



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL ATIK YAĞLARIN KARAKTERİZASYONU
VE BİYODİZEL ÜRETİMİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Önder AYBASTIER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA - 2010



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL ATIK YAĞLARIN KARAKTERİZASYONU
VE BİYODİZEL ÜRETİMİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Önder AYBASTIER

Prof.Dr. Cevdet DEMİR
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI


BURSA - 2010


T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


Önder AYBASTIER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 11/01/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oy ~~çokluğu~~ ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Cevdet DEMİR
Danışman


Prof. Dr. Şeref GÜÇER


Prof. Dr. Yücel TAŞDEMİR

ÖZET

Thermomyces lanuginosus lipaz enzimi mikroporoz stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Merkezi kompozit dizayn ile immobilizasyon üzerine enzim konsantrasyonunun (% 4-16 v/v), tampon pH'nın (6,0-8,0), tampon konsantrasyonunun (20-100 mM), immobilizasyon süresinin (8-40 saat) etkisi incelenmiş ve etkili faktörler optimize edilmiştir. Enzim konsantrasyonu, pH ve tampon konsantrasyonunun spesifik aktivite üzerinde etkili olan önemli faktörler olduğunu bulunmuştur. Optimum koşullardaki tahmini spesifik aktivite 8.78 $\mu\text{mol pNP/mg enzim.dk}$ olarak hesaplanmış, deneysel spesifik aktivite ise 8,41 $\mu\text{mol pNP/mg enzim.dk}$ olarak belirlenmiştir. Metanol ve *t*-bütanolün immobilize lipazın spesifik aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Immobilize lipazın aktivitesi *t*-bütanolde hemen hemen değişmezken, metanolde büyük oranda azalmaktadır. Çalışmanın ikinci aşamasında çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak kitosan küreler hazırlanmıştır. *Candida antarctica A* lipaz enzimi kitosan küreler üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Bu küreler üzerine yapılan immobilizasyonda en yüksek spesifik aktivite, % 12 (v/v) enzim konsantrasyonunda ve 24 saat immobilizasyon süresinde elde edilmiştir. Optimum koşullarda enzim immobilize edilen STR-DVB-PGA polimeri ve kitosan küreleri kullanılarak ön işlem uygulanmamış atık kanola yağından biyodizel üretilmiştir. Her iki destek maddesi kullanılarak üretilen biyodizel verimleri sırası ile % 85,95 ve % 59,32 dir. STR-DVB-PGA destek maddesi ile daha yüksek oranda biyodizel elde edildiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Merkezi kompozit dizayn, lipaz, immobilizasyon, STR-DVB-PGA, kitosan, atık kanola yağı, biyodizel.

ABSTRACT

Lipase from *Thermomyces lanuginosus* was immobilized by covalent binding on a novel microporous styrene-divinylbenzene-polyglutaraldehyde copolymer (STY-DVB-PGA). The central composite design was employed to evaluate the effects of enzyme concentration (4-16 %v/v), buffer pH (6.0-8.0), buffer concentration (20-100 mM) and immobilization time (8-40 h) on the specific activity, and significant parameters were optimized. The results indicated that enzyme concentration, pH and buffer concentration were the significant factors on the specific activity of immobilized lipase. The predicted specific activity was 8.78 $\mu\text{mol } p\text{NP}/\text{mg enzyme}\cdot\text{min}$ under the optimal conditions and the subsequent verification experiment with specific activity of 8.41 $\mu\text{mol } p\text{NP}/\text{mg enzyme}\cdot\text{min}$ confirmed the validity of the predicted model. The effect of methanol and *tert*-butanol on the specific activity of immobilized lipase was investigated. The immobilized lipase was almost stable in *tert*-butanol whereas it lost most of its activity in methanol. In second part of study, chitosan beads were prepared by using a crosslinking agent as glutaraldehyde. Lipase from *Candida antarctica A* was immobilized by covalent binding on chitosan beads. The maximum specific activity was found as enzyme concentration of 12 % (v/v) and immobilization time of 24 hours. Production of biodiesel was performed with STY-DVB-PGA polymer and chitosan beads as support materials using waste canola oil. The yields of biodiesel were 85.95 % and 59.32 %, respectively. It was observed that STY-DVB-PGA support material provided higher biodiesel yield.

Keywords: Central composite design, lipase, immobilization, STY-DVB-PGA, chitosan, waste canola oil, biodiesel.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Atık Bitkisel Yağlar	4
2.1.1. Kızartma Mekanizması	5
2.1.2. Kızartma Sırasında Yağdaki Kimyasal Reaksiyonlar ...	8
2.1.2.1. Yağın Hidrolizi	8
2.1.2.2. Yağın Oksidasyonu	9
2.1.2.3. Yağın Polimerizasyonu	13
2.1.3. Kızartma Yağlarının Kullanımdan Çekilmesi	19
2.1.4. Atık Yağların Çevresel Etkileri	20
2.1.5. Bitkisel Atık Yağlarla İlgili Yasal Düzenlemeler	23
2.2. Biyodizel	24
2.2.1. Bitkisel Yağların Yakıt Olarak Kullanımı	24
2.2.2. Biyodizel	25
2.2.2.1. Biyodizel Üretim Yöntemleri	26
2.2.2.2. Atık Bitkisel Yağlardan Biyodizel Üretimi	28
2.2.2.3. Biyodizel Özellikleri	29
2.2.2.3.1. Biyodizelin Yakıt Özellikleri	29

2.2.2.3.2. Biyodizelin Çevresel Özellikleri	31
2.2.3. Dünyada Biyodizel	33
2.2.4. Türkiye’de Biyodizel	35
2.3. Enzimler	39
2.3.1. Enzimlerin Yapısı	39
2.3.2. Enzimlerin Özellikleri	40
2.3.3. Lipaz Enzimi	40
2.3.3.1. Lipaz Enziminin Kullanım Alanları	40
2.3.3.2. Lipaz Enziminin Özellikleri	41
2.3.4. Enzim İmmobilizasyonu	42
2.3.4.1. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları	43
2.3.4.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	44
2.3.4.2.1. Çapraz Bağlama	44
2.3.4.2.2. Enzim Kopolimerizasyonu	45
2.3.4.2.3. Taşıyıcıya Bağlama	45
2.3.4.2.4. Jelde Hapsetme	47
2.3.4.2.5. Mikrokapsülleme	48
2.3.4.2.6. Lipozom Tekniği	49
2.3.4.3.İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Maddeleri	49
3. MATERYAL ve YÖNTEM	51
3.1. Materyal	51
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler	51
3.1.1.1. Kimyasallar	51
3.1.1.2. Çözeltiler	53
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Aletler	54
3.2. Yöntem	54
3.2.1. STR-DVB-PGA Polimer Destek Maddesinin Hazırlanması	54

3.2.2. STR-DVB-PGA Polimer Destek Maddesinin Lipaz Enziminin İmmobilizasyonuna Hazırlanması	56
3.2.3. Polimer Destek Maddesinin Lipaz Enziminin İmmobilizasyonunu	56
3.2.4. Kitosan Kürelerinin Sentezi	58
3.2.5. Kitosan Kürelerine Enzim İmmobilizasyonu	59
3.2.6. Kantitatif Protein Tayini	61
3.2.6.1. Bradford Metodu	61
3.2.6.1.1. Bradford Analizi İçin Boya Çözeltilisinin Hazırlanması	61
3.2.6.1.2. Bradford Analizi İçin Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	61
3.2.6.1.3. Protein Tayini	62
3.2.6.2. Lowry Metodu	62
3.2.6.2.1. Lowry Çözeltilerinin Hazırlanması	62
3.2.6.2.2. Lowry Metodu İçin Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	63
3.2.6.2.3. Protein Tayini	64
3.2.7. Lipaz Enziminin Aktivite Tayini	64
3.2.7.1. Lipaz Enziminin Aktivite Tayini İçin Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	64
3.2.7.2. Aktivite Tayini	65
3.2.8. STR-DVB-PGA Polimerine İmmobilize Edilmiş Lipozyme TL 100L ve Kitosan Kürelere İmmobilize Edilmiş Novozyme 735 Enzimlerinin K_m ve V_{max} Değerlerinin İncelenmesi	66
3.2.9. Biyodizel Üretimi	66
3.2.10. Gaz Kromatografi Kütle Spektrometresi ile Biyodizel Tayini	68
3.2.11. Kullanılmış Yemelik Yağlarda Asit Sayısı ve Asitlik Tayini	69
3.2.12. Kullanılmış Yemelik Yağlarda İyot Sayısı Tayini ...	69

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	71
4.1. STR-DVB-PGA Polimerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonun Kemometrik Optimizasyonu	71
4.1.1. STR-DVB-PGA Polimerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonun Kemometrik Optimizasyonu İçin ANOVA Sonuçları	73
4.1.2. STR-DVB-PGA Polimerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonu İçin Optimum Değerlerin Belirlenmesi	78
4.2. İmmobilizasyon Öncesi ve Sonrasında Destek Maddesinin Karakterizasyonu	79
4.2.1. STR-DVB-PGA Polimerinin SEM Analizi ile Yüzey Karakterizasyonu	79
4.2.2. STR-DVB-PGA Polimerinin FTIR Analizi ile Yapı Karakterizasyonu	81
4.3. STR-DVB-PGA Polimerine İmmobilize Edilen Lipaz Enziminin Organik Çözücü Stabilitesi	83
4.4. Kitosan Kürelerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonu	84
4.4.1. Kitosan Kürelerine Lipaz İmmobilizasyonuna İmmobilizasyon Süresinin Etkisi	84
4.4.2. Kitosan Kürelerine Lipaz İmmobilizasyonuna Enzim Konsantrasyonunun Etkisi	85
4.5. STR-DVB-PGA Polimerine İmmobilize Edilmiş Lipozyme TL 100L ve Kitosan Kürelere İmmobilize Edilmiş Novozyme 735 Enzimlerinin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi	86
4.6. Atık Kanola Yağının Özellikleri	89
4.7. Atık Kanola Yağından Biyodizel Üretimi	89
4.7.1. STR-DVB-PGA Polimerine Lipaz İmmobilizasyonu ile Biyodizel Üretimi	89
4.7.2. Kitosan Kürelere Lipaz İmmobilizasyonu ile Biyodizel Üretimi	91
5. SONUÇ	93
KAYNAKLAR	95

EKLER	103
ÖZGEÇMİŞ	104
TEŞEKKÜR	105

KISALTMALAR DİZİNİ

AB – Avrupa Birliği

ABD – Amerika Birleşik Devletleri

ANOVA – Varyans analizi

BSA – Bovine serum albumin

CBB – Coomassie brilliant blue

EPDK – Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu

FTIR – Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometresi

GC-MS – Gaz kromatografisi kütle spektrometresi

HA – Heterosiklik amin

ÖTV – Özel tüketim vergisi

PAH – Polisiklik aromatik hidrokarbon

PCB – Poliklorlu bifenil

pNP – *para*-nitrofenol

pNPP – *para*-nitrofenilpalmitat

SEM – Taramalı elektron mikroskobu

STR-DVB-PGA – stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit

TPM – Toplam polar madde

TS – Türk standartı

UV – Ultraviyole

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1.1. Kızartma işleminin yararları	5
Çizelge 2.1.1.1. Kızartma sırasında bozunmaya neden olan etmenler ve bozunma sonucu oluşan ürünler	6
Çizelge 2.1.1.2. Kızartma sırasında yağda oluşan bozunma ürünleri	7
Çizelge 2.1.2.2.1. Farklı sıcaklıklarda ısıtma sırasında etil linolenatın peroksit değerleri	12
Çizelge 2.1.2.3.1. Patates kızartması sırasında ayçiçeği yağında trigliserid polimerlerinin oluşumu	16
Çizelge 2.1.3.1. Bazı ülkelerde kızartma yağlarının kullanımdan çekilme kriterleri	20
Çizelge 2.1.4.1. Bazı ülkelerin kişi başına düşen yıllık yağ tüketimleri	21
Çizelge 2.1.4.2. Ülkemizde toplanan kızartma yağı miktarları	22
Çizelge 2.2.2.1.1. Farklı biyodizel üretim yöntemlerinin karşılaştırılması	28
Çizelge 2.2.2.3.1.1. Biyodizel ile petrol kaynaklı dizel yakıtın bazı özellikleri ..	31
Çizelge 2.2.3.1. AB ülkelerinin biyodizel üretim miktarları	35
Çizelge 2.2.4.1. Türkiye’de üretilen biyodizel miktarları	38
Çizelge 2.3.3.2.1. Lipaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	41
Çizelge 2.3.4.3.1. Enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan destek maddeleri	49
Çizelge 2.3.4.3.2. Immobilizasyon destek maddesinde aranan özellikler	50
Çizelge 3.1.1.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	51
Çizelge 3.1.2.1. Çalışmada kullanılan araç-gereçler	54
Çizelge 3.2.10.1. GC-MS cihazı çalışma koşulları	68
Çizelge 3.2.10.2. GC-MS cihazı fırın sıcaklık programı	68
Çizelge 4.1.1. Merkezi kompozit dizaynda kullanılan kodlanmış ve gerçek değerler	71
Çizelge 4.1.2. Lipozyme TL 100L enziminin STR-DVB-PGA polimerine immobilizasyonunun optimizasyonu için merkezi kompozit dizayn tablosu ve deneysel sonuçlar	72

Çizelge 4.1.1.1. STR-DVB-PGA polimerine lipaz enzimi immobilizasyonun kemometrik optimizasyonu için ANOVA sonuçları	74
Çizelge 4.1.2.1. STR-DVB-PGA polimerine lipaz enzimi immobilizasyonun için optimum değerler	79
Çizelge 4.5.1. STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş Lipozyme TL 100L enzimi için [S] ve V değerleri	87
Çizelge 4.5.2. Kitosan kürelere immobilize edilmiş Novozyme 735 enzimi için [S] ve V değerleri	88
Çizelge 4.6.1. Atık kanola yağının bazı özellikleri	89
Çizelge 4.7.1.1. Üretilen biyodizelin bazı özellikleri	90
Çizelge 4.7.2.1. Üretilen biyodizelin bazı özellikleri	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1.1.1. Kızartma sırasında zamanla yağdaki fiziksel ve kimyasal değişimler	8
Şekil 2.1.2.2.1. Yağın termal oksidasyonunda başlama, çoğalma ve sonlanma	10
Şekil 2.1.2.3.1. Kızartma sırasında oleik asitten siklik olmayan polimer oluşumu	14
Şekil 2.1.2.3.2. Kızartma sırasında yağda eter ve peroksit bağlarının oluşumu	15
Şekil 2.1.2.3.3. 190 °C ve 204 °C’de ısıtılan pamuk yağı ve mısır yağının polimer içeriği	16
Şekil 2.1.2.3.4. Kızartma sırasında linoleik asitten siklik dimerler ve polimerlerin oluşumu	17
Şekil 2.1.2.3.5. Kızartma sırasında Diels-Alder reaksiyonuyla linoleik asitten siklik bileşiklerin oluşumu	18
Şekil 2.2.2.1. Trigliserid molekülünün transesterifikasyon reaksiyonu	25
Şekil 2.2.3.1. Biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılan yağlar	34
Şekil 2.2.4.1. Türkiye’de akaryakıt tüketimi ve biyodizel kurulu kapasitesi karşılaştırması	37
Şekil 2.3.4.2.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri	44
Şekil 2.3.4.2.1.1. Çapraz bağlamayla enzim immobilizasyonu	45
Şekil 2.3.4.2.3.1. Fiziksel adsorpsiyonla enzim immobilizasyonu	46
Şekil 2.3.4.2.3.2. Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu	46
Şekil 2.3.4.2.3.3. İyonik bağlama ile enzim immobilizasyonu	47
Şekil 2.3.4.2.4.1. Jelde hapsedme ile enzim immobilizasyonu	48
Şekil 2.3.4.2.5.1. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu	48
Şekil 3.2.1.1. Stiren-divinil benzen-poliglutaraldehit polimerinin bileşimi	55
Şekil 3.2.1.2. Stiren-divinil benzen-poliglutaraldehit polimerinin polimerizasyon reaksiyonu	55
Şekil 3.2.1.3. Stiren-divinil benzen-poliglutaraldehit polimerinin fotoğrafı	56
Şekil 3.2.3.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan deneysel düzeneğin fotoğrafı	57

Şekil 3.2.3.2. Enzimin polimer destek maddesine kovalent olarak immobilizasyonu	58
Şekil 3.2.4.1. Kitosan kürelerinin sentezinde kullanılan deneysel düzenek	59
Şekil 3.2.5.1. Kitosanın çapraz bağlanması ve kovalent enzim immobilizasyonu .	60
Şekil 3.2.6.1.2.1. Bradford protein analiz metodu kalibrasyon grafiği	62
Şekil 3.2.6.2.2.1. Lowry protein analiz metodu kalibrasyon grafiği	63
Şekil 3.2.7.1. Aktivite ölçümü sırasında gerçekleşen <i>pNPP</i> 'in <i>pNP</i> 'e dönüşüm reaksiyonu	64
Şekil 3.2.7.1.1. Aktivite tayini için <i>pNP</i> kalibrasyon grafiği	65
Şekil 3.2.9.1. Biyodizel üretiminde kullanılan deney düzeneği	67
Şekil 4.1.1.1. Tahmini spesifik aktivite değerleri ile deneysel spesifik aktivite değerlerinin grafiği	75
Şekil 4.1.2.2. Enzim konsantrasyonu ile pH ve karşılıklı etkileşimlerinin spesifik aktivite üzerine etkisini gösteren kontur grafik	76
Şekil 4.1.2.3. Enzim konsantrasyonu ile tampon konsantrasyonu ve karşılıklı etkileşimlerinin spesifik aktivite üzerine etkisini gösteren kontur grafik	77
Şekil 4.1.2.4. pH ile tampon konsantrasyonu ve karşılıklı etkileşimlerinin spesifik aktivite üzerine etkisini gösteren kontur grafik	78
Şekil 4.2.1.1. İmmobilizasyon öncesi STR-DVB-PGA polimerinin SEM görüntüsü	80
Şekil 4.2.1.2. İmmobilizasyon sonrası STR-DVB-PGA polimerinin SEM görüntüsü	80
Şekil 4.2.2.1. İmmobilizasyon öncesi STR-DVB-PGA polimerinin FTIR spektrumu	81
Şekil 4.2.2.2. İmmobilizasyon sonrası STR-DVB-PGA polimerinin FTIR spektrumu	82
Şekil 4.3.1. Metanol ve t-bütanol ile etkileşme zamanına bağlı olarak enzimin bağlı spesifik aktivitesindeki değişim	83
Şekil 4.4.1.1. İmmobilizasyon süresiyle spesifik aktivitedeki değişim	85
Şekil 4.4.2.1. Enzim konsantrasyonu ile spesifik aktivitedeki değişim	86
Şekil 4.5.1. STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş Lipozyme TL 100L enzimi için çizilen Lineweaver-Burk denklemi grafiği	87

Şekil 4.5.2. Kitosan kürelere immobilize edilmiş Novozyme 735 enzimi için çizilen Lineweaver-Burk denklemi grafiği	88
Şekil 4.7.1.1. STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilen <i>Thermomyces lanuginosus</i> lipaz enzimi ile yapılan biyodizel üretiminde tekrar kullanım sayısı ile biyodizel verimindeki değişim	90
Şekil 4.7.2.1. Kitosan kürelere immobilize edilen <i>Candida antarctica A</i> lipaz enzimi ile yapılan biyodizel üretiminde tekrar kullanım sayısı ile biyodizel verimindeki değişim	91

1. GİRİŞ

Son yıllardaki petrol krizleri, sera etkisi ve CO₂ sorunu alternatif enerji kaynağı arayışlarını hızlandırmıştır. Fosil kaynaklı yakıtların kullanımıyla salınan gazlar çevreyi ve sağlığımızı tehdit etmektedir. Bir süre sonra bu yakıtların rezervlerinin tükeneceği bilinmektedir. Bu nedenlerle yenilenebilir ve çevreye zarar vermeyen enerji kaynaklarının araştırılmasına yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır.

Yenilenebilir enerji kaynakları arasında bitkisel ve hayvansal kaynaklardan edilen biyoyakıtlar, petrol kaynaklı yakıtlara en önemli alternatif enerji kaynağı olmuştur. Biyoyakıtların ticari olarak kendine en fazla yer bulanı biyodizeldir. Biyodizel, bitkisel ve hayvansal kökenli yağlardan elde edilen yağ asidi metil esterleridir. Biyodizel saf olarak kullanılabilceği gibi petrolden elde edilen dizel yakıtı karıştırılarak da kullanılabilir.

İlk olarak 1895'te Rudolf Diesel'in yerfıstığı yağı kullanarak dizel yakıtı elde etmesiyle gündeme gelen biyodizelin 1990'lardan itibaren dünyada kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Bugün ABD ve AB ülkeleri ile Malezya'da üretimi ve kullanımı önemli miktarlara ulaşan biyodizelin fosil yakıtlardan elde edilen ürünlere göre çeşitli avantajları vardır. Biyodizel, toksik olmayan, yenilenebilir ve düşük emisyon değerlerine sahip bir yakıttır.

İlk dizel motorlarda dizel yakıtı olarak bitkisel kökenli yağlar kullanılmasına rağmen, bu yakıtların motorlarda oluşturduğu problemler dikkate alınarak, motor üreticileri fosil yakıtlara yönelmiştir. Oksijen içeren yakıtların egzoz emisyonlarını azaltması ve artan çevre bilinci yağların dizel motorlarında kullanımını 1980'li yılların başında tekrar gündeme getirmiştir. Ancak bitkisel yağların petrol kaynaklı dizel yakıtı göre viskozitelerinin ve moleküler ağırlığının daha yüksek olması motor içinde tortu oluşumu ve karbon birikimi gibi olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bu durum motorlarda ciddi problemlere yol açar. Bitkisel veya hayvansal yağların dizel motorlarda herhangi bir değişiklik yapılmadan kullanılabilmesi için petrol kaynaklı dizel yakıtına yakın özelliklere sahip bir yakıtı dönüştürülmesi gerekmektedir. Bitkisel ve

hayvansal yağların dizel yakıtına dönüştürülmesinde dört metot vardır. Bunlar, bitkisel ve hayvansal yağın seyreltilmesi, termal kraking (piroliz), mikroemülsiyon ve transesterifikasyon reaksiyonudur. Transesterifikasyon, son zamanlardaki araştırmalarda üzerinde en çok durulan, en yaygın metottur.

Transesterifikasyon, asit katalizli, baz katalizli, enzim katalizli ve süperkritik akışkan metanol kullanılarak gerçekleştirilebilir. Kimyasal yöntemlerin yüksek enerji maliyeti ve gliserin saflaştırma basamaklarının olması nedeniyle, günümüzde lipaz enzimleri kullanılarak biyodizel üretimi önemli hale gelmiştir. Lipaz enzimi ılımlı reaksiyon koşullarında çalışmasını ve ilave işlem gerektirmeden gliserinin geri kazanımını sağlamaktadır. Ayrıca bu yöntemle saflaştırma işlemlerine gerek kalmadan daha saf esterler elde edilmektedir. Enzimatik yöntemin en önemli dezavantajı enzim maliyetinin yüksek olmasıdır. Bu durum immobilize enzim kullanımıyla bir ölçüde telafi edilebilmektedir.

Biyodizelin ticarileşmesinin önündeki başlıca engel maliyetinin yüksek olmasıdır. Biyodizelin üretiminde maliyetin azaltılabilmesi için hammadde olarak atık bitkisel yağların kullanılması, sürekli transesterifikasyon reaksiyonu ve yan ürün olarak çıkan gliserinin değerlendirilmesi düşünülebilir. Ülkemizde yıllık 350.000 ton bitkisel atık yağ olduğu tahmin edilmektedir. Bu atık yağların toplanarak biyodizele dönüştürülmesi ile çevresel olmayan yollarla imhasının önlenmesi, atık bir enerji kaynağının tekrar hayata geçirilmesi ve atık yağlardan üretilen biyodizelin rafine yağlardan üretilen biyodizele oranla maliyetinin çok daha düşük olması gibi avantajlar, atık bitkisel yağlardan biyodizel üretimini cazip hale getirmektedir. Biyodizel üretiminde hammadde olarak atık yağların kullanılması, hem çevre sorunlarının azaltılmasını hem de üretim maliyetinin düşürülmesini sağlamaktadır.

Ülkemizde petrol tüketiminin ancak %15'i yerli üretimle sağlanabilmektedir. Petrol tüketiminde en büyük pay %34 ile dizel yakıtı aittir. Ülkemizde petrol kaynaklarının yetersiz olması ve küresel enerji krizleri, alternatif enerji kaynaklarının araştırılmasına hız kazandırmıştır. Türkiye'de biyodizel kullanımı, tüketici tasarrufunu

ve petrol ithalatının azaltılmasını sağlarken, temiz çevrenin gelişimine de önemli bir katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmada *Thermomyces lanuginosus* lipaz enziminin (Lipozyme TL-100L) mikro gözenekli stiren-divilbenzen-poliglutaraldehit polimer destek maddesine immobilizasyon parametreleri kemometrik olarak optimize edilmiştir. Optimum koşullarda immobilize edilen enzime *t*-butanol ve metanolün inhibisyon etkisi incelenmiştir. Kitosandan üretilen polimerik destek maddesine *Candida antarctica A* lipaz enzimi (Novozyme 735) immobilize edilmiştir. Bu immobilize enzimler kullanılarak reaktör sistemi ile atık kanola yağından biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen biyodizelin bazı özellikleri incelenerek kullanıma uygunluğu belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda endüstriyel olarak uygulanabilir biyodizel üretim sistemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

2.1. ATIK BİTKİSEL YAĞLAR

Kızartma en eski ve en yaygın gıda hazırlama yöntemlerinden biridir. ABD’de 2005 yılında 83 milyar \$ ticari potansiyeli olduğu tahmin edilmektedir (Pedreschi ve ark. 2005). Kızartılmış gıdalar tüketiciler tarafından beğenilen tat, renk ve yapıya sahiptirler (Boskou ve ark. 2006). Kızartma işlemi, gıda maddesinin 150-190 °C sıcaklığındaki yağ içine daldırılması ile yağ, gıda ve hava arasında aynı anda gerçekleşen ısı ve kütle iletimi sonucunda, gıdanın istenilen renk, doku ve lezzet kazanarak kısa sürede pişmesini sağlayan bir prosestir. (Türkay 2007).

