \frac{(3 + 3 - 1)!}{(3 - 1)!3!} = 10$$

10 deney için oluşturulan model şeması Şekil 1.8.2.2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.8.2.2.1. Üç bileşenli simplex lattice (örgü) dizayn şeması

Elde edilen üç bileşenli simplex centroid dizaynı Şekil 1.8.2.2.2.'deki gibi oluşturulur.

Deneyler	Bileşen 1	Bileşen 2	Bileşen 3
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	2/3	1/3	0
5	1/3	2/3	0
6	2/3	0	1/3
7	1/3	0	2/3
8	0	2/3	1/3
9	0	1/3	2/3
10	1/3	1/3	1/3

Şekil 1.8.2.2.2. Üç bileşenli simplex lattice (örgü) dizaynı

Karışım dizaynda oluşturulan deneysel dizayn tablosu mümkün olduğu kadar kare matrikse dönüştürülmesi uygundur. Böylece bileşenlerin birbirleri arasındaki etkileşimler de hesaplanmış olur.



## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

##### 2.1.1.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan enzimler ve özellikleri Çizelge 2.1.1.1.1.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1.1.1.1.** Çalışmada kullanılan enzimler ve özellikleri

Enzim	Enzim sınıfı	Katalog no	Aktivite	Üretildiği organizma
Lipozyme TL 100L	Lipaz	LAP40012	100000 IU/g	Aspergillus oryzae
Novozyme 388	Lipaz	LUN00250	20000 IU/g	Aspergillus oryzae
Novozym 435	Lipaz	LC200207	3000 IU/g	Candida Antarctica
Lipozyme TL-IM	Lipaz	LA350012	1000 IU/g	Thermomyces lanuginosus
Lipozyme RM-IM	Lipaz	LUX00205	4000 IU/g	Rhizomucor miehei

Çalışmada kullanılan yağ asidi metil esteri karışımı standartları Çizelge 2.1.1.1.2.'de kimyasal maddeler ise Çizelge 2.1.1.1.3.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.1.1.2.** Çalışmada kullanılan yağ asidi metil esteri karışımı standartları

Yağ asidi metil esteri	Ağırlıkça %	Üretici firma	Katalog (lot) no
Miristoleik asit metil esteri (C <sub>14:1</sub> )	1.966	Supelco	LB06978
Palmitoleik asit metil esteri (C <sub>16:1</sub> )	6.406	Supelco	LB16170
Erüsik asit metil esteri (C <sub>22:1 n9</sub> )	1.903	Supelco	LA59119
Metil oktanoat (C <sub>8:0</sub> )	1.898	Supelco	LB10691
Metil dekanoat (C <sub>10:0</sub> )	3.201	Supelco	LB09544
Metil laurat (C <sub>12:0</sub> )	6.381	Supelco	LA39880
Metil tridecanoat (C <sub>13:0</sub> )	3.195	Supelco	LB16654
Metil miristat (C <sub>14:0</sub> )	3.268	Supelco	LB20367
Metil pentadekanoat (C <sub>15:0</sub> )	1.893	Supelco	LB19252
Metil palmitat (C <sub>16:0</sub> )	12.972	Supelco	LB22304
Metil heptadekanoat (C <sub>17:0</sub> )	3.205	Supelco	LB18901
Metil stearat (C <sub>18:0</sub> )	6.491	Supelco	LB20333
Metil behenat (C <sub>22:0</sub> )	1.900	Supelco	LB09123
Cis-9-oleik metil ester (C <sub>18:1n9c</sub> )	19.534	Supelco	LB10389
Metil lineloat (C <sub>18:2</sub> )	12.991	Supelco	LB16171
Metil araşidat (C <sub>20:0</sub> )	1.901	Supelco	LA86718
Trans-9-elaidik metil ester (C <sub>18:1n9t</sub> )	2.599	Supelco	LA60932
Metil linoleat (C <sub>18:3</sub> )	6.383	Supelco	LB17201
Metil eikosenoat (C <sub>20:1</sub> )	1.914	Supelco	LB19001

**Çizelge 2.1.1.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler**

Kimyasal adı	Üretici firma	Katalog no
Stiren	ACROS	22053
Divinil Benzen	MERCK	803598
Potasyum Persülfat	FLUKA	60487
4- Aminoantipirin	MERCK	107293
Glutaraldehit %25	MERCK	820603
Potasyum Dihidrojen Fosfat	MERCK	104873
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	MERCK	105104
Coomassie Brilliant Blue G 250	MERCK	115444
Bovine Serum Albumine	SIGMA	A7906
Span 80	FLUKA	85548
Gum Arabic	SIGMA	G9752
Triton X-100	SIGMA	T9284
4-Nitrofenol	SIGMA	1048
4- Nitrofenilpalmitat	FLUKA	76166
Metanol	MERCK	106007
Etanol	SIGMA-ALDRICH	32221
1-propanol	MERCK	100996
1-butanol	MERCK	101990
2-propanol	MERCK	109634
t-Butanol	MERCK	822264
Ham kanola yağı	AYT	-
Celite 545	FLUKA	22140
Silika jel	MERCK	8634
1,2,3 tricaprogliserin	FLUKA	91022
Metil heptadekanoat (%99)	FLUKA	51635
Kalsiyum asetat	MERCK	102052
1,2,4-butantriol	FLUKA	19045
1,4 Butandiol (%99)	FLUKA	18960

**Çizelge 2.1.1.1.3. (Devam)** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal adı	Üretici firma	Katalog no
Wijs reagenti	FLUKA	35071
Heptan	SIGMA-ALDRICH	15677
Hekzan	MERCK	104368
N-methyl-N-trimethylsilyltriflorasetamid (MSTFA)	MERCK	841102
Sodyum Hidroksit	SIGMA-ALDRICH	41320
K5 TLC plak	WHATMAN	4850-820
Dietileter	MERCK	822270
Asetik asit (%98)	MERCK	100056
$\alpha$ -naftol	SIGMA	N-1000
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MERCK	100753
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%85)	MERCK	100557
HCl	MERCK	100314
HNO <sub>3</sub>	MERCK	100443
Metil oleat	FLUKA	75163
Gliserin (%99)	SIGMA	G-9012

**2.1.1.2. Çözeltiler**

- a) 1M 100 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O çözeltisi: 35,814 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O tartıldı ve saf su ile 100 ml' ye seyreltildi.
- b) 1M 100 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O çözeltisi: 15,601 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O tartıldı ve saf su ile 100 ml' ye seyreltildi.
- c) 0,1 M fosfat tamponu (pH: 7): 5,77 mL 1M 100 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O çözeltisi ile 4,23 mL 1M 100 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O çözeltisi karıştırıldı ve çözelti saf su ile 100 mL' ye seyreltildi.
- d) 0,1 M 100 mL KOH çözeltisi: 0,561 g KOH tartıldı ve etil alkol ile 100 ml' ye seyreltildi.
- e) 10 mg/mL metil heptadekanoat çözeltisi: 500 mg metil heptadekanoat tartıldı heptan ile 50 mL' ye seyreltildi.
- f) 1M 100 mL Ca(Ac)<sub>2</sub> (pH: 6) tampon çözeltisi: 15,8 g Ca(Ac)<sub>2</sub> tartıldı ve saf su ile 100 ml' ye seyreltildi. Asetik asit ile pH değeri 6 yapıldı.

- g) %10' luk enzim çözeltisi: 3 ml enzim balonjojeye alındı. 27 ml  $\text{Ca}(\text{Ac})_2$  pH: 6 tampon çözeltisi ile 30 mL'ye seyreltildi.
- h) Poliglutaraldehit çözeltisi: 10 mL % 25'lik glutaraldehit alındı. Saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. pH'sı 3 M NaOH ile 10,5'a ayarlandı ve 30dk karıştırıldı.
- i) 25 mM 50 mL paranitrofenilpalmitat (pNPP) çözeltisi: 0,4719 g pNPP tartıldı ve 2-propanol ile 50 mL'ye seyreltildi.
- i) 2M 10 mL 4-aminoantipirin: 4,065 g 4-aminoantipirin tartıldı ve metanol ile 10 mL'ye seyreltildi.

### 2.1.2. Çalışmada Kullanılan Aletler

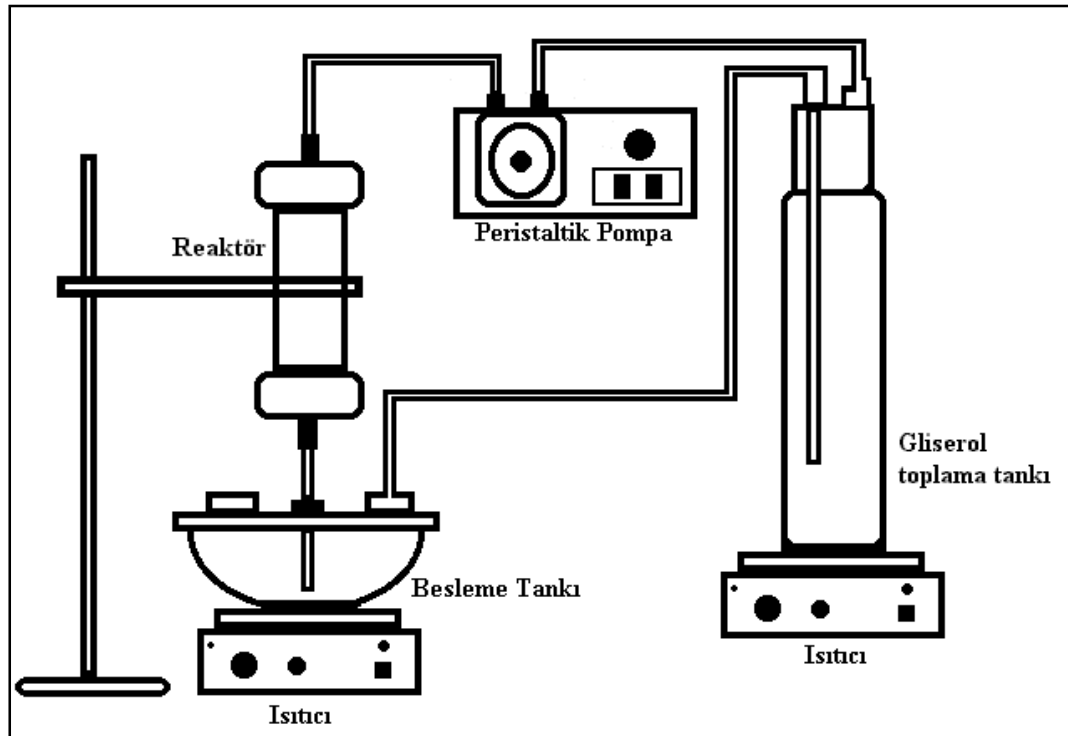
Çalışmada kullanılan araç ve gereçler Çizelge 2.1.2.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1.2.1.** Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

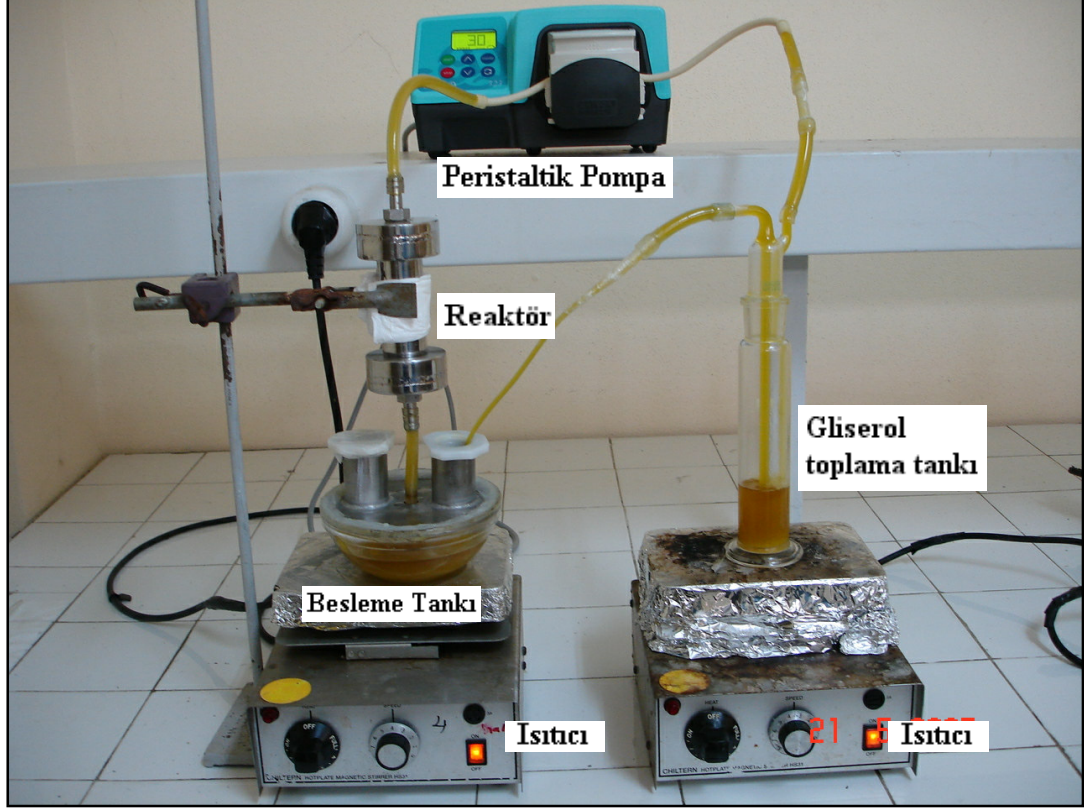
Araç-Gereç	Marka	Model
GC-MS	Shimadzu	QP5000
UV	Shimadzu	UV-2100
Elektron mikroskobu	Carl Zeiss	EVO 40
Fourier transform infrared spektrometresi (FTIR)	Thermo Nicolet	6700
pH-metre	Sartorius	PP-15
Manyetik karıştırıcı	Chiltern	HS-31
Isıtıcı	Chiltern	HS-31
Peristaltik pompa	Watson-Marlow	3235/D
Hassas terazi	Gec Avery	VA304
Mikroşırınga (5 µL)	Hamilton	7105
Otomatik pipet (1000 µL)	Eppendorf	100-1000
Otomatik pipet (200 µL)	Eppendorf	500-5000
Polipropilen saklama kabı	PE-LD	303-100
Santrifüj	Nüve	NF-615

### 2.1.3. Deney Düzeneği

Enzimatik yöntemle biyodizel üretiminde kullanılan deney düzeneđi Őeması ve deney düzeneđi resmi sırasıyla Őekil 2.1.3.1. ve Őekil 2.1.3.2.'de gösterilmiŐtir. Deney düzeneđinde 10 cm uzunluđunda 2,3 cm ić ćap, 2,8 cm dıŐ ćap ve 6 cm kapak ćapı ölçülerine sahip ćelik reaktör kullanılmıŐtır. Reaktörün hacmi 41,5 mL dir. Deney düzeneđinde 250 mL kapasiteli bir besleme tankı ve gliserol toplama tankı kullanılmıŐtır. Sıvı sirkülasyonu bir peristaltik pompa yardımıyla 5 mL/dk akıŐ hızıyla sađlanmıŐtır.



Şekil 2.1.3.1. Biyodizel üretiminde kullanılan deney düzeneği Şeması



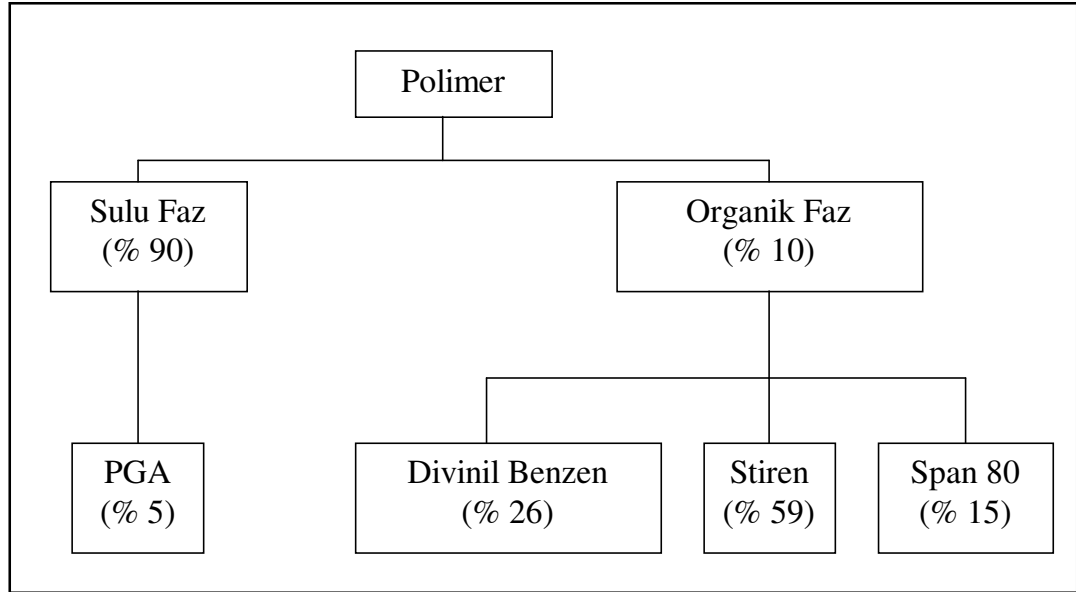
Şekil 2.1.3.2. Biyodizel üretiminde kullanılan deney düzeneği resmi

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Polimer Destek Maddesinin Hazırlanması

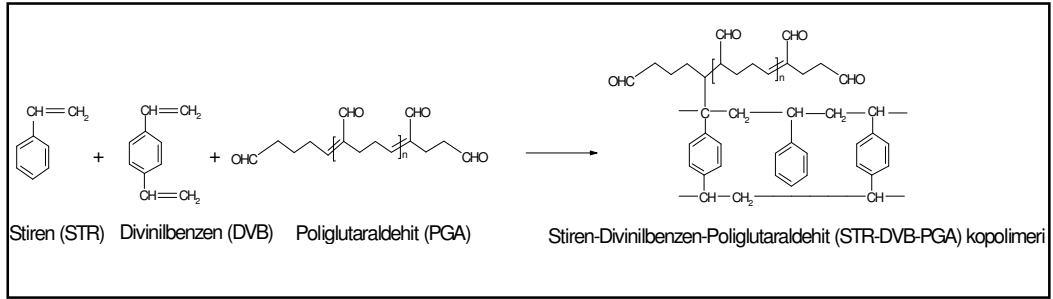
Deneysel çalışmada polimer destek maddesi olarak Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit polimeri kullanılmıştır. Polimer destek maddesi %90 su fazı ve %10 organik faz olmak üzere iki fazdan oluşmaktadır. Toplam 50 mL'lik hacmin 45 mL'sini su fazı, 5 mL'sini de organik faz oluşturmaktadır. Yüksek poroziteye sahip polimer sentezi iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Birinci basamak poliglutaraldehit sentezidir. Bu amaçla dış hacmi 50 mL olan polimer bloğunun üretimi için %25'lik

glutaraldehitten 5 mL alınarak 50 mL'ye seyreltilerek ortama 5 mL, 0.1 M NaOH ilave edilmiş ve 30 dak. 600 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırılarak Aldol kondenzasyon polimerizasyonu sağlanmıştır. İkinci basamakta aldol kondenzasyon polimerizasyonu ile elde edilen poliglutaraldehit çözeltisinden 45 mL alınarak çözelti içine radikalik polimerizasyon reaksiyonunu başlatmak için başlatıcı potasyum peroksidosülfattan 0.7 g konularak çözülmüştür. Bu çözelti % 59 stiren, % 26 divinilbenzen ve %15 span 80'den oluşan 5 mL'lik emülsiyon fazına ilave edilmiş ve şiddetli bir şekilde elle çalkalanmıştır. Polimerizasyon şeması Şekil 2.2.1.1.'de gösterilmiştir. Polimerizasyon reaksiyonu 80° C'lik etüvde gerçekleştirilmiş ve bu sıcaklıkta 3 saat etüvde kurutulduktan sonra polimer blok tüpten çıkartılarak 60-65 ° C'de 1 gün süre ile kurutulmuştur. Şekil 2.2.1.2.'de stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimer destek maddesinin polimerizasyon reaksiyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.2.1.1. Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimerizasyon şeması





**Şekil 2.2.1.2.** Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimer destek maddesinin polimerizasyon reaksiyonu

Şekil 2.2.1.3.'de Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimer destek maddesinin resmi görülmektedir.



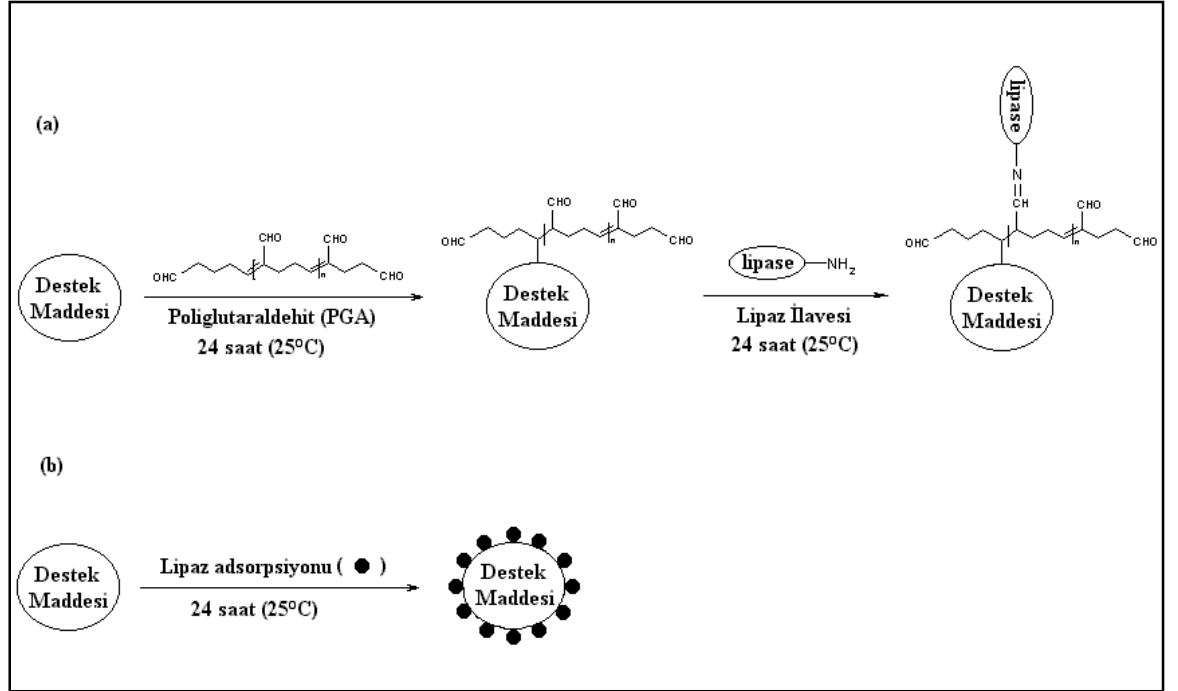
**Şekil 2.2.1.3.** Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimer destek maddesinin resmi

### **2.2.2. Polimer Destek Maddesinin Modifikasyonu**

Gözenekli stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimer destek maddesi uygun boyutlara getirilerek Şekil 2.1.3.2.'de görülen reaktöre yerleştirilmiştir. Daha sonra taze hazırlanmış poliglutaraldehit çözeltisi Şekil 2.1.3.2.'deki deney düzeneği kullanılarak 5 mL/dak debide 24 saat sirküle edilmiştir. Bu süre sonunda STR-DVB-PGA önce 300 mL saf su ile daha sonra da 200 mL 25 mM, pH 6 Ca(Ac)<sub>2</sub> tampon çözeltisi ile yıkanmış ve böylece poliglutaraldehit polimer destek yüzeyine tutturulmuştur.

### **2.2.3. Destek Maddesine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonu**

Lipozyme TL-100L ve Novozym 388 enzimleri stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA), Celite 545 ve Silikajel destek maddelerine adsorpsiyon ve kovalent bağlama olmak üzere iki farklı immobilizasyon yöntemiyle tutturulmuştur. Lipaz enzimlerinin adsorpsiyon ve kovalent bağlama metotlarıyla destek maddelerine immobilizasyon şeması Şekil 2.2.3.1.'de gösterilmiştir.

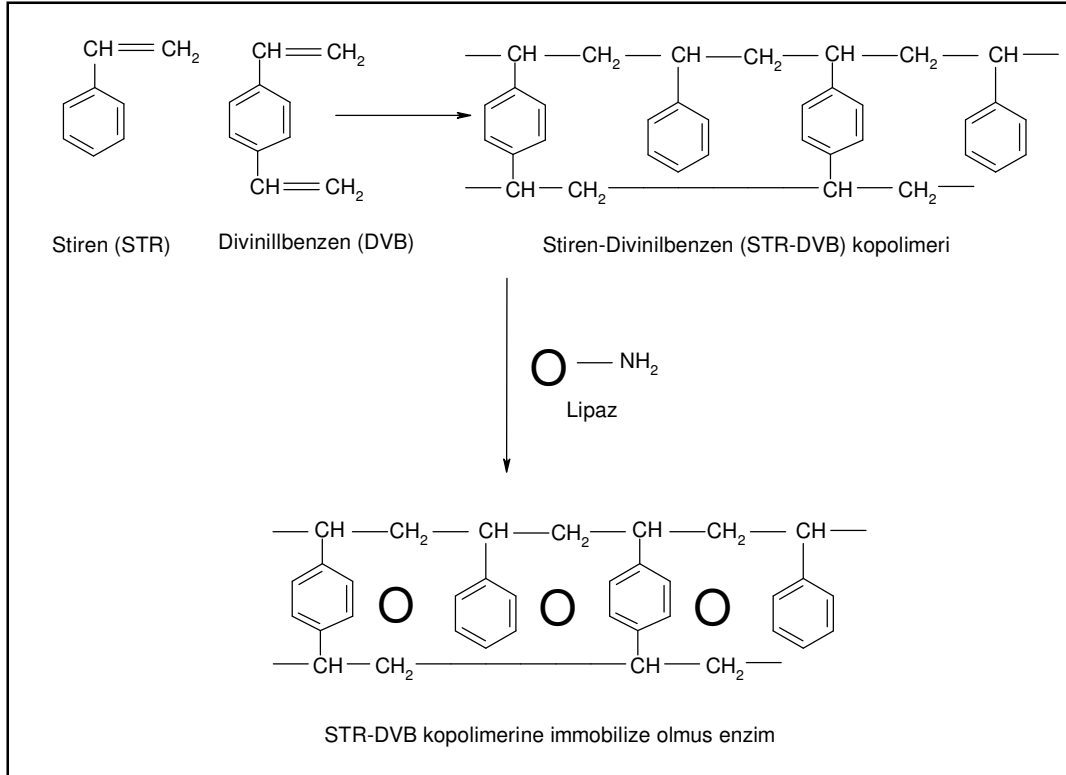


Şekil 2.2.3.1. Lipaz enzimlerinin adsorpsiyon ve kovalent bağlama metotlarıyla destek maddelerine immobilizasyon şeması. (a) Kovalent immobilizasyon metodu (b) Fiziksel adsorpsiyon ile immobilizasyon metodu

### 2.2.3.1. Enzimlerin Destek Maddesine Adsorpsiyon ile İmmobilizasyonu

4'er gram destek maddeleri (STR-DVB, Celite 545 ve Silikajel) tartılarak reaktöre yerleştirilmiş ve 500 mL saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra 3'er mL Lipozyme TL-100L ve Novozym 388 enzimleri alınarak 27 mL 25 mM pH 6 Ca(Ac)<sub>2</sub> tampon çözeltisine ilave edilerek %10'luk enzim çözeltileri hazırlanmış ve 24 saat boyunca Şekil 2.1.3.2.'de görülen deney düzeneği kullanılarak 5 mL/dak debide reaktörden geçirilerek destek maddelerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. Şekil

2.2.3.1.1.'de enzimlerin polimer destek maddesine adsorpsiyon ile immobilizasyon şeması görülmektedir. Bağlanmayan enzimler destek maddelerinin önce 300 mL saf su sonra 200 mL 25 mM, pH 6 Ca(Ac)<sub>2</sub> tampon çözeltisi ile yıkanmasıyla uzaklaştırılmıştır.