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 üstünlükleri vardır. Örneğin, gıda içindeki sıcaklığın 100 °C’nin altında ve kızartma süresinin kısa olması nedeniyle, C vitamini gibi ısıya hassas vitaminlerin haşlama ve fırınlama yöntemlerine göre daha az bozunduğu saptanmıştır. Benzer şekilde kızartılmış gıdalardaki mineral kaybı, haşlanmış ve fırınlanmış gıdalarla kıyaslandığında ihmal edilecek kadar azdır. Kızartma amacıyla kullanılan tüm bitkisel yağlar E vitamini içerdiklerinden, kızartılmış gıdalar da tuttıkları yağ nedeniyle bu vitamince zenginleşirler. Dolayısıyla yağ içeriği ve bundan kaynaklanan kalorileri sorun olmadığı sürece, kızartma işleminin gıdanın besleyici değerine olumlu bir katkısından söz edilebilir. Ancak kızartılmış ürünlerin insan sağlığına olumsuz etkisi olmaması için, mutlaka kızartma işleminde kullanılan yağın içerdiği bozunma ürünlerinin miktarının takip edilmesi gerekmektedir (Türkay 2007). Kızartma işleminin yararları çizelge 2.1.1.’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1.1. Kızartma işleminin yararları

<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ucuz, hızlı ve verimli bir pişirme yöntemidir.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gıda maddesinin yüzey sterilizasyonu sağlar.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gıda maddesinin C vitamini gibi yüksek sıcaklıkta bozulan vitamin kaybı daha azdır.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gıda maddesinin yağda çözünen vitaminlerden A vitamini kaybı daha fazla iken, kızartma yağından gelen E vitamini kazanımı fazladır.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gıdanın içerdiği mineral madde kaybı daha azdır.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gelişmemiş ülkelerde yüksek kalori içeriği ile iyi bir besleyici madde kaynağıdır.

KAYNAK: Türkay 2008.

2.1.1. Kızartma Mekanizması:

Kızartma işlemi bir su giderme (dehidrasyon) işlemidir. Kızartma işleminde;

- Gıda kısa sürede pişer.
- Ürünün sıcaklığı, kabuk bölgesi hariç 100 °C'yi geçmez.
- Suda çözünen madde kaybı minimumdur (Türkay 2008).

Uygun süre ve sıcaklıkta kızartılan gıda canlı renkte, gevrek yapıdadır ve uygun miktarda yağ adsorplamıştır. Daha düşük sıcaklıkta veya daha kısa sürede kızartılan gıda beyaz veya açık sarı renkte, kısmen pişmemiş iç yapıya sahiptir. Daha yüksek sıcaklıkta veya daha uzun sürede kızartılan gıda daha koyu renkte, daha sert bir dış yapıya sahiptir ve fazla miktarda yağ adsorplamıştır (Blumenthal 1991).

Kızartma işlemi sırasında istenen veya istenmeyen kimyasal bileşikler oluşması nedeniyle kızartılan gıdanın lezzetinde, kalitesinde, renginde, yapısında ve besleyicilik özelliklerinde bazı değişimler olur. Yağda hidroliz, oksidasyon ve polimerizasyon gibi kimyasal reaksiyonlar gerçekleşir, uçucu ve uçucu olmayan bileşikler oluşur. Kızartma yağları, kızartma işlemi sırasında oluşan sağlığa zararlı olabilecek bu maddelerden başka gıda maddesinden kaynaklanan ve yağda yüksek çözünürlüğü olan heterosiklik

aminler (HAs), poliaromatik hidrokarbonlar (PAHs), poliklorlu bifeniller (PCBs), diokosinler, akrilamidler gibi sağlığa zararlı maddeleri kullanım süresine bağlı olarak değişen miktarlarda içerebilirler (Türkay 2008).

Kızartma sırasında yağda bozunmaya neden olan etmenler ve bozunma sonucu oluşan ürünler çizelge 2.1.1.1’de verilmiştir. Kızartma sırasında yağda oluşan uçucu ve uçucu olmayan bileşenler de çizelge 2.1.1.2.’de verilmiştir. Oluşan uçucu olmayan bozunma ürünleri yağın toplam polar madde içeriğini oluşturur (Türkay 2007).

Çizelge 2.1.1.1. Kızartma sırasında bozunmaya neden olan etmenler ve bozunma sonucu oluşan ürünler

Reaksiyon	Neden olan etmen	Reaksiyon ürünleri
Hidroliz	Gıdanın içerdiği su	Yağ asitleri Monoglisidler Diglisidler
Oksidasyon ve polimerizasyon	Hava	Oksitlenmiş monomerik, dimerik ve oligomerik triglisidler Uçucu maddeler (aldehit, keton, alkol vs.)
Isıl bozunma ve polimerizasyon	Sıcaklık	Halkalı yapıda dimerik, polimerik triglisidler

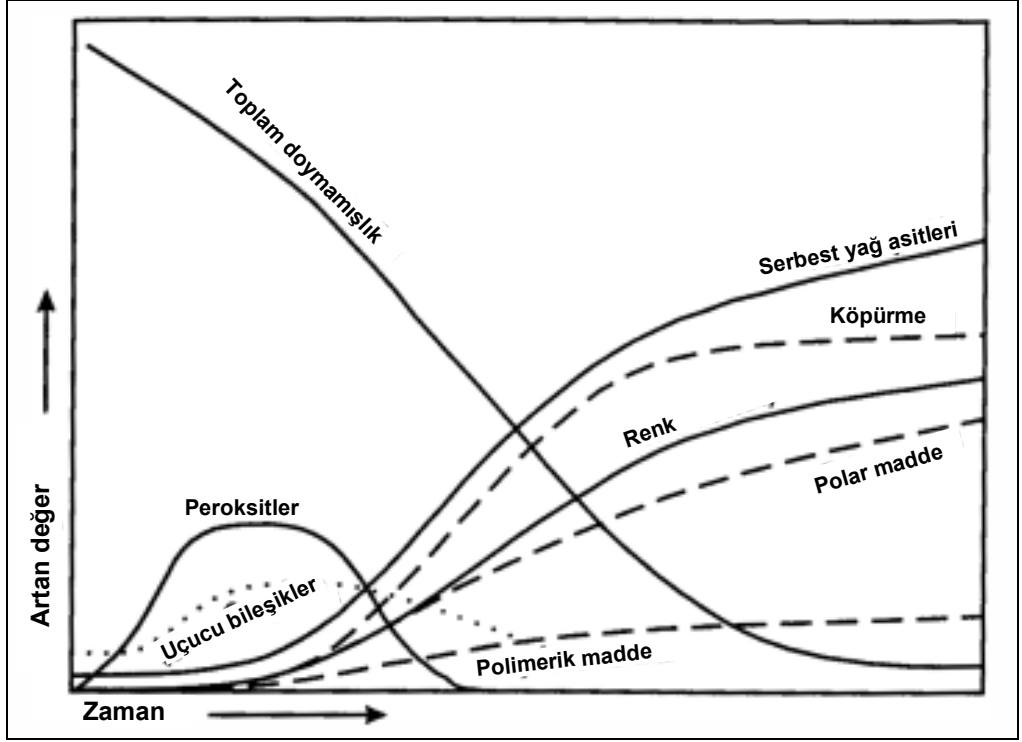
KAYNAK: Türkay 2008.

Çizelge 2.1.1.2. Kızartma sırasında yağda oluşan bozunma ürünleri

Uçucu olmayan bozunma ürünleri (Toplam Polar Madde İçeriği)	Uçucu bozunma ürünleri
Monoglisericidler	Hidrokarbonlar
Diglisericidler	Ketonlar
Oksitlenmiş triglisericidler	Aldehitler
Triglisericid dimerleri	Alkoller
Triglisericid trimerleri	Esterler
Triglisericid polimerleri	Laktonlar
Serbest yağ asitleri	PAH'lar
Akrilamidler	PCB'ler
Heterosiklik aminler	Dioksin

KAYNAK: Türkay 2007.

Kızartma sırasında yağın bozunması sonucu oluşan uçucu bileşiklerin çoğu buharlaşarak atmosfere karışır. Yağdaki kalan uçucu bileşikler birçok kimyasal reaksiyona maruz kalır veya gıda tarafından adsorplanır. Uçucu olmayan bileşikler kızartılan gıdanın lezzetine, kalitesine ve yapısına depolama süresince etki eder. Kızartma işlemi sırasında yağdaki doymamış yağ asitleri azalır. Köpüklenme, renk, viskozite, yoğunluk, spesifik ısı, serbest yağ asidi içeriği, polar maddeler ve polimerik bileşikler artar. Kızartma süresine bağlı olarak bu parametrelerin değişimi şekil 2.1.1.1.'de gösterilmiştir. Kızartma sıcaklığı ve zamanı, kızartma yağı, antioksidanlar ve kızartma yapılan kap kızartma sırasında yağın oksidasyon, polimerizasyon ve hidrolizine etki eder (Choe ve Min 2007).



Şekil 2.1.1.1. Kızartma sırasında zamanla yağdaki fiziksel ve kimyasal değişimler (Choe ve Min 2007).

2.1.2. Kızartma Sırasında Yağdaki Kimyasal Reaksiyonlar

2.1.2.1. Yağın Hidrolizi

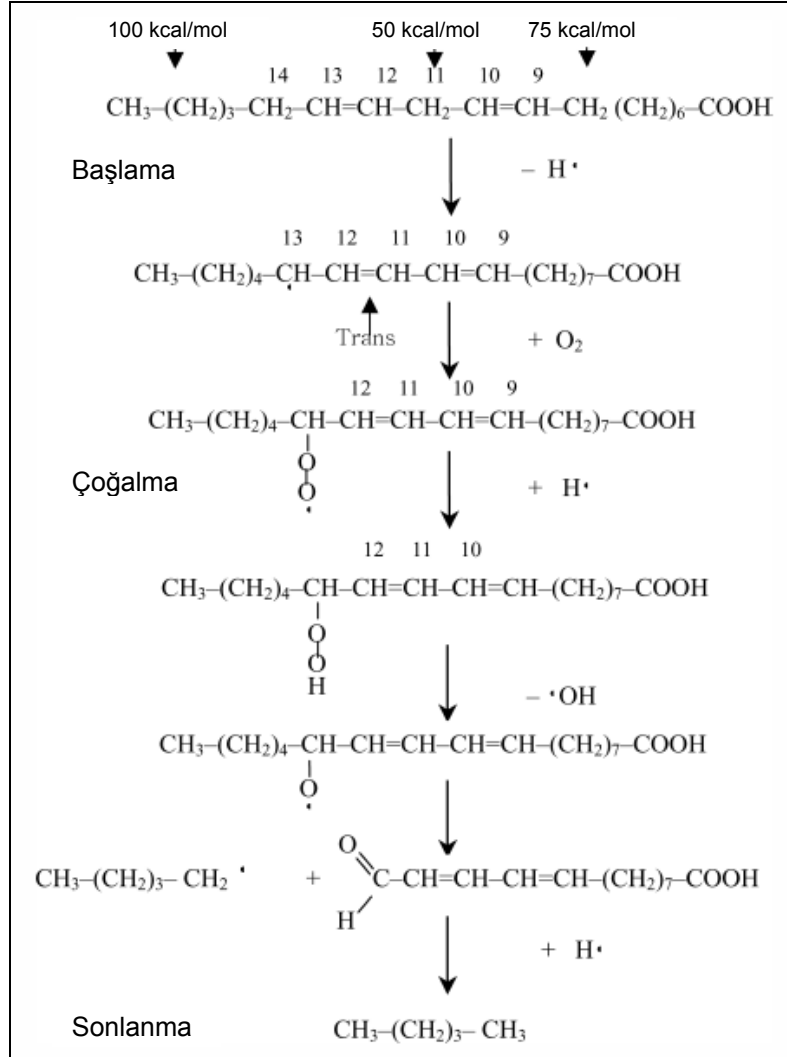
Kızartma sırasında ortamda var olan su ve oksijen kızartma yağında ve gıdada kimyasal reaksiyonları başlatırlar. Su, zayıf bir nükleofil olarak trigliseritin ester bağına saldırarak monogliserid, digliserid, gliserol ve serbest yağ asitlerinin oluşmasına neden olur. Kızartma yağının serbest yağ asidi içeriği kızartma sayısı arttıkça artar (Chung ve ark. 2004). Kızartma yağının kalitesinin belirlenmesinde kullanılan parametrelerden biri de serbest yağ asidi miktarıdır. Termal hidroliz, su-yağ ara yüzeyinden ziyade başlıca yağ fazında gerçekleşir (Lascaray 1949). Hidroliz, kısa ve doymamış yağ asitleri içeren yağda uzun ve doymuş yağ asitleri içeren yağlardan daha fazla meydana gelir. Çünkü kısa ve doymamış yağ asitlerinin suda çözünürlüğü uzun ve doymuş yağ asitlerinden daha fazladır. Gıdalardaki su, kısa zincirli yağ asitlerini kolaylıkla hidroliz eder (Nawar 1969).

Fazla miktarda su, yağı hızlıca hidroliz eder (Dana ve ark. 2003). Yağ ile gıdanın sulu fazı arasındaki temasın fazla olması yağın hidrolizini arttırır (Pokorny 1989). Patates kızartması sırasında, pamuk yağındaki mono ve digliseridler 155-195 °C'de başlangıçta artar ve sonra sabit bir noktaya ulaşır (Houhoula ve ark. 2003). Kızartma yağının sık sık taze yağ ile değiştirilmesi ile kızartma yağının hidrolizi yavaşlatılır (Romero ve ark. 1998). Kızartma kabının temizliğinde sodyum hidroksit ve diğer bazik maddelerin kullanımı yağın hidrolizini arttırır. Kızartma süresinin yağın hidrolizine etkisi yoktur (Naz ve ark. 2005).

Serbest yağ asitleri ve onların okside olmuş bileşikleri kötü tat ve koku üreterek yağın kızartma işlemine uygunluğunu azaltır. Digliseridler ve monogliseridler, gliserol ve serbest yağ asitleri yağın hidroliz reaksiyonunu daha da hızlandırır (Frega ve ark., 1999). 150 °C'de gliserol buharı ve yağda kalan gliserol, hidroliz ile yağ asitlerinin oluşumunu arttırır (Naz ve ark., 2005). Stevanson ve ark. (1984) kızartma yağı için maksimum yağ asidi içeriğinin %0,05 ile %0,08 arasında olması gerektiğini önermişlerdir.

2.1.2.2. Yağın Oksidasyonu

Kızartma işlemin sırasında oksijen yağ ile tepkime verir (Peers ve Swoboda 1982, Houhoula ve ark. 2003). Termal oksidasyonun kimyasal mekanizması aslında otooksidasyon mekanizması ile aynıdır. Termal oksidasyon, otooksidasyondan daha hızlıdır. Ama termal ve otooksidasyon arasında detaylı bilgi ve kıyaslama bulunmamaktadır. Termal oksidasyonun mekanizması şekil 2.1.2.2.1.'de görüldüğü gibi başlama, çoğalma ve sonlanma aşamalarından oluşur.



Şekil 2.1.2.2.1. Yağın termal oksidasyonunda başlama, çoğalma ve sonlanma (Choe ve Min 2007).

Radikal olmayan singlet haldeki yağ triplet haldeki diradikal oksijen ile spin engelinden dolayı tepkime vermez. Havadaki oksijen bir diradikal bileşiktir. Oksidasyon reaksiyonu için radikal oksijen ile tepkime verecek olan yağ radikal halde olmalıdır. Yağdaki karbona daha zayıf bağ ile bağlı olan hidrojen ilk olarak uzaklaşarak radikal haline gelecektir. Linoleik asidin 11. karbonunda, karbon ile hidrojen arasındaki bağı kırmak için 50 kcal/mol enerjiye ihtiyaç vardır (Min ve Boff 2002). Çifte bağlı 9. ve 12. karbonların karbon-hidrojen bağının enerjisi, elektronların çekilmesi nedeniyle 11. karbondan daha azdır. Oleik asidin çifte bağının α konumundaki 8. veya 11. karbondaki karbon-hidrojen bağı yaklaşık 75 kcal/mol'dür. Yanında çifte bağ içermeyen doymuş karbondaki karbon-hidrojen bağı yaklaşık 100 kcal/mol'dür (Min ve Boff,

2002). Yağ asitlerindeki karbon-hidrojen bağının farklı kuvvetlerde olması stearik, oleik ve linoleik asitlerin termal veya otooksidasyon sırasında farklı miktarlarda oksidasyona uğramalarını açıklar. Linoleik asitteki en zayıf karbon-hidrojen bağı 11. karbondadır ve ilk olarak 11. karbondaki hidrojen uzaklaşarak 11. karbonda bir radikal oluşur. 11. karbondaki radikal trans çifte bağı 9. veya 13. karbondaki konjuge pentadienil radikali oluşumuyla yeniden düzenlenir. Isı, ışık, metaller ve reaktif oksijen türleri yağda radikal oluşumunu kolaylaştırırlar. Fe^{3+} ve Cu^{2+} gibi çok değerlikli metaller düşük sıcaklıklarda bile metalin yükseltgenme-indirgenme mekanizması sayesinde yağdan hidrojeni uzaklaştırarak alkil radikalleri oluştururlar. Doymuş yağ asitlerinde radikal oluşum bölgesi doymamış oleik ve linoleik asitlerinkinden farklıdır. Doymuş yağ asitlerinin alkil radikali elektron çekme özelliğine sahip karboksil grubunun α pozisyonunda oluşur. Bir yağ molekülünden bir hidrojen uzaklaşmasıyla alkil radikalinin oluşumu yağın oksidasyon reaksiyonunun başlama basamağı olarak isimlendirilir. Alkil radikali, alkil radikalleri, alkoksi radikalleri ve peroksi radikalleri ile tepkime vererek dimerler ve polimerler oluşturabilir.

Alkil radikali diradikal triplet oksijen ile hızlı bir şekilde tepkime verir ve peroksi radikalleri meydana gelir. Peroksi radikali de oleik asit ve linoleik asitten hidrojen ayırır ve hidroperoksit oluşur. Peroksi radikali bir başka yağ molekülünden bir hidrojen atomu uzaklaştırır ve yeni hidroperoksit ve bir başka alkil radikali oluşur. Bu zincir reaksiyonu gıdalardaki serbest radikal zincir reaksiyonu olarak adlandırılır ve çoğalma basamağıdır. Peroksi radikalleri de diğer radikaller ile tepkime vererek dimerleri veya polimerleri oluşturur (Choe ve Min 2005). Serbest alkil radikalleri ve peroksi radikallerinin zincir reaksiyonları yağın termal oksidasyonunu hızlandırır.

R-O-O-H yapısındaki oksijen-oksijen bağının kuvveti yaklaşık 44 kcal/mol'dür. Bu bağ göreceli olarak zayıf bir kovalent bağıdır (Hiatt ve ark. 1968). Hidroperoksitler genellikle kızartma sırasında kararlı değildirler (çizelge 2.1.2.2.1.). Hidroperoksitler peroksit bağının homolizi ile alkoksi ve hidroksi radikallerine parçalanırlar. Hidroperoksitin parçalanmasıyla oksi ve hidroksi radikalleri oluşur. Toschi ve ark. (1997) 150 °C'de termal oksidasyona uğramış metil linoleatın hidroperoksitlerinden çeşitli hidroksil türevleri tanımlamışlardır. Alkoksi radikali diğer alkoksi radikalleri ile

tepkime verir veya parçalanmasıyla radikal olmayan ürünler oluşur. Radikal olmayan, uçucu veya uçucu olmayan bileşiklerin oluşmasıyla oksidasyon sona erer ve bu sonlanma basamağı olarak adlandırılır (şekil 2.1.2.2.1.).

Çizelge 2.1.2.2.1. Farklı sıcaklıklarda ısıtma sırasında etil linolenatın peroksit değerleri

70 °C		180 °C		250 °C	
Isıtma süresi (saat)	Peroksit değeri (meq/kg yağ)	Isıtma süresi (saat)	Peroksit değeri (meq/kg yağ)	Isıtma süresi (saat)	Peroksit değeri (meq/kg yağ)
6	1777	5	237	3	44
24	1058	10	251	5	77
45	505	20	119	10	198
69	283	30	80	20	67
		60	44	30	0

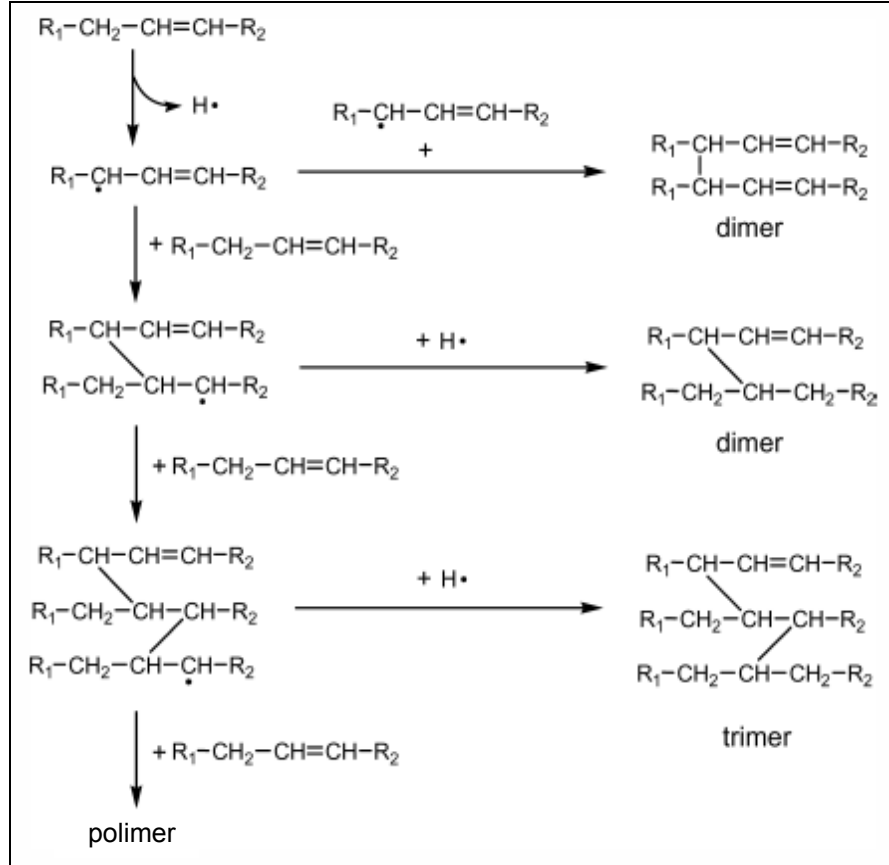
KAYNAK: Nawar 1984.

Kızartma yağındaki uçucu bileşiklerin çoğu kızartma sırasında buharlaşarak uzaklaşır (May ve ark. 1983). Kızartma sistemine su eklenmesiyle yağdaki uçucu bileşikler azalır (Wu ve Chen 1992). Yağda bulunan uçucu bileşiklerin miktarı yağ türü, gıda türü ve kızartma koşullarına bağlı olarak büyük ölçüde değişir. Kızartma yağındaki uçucu bileşikler, buharlaşma, bozunma ve uçucu bileşiklerin diğer gıda bileşenleri ile reaksiyonu nedeniyle azalır veya tamamen ortadan kalkar (Nawar 1985). Kızartma yağındaki uçucu bileşikler oksidasyon, dimerizasyon ve polimerizasyon gibi pek çok reaksiyona maruz kalır. Uçucu bileşikler kızartma yağının ve kızartılan gıdaların lezzet kalitesine önemli ölçüde katkıda bulunur. Oksidatif parçalanma reaksiyonları, oksijen konsantrasyonu ve serbest radikallerin artması ile artar (Paul ve Mittal 1997). Mono ve digliseridlerin miktarları kızartma işleminin başlangıcında azdır. Kızartma sisteminde yüksek yüzeyler arası gerilimi su kabarcıkları ve yağ yüzeyini kaplayan buhar oluşumu kırar. Yüzeyi kaplayan su yağ ile oksijen arasındaki teması azaltır ve yağın oksidasyonu azalır (Blumenthal 1991). Rafine yağ genellikle 1 ppm'den daha az yağ asitlerinin sodyum ve potasyum tuzları gibi alkali madde içerir. Taze kızartma yağı 10 ppm'den daha az alkali madde içermelidir (Moreira ve ark. 1999).

2.1.2.3. Yağın Polimerizasyonu

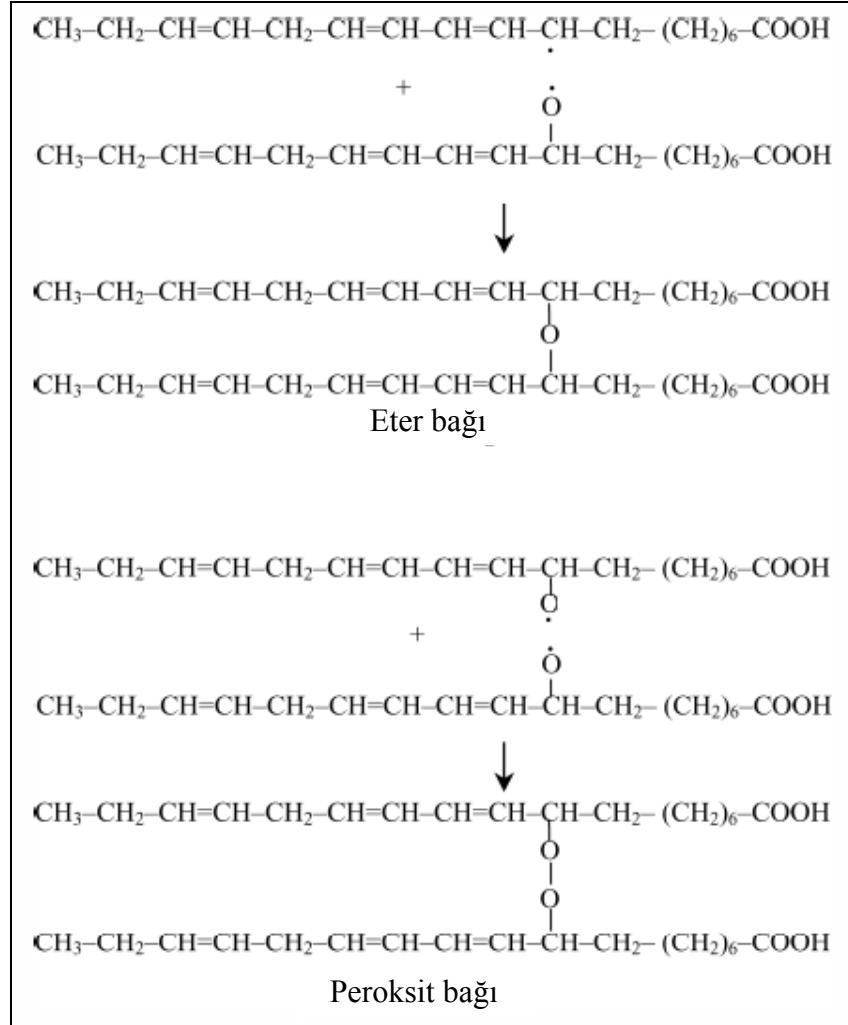
Kızartma yağının ve kızarmış gıdaların lezzet kalitesinde uçucu bileşikler fazlasıyla önemlidir ama kızartma yağındaki tüm bozunma ürünlerindeki uçucu içeriği milyonda bir seviyesindeki konsantrasyonda bulunur (Nawar 1985). Kızartma yağının başlıca bozunma ürünleri uçucu olmayan polar bileşikler, trigliserid dimerleri ve polimerleridir. Siklik bileşiklerin miktarları uçucu olmayan polar bileşikler, dimerler ve polimerler ile karşılaştırıldıkları zaman göreceli olarak küçüktür (Takeoka ve ark. 1997, Dobarganes ve ark. 2000). Dimerler ve polimerler molekül ağırlığı 692 ile 1600 Dalton arasında olan büyük moleküllerdir ve $-C-C-$, $-C-O-C-$, ve $-C-O-O-C-$ bağlarının kombinasyonu ile oluşurlar (Kim ve ark. 1999). Dimerler ve polimerler, hidroperoksi, epoksi, hidroksi ve karbonil gruplarına, $-C-O-C-$ ve $-C-O-O-C-$ bağlarına sahiptirler.

Oluşan dimerler ve polimerler, reaksiyon süreçlerine ve yağın içerdiği yağ asidi türlerine bağlı olarak siklik veya asiklik olabilir (Tompkins ve Perkins 2000). Kızartma işlemi sırasındaki dimerizasyon ve polimerizasyon radikalik reaksiyonlardır. Allil radikalleri tercihen çift bağların α konumundaki metilen karbonlarında oluşur. Dimerler C-C bağından allil radikalinin reaksiyonu ile oluşur. Isıtma sırasında oleik asitten siklik olmayan polimerlerin oluşumu şekil 2.1.2.3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1.2.3.1. Kızartma sırasında oleik asitten siklik olmayan polimer oluşumu (Choe ve Min 2007).

Trigliseridler oksijen ile reaksiyon verir ve alkil hidroperoksitler (ROOH) veya dialkil peroksitler (ROOR) oluşur. Bunlar kolaylıkla RO-OH şeklinde bölünerek alkoksi ve ROO-R şeklinde bölünerek peroksi radikallerine bozunur. Alkoksi radikalleri yağ molekülünden hidrojen kopararak hidroksi bileşikleri meydana getirebilir veya diğer alkil radikalleri ile birleşerek oksidimerler meydana getirebilir. Peroksi radikalleri alkil radikalleri ile birleşebilir ve peroksi dimerleri oluşturabilir (Choe ve Min 2007). Kızartma sırasında yağda eter ve peroksit bağlarının oluşumu Şekil 2.1.2.3.2.'de gösterilmiştir.



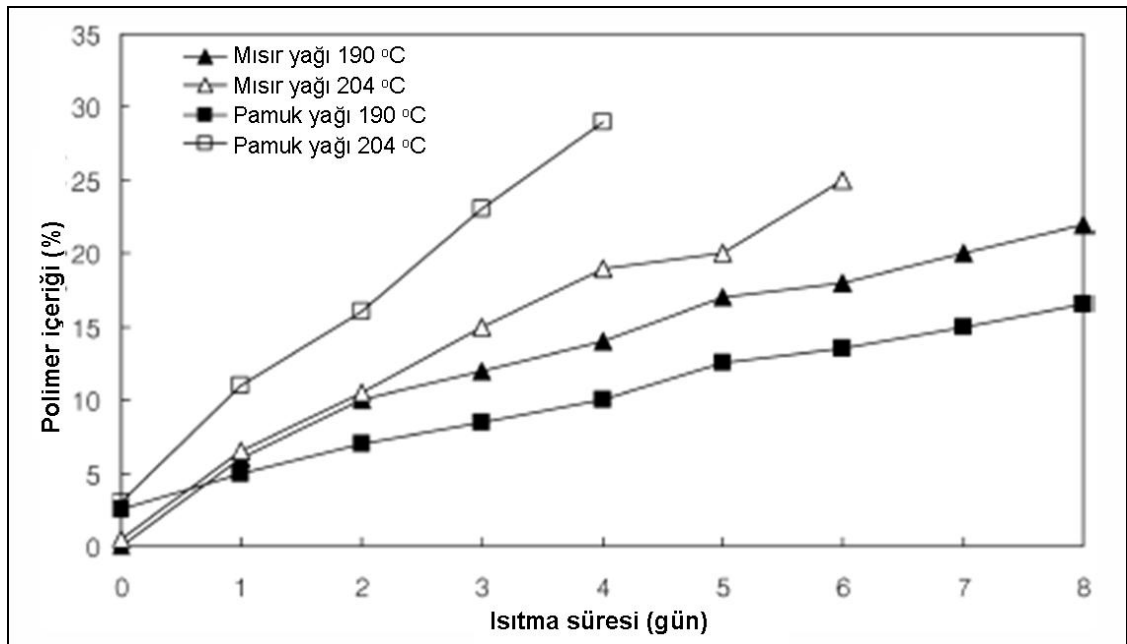
Şekil 2.1.2.3.2. Kızartma sırasında yağda eter ve peroksit bağlarının oluşumu (Choe ve Min 2007).

Dimerler ve polimerlerin oluşumu yağın türüne, kızartma sıcaklığına ve kızartma sayısına bağlıdır. Kızartma sayısı ve kızartma sıcaklığı arttığında çizelge 2.1.2.3.1. (Cuesta ve ark. 1993) ve şekil 2.1.2.3.3.'da (Takeoka ve ark. 1997) görüldüğü gibi polimer miktarı artar. Kızartma sırasında linoleik asitçe zengin olan yağ oleik asitçe zengin yağdan daha kolay polimerize olur (Bastida ve Sanchez-Muniz 2001).

Çizelge 2.1.2.3.1. Patates kızartması sırasında ayçiçeği yağında (mg/100 mg yağ) trigliserid polimerlerinin oluşumu

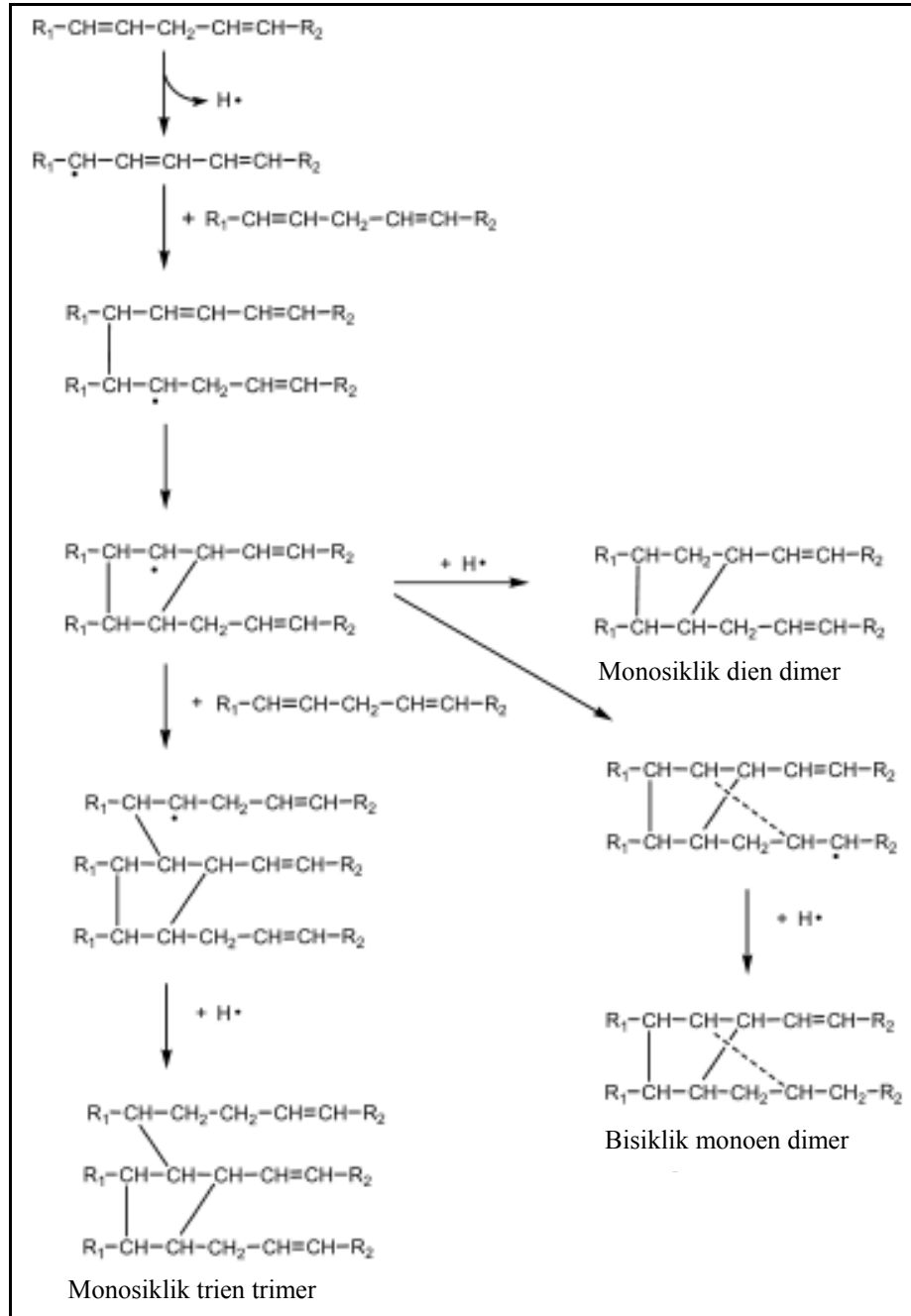
	Kızartma Sayısı				
	0	20	30	50	75
Trigliserid polimerleri	0,10	1,65	2,50	3,15	3,44
Trigliserid dimerleri	0,75	6,25	7,09	7,37	7,51

KAYNAK: Cuesta ve ark. 1993.

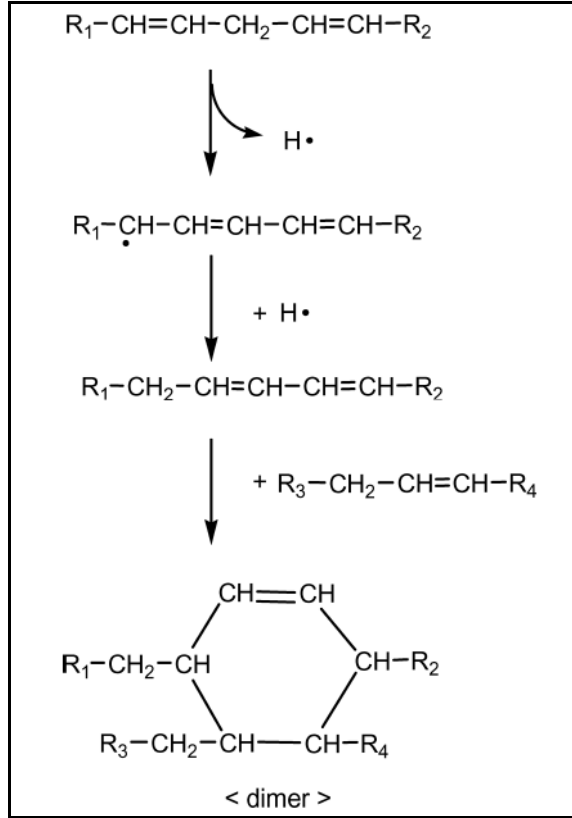


Şekil 2.1.2.3.3. 190 °C ve 204 °C’de ısıtılan pamuk yağı ve mısır yağının polimer içeriği (Takeoka ve ark. 1997).

Siklik polimerler, trigliseridler arasında veya içinde radikalik reaksiyonlar (Şekil 2.1.2.3.4.) ve Diels-Alder reaksiyonuyla (şekil 2.1.2.3.5.) meydana gelir. Kızartma yağında siklik bileşiklerin oluşması doymamışlık derecesi ve kızartma sıcaklığına bağlıdır (Meltzer ve ark. 1981). Siklik monomerlerin ve polimerlerin oluşumu linoleik asit miktarının artmasıyla artar (Tompkins ve Perkins 2000). Kızartma sırasında soya yağında siklik monomerlerin yanı sıra linoleatın bisiklik ve trisiklik dimerleri de meydana gelir (Christopoulou ve Perkins 1989).



Şekil 2.1.2.3.4. Kızartma sırasında linoleik asitten siklik dimerler ve polimerlerin oluşumu (Choe ve Min 2007).



Şekil 2.1.2.3.5. Kızartma sırasında Diels-Alder reaksiyonuyla linoleik asitten siklik bileşiklerin oluşumu (Choe ve Min 2007).

Polimerler oksijence zengin kızartma işlemlerinde oluşur. Yoon ve ark. (1988) yağın oksidasyonunu oksitlenmiş polimer bileşiklerinin hızlandırdığını rapor etmişlerdir. Polimerler yağın parçalanmasını daha hızlandırır. Bunun sonucunda yağın viskozitesi artar, ısı transferi azalır, kızartma sırasında köpük meydana gelir ve gıdada hoş olmayan renk oluşur (Tseng ve ark.1996). Ayrıca polimerler gıdanın fazla miktarda yağ adsorplamasına neden olur.

Polimerler dienlerle büyük ölçüde birleşir ve havanın oksijeni ile yağ ve metalin temas etmesiyle kızartma kabının kenarlarında kahverengi, reçine benzeri maddeler meydana gelir. Yağ nemden uzaklaştırılmadığında da reçine benzeri maddelerin meydana gelişi artar (Moreira ve ark. 1999).

2.1.3. Kızartma Yağlarının Kullanımdan Çekilmesi

Kızartma yağlarının kullanımdan çekilmesi için en yaygın olarak kullanılan kriter yağdaki toplam polar madde (TPM) miktarıdır. Polar maddeler bir yağdaki trigliserid olmayan maddeler olarak tanımlanabilir. Örneğin kullanılmamış yağ başlangıçta %96-98 trigliserid içerir, kalan %2-4'lük kısım polar fraksiyon olarak değerlendirilir. Kızartma sırasında yağın yüksek sıcaklık, hava ve gıda ile olan etkileşimleri sonucunda pek çok bileşik oluşur. Oluşan bu polar parçalanma ürünlerinin çoğunun toksik etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Hein ve ark. 1998).

Toplam polar madde miktarının ölçülmesi kızartma yağlarının kalitesini belirlemek için en genel ve güvenilir metottur. Pek çok ülkede kızartma yağındaki TPM miktarı için sınır değerler belirlenmiştir. Bu ülkelerin çoğunun yemeklik yağ yönetmeliğinde polar madde içeriğinin en fazla %25 olması gerektiği belirtilmektedir. Türkiye’de de bu konuyla ilgili olarak gıda maddeleri üretim, satış ve toplu tüketim yerlerindeki kızartma işlemlerinde kullanılmakta olan katı ve sıvı yağların resmi kontrol ve denetimlerindeki fiziksel ve kimyasal kriterleri belirlemek amacıyla 2007/41 no’lu “Kızartma Amacıyla Kullanılan Katı ve Sıvı Yağların Kontrol Kriterleri Tebliği” yayınlanarak 28.07.2008 tarihinde yürürlüğe girmiştir. Bu tebliğe göre kızartma amacıyla kullanılan yağların TPM içeriği en fazla %25, dumanlanma noktası en az 170 °C olmalıdır. Çizelge 2.1.3.1.’de bazı Avrupa ülkelerinde kızartma yağlarının kullanımdan çekilme kriterleri verilmiştir. Yapılan bir araştırmada 40 kızartmadan sonra tüm kullanılmış yağların %25’in üzerinde polar madde içerdiği tespit edilmiştir (Dobargenes 2000, Oziewicz ve Tymoszczyk 2005).

Çizelge 2.1.3.1. Bazı ülkelerde kızartma yağlarının kullanımdan çekilme kriterleri

Ülke	Toplam Polar Madde	Toplam Polimerik Madde	Oksitlenmiş Yağ İçeriği	Asit Sayısı	Dumanlanma Noktası (°C)
Fransa	< 25				
Avusturya	< 27		< 1	< 2,5	> 170
Belçika	< 25	< 10		< 5	> 170
Almanya	< 24		< 0,7		
İspanya	< 25				
Macaristan	< 25				
İtalya	< 25			< 4,5	
Hollanda	< 27	< 16			
Portekiz	< 25				
Türkiye *	< 25				> 170

* 28.08.2007 tarih ve 26627 sayılı “Kızartma Amacıyla Kullanılan Katı Ve Sıvı Yağların Kontrol Kriterleri Tebliği” (Tebliğ No:2007/41).

KAYNAK: Demir 2008.

Kullanılmış kızartma yağındaki TPM miktarı avuç içine sığabilen boyuttaki portatif cihazlarla saniyeler içinde belirlenebilir. Kızartma sırasında yağ, çeşitli etkileşimler sonucu bozduğundan polar moleküllerin miktarında bir artış olur. Bu artış ortamın dielektrik sabitini artırır. Portatif test cihazları da dielektrik sabitindeki değişimden yararlanarak polar madde miktarını belirler. Ölçümler basit, yüksek kesinlikte ve tekrar edilebilirdir (<http://www.libralabs.com/TKT/Information/RefTPMIndustrial.pdf> 2009).

2.1.4. Atık Yağların Çevresel Etkileri

Türk mutfağında hazırlanan yemeklerde genel olarak bol miktarda yağ kullanılmaktadır. Özellikle kızartma işlemleri sırasında önemli miktarda atık yağ oluşmaktadır. Son yıllarda dünyada olduğu gibi ülkemizde de yağda kızartılmış patates ve diğer yiyeceklerin kullanımında önemli artışlar olmuştur (Öztürk 2004). Bu artışın sonucunda oluşan atık bitkisel yağ miktarı da artmıştır. Bazı ülkelerdeki kişi başına düşen yıllık yağ tüketim miktarları çizelge 2.1.4.1.'de görülmektedir.

Çizelge 2.1.4.1. Bazı ülkelerin kişi başına düşen yıllık yağ tüketimleri

Ülke	Toplam yağ tüketimi (kg)	Ayçiçek yağı (kg)	Soya yağı (kg)	Kanola yağı (kg)	Palm yağı (kg)	Pamuk yağı (kg)	Mısırözü yağı (kg)	Zeytin yağı (kg)
ABD	50,9	0,5	26,8	2,2	0,6	1,1	2,3	0,8
AB	50,5	5,5	5,6	8,8	9,1	0,3	0,56	5,3
Türkiye	26,4	6,4	4,01	0,1	4,3	3,1	2,2	1,2
Rusya	20,1	9,3	3,0	0,4	2,3	0,01	0,01	0,03
Mısır	18,4	1,9	44	0,003	8,1	1,03	0,4	0,01
Çin	16,4	0,2	4,2	3,0	2,2	1,0	0,04	0,001

KAYNAK: Bulut 2008.

Bitkisel ve hayvansal yağ atıklarının kalorileri çok yüksektir. Bu atık yağlar, suya, kanalizasyona döküldüğü zaman su yüzeyini kaplar, su sistemine zarar verir, havadan suya oksijen transferini önler, zamanla suda bozunarak sudaki oksijenin tükenmesini hızlandırır. Atık su arıtma tesislerinin işletme maliyetini artırır. Atık su borularına yapışarak boru kesitinin daralmasına ve tıkanmasına neden olur. Kullanılmış yağlar lavaboya döküldüğü zaman dren sistemine sıvanır, kanalizasyon borusu içindeki atıkların yapışmasına ve zamanla borunun daralmasına neden olur. Kanalizasyona dökülen atık yağlar diğer atıkları tutar ve kanalizasyon sisteminin kullanılmaz hale gelmesine sebep olurlar. Böylece atık su arıtma tesislerine zarar verir ve işletme maliyetini artırır. ABD’de yapılan bir araştırmaya göre lavaboya dökülen atık yağların kanalizasyon sistemlerinin %40 oranında tıkanmasına sebep olduğu bildirilmiştir (http://www.albiyobir.org.tr/aby_b.htm 2009).

Kullanılmış bitkisel yağlar atık su kirliliğinin %25’ini oluşturmaktadır. Denize, akarsuya ve göle ulaşan bitkisel atık yağlar, kuşlara, balıklara ve diğer canlı türlerine zarar vermektedir. Yukarıda sıralanan olumsuzluklardan dolayı gelişmiş ülkelerde kullanılmış bitkisel ve hayvansal yağların kanalizasyona, yüzeysel sulara dökülmesi yasaktır.

Bitkisel ve hayvansal yağ atıklarının çöp içerisine atılması veya dökülmesi yasaktır. Çöpe dökülen atık yağlar çöp depolama alanında yangın çıkmasına neden olmaktadır. Çöp depolama alanı işleticileri kızartma yağlarının çöpe karışmamasını isterler. Köpekler, ayılar ve martı gibi bazı kuş türleri bitkisel ve hayvansal yağ atıklarını severler. Bu durum hayvanların bu depolama alanına gelmesine neden olur. Kullanılmış yağlar yer altı sularının da kirlenmesine neden olur. Her ülke için önemli bir içme suyu kaynağı olan yer altı sularını temizlemek oldukça pahalı ve zordur (Öztürk 2006).

Çevre ve Orman Bakanlığı verilerine göre ülkemizde her yıl yaklaşık 1,5 milyon ton bitkisel yağ gıda amacı ile kullanılmaktadır. Özellikle kızartma işlemlerinden sonra 150-350 bin ton civarında kızartmalık atık bitkisel yağ olduğu tahmin edilmektedir. 1 litre yağın 1 milyon litre içme suyunu kirlettiği göz önüne alındığında bu miktarın önemi daha iyi anlaşılacaktır. Ancak bu yağların yaklaşık %1'i toplanabilmektedir. Buna göre atık yağların %99'u gıdaya, yem sanayisine, kozmetik sanayisine, kanalizasyona ya da toprağa gitmektedir. 2005-2008 yılları arasında lisanslı toplayıcılar tarafından toplanan atık yağ miktarları çizelge 2.1.4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1.4.2. Ülkemizde toplanan kızartma yağı miktarları

Yıl	Toplanan Atık Yağ Miktarı (ton)
2005	1380
2006	1680
2007	2450
2008	5850

KAYNAK: Çakır 2009.

Yaklaşık olarak yıllık 350 bin ton civarında oluşan kullanılmış bitkisel ve hayvansal atık yağların kanalizasyona dökülmeyip geri kazanılması ile yılda 350 bin ton biyodizel, 35 bin ton gliserin üretilerek ekonomiye katkı sağlanabilir. Kullanılmış bitkisel ve hayvansal yağların geri kazanılması ile evsel atık sular %25 oranında daha az kirlenmiş olur (Çakır 2009).

2.1.5. Bitkisel Atık Yağlarla İlgili Yasal Düzenlemeler

Bitkisel atık yağlar ekotoksik özelliklerinden dolayı çevreyle uyumlu olarak yönetilmesi gereken atıklar arasında yer almaktadır. Bu nedenle Çevre ve Orman Bakanlığı'nca "Bitkisel Atık Yağların Kontrolü Yönetmeliği" 19.04.2005 tarih ve 25791 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanarak yürürlüğe girmiştir. Bu yönetmeliğin amacı, bitkisel atık yağların üretiminden bertarafına kadar, çevreye zarar verecek şekilde doğrudan veya dolaylı bir biçimde alıcı ortama verilmesinin önlenmesini, bu atık yağların yönetiminde gerekli teknik ve idari standartların oluşturulmasını, geçici depolama, geri kazanım ve bertaraf tesislerinin çevreyle uyumlu yönetimi için buna yönelik prensip, politika ve programların belirlenmesi amacıyla hukuki ve teknik esasların düzenlenmesini sağlamaktır.

Bu yönetmeliğe göre, atık yağların ithali yasaktır. Atık yağların kaynaktan azaltılması ve geri kazanılması esastır. Geri kazanıma uygun olmayan atık yağlar bertaraf edilir. Kullanılmış kızartmalık yağların doğrudan veya dolaylı olarak yemeklik yağlara, ham yağlara, mineral yağlara karıştırılması ve doğrudan yakıt olarak kullanılması yasaktır. Atık yağlar, toplama lisanslı geri kazanım tesisleri ile geçici depolama izni almış toplayıcılar dışında gerçek ve tüzel kişiler tarafından toplanamaz, alınıp satılamaz. Bitkisel atık yağ üreten tesisler, bu yağların toplanması için lisanslı geri kazanım tesisleriyle veya toplayıcılarla yıllık sözleşme yapmakla yükümlüdürler. Bu yağların ücretsiz olarak geri kazanımcıya veya toplayıcılara teslim edilmesi esastır.

Bitkisel atık yağların canlılar üzerindeki kanserojen etkileri dolayısıyla yem ve sabun sanayinde kullanılması ilgili kurumların da işbirliği ile yasaklanmıştır. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın 2005/24 sayılı tebliği ile yem sanayinde kullanılması, Sağlık Bakanlığı'nın 15.02.2006 tarih ve 1697 sayılı yazısı ile de sabun üretiminde kullanılması yasaklanmıştır. Bu nedenle bitkisel atık yağlar sadece biyodizel üretiminde kullanılabilirler.

2.2. BİYODİZEL

2.2.1. Bitkisel Yağların Yakıt Olarak Kullanımı

Yapılan araştırmalar sonucunda bitkisel yağların dizel motorlarda yakıt olarak kullanılmasıyla uzun vadede bazı motor problemlerinin ortaya çıktığı görülmüştür. Motor problemleri, bitkisel yağların viskozitesinin yüksek olması, uçuculuklarının düşük olması ve soğuk akış özelliklerinin kötü olmasından kaynaklanmaktadır (Clark ve ark. 1984). Bu nedenle bitkisel yağların dizel motorlarda yakıt olarak kullanılması için bu sorunların giderilmesi gerekmektedir. Bitkisel yağların yakıt olarak kullanılabilmesi için inceltme (seyreltme), piroliz (termal kraking), mikroemülsiyon ve transesterifikasyon olmak üzere dört yöntem kullanılmaktadır (Ma ve Hanna 1999).