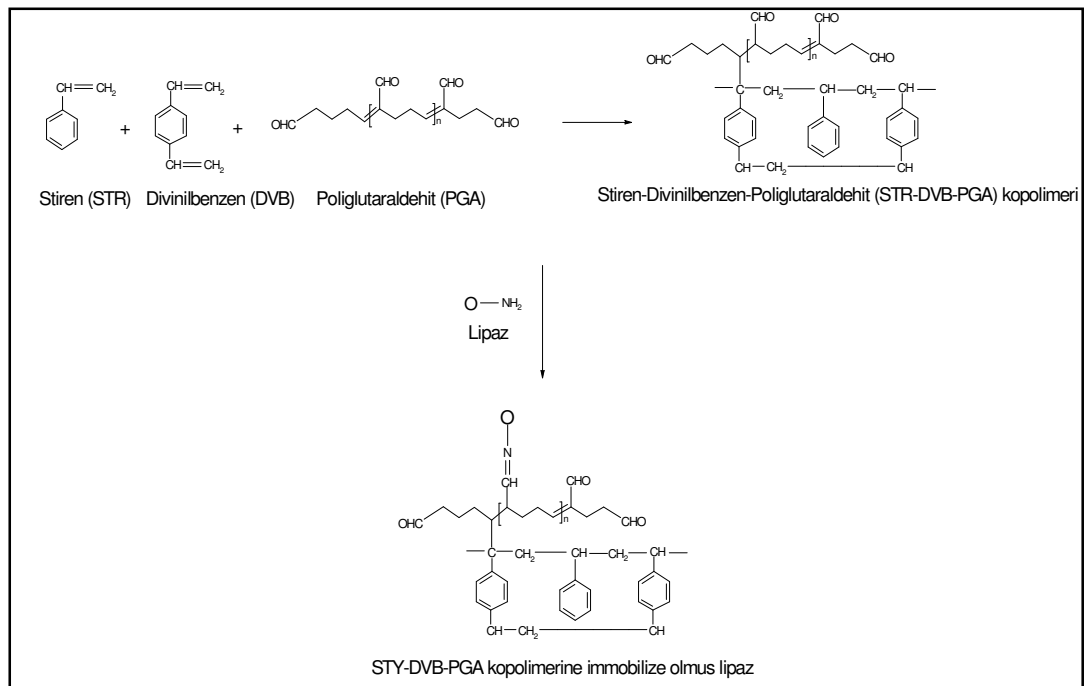


Şekil 2.2.3.1.1. Enzimlerin polimer destek maddesine adsorpsiyon ile immobilizasyon şeması

### 2.2.3.2. Enzimlerin Destek Maddesine Kovalent Bağlama ile İmmobilizasyonu

4'er gram destek maddeleri (STR-DVB-PGA, Celite 545 ve Silikajel) tartılarak reaktöre yerleştirilmiş ve 500 mL saf su ile yıkanmıştır. Sonra taze hazırlanmış poliglutaraldehit çözeltisi Şekil 2.1.3.2.'deki deney düzeneği kullanılarak 5 mL/dak debide 24 saat sirküle edilmiş ve 500 mL saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra 3'er mL Lipozyme TL-100L ve Novozym 388 enzimleri alınarak 27 mL 25 mM pH 6 Ca(Ac)<sub>2</sub>

tampon çözeltisine ilave edilerek %10'luk enzim çözeltileri hazırlanmış ve 24 saat boyunca Şekil 2.1.3.2.'de görülen deney düzeneği kullanılarak 5 mL/dak debide reaktörden geçirilerek destek maddelerine kovalent bağlama yöntemiyle immobilize edilmiştir. Şekil 2.2.3.2.1.'de enzimlerin polimer destek maddesine kovalent bağlama ile immobilizasyon şeması görülmektedir. Bağlanmayan enzimler destek maddelerinin önce 300 mL saf su sonra 200 mL 25 mM, pH 6 Ca(Ac)<sub>2</sub> tampon çözeltisi ile yıkanmasıyla uzaklaştırılmıştır.



Şekil 2.2.3.2.1. Enzimlerin polimer destek maddesine kovalent bağlama ile immobilizasyon şeması

#### 2.2.4. Kantitatif Protein Tayini

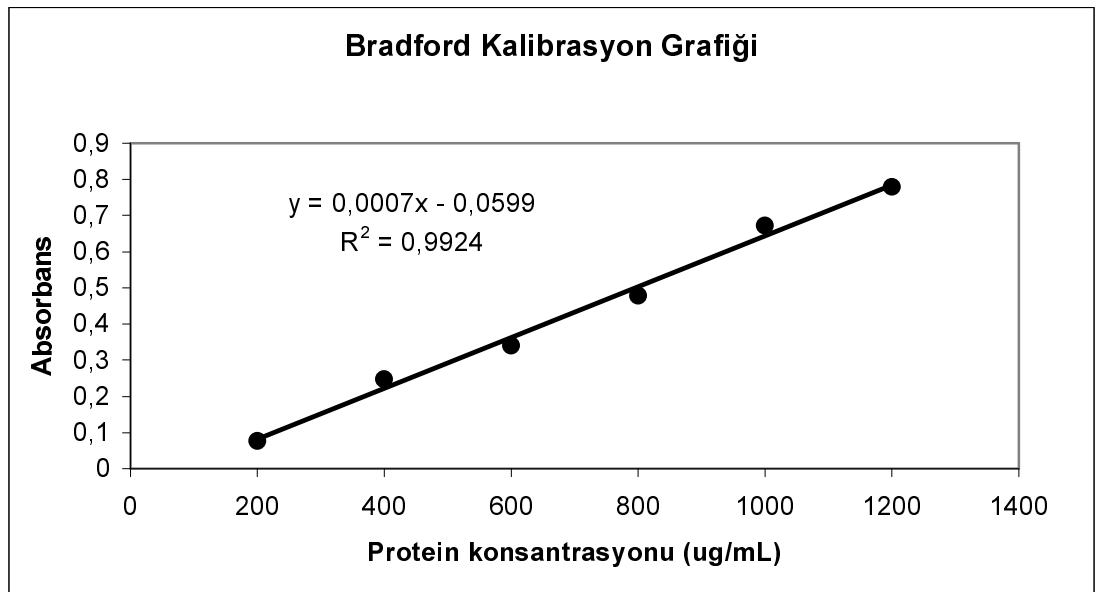
Lipozyme TL-100L ve Novozym 388 lipaz enzimlerinin destek maddelerine immobilizasyonunda desteğe tutturulan protein miktarı Bradford Metodu ile tayin edilmiştir (Bradford, 1976). Bu metotta Coomassie Brilliant Blue boyası kullanılmakta ve kullanılan bu boya ortamdaki proteinlerle kompleks oluşturarak ortamdaki proteinin yoğunluğuna göre açık veya koyu mavi renk vermektedir.

#### 2.2.4.1. Bradford Boyasının Hazırlanması

100 mg Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyası, 50 mL metanol içerisinde çözülerek üzerine 100 mL %85'lik fosforik asit ( $H_3PO_4$ ) ilave edilmiş ve saf su ile 200 mL'ye seyreltilmiştir. Elde edilen çözelti kullanılıncaya kadar koyu renkli bir şişe içerisinde buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır.

#### 2.2.4.2. Bradford Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Protein kalibrasyonunda standart protein olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır. Standart proteinden konsantrasyonları 200, 400, 600, 800, 1000 ve 1200  $\mu\text{g/mL}$  olacak şekilde farklı derişimde 6 çözelti hazırlanmıştır. Farklı derişimlerde (200–1200  $\mu\text{g/mL}$ ) hazırlanan BSA standartlarından deney tüplerine 1.5 mL alınmış ve üzerlerine 1.5 mL Bradford boyası ilave edilmiştir. Ayrı bir deney tüpüne 3 mL saf su ve 3 mL boya eklenerek karıştırılmıştır. UV-spektrofotometrenin dalga boyu 594 nm olacak şekilde ayarlanmış ve saf su içeren karışıma göre sıfırlanmıştır. Her bir örneğin 594 nm dalga boyunda absorbanları okunarak protein konsantrasyonlarına ( $\mu\text{g/mL}$ ) karşı okunan absorban (594 nm) değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 2.2.4.2.1.'de verilmiştir.



**Şekil 2.2.4.2.1.** Bradford kalibrasyon grafiği

### 2.2.4.3. Standart Tayin Prosedürü

Belirli oranlarda bradford boyası, saf su ve 4-aminoantipirin içeren analiz reagentinden 5 mL alınarak 100 µL örnek ile karıştırılmış ve 5 dk. Bekletilerek 595 nm'de UV absorbansı okunmuştur. Farklı derişimlerde Bovin Serum Albumin (BSA) standart proteini kullanılarak hazırlanmış Şekil 2.2.4.2.1.'deki Bradford kalibrasyon grafiği kullanılarak örnekteki protein miktarı hesaplanmıştır.

### 2.2.5. Enzim Aktivite Tayini

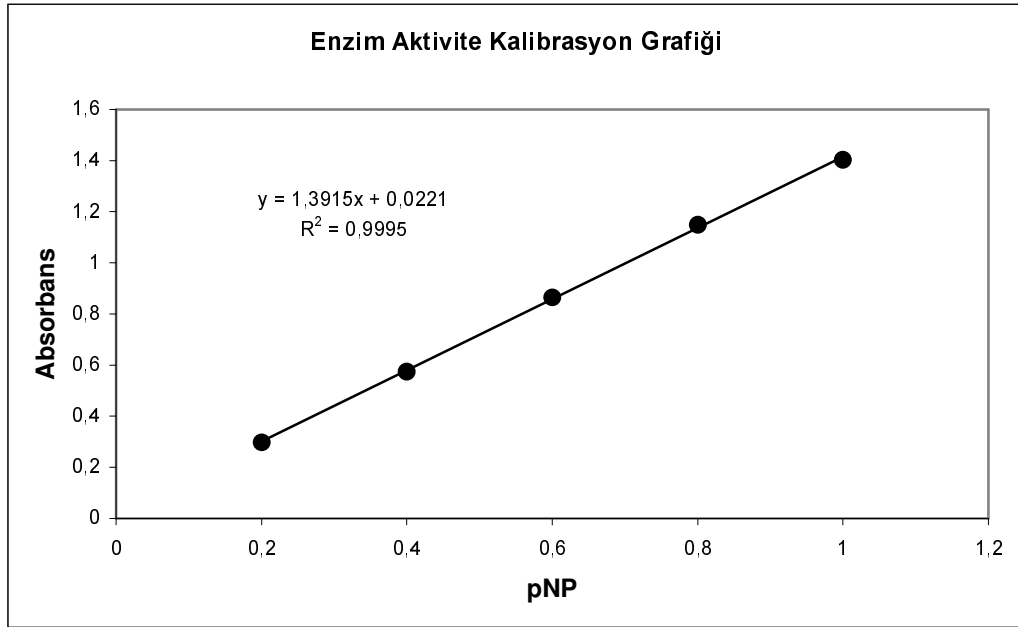
Çalışmamızda enzim aktivitesi spektrofotometrik metotla belirlenmiştir (Winkler ve Stuckman, 2003). Metot enzim moleküllerinin birim zamanda pNPP'ı (para-nitrofenil palmitat) pNP'e (para-nitrofenol) dönüştürme miktarının ölçülmesine dayanmaktadır. 1 birim enzim; reaksiyon koşullarında, pNPP'dan (para-nitrofenil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

Enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla öncelikle 0,2 mM; 0,4 mM; 0,6 mM; 0,8 mM ve 1,0 mM pNP (para-nitro fenol) çözeltileri hazırlanarak UV spektrofotometresinde 410 nm'de absorbansları ölçülerek Şekil 2.2.5.1.'de gösterilen kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Daha sonra 0,5 g yaş örnek tartılarak 9 hacim 25 mM Ca(Ac)<sub>2</sub> pH 6 tamponu ile 1 hacim 10 mM pNPP, % 0,8 triton X100 ve % 0,2 gum arabic'den oluşan 15 mL'lik çözelti karışımına ilave edilmiştir. Manyetik balıkla 125 rpm hızla karıştırılarak 60°C' de 5 dk. bekletilen örnek oda sıcaklığına soğutularak beyaz bant süzgeç kağıdı ile süzölmüş ve berrak sıvı UV spektrofotometresiyle 410 nm'de absorbansı ölçülerek lipaz aktivitesi, spesifik aktivite ve immobilizasyon verimi sırasıyla eşitlik 2.2.5.1., 2.2.5.2. ve 2.2.5.3'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Lipaz aktivitesi (umol pNP/g-destek.dk.)} = \frac{\text{İmmobilizelipaz aktivitesi}}{\text{Destek miktar}} \quad 2.2.5.1.$$

$$\text{Spesifik aktivite (umol pNP/mg-protein.dk)} = \frac{\text{İmmobilize lipaz aktivitesi}}{\text{Tutuklanan protein miktar}} \quad 2.2.5.2.$$

$$\text{İmmobilizasyon verimi (\%)} = \frac{\text{Tutuklanan protein miktar}}{\text{Toplam protein miktar}} \quad 2.2.5.3.$$



Şekil 2.2.5.1. Enzim aktivite kalibrasyon grafiği

### 2.2.6. Biyodizel Üretimi

Biyodizel sentezi sürekli sistem ve kesikli sistem deney düzeneği olmak üzere iki farklı şekilde ham kanola yağı ve metanolün enzim beraberinde uygun koşullardaki reaksiyonuyla gerçekleştirilmiştir.



### **2.2.6.1. Sürekli Sistem Deney Düzeneği Kullanılarak Biyodizel Üretimi**

Biyodizel sentezi için Şekil 2.1.3.2.'de gösterilen sürekli sistem deney düzeneği kullanılmıştır. Yöntemde besleme tankına 100 mL ham kanola yağı ile 27 mL metanol ilave edilerek sıkıca kapatılmış 5 mL/dk. debide reaktörden peristaltik pompa yardımıyla sirküle edilmiştir. Metanol besleme tankına 3'er saat ara ile üç aşamada ilave edilerek metanolün enzimi inhibe etme olasılığı önlenmiştir. Reaksiyonlar daha önceden kemometrik optimizasyon çalışmalarında her enzim için ayrı ayrı belirlenen optimum deneysel koşullarda "reaksiyon süresi:4-6 saat, sıcaklık:34°C-55°C, enzim miktarı:4,5-21 (% yağ ağırlığı) ve alkol/yağ molar oranı:2/1- 4/1" gerçekleştirilmiştir.

### **2.2.6.2. Kesikli Sistem Deney Düzeneği Kullanılarak Biyodizel Üretimi**

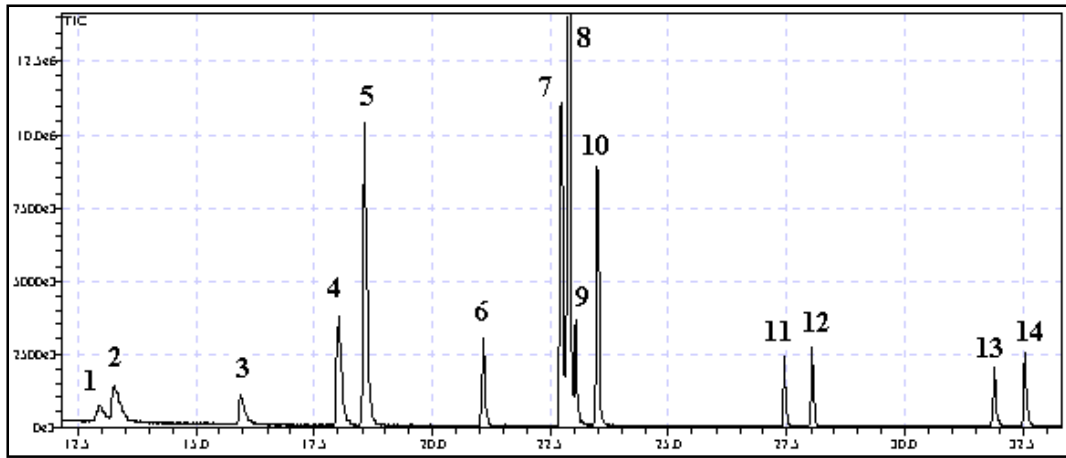
Biyodizel sentezi için 250 mL'lik beherler kullanılmıştır. Yöntem behere 100 mL ham kanola yağı, yağ ağırlığının % 4,5'i ile % 21'i arasında değişen oranlarda immobilize enzim ve 27 mL metanol eklenerek uygulanmıştır. Metanol karışıma 3'er saat ara ile üç aşamada ilave edilmiştir. Karışım manyetik balık ile 200 rpm hızla sürekli karıştırılmıştır. Reaksiyonlar daha önceden kemometrik optimizasyon çalışmalarında her enzim için ayrı ayrı belirlenen optimum deneysel koşullarda "reaksiyon süresi:4-6 saat, sıcaklık:34°C-55°C, enzim miktarı:4,5- 21 (% yağ ağırlığı) ve alkol/yağ molar oranı:2/1- 4/1" gerçekleştirilmiştir.

### **2.2.7. Standart Yağ Asidi Metil Esteri Grafiklerinin Çıkartılması**

Yapılan çalışmada standart yağ asidi metil esterleri karışımı 500 ppm derişimde GC-MS' e Çizelge 2.2.7.1.'de verilen sıcaklık programı ile enjekte edilerek 14 adet yağ asidi metil esterleri piki gözlenmiştir. Elde edilen yağ asidi metil esterleri pikleri Şekil 2.2.7.1.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2.7.1.** GC-MS sıcaklık programı

Fırın Sıcaklığı		
Oran	Sıcaklık	Bekleme süresi
-	140	5
4	240	10

**Şekil 2.2.7.1.** Standart yağ asidi metil esterleri pikleri.

Pikler; (1.) miristoleik asit metil ester ( $C_{14:1}$ ); (2.) miristik asit metil ester ( $C_{14:0}$ ); (3.) pentadekanoik asit metil ester ( $C_{15:0}$ ); (4.) palmitoleik asit metil ester ( $C_{16:1}$ ); (5.) palmitik asit metil ester ( $C_{16:0}$ ); (6.) heptadekanoik asit metil ester ( $C_{17:0}$ ); (7.) linoleik asit metil ester ( $C_{18:2}$ ) (8.) oleik asit metil ester ( $C_{18:1}$ ). (9.) elaidik asit metil ester ( $C_{18:1}$ ); (10.) stearik asit metil ester ( $C_{18:0}$ ); (11.) eikosenoik asit metil ester ( $C_{20:1}$ ); (12.) araşidik asit metil ester ( $C_{20:0}$ ); (13.) erusik asit metil ester ( $C_{22:1}$ ); (14.) behenik asit metil ester ( $C_{22:0}$ ).

### 2.2.8. İnce Tabaka Kromatografisi İle Biyodizel Tayini

Sentezlenen biyodizel örnekleri ve standart biyodizelden Hamilton enjektör yardımıyla 1  $\mu$ L alınmış Whatman K5 TLC plakala üzerine damlatılarak kurutulmuştur. Daha sonra sentezlenen biyodizel örnekleri ve standart biyodizel 90/15/4 (v/v) hekzan/dietileter/asetik asit çözelti sistemi kullanılarak plaka üzerinde yürütülmüştür.

Yürütme işlemi sonunda plaka üzerindeki noktalar % 95 etil alkol - % 5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve % 0,5  $\alpha$ -naftol karışımına daldırılıp 150 °C'de 10 dk ısıtılarak görünür hale getirilmiştir. Son olarak elde edilen noktalar standart biyodizel örneği ile karşılaştırılmıştır.

### 2.2.9. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi ile Biyodizel Tayini

Biyodizel örnekleri sentezlendikten sonra 1.8 ml kapaklı şişelerde +4°C'de buzdolabında saklanarak GC-MS ile analiz edilmiştir. Çalışmada GC-MS QP5000 model gaz kromatografisi kütle spektrometre cihazı kullanılmıştır. DB-1 model kolonun uzunluğu 30 m, çapı 0.25 mm ve film kalınlığı 0.25  $\mu$ m' dir. Analiz sırasındaki çalışma şartları ve sıcaklık programı Çizelge 2.2.9.1. ve 2.2.9.2.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2.9.1.** QP5000 model GC-MS cihazı çalışma şartları

PARAMETRELER	
Enjeksiyon sıcaklığı	250°C
Ara yüzey sıcaklığı	280°C
Kontrol modu	Splitless
Kolon iç basıncı	100 kPa
Kolon akış hızı	1.6 mL/min.
Doğrusal hız	46.4 cm/sec.
Split oranı	0
Toplam akış	52.6 mL/min.
Taşıyıcı akış	52.6 mL/min.
Tarama Modu	Scan
Çözücü kesim zamanı	2 min.
GC Program süresi	50 min.

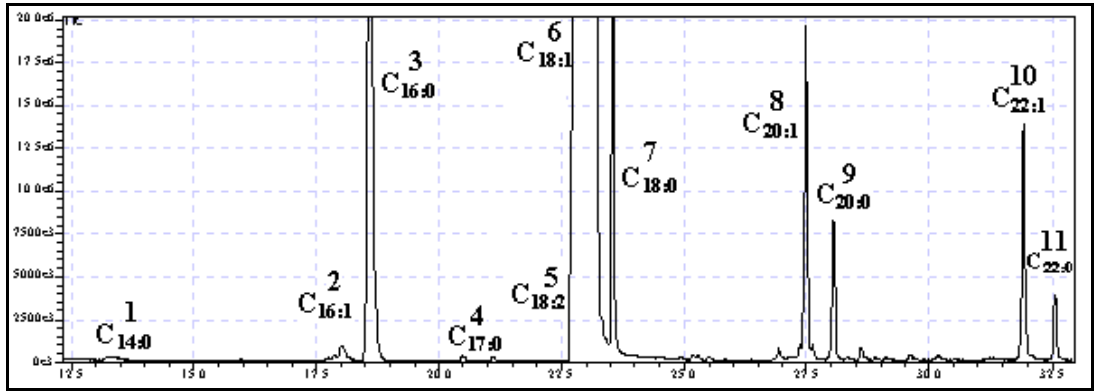
**Çizelge 2.2.9.2.** QP5000 model GC-MS cihazı sıcaklık programı

Fırın Sıcaklığı		
Oran	Sıcaklık	Bekleme süresi
-	140	5
4	240	10

### 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

#### 3.1 Alkali Biyodizel Ön Çalışması

Çalışmamızda ester dönüşümü bilinen standart biyodizel elde etmek ve beklenen yağ asidi metil esteri piklerinin incelenmesi amacıyla alkali katalizör (NaOH) beraberinde ham kanola yağının metanol ile transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 40 °C sıcaklıkta, (6:1) metanol-yağ molar oranı ve yağ ağırlığının %1'i oranında NaOH kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon sonunda % 98 verimle biyodizel elde edilmiştir. Sentezlenen biyodizelin GC-MS ile analizinde gözlenen yağ asidi metil esteri pikleri Şekil 3.1.1.'de görülmektedir.

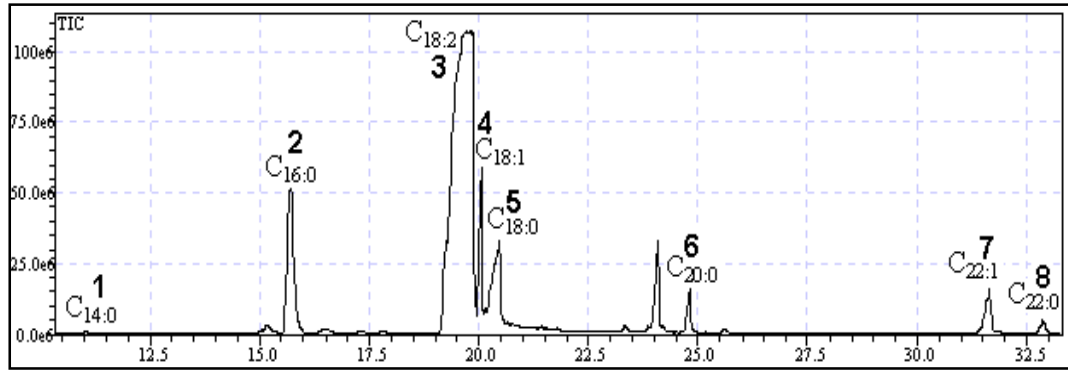


**Şekil 3.1.1.** Alkali katalizör beraberinde kanola yağı ile sentezlenen biyodizelin yağ asidi metil esteri pikleri. Pikler; **(1.)** miristik asit metil ester ( $C_{14:0}$ ); **(2.)** palmitoleik asit metil ester ( $C_{16:1}$ ); **(3.)** palmitik asit metil ester ( $C_{16:0}$ ); **(4.)** heptadekanoik asit metil ester ( $C_{17:0}$ ); **(5.)** linoleik asit metil ester ( $C_{18:2}$ ); **(6.)** oleik asit metil ester ( $C_{18:1}$ ); **(7.)** stearik asit metil ester ( $C_{18:0}$ ); **(8.)** eikosenoik asit metil ester ( $C_{20:1}$ ); **(9.)** araşidik asit metil ester ( $C_{20:0}$ ); **(10.)** erusik asit metil ester ( $C_{22:1}$ ); **(11.)** behenik asit metil ester ( $C_{22:0}$ ).

### 3.2. Enzimatik Biyodizel Yağ Asidi Metil Esteri Pikleri

Novozym 435, Lipozyme TL-IM ve Lipozyme RM-IM immobilize enzimleriyle kanola yağının metanol beraberinde transesterleşme reaksiyonu sonucu elde edilen biyodizel GC-MS ile analiz edilmiştir. Şekil 3.2.1.'de Novozym 435 enzimi ile elde edilen biyodizelin yağ asidi metil esterleri pikleri görülmektedir.