İnceltme, bitkisel yağların uygun bir seyrelticiyle viskozitelerini düşürme yöntemidir. Bu yöntemde kullanılacak bitkisel yağa belirli oranlarda dizel yakıtı katılması tercih edilen bir uygulamadır. Ayrıca bütanol, aseton, etanol, metanol gibi organik çözücüler de inceltme amacıyla kullanılabilir. Ancak bu karışım enjektör tıkanmasına neden olduğu için kullanıma pek uygun değildir (Altun ve Gür 2005).

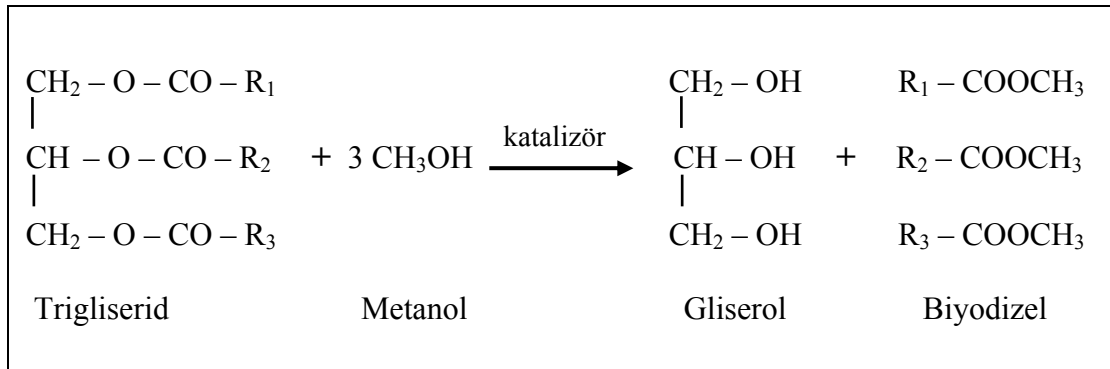
Piroliz, bitkisel yağların ısı etkisiyle alkanlar, alkenler, alkadienler, karboksilik asitler, aromatik bileşikler ve az miktarda gaz bileşik vererek bozunmasıdır (Demirbaş, 2005). Piroliz yöntemi yakıtın viskozitesindeki azalma ve soğuk akış özelliklerinin iyileşmesi nedeniyle avantajlıdır. Ancak yüksek maliyeti, fraksiyonlama basamaklarının uzun olması nedeniyle dezavantajlıdır (Ranganathan ve ark. 2008).

Mikroemülsiyon yönteminde bitkisel yağın metanol, etanol, propanol gibi bir alkolle mikroemülsiyonu oluşturulur. Mikroemülsiyon, birbiriyle karışmayan iki sıvıdan oluşan akışkan mikro yapıların dengedeki kolloidal dağılımıdır. Mikroemülsiyon yöntemiyle elde edilen yakıt düşük viskozite ve yüksek setan sayısı gibi avantajlara sahiptir. Uzun süreli kullanımda enjektörlerde oluşan ateşleme problemleri, karbon birikimi ve tam yanmanın meydana gelmemesi gibi dezavantajlara sahiptir (Ma ve Hanna 1999).

Transesterifikasyon reaksiyonunda bir ester başka bir estere dönüştürülür. Trigliserin yapısındaki üç tane yağ asidi ile esterleşmiş gliserol yerine yağ asitlerinin her biri kısa zincirli bir alkol ile esterleştirilir. Buradan üretilen yağ asidi alkil esterleri motora hiçbir zarar vermeden saf olarak veya petrol kaynaklı dizel yakıtla karıştırılarak kullanılabilir. Ayrıca yan ürün olarak elde edilen gliserol de çeşitli şekillerde değerlendirilebilir.

2.2.2. Biyodizel

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı yağların bir katalizör eşliğinde metanol ile reaksiyonu sonucu meydana gelen yağ asidi metil esterleri biyodizel olarak adlandırılmaktadır. Biyodizel sentezi sırasında gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu şekil 2.2.2.1.'de görülmektedir.



Şekil 2.2.2.1. Trigliserid molekülünün transesterifikasyon reaksiyonu

Transesterifikasyon reaksiyonunda stokiyometrik olarak 1 mol trigliserid için 3 mol metanol kullanılır. Ürün olarak 3 mol yağ asidi metil esterleri (biyodizel) ve 1 mol gliserol oluşur.

Biyodizel yenilenebilir, biyoparçalanabilir ve zehirsiz bir yakıttır (Hama ve ark. 2007). Biyodizel, dizel motorlarda herhangi bir değişiklik yapılmadan doğrudan kullanılabilen bitkisel yağ bazlı tek yakıttır. Biyodizel, petrol kaynaklı dizele benzer özellikleri sayesinde bu yakıtla her oranda karışabilir. Biyodizel-dizel yakıt karışımları motor parçalarının daha uzun süre çalışmasını sağlayacak üstün yağlama özelliğine sahiptirler (Barnwal ve Sharma 2005). Karışımdaki biyodizel yüzdesi BXX şeklinde

ifade edilir. XX yakıt karışımındaki biyodizel oranını göstermektedir. Yakıt karışımı içinde %20 biyodizel, %80 petrol kaynaklı dizel kullanılmışsa karışım B20 olarak adlandırılır. B100 ise saf biyodizeli ifade etmektedir.

2.2.2.1. Biyodizel Üretim Yöntemleri

Transesterifikasyon reaksiyonu asit katalizörlü, baz katalizörlü, süperkritik akışkan metanol kullanılarak veya enzim katalizörlüğünde gerçekleştirilebilir (Enweremadu ve Mbarawa 2009).

Asit katalizörlü yöntemde sülfirik asit (H_2SO_4), sülfonik asit (RSO_3H) ve hidroklorik asit (HCl) sıklıkla kullanılan katalizörlerdir. Asit katalizörlü transesterifikasyon reaksiyonu baz katalizör kullanılanlara göre çok daha yavaştır (Ma ve ark. 1999). Baz katalizörler için katılan katalizör miktarı yağın kütlece % 0,1-1'i oranındayken, asit katalizörlerde bu oran %3-5'e çıkar (Ma ve Hanna 1999). Asitlerin korozyon etkileri, gliserolün ayrılmasındaki güçlükler, motor parçalarının zarar görme ihtimali ve reaksiyonun daha yavaş olması nedeniyle ticari uygulamalarda asit katalizörler tercih edilmemektedir (Freedman ve ark. 1984).

Baz katalizör yönteminde sodyum hidroksit ($NaOH$) veya potasyum hidroksit (KOH) katalizör olarak kullanılır. $NaOH$, KOH 'tan daha ucuz olduğundan ticari uygulamalarda tercih edilmektedir. Yöntem, çok yüksek olmayan sıcaklıkta ($60\text{ }^{\circ}C$), yüksek ester dönüşümü sağlaması, üretim maliyetinin düşük olması ve reaksiyon süresinin kısa olması gibi avantajlara sahiptir. Gliserolün reaksiyon ortamında ayrılmasındaki güçlükler, reaksiyon ortamının serbest yağ asidi ve su içermesi durumunda sabunlaşma görülmesi ve ürün saflaştırılmasının zorlaşması gibi dezavantajlara sahiptir (Fukuda ve ark. 2001, Barnval ve Sharma 2005). Atık bitkisel yağların serbest yağ asidi içeriği daha yüksek olduğunda asidik katalizörlü bir ön iyileştirme sonrasında baz katalizör kullanılabilir (Gerpen 2005).

Süperkritik akışkan metanol kullanılarak biyodizel üretiminde, katalizör kullanılmadan süperkritik akışkan hale getirilmiş metanolla yağ reaksiyona girer.

Süperkritik akışkan metanol ile biyodizel üretimi 240-500 °C sıcaklıkta ve 7-105 MPa basınçta elde edilir. Sıcaklık ve basınçtaki artış reaksiyon hızını da artırır. Bu yöntemde reaksiyon ürünleri kolayca ayrılabilir ve yağın içerdiği serbest yağ asitleri de metil esterlere dönüştürülebilir (Glisic ve Skala 2009). Yüksek enerji sarfiyatı ve 400 °C'nin üzerinde esterlerde termal bozunmaların oluşması yöntemin olumsuz yönleridir (Demirbaş 2006, Glisic ve Skala 2009).

Son yıllarda katalizör olarak lipaz enzimini kullanılarak biyodizel üretimine ilgi artmaktadır. Lipazlar, trigiseridlerin hidroliz reaksiyonunu katalizledikleri gibi esterleşme ve transesterifikasyon reaksiyonlarını da susuz ve sulu ortamda katalizleyebilirler. Bu nedenle biyodizel üretiminde katalizör olarak kullanılabilirler (Shimada ve ark. 2002). Bu yöntem yan ürünlerin oluşmaması, reaksiyon koşullarının ılımlı olması (35-45 °C) ve oluşan ürünlerin kolaylıkla ayrılması gibi önemli avantajlara sahiptir. Enzimatik reaksiyonlar yağın serbest yağ içeriği ve su içeriğinden etkilenmediği için atık bitkisel yağlardan biyodizel üretiminde de kullanılabilir. Bu yöntem diğer yöntemlerin dezavantajlarını büyük ölçüde elimine etmiştir (Wu ve ark. 1999, Kulkarni ve Dalai 2006). Lipaz enzimi 1,5 molardan daha fazla metanol içeren ortamlarda inaktive olduğundan basamaklı transesterifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Metanolün reaksiyon ortamına basamaklı olarak eklenmesinin bu inaktivasyonu ortadan kaldırdığı rapor edilmiştir (Fukuda ve ark. 2001). Ancak, bu yöntem üretim maliyeti açısından diğer biyodizel üretim yöntemlerinden oldukça pahalıdır (Fukuda ve ark. 2001).

Enzimatik biyodizel üretimi hücre içi (intracellular) veya hücre dışı (extracellular) lipaz kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Hücre içi lipaz kullanılan reaksiyonlarda lipaz enzimi sentezi yapabilen mikroorganizmalar kullanılır. Hücre dışı lipaz kullanılan reaksiyonlarda doğrudan mikroorganizmalardan elde edilen lipaz enzimi kullanılır (Marchetti ve ark. 2007). Her iki yöntemde de enzim uygun bir destek maddesine tutturularak defalarca kullanılabilir (Dizge ve Keskinler 2008). Enzimlerin destek maddesine tutturularak tekrar tekrar kullanılması enzimatik biyodizel üretiminin üretim maliyetini diğer yöntemlerle kıyaslanacak kadar olmasa da

düşürmektedir. Çizelge 2.2.2.1.1.'de farklı biyodizel üretim yöntemlerinin karşılaştırılması görülmektedir.

Çizelge 2.2.2.1.1. Farklı biyodizel üretim yöntemlerinin karşılaştırılması

	Baz katalizli	Enzim katalizli	Süperkritik alkol	Asit katalizli
Reaksiyon sıcaklığı (°C)	60 - 70	30 – 40	239 - 385	55 – 80
Ham maddedeki serbest yağ asidi	Sabunlaşma ürünleri	Metil esterler	Esterler	Esterler
Ham maddedeki su	Reaksiyona girişim etkisi	Etki etmez		Reaksiyona girişim etkisi
Metil ester verimi	Normal	Yüksek	İyi	Normal
Gliserol geri kazanımı	Zor	Kolay		Zor
Metil esterlerin saflaştırılması	Tekrarlı yıkama	Yok		Tekrarlı yıkama
Üretim maliyeti	Ucuz	Pahalı	Orta	Ucuz

KAYNAK: Marchetti ve ark. 2007.

2.2.2.2. Atık Bitkisel Yağlardan Biyodizel Üretimi

Biyodizel üretiminde maliyetin en büyük kısmını hammadde olarak kullanılan yağlar oluşturmaktadır. Bu durum biyodizelin alternatif yakıt olarak kullanılmasına önemli bir engeldir. Ayrıca gitgide artan Dünya nüfusuna rağmen yemeklik olarak kullanılabilen kalitede yağların biyodizel üretimi için kullanılması çok da mantıklı değildir. Biyodizel üretiminde atık bitkisel yağların kullanılmasıyla hem bu olumsuz yönlerin önüne geçilmektedir hem de çevreye zarar veren atık yağların bertarafı sağlanmaktadır.

Kullanılan bitkisel yağların kimyasal ve fiziksel özellikleri değişmektedir. Kullanılan yağın viskozitesi, yoğunluğu artmakta, iyot değeri azalmaktadır. Serbest yağ asitleri, su ve yağın oksidasyonu sonucu oluşan çeşitli bileşikler içermektedirler (Watanabe ve ark. 2001). Yüksek miktarda serbest yağ asidi içeren yağ

transesterifikasyon reaksiyonu için bazik katalizör eşliğinde reaksiyona sokulduğunda sabun oluşumu meydana gelmektedir. Serbest yağ asitlerinin varlığı ester dönüşümünü azaltırken, reaksiyon sırasında oluşan sabun, reaksiyon sonunda ester ile gliserinin ayrılmasını zorlaştırır. Bazik katalizör ile transesterifikasyon reaksiyonu için reaksiyon ortamı su içermemelidir. Çünkü ortamda bulunan su, trigliseridler ve oluşan yağ asidi metil esterleri ile hidroliz reaksiyonu verebilir. Bitkisel atık yağ fazla miktarda su ve serbest yağ asidi içeriyorsa önce asidik katalizör kullanılarak serbest yağ asitleri esterleştirilir, daha sonra bazik katalizör kullanılarak transesterifikasyon yapılabilir. Asidik katalizörlü reaksiyonda reaksiyon süresi daha uzundur (Çanakçı ve Özsezen 2005, Felizardo ve ark. 2006).

Atık bitkisel yağlardan biyodizel üretiminde enzim katalizör kullanıldığında, asit ve baz katalizör kullanımında meydana gelen olumsuz etkiler oluşmamaktadır. Atık bitkisel yağın serbest yağ asidi ve su içeriği transesterifikasyon reaksiyonunu etkilememektedir. Yağ asitleri de biyodizele dönüştürülebilmektedir (Watanabe ve ark. 2001).

2.2.2.3. Biyodizel Özellikleri

2.2.2.3.1. Biyodizelin Yakıt Özellikleri

- Biyodizelin alevlenme noktası, petrol kaynaklı dizelden daha yüksektir. Bu özellik, biyodizelin kullanım, taşınma ve depolanmasında daha güvenli bir yakıt olmasını sağlar.
- Biyodizel petrol kaynaklı dizel ile her oranda tam olarak karıştırılabilmektedir. Bu özellik petrol kaynaklı dizelin kalitesini yükseltir. Yanma sonucu oluşan çevreye zararlı gazların emisyon değerlerini düşürür, motordaki yağlanma derecesini artırır ve motor gücünü azaltan birikintileri çözer.
- Yakıtın enjektörden püskürtülmesi ile birlikte kendiliğinden tutuşabilirliğinin göstergesi olan setan sayısı, biyodizelde petrol kaynaklı dizelden daha yüksek olduğu için motor daha az vuruntulu çalışmaktadır. Düşük setan sayılı bir dizel

yakıt doğru noktada tutuşmaz. Bunun sonucunda, kontrolsüz biçimde yanan karışım, gürültüye ve motor içinde hasara neden olur.

- Biyodizelin avantajlarından biri de yağlayıcı özelliğidir. Yağlayıcılığı daha az olan petrol kaynaklı dizelere biyodizel karıştırarak yağlayıcılığı arttırmak mümkündür. Biyodizelin yağlayıcılığını etkileyen ana bileşikler yağ asidi metil esterleri ve monogliseridlerdir.
- Biyodizel, dizel yakıt kullanan motorlarda herhangi bir teknik değişiklik yapılmadan veya küçük değişiklikler yapılarak kullanılabilir.
- Biyodizel, çözücü özelliği nedeniyle dizel yakıtın depolanmasından kaynaklanan yakıt deposu duvarlarındaki ve borulardaki kalıntıları, tortuları çözdüğü için filtrelerin tıkanmamasına yönelik önlemler alınmalıdır.
- Biyodizelin soğuk akış özellikleri petrol kaynaklı dizel yakıtı göre daha kötüdür. Bu nedenle soğuk havalarda motorun ilk çalıştırılması sırasında sorunlara neden olabilir. Ayrıca yüksek miktarda doymuş yağ asidi içeren biyodizeller kış aylarında yakıt filtresi ve yakıt hattı borularının tıkanmasına sebep olabilir. Bu sorun donma noktasını düşürücü katkıları ilave edilerek giderilebilir.
- Biyodizelin diğer bir dezavantajı da oksitlenmeye karşı eğilimli olmasıdır. Havayla temas halindeki biyodizel özellikle yüksek sıcaklıklarda hızla oksitlenmeye başlar.
- Biyodizelin kimyasal yapısı petrol kaynaklı dizel yakıtından farklıdır. Çizelge 2.2.2.3.1.1.'de biyodizel ile petrol kaynaklı dizel yakıtın bazı özellikleri karşılaştırılmıştır (Alptekin ve Çanakçı 2008, http://www.eie.gov.tr/turkce/YEK/biyoenerji/02biyodizel/bd_yakit_ozellik.html, 2009).

Çizelge 2.2.2.3.1.1. Biyodizel ile petrol kaynaklı dizel yakıtın bazı özellikleri

Yakıt Özellikleri	Birim	Biyodizel	Dizel
Kapalı Formül		$C_{19}H_{35,2}O_2$	$C_{12,226}H_{23,29}S_{0,0575}$
Molekül Ağırlığı	g/mol	296	120 - 320
Alt Isıl Değeri			
Kütleli	Mj/kg	37,1	42,7
Hacimsel	Mj/L	32,6	35,5
Özgül Ağırlığı (15 °C)	kg/L	0,87 - 0,88	0,82 - 0,86
Kinematik Viskozite (40 °C)	Mm ² /s	4,3	2,5 - 3,5
Tutuşma Noktası	°C	>100	>55
Kükürt İçeriği	% Kütlece	<0,01	<0,05
Tutuşma Katsayısı	Setan Sayısı	>55	42 - 50
Kül	% Kütlece	<0,01	<0,01
Su Miktarı	Mg/kg	<300	

KAYNAK: http://www.eie.gov.tr/turkce/YEK/biyoenerji/02biyodizel/bd_yakit_ozellik.html 2009.

2.2.2.3.2. Biyodizelin Çevresel Özellikleri

- Biyodizelin çevre açısından en önemli avantajlarından biri yenilenebilir hammaddelerden elde edilerek sürdürülebilir bir enerji potansiyeline sahip olmasıdır.
- Doğada biyolojik olarak hızlı ve kolay bozunabildiği için birikerek toksik etki yaratmamaktadır. Yapılan çalışmalar biyodizelin suda 28 günde %95'inin, dizelin ise %40'ının bozunabildiğini göstermektedir.
- Atık bitkisel ve hayvansal yağlardan üretilbildiği için oluşan atık miktarı azaltılabilir. Bu nedenle biyodizel üretimi, atıklardan enerjinin geri kazanıldığı çevre dostu bir süreçtir.

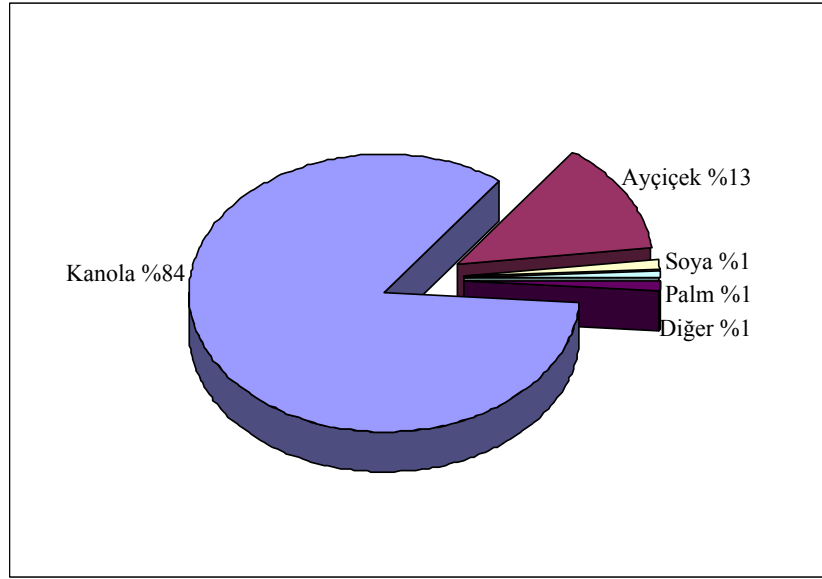
- Biyodizel emisyonları kimyasal olarak petrol kaynaklı dizelden farklıdır. Biyodizel kullanımıyla daha düşük CO, CO₂, SO_x, poliaromatik hidrokarbon (PAH) ve partiküler madde emisyonu oluşması sağlanır. Biyodizel emisyonlarında, potansiyel kanser nedeni olan PAH ve türevlerinden kaynaklanan emisyonlarda % 85 oranında azalma olmaktadır.
- Sera gazları içinde büyük bir orana sahip olan CO₂ dünyanın en önemli çevre sorunlarından biri olan küresel ısınmaya neden olmaktadır. AB tarafından yayınlanan araştırma raporu sonuçlarına göre; 1 litre dizel tüketiminden 3,2 kg/L CO₂ emisyonu meydana gelirken, biyodizel tüketiminde bu miktar 0,7 kg/L seviyesine kadar düşmektedir. CO₂ ile birlikte yanma sonucu açığa çıkan ve sera gazları arasında yer alan CO, NO_x, SO_x emisyonları da sera gazı etkisini hızlandırmakta ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Biyodizel, tarımsal bitkilerden elde edilmesi nedeniyle, biyolojik karbon döngüsü içinde, fotosentez ile CO₂'i dönüştürüp karbon döngüsünü hızlandırdığı için sera etkisini artırıcı yönde etki göstermez.
- Biyodizelin NO_x emisyonları dizel yakıtı göre daha fazladır. Emisyon miktarı motorun biyodizel yakıtı uygunluğuna bağlı olarak değişir. NO_x emisyonlarının %13 oranına kadar arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte biyodizel kükürt içermediğinden NO_x kontrol teknolojileri biyodizel yakıtı kullanan sistemlere uygulanabilir. Petrol kaynaklı dizel yakıtı kükürt içerdiği için NO_x kontrol teknolojilerine uygun değildir.
- Ozon tabakasına olan olumsuz etkiler biyodizel kullanımında dizel yakıtı göre %50 daha azdır. Asit yağmurlarına neden olan kükürt bileşenleri biyodizel yakıtlarda yok denecek kadar azdır. Biyodizel kükürt içermediğinden petrol kaynaklı dizel yerine biyodizelin kullanılması durumunda SO_x emisyonu oluşturmaz, bu gazlardan kaynaklanan asit yağmuru gibi olumsuz çevresel etkilerin oluşmasını önler.
- Biyodizel yapısında oksijen içerdiğinden yanması sonucu ortaya çıkan CO miktarı petrol kaynaklı dizel yakıtların yanması sonucu oluşan CO oranından %48 daha azdır.

- Biyodizelin sudaki canlılara karşı herhangi bir toksik etkisi yoktur. Buna karşılık 1 litre ham petrol 1 milyon litre içme suyunun kirlenmesine neden olmaktadır. (Dizge ve ark. 2005, http://www.eie.gov.tr/turkce/YEK/biyoenenerji/02-biyodizel/bd_cevre.html 2009)

2.2.3. Dünyada Biyodizel

İlk biyodizel üretimi 1983 yılında Avusturya'da yapılmıştır. 1994 yıllarında yaşanan petrol krizi alternatif enerji arayışlarını hızlandırmış ve biyodizel tekrar gündeme taşınmıştır. 1994 yılında Mureck'te ilk endüstriyel üretim tesisi çalışmaya başlamış, bunu Hollanda, İngiltere gibi diğer bazı Avrupa ülkeleri takip etmiştir. Özellikle 2000 yılında ham petrol fiyatlarındaki artış biyodizeli ön plana çıkarmış ve yatırımlar büyük bir hızla artmıştır (http://www.albiyobir.org.tr/dunyada_b.htm 2009).

Biyodizel üretiminde hammadde olarak farklı kaynaklardan elde edilen yağlar kullanılmaktadır. Kullanılan yağların dağılımları şekil 2.2.3.1.'de görülmektedir Buna göre kanola yağı %84 ile en çok kullanılan hammadde olurken, onu ayçiçek yağı %13 ile takip etmektedir. Soya yağı, palm yağı ve diğer hammaddeler ise üretimde %1'lik paya sahiptir. Kanola yağı transesterifikasyonda kullanılan en önemli bitkisel yağ çeşidi olup, yüksek kalitede biyodizel üretimi için çok uygundur. Almanya ve Avusturya kanola kökenli biyodizel üretiminde lider ülkelerdir. Ayçiçek yağı Güney Fransa ve İtalya'da, soya yağı ABD'de, palm yağı Malezya'da biyodizel üretiminde yaygın kullanılmaktadır. ABD, Avusturya ve İngiltere kullanılmış yemeklik yağ kökenli biyodizel üretimini gerçekleştiren lider ülkelerdir. Biyodizel üretimindeki en önemli sorun hammaddenin düzenli ve sürekli sağlanmasıdır (Karaosmanoğlu 2008).



Şekil 2.2.3.1. Biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılan yağlar (Karaosmanoğlu 2008).

Dünyada pek çok ülkede biyodizel üretimi ve kullanımı ile ilgili çalışmalar yoğun olarak sürmektedir. Bitkisel ve hayvansal yağlardan Batı Avrupa'da 44, Doğu Avrupa'da 29, Kuzey Amerika'da 8 adet biyodizel üretim tesisi bulunmaktadır (Öztürk 2004).

AB komisyonu da 2010 yılına kadar yenilebilir enerji pazar payını %12'ye arttırmayı önermektedir. AB komisyonu şu an için %5 biyodizel içeren dizel yakıt kullanılmasını önerirken, bu oranın 2010'da %7,75'e, 2020'de %20'ye ve 2030'da %30'a çıkarılmasını önermektedir. AB bu önerisi ile 2030 yılına kadar dünya ulaşım sektöründe kullanılacak yakıtın %4'ünün biyoyakıt kaynaklarından sağlanmasını planlamaktadır. Çizelge 2.2.3.1.'de AB üyesi ülkelerin biyodizel üretim miktarları görülmektedir (www.ebb-eu.org/stats.php 2009).

Çizelge 2.2.3.1. AB ülkelerinin biyodizel üretim miktarları

Ülke	2005 (1000 ton)	2006 (1000 ton)	2007 (1000 ton)	2008 (1000 ton)
Almanya	1.669	2.662	2.890	2.819
Fransa	492	743	872	1.815
İtalya	396	447	363	595
Avusturya	85	123	267	213
İspanya	73	99	168	207
Danimarka	71	80	85	116
Portekiz	1	91	175	268
İngiltere	51	192	150	192
İsveç	1	13	63	115
Yunanistan	3	42	100	107
Çek Cumhuriyeti	133	107	61	104
Slovakya	78	82	46	146
Litvanya	7	10	26	66
Polonya	100	116	80	275
Diğer Ülkeler	24	83	367	717
Toplam	3.184	4.890	5.713	7.755

KAYNAK: <http://www.ebb-eu.org/stats.php> 2009.

2.2.4. Türkiye’de Biyodizel

Türkiye, biyodizelle ilgili ilk çalışmasını AB’den önce 1934 yılında “Tarım Traktörlerinde Bitkisel Yağın Yakıt Olarak Kullanılması” adı altında Atatürk Orman Çiftliği’nde yapmıştır (http://www.albiyobir.org.tr/trde_b.htm 2009).

Biyodizel Türkiye’de mevcut olanaklarla uygulamaya alınabilecek en önemli alternatif yakıt seçeneklerinden biridir. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de kara taşımacılığının önemli bölümünde ve deniz taşımacılığında dizel motorlu taşıtlar kullanılmaktadır. Ayrıca endüstride jeneratör yakıtı olarak da önemli miktarda dizel yakıt kullanılmaktadır. Petrol tüketimimizin ancak %15’i yerli üretimle sağlanabilmektedir. Petrol ürünleri tüketimi içinde ise, en büyük pay %34 değeri ile

dizel yakıta aittir. Biyodizel kullanımının artması ile petrol tüketiminde ve egzoz gazı kirliliğinde önemli miktarda azalma gerçekleşecektir.

Biyodizel üretmek ve kullanmak için Türkiye yeterli ve uygun alt yapıya sahiptir. Türkiye'de kanola, ayçiçek, soya, aspir gibi yağlı tohum bitkilerinin enerji amaçlı tarımı mümkündür (Sarıyıldız 2005). Ayrıca büyük bir atık yağ potansiyeline sahip olan ülkemizde bu yağlar da biyodizel üretiminde değerlendirilebilir.

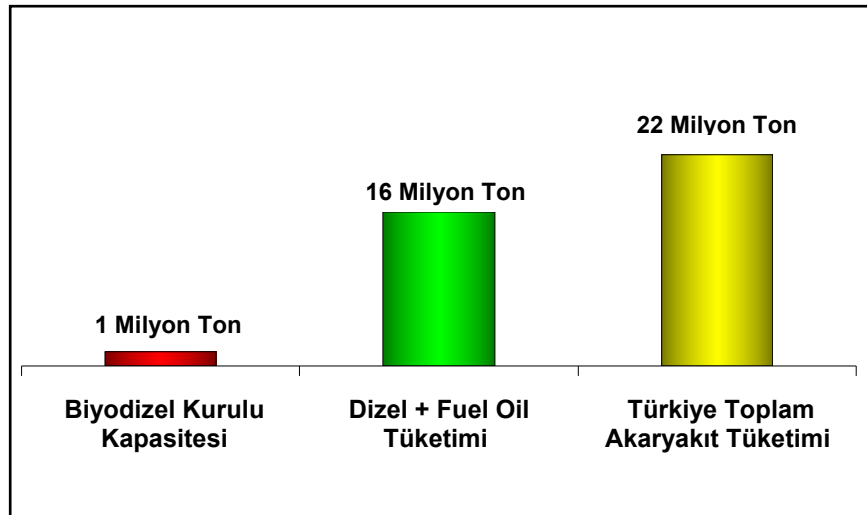
Türkiye’de biyodizel dünyadaki gelişmelerin etkisinde 2000’li yılların başında gündeme geldi. Üniversitelerdeki çalışmalar hızla gelişti. 2001 yılında Sanayi ve Ticaret Bakanlığı’nda “Biyodizel Çalışma Grubu” oluşturuldu. İlk kez biyodizel ve ismi 04.12.2003 tarihinde 5015 Sayılı Petrol Piyasası Kanunu’nda harmanlanan ürünler arasında yer aldı. Kanunda biyodizelin özel tüketim vergisi (ÖTV) dışında tutulması nedeniyle yatırımlar dünyaya paralel biçimde hızla arttı. 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.

Enerji piyasası düzenleme kurulu (EPDK) 05.01.2006 tarihli “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 tanımış, “Otobiyodizelin üretimi, Yurtdışı ve Yurtiçi Kaynaklardan Temini ve Piyasaya Arzına İlişkin Teknik Düzenleme” Tebliği ile otobiyodizelde TS EN 14214 standardı aynen kabul edilmiştir. Yakıt biyodizelin üretimi de aynı tebliğ ile TS EN 14213’ü maksimum iyot sayısı 120’den 140’a çıkararak kabul etmiştir. Bu tebliğ ile yakıt biyodizelin kırmızıyla işaretlenerek piyasaya sunulması kararlaştırılmıştır. Ayrıca 05.01.2006 tarih ve 630/26 sayılı kurul kararı ile biyodizel üreticileri biyodizel işleme lisansı kapsamına alınmıştır.

Petrol Piyasasında haksız rekabet oluşturduğu gerekçesiyle 30.03.2006 tarihinde 5479 Sayılı Gelir Vergisi Kanunu'nda değişiklik yapılarak otobiyodizele litrede 0,6498 TL ÖTV getirilmiştir. 08.12.2006 tarihinde 26370 Sayılı Resmi Gazetede yayınlanan 05.06.2007 tarihli Bakanlar Kurulu Kararı ile 4760 sayılı Özel Tüketim Vergisi Kanununa Ekli 1 Sayılı listede yer alan mallarda uygulanan özel tüketim vergisi ile yerli tarım ürünlerinden elde edilen otobiyodizelin motorine %2 oranında harmanlanması ÖTV'den muaf tutulmuştur.

Bütün bu düzenlemeler sonunda firmalar biyodizel üretmek için EPDK'dan biyodizel işleme lisansı almak, standartlara uygun üretim yapmak ve petrol piyasası kanunu ve ikincil mevzuatına uygun dağıtım şirketleri üzerinden ulusal markerle işaretleyerek satmak durumundadır (http://www.albiyobir.org.tr/trde_b.htm, 2009).

Türkiye'de bugün toplam bir milyon ton kapasiteli biyodizel üretim tesisi kurulu bulunmaktadır. Bu verilerle Türkiye, kurulu biyodizel kapasitesi açısından Almanya'dan sonra dünyada ikinci sırada yer almaktadır. Şekil 2.2.4.1.'de Türkiye'nin akaryakıt tüketimi ve biyodizel kurulu kapasitesi görülmektedir. (Afacan, 2009)



Şekil 2.2.4.1. Türkiye'de akaryakıt tüketimi ve biyodizel kurulu kapasitesi karşılaştırması (Afacan 2009).

Türkiye’de 150’ye yakın biyodizel üretimi yapabilecek tesis bulunmasına rağmen EPDK verilerine göre 2009 yılında 27 ile dağılmış durumda 57 adet lisans almış biyodizel üretim tesisi bulunmaktadır (<http://www.epdk.gov.tr/lisans/petrol/bayilik/isleme.asp> 2009). Ancak biyodizel petrol kaynaklı dizel ile fiyat rekabeti yapamadığı için üretilen biyodizel miktarı gittikçe azalmaktadır. Çizelge 2.2.4.1.’de 2005-2007 yılları arasında Türkiye’de üretilen biyodizel miktarları görülmektedir (Afacan 2009).

Çizelge 2.2.4.1. Türkiye’de üretilen biyodizel miktarları

Yıl	Üretilen biyodizel miktarı (ton)
2005	90.000
2006	45.000
2007	20.000

KAYNAK: Afacan 2009.

2.3. ENZİMLER

2.3.1. Enzimlerin Yapısı

Enzimler, hücrelerde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısında moleküllerdir. Enzimler diğer doğal proteinlerde olduğu gibi peptid bağlarıyla birbirine bağlanmış amino asitlerden oluşur. Enzimlerin en önemli özellikleri katalitik güçleri ve spesifiklikleridir. Kataliz enzimin özel bölgesi olan aktif merkezde gerçekleşir. Enzimler, reaksiyonun denge sabitini değiştirmeden reaksiyon hızını arttırmaktadırlar. Organizmalardaki organik moleküllerin yapımı ve yıkımı, kas hareketleri, solunum, sindirim gibi fizyolojik olaylar enzimlerin yardımıyla yürütülmektedir (Wiseman 1986, Telefoncu 1997).

Enzimler protein yapısında olmasına rağmen, pek çok durumda bu protein yapısına protein olmayan daha küçük yapıları organik veya anorganik moleküllerin bağlanmasıyla oluşmuş protein yapısı gözlenir. Bu yapıda enzimin protein kısmı apoenzim, protein olmayan kısmı ise koenzim olarak adlandırılmaktadır. Apoenzim ve koenzimin birleşmesiyle meydana gelen yapıya haloenzim adı verilir. Koenzimler enzimatik reaksiyonlarda elektron alışverişi sağlarlar. Enzimin spesifik olarak etki ettiği maddeye substrat denir. Koenzim enzimin etki edeceği kimyasal reaksiyonu, apoenzim ise hangi substrata etki edeceğini tayin eder (Tekman ve Öner 1994).

Enzimlerin protein zincirlerinin katlanmasıyla oluşan üç boyutlu yapılarında sadece o enzime özgü substrat moleküllerinin bağlanabildiği katalizden sorumlu bir bölge vardır. Özel bir geometrisi olan bu bölgeye enzimin aktif merkezi denir. Bu nedenle enzimler spesifikliğı çok yüksek olan katalizörlerdir. Enzimlerin aktif merkezinde genellikle lizin, histidin, sistein, serin ve tirozin aminoasitleri yer alır.

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

substrattan uzakta olduğu dönemde substrata benzerlik göstermez. Enzim substrata yaklaştışça enzimin aktif merkezi substratın şeklini alır.

2.3.2. Enzimlerin Özellikleri

Enzimler de diğer katalizörler gibi katalizledikleri reaksiyonun başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisi düşürerek reaksiyonu hızlandırırlar. Enzimler reaksiyonun hızını arttırırken basınç, sıcaklık ve pH açısından oldukça ılımlı koşullarda çalışmayı sağlarlar. Ayrıca en ucuz, en kolay bulunabilen çözücü olan su kullanılarak çalışmak enzimler ile mümkün olmaktadır.

Enzimler hücre içinde üretilmelerine rağmen hücre dışında da etkinliklerini sürdürürler. Reaksiyonun türüne ve substrata oldukça spesifiktirler. Bu nedenle katalizledikleri reaksiyonlar yan ürün oluşmaz ve yüksek verimle gerçekteşir (Bingöl 1977). Enzimlerin kimyasal katalizörlere olan bu üstünlükleri son yıllarda endüstride kullanımlarının yaygınlaşmasını sağlamıştır. Günümüzde enzimler en fazla ilaç ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadırlar.

2.3.3. Lipaz Enzimi

Lipazlar (E.C.3.1.1.3.) hidrolazlar sınıfında olup triaçilgliserol ester hidrolazlar olarak da adlandırılırlar (Villeneuve ve ark. 2000). Lipazlar hidrolazlar sınıfında olmalarına rağmen yağ asidi esterlerinin hem hidrolizini hem de sentezini katalizleyebilirler. Lipazlar spesifik olarak katalizör görevini esterifikasyon ve hidroliz reaksiyonları haricinde asidoliz ve alkoliz reaksiyonlarında da gösterirler (Pandey ve ark. 1999).

2.3.3.1. Lipaz Enziminin Kullanım Alanları

Lipaz, sentetik organik kimyada karboksilli asitlerin esterlerinin hidrolizinde katalizör olarak yaygın olarak kullanılan ve endüstride önemli yeri olan çok yönlü bir enzimdir (Manfred 2002). Farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar gıda, deterjan, ilaç,

biyosensör, kozmetik ve parfümeri endüstrisi gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar (Hasan ve ark. 2006). Endüstride çok farklı proseslerde uygulanabilmelerinden dolayı özellikle mikrobiyal lipazlar için talep sürekli artmaktadır. Son 10-15 yılda mikrobiyal lipazların sulu ve susuz ortamda biyokatalitik potansiyellerinin anlaşılmasıyla endüstride son derece önemli hale gelmişlerdir.

Lipazlar, trigliseridleri digliseridlere, monogliseridlere, gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini katalizlerler. Belirli koşullarda ters yönde reaksiyonu da katalizleyerek yağ asitlerinden esterlerin oluşumunu sağlarlar. Yağlardan biyodizel sentezinde reaksiyon ortamında serbest yağ asitleri ve su varlığının lipazın çalışma mekanizması üzerine olumsuz etkisi olmaması ve reaksiyonun düşük sıcaklıklarda gerçekleşmesi yöntemin önemli avantajlarıdır (Hama ve ark. 2009).

2.3.3.2. Lipaz Enziminin Özellikleri

Lipaz enzimleri bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilebilmektedirler. Bunlardan en geniş uygulama alanı bulan diğerlerine göre daha kolay ve hızlı yetiştirildiği için mikroorganizmalardan elde edilen lipazlardır. Lipazlar birkaç tür reaksiyonu katalizleyebilir (Villeneuve ve ark. 2000). Lipazların katalizlediği reaksiyonlar çizelge 2.3.3.2.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3.3.2.1. Lipaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

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

Lipaz enzimleri pH 4 ile pH 8 aralığında çalışmaya uygun enzimlerdir ama en yüksek stabiliteyi pH 6,0 ile pH 7,5 arasında göstermektedirler. Ancak bazı mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar bu pH aralıklarının dışında da aktivite gösterebilmektedirler (Rajakumara ve ark. 2008).

Lipazlar trigliserid molekülündeki yağ asitlerinin yerlerine ya da yağ asidi türüne spesifik olabilir. Yer spesifitesi gösteren lipazlar trigliseritteki 1,3 veya 2 konumundaki açıl gruplarına spesifik olabilir. Yağ asidi spesifitesi gösteren lipazlar ise sadece bazı yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarına etki ederler.

2.3.4. Enzim İmmobilizasyonu

Endüstriyel uygulamalar çoğunlukla çözelti ortamında gerçekleştirildiği için katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması ve yeniden kullanılması mümkün değildir. Serbest enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığı için reaksiyonun kontrolü çok zordur. Reaksiyonun istenilen anda durdurabilmesi için inhibitör eklenebilir. Ancak bu durumda da serbest enzim tarafında kirletilmiş olan reaksiyon ortamına yeni bir kirletici eklenmiş olur. Ayrıca enzim tekrar kullanılamayacağından ve inhibitör sarfiyatından dolayı maliyette artış olacaktır. Ürünlerin bu kirleticilerden ayrılması da maliyeti arttırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı serbest enzimler sürekli üretim sistemlerinde kullanılmaya uygun değildirler. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için enzimlerin immobilize edilerek kullanımları giderek daha fazla önem kazanmaya başlamıştır.

Enzim immobilizasyonu, enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak bir destek maddesine fiziksel veya kimyasal olarak tutturulmasıdır. Kelime anlamı hareketsizleştirme olan immobilizasyon, tutuklanmış enzim moleküllerinin sürekli bir işlemde kullanılmasına imkân verir. Böylece enzimlerin tek kullanım yerine defalarca kullanılmasına olanak sağlanarak ekonomik açıdan büyük bir avantaj elde edilir (Öztürk 2001).

2.3.4.1. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları

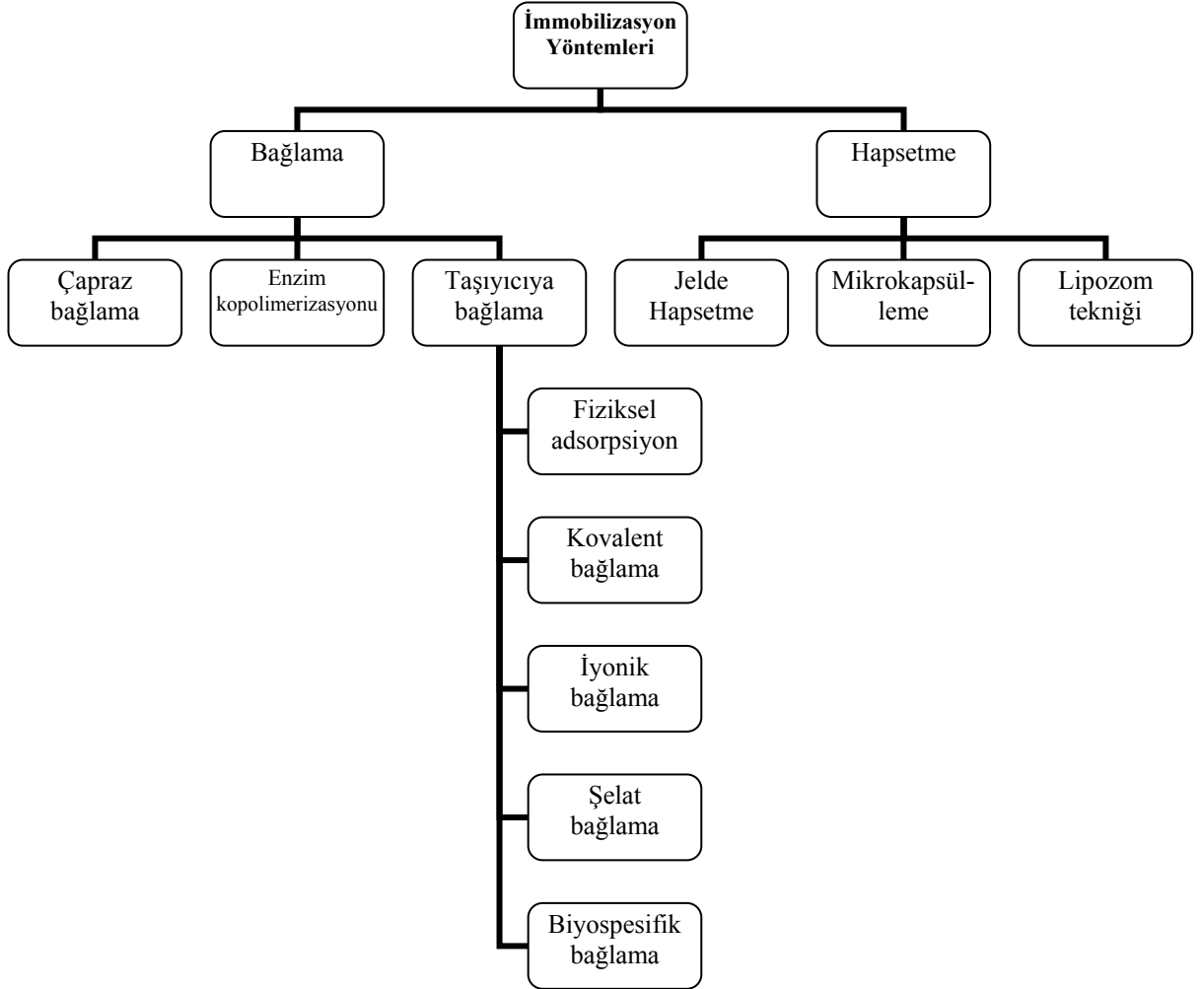
Enzim immobilizasyonu, enzimlerin stabilitesinin artmasını ve daha küçük bir hacimde daha derişik enzim bulunmasını sağlar. Bu da daha küçük reaktörlerden daha fazla ürün sağlanmasına imkân verir. İmmobilize enzimler serbest enzimlere göre pH değişimlerine ve sıcaklığa karşı daha dayanıklı yapıdadırlar. Enzimlerin immobilize edilerek kullanılmasıyla sağlanan avantajlar aşağıda sıralanmıştır.

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

Bununla birlikte enzimlerin immobilize edilmesi ile enzim aktifliğinde azalma ve destek maddesinden kaynaklanan maliyet artışı gibi dezavantajlar da oluşabilmektedir. Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan destek maddesi ve seçilen immobilizasyon yöntemi çok önemlidir. İmmobilize enzimin özellikleri, enzime, destek maddesine ve immobilizasyon yöntemine bağlıdır.

2.3.4.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler bağlama ve hapsetme olarak ikiye ayrılır. Bunlar da kendi içinde üçe ayrılır. İmmobilizasyon yöntemleri şekil 2.3.4.2.1.'de görülmektedir.

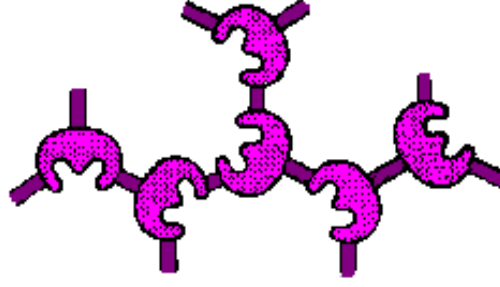


Şekil 2.3.4.2.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Telefoncu 1997).

2.3.4.2.1. Çapraz Bağlama

Bu yöntem iki yada daha fazla fonksiyonel grup taşıyan enzim moleküllerinin birbirlerine çapraz bağlanarak suda çözünmeyen bir kompleks oluşturması temeline dayanmaktadır. Enzimleri birbirine bağlamak için glutaraldehit, diazobenzidin gibi maddeler kullanılır. Bu yöntemin dezavantajları; çapraz bağlanma reaksiyonunun

kontrolünün zor olması, fazla miktarda enzime ihtiyaç olması ve bağlanma sırasında enzimin aktivitesini kaybetme olasılığının fazla olmasıdır. Çapraz bağlama reaksiyonu ılımlı koşullarda gerçekleşmediği için enzimde genellikle önemli aktivite kaybı söz konusudur (Hilal ve ark. 2004). Şekil 2.3.4.2.1.1.'de çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.3.4.2.1.1. Çapraz bağlamayla enzim immobilizasyonu

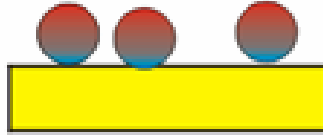
2.3.4.2.2. Enzim Kopolimerizasyonu

Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak destek maddesine bağlanmaktadır. Yöntem polimer destek maddesine enzim tutuklanmasına benzemekle birlikte enzim kaçışının önlenmesi gibi bir üstünlüğü vardır.

2.3.4.2.3. Taşıyıcıya Bağlama

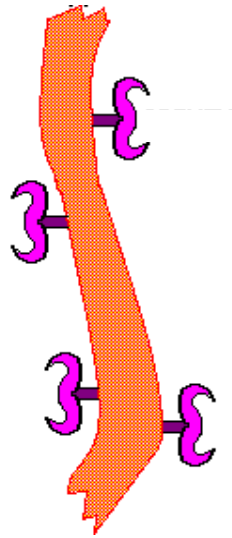
Fiziksel adsorpsiyon; enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski, en basit yöntemdir. Taşıyıcı ile enzim arasında tersinir yüzey etkileşimleri ile oluşur. Moleküller arasında van der Waals, iyonik ve hidrojen bağı gibi güçler etkindir. Yöntem, suda çözünmeyen, adsorpsiyon özelliklerine sahip bir taşıyıcı ile enzim çözeltisinin uygun koşullarda karıştırılması ve tutunmayan enzimin yıkanarak uzaklaştırılması şeklinde uygulanır. Yöntemin, basit, hızlı ve ucuz olması, taşıyıcının tekrar tekrar kullanılabilmesi gibi avantajları vardır. Optimum koşulların belirlenmesindeki zorluk, enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma olmaması durumunda enzimin serbest

hale geçerek reaksiyon ortamında ürünleri kirletmesi gibi dezavantajları vardır (Öztürk ve ark. 2007). Şekil 2.3.4.2.3.1.'de fiziksel adsorpsiyon ile enzim immobilizasyonu gösterilmiştir.



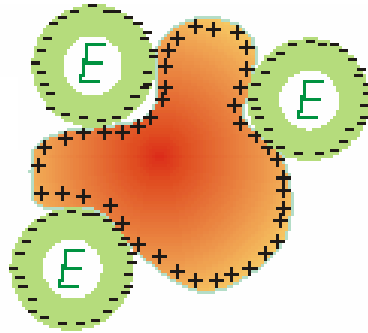
Şekil 2.3.4.2.3.1. Fiziksel adsorpsiyonla enzim immobilizasyonu

Kovalent bağlama; bu yöntem enzim ile destek maddesi arasında kovalent bir bağ oluşumuna dayanır. Destek maddesi yüzeyindeki fonksiyonel gruplarla enzim yüzeyindeki aminoasitlere ait fonksiyonel gruplar arasında kovalent bağ oluşur. Kullanılacak destek maddesi fonksiyonel grup içermiyorsa yardımcı bir reaktifle aktive edilmesi gerekir. Kovalent bağlanmada en önemli nokta bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olması ve bağlanma sırasında sterik engellemeler nedeniyle bu grupların pasifleştirilmemesidir. Bu yöntemde destek maddesi tekrar kullanılamaz (Huang ve ark. 2008). Şekil 2.3.4.2.3.2.'de kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.3.4.2.3.2. Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu

İyonik bağlama; iyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen destek maddelerine enzimin iyonik olarak bağlanması temeline dayanan bir yöntemdir. İyonik bağlanma ile enzimin destek maddesine bağlanması adsorpsiyondan daha güçlü bir bağlanmadır. İyonik bağlama ılıman koşullarda gerçekleştiği için enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde bir değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığı için enzim kaçıışı söz konusudur (Taylor 1991). Şekil 2.3.4.2.3.3.'de iyonik bağlama ile enzim immobilizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.3.4.2.3.3. İyonik bağlama ile enzim immobilizasyonu

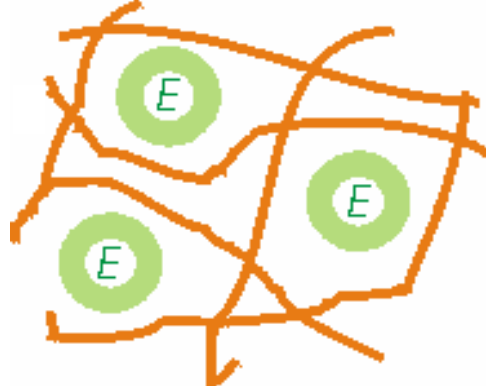
Şelat bağlama; bu yöntemin esası destek maddesinin yüzeyini aktifleştirmek ve enzimin destek maddesine bağlanmasını sağlamak amacıyla titanyum (III), titanyum (IV), zirkonyum (IV) gibi geçiş metali iyonları kullanılmasına dayanır. Bu iyonlar destek maddesi ile enzim arasında köprü görevi görür (Taylor 1991).