**Şekil 3.2.1.** İmmobilize *Candida Antarctica* (Novozym 435) enzimi beraberinde kanola

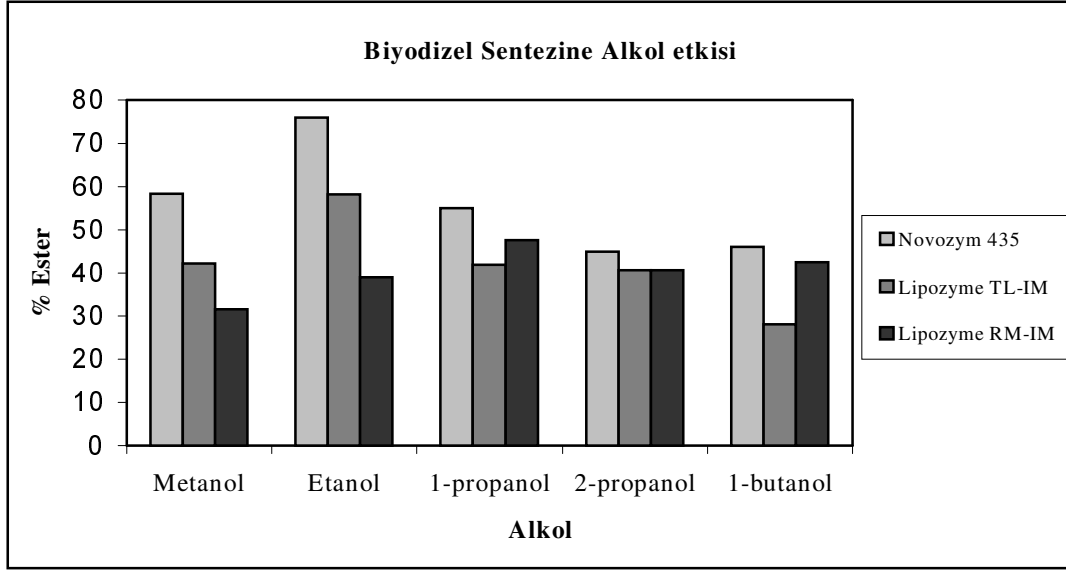


yağı ile sentezlenen biyodizelin yağ asidi metil eteri pikleri. Sentez reaksiyon koşulları: (4:1) Alkol/Yağ molar oranında; 10 g ham kanola yağı ve yağın ağırlıkça %10'u oranında immobilize lipaz; 40°C'de; 6 saat reaksiyon süresi. Pikler; (1.) metil miristat (C<sub>14:0</sub>); (2.) metil palmitat (C<sub>16:0</sub>); (3.) metil 6,9-oktadekadienoat (C<sub>18:2</sub>); (4.) metil-9-oktadekanoat (C<sub>18:1</sub>); (5.) metil oktadekanoat (C<sub>18:0</sub>); (6.) metil ekosanoat (C<sub>20:0</sub>); (7.) metil-13-dokosanoat (C<sub>22:1</sub>) (8.) metil dokosanoat (C<sub>22:0</sub>).

### 3.3. Biyodizel Sentezine Alkol Türünün Etkisi

Alkol türlerinin kanola yağının enzimatik transesterleşme reaksiyonuna etkisinin incelenmesi amacıyla metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol ve 1-butanol alkolleriyle Novozym 435, Lipozyme TL-IM ve Lipozyme RM-IM immobilize enzimleri beraberinde biyodizel sentezlenerek % ester dönüşümleri incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 3.3.1.'de görülmektedir. Genel olarak alkolün karbon sayısı arttıkça ester miktarı düşmektedir. Fakat *thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) enzimi bunun dışında bir davranış göstermiştir. Lipozyme RM-IM enziminin esterleşme reaksiyonunda kullanılan alkolün karbon sayısı ile elde edilen ester miktarı arasında bir ilişki görülmemiştir. Çalışmada en yüksek ester dönüşümü (% 76) *Candida antarctica* (Novozym 435) enziminin etanol ile esterleşmesinde gözlenmiştir. *Candida antarctica*

(Novozym 435) ve *thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) enzimlerinin kullanıldığı esterleşme reaksiyonlarında en etkin ester dönüşümü etanol ile sağlanmıştır. Oysa *rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM) enziminin kullanıldığı reaksiyonda en iyi ester dönüşümü 1-propanol ise sağlanmıştır.

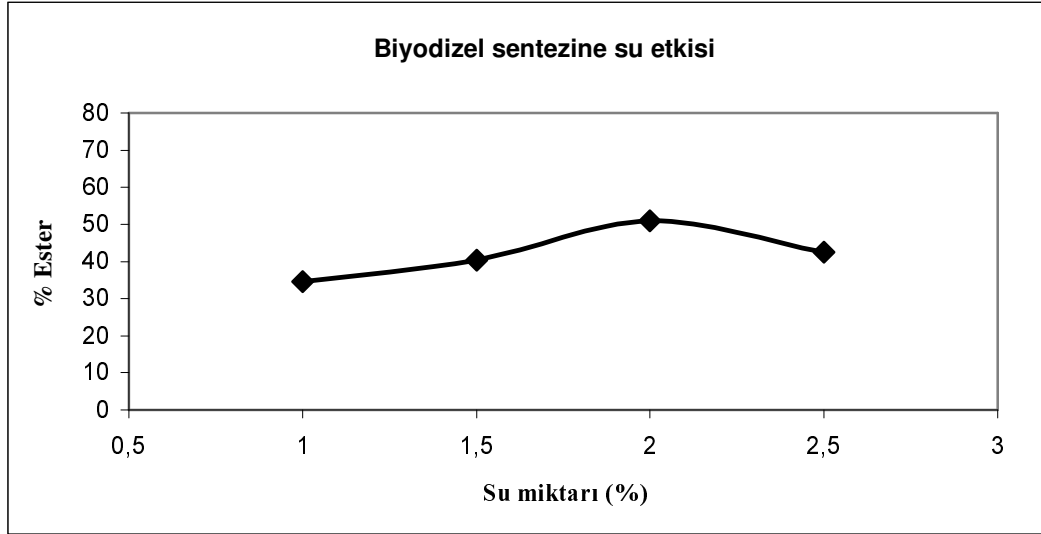


**Şekil 3.3.1.** Biyodizel sentezine farklı alkol türlerinin etkisi. Reaksiyon koşulları: (4:1) Alkol/Yağ molar oranında; 10 g ham kanola yağı ve yağın ağırlıkça %10'u oranında immobilize lipaz; 40°C'de; 6 saat reaksiyon süresi.

### 3.4. Biyodizel Sentezine Su Etkisi

Enzimatik transesterleşme reaksiyonuna suyun etkisinin belirlenmesi amacıyla reaksiyonda kullanılan kanola yağ ağırlığının %1'i ile %2.5'u arasında değişen oranlarda su reaksiyon ortamına ilave edilerek elde edilen ester dönüşümü belirlenmiştir. Reaksiyonlar (4:1) Alkol/Yağ molar oranında, kullanılan yağın ağırlıkça %10'u oranında immobilize lipaz beraberinde 40°C sıcaklıkta ve reaksiyon ortamına kullanılan yağ ağırlığının %1'i ile %2.5'u arasında değişen oranlarda su ilavesiyle 6 saatte gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.4.1.'de verilmiştir. Transesterleşme reaksiyonunun su varlığında yada susuz ortamda yapılması enzim aktivitesini etkilemektedir. Lipazlar sulu veya organik çözelti ortamında farklı davranış göstermektedirler. Alkol moleküllerinin lipaz enzimini sarması ile lipaz moleküllerinde

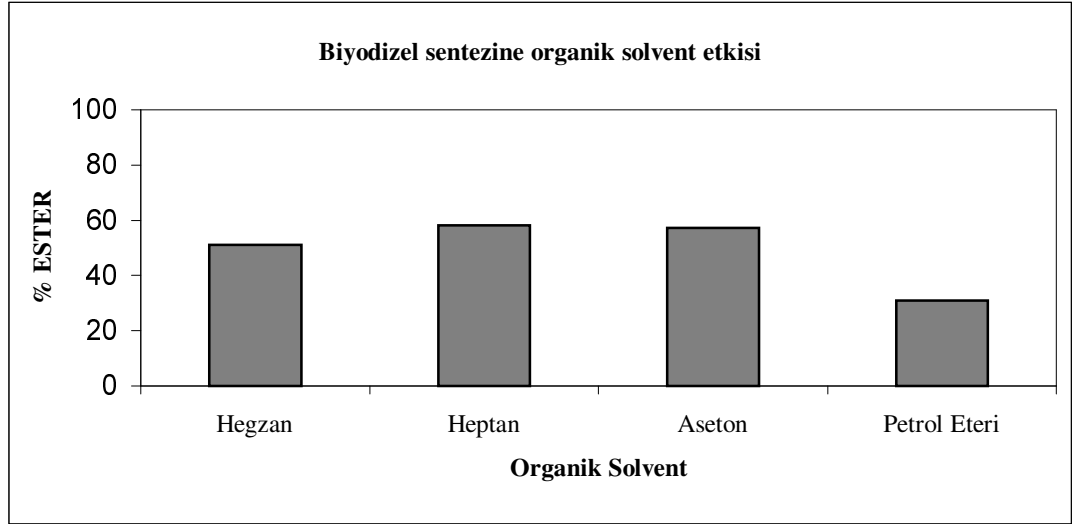
aktivite kaybı olmaktadır. Reaksiyon ortamında bulunacak optimum su miktarı transesterleşme reaksiyonunda maksimum verim elde edilmesini sağlamaktadır. Yapılan çalışmada en yüksek ester dönüşümü yağ ağırlığının % 2'si oranında su varlığında elde edilmiştir. Daha yüksek oranlarda su varlığı hidrolize neden olmakta ve ester verimini düşürmektedir.



**Şekil 3.4.1.** Biyodizel sentezine su etkisi. Reaksiyon koşulları: (4:1) Alkol/Yağ molar oranında; 10 g ham kanola yağı ve yağın ağırlıkça %10'u oranında immobilize lipaz (Novozym 435); 40°C'de; 6 saat reaksiyon süresi.

### 3.5. Biyodizel Sentezine Organik Solvent Etkisi

Transesterleşme reaksiyonuna organik solvent etkisinin gözlenmesi amacıyla farklı organik solventler (hegzan, heptan, aseton ve petrol eteri) reaksiyon ortamına eklenerek ester dönüşümü belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 3.5.1.'de verilmiştir. Candida antarctica (Novozym 435) immobilize enziminin kullanıldığı transesterleşme reaksiyonu için heptan en iyi organik solvent olarak belirlenmiştir. Aseton ile hegzan ise transesterleşme reaksiyonunda alternatif solventler olarak düşünülebilir fakat petrol eterinin elde edilen sonuçlara göre reaksiyon ortamına uygun bir solvent olmadığı belirlenmiştir. Reaksiyonlar (4:1) Alkol/Yağ molar oranında, kullanılan yağın ağırlıkça %10'u oranında immobilize lipaz beraberinde 40°C sıcaklıkta, 10 mL organik solvent varlığında 6 saatte gerçekleştirilmiştir.

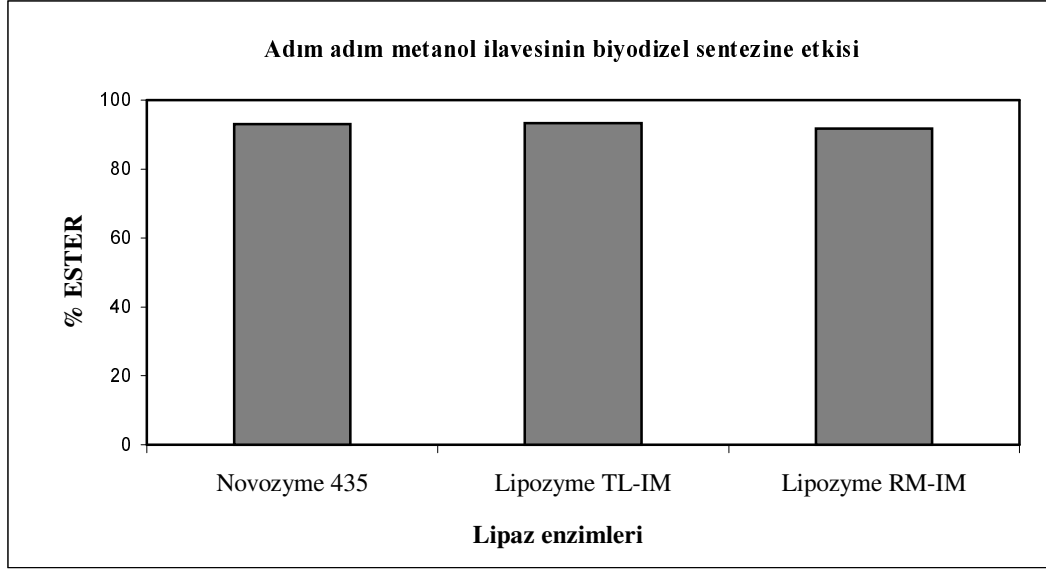


**Şekil 3.5.1.** Biyodizel sentezine organik solvent etkisi. Reaksiyon koşulları: (4:1) Alkol/Yağ molar oranında; 10 g ham kanola yağı ve yağın ağırlıkça %10'u oranında immobilize lipaz (Novozym 435); 40°C'de; 6 saat reaksiyon süresi; 10 mL organik solvent.

### 3.6. Adım Adım Metanol İlavesinin Biyodizel Verimine Etkisi

Bitkisel yağın lipaz enzimi kullanılarak metanol beraberinde yağ asidi metil esterine dönüştürülmesi reaksiyonunda ortamdaki metanol miktarı enzim aktivitesi dolayısıyla ester dönüşüm oranı açısından son derece önemlidir. Çalışmamızda reaksiyon ortamındaki alkolün enzimi inhibe etmesini önlemek amacıyla esterleşme için gerekli alkol miktarı reaksiyon ortamına üç adımda eklenmiştir. Her adım sonunda reaksiyon ortamındaki immobilize lipazlar izopropanol ile yıkanarak alkolden temizlenmiştir. Reaksiyonlar her adım 2 saat olmak üzere toplam 6 saatte tamamlanmıştır. Reaksiyonlar sonunda novozym 435 enzimi ile % 93, lipozyme RM-IM enzimi ile % 93.4 ve lipozyme TL-IM enzimiyle ise % 91.8 ester dönüşümü elde edilmiştir. Elde edilen deneysel sonuçlar Şekil 3.6.1'de gösterilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü gibi reaksiyon ortamına metanolün adım adım ilavesi tek seferde eklenmesinden çok daha etkin sonuç vermiştir.

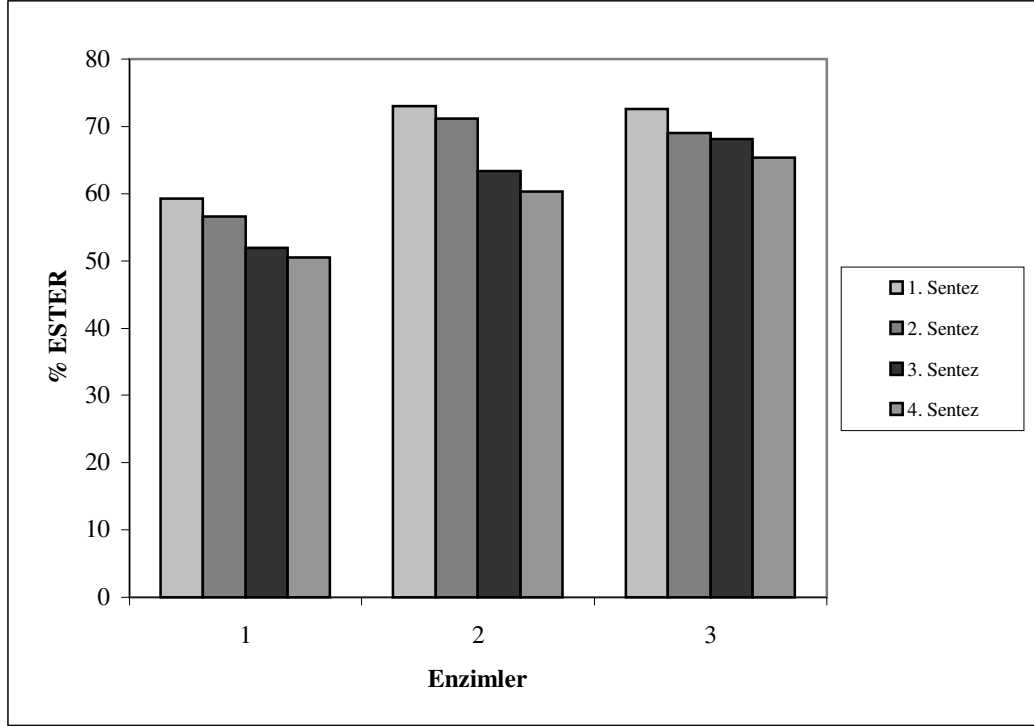




**Şekil 3.6.1.** Biyodizel sentezine adım adım metanol ilavesi etkisi. Reaksiyon koşulları: (4:1) Alkol/Yağ molar oranında; 10 g ham kanola yağı ve yağın ağırlıkça %10'u oranında immobilize lipaz; 40°C'de; 6 saat reaksiyon süresi (metanol reaksiyon ortamına üç adımda ilave edilmiştir).

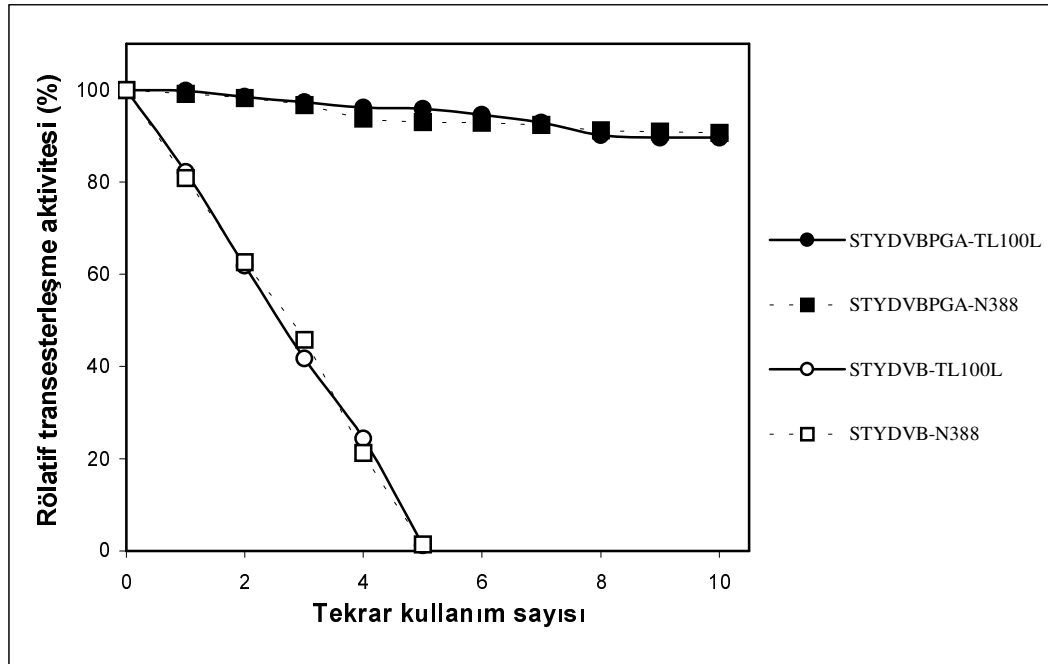
### 3.7. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanımı

İmmobilize enzimlerin sağladığı en büyük avantaj reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılarak tekrar kullanılabilmeleridir. Çalışmamızda *Candida Antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM), *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM), Lipozyme TL-100L ve Novozyme 388 lipaz enzimlerinin tekrar kullanılmalarının ester dönüşümüne etkileri incelenmiştir. Şekil 3.7.1.'de görülebileceği gibi novozym 435, lipozyme TL-IM ve lipozyme RM-IM immobilize ticari lipazların hiçbiri 4 tekrar kullanım sonucu bile önemli bir aktivite kaybı göstermemiştir. İlk tekrar kullanım sonucu novozym 435, lipozyme RM-IM ve lipozyme TL-IM enzimleri için sırasıyla % 4.51, % 2.57 ve % 4.88 ester kaybı gözlenmiştir. İkinci tekrar kullanımda ester kaybı sırasıyla %8.20, %10.94 ve %1.33, üçüncü tekrar kullanımda ise % 2.73, % 4.89 ve % 3.97 ester kaybı gözlenmiştir. Esterleşme oranındaki toplam kayıp ise Novozym 435, Lipozyme RM-IM ve Lipozyme TL-IM immobilize enzimleri için sırasıyla %15.45, %18.41 ve %10.18 olarak belirlenmiştir.



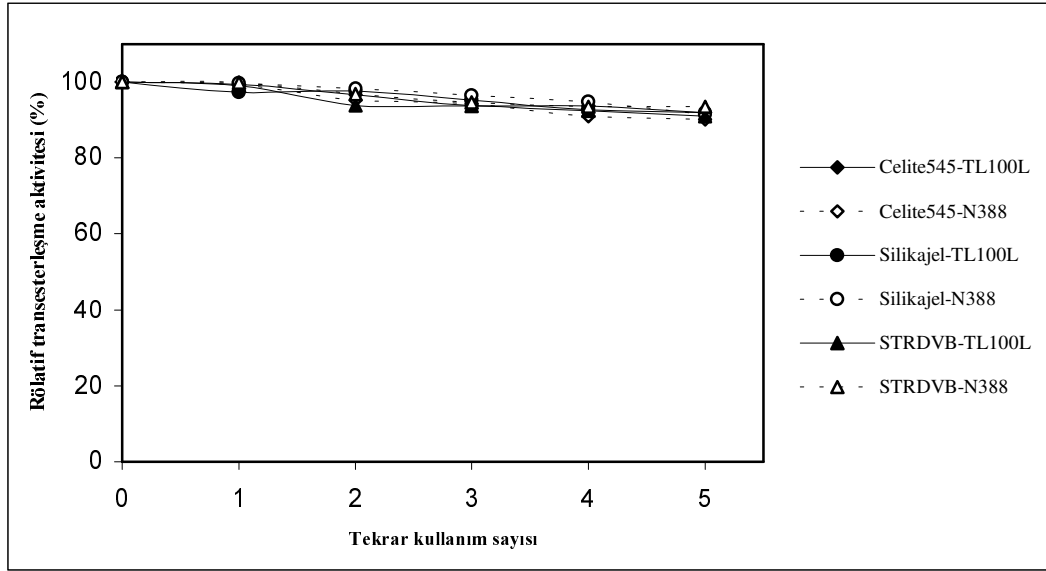
**Şekil 3.7.1.** Ticari immobilize enzimlerin tekrar kullanımı. **(1)** *Candida Antarctica* (Novozym 435); **(2)** *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM); **(3)** *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM). Reaksiyon koşulları: (4:1) Alkol/Yağ molar oranında; 10 g ham kanola yağı ve yağın ağırlıkça %10'u oranında immobilize lipaz; 40°C'de; 6 saat reaksiyon süresi.

Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) ve Stiren-divinilbenzen (STR-DVB) destek maddelerine farklı metotlarla immobilize olan lipozyme TL-100L ve novozyme 388 enzimlerinin tekrar kullanım sonucu elde edilen rölatif transesterleşme aktiviteleri Şekil 3.7.2.'de verilmiştir. Poliglutaraldehit ile aktive edilerek destek maddeleri üzerine kovalent olarak tutturulan lipozyme TL-100L ve novozyme 388 lipaz enzimleri için 10 tekrar kullanım sonunda dahi önemli bir aktivite kaybı gözlenmemiştir. Poliglutaraldehit ile aktive edilmeyerek destek maddeleri üzerine adsorpsiyon yöntemiyle tutturulan lipozyme TL-100L ve novozyme 388 lipaz enzimleri ise 5 tekrar kullanım sonucu aktivitelerini tamamen kaybetmiştir.

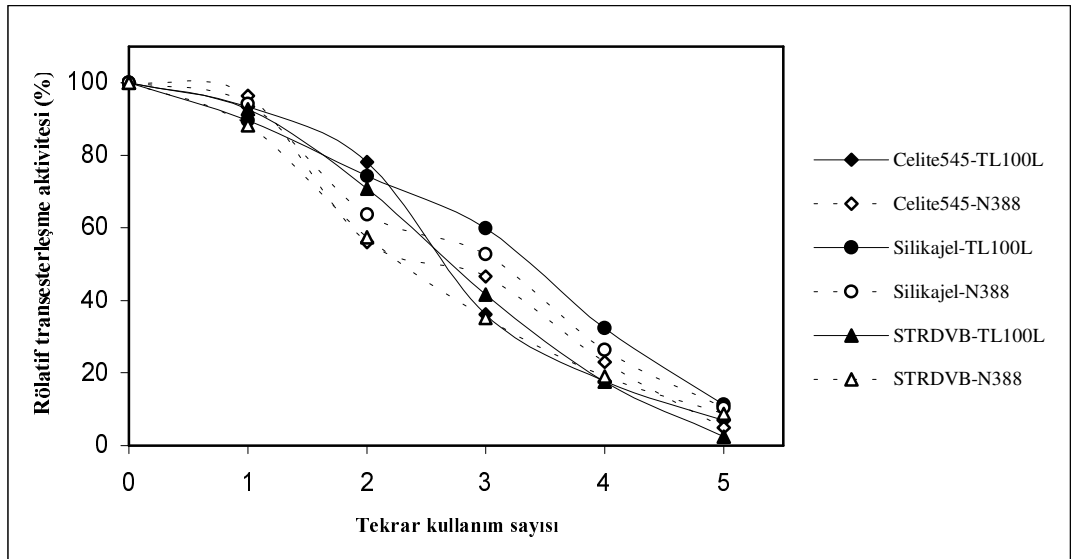


**Şekil 3.7.2.** Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) destek maddesine kovalent metotla, Stiren-divinilbenzen (STR-DVB) destek maddesine adsorpsiyon metoduyla immobilize olan lipozyme TL-100L ve novozyme 388 enzimlerinin rölatif transesterleşme aktiviteleri. Reaksiyon koşulları: (4:1) Alkol/Yağ molar oranında; 100 g ham kanola yağı ve yağın ağırlıkça %10'u oranında immobilize lipaz; 40°C'de; 24 saat reaksiyon süresi. (Metanol reaksiyon ortamına üç adımda eklenmiştir)

Celite 545, silikajel ve STR-DVB kopolimer destek maddelerine kovalent bağlama (glutaraldehit ile aktive edilmiş) metoduyla immobilize edilen lipozyme TL-100L ve novozyme 388 lipaz enzimlerinin tekrar kullanım kapasiteleri Şekil 3.7.3'de, celite 545, silikajel ve STR-DVB kopolimer destek maddelerine fiziksel adsorpsiyon (glutaraldehit ile aktive edilmemiş) metoduyla immobilize edilen lipozyme TL-100L ve novozyme 388 lipaz enzimlerinin tekrar kullanım kapasiteleri ise Şekil 3.7.4.'de görülmektedir. Şekiller incelendiğinde Şekil 3.7.2.'de elde edilen sonuçlara benzer sonuçlara ulaşıldığı gözlenmektedir. Glutaraldehit ile aktive edilen celite 545, silikajel ve STR-DVB kopolimer destek maddelerine kovalent olarak immobilize edilen lipozyme TL-100L ve novozyme 388 lipaz enzimleri önemsiz bir aktivite kaybı ile 5 kez tekrar kullanılmıştır (Şekil 3.7.3.). Glutaraldehit ile aktive edilmemiş celite 545, silikajel ve STR-DVB kopolimer destek maddelerine fiziksel adsorpsiyon metoduyla immobilize edilen lipozyme TL-100L ve novozyme 388 lipaz enzimleri ise 5 tekrar kullanım sonucu aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Şekil 3.7.4.).



**Şekil 3.7.3.** Celite 545, silikajel ve STR-DVB kopolimer destek maddelerine kovalent bağlama (glutaraldehit ile aktive edilmiş) metoduyla immobilize edilen lipozyme TL-100L ve novozyme 388 lipaz enzimlerinin tekrar kullanım kapasiteleri. Reaksiyon koşulları: (4:1) Alkol/Yağ molar oranında; 10 g ham kanola yağı ve yağın ağırlıkça %10'u oranında immobilize lipaz; 40°C'de; 6 saat reaksiyon süresi. (Metanol reaksiyon ortamına üç adımda eklenmiştir)



**Şekil 3.7.4.** Celite 545, silikajel ve STR-DVB kopolimer destek maddelerine fiziksel adsorpsiyon (glutaraldehit ile aktive edilmemiş) metoduyla immobilize edilen lipozyme TL-100L ve novozyme 388 lipaz enzimlerinin tekrar kullanım kapasiteleri. Reaksiyon

koşulları: (4:1) Alkol/Yağ molar oranında; 10 g ham kanola yağı ve yağın ağırlıkça %10'u oranında immobilize lipaz; 40°C'de; 6 saat reaksiyon süresi. (Metanol reaksiyon ortamına üç adımda eklenmiştir)

### 3.8. Enzimatik Biyodizel Sentezinin Kemometrik Optimizasyonu

Yapılan çalışmada *Candida Antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) ve *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) enzimlerinin kullanıldığı transesterleşme reaksiyonlarında önemli rol oynayan reaksiyon süresi, sıcaklık, enzim miktarı ve alkol/yağ molar oranı gibi faktörlerin kemometrik yöntemlerle optimize edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için önde gelen kemometrik optimizasyon tekniklerinden biri olan merkezi kompozit dizayn metodu kullanılmıştır. Biyodizel üretimi aşamasında optimize edilen faktörler; *reaksiyon süresi* ( $X_1$ ), *sıcaklık* ( $X_2$ ), *enzim miktarı* ( $X_3$ ) ve *alkol/yağ molar oranı* ( $X_4$ ) olarak seçilmiştir. Çalışmamızda her enzim için ayrı ayrı 5 seviyeli 4 faktörlü merkezi kompozit dizayn oluşturularak 25'er adet deney yapılmıştır. Çizelge 3.8.1.'de optimizasyon için seçilen faktör ve seviyeler gösterilmiştir.

**Çizelge 3.8.1.** Merkezi kompozit dizayn için kullanılan bağımsız değişkenler ve

Bağımsız değişkenler	Semboller	Seviyeler				
		-2	-1	0	1	2
Reaksiyon süresi [saat]	$x_1$	2	4	6	8	10
Sıcaklık [°C]	$x_2$	20	30	40	50	60
Yağ ağırlığına bağlı enzim miktarı [%]	$x_3$	10	15	20	25	30
Yağ/Alkol molar oranı [v/v]	$x_4$	2:1	3:1	4:1	5:1	6:1

seviyeler

#### 3.8.1. *Candida Antarctica* (Novozym 435) Enziminin Kemometrik Optimizasyonu

İmmobilize *Candida Antarctica* (Novozym 435) enzimi kullanılarak gerçekleştirilen biyodizel üretim prosesinin optimize edilmesi amacıyla oluşturulan 5

seviyeli 4 faktörlü merkezi kompozit dizayn ve 25 deney sonucu elde edilen veriler Çizelge 3.8.1.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.8.1.1.** Candida Antarctica (Novozym 435) enziminin merkezi kompozit dizayn tablosu ve deneysel sonuçlar

Çizelge 3.8.1.1.'deki deneysel veriler kullanılarak Microsoft Excel programı ile eşitlik

Deney	Kodlanmış veriler				Deneysel veriler				Ağırlıkça dönüşüm (%)	
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	( $x_1$ ) Reaksiyon süresi (saat)	( $x_2$ ) Sıcaklık (°C)	( $x_3$ ) Enzim miktarı (%)	( $x_4$ ) Alkol/Yağ molar oranı	Deneysel	Tahmini
1	-1	-1	-1	-1	4	30	15	3:1	57,82	57,20
2	1	-1	-1	-1	8	30	15	3:1	60,00	59,00
3	-1	1	-1	-1	4	50	15	3:1	45,78	49,34
4	1	1	-1	-1	8	50	15	3:1	47,47	48,17
5	-1	-1	1	-1	4	30	25	3:1	27,79	29,53
6	1	-1	1	-1	8	30	25	3:1	35,69	37,81
7	-1	1	1	-1	4	50	25	3:1	31,28	31,01
8	1	1	1	-1	8	50	25	3:1	33,66	36,31
9	-1	-1	-1	1	4	30	15	5:1	58,16	56,42
10	1	-1	-1	1	8	30	15	5:1	50,00	51,13
11	-1	1	-1	1	4	50	15	5:1	45,05	43,79
12	1	1	-1	1	8	50	15	5:1	36,36	35,53
13	-1	-1	1	1	4	30	25	5:1	33,17	33,32
14	1	-1	1	1	8	30	25	5:1	37,17	34,51
15	-1	1	1	1	4	50	25	5:1	28,12	30,03
16	1	1	1	1	8	50	25	5:1	26,77	28,24
17	2	0	0	0	10	40	20	4:1	42,16	41,24
18	-2	0	0	0	2	40	20	4:1	42,08	41,23
19	0	2	0	0	6	60	20	4:1	40,00	36,91
20	0	-2	0	0	6	20	20	4:1	49,71	51,03
21	0	0	2	0	6	40	30	4:1	23,05	20,37
22	0	0	-2	0	6	40	10	4:1	54,42	55,33
23	0	0	0	2	6	40	20	6:1	36,07	37,86
24	0	0	0	-2	6	40	20	2:1	50,27	46,71
25	0	0	0	0	6	40	20	4:1	30,40	30,39



3.8.1.1.'e göre model denkleminin oluşturulmasında kullanılacak b katsayıları hesaplanmıştır.

$$b = (X' \cdot X)^{-1} \cdot X' \cdot y \quad 3.8.1.1.$$

Candida Antarctica (Novozym 435) enziminin kemometrik optimizasyonu için b katsayıları kullanılarak oluşturulan model denklemi eşitlik 3.8.1.2.'de verilmiştir.

$$y = 30,395 + 0,004x_1 - 3,531x_2 - 8,739x_3 - 2,213x_4 + 2,710x_1^2 + 3,394x_2^2 + 1,863x_3^2 + 2,973x_4^2 - 0,744x_1x_2 + 1,618x_1x_3 - 1,772x_1x_4 + 2,333x_2x_3 - 1,193x_2x_4 + 1,144x_3x_4 \quad 3.8.1.2.$$

Oluşturulan model denkleminin seçilen faktörlere göre türevleri alınarak sıfıra eşitlenmiş ve optimum değerler hesaplanmıştır. Candida Antarctica (Novozym 435) enzimi ile biyodizel üretiminde optimum deneysel koşullar; *reaksiyon süresi* ( $x_1$ ) = 3,9 saat, *sıcaklık* ( $x_2$ ) = 55,8°C, *enzim miktarı* ( $x_3$ ) = 4,4 (% yağ ağırlığı) ve *alkol/yağ molar oranı* ( $x_4$ ) = 4,1/1 olarak bulunmuştur.

Eşitlik 3.8.1.2. kullanılarak biyodizel sentezinde tahmini ester verimleri bulunmuş ve yapılan optimizasyon çalışmasında % 4,52 gibi düşük bir ortalama karekök hata (RMSE) hesaplanmıştır.

### **3.8.2. Thermomyces Lanuginosus (Lipozyme TL-IM) Enziminin Kemometrik Optimizasyonu**

İmmobilize Thermomyces Lanuginosus (Lipozyme TL-IM) enzimi kullanılarak gerçekleştirilen biyodizel üretim prosesinin optimize edilmesi amacıyla oluşturulan 5 seviyeli 4 faktörlü merkezi kompozit dizayn ve 25 deney sonucu elde edilen veriler Çizelge 3.8.2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.8.2.1.** Thermomyces Lanuginosus (Lipozyme TL-IM) enziminin merkezi kompozit dizayn tablosu ve deneysel sonuçlar

Deney	Kodlanmış veriler				Deneysel veriler				Ağırlıkça dönüşüm (%)	
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	( $x_1$ ) Reaksiyon süresi (saat)	( $x_2$ ) Sıcaklık (°C)	( $x_3$ ) Enzim miktarı (%)	( $x_4$ ) Alkol/Yağ molar oranı	Deneysel	Tahmini
1	-1	-1	-1	-1	4	30	15	3:1	61,10	59,79
2	1	-1	-1	-1	8	30	15	3:1	47,17	47,17
3	-1	1	-1	-1	4	50	15	3:1	72,00	70,65
4	1	1	-1	-1	8	50	15	3:1	48,54	48,10
5	-1	-1	1	-1	4	30	25	3:1	46,86	48,49
6	1	-1	1	-1	8	30	25	3:1	62,00	60,81
7	-1	1	1	-1	4	50	25	3:1	60,71	58,83
8	1	1	1	-1	8	50	25	3:1	61,04	61,22
9	-1	-1	-1	1	4	30	15	5:1	64,00	64,82
10	1	-1	-1	1	8	30	15	5:1	55,88	55,52
11	-1	1	-1	1	4	50	15	5:1	66,04	65,00
12	1	1	-1	1	8	50	15	5:1	46,40	45,76
13	-1	-1	1	1	4	30	25	5:1	46,00	44,21
14	1	-1	1	1	8	30	25	5:1	57,50	59,85
15	-1	1	1	1	4	50	25	5:1	42,86	43,86
16	1	1	1	1	8	50	25	5:1	50,50	49,57
17	2	0	0	0	10	40	20	4:1	51,02	50,92
18	-2	0	0	0	2	40	20	4:1	56,51	57,84
19	0	2	0	0	6	60	20	4:1	58,96	60,89
20	0	-2	0	0	6	20	20	4:1	61,00	60,31
21	0	0	2	0	6	40	30	4:1	56,56	56,26
22	0	0	-2	0	6	40	10	4:1	62,22	63,76
23	0	0	0	2	6	40	20	6:1	42,94	42,61
24	0	0	0	-2	6	40	20	2:1	47,67	49,23
25	0	0	0	0	6	40	20	4:1	37,50	37,50

Çizelge 3.8.2.1.'deki deneysel veriler kullanılarak Microsoft Excel programı ile eşitlik 3.8.1.1.'e göre model denkleminin oluşturulmasında kullanılacak b katsayıları hesaplanmıştır. Thermomyces Lanuginosus (Lipozyme TL-IM) enziminin kemometrik optimizasyonu için b katsayıları kullanılarak oluşturulan model denklemi eşitlik 3.8.2.1.'de verilmiştir.

$$y = 37,500 - 1,729x_1 + 0,146x_2 - 1,875x_3 - 1,654x_4 + 4,221x_1^2 + 5,774x_2^2 + 5,627x_3^2 + 2,106x_4^2 - 2,482x_1x_2 + 6,236x_1x_3 + 0,831x_1x_4 - 0,130x_2x_3 - 2,672x_2x_4 - 2,328x_3x_4 \quad 3.8.2.1.$$

Oluşturulan model denkleminin seçilen faktörlere göre türevleri alınarak sıfıra eşitlenmiş ve optimum değerler hesaplanmıştır. Thermomyces Lanuginosus (Lipozyme TL-IM) enzimi ile biyodizel üretiminde optimum deneysel koşullar; *reaksiyon süresi* ( $x_1$ ) = 5,7 saat, *sıcaklık* ( $x_2$ ) = 33,9°C, *enzim miktarı* ( $x_3$ ) = 21,2 (% yağ ağırlığı) ve *alkol/yağ molar oranı* ( $x_4$ ) = 1,6/1 olarak bulunmuştur.

Eşitlik 3.8.2.1. kullanılarak biyodizel sentezinde tahmini ester verimleri bulunmuş ve yapılan optimizasyon çalışmasında % 2,18 gibi düşük bir ortalama karekök hata (RMSE) hesaplanmıştır.

### **3.8.3. Rhizomucor Miehei (Lipozyme RM-IM) Enziminin Kemometrik Optimizasyonu**

İmmobilize Rhizomucor Miehei (Lipozyme RM-IM) enzimi kullanılarak gerçekleştirilen biyodizel üretim prosesinin optimize edilmesi amacıyla oluşturulan 5 seviyeli 4 faktörlü merkezi kompozit dizayn ve 25 deney sonucu elde edilen veriler Çizelge 3.8.3.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.8.3.1.** Rhizomucor Miehei (Lipozyme RM-IM) enziminin merkezi kompozit dizayn tablosu ve deneysel sonuçlar

Deney	Kodlanmış veriler				Deneysel veriler				Ağırlıkça dönüşüm (%)	
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	(x <sub>1</sub> ) Reaksiyon süresi (saat)	(x <sub>2</sub> ) Sıcaklık (°C)	(x <sub>3</sub> ) Enzim miktarı (%)	(x <sub>4</sub> ) Alkol/Yağ molar oranı	Deneysel	Tahmini
1	-1	-1	-1	-1	4	30	15	3:1	63,36	61,61
2	1	-1	-1	-1	8	30	15	3:1	64,30	64,05
3	-1	1	-1	-1	4	50	15	3:1	63,38	63,15
4	1	1	-1	-1	8	50	15	3:1	62,62	62,76
5	-1	-1	1	-1	4	30	25	3:1	64,15	64,54
6	1	-1	1	-1	8	30	25	3:1	63,63	63,52
7	-1	1	1	-1	4	50	25	3:1	56,00	55,06
8	1	1	1	-1	8	50	25	3:1	51,38	51,20
9	-1	-1	-1	1	4	30	15	5:1	56,94	56,68
10	1	-1	-1	1	8	30	15	5:1	62,69	62,73
11	-1	1	-1	1	4	50	15	5:1	69,00	68,21
12	1	1	-1	1	8	50	15	5:1	72,26	71,43
13	-1	-1	1	1	4	30	25	5:1	55,24	54,20
14	1	-1	1	1	8	30	25	5:1	57,00	56,79
15	-1	1	1	1	4	50	25	5:1	54,90	54,71
16	1	1	1	1	8	50	25	5:1	53,61	54,47
17	2	0	0	0	10	40	20	4:1	65,55	65,15
18	-2	0	0	0	2	40	20	4:1	61,22	62,95
19	0	2	0	0	6	60	20	4:1	59,00	59,40
20	0	-2	0	0	6	20	20	4:1	59,25	60,18
21	0	0	2	0	6	40	30	4:1	54,50	54,54
22	0	0	-2	0	6	40	10	4:1	67,28	68,57
23	0	0	0	2	6	40	20	6:1	54,51	55,05
24	0	0	0	-2	6	40	20	2:1	55,92	56,71
25	0	0	0	0	6	40	20	4:1	56,12	56,12

Çizelge 3.8.3.1.'deki deneysel veriler kullanılarak Microsoft Excel programı ile eşitlik 3.8.1.1.'e göre model denkleminin oluşturulmasında kullanılacak b katsayıları hesaplanmıştır. *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) enziminin kemometrik optimizasyonu için b katsayıları kullanılarak oluşturulan model denklemi eşitlik 3.8.3.1.'de verilmiştir.

$$y = 56,120 + 0,549x_1 - 0,194x_2 - 3,508x_3 - 0,417x_4 + 1,983x_1^2 + 0,918x_2^2 + 1,359x_3^2 - 0,060x_4^2 - 0,709x_1x_2 - 0,866x_1x_3 + 0,903x_1x_4 - 2,756x_2x_3 + 2,498x_2x_4 - 1,353x_3x_4 \quad 3.8.3.1.$$

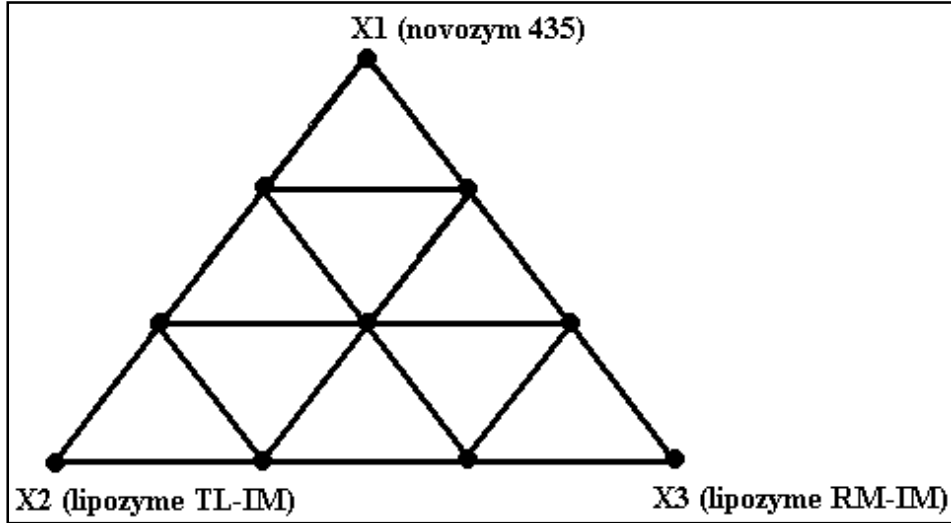
Oluşturulan model denkleminin seçilen faktörlere göre türevleri alınarak sıfıra eşitlenmiş ve optimum değerler hesaplanmıştır. *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) enzimi ile biyodizel üretiminde optimum deneysel koşullar; *reaksiyon süresi* ( $x_1$ ) = 6,2 saat, *sıcaklık* ( $x_2$ ) = 39,5°C, *enzim miktarı* ( $x_3$ ) = 13,8 (% yağ ağırlığı) ve *alkol/yağ molar oranı* ( $x_4$ ) = 3,1/1 olarak bulunmuştur.

Eşitlik 3.8.3.1. kullanılarak biyodizel sentezinde tahmini ester verimleri bulunmuş ve yapılan optimizasyon çalışmasında % 1,26 gibi düşük bir ortalama karekök hata (RMSE) hesaplanmıştır.

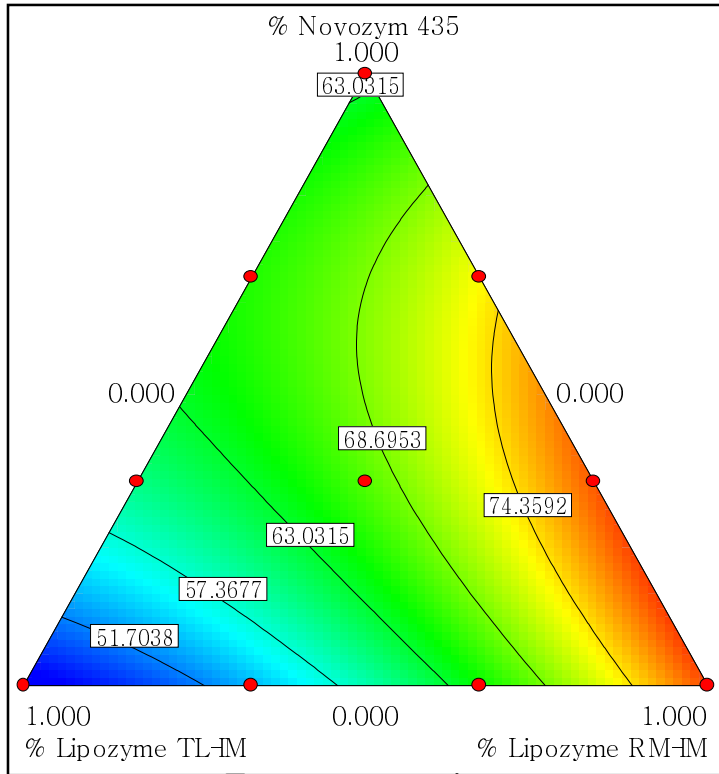
### 3.9. Karışım Dizayn İle Biyodizel Sentezinin Kemometrik Optimizasyonu

Lipazların spesifitesi, enzimin moleküler özellikleriyle, substratın yapısıyla ve enzim-substrat bağlantısını etkileyen faktörlerle yakından ilgilidir. Çalışmamızda biyodizel sentezinde enzim karışımının kullanılmasının ester verimine pozitif katkı sağlayacağı düşünülmüştür. Bu amaçla *Candida Antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) ve *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) immobilize enzimlerinin kullanıldığı biyodizel sentezinde optimum enzim karışımının belirlenmesi için kemometrik optimizasyon yöntemlerden biri olan simplex örgü dizayn yöntemi kullanılmıştır. Şekil 3.9.1.'de simplex örgü dizayn şekli, Şekil 3.9.2.'de lipaz enzimlerinin ternary grafiği, Çizelge 3.9.1.'de ise *Candida Antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) ve *Rhizomucor Miehei*

(Lipozyme RM-IM) enzimlerinin simplex örgü dizayn tablosu ve deneysel sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.9.1. Üçlü enzim karışımının karışım dizayn şeması ( $x_1$ : novozym 435;  $x_2$ : lipozyme TL-IM;  $x_3$ : lipozyme RM-IM)



Şekil 3.9.2. Lipazların ternary grafiği [*Candida Antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) and *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM)]

**Çizelge 3.9.1.** *Candida Antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) ve *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) enzimlerinin simplex örgü dizayn tablosu ve deneysel sonuçlar

Deney	Kodlanmış veriler			Deneysel veriler			Ağırlıkça dönüşüm (%)	
	$x_1$ (Novozym 435)	$x_2$ (Lipozyme TL-IM)	$x_3$ (Lipozyme RM-IM)	$x_1$ (Novozym 435) [gr]	$x_2$ (Lipozyme TL-IM) [gr]	$x_3$ (Lipozyme RM-IM) [gr]	Deneysel	Tahmini
1	1	0	0	2.1	0	0	62,24	62,00
2	0	1	0	0	2.1	0	46,93	46,04
3	0	0	1	0	0	2.1	78,57	79,70
4	1/3	2/3	0	0.7	1.4	0	58,12	60,07
5	2/3	1/3	0	1.4	0.7	0	67,34	65,39
6	1/3	0	2/3	0.7	0	1.4	81,63	78,95
7	2/3	0	1/3	1.4	0	0.7	70,36	73,04
8	0	2/3	1/3	0	1.4	0.7	52,85	53,57
9	0	1/3	2/3	0	0.7	1.4	65,51	64,79
10	1/3	1/3	1/3	0.7	0.7	0.7	67,34	67,34

Çizelge 3.9.1.'deki deneysel veriler kullanılarak Microsoft Excel programı ile eşitlik 3.8.1.1.'e göre model denkleminin oluşturulmasında kullanılacak b katsayıları hesaplanmıştır. *Candida Antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) ve *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) enzim karışımının kemometrik optimizasyonu için b katsayıları kullanılarak oluşturulan model denklemi eşitlik 3.91.'de verilmiştir.

$$y = 61,996x_1 + 46,040x_2 + 79,704x_3 + 39,205x_1x_2 + 23,152x_1x_3 - 16,615x_2x_3 - 8,708 x_1x_2x_3 \quad 3.9.1.$$

Elde edilen deneysel verilere göre % 33 *Candida Antarctica* (Novozym 435) ve % 66 *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) karışımının kullanıldığı biyodizel sentezinde

en yüksek ester dönüşümü elde edilmiş ve % 2,44 ortalama karekök hata (RMSE) hesaplanmıştır. Bulunan optimum enzim karışımı kullanılarak metanolün üç adımda eklendiği optimum sentez koşullarında ise % 97,2 ester dönüşüm değerine ulaşılmıştır.

### 3.10. Enzimatik Biyodizel Sentezinin ANOVA Analiz Sonuçları

*Candida Antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) ile *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) immobilize enzimlerinin ayrı ayrı kullanıldığı biyodizel sentezlerinin optimizasyon çalışmalarında ve üçlü enzim karışımının kullanıldığı mixture dizayn optimizasyonunda faktörlerin birbirleri arasında etkileşim olup olmadığının belirlenmesi amacıyla Çizelge 3.8.1.1., 3.8.2.1., 3.8.3.1. ve 3.9.1.'deki veriler kullanılarak Design-Expert-7 programı ile ANOVA analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.10.1., 3.10.2., 3.10.3. ve 3.10.4.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.10.1.** *Candida Antarctica* (Novozym 435) enzimi için ANOVA analiz sonuçları

	Kareleri Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karaleri Ortalaması	F-Değeri	p-Değeri
<b>Model</b>	<b>2636.04</b>	<b>14</b>	<b>188.29</b>	<b>22.05</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
X <sub>1</sub>	4.860.10 <sup>-4</sup>	1	4.860.10 <sup>-4</sup>	5.691.10 <sup>-5</sup>	0.9941
<b>X<sub>2</sub></b>	<b>299.22</b>	<b>1</b>	<b>299.22</b>	<b>35.04</b>	<b>0.0001</b>
<b>X<sub>3</sub></b>	<b>1832.67</b>	<b>1</b>	<b>1832.67</b>	<b>214.60</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>X<sub>4</sub></b>	<b>117.49</b>	<b>1</b>	<b>117.49</b>	<b>13.76</b>	<b>0.0040</b>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	8.84	1	8.84	1.04	0.3328
<b>X<sub>1</sub>X<sub>3</sub></b>	<b>41.91</b>	<b>1</b>	<b>41.91</b>	<b>4.91</b>	<b>0.0511</b>
<b>X<sub>1</sub>X<sub>4</sub></b>	<b>50.23</b>	<b>1</b>	<b>50.23</b>	<b>5.88</b>	<b>0.0357</b>
<b>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub></b>	<b>87.06</b>	<b>1</b>	<b>87.06</b>	<b>10.19</b>	<b>0.0096</b>
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	22.75	1	22.75	2.66	0.1337
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	20.93	1	20.93	2.45	0.1486
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	<b>82.94</b>	<b>1</b>	<b>82.94</b>	<b>9.71</b>	<b>0.0109</b>
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	<b>130.10</b>	<b>1</b>	<b>130.10</b>	<b>15.23</b>	<b>0.0029</b>
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	39.21	1	39.21	4.59	0.0578
<b>X<sub>4</sub><sup>2</sup></b>	<b>99.81</b>	<b>1</b>	<b>99.81</b>	<b>11.69</b>	<b>0.0066</b>
Artan	85.40	10	8.54		
Toplam	2721.43	24			



**Çizelge 3.10.2.** *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) enzimi için ANOVA analiz sonuçları

	Kareleri Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karaları Ortalaması	F-Değeri	p-Değeri
<b>Model</b>	<b>1734.89</b>	<b>14</b>	<b>123.92</b>	<b>35.18</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>X<sub>1</sub></b>	<b>71.77</b>	<b>1</b>	<b>71.77</b>	<b>20.38</b>	<b>0.0011</b>
X <sub>2</sub>	0.51	1	0.51	0.14	0.7119
<b>X<sub>3</sub></b>	<b>84.34</b>	<b>1</b>	<b>84.34</b>	<b>23.94</b>	<b>0.0006</b>
<b>X<sub>4</sub></b>	<b>65.66</b>	<b>1</b>	<b>65.66</b>	<b>18.64</b>	<b>0.0015</b>
<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	<b>98.58</b>	<b>1</b>	<b>98.58</b>	<b>27.98</b>	<b>0.0004</b>
<b>X<sub>1</sub>X<sub>3</sub></b>	<b>622.13</b>	<b>1</b>	<b>622.13</b>	<b>176.61</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	11.05	1	11.05	3.14	0.1070
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.27	1	0.27	0.077	0.7874
<b>X<sub>2</sub>X<sub>4</sub></b>	<b>114.20</b>	<b>1</b>	<b>114.20</b>	<b>32.42</b>	<b>0.0002</b>
<b>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub></b>	<b>86.72</b>	<b>1</b>	<b>86.72</b>	<b>24.62</b>	<b>0.0006</b>
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	<b>201.19</b>	<b>1</b>	<b>201.19</b>	<b>57.12</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	<b>376.59</b>	<b>1</b>	<b>376.59</b>	<b>106.91</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	<b>357.60</b>	<b>1</b>	<b>357.60</b>	<b>101.52</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>X<sub>4</sub><sup>2</sup></b>	<b>50.08</b>	<b>1</b>	<b>50.08</b>	<b>14.22</b>	<b>0.0037</b>
Artan	35.23	10	3.52		
Toplam	1770.11	24			

**Çizelge 3.10.3.** *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) enzimi için ANOVA analiz sonuçları

	Kareleri Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karaleri Ortalaması	F-Değeri	p-Değeri
<b>Model</b>	<b>679.21</b>	<b>14</b>	<b>48.51</b>	<b>33.85</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>X<sub>1</sub></b>	<b>7.24</b>	<b>1</b>	<b>7.24</b>	<b>5.05</b>	<b>0.0484</b>
X <sub>2</sub>	0.90	1	0.90	0.63	0.4453
<b>X<sub>3</sub></b>	<b>295.40</b>	<b>1</b>	<b>295.40</b>	<b>206.10</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
X <sub>4</sub>	4.17	1	4.17	2.91	0.1190
<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	<b>8.04</b>	<b>1</b>	<b>8.04</b>	<b>5.61</b>	<b>0.0394</b>
<b>X<sub>1</sub>X<sub>3</sub></b>	<b>12.01</b>	<b>1</b>	<b>12.01</b>	<b>8.38</b>	<b>0.0160</b>
<b>X<sub>1</sub>X<sub>4</sub></b>	<b>13.03</b>	<b>1</b>	<b>13.03</b>	<b>9.09</b>	<b>0.0130</b>
<b>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub></b>	<b>121.55</b>	<b>1</b>	<b>121.55</b>	<b>84.81</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>X<sub>2</sub>X<sub>4</sub></b>	<b>99.80</b>	<b>1</b>	<b>99.80</b>	<b>69.63</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub></b>	<b>29.27</b>	<b>1</b>	<b>29.27</b>	<b>20.42</b>	<b>0.0011</b>
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	<b>44.41</b>	<b>1</b>	<b>44.41</b>	<b>30.98</b>	<b>0.0002</b>
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	<b>9.52</b>	<b>1</b>	<b>9.52</b>	<b>6.64</b>	<b>0.0276</b>
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	<b>20.86</b>	<b>1</b>	<b>20.86</b>	<b>14.56</b>	<b>0.0034</b>
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	0.040	1	0.040	0.028	0.8705
Artan	14.33	10	1.43		
Toplam	693.54	24			

**Çizelge 3.10.4.** *Candida Antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) ve *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) enzimlerinin kullanıldığı karışım dizayn verileri için ANOVA analiz sonuçları

	Kareleri Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karaleri Ortalaması	F-Değeri	p-Değeri
<b>Model</b>	<b>1004.48</b>	<b>6</b>	<b>167.41</b>	<b>19.94</b>	<b>0.0163</b>
<b>Linear Mixture</b>	<b>861.70</b>	<b>2</b>	<b>430.85</b>	<b>51.32</b>	<b>0.0048</b>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	77.75	1	77.75	9.26	0.0557
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	27.12	1	27.12	3.23	0.1702
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	13.96	1	13.96	1.66	0.2876
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.071	1	0.071	8.495.10 <sup>-3</sup>	0.9324
Artan	25.19	3	8.40		
Toplam	1029.66	9			

Anova analiz sonuçlarının verildiği tablolara göre p değeri 0,05' den küçük olan faktörler ester veriminde önemli diğer faktörler ise önemsiz kabul edilmiştir. Buna göre her bir enzim için önemli parametreler ile oluşturulan tahmini model denklemleri eşitlik 3.10.1., 3.10.2. ve 3.10.3.'de verilmiştir.