Biyospesifik bağlama; bu yöntemde enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimlerden yararlanılarak immobilizasyon gerçekleştirilir (Telefoncu 1997).

2.3.4.2.4. Jelde Hapsetme

Çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve

böylece çözeltiye geçmeleri engellenmektedir (Noureddini ve ark. 2005). Şekil 2.3.4.2.4.1.'de jelde hapsetme ile enzim immobilizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.3.4.2.4.1. Jelde hapsetme ile enzim immobilizasyonu

2.3.4.2.5. Mikrokapsülleme

Bu yöntemde çapı 1-100 µm olan yarı geçirgen zarlar kullanılır. Enzim molekülleri bu membran içinde tutuklanır. Bu yarı geçirgen zarların gözenekleri substrat ve ürünün geçişine izin verecek, ancak hapsedilmiş enzimin çıkışına izin vermeyecek büyüklükte olmalıdır. Mekanik dayanıklılığı azdır ve uygulanması sırasında enzim inaktive olabilir. Ayrıca enzimin membran içinden kaçma olasılığı fazladır. En büyük avantajı oldukça küçük bir hacimde enzim ile substratın etkileşme alanının göreceli olarak yüksek olmasıdır (Christensen ve ark. 2003). Şekil 2.3.4.2.5.1.'de mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.3.4.2.5.1. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu

2.3.4.2.6. Lipozom Tekniği

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

2.3.4.3. İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Maddeleri

Enzim immobilizasyonunda doğal ve sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan bazı destek maddeleri çizelge 2.3.4.3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.3.4.3.1. Enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan destek maddeleri

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

KAYNAK: Aksoy 2003.

İmmobilize enzim sistemlerinin yüksek performans göstermesi için destek maddesinin seçimi çok önemlidir. Seçilen destek maddesinin kararlılık, düşük maliyet ve dayanıklılık gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (Vaidya ve ark. 2008).

İmmobilizasyonun yüksek verimle gerçekleşmesi ve kullanıma uygun olması için kullanılacak destek maddesinin sahip olması özellikler çizelge 2.3.4.3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.3.4.3.2. İmmobilizasyon destek maddesinde aranan özellikler

- Mekanik, kimyasal ve ısısal dayanıklılık
- Gözenekli yapı, uygun partikül formu
- Suda çözünmeme
- Ekonomiklik
- Hidrofilik karakter
- Zehirsizlik
- Tekrar kullanıma uygun olması
- Yüksek immobilizasyon kapasitesi
- pH değerini değiştirmemesi
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik
- Ürün inhibisyonunu azaltması
- Kovalent bağlanmada kullanılan taşıyıcılar ılıman koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımaktadır.

KAYNAK: Mateo ve ark. 2007, Aksoy 2003.

Bu özelliklerin tamamını sağlayan bir destek maddesi bulunmamaktadır. Bu nedenle kullanım amacına ve immobilizasyon yöntemine en uygun özellikleri içeren destek maddeleri seçilerek kullanılmakta ve yeni destek maddeleri geliştirilmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

3.1.1.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler çizelge 3.1.1.1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Stiren	Acros	22053
Divinil benzen	Merck	803598
Glutaraldehit (%25)	Merck	820603
Potasyum persülfat	Fluka	60487
Span 80	Fluka	85548
Kitosan	Aldrich	419419
Lipaz enzimi (Lipozyme TL 100L)	Novozymes	LAP40012
Lipaz enzimi (Novozyme 735)	Novozymes	LDN00026
Bovine serum albumine	Sigma	A7906
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck	115444
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma-Aldrich	F9252
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck	104873
Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck	105104
<i>p</i> -nitrofenilpalmitat	Fluka	76166
<i>p</i> -nitrofenol	Fluka	1048
Gum arabic	Sigma	G9752
Triton X-100	Sigma	T9284

Çizelge 3.1.1.1.1. (Devam) Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Metanol	Merck	106007
Etanol	Riedel-de Haen	32221
2-propanol	Merck	109634
t-bütanol	Merck	822264
İzobütil metil keton	Merck	106146
Sikloheksan	Merck	109666
Hekzan	Merck	104368
Heptan	Riedel-de Haen	15677
Metil heptadekanoat	Fluka	51635
Wijs reagenti	Riedel-de Haen	35071
Potasyum hidroksit	Sigma-Aldrich	60370
Potasyum iyodür	Merck	105043
Potasyum iyodat	Sigma-Aldrich	207977
Sodyum tiyosülfat	Merck	106513
Sodyum hidroksit	Riedel-de Haen	06203
Sodyum karbonat	Merck	106393
Sodyum-potasyum tartarat	Merck	108087
Bakır sülfat	Merck	102791
TLC plaka	Merck	105554
Dietileter	Merck	100921
Benzoik asit	Merck	100136
Asetik asit (%98)	Merck	100056
Sülfirik asit	Merck	100713
Fosforik asit	Merck	100557

3.1.1.2. Çözeltiler

- 1 mol/L K_2HPO_4 çözeltisi: 17,4100 g K_2HPO_4 tartılarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 1 mol/L KH_2PO_4 çözeltisi: 13,6100 g KH_2PO_4 tartılarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 10 mg/mL metil heptadekanoat çözeltisi: 0,5000 mg metil heptadekanoat tartılıp heptan ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.
- Poliglutaraldehit çözeltisi: 10 mL %25'lik glutaraldehit alınarak saf su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. 3 mol/L NaOH çözeltisi çözeltisi kullanılarak pH'ı 10,5'e ayarlanmış ve manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırılmıştır.
- 20 mM para-nitrofenil palmitat (pNPP) çözeltisi: 0,1888 g pNPP tartılarak 2-propanol ile 25 mL'ye tamamlanmıştır.
- 10 mM para-nitrofenol (pNP) çözeltisi: 0,1391 g pNP tartılarak 10 mL 2-propanolde çözülüp, pH 7 fosfat tamponuyla 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- Stok bovine serum albumin (BSA) çözeltisi: 0,5000 g BSA, pH 7,0 fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlanarak 10000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik stok çözelti hazırlanmıştır.
- 0,1 mol/L $Na_2S_2O_3$ çözeltisi: 12,4093 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ tartılıp, saf suyla 500 mL'ye tamamlanmıştır.
- 100 g/L KI çözeltisi: 10 g KI tartılıp saf suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Aletler

Çalışmada kullanılan araç-gereçler çizelge 3.1.2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.2.1. Çalışmada kullanılan araç-gereçler

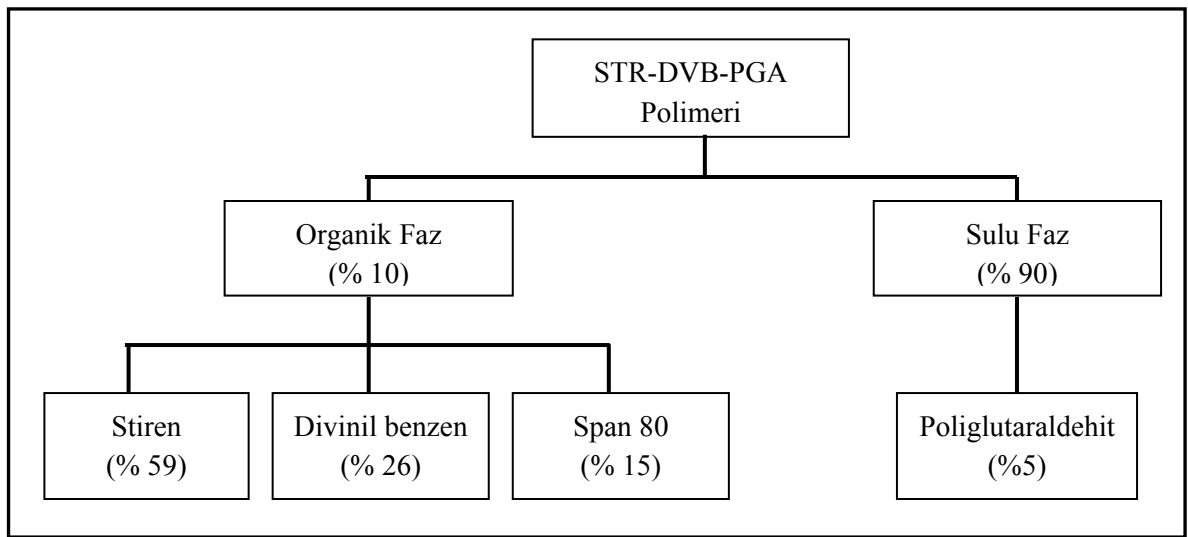
Araç-Gereç	Marka	Model
Gaz kromatografi kütle spektrometresi (GC-MS)	Shimadzu	QP5000
UV-görünür bölge spektrofotometresi	Ati-Unicam	UV2
Fourier dönüşümlü infrared spektrometresi (FTIR)	Thermo Nicolet	6700
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	Carl Zeiss	EVO 40
Etüv	Nüve	EN 500
Peristaltik pompa	Watson Marlow	323S
Isıtcılı manyetik karıştırıcı	Velp	ARE
pH-metre	Sartorius	PP-15
Analitik terazi	Gec Avery	VA304
Saf su cihazı	Nüve	NS112
Ayarlanabilir otomatik mikropipet (500-5000 µL)	Eppendorf	Research
Ayarlanabilir otomatik mikropipet (100-1000 µL)	Eppendorf	Research

3.2. YÖNTEM

3.2.1. STR-DVB-PGA Polimer Destek Maddesinin Hazırlanması

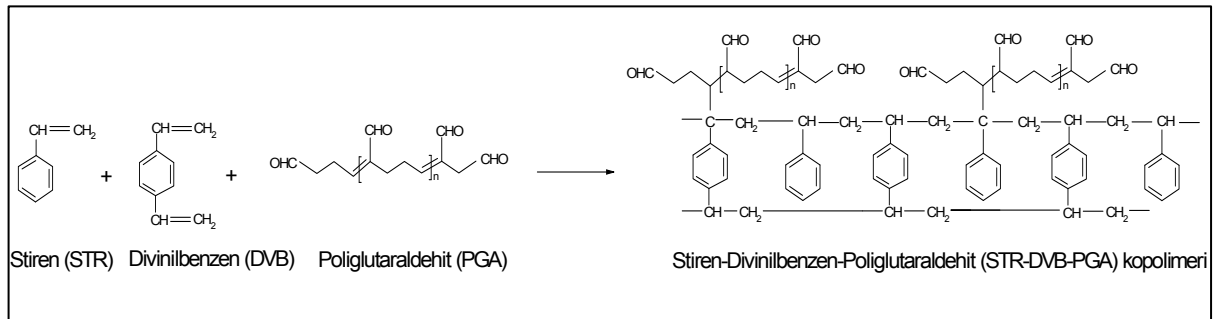
Deneyel çalışmada kullanılan stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) kopolimeri %90 su fazı ve %10 organik faz olmak üzere iki fazdan oluşmaktadır. Polimerik destek maddesinin hazırlanması için öncelikle glutaraldehitten poliglutaraldehit sentezlenmelidir. Bunun için 10 mL %25'lik glutaraldehit alınarak saf su ile 50 mL'ye tamamlanmış, pH'sı 3 mol/L NaOH çözeltisi kullanılarak 10,5'a ayarlanmış ve manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırılmıştır. Aldol kondenzasyonu polimerizasyonu sonucu poliglutaraldehit elde edilmiştir. Bu işlemden sonra hazırlanan poliglutaraldehit çözeltisinden 45 mL alınarak, üzerine radikalik polimerizasyonu

başlatmak için gerekli olan başlatıcı potasyum peroksidosülfattan 0,7000 g koyularak çözülmüştür. Bu çözelti, hacimce %59 stiren, %26 divinilbenzen ve %15 span 80 içeren 5 mL'lik organik faza ilave edilip falkon tüpte kuvvetlice çalkalanmıştır. Hazırlanan çözeltinin hacimce bileşimi şekil 3.2.1.1.'de gösterilmiştir. Çözeltinin kıvamı iyice koyulaştıktan sonra falkon tüp 80 °C'deki etüve yerleştirilerek polimerleşmenin tamamlanması için 3 saat bekletilmiştir. Süre sonunda blok haldeki polimer falkon tüpten çıkartılarak 60 °C'deki etüvde 24 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra kullanıma hazır hale gelen polimer, parçalanıp elenerek 16-30 mesh (0,6-1,4 mm) boyutları arasındaki tanecikler immobilizasyon için kullanılmıştır.



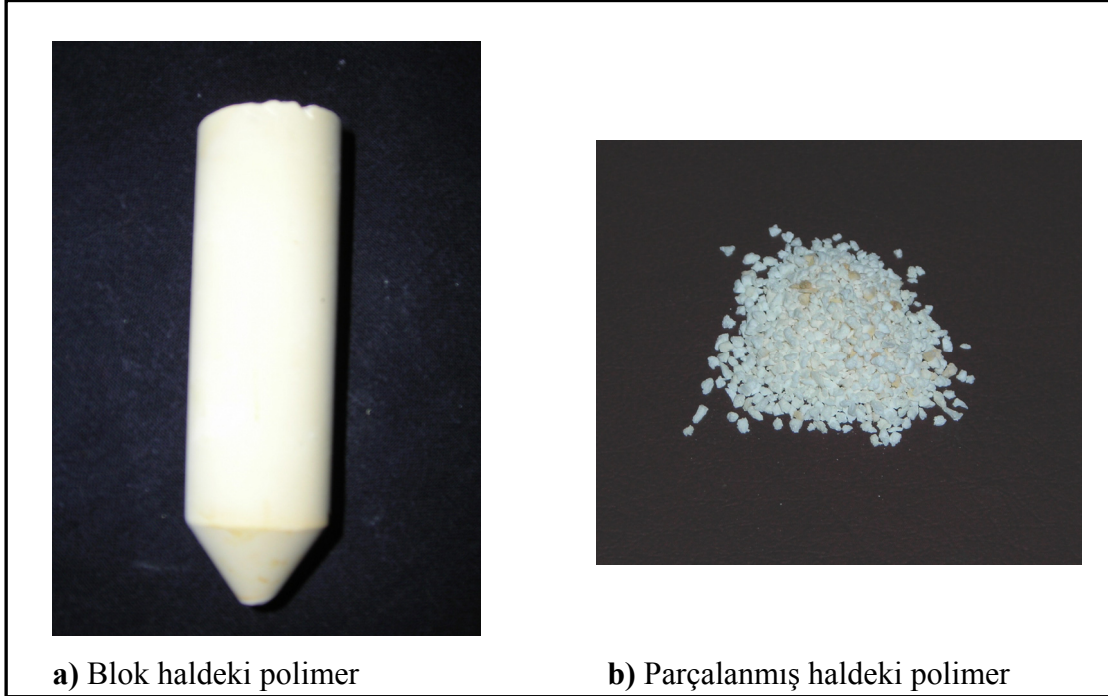
Şekil 3.2.1.1. Stiren-divinil benzen-poliglutaraldehit polimerinin bileşimi

Şekil 3.2.1.2.'de stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit polimerinin polimerizasyon reaksiyonu gösterilmiştir.



Şekil 3.2.1.2. Stiren-divinil benzen-poliglutaraldehit polimerinin polimerizasyon reaksiyonu

Şekil 3.2.1.3.'de blok halde ve immobilizasyon için parçalanıp, elenmiş halde stiren-divinil benzen-poliglutaraldehit polimeri görülmektedir.



Şekil 3.2.1.3. Stiren-divinil benzen-poliglutaraldehit polimerinin fotoğrafı

3.2.2. STR-DVB-PGA Polimer Destek Maddesinin Lipaz Enziminin İmmobilizasyonuna Hazırlanması

Deney düzeneğinde 10 cm uzunlukta, iç çapı 2,3 cm ve dış çapı 2,8 cm olan, 42 mL iç hacme sahip paslanmaz çelikten üretilmiş reaktör kullanılmıştır. Reaktör, parçalanıp elenen 3,3000 g STR-DVB-PGA polimeri ile tamamen doldurulmuştur. İmmobilizasyona başlamadan önce peristaltik pompa yardımıyla sistemden 250 mL saf su geçirilerek polimer yıkanmıştır.

3.2.3. Polimer Destek Maddesinin Lipaz Enziminin İmmobilizasyonunu

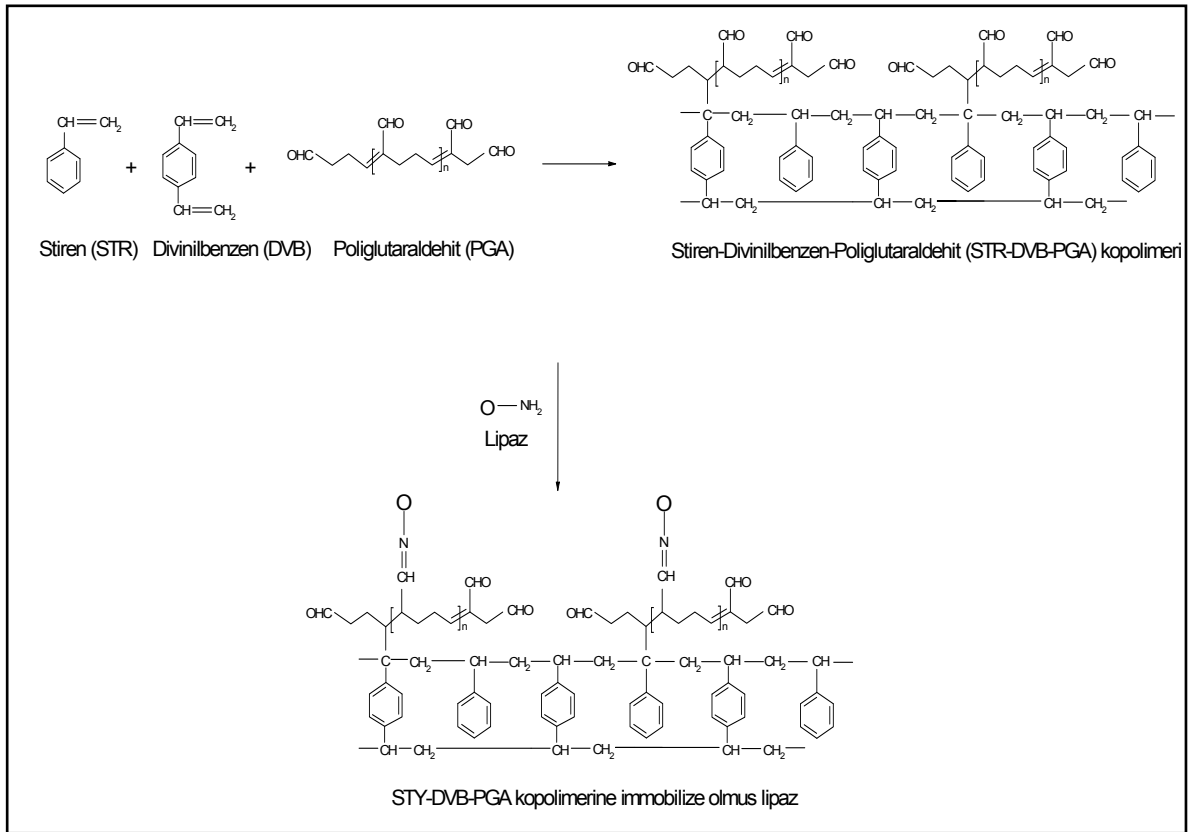
Lipozyme TL-100L (*Thermomyces lanuginosus*) lipaz enziminin immobilizasyonu şekil 3.2.3.1'deki düzenek yardımıyla gerçekleştirilmiştir. 25 °C'deki su banyosuna yerleştirilen besleme tankına fosfat tamponunda hazırlanmış Lipozyme

TL-100L çözeltisi koyulmuş ve peristaltik pompa yardımıyla sağlanan 5 mL/dk akış hızıyla sirküle edilerek immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2.3.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan deneysel düzeneğin fotoğrafı

Bu işlemle enzim kovalent olarak polimer destek maddesine tutturulmuştur. Şekil 3.2.3.2.'de enzim molekülünün polimer destek maddesine kovalent bağlanma ile immobilizasyon reaksiyonu görülmektedir. İmmobilizasyon işlemi sonunda kovalent olarak bağlanmayan enzim 200 mL tampon çözeltisi geçirilerek yapılan yıkamayla uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.2.3.2. Enzimin polimer destek maddesine kovalent olarak immobilizasyonu

3.2.4. Kitosan Kürelerinin Sentezi

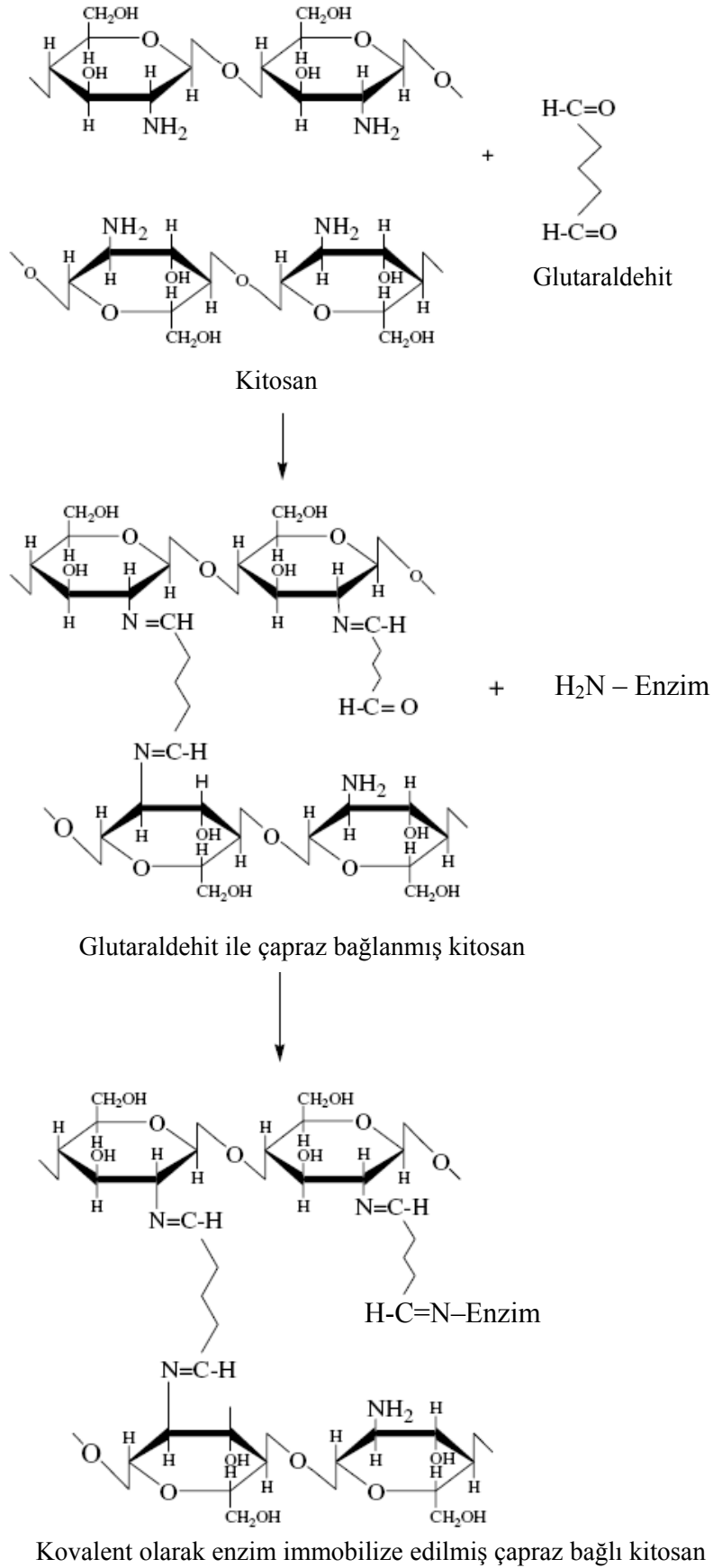
2,8000 g kitosan %3'lük 140 mL asetik asit çözeltisinde çözülerek %2'lik kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Kitosan çözeltisi, manyetik karıştırıcı ile karıştırılan, hacimce %26 etanol, %74 1 mol/L NaOH içeren 475 mL çözeltiliye 0,91 mm iç çaplı enjektör iğnesinden peristaltik pompa yardımıyla 0,8 mL/dk hızla damlatılmıştır. Damlatma işlemi bittikten sonra 3 saat daha karıştırılmaya devam edilmiştir. Süre sonunda küreler süzülüp, nötrleşene kadar saf suyla yıkanmıştır. pH 7,0 fosfat tamponunda %1'lik glutaraldehit çözeltisi hazırlanmış ve küreler bu çözeltiliye atılarak manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Süre sonunda süzülüp iyice yıkanan küreler kurumaya bırakılmıştır. Kitosan kürelerinin sentezlenmesinde kullanılan deneysel düzenek şekil 3.2.4.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.2.4.1. Kitosan kürelerinin sentezinde kullanılan deneysel düzenek

3.2.5. Kitosan Kürelerine Enzim İmmobilizasyonu

Kurutulmuş kitosan küreler farklı konsantrasyonlarda Novozyme 735 (*Candida antarctica A*) lipaz enzimi içeren tampon çözeltisi ile manyetik karıştırıcıda farklı sürelerde karıştırılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon öncesi ve sonrası enzim çözeltisinden örnek alınarak protein konsantrasyonu belirlenmiş ve immobilize olan enzim miktarı hesaplanmıştır. İmmobilize enzimin spesifik aktivitesi belirlenerek en yüksek spesifik aktivitenin elde edildiği koşullarda çalışılmıştır. Kitosan kürelerinin oluşumu sırasında glutaraldehitte çapraz bağlanma reaksiyonu ve kovalent olarak enzim immobilizasyonu reaksiyonu şekil 3.2.5.1.'de görülmektedir.