*Candida Antarctica* (Novozym 435);

$$y = 30,395 - 3,531x_2 - 8,739x_3 - 2,213x_4 + 2,710x_1^2 + 3,394x_2^2 + 2,973x_3^2 + 1,618x_1x_3 - 1,772x_1x_4 + 2,333x_2x_3 \quad 3.10.1.$$

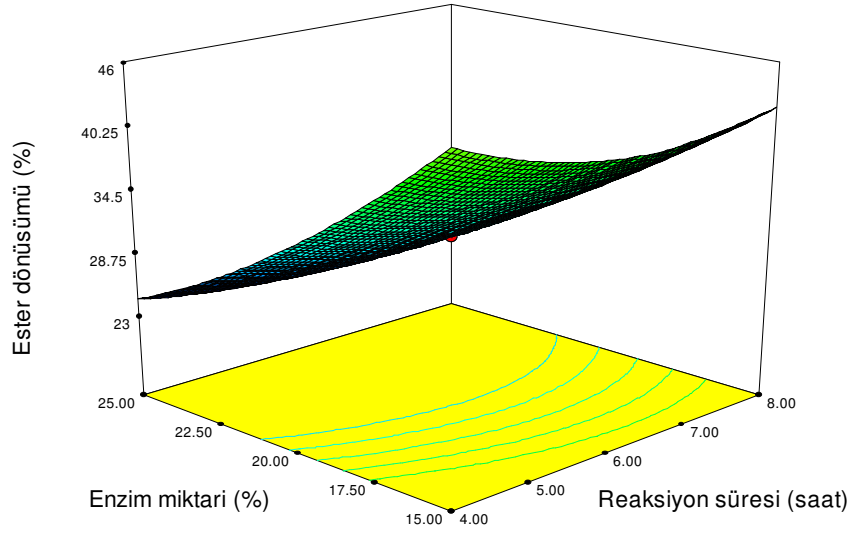
*Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM);

$$y = 37,500 - 1,729x_1 - 1,875x_3 - 1,654x_4 + 4,221x_1^2 + 5,774x_2^2 + 5,627x_3^2 + 2,106x_4^2 - 2,482x_1x_2 + 6,236x_1x_3 - 2,672x_2x_4 - 2,328x_3x_4 \quad 3.10.2.$$

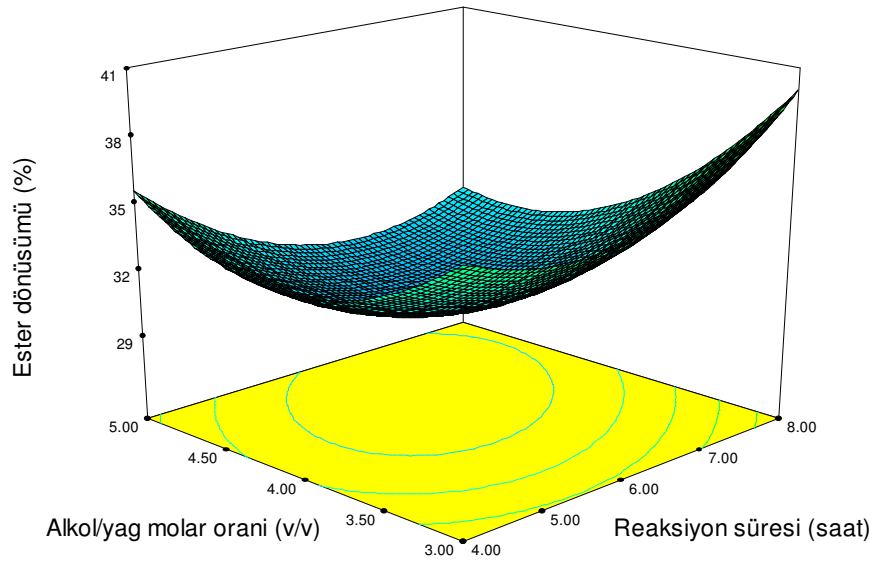
*Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM);

$$y = 56,120 + 0,549x_1 - 3,508x_3 + 1,983x_1^2 + 0,918x_2^2 + 1,359x_3^2 - 0,709x_1x_2 - 0,866x_1x_3 + 0,903x_1x_4 - 2,756x_2x_3 + 2,498x_2x_4 - 1,353x_3x_4 \quad 3.10.3.$$

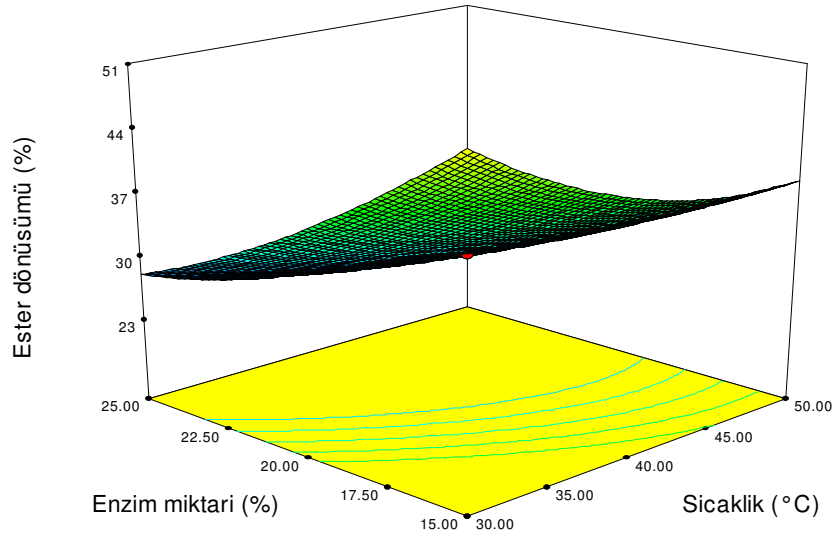
Elde edilen model denklemlerine göre *Candida Antarctica* (Novozym 435) enzimi için önemli faktör etkileşimleri  $x_1x_3$  (reaksiyon süresi-enzim miktarı);  $x_1x_4$  (reaksiyon süresi-alkol/yağ molar oranı) ve  $x_2x_3$  (sıcaklık-enzim miktarı) olarak, *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) enzimi için  $x_1x_2$  (reaksiyon süresi-sıcaklık);  $x_1x_3$  (reaksiyon süresi-enzim miktarı),  $x_2x_4$  (sıcaklık-alkol/yağ molar oranı) ve  $x_3x_4$  (enzim miktarı-alkol/yağ molar oranı) olarak ve *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) enzimi için ise  $x_1x_4$  (reaksiyon süresi-alkol/yağ molar oranı);  $x_2x_3$  (sıcaklık-enzim miktarı);  $x_2x_4$  (sıcaklık-alkol/yağ molar oranı) ve  $x_3x_4$  (enzim miktarı-alkol/yağ molar oranı) olarak belirlenmiş. *Candida Antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) ve *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) enzimlerinin kullanıldığı biyodizel sentez reaksiyonlarında önemli faktör etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkileri sırasıyla Şekil 3.10.1., 3.10.2. ve 3.10.3.'de gösterilmiştir.



(a) Enzim miktarı ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.

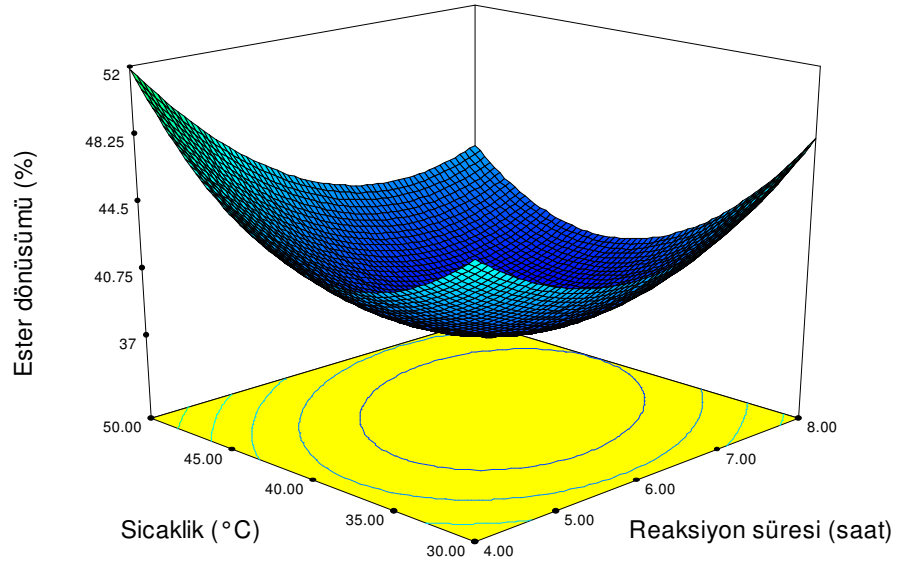


(b) Alkol/yağ molar oranı ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.

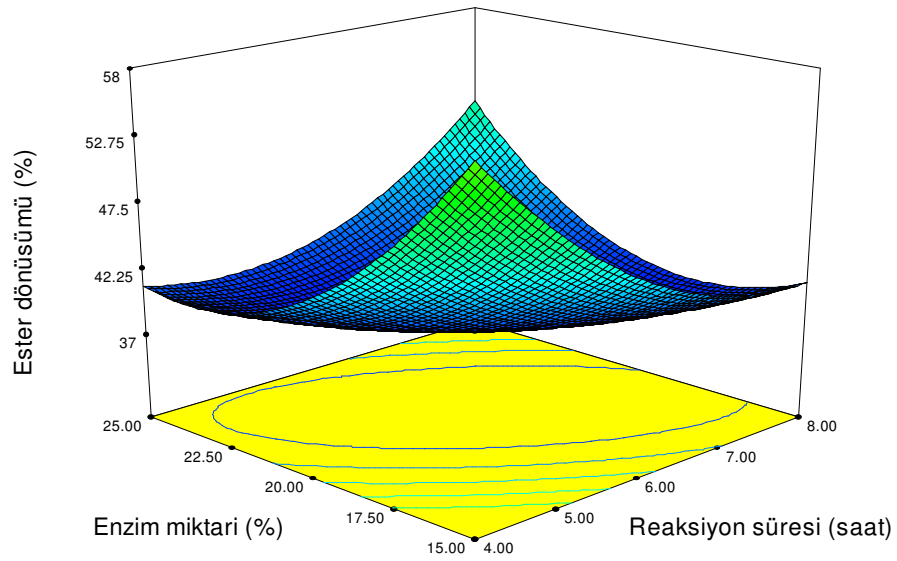


(c) Enzim miktarı ile sıcaklık ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.

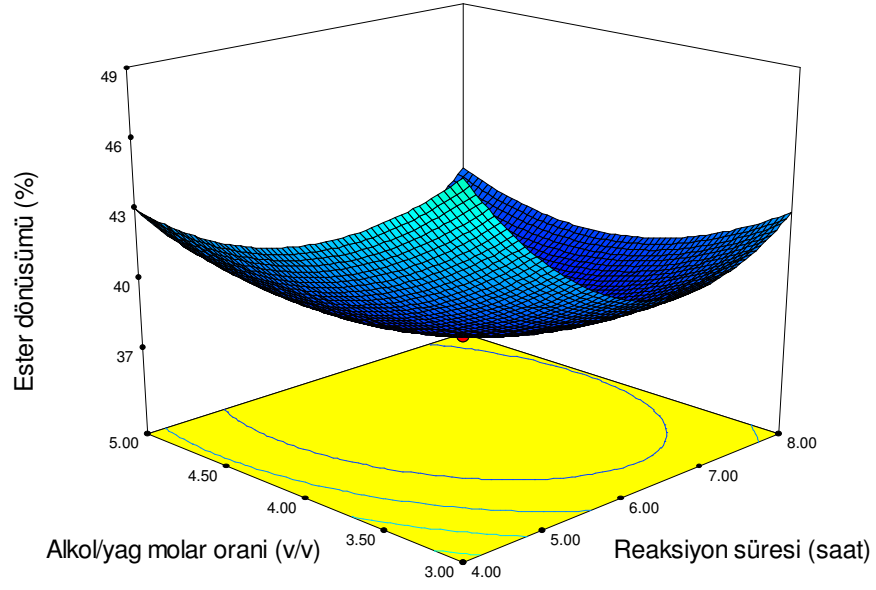
**Şekil 3.10.1.** *Candida Antarctica* (Novozym 435) enziminin kullanıldığı biyodizel sentez reaksiyonlarında önemli faktör etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkilerini gösteren yüzey grafikleri. (a); Enzim miktarı ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği. (b); Alkol/yağ molar oranı ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği. (c); Enzim miktarı ile sıcaklık ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.



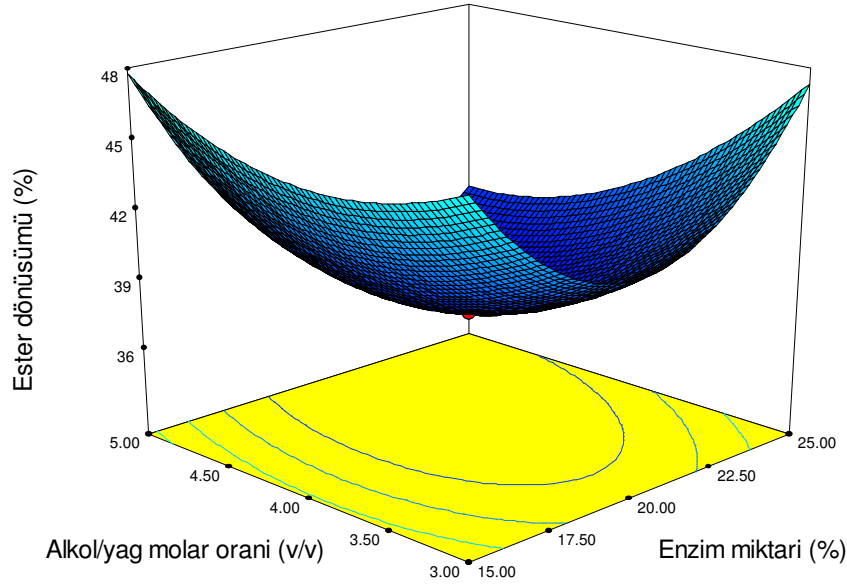
(a) Sıcaklık ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.



(b) Enzim miktarı ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.



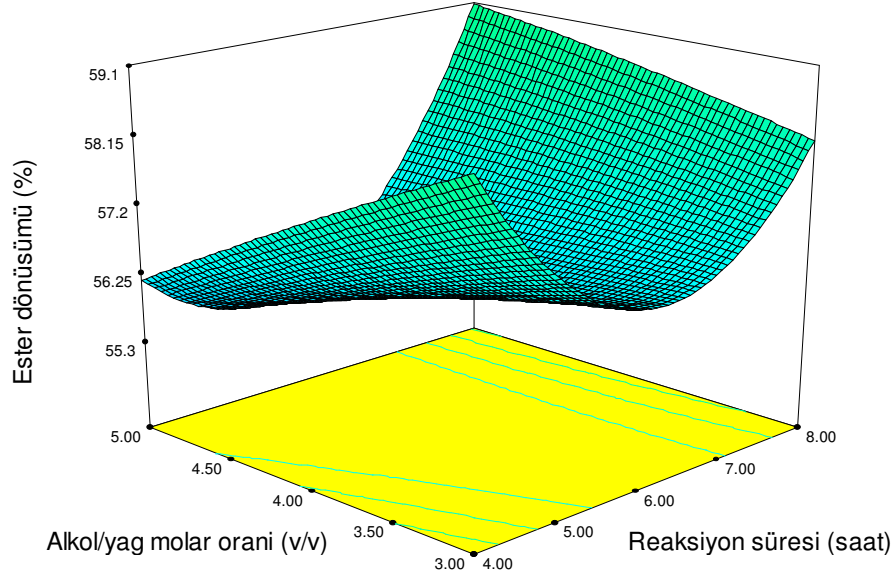
(c) Alkol/yağ molar oranı ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.



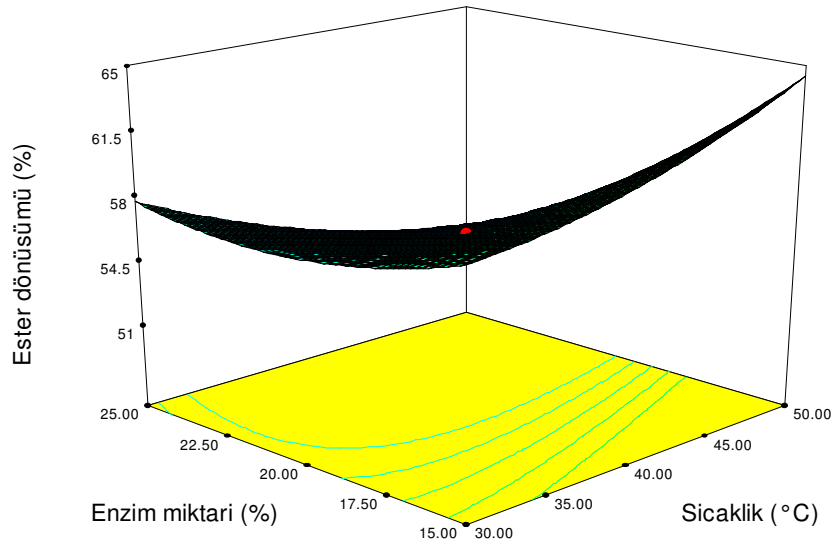
(d) Alkol/yağ molar oranı ile enzim miktarı ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.

**Şekil 3.10.2.** *Thermomyces Lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) enziminin kullanıldığı biyodizel sentez reaksiyonlarında önemli faktör etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkilerini gösteren yüzey grafikleri. (a); Sıcaklık ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği. (b); Enzim miktarı ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği. (c); Alkol/yağ molar oranı ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği. (d) Alkol/yağ molar oranı ile enzim miktarı ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.

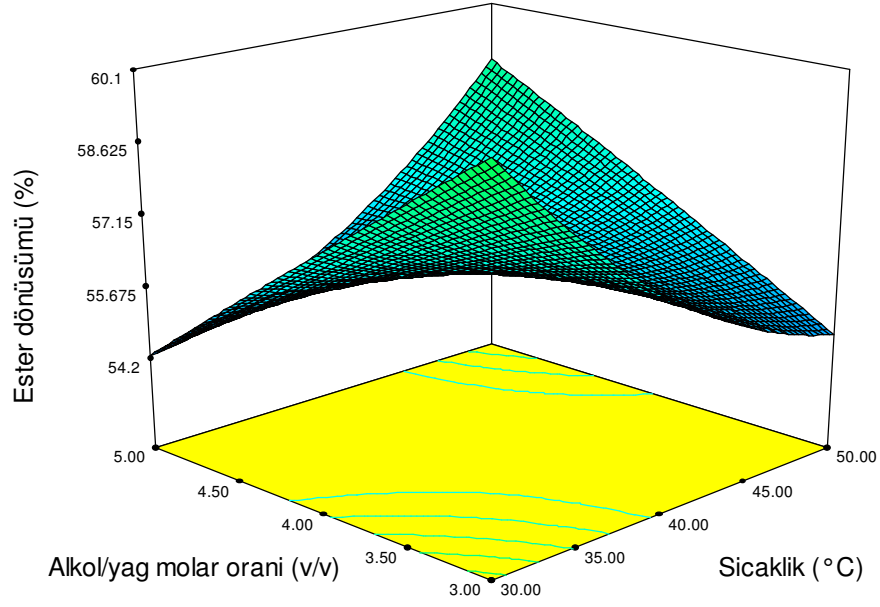




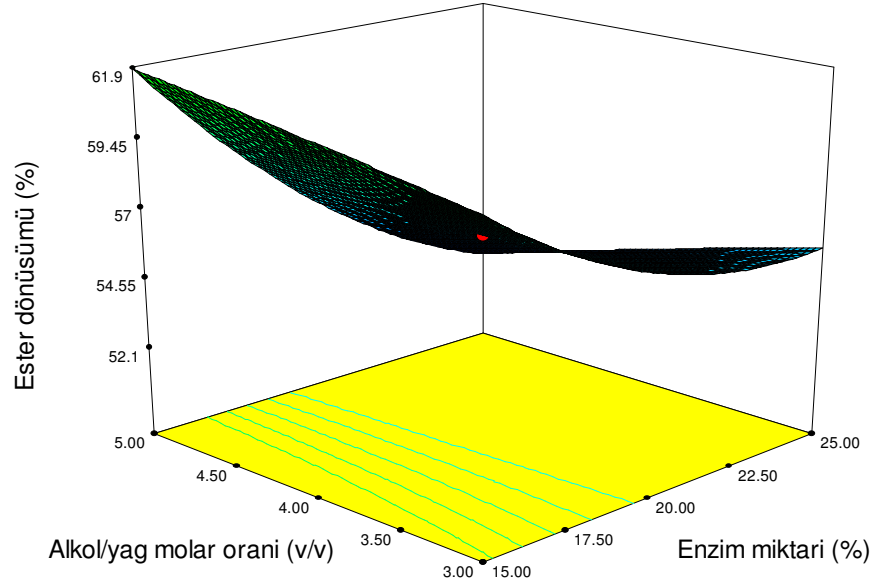
(a) Alkol/yağ molar oranı ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.



(b) Enzim miktarı ile sıcaklık ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.



(c) Alkol/yağ molar oranı ile sıcaklık ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.



(d) Alkol/yağ molar oranı ile enzim miktarı ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.

**Şekil 3.10.3.** *Rhizomucor Miehei* (Lipozyme RM-IM) enziminin kullanıldığı biyodizel sentez reaksiyonlarında önemli faktör etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkilerini gösteren yüzey grafikleri. (a); Alkol/yağ molar oranı ile reaksiyon süresi ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği. (b); Enzim miktarı ile sıcaklık ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği. (c); Alkol/yağ molar oranı ile sıcaklık ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği. (d) Alkol/yağ molar oranı ile enzim miktarı ve karşılıklı etkileşimlerinin ester dönüşümüne etkisini gösteren yüzey grafiği.

### 3.11. Biyodizel Yakıtın TSEN 14214 Analizleri

Optimum deneysel koşullarda enzimatik transesterleşme reaksiyonu ile sentezlenen biyodizel yakıtın TSEN 14214'e göre sahip olması gereken özelliklerden bazıları standart analiz yöntemlerine göre analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar izelge 3.11.1.'de verilmiştir.

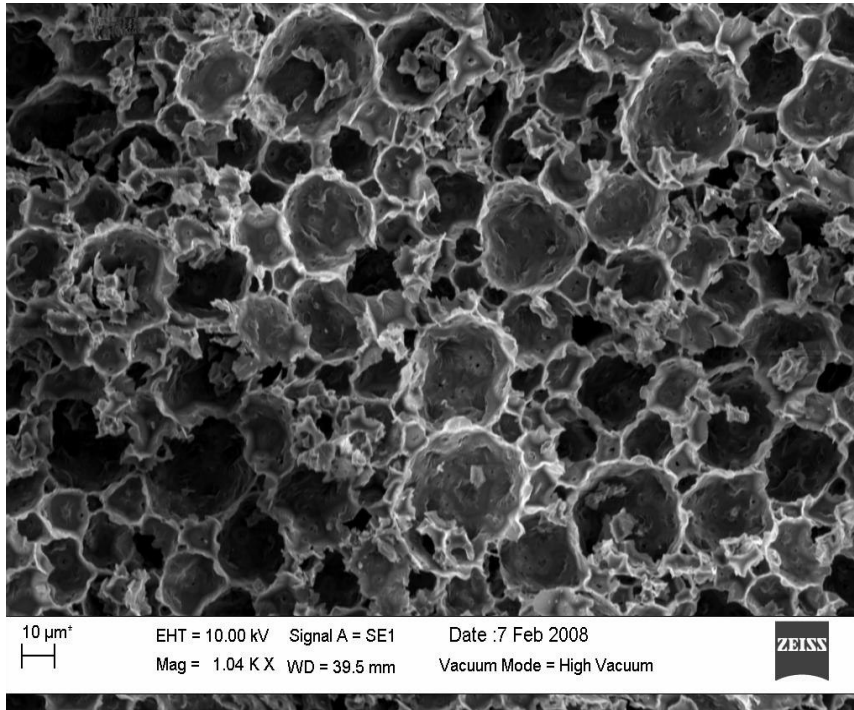
Çizelge 3.11.1. Optimum deneysel koşullarda enzimatik transesterleşme reaksiyonu ile sentezlenen biyodizel yakıtın TSEN 14214 analiz sonuçları

Analiz Adı	Birim	En Az (min.)	En çok (max.)	Deney sonucu	Deney Yöntemi
Ester muhtevası	% (m/m)	96,5	-	97,26±0,65	EN 14103
Asit sayısı	mg KOH/g	-	0,5	0,48±0,04	EN 14104
İyot sayısı	g iyot/100 g	-	120	112±4,69	EN 14111
Linolenik asit metil esteri	% (m/m)	-	12	9,76±0,43	EN 14103
Metanol muhtevası	% (m/m)	-	0,2	0,11±0,003	EN 14110
Monogliserit muhtevası	% (m/m)	-	0,8	0,30±0,10	EN 14105
Diğliserit muhtevası	% (m/m)	-	0,2	0,20±0,03	EN 14105
Trigliserit muhtevası	% (m/m)	-	0,2	0,18±0,01	EN 14105
Serbest gliserol	% (m/m)	-	0,02	0,012±0,05	EN 14105 EN 14106
Toplam gliserol	% (m/m)	-	0,25	0,17±0,015	EN 14105

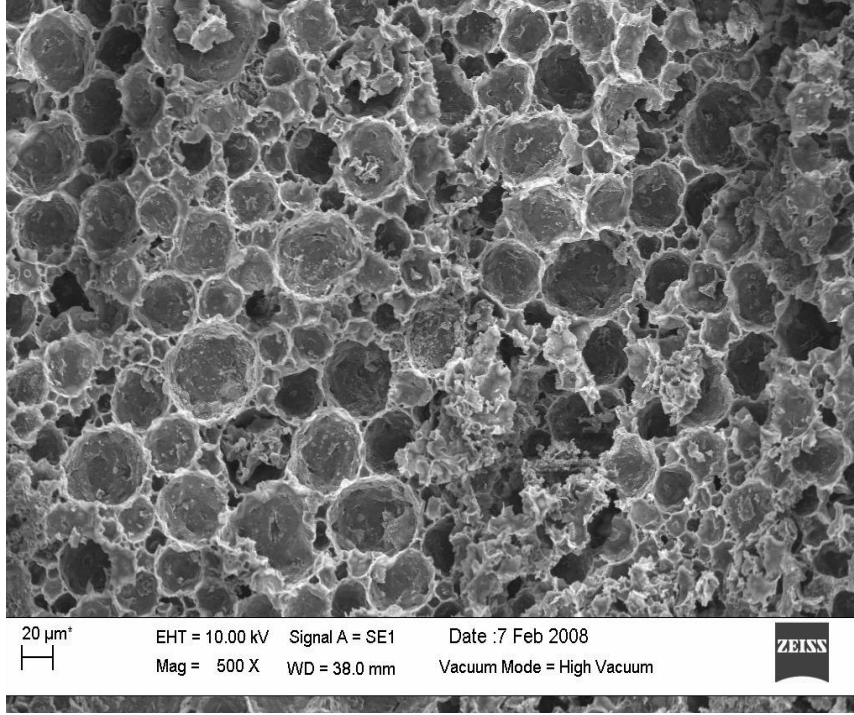
Standart deney yöntemlerine göre yapılan analizler sonucu biyodizel yakıtın TSEN 14214 standartlarını sağladığı gözlenmiştir.

### 3.12. Destek Maddesinin SEM Analizi İle Yüzey Karakterizasyonu

Enzim immobilizasyonunda kullandığımız destek maddelerinin yüzey özellikleri ve onların immobilize olmuş türevleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Şekil 3.12.1.'de stiren-divinilbenzen (STR-DVB) polimerinin yüzeyi Lipozyme TL100L enzimi immobilizasyonu öncesi ve sonrası görülmektedir. SEM görüntüleri incelendiğinde immobilizasyon öncesi geniş ve düzensiz olan porların immobilizasyon sonrası daha düzenli ve dar olduğu görülmektedir.



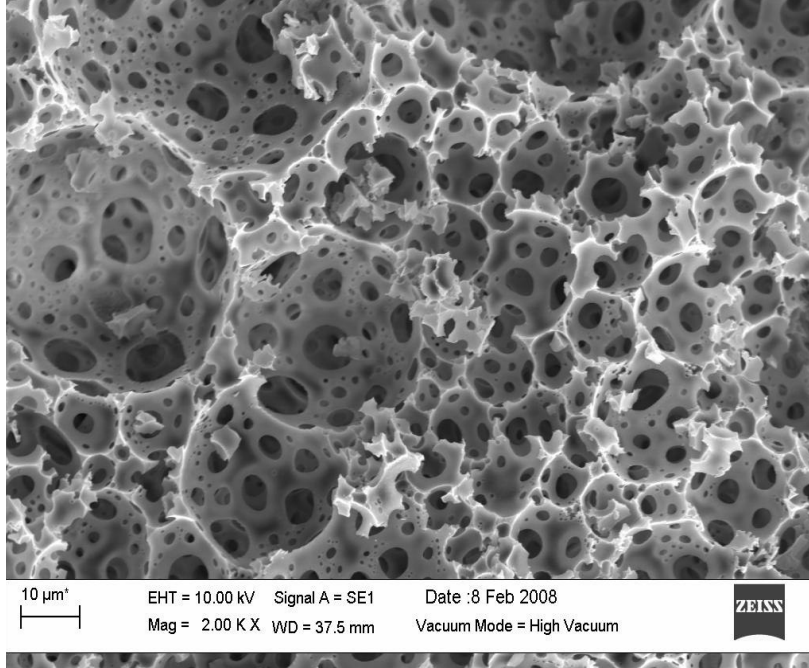
(a) İmmobilizasyon öncesi stiren-divinilbenzen (STR-DVB) polimeri



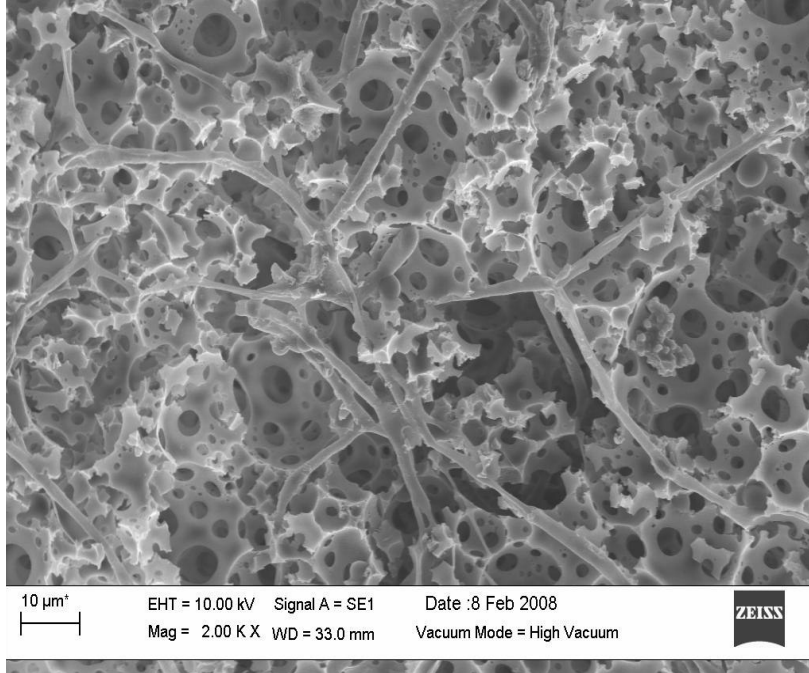
(b) İmmobilizasyon sonrası stiren-divinilbenzen (STR-DVB) polimeri

**Şekil 3.12.1.** Stiren-divinilbenzen (STR-DVB) polimerinin SEM görüntüsü (a) immobilizasyon öncesi (b) immobilizasyon sonrası

Şekil 3.12.2.'de ise stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimerinin enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrası yüzey yapısı görülmektedir. SEM görüntüleri incelendiğinde immobilizasyon öncesi porların geniş ve düzensiz olduğu immobilizasyon sonrası ise lifli bir yapının yanında porların daha düzenli ve dar olduğu görülmektedir.



(a) İmmobilizasyon öncesi stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimeri



(b) İmmobilizasyon sonrası stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimeri

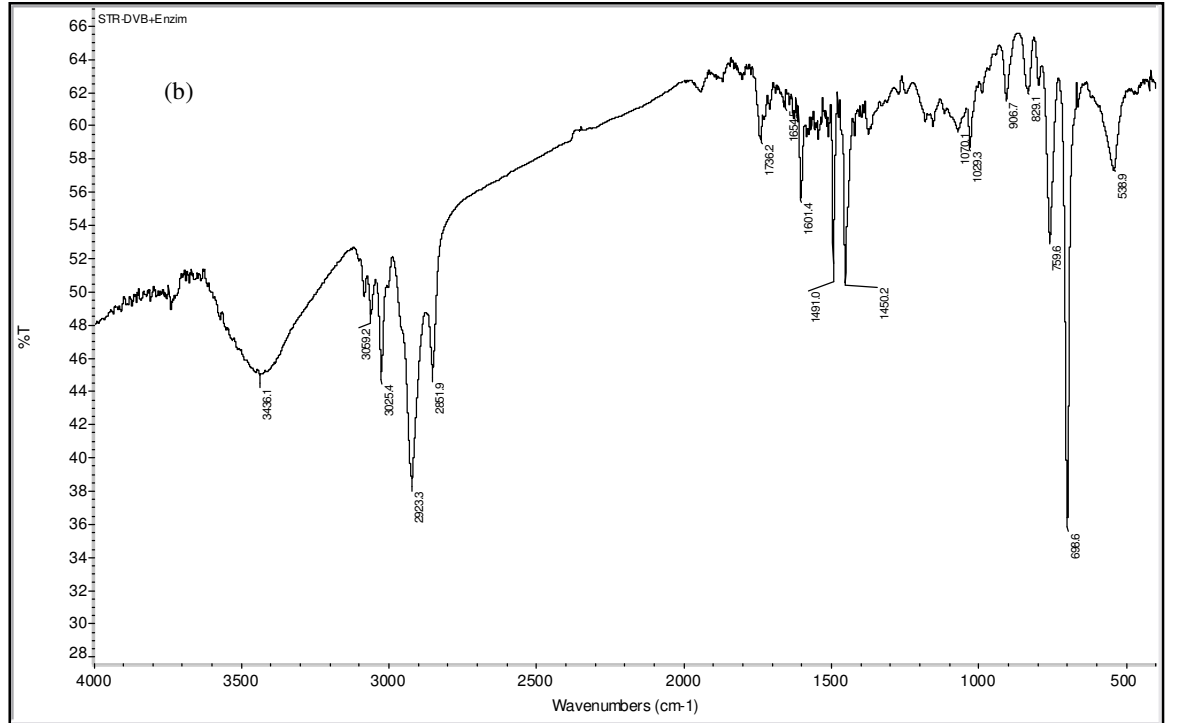
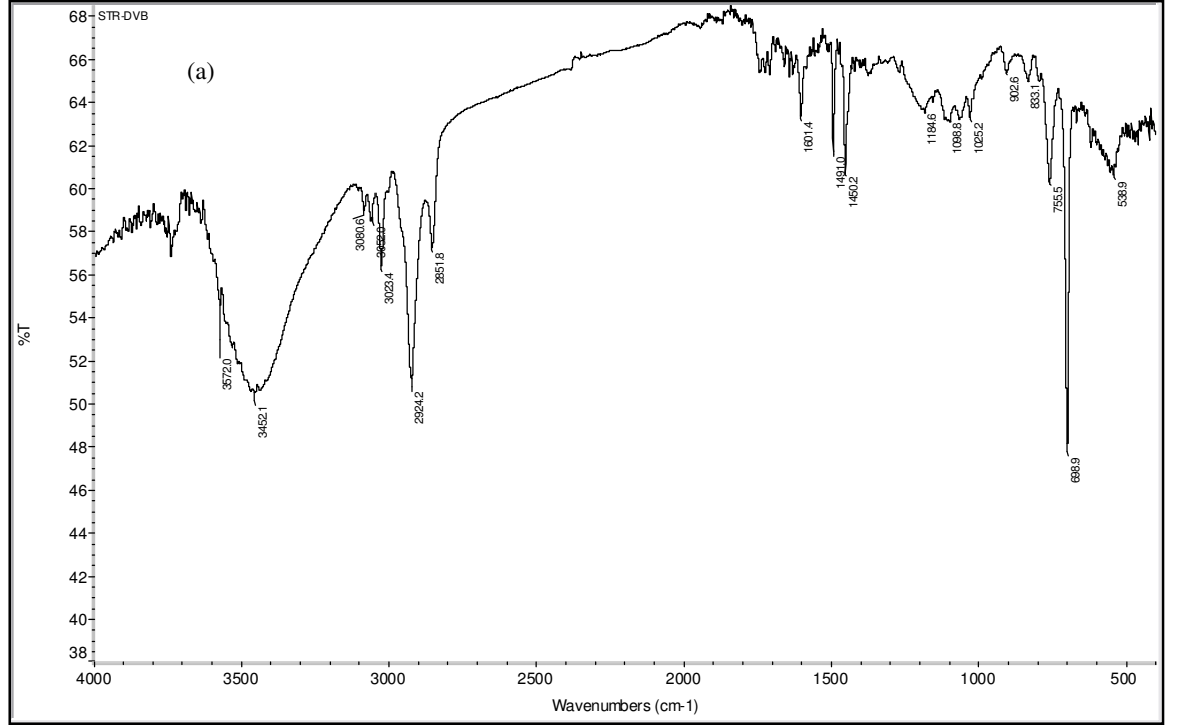
**Şekil 3.12.2.** Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimerinin SEM görüntüsü (a) immobilizasyon öncesi (b) immobilizasyon sonrası

### 3.13. Destek Maddesinin FTIR Analizi İle Yapı Karakterizasyonu

Enzim immobilizasyonunda kullandığımız destek maddelerinin yapı özellikleri ve onların Lipozyme TL100L lipaz enzimi ile immobilize olmuş türevleri fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ile incelenmiştir. Şekil 3.13.1., Şekil 3.13.2. ve Şekil 3.13.3.'de sırasıyla stiren-divinilbenzen (STR-DVB), stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) ve celite 545 destek maddelerinin Lipozyme TL100L lipaz enzimi ile immobilizasyon öncesi ve immobilizasyon sonrası FTIR spektrumları gösterilmiştir.

Şekil 3.13.1. incelendiğinde Lipozyme TL-100L immobilizasyonu öncesi  $3452\text{ cm}^{-1}$  de STR-DVB kopolimerinin polimerizasyon adımlarından gelen suya ait OH absorpsiyon bandı,  $3060\text{ cm}^{-1}$  ve  $3023\text{ cm}^{-1}$  de aromatik C-H gerilmesi,  $2924\text{ cm}^{-1}$  ve  $2852\text{ cm}^{-1}$  de alifatik C-H gerilmesi,  $1601\text{ cm}^{-1}$ ,  $1491\text{ cm}^{-1}$  ve  $1450\text{ cm}^{-1}$  de aromatik C=C gerilmesi,  $1025\text{ cm}^{-1}$  ve  $903\text{ cm}^{-1}$ 'de aromatik C-H düzlem içi eğilmesi (p-süstitüe benzen için),  $796\text{ cm}^{-1}$ ,  $756\text{ cm}^{-1}$  ve  $699\text{ cm}^{-1}$ , de aromatik düzlem dışı eğilmesine (p-süstitüe benzen için) ait pikler görülmektedir. Poliglutaraldehit ile aktive edilmiş STR-DVB kopolimerine Lipozyme TL100L lipaz enzimi immobilizasyonu sonrası ise  $1736\text{ cm}^{-1}$ 'de aldehit grubuna karşılık gelen C=O gerilmesine ait pikler poliglutaraldehit ile aktive edilen STR-DVB kopolimerinde poliglutaraldehitin varlığını göstermektedir. Polimerin  $1654\text{ cm}^{-1}$  de gösterdiği absorpsiyon piki ise poliglutaraldehit ile aktive edilen STR-DVB kopolimerinde gözlenen C=O bağı ile lipaz enzimi arasında immobilizasyon süresince oluşan imin bağı (-C=N) göstermektedir.

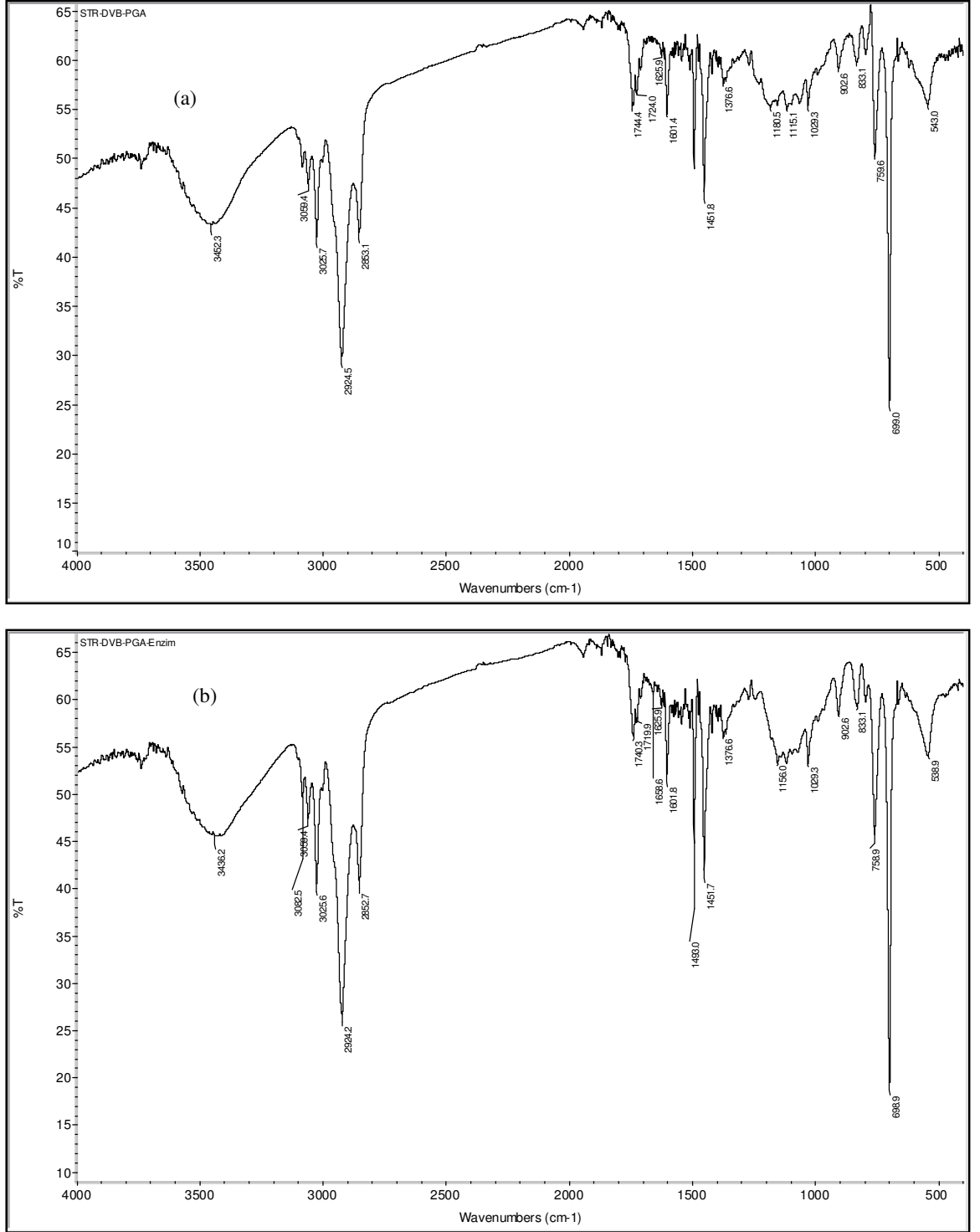




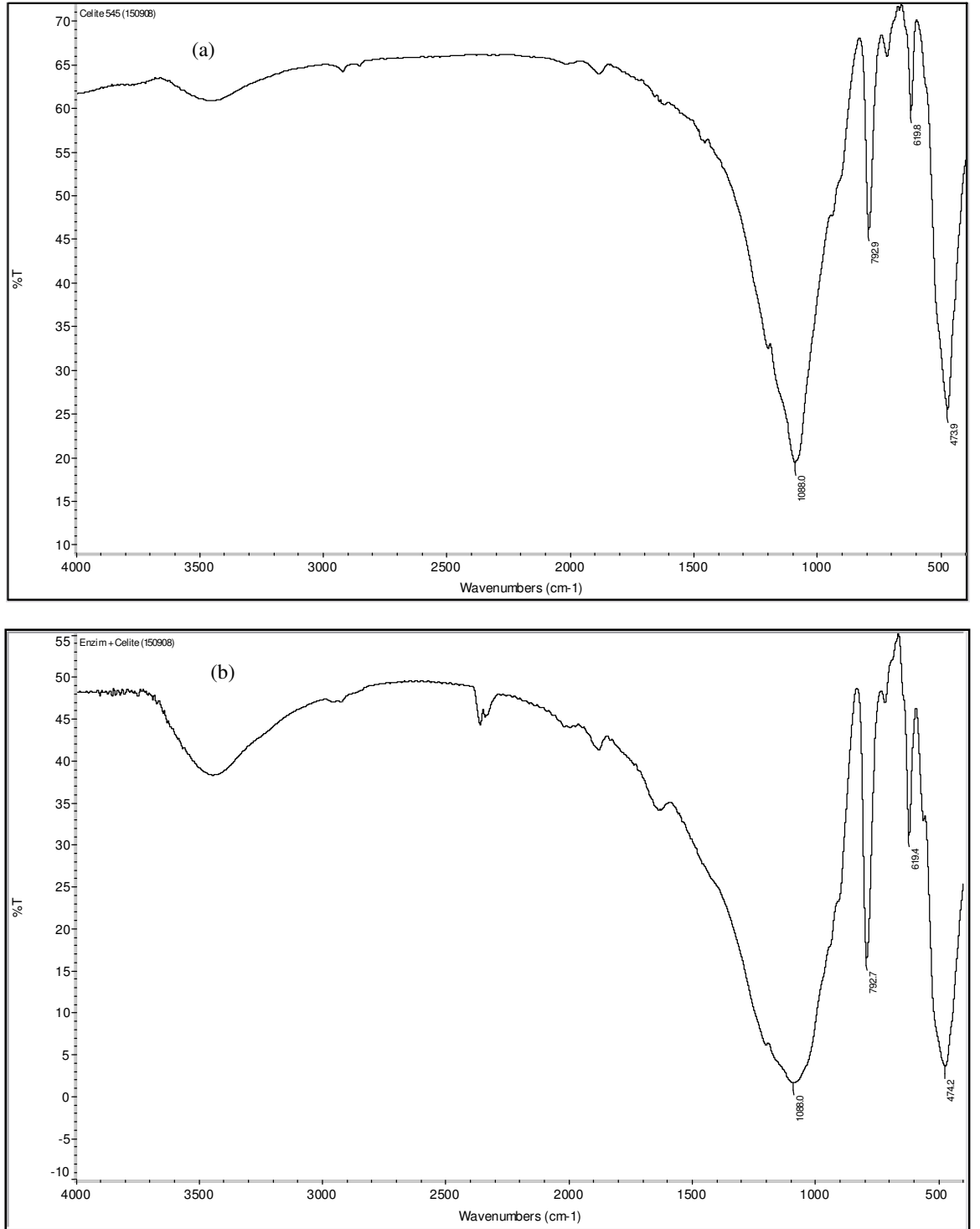
**Şekil 3.13.1.** Stiren-divinilbenzen (STR-DVB) kopolimerinin FTIR spektrumu (a) Lipozyme TL-100L immobilizasyonu öncesi (b) Poliglutaraldehit ile aktive edilmiş STR-DVB kopolimerine Lipozyme TL-100L immobilizasyonu sonrası

Şekil 3.13.2. incelendiğinde Lipozyme TL-100L immobilizasyonu öncesi  $3452\text{ cm}^{-1}$  de STR-DVB-PGA kopolimerinin polimerizasyon adımlarından gelen suya ait OH absorpsiyon bandı,  $3059\text{ cm}^{-1}$  ve  $3026\text{ cm}^{-1}$  de aromatik C-H gerilmesi,  $2925\text{ cm}^{-1}$  ve  $2853\text{ cm}^{-1}$  de alifatik C-H gerilmesi,  $1601\text{ cm}^{-1}$ ,  $1493\text{ cm}^{-1}$  ve  $1451\text{ cm}^{-1}$  de aromatik C=C gerilmesi,  $1029\text{ cm}^{-1}$  ve  $903\text{ cm}^{-1}$ 'de aromatik C-H düzlem içi eğilmesi (p-süstitüe benzen için),  $833\text{ cm}^{-1}$ ,  $760\text{ cm}^{-1}$  ve  $699\text{ cm}^{-1}$ , de aromatik düzlem dışı eğilmesine (p-süstitüe benzen için) ait pikler görülmektedir.  $1744\text{ cm}^{-1}$  ve  $1724\text{ cm}^{-1}$  de aldehit grubuna karşılık gelen C=O gerilmesine ait pikler STR-DVB-PGA kopolimerinde poliglutaraldehitin varlığını göstermektedir. Lipozyme TL100L lipaz enzimi immobilizasyonu sonrası STR-DVB-PGA kopolimerinin  $1658\text{ cm}^{-1}$  de gösterdiği absorpsiyon piki ise STR-DVB-PGA kopolimerinde gözlenen C=O bağı ile lipaz enzimi arasında immobilizasyon süresince oluşan imin bağı (-C=N) nedeniyledir.

Şekil 3.13.3. incelendiğinde Lipozyme TL-100L immobilizasyonu öncesi  $3450\text{ cm}^{-1}$  de celite 545 destek maddesinin içerdiği suya ait OH absorpsiyon bandı ve  $1088\text{ cm}^{-1}$  de Si-O gerilmesine ait pikler görülmektedir. Poliglutaraldehit ile aktive edilmiş celite 545 destek maddesine Lipozyme TL100L lipaz enzimi immobilizasyonu sonrası ise  $1850\text{ cm}^{-1}$  de aldehit grubuna karşılık gelen C=O gerilmesine ait pikler poliglutaraldehit ile aktive edilen celite 545 destek maddesinde poliglutaraldehitin varlığını göstermektedir. Celite 545' in  $1640\text{ cm}^{-1}$  de gösterdiği absorpsiyon piki ise poliglutaraldehit ile aktive edilen celite 545 destek maddesinde gözlenen C=O bağı ile lipaz enzimi arasında immobilizasyon süresince oluşan imin bağı (-C=N) göstermektedir.



**Şekil 3.13.2.** Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) kopolimerinin FTIR spektrumu (a) Lipozyme TL-100L immobilizasyonu öncesi (b) Lipozyme TL-100L immobilizasyonu sonrası



**Şekil 3.13.3.** Celite 545 destek maddesinin FTIR spektrumu (a) Lipozyme TL-100L immobilizasyonu öncesi (b) Poliglutaraldehit ile aktive edilmiş Celite 545 destek maddesinin Lipozyme TL-100L immobilizasyonu sonrası

### 3.14. Kantitatif Protein Analiz Sonuçları

Çalışmamızda iki farklı serbest lipaz enzimi “Lipozyme TL-100L ve Novozyme 388“ beş farklı destek maddesine “stiren-divinilbenzen (STR-DVB), stiren-divinilbenzen-glutaraldehit (STR-DVB-GA), stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA), celite 545 ve silikajel“ adsorpsiyon ve kovalent bağlama olmak üzere iki farklı metotla immobilize edilmiştir. Destek maddelerine immobilize olan protein miktarları Bradford protein analiz yöntemiyle belirlenmiştir. Çizelge 3.14.1.’de destek maddelerine immobilize olan Novozyme 388 enziminin protein analiz sonuçları Çizelge 3.14.2.’de ise Lipozyme TL-100L enziminin protein analiz sonuçları verilmiştir.