Şekil 3.2.5.1. Kitosanın çapraz bağlanması ve kovalent enzim immobilizasyonu

3.2.6. Kantitatif Protein Tayini

Kantitatif protein tayini için Bradford ve Lowry metodu olmak üzere iki farklı analiz metodu kullanılmıştır.

3.2.6.1. Bradford Metodu

İmmobilizasyon işlemi ile Lipozyme TL-100L lipaz enziminin polimer destek maddesine tutturulan miktarı Bradford protein analiz metodu ile belirlenmiştir (Bradford,1976). Bu metodun temeli coomassie brilliant blue G250 (CBB) boyasının protein molekülü ile kompleks oluşturmasına dayanmaktadır. Ortamdaki protein miktarı arttıkça oluşan renk açık maviden koyu maviye kaymaktadır.

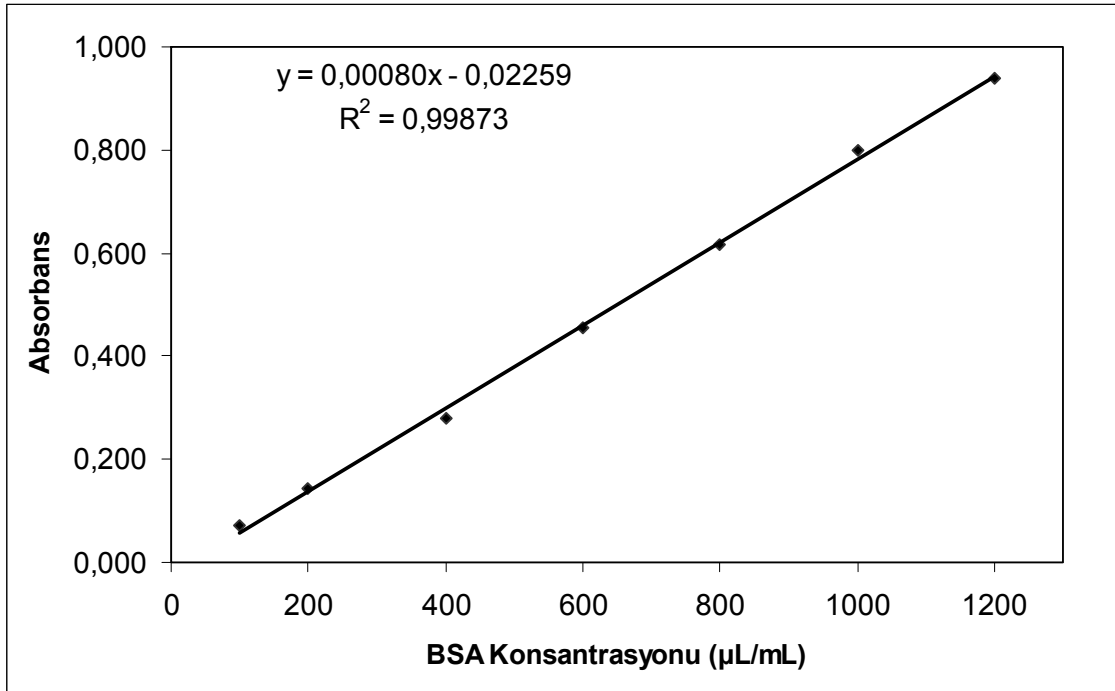
3.2.6.1.1. Bradford Analizi İçin Boya Çözeltisinin Hazırlanması

Analiz için kullanılan stok boya çözeltisi 100 mg CBB 50 mL metanol içerisinde çözülerek, üzerine 100 mL %85 fosforik asit (H_3PO_4) eklenmiş ve saf su ile 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Bu çözelti siyah bant süzgeç kâğıdından süzülerek koyu renkli şişede +4 °C'de saklanmıştır. Analiz için kullanılan çözelti 1 hacim stok boya çözeltisi 4 hacim saf su ilave edilerek hazırlanmıştır.

3.2.6.1.2. Bradford Analizi İçin Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Kalibrasyon grafiği çizmek amacıyla standart protein olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır. pH 7,0 fosfat tamponunda 100; 200; 400; 600; 800; 1000; 1200 µL/mL derişime sahip BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Farklı derişimlerdeki BSA standart protein çözeltilerinden deney tüplerine 100'er µL alınmış üzerlerine 5'er mL Bradford boya çözeltisi eklenerek çalkalanmış ve 5 dk beklendikten sonra 595 nm dalga boyunda UV-görünür bölge spektrofotometresinde absorbansları okunmuştur. Spektrofotometriyi sıfırlamak için 100 µL pH 7,0 fosfat tamponunun üzerine 5 mL Bradford boya çözeltisi eklenerek hazırlanan çözelti kullanılmıştır. Her bir standardın 595 nm dalga boyunda absorbansları okunarak protein konsantrasyonuna (µL/mL) karşı

okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 3.2.6.1.2.1.'de verilmiştir.



şekil 3.2.6.1.2.1. Bradford protein analiz metodu kalibrasyon grafiği

3.2.6.1.3. Protein Tayini

Deney tüpüne 100 µL rnek alınmış üzerine stok boya zltisinden seyreltilerek hazırlanmış olan Bradford boya zltisinden 5 mL eklenerek çalkalanmıştır. 5 dk beklendikten sonra 595 nm dalga boyunda UV-görünür bölge spektrofotometresinde absorbans okunmuştur. Oluşturulan kalibrasyon grafiği kullanılarak örneğin içerdiği protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.6.2. Lowry Metodu

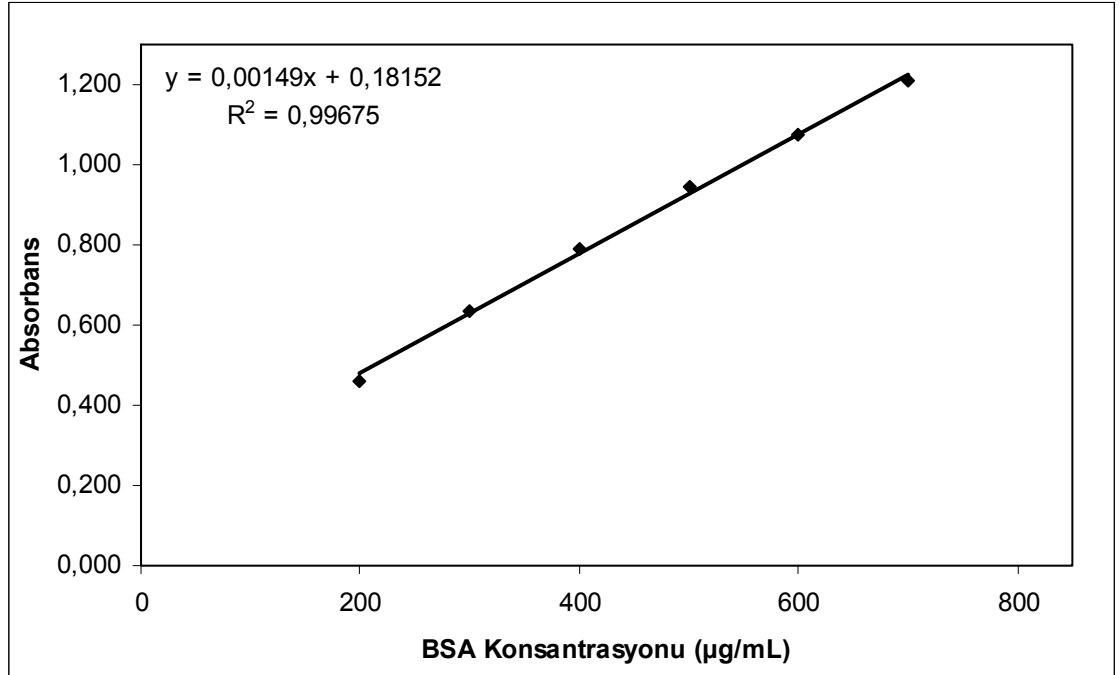
3.2.6.2.1. Lowry zltilerinin Hazırlanması

0,1 mol/L NaOH içinde %2 Na₂CO₃ olacak şekilde Lowry A zltisi, %1'lik NaKC₄H₄O₆ zltisi (Lowry B₁) ve %0,5'lik CuSO₄ (Lowry B₂) zltisi hazırlanır.

Lowry A, Lowry B₁ ve Lowry B₂ çözeltileri 100:1:1 (v/v) oranında karıştırılarak Lowry C çözeltisi hazırlanır.

3.2.6.2.2. Lowry Metodu İçin Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Kalibrasyon grafiği çizmek amacıyla standart protein olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır. pH 7,0 fosfat tamponunda 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800 µL/mL derişime sahip BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Farklı derişimlerdeki BSA standart protein çözeltilerinden deney tüpüne 500 µL alınmış üzerlerine 3 mL Lowry C çözeltisi eklenip, çalkalanarak 10 dk beklenmiştir. Süre sonunda 300 µL 1:1 seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek çalkalanmıştır. Bu çözeltiler 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 750 nm dalga boyunda UV-görünür bölge spektrofotometresinde absorbansları okunmuştur. Spektrofotometreyi 500 µL pH 7.0 fosfat tamponuyla aynı işlemler yapılarak hazırlanan çözeltiyle sıfırlanmıştır. Her bir standardın 750 nm dalga boyunda absorbansları okunarak protein konsantrasyonuna (µL/mL) karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 3.2.6.2.2.1.'de verilmiştir.



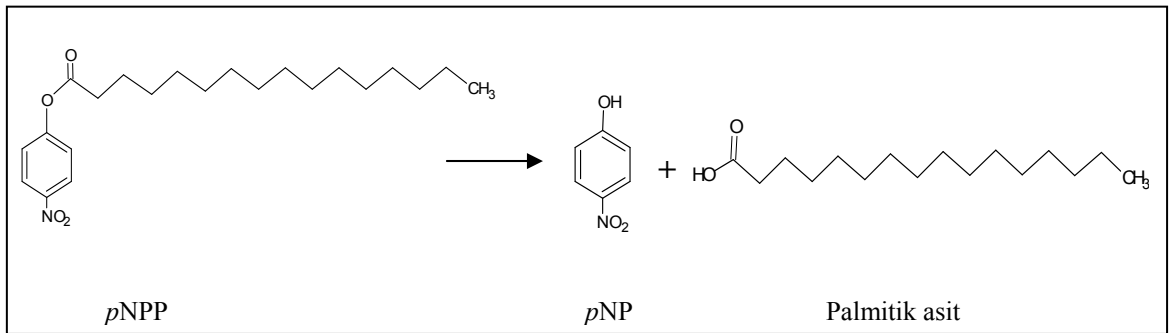
Şekil 3.2.6.2.2.1. Lowry protein analiz metodu kalibrasyon grafiği

3.2.6.2.3. Protein Tayini

Deney tüpüne 500 μ L örnek alınmış üzerine 3 mL Lowry C çözeltisi eklenip, çalkalanarak 10 dk beklenmiştir. Süre sonunda 300 μ L 1:1 seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek çalkalanmıştır. Bu çözelti 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 750 nm dalga boyunda UV-görünür bölge spektrofotometresinde absorbansı okunmuştur. Oluşturulan kalibrasyon grafiği kullanılarak örneğin içerdiği protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.7. Lipaz Enziminin Aktivite Tayini

Lipaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi enzimin para-nitrofenil palmitatı (*p*NPP) para-nitrofenole (*p*NP) dönüştürmesi ve oluşan para-nitrofenolün spektrofotometrik olarak tayini temeline dayanmaktadır. Gerçekleşen reaksiyon şekil 3.2.7.1.'de görülmektedir.

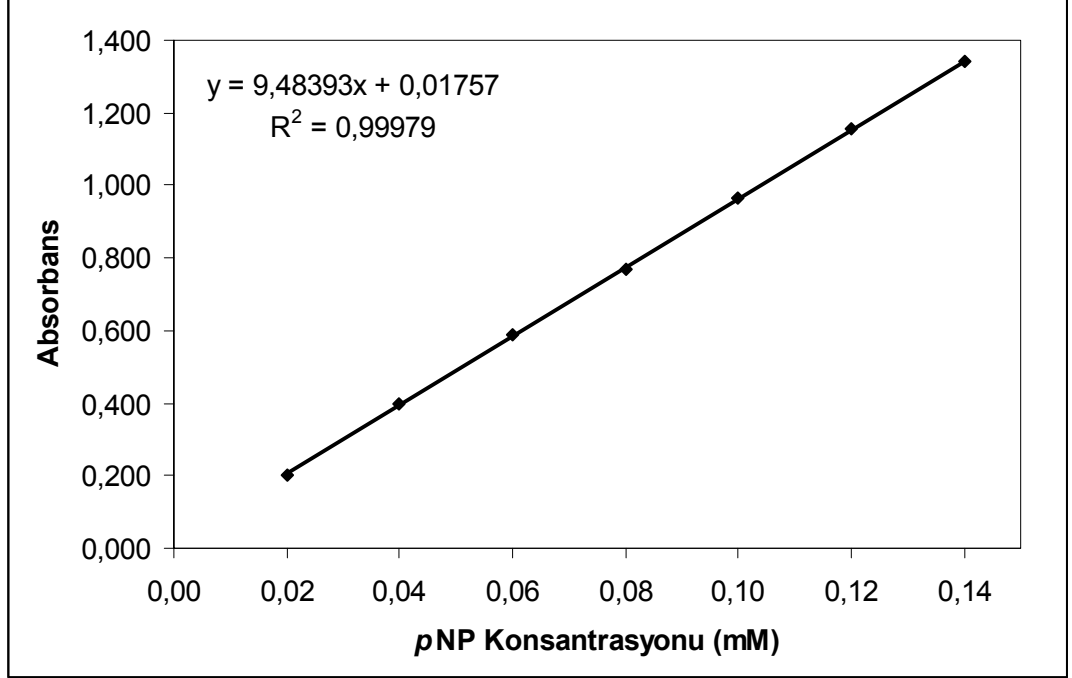


Şekil 3.2.7.1. Aktivite ölçümü sırasında gerçekleşen *p*NPP'ın *p*NP'e dönüşüm reaksiyonu

3.2.7.1. Lipaz Enziminin Aktivite Tayini İçin Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Kalibrasyon grafiği çizmek hacimce %10 2-propanol, %90 pH 7,0 fosfat tampon çözeltisinde 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14 mM *p*NP çözeltileri hazırlanmıştır. Spektrofotometreyi sıfırlamak için %10 2-propanol, %90 pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Her bir standartın 410 nm dalga boyunda absorbansları

ölçülerek *p*NP derişimine (mM) karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geğirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 3.2.7.1.1'de verilmiştir.



şekil 3.2.7.1.1. Aktivite tayini için *p*NP kalibrasyon grafiği

3.2.7.2. Aktivite Tayini

STR-DVB-PGA polimerine immobilize lipazın aktivitesi tayin edilirken, 2-propanol içinde 20 mM *p*NPP çözeltisi hazırlanmıştır. *p*NPP çözeltisinden 1,5 mL alınıp üzerine 13,5 mL % 0,2 (m/v) gum arabic, % 0,6 (v/v) Triton X-100 içeren pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi eklenmiştir. Bu çözelti enzim immobilize edilmiş 0,0700 g polimer destek maddesi ile 5 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Süre sonunda polimer çözeltiden süzgeç kâğıdı ile süzülerek ayrılmıştır. Süzüntü 1/12 oranında seyreltilerek UV-görünür bölge spektrofotometresinde 410 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Kitosan kürelere immobilize edilen lipazın aktivitesi de aynı yöntemle belirlenmiştir. Ancak, 10 mM *p*NPP çözeltisi kullanılmış, 0,1000 g destek maddesi ile çalışılmış ve süzüntünün absorbansı seyreltme yapılmadan ölçülmüştür. şekil 3.2.5.2.1.'deki *p*NP ile çizilmiş olan kalibrasyon grafiği kullanılarak oluşan *p*NP miktarı belirlenmiş ve buna göre

aktivite değeri hesaplanmıştır. Lipaz aktivitesi ve spesifik aktivite sırasıyla eşitlik 3.2.7.2.1. ve 3.2.7.2.2.'ye göre hesaplanmıştır.

$$\text{Lipaz aktivitesi } (\mu\text{mol } p\text{NP/g destek.dk}) = \frac{\text{İmmobilize lipaz aktivitesi}}{\text{Polimer destek ağırlığı}} \quad 3.2.7.2.1$$

$$\text{Spesifik aktivite } (\mu\text{mol } p\text{NP/mg enzim.dk}) = \frac{\text{İmmobilize lipaz aktivitesi}}{\text{İmmobilize enzim miktarı}} \quad 3.2.7.2.2$$

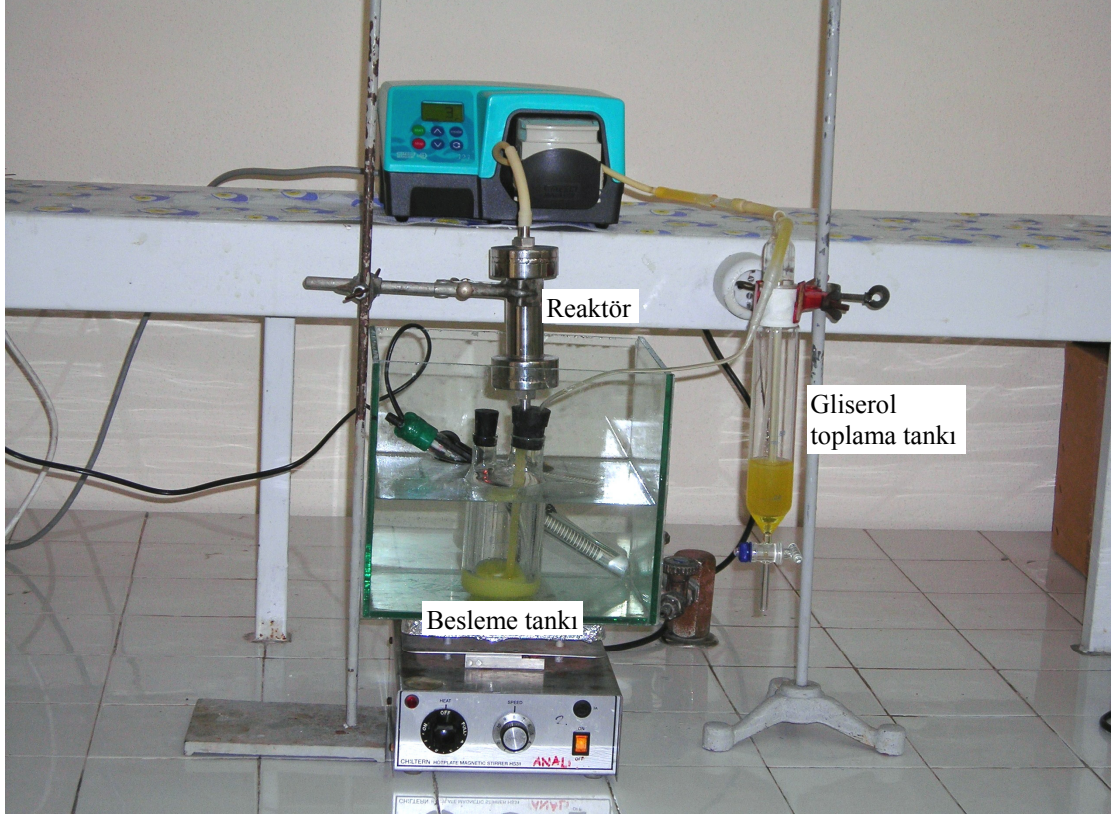
3.2.8. STR-DVB-PGA Polimerine İmmobilize Edilmiş Lipozyme TL 100L ve Kitosan Kürelere İmmobilize Edilmiş Novozyme 735 Enzimlerinin K_m ve V_{max} Değerlerinin İncelenmesi

STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş Lipozyme TL 100L enzimi için, 0,25; 0,5; 0,8; 1,0; 1,6; 2,0; 2,5 mM konsantrasyonlarında *p*NPP çözeltisi kullanılarak aktivite tayini yapılmıştır. Kitosan kürelere immobilize edilmiş Novozyme 735 enzimi için, 0,25; 0,5; 0,8; 1,0; 1,25; 1,6 mM konsantrasyonlarında *p*NPP çözeltisi kullanılarak aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan eşitlik 3.2.8.1.'deki Lineweaver-Burk denklemi kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3.2.8.1.)$$

3.2.9. Biyodizel Üretimi

Biyodizel üretimi, sürekli sistem ile atık bitkisel yağ ve metanolün enzim katalizörlüğünde transesterleştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için şekil 3.2.9.1.'deki deney düzeneği kullanılmıştır.



Şekil 3.2.9.1. Biyodizel üretiminde kullanılan deney düzeneği

Reaktör, *Candida antarctica* A lipaz enzimi ile biyodizel üretimi için enzim immobilize edilmiş 33,3000 g kitosan küre ile, *Thermomyces lanuginosus* lipaz enzimi ile biyodizel üretimi için enzim immobilize edilmiş 3,3000 g STR-DVB-PGA polimeri ile doldurulmuştur. Süzölmüş 100 mL atık kanola yağı besleme tankına koyulmuş, toplam 28 mL metanol 3'er saat arayla 7'er mL ilave edilmiştir. Böylece metanolün enzimi inhibe etme oranı en aza indirilmiştir. Metanol ve yağ manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak peristaltik pompa yardımıyla 5 mL/dk akış hızıyla reaktörden sirküle edilmiştir. Biyodizel üretimi sırasında yan ürün olarak oluşan gliserol ayrı bir bölümde toplanarak, enzimi inhibe etme etkisi en aza indirilmiş ve esterleşme reaksiyonun ürünler yönüne kaymasına katkı sağlanmıştır. Her bir biyodizel üretim reaksiyonu arasında sistemden 10 dk boyunca t-bütanol geçirilip, destek maddesinin üzerinde kalan reaktanlar ve ürünler uzaklaştırılarak, destek maddesinin rejenerasyonu sağlanmıştır.

3.2.10. Gaz Kromatografi Kütle Spektrometresi ile Biyodizel Tayini

Analiz Shimadzu GC-MS QP5000 gaz kromatografi kütle spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Varian CP-SIL 88 kolonun uzunluğu 60 m, çapı 0,25 mm ve film kalınlığı 0,25 μm 'dir. Analiz sırasındaki çalışma koşulları ve sıcaklık programı çizelge 3.2.10.1. ve 3.2.10.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.10.1. GC-MS cihazı çalışma koşulları

Enjeksiyon sıcaklığı	225 $^{\circ}\text{C}$
Ara yüzey sıcaklığı	225 $^{\circ}\text{C}$
Kontrol modu	Split
Kolon iç basıncı	165,9 kPa
Kolon akış hızı	1,0 mL/dk
Doğrusal hız	26,7 cm/sn
Split oranı	30
Toplam akış	37,1 mL/dk
Taşıyıcı akış	37,1 mL/dk
Tarama modu	Scan
Çözücü kesim zamanı	6 dk
GC program süresi	40 dk

Çizelge 3.2.10.2. GC-MS cihazı fırın sıcaklık programı

Oran ($^{\circ}\text{C}/\text{dk}$)	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Bekleme süresi (dk)
-	140	5
4	236	11

Belirtilen çalışma koşullarında TS EN 14103 standardına göre metil heptadekanoat iç standardı kullanılarak kantitatif olarak yağ asidi metil esteri içeriği tayin edilmiştir.