**Çizelge 3.14.1.** Destek maddelerine immobilize olan Novozyme 388 enziminin protein analiz sonuçları

Destek maddesi	Fiziksel immobilizasyon metodu (Adsorpsiyon)		Kimyasal immobilizasyon metodu (Kovalent bağlama)	
	İmmobilize enzim (mg/g-destek)	İmmobilizasyon verimi (%)	İmmobilize enzim (mg/g-destek)	İmmobilizasyon verimi (%)
1. STR-DVB	10.96	29.22	0.99	11.65
2. STR-DVB-GA	-	-	1.77	26.21
3. STR-DVB-PGA	-	-	4.19	36.99
4. Celite 545	1.54	11.69	10.11	33.72
5. Silikajel	3.10	13.77	1.71	6.19

(STR-DVB): Stiren-divinilbenzen , (GA): Glutaraldehit, (PGA): Poliglutaraldehit.

**Çizelge 3.14.2.** Destek maddelerine immobilize olan Lipozyme TL-100L enziminin protein analiz sonuçları

Destek maddesi	Fiziksel immobilizasyon metodu (Adsorpsiyon)		Kimyasal immobilizasyon metodu (Kovalent bağlama)	
	İmmobilize enzim (mg/g-destek)	İmmobilizasyon verimi (%)	İmmobilize enzim (mg/g-destek)	İmmobilizasyon verimi (%)
1. STR-DVB	11.56	30.11	4.79	23.70
2. STR-DVB-GA	-	-	5.04	26.48
3. STR-DVB-PGA	-	-	5.81	34.66
4. Celite 545	4.61	13.80	21.20	55.27
5. Silikajel	6.32	18.66	7.93	16.12

(STR-DVB): Stiren-divinilbenzen , (GA): Gluturaldehit, (PGA): Poliglutaraldehit.

Çizelge 3.14.1.ve Çizelge 3.14.2. incelendiğinde Novozyme 388 enziminin en fazla fiziksel immobilizasyon metodu ile STR-DVB destek maddesine tutunduğu (10.96 mg/g-destek) onu kimyasal immobilizasyon yöntemiyle Celite 545'in izlediği (10.11 mg/g-destek) görülmüştür. Aynı enzimin immobilizasyon verimlerine bakıldığında en yüksek verim kimyasal immobilizasyon metodu ile STR-DVB-PGA destek maddesinde (% 36.99) görülmüş onu yine kimyasal immobilizasyon yöntemi ile Celite 545 (% 33.72) takip etmiştir. Aynı değerlendirme Lipozyme TL-100L enzimi için yapıldığında destek maddesine en çok tutunma gram destek başına 21.20 mg protein ile Celite 545'de kimyasal tutunma metoduyla gerçekleşmiştir. STR-DVB destek maddesi gram destek başına 11.56 mg proteini fiziksel metotla immobilize ederek ikinci sırayı almıştır. Lipozyme TL-100L enziminin immobilizasyon verimlerine bakıldığında en yüksek verim kimyasal immobilizasyon metodu ile Celite 545 destek maddesinde (%

55.27) görülmüş onu yine kimyasal immobilizasyon yöntemi ile STR-DVB-PGA (% 34.66) takip etmiştir.

Çizelge 3.14.1.ve Çizelge 3.14.2. değerlendirildiğinde destek maddelerinin yapısına glutaraldehit ve poliglutaraldehit girdiğinde (kovalent immobilizasyon) destek üzerine tutunan enzim miktarı her iki lipaz enzimi “Lipozyme TL-100L ve Novozyme 388“ içinde artış gösterirken enzim aktivitelerinde (Çizelge 3.15.1. ve Çizelge 3.15.2.) bir miktar düşüş gözlenmektedir. Bu sonuç ortamda bulunan fazla miktardaki enzimin birbirine bağlanarak (protein-protein etkileşimi) lipaz enziminin aktif merkezini inaktive etmesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle destek maddesi üzerine aşırı enzim yüklemesi yapılmamalıdır.

### **3.15. Enzim Aktivite Analiz Sonuçları**

Çalışmamızda iki farklı serbest lipaz enzimi “Lipozyme TL-100L ve Novozyme 388“ beş farklı destek maddesine “stiren-divinilbenzen (STR-DVB), stiren-divinilbenzen-glutaraldehit (STR-DVB-GA), stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA), celite 545 ve silikajel“ adsorpsiyon ve kovalent bağlama olmak üzere iki farklı metotla immobilize edilmiştir. Destek maddelerine immobilize olan lipaz enzimlerinin aktiviteleri spektrofotometrik metotla belirlenmiştir. (Winkler ve Stuckman, 2003). Novozyme 388 ve Lipozyme TL 100L enzimlerinin beş farklı destek maddesine adsorpsiyon ve kovalent bağlama metotlarıyla immobilize edilmesinden sonra ölçülen aktivite değerleri sırasıyla Çizelge 3.15.1. ve Çizelge 3.15.2.’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.15.1.ve Çizelge 3.15.2. incelendiğinde Novozyme 388 enzimi en yüksek aktiviteyi gram destek başına 29.63 U ile fiziksel immobilizasyon metoduyla Celite 545’e tutunduğunda göstermiştir. Enzim aktivitesi mg lipaz başına U (ünite) olarak (spesifik aktivite) incelendiğinde 20.50 U/mg-protein değeri ile kimyasal immobilizasyon metoduyla STR-DVB destek maddesi öne çıkmıştır.

**Çizelge 3.15.1.** Destek maddelerine immobilize olan Novozyme 388 enziminin aktivite analiz sonuçları

Destek maddesi	Fiziksel immobilizasyon metodu (Adsorpsiyon)		Kimyasal immobilizasyon metodu (Kovalent bağlama)	
	Lipaz aktivitesi (U/g-destek)	Spesifik aktivite (U/mg-protein)	Lipaz aktivitesi (U/g-destek)	Spesifik aktivite (U/mg-protein)
1. STR-DVB	20.73	1.89	20.29	20.50
2. STR-DVB-GA	-	-	18.28	10.33
3. STR-DVB-PGA	-	-	17.69	4.22
4. Celite 545	29.63	19.24	20.80	2.06
5. Silikajel	8.64	2.79	8.87	5.19

(STR-DVB): Stiren-divinilbenzen , (GA): Gluturaldehit, (PGA): Poliglutaraldehit.

**Çizelge 3.15.2.** Destek maddelerine immobilize olan Lipozyme TL 100L enziminin aktivite analiz sonuçları

Destek maddesi	Fiziksel immobilizasyon metodu (Adsorpsiyon)		Kimyasal immobilizasyon metodu (Kovalent bağlama)	
	Lipaz aktivitesi (U/g-destek)	Spesifik aktivite (U/mg-protein)	Lipaz aktivitesi (U/g-destek)	Spesifik aktivite (U/mg-protein)
1. STR-DVB	28.32	2.45	22.20	4.64
2. STR-DVB-GA	-	-	19.37	3.84
3. STR-DVB-PGA	-	-	17.54	3.02
4. Celite 545	26.77	5.81	20.09	0.95
5. Silikajel	8.52	1.35	5.85	0.74

(STR-DVB): Stiren-divinilbenzen , (GA): Gluturaldehit, (PGA): Poliglutaraldehit.

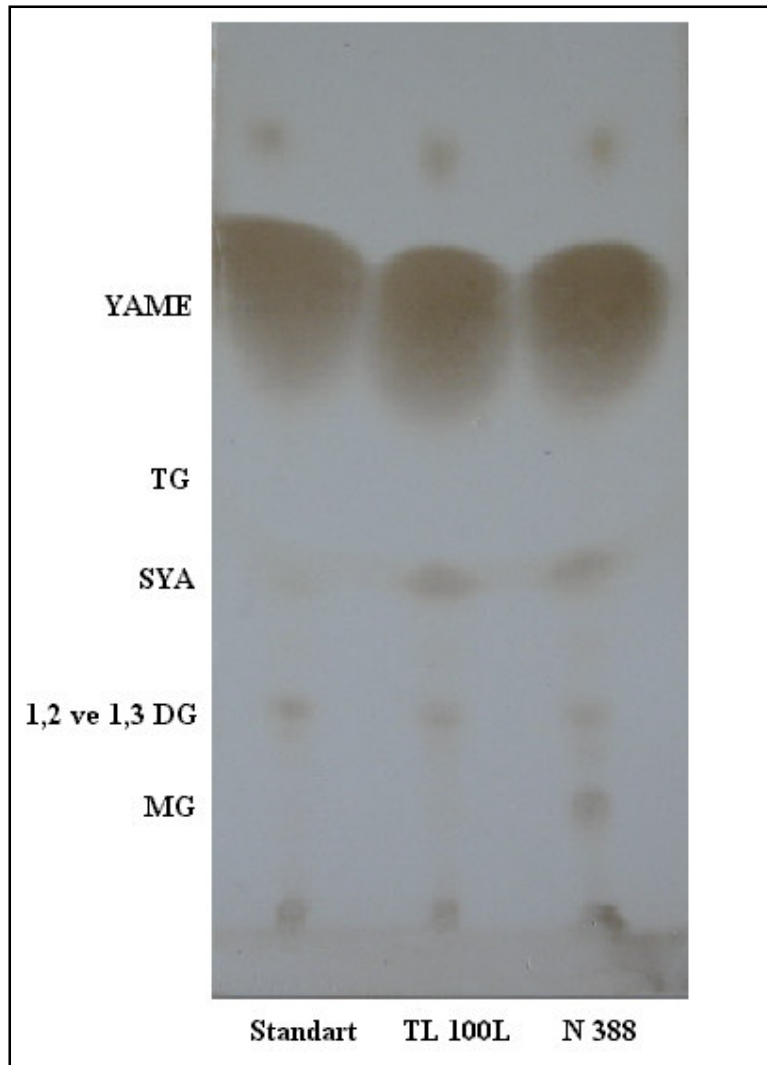


Aynı değerlendirme Lipozyme TL 100L enzimi için yapıldığında en yüksek aktivite gram destek başına 28.32 U ile yine fiziksel immobilizasyon metoduyla STR-DVB'e tutunma sonucu gözlenmiştir. Enzimin spesifik aktivitesi dikkate alındığında ise 5.81 U/mg-protein değeri ile en yüksek aktivite yine fiziksel immobilizasyon metoduyla Celite 545'e tutunma sonucu gözlenmiştir.

Çizelge 3.15.1.ve Çizelge 3.15.2. değerlendirildiğinde destek maddeleri üzerine fiziksel immobilizasyon (adsorpsiyon) metoduyla tutunan lipaz enzimlerinin "Lipozyme TL-100L ve Novozyme 388" aktivitelerinin kimyasal immobilizasyon (kovalent bağlama) metoduyla tutunan lipaz enzimlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuç glutaraldehit aktivasyonu ile desteğe kovalent olarak tutunan enzimlerin daha sıkı bağlandığını ve hareket alanının daraldığını, desteğe adsorpsiyonla tutunan lipazların ise daha esnek bağlandığını ve daha serbest hareket alanına sahip olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan destek maddelerine farklı metotlarla bağlanan enzimlerin tekrar kullanım sayıları incelendiğinde (Şekil 3.7.2., Şekil 3.7.3. ve Şekil 3.7.4.) destek maddelerine esnek bağlanan (adsorpsiyon) lipaz enzimlerinin aktivitelerini 5 tekrar kullanımda kaybederken, destek maddeleri üzerine daha sıkı bağlanan (kovalent bağlama) lipazların ise 10 tekrar sonucu dahi önemli bir aktivite kaybı göstermediği gözlenmiştir.

### 3.16. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Analiz Sonuçları

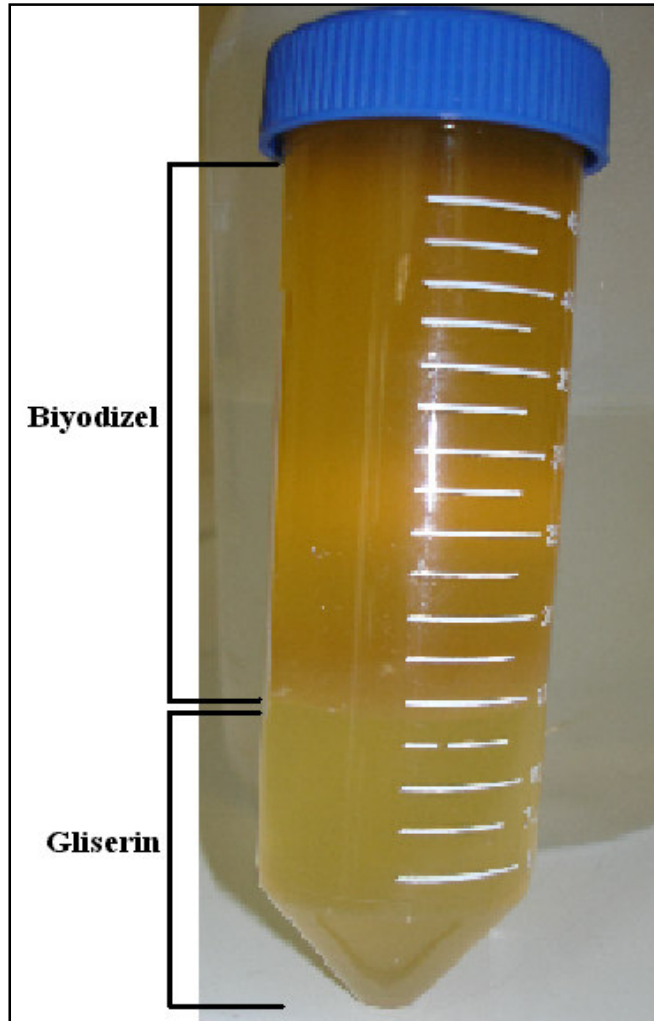
Çalışmamızda biyodizel örneklerinin GC analizi öncesi ester dönüşüm verimlerinin tahmin edilmesi amacıyla ince tabaka kromatografisi metodu kullanılmıştır. Bu amaçla sentezlenen biyodizel örnekleri bölüm 2.2.8.'de anlatılan yöntem ile standart biyodizel örneği ile karşılaştırılmıştır. Şekil 3.16.1.'de TL 100L ve N 388 enzimleriyle sentezlenen biyodizel örneklerinin standart biyodizel örneğiyle TLC metodu kullanılarak karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 3.16.1. TL 100L ve N 388 enzimleriyle sentezlenen biyodizel örneklerinin TLC analiz sonuçları (YAME: Yağ asidi metil ester; TG: Trigliserid; SYA: Serbest yağ asidi; DG: Digliserid; MG: Monogliserid)

### 3.17. Biyodizel Gaz Kromatografisi Analiz Sonuçları

Stiren-divinilbenzen (STR-DVB), stiren-divinilbenzen-glutaraldehit (STR-DVB-GA), stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA), celite 545 ve silikajel destek maddelerine Lipozyme TL-100L and Novozyme 388 enzimlerinin farklı immobilizasyon metotları kullanılarak tutturulmasıyla hazırlanan örnekler ile biyodizel üretilmiştir. Şekil 3.17.1.'de Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) destek maddesine tutturulan Lipozyme TL-100L enzimi ile sentezlenen biyodizel örneği gösterilmiştir.



Şekil 3.17.1. Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) destek maddesine tutturulan Lipozyme TL-100L enzimi ile sentezlenen biyodizel örneği.

Farklı enzim ve destek maddeleri kullanılarak üretilen biyodizel örneklerinin GC analiz sonuçları Çizelge 3.17.1., Çizelge 3.17.2., Çizelge 3.17.3. ve Çizelge 3.17.4.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.17.1.** Stiren-divinilbenzen (STR-DVB) destek maddesine immobilize olan TL 100L ve N 388 enzimleriyle sentezlenen biyodizelin GC analiz sonuçları

İmmobilizasyon metodu	Fiziksel immobilizasyon metodu (Adsorpsiyon)		Kimyasal immobilizasyon metodu (Kovalent bağlama)	
Destek maddesi	Stiren-divinilbenzen (STR-DVB)		Stiren-divinilbenzen (STR-DVB)	
(%)	TL 100L Enzimi	N 388 Enzimi	TL 100L Enzimi	N 388 Enzimi
Serbest yağ asidi	3,01	3.74	1.07	2.50
Monoglisericid	0.32	4.58	17.99	2.46
Diglisericid	0.28	11.86	2.28	10.15
Triglisericid	0.02	11.49	0.08	12.12
Ester	96.37	68.33	78.58	72.77

**Çizelge 3.17.2.** Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) destek maddesine immobilize olan TL 100L ve N 388 enzimleriyle sentezlenen biyodizelin GC analiz sonuçları

İmmobilizasyon metodu	Kimyasal immobilizasyon metodu (Kovalent bağlama)			
Destek maddesi	Stiren-divinilbenzen-glutaraldehit (STR-DVB-GA)		Stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA)	
(%)	TL 100L Enzimi	N 388 Enzimi	TL 100L Enzimi	N 388 Enzimi
Serbest yağ asidi	2.98	0.79	6.61	1.77
Monoglisericid	3.5	1.5	3.81	3.70
Diglisericid	1.08	4.65	3.24	4.88
Triglisericid	0.03	9.91	1.65	8.80
Ester	92.41	83.15	84.69	80.85

**Çizelge 3.17.3.** Silikajel destek maddesine immobilize olan TL 100L ve N 388 enzimleriyle sentezlenen biyodizelin GC analiz sonuçları

İmmobilizasyon metodu	Fiziksel immobilizasyon metodu (Adsorpsiyon)		Kimyasal immobilizasyon metodu (Kovalent bağlama)	
Destek maddesi	Silikajel		Silikajel	
(%)	TL 100L Enzimi	N 388 Enzimi	TL 100L Enzimi	N 388 Enzimi
Serbest yağ asidi	3.75	2.19	3.09	1.56
Monoglisericid	17.25	11.26	8.24	0.29
Diglisericid	3.90	14.88	10.78	4.04
Triglisericid	0.23	4.62	5.63	11.81
Ester	74.87	67.05	72.26	82.30

**Çizelge 3.17.4.** Celite 545 destek maddesine immobilize olan TL 100L ve N 388 enzimleriyle sentezlenen biyodizelin GC analiz sonuçları

İmmobilizasyon metodu	Fiziksel immobilizasyon metodu (Adsorpsiyon)		Kimyasal immobilizasyon metodu (Kovalent bağlama)	
Destek maddesi	Celite 545		Celite 545	
(%)	TL 100L Enzimi	N 388 Enzimi	TL 100L Enzimi	N 388 Enzimi
Serbest yağ asidi	1.32	2.52	1.98	1.16
Monoglisericid	15.10	6.01	0.30	2.62
Diglisericid	2.82	8.90	0.21	2.45
Triglisericid	0.11	7.26	0.25	4.92
Ester	80.65	75.31	97.26	88.85

Çizelge 3.17.1., Çizelge 3.17.2., Çizelge 3.17.3. ve Çizelge 3.17.4. incelendiğinde kimyasal immobilizasyon yönteminde Celite 545 destek maddesine en yüksek immobilizasyon verimiyle (%55.27) tutunan TL 100L lipaz enzimi ile en yüksek ester verimi (%97.26) elde edilmiştir. Fiziksel immobilizasyon yöntemi değerlendirildiğinde ise STR-DVB destek maddesine en yüksek immobilizasyon

verimiyle (%30.11) tutunan TL 100L lipaz enziminin kullanıldığı transesterleşme reaksiyonundan yine en yüksek ester verimi (%96.37) elde edilmiştir. Celite 545 ve silikajel destek maddelerine immobilize olan TL 100L ve N 388 enzimleri incelendiğinde genel olarak desteğe kovalent bağlanan lipazların ester verimlerinin adsorpsiyonla bağlananlardan daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca lipazların tekrar kullanılabilirlikleri incelendiğinde (Şekil 3.7.2., Şekil 3.7.3. ve Şekil 3.7.4.) yine desteğe kovalent bağlanan lipazlar öne çıkmaktadır.

#### 4. SONUÇ

Günümüzde fosil kökenli enerji kaynaklarının azalması, çevre kirliliği, küresel ısınma ve dünyadaki enerji ihtiyacının hızla artması gibi nedenlerle tüm dünyada alternatif enerji kaynaklarına doğru hızlı bir yöneliş söz konusudur. Son yıllarda bitkisel ve hayvansal kaynaklı yağlardan elde edilen, çevreye zarar vermeyen ve yenilenebilir kaynaklardan üretilen biyodizel, petrol kökenli dizel yakıtlara en önemli alternatif enerji kaynağı olmuştur.

Biyodizel üretiminde farklı yöntemler kullanılmasına rağmen son yıllarda ılımlı reaksiyon koşullarına izin vermesi, saflaştırma işlemi gerekmeksizin gliserin geri kazanımı sağlaması, geride kimyasal artık ürün oluşturmaması, uygun destek üzerine tutturularak defalarca kullanılabilmesi ve daha saf ester oluşturması gibi avantajları nedeniyle biyodizel üretiminde lipaz enzimlerinin kullanılması önemli hale gelmiştir.

Çalışmamızda EN14214 biyodizel standartlarını sağlayan, üretim maliyeti düşük ve en önemlisi endüstriyel alanda uygulanabilir biyodizel üretilmiştir. Bu amaçla geliştirilen deney düzeneğiyle reaksiyon sırasında yan ürün olarak elde edilen gliserin ayrı bir bölmede toplanarak literatürde fazlaca rapor edilen gliserinin lipaz enzimini inhibe etme özelliği engellenmiştir. Ayrıca uygun biyodizel üretim koşulları geliştirilerek %97,2 ester dönüşümü elde edilmiştir.

Çalışmamız iki ana bölümden oluşmuştur. İlk bölümde ticari olarak üretilen hazır immobilize enzimler kullanılmış ve uygun biyodizel üretim koşulları (yağ ağırlığının (%4-%21)' i oranında enzim, (1:1,6-1:4,1) yağ-alkol molar oranı, (34°C-55°C) reaksiyon sıcaklığı ve (4-6) saat reaksiyon süresi) kemometrik optimizasyon teknikleriyle ve ANOVA analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca alkol türünün, reaksiyon ortamındaki suyun, reaksiyon ortamındaki organik solventin, reaksiyon ortamına adım adım metanol eklenmesinin, immobilize enzimlerin tekrar kullanılmasının ve enzim karışımı kullanılarak biyodizel üretilmesinin ester verimine etkileri incelenmiştir. İkinci bölümde ise TL 100L ve N 388 serbest lipaz enzimleri sentezlenen (STR-DVB; STR-DVB-GA ve STR-DVB-PGA) veya hazır alınan (Celite 545 ve silikajel) destek maddelerine farklı immobilizasyon metotları kullanılarak tutturulmuş ve geliştirilen deney düzeneğiyle %97 verimle biyodizel üretilmiştir. Mikro gözenekli polimer destek maddesi üzerine tutturulan lipaz enzimleri 10 kez kullanılmasına rağmen önemli bir

aktivite kaybı göstermemiştir. Bunun yanında enzimler protein ve aktivite analizleriyle, destek maddeleri SEM ve FTIR analizleriyle, sentezlenen biyodizel yakıtlar ise GC ve TLC analizleriyle incelenmiştir.

Çalışmamızda sentezlenen stiren-divinilbenzen polimerinin sağlam, kararlı, mikrobiyal ataklara karşı dirençli ve hidrofobik özellikte olması hem gliserinin enzimi inhibe etme olasılığını düşürmekte hemde endüstriyel alanda uygulanabilir olma ihtimalini artırmaktadır.

Sonuç olarak; enzimatik transesterleşme yöntemiyle TSEN 14214 standartlarını sağlayan biyodizel üretilmesi amacıyla uygun destek maddeleri sentezlenmiş, serbest lipaz enzimleri hazır ve sentezlenen destek maddelerine başarıyla tutturularak tekrar kullanılabilirliği sağlanmış ve geliştirilen deney düzeneği ile yüksek ester içeriğine sahip katalizör kalıntıları içermeyen biyodizel sentezlenmiştir. Enzimatik transesterleşme metoduyla biyodizel üretilmesi amacıyla geliştirilen yöntemlerin ilerideki çalışmalarla endüstriyel boyutlarda uygulanmaya başlayacağı kanısındayız.



**KAYNAKLAR**

**ABBAS, H., A. HIOL, V. DEYRIS, L., COMEAU 2002.** Isolation and Characterisation of an extracellular lipase from *Mucor* sp Strain Isolated from Palm Fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 31. p. 274-373.

**ABIGOR, R., P. UADIA, T. FOGLIA, M. HAAS, K. JONES, E. OKPEFA, J. OBIBUZOR, M. BAFOR. 2000.** Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochem. Soc. Trans.* 28:979-981.

**ALGAN, N., 1990.** “Kanola Tarımında Çeşit Sorunu ve Agroteknik Yöntemler”, TOKB Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Menemen, İzmir.

**ALLEN, C.A.W, K.C. WATTS, R.G. ACKMAN, M.J. 1999.** Pegg. Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition. *Fuel* 78, p. 1319-1326.

**AL-ZUHAIR, S., LING, F. W., JUN. L. S., 2007.** Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase *Process Biochemistry*, Volume 42, Issue 6, 951-960.

**ANONİM 2007.** USDA-FAS, Oilseed: World Market and Trade.

**ATAKİŞİ, İ.K, 1991.** “Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı”, T.Ü Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayın No: 148, Ders Kitabı No : 10, Tekirdağ.

**BAILEY, J.E., D.F. OLLIS 1997.** *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second Edition, McGraw-Hill International Editions.

**BAKO, K.B., F.C.S. KOVA, L. GUBÍCZA, J.K. HANSCO, 2002.** Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent free system. *Biocatal. Biotransform.* 20:437–439.

**BAN, K., M. KAIEDA, T. MATSUMOTO, A. KONDO, H. FUKUDA, 2001.** Whole-cell biocatalyst for Biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem. Eng.* 8:39–43.

**BAN, K., S. HAMA, K. NISHIZUKA, M. KAIEDA, T. MATSUMOTO, A. KONDO, H. NODA, H. FUKUDA, 2002.** Repeated use of whole cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 17:157–165.

**BARNWAL, B.K., M.P. SHARMA. 2005.** Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renew Sust Energy*, 9(4):363-378.

**BAŞOĞLU, F. 2002.** *Yemelik Yağ Teknolojisi*. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları No: 91, Bursa.

- BAŞOĞLU, F., 2002.** Yemeklik Yağ Teknolojisi.Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları No: 91, Bursa. s. 64
- BAYRAMOĞLU, G., KAYA, B., ARICA, M. Y., 2005.** Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached poly(GMA-HEMA-EGDMA) microspheres. *Food Chemistry* 92, 261–268.
- BOUAID, A., MARTINEZ, M., ARACIL, J., 2007.** A comparative study of the production of ethyl esters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design. *Chemical Engineering journal*. 134, 93-99.
- BRADFORD, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* 72, 242-254.
- BRERETON, G.R., 1990.** Chemometrics Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems. Ellis Horwood Limited, England. 307p.
- BUTHE A., A. KAPITAIN W. HARTMEIER VE M.B. ANSORGE-SCHUMACHER 2005.** Generation of lipase-containing static emulsions in silicone spheres for synthesis in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35:93-99.
- CHANG, H. M., LIAO, H. F., LEE, C. C., SHIEH, C. J. 2005.** Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 80, 307-312.
- CHANG, S. F., CHANG, S. W., YEN, Y. H., SHIEH, C. J., 2007.** Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM *Applied Clay Science* 37, 67–73.
- CHRISTENSEN, M.W. L., ANDERSEN, T.L. HUSUM, O. KIRK. 2003.** Industrial lipase immobilization. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105. p. 318-321.
- DEMİR, C., 1997.** Dedetection of Metabolites by GC-MS and Analysis of Mixtures by Chemometrics. Doktora Tezi, Bristol, 236p.
- DİZGE, N. 2005.** Bitkisel yağ ve atıklarından yeni mikro poroz polimerik enzim reaktörleri ile biyodizel üretimi. 171 s.
- DİZGE, N., B. KESKİNLER. 2008.** Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass and Bioenergy*. Accepted 20.03.2008.
- DİZGE, N., B. KESKİNLER., A., TANRISEVEN. 2008.** Covalent attachment of microbial lipase onto microporous styrene–divinylbenzene copolymer by means of polyglutaraldehyde. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 66, 34–38.

**DU W., Y. XU VE D. LIU 2003.** Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. *Biotechnol.Appl.Biochem*, 38:103-106.

**DU, W., Y. XU, D. LIU, J. ZENG, 2004.** Comparative study on lipase catalyzed transformation of soyabean oil for biodiesel production with acyl acceptors. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 30:125–129.

**FREEDMAN, B., E.H. PRYDE, T.L. MOUNTS. 1984.** Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *JAACS*, 61(10): 1638-1643.

**FREGAPANE, G., DOUGLAS B. SARNEY, EVGENY N. VULFSON. 1994.** Facile Chemo-Enzymatic Synthesis of Monosaccharide Fatty Acid Esters. *Biocatalysis and Biotransformation*, Volume 11, Issue1, 9-18.

**FRUTA, A., H. MATSUHASHI, K. ARATAB. 2006.** Biodiesel fuel production with solid amorphous-zirconia catalysis in fixed bed reactor. *Biomass Bioenergy*, 30:870-873.

**FUKUDA, H., A. KONDO, VE H. NODO. 2001.** Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *Biosci.Bioeng.*, 92(5):405-416.

**GLOGER, M., W. TISCHER 1981.** Determination of catalytic activity of immobilized enzymes. In *Methods of Enzymatic Analysis*. 1. p. 142-154.

**GÜMÜŞKESEN, A.S., 1999** “Bitkisel Yağ Teknolojisi”, 1999.

**GÜVENÇ, A., KAPUCU, N., KAPUCU, H., AYDOĞAN, Ö., MEHMETOĞLU, Ü., 2007.** Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: Optimization by response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*. 40, 778-785.

<http://www.albiyobir.org.tr/atikyaglar/html>, Erişim Tarihi: 07.05.2008. Konu: Atık yağlar.

<http://www.albiyobir.org.tr/biyodizel.html>, Erişim Tarihi: 17.05.2008. Konu: Biyodizel ve Atık yağların kullanımı.

<http://www.atikbitkiselyag.com/icerikler/cevre04.html>, Erişim Tarihi: 07.05.2008. Konu: Atık yağın ekonomiye katkısı.

<http://www.biyotek.com.tr/html>, Erişim Tarihi: 18.05.2008. Konu: Endüstride lipaz kullanımı.

[http://www.eie.gov.tr/biyodizel/bd\\_teknikoz.html](http://www.eie.gov.tr/biyodizel/bd_teknikoz.html), Erişim Tarihi: 20.05.2008. Konu: Biyodizel Yakıt özellikleri.

<http://www.epdk.gov.tr/lisans.html>, Erişim Tarihi: 19.05.2008. Konu: Atık yağların kullanımı.

<http://www.fao.org.html>, Erişim Tarihi: 17.01.2005. Konu: Kanola tohum üretim verileri.

<http://www.tse.org.tr/turkish/standard/standardlar.asp>, Erişim Tarihi: 17.05.2008. Konu: Biyodizel standartları.

<http://www.worldoil.com.html>, Erişim Tarihi: 17.01.2005. Konu: Dünya bitkisel yağ üretimi.

**HIOL, A., JONZO, M. D., RUGANI, N., DRUET, D., SADRA, L., COMEAU, L.C., 2000.** Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from Thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from Palm Fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 26, 421-430.

**HUANFEI J. 2002.** Pretreatment of wastewater containing fats and oils using an immobilized enzyme. Department of Chemical Engineering. Curtin University of Technology.

**HUNG, T. C., GIRIDHAR, R., CHIOU, S. H., WU, W. T., 2003.** Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 26, 69–78.

**ISO, M., B. CHEM, M. EGUCHI, T. KUDO, S. SHRESTHA. 2001.** Production of biodiesel from triglycerides and ethanol using immobilized enzyme. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 16:53-58.

**JACOBSEN, T., O., JORGEN, K., ALLERMANN 1990.** Substrate specificity of *Geotrichum candidum* lipase preparations, *Journal Biotechnology Letters* Volume 12, p.121-126.

**JEONG, G. T., PARK, D., H., 2006.** Response surface methodological approach for optimization of enzymatic synthesis of sorbitan methacrylate. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 383-386.

**LI, WEI, DU, WEI, LIU, DEHUA, 2007.** Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 45, 122-127.

**LINKO, Y.Y., M. LIIMSII, X. WU, W. UOSUKAINEN, J. SAPPILII, P. LINKO. 1998.** Biodegradable products by lipase biocatalysis. *J. Biotechnol*, 66:41-50.

**MA, F., M.A. HANNA. 1999.** Biodiesel Production: a review. *Bioresour. Technol.*, 70:1-15.

**MARCHETTI, J.M., V.U. MIGUEL, A.F. ERRAZU. 2007.** Possible methods for biodiesel production. *Renewable sustainable energy reviews*, 11:1300-1311.

**MATSUMOTO, T., S. TAKAHASHI, M. KAIEDA, M. UEDA, A. TANAKA, H. FUKUDA, A. KONDO, 2001.** Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:4.

**MITTELBACH, M. 1990.** Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67:168-170.

**MODI, M.K., J.R.C. REDDY, B.V.S.K. RAO, R.B.N. PRASAD, 2006.** Lipase mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propane-2-ol as acyl acceptor. *Biotechnol. Lett.* 28:637-640.

**NELSON, L.A., T.A. FOGLIA, W.N. MARMER. 1996.** Lipase-catalysed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(8):1191-1195.

**NOROUZIAN, D., 2003.** Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology. *Iranian Journal of Biotechnology*, Vol. 1, No. 4, 197-206.

**NOUREDDINI, H., X. GAO, R.S. PHIKANA. 2001.** Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour. Technology* 96:767-777.

**OLIVEIRA, P. C., ALVES, G. M., CASTRO, H. F., 2000.** Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal* 5, 63-71.

**ONURLUBAŞ, H.E., 2006.** Türkiye’de bitkisel yağ sanayinde yapısal değişimler ve izlenen politikalar. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Tokat, s.39.*

**ORÇAIRE, O., BUISSON, P., PIERRE, A. C., 2006.** Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 42, 106-113.

**ÖZTÜRK, B. 2001.** Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. Master of Science, İzmir Institute of Technology, İzmir. p. 102.

**PALOMO, J. M., CLAUDIA O., MANUEL, F., GLORIA, F. L., JOSE, M. G., ROBERTO, F. L., 2004.** Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. *Journal of Chromatography A*, 1038, 267-273.

**RANGANATHAN, S.V., S.K. NARASIMHAN VE K. MUTHUKUMAR. 2008.** An Overview of Enzymatic Production of Biodiesel. *Bioresource Technology*, 99:3975-3981.

**ROYON, D., M. DAZ, G. ELLENRIEDER, S. LOCATELLI, 2007.** Enzymatic production of Biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour. Technol.* 98: 648-653.

**SAMUKAWA, T., M. KAIEDA, T. MATSUMOTO, K. BAN, A. KONDO, Y. SHIMADA, H. NODA, H., H. FUKUDA, 2000.** Pretreatment of Immobilized *Candida antarctica* lipase for Biodiesel fuel production from plant oil. *J. Bioresour. Bioeng.* 90:180–183.

**SAXENA, R.K., P.K. GHOSH, R. GUPTA, W. SHEBA DAVIDSON, S. BRADDOO, R., GULATI. 1999.** Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. Microbiology, University of Delhi, South Campus, Benito Juarez Road, New Delhi 110 021, India.

**SHAH, S., GUPTA, M. N., 2007.** Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system *Process Biochemistry* 42, 409–414.

**SHAH, S., SHARMA, S., GUPTA, M. N., 2004.** Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of *Jatropha* Oil. *Energy & Fuels.* 18, 154-159.

**SHAHIDI, F., 1990.** Rapeseed and Canola :Global Production and Distribution Chapter 1, Grain Research Laboratory Quality of Canadian and Flaxseed Cargoes.1989-1990 Crop Yearcargo Bulletin, No.260, Canada.

**SHIEH, C. J., LIAO, H. F., LEE, C. C., 2003.** Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresource Technology.* 88, 103-106.

**SHIMADA, Y., Y. WATANABE, T. SAMUKAWA, A. SUGIBARA, I.L. NODA, I.I. FUKUDA, Y. TOMINAGA, 1999.** Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76:789–793.

**SOUMANOUA, M. M., BORNSCHEUERA M. T., 2003.** Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 656–660.

**TAYLOR, R.F., 1991.** Protein Immobilization Fundamentals and Applications. Cambridge, Massachusetts. 377 p.

**TEKMAN, Ş., N. ÖNER. 1998.** Genel biyokimya dersleri. İstanbul Üniversitesi Yayınları. Eczacılık Fakültesi. No: 67, Emek Matbaacılık, İstanbul. 426 s.

**TÜRKAY, S., 2006.** Uygulamalı yağ kimyası-Yağ analizleri-Standartlara etkileri. Biyodizel teknik kursu. İTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü.

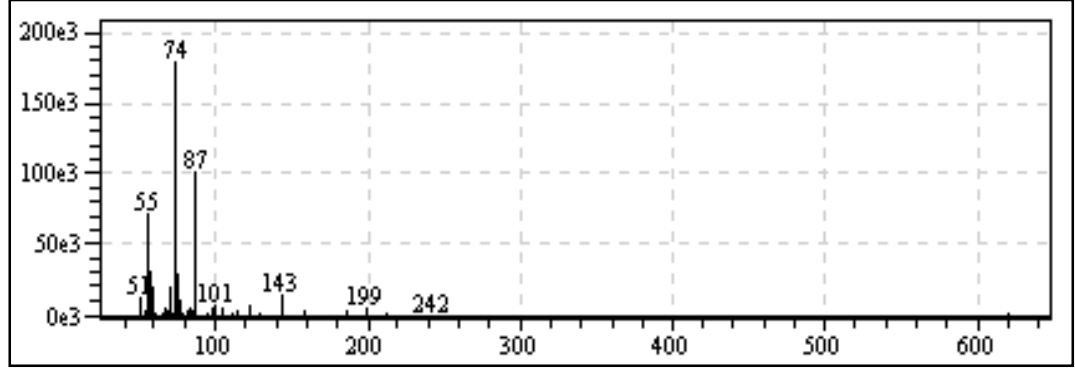
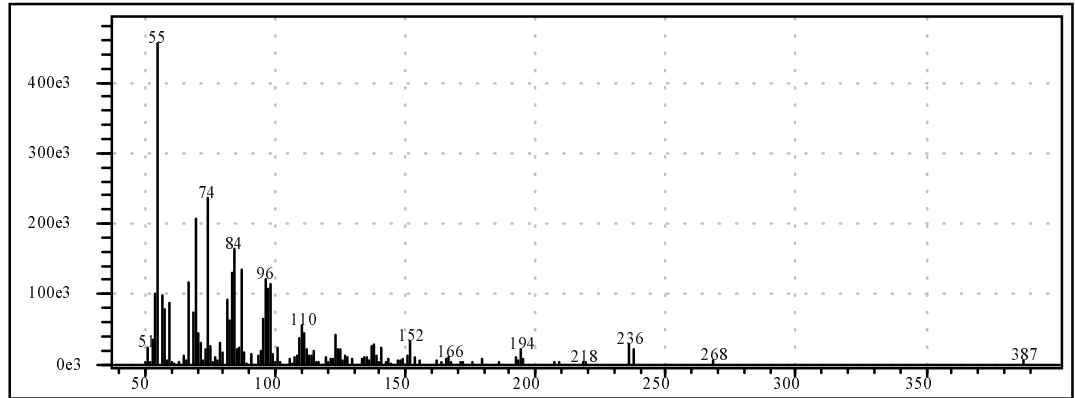
**WATANABE, Y., Y. SHIMADA, A. SUGIHARA, H. NODA, H. FUKUDA, Y. TOMINAGA, 2000.** Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77:355–360.

**WINKLER, U. K., STUCKMANN, M., 1979.** Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 138, 663-679.

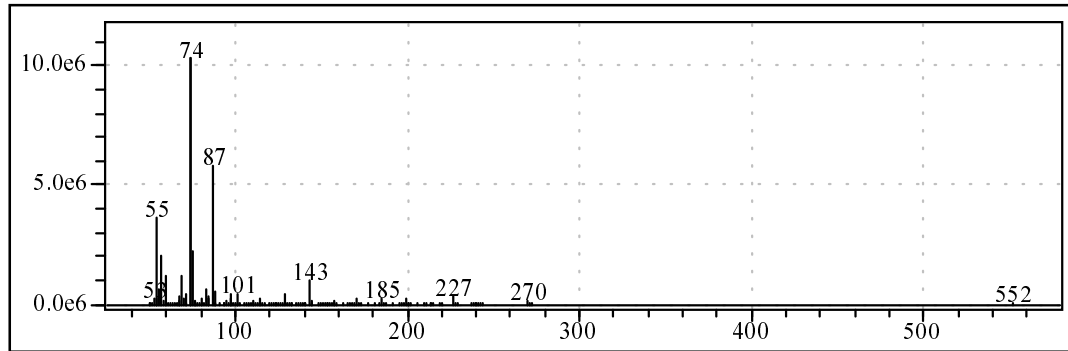
**WISEMAN, A., 1987.** Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373.

**XU, G. Z., ZHANG, B.L., LIU, S. Y., YUE, J. Z., 2006.** Study on immobilized lipase catalyzed transesterification reaction of tung oil. Agricultural Science in China. 5, 859-864.

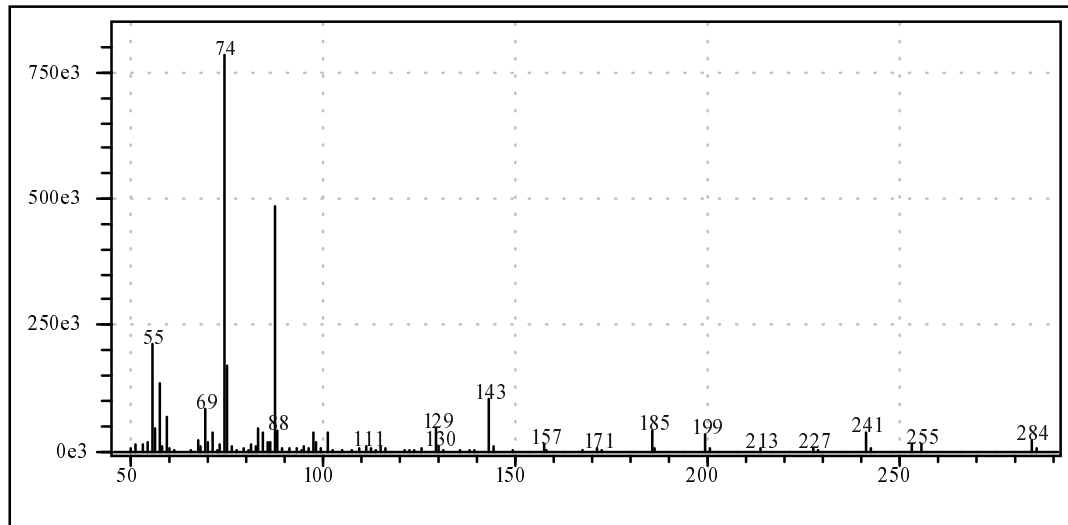
**ZABORSKY, O., 1973.** Absorption Immobilized Enzyme. CRC pres. Ohio. p. 75.

**EKLER****EK-1 Yağ asidi metil esterlerinin MS spektrumları****1. C<sub>14:0</sub> pikinin kütle spektrumu.****2. C<sub>16:1</sub> pikinin kütle spektrumu**

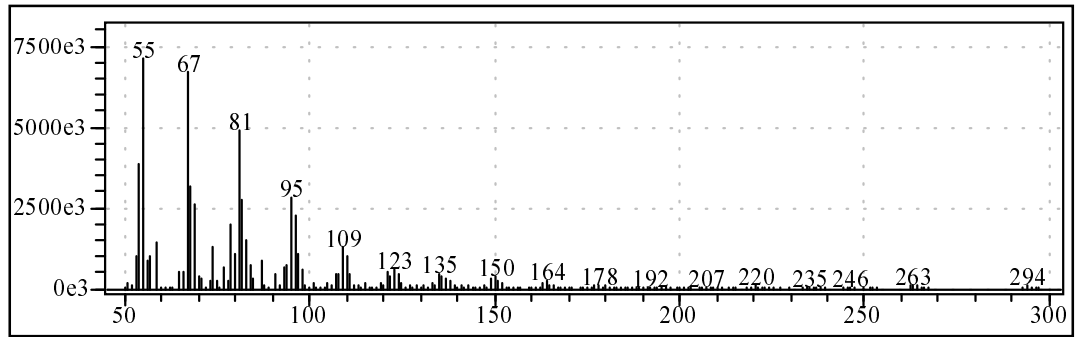




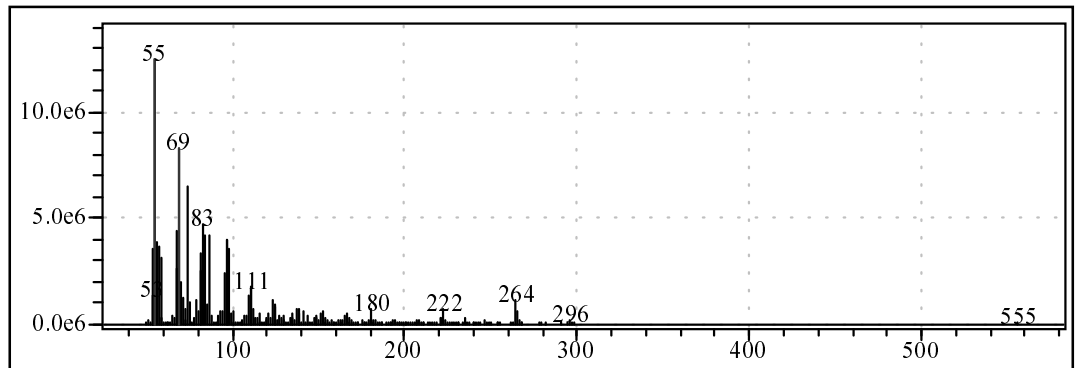
### 3. C<sub>16:0</sub> pikinin kütle spektrumu



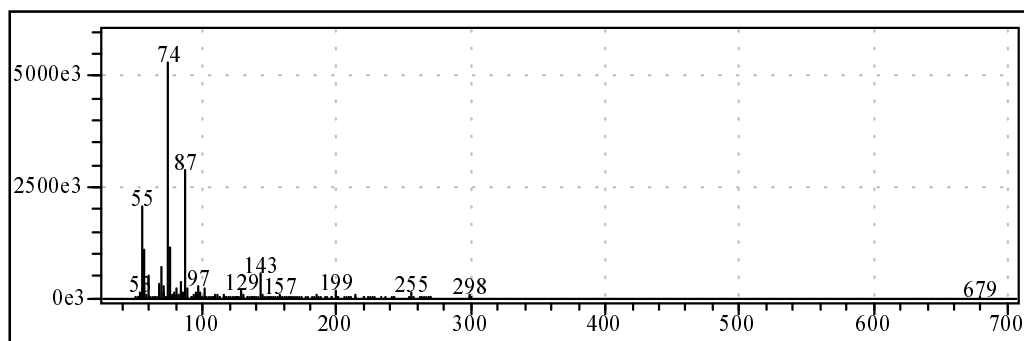
### 4. C<sub>17:0</sub> pikinin kütle spektrumu.



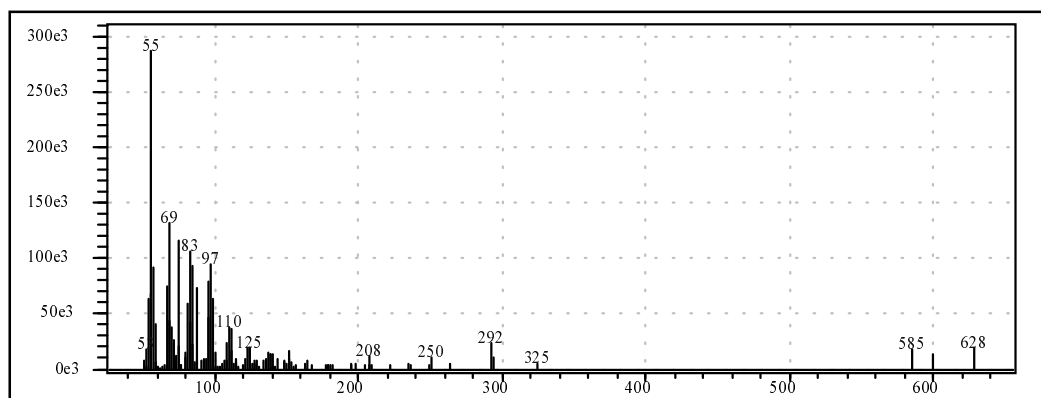
5. C<sub>18:2</sub> pikinin kütle spektrumu.



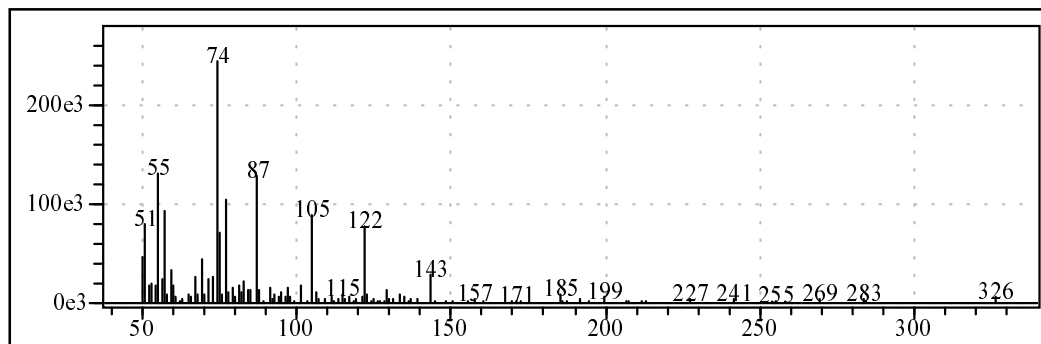
6. C<sub>18:1</sub> pikinin kütle spektrumu.



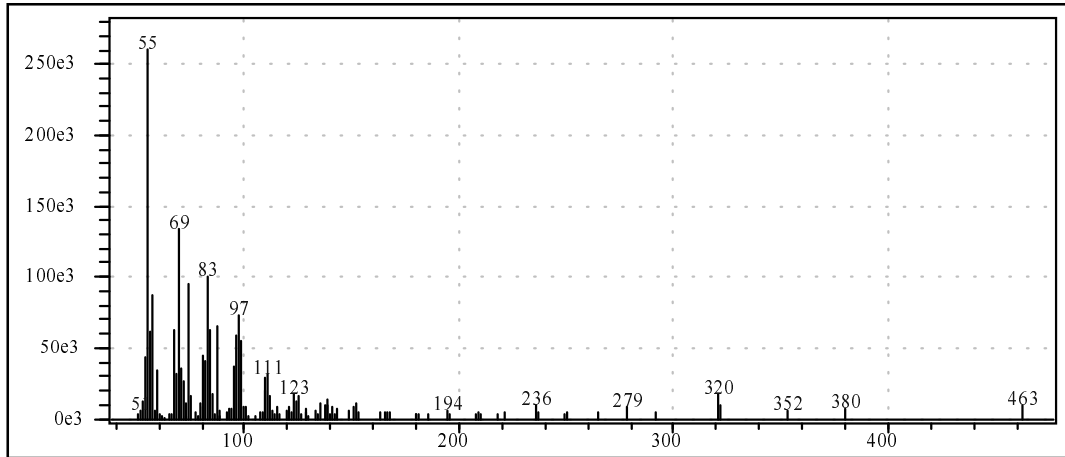
7. C<sub>18:0</sub> pikinin kütle spektrumu.



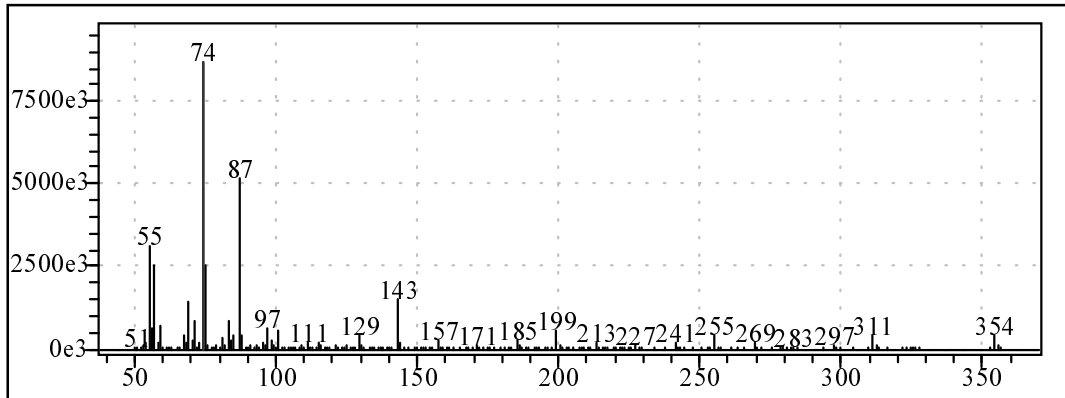
8. C<sub>20:1</sub> pikinin kütle spektrumu.



9. C<sub>20:0</sub> pikinin kütle spektrumu.



10. C<sub>22:1</sub> pikinin kütle spektrumu.



11. C<sub>22:0</sub> pikinin kütle spektrumu.

**ÖZGEÇMİŞ**

16.06.1978 tarihinde Bursa'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bursa'da tamamladı. Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünden 1999 yılında bölüm ikincisi olarak mezun oldu. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalında doktora eğitimine başladı.

**TEŞEKKÜR**

Doktora çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren danışman hocam sayın Prof. Dr. Cevdet Demir' e teşekkür ederim.

Uludağ Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümünden sayın Prof. Dr. Yücel Taşdemir ve Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümünden sayın Prof. Dr. Necdet Coşkun' a bilimsel katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın bir bölümünü Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü laboratuvarlarında yapmama izin veren Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü'nden sayın Prof. Dr. Bülent Keskinler' e ve çalışmalarım sırasında bana zaman ayıran Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü'nden sayın Arş. Görevlisi Nadir Dizge' ye teşekkür ederim.

Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümünden arkadaşım Önder Aybastier' e bana ayırdığı zaman için teşekkür ederim.

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme şükranlarımı sunarım.