3.2.11. Kullanılmış Yemeklik Yağlarda Asit Sayısı ve Asitlik Tayini

%95 etanol içinde 0,125 mol/L KOH çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiyi standartlaştırmak için 3 adet 0,0750 g benzoik asit tartılıp her birine 10 mL izobütil metilketon eklenerek çözülmüştür. Fenolftalein indikatörü eşliğinde her bir benzoik asit çözeltisi KOH çözeltisi ile titre edilmiş ve harcanan hacimden gerçek KOH konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Analiz edilecek yağdan 5,0000 g alınarak üzerine hacimce % 50 dietileter, % 50 etanol içeren 50 mL nötrleştirilmiş çözücü karışımı eklenmiştir. Çözücü karışımı 3 damla fenolftalein indikatörü eklenip hazırlanan KOH çözeltisinden eklenerek nötrleştirilmiştir. Hazırlanan yağ çözeltisi standartlaştırılmış KOH çözeltisi ile titre edilerek harcanan hacimden yağın asit sayısı ve asitliği eşitlik 3.2.11.1. ve 3.2.11.2.'ye göre hesaplanmıştır.

$$\text{Asit sayısı} = \frac{56,1 \cdot V_{KOH} \cdot C_{KOH}}{m_{yağ}} \quad 3.2.11.1.$$

$$\text{Asitlik} = \frac{V_{KOH} \cdot C_{KOH} \cdot M_{A(oleikasıit)}}{10 \cdot m_{yağ}} \quad 3.2.11.2.$$

3.2.12. Kullanılmış Yemeklik Yağlarda İyot Sayısı Tayini

0,1 mol/L, 500 mL Na₂S₂O₃ çözeltisi hazırlanıp, 0,01 mol/L KIO₃ çözeltisi kullanılarak standartlaştırılmıştır. Bunun için 10 mL 0,01 mol/L KIO₃ çözeltisi alınıp, üzerine spatül ucuyla KI ve 10 mL 2 N H₂SO₄ eklenip standartlaştırılacak Na₂S₂O₃ çözeltisi ile titre edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak Na₂S₂O₃ çözeltisinin gerçek derişimi belirlenmiştir. İyot sayısı tayini için 0,1000 g yağ tartılarak 10 mL hacimce %50 sikloheksan, %50 asetik asit karışımı eklenerek çözülmüştür. Üzerine 12,5 mL Wijs reaktif eklenip, karanlıkta 1 saat bekletilmiştir. Süre sonunda 100g/L

derişimindeki KI çözeltilisinden 10 mL ve 75 mL saf su eklenmiştir. Bu çözeltili nişasta indikatörü kullanılarak, standartlaştırılmış $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ çözeltilisi ile titre edilmiştir. Aynı işlemler yağ içermeyen blank için de tekrar edilmiştir. Eşitlik 3.2.12.1.kullanılarak yağın iyot sayısı hesaplanmıştır.

$$\text{İyot sayısı} = \frac{12,69.C.(V_{\text{örnek}} - V_{\text{blank}})}{m_{\text{örnek}}} \quad 3.2.12.1.$$

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. STR-DVB-PGA Polimerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonun Kemometrik Optimizasyonu

Thermomyces lanuginosus lipaz enzimi (Lipozyme TL 100L) STR-DVB-PGA polimerine immobilizasyonu en yüksek spesifik aktiviteyi elde etmek için kemometrik olarak optimize edilmiştir. Bunun için 5 seviyeli 4 faktörlü, 30 deneyden oluşan merkezi kompozit dizayn tasarlanmıştır. İmmobilizasyon sonucu enzimin spesifik aktivitesi üzerine, enzim konsantrasyonu, pH, tampon konsantrasyonu ve immobilizasyon süresinin etkisi incelenmiştir. İncelenen parametreler ile bu parametreler için seçilen kodlanmış ve gerçek değerler çizelge 4.1.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1.1. Merkezi kompozit dizaynda kullanılan kodlanmış ve gerçek değerler

Kodlanmış değer	Enzim konsantrasyonu (% v/v) (x_1)	pH (x_2)	Tampon konsantrasyonu (mM) (x_3)	İmmobilizasyon süresi (saat) (x_4)
-2	4	6.0	20	8
-1	7	6.5	40	16
0	10	7.0	60	24
1	13	7.5	80	32
2	16	8.0	100	40

Oluşturulan 30 deneylik dizayna uygun olarak her biri için gram destek maddesi başına aktivite ve immobilize olan enzim miktarı belirlenerek spesifik aktivite değeri hesaplanmıştır. Deneysel dizayn ve deneyler sonucu elde edilen veriler çizelge 4.1.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1.2. Lipozyme TL 100L enziminin STR-DVB-PGA polimerine immobilizasyonunun optimizasyonu için merkezi kompozit dizayn tablosu ve deneysel sonuçlar

Deney No	Faktörler				Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol } p\text{NP}/\text{mg enzim.dk}$)	
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Deneysel	Tahmini
1	-1	-1	-1	-1	3,45	3,73
2	1	-1	-1	-1	2,59	3,10
3	-1	1	-1	-1	4,58	4,82
4	1	1	-1	-1	4,34	4,19
5	-1	-1	1	-1	5,00	4,71
6	1	-1	1	-1	4,55	4,08
7	-1	1	1	-1	5,23	5,80
8	1	1	1	-1	5,54	5,17
9	-1	-1	-1	1	3,30	3,70
10	1	-1	-1	1	3,39	3,06
11	-1	1	-1	1	4,62	4,79
12	1	1	-1	1	4,32	4,15
13	-1	-1	1	1	4,40	4,68
14	1	-1	1	1	3,82	4,04
15	-1	1	1	1	6,14	5,77
16	1	1	1	1	4,66	5,13
17	-2	0	0	0	7,93	7,53
18	2	0	0	0	5,88	6,27
19	0	-2	0	0	3,12	3,30
20	0	2	0	0	5,20	5,48
21	0	0	-2	0	2,33	2,10
22	0	0	2	0	3,83	4,06
23	0	0	0	-2	3,29	3,38
24	0	0	0	2	3,41	3,32
25	0	0	0	0	4,59	4,39
26	0	0	0	0	4,21	4,39
27	0	0	0	0	4,66	4,39
28	0	0	0	0	4,64	4,39
29	0	0	0	0	4,18	4,39
30	0	0	0	0	4,07	4,39

Çizelge 4.1.2.'deki deneysel veriler kullanılarak Design Expert 7.1.4. programı ile eşitlik 4.1.1.'e göre model denkleminin oluşturulmasında kullanılacak b katsayıları hesaplanmıştır.

$$b = (X' \cdot X)^{-1} \cdot X' \cdot y \quad 4.1.1.$$

Thermomyces lanuginosus lipaz enziminin kemometrik optimizasyonu için b katsayılar kullanılarak oluşturulan model denklemi eşitlik 4.1.2.'de verilmiştir.

$$\begin{aligned} y = & 4,39 - 0,32x_1 + 0,55x_2 + 0,49x_3 - 0,02x_4 \\ & + 0,01x_1x_2 - 0,06x_1x_3 - 0,07x_1x_4 - 0,08x_2x_3 + 0,05x_2x_4 - 0,12x_3x_4 \\ & + 0,63x_1^2 - 0,06x_2^2 + 0,33x_3^2 - 0,26x_4^2 \end{aligned} \quad 4.1.2.$$

4.1.1. STR-DVB-PGA Polimerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonun Kemometrik Optimizasyonu İçin ANOVA Sonuçları

Elde edilen denkleme göre modelin uygunluğunu ve hangi parametrelerin önemli olduğunu belirlemek amacıyla Design Expert 7.1.4. programı ile varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.1.1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1.1.1. STR-DVB-PGA polimerine lipaz enzimi immobilizasyonun kemometrik optimizasyonu için ANOVA sonuçları

	Kareleri toplamı	Serbestlik derecesi	Kareleri ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	34.14	14	2.44	16.52	<0.0001 ^a
x ₁	2.40	1	2.40	16.25	0.0011 ^a
x ₂	7.14	1	7.14	48.35	<0.0001 ^a
x ₃	5.77	1	5.77	39.06	<0.0001 ^a
x ₄	0.01	1	0.01	0.04	0.8354 ^b
x ₁ x ₂	0.00	1	0.00	0.00	0.9490 ^b
x ₁ x ₃	0.05	1	0.05	0.33	0.5745 ^b
x ₁ x ₄	0.07	1	0.07	0.46	0.5097 ^b
x ₂ x ₃	0.11	1	0.11	0.74	0.4039 ^b
x ₂ x ₄	0.03	1	0.03	0.23	0.6389 ^b
x ₃ x ₄	0.24	1	0.24	1.62	0.2220 ^b
x ₁ ²	10.79	1	10.79	73.09	<0.0001 ^a
x ₂ ²	0.10	1	0.10	0.65	0.4324 ^b
x ₃ ²	2.96	1	2.96	20.03	0.0004 ^a
x ₄ ²	1.87	1	1.87	12.68	0.0028 ^a
Artan	2.21	15	0.15		
Hata	0.35	5	0.07		

^a : önemli parametreler

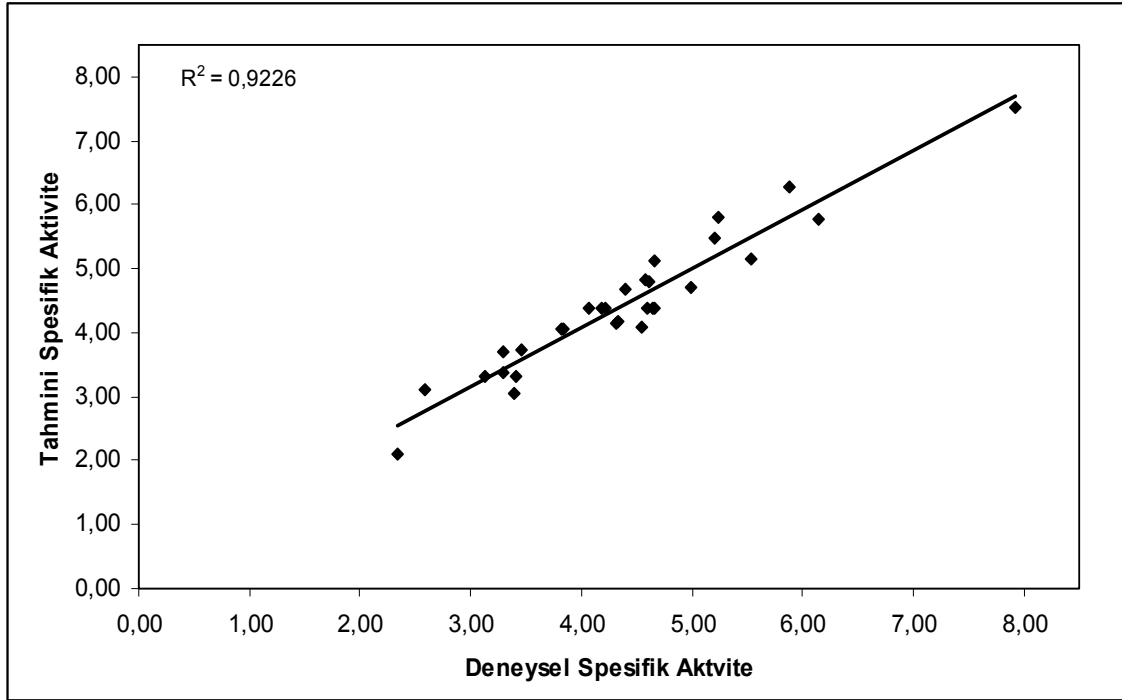
^b : önemsiz parametreler

ANOVA sonuçlarına göre, p değeri 0,05'den küçük olan parametreler önemli, büyük olan parametreler önemsiz kabul edilmiştir. Buna göre oluşturulan yeni model denklemi eşitlik 4.1.1.1.'de verilmiştir.

$$y = 4,39 - 0,32x_1 + 0,55x_2 + 0,49x_3 - 0,02x_4 \\ + 0,63x_1^2 + 0,33x_3^2 - 0,26x_4^2$$

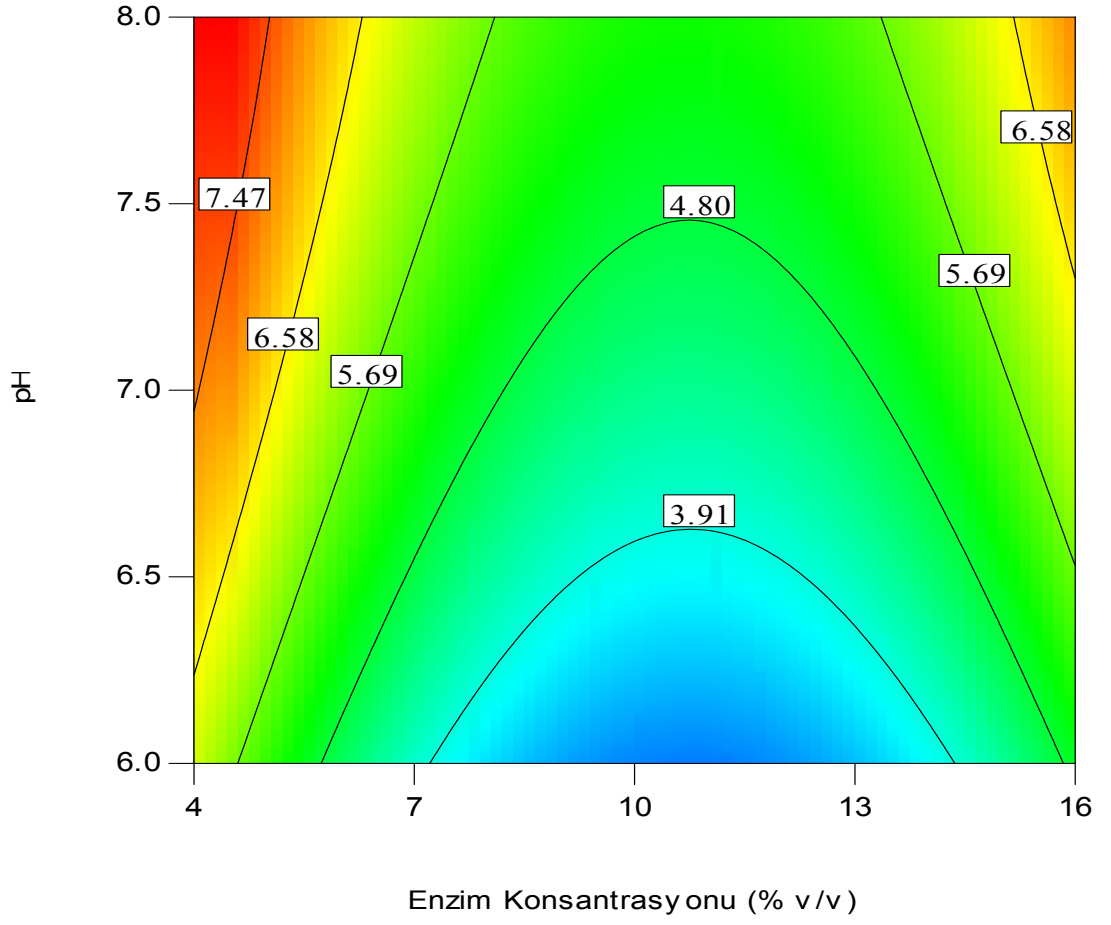
4.1.1.1.

Eşitlik 4.1.1.1.'e göre hesaplanan tahmini spesifik aktiviteler ile deneysel spesifik aktiviteler büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Şekil 4.1.1.1.'de tahmini spesifik aktivite değerleri ile deneysel spesifik aktivite değerlerinin grafiğe geçirilmiş hali görülmektedir.

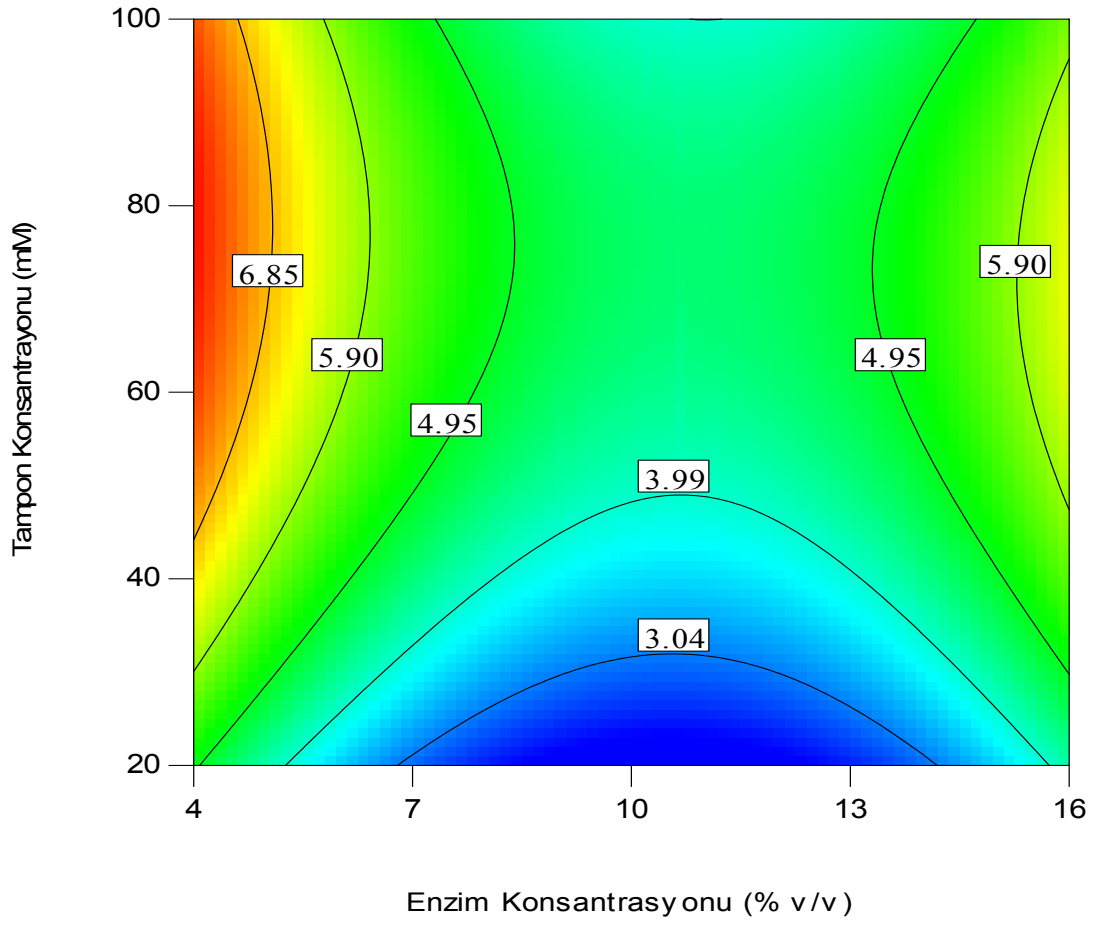


Şekil 4.1.1.1. Tahmini spesifik aktivite değerleri ile deneysel spesifik aktivite değerlerinin grafiği

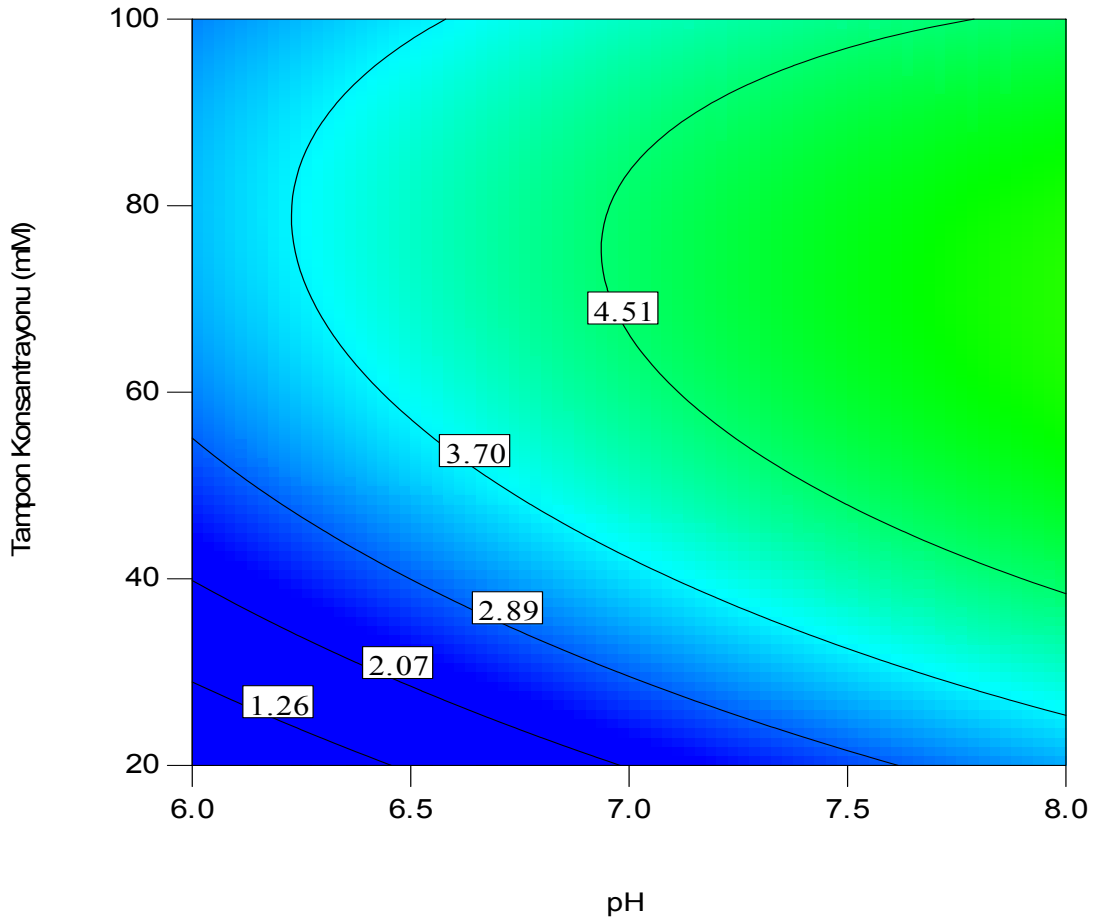
$x_1 - x_2$ (enzim konsantrasyonu - pH), $x_1 - x_3$ (enzim konsantrasyonu – tampon konsantrasyonu), $x_2 - x_3$ (pH - tampon konsantrasyonu) parametreleri arasında kontur grafikler çizilerek önemli parametrelerin spesifik aktivite üzerine etkileri şekil 4.1.1.2., 4.1.1.3. ve 4.1.1.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1.2.2. Enzim konsantrasyonu ile pH ve karşılıklı etkileşimlerinin spesifik aktivite üzerine etkisini gösteren kontur grafik



Şekil 4.1.2.3. Enzim konsantrasyonu ile tampon konsantrasyonu ve karşılıklı etkileşimlerinin spesifik aktivite üzerine etkisini gösteren kontur grafik



Şekil 4.1.2.4. pH ile tampon konsantrasyonu ve karşılıklı etkileşimlerinin spesifik aktivite üzerine etkisini gösteren kontur grafik

Grafiklere göre spesifik aktivite, enzim konsantrasyonu azaldıkça ve pH arttıkça artmaktadır. Tampon konsantrasyonu arttıkça ve enzim konsantrasyonu azaldıkça artmaktadır. Tampon konsantrasyonu ve pH arttıkça artmaktadır. Grafiklerden elde edilen veriler belirlenen optimum koşullarla da uygunluk göstermektedir.

4.1.2. STR-DVB-PGA Polimerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonu İçin Optimum Değerlerin Belirlenmesi

Oluşturulan model denkleminde göre Design Expert 7.1.4. programı kullanılarak her bir parametre için optimum değer belirlenmiştir. Belirlenen optimum değerler çizelge 4.1.2.1.'de görülmektedir.

Çizelge 4.1.2.1. STR-DVB-PGA polimerine lipaz enzimi immobilizasyonun için optimum değerler

	Kodlanmış değer	Gerçek değer
Enzim Konsantrasyonu	-2	% 4
pH	2	8,0
Tampon konsantrasyonu	0,758	75 mM
İmmobilizasyon süresi	- 0,017	24 saat

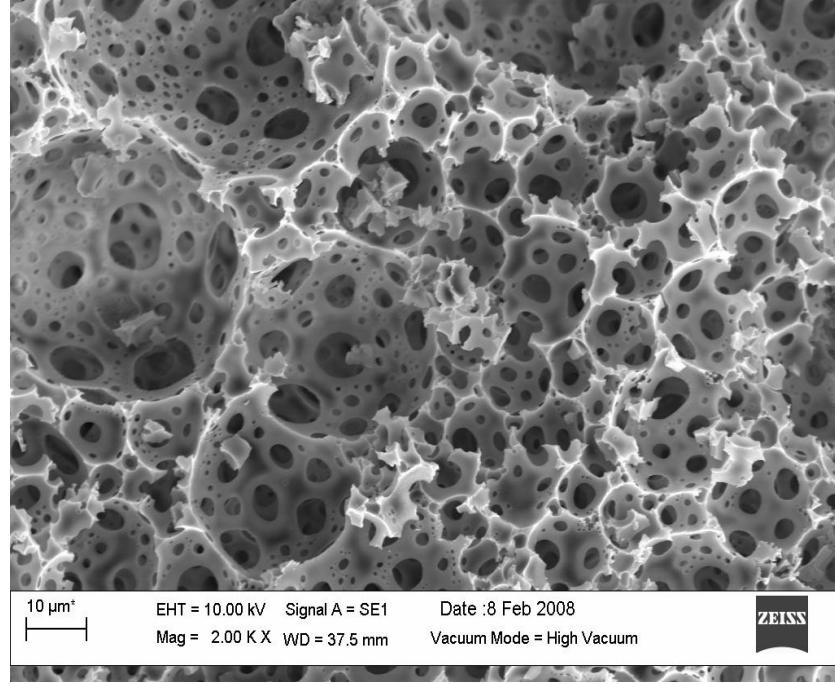
Hesaplanan optimum değerler eşitlik 4.1.1.1.'de yerine koyularak tahmini optimum spesifik aktivite değeri 8,78 $\mu\text{mol } p\text{NP}/\text{mg}$ enzim.dk bulunmuştur. Optimum koşullarda immobilizasyon işlemi tekrar edilerek, deneysel spesifik aktivite 8,41 $\mu\text{mol } p\text{NP}/\text{mg}$ enzim.dk bulunmuştur. Optimum koşullardaki tahmini ve deneysel spesifik aktivite değerlerinin birbirine yakın olması modelin geçerliliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

4.2. İmmobilizasyon Öncesi ve Sonrasında Destek Maddesinin Karakterizasyonu

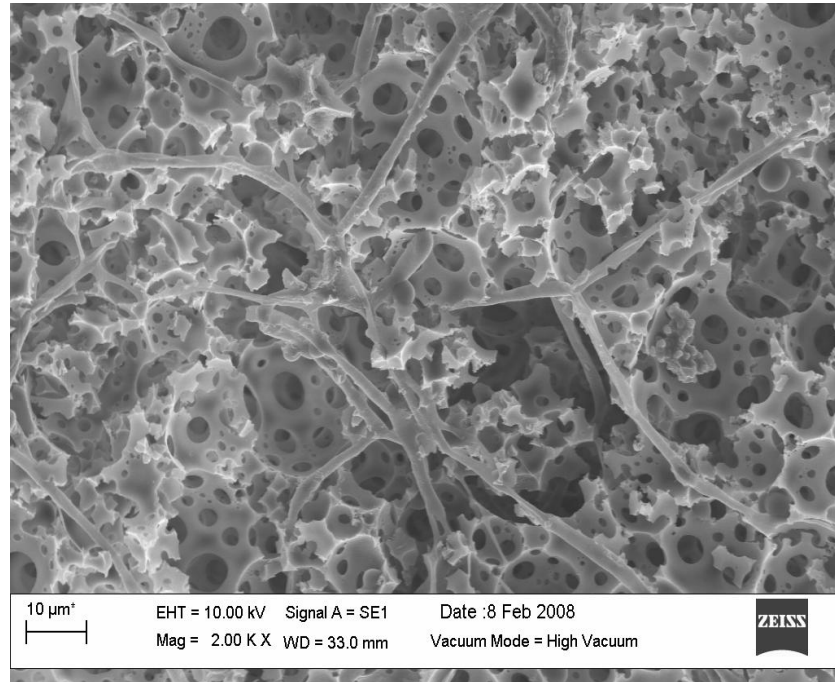
STR-DVB-PGA polimerine *Thermomyces lanuginosus* lipaz enzimi immobilizasyonu öncesinde ve sonrasında SEM ve FTIR analizi yapılarak yapısı aydınlatılmıştır.

4.2.1. STR-DVB-PGA Polimerinin SEM Analizi ile Yüzeysel Karakterizasyonu

Enzim immobilizasyonunda kullanılan STR-DVB-PGA polimerinin immobilizasyon işlemi öncesi ve sonrasında yüzeysel özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Şekil 4.2.1.1.'de destek maddesinin immobilizasyon öncesi ve şekil 4.2.1.2.'de *Thermomyces lanuginosus* lipaz enzimi immobilizasyonu sonrasındaki SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.2.1.1. İmmobilizasyon öncesi STR-DVB-PGA polimerinin SEM görüntüsü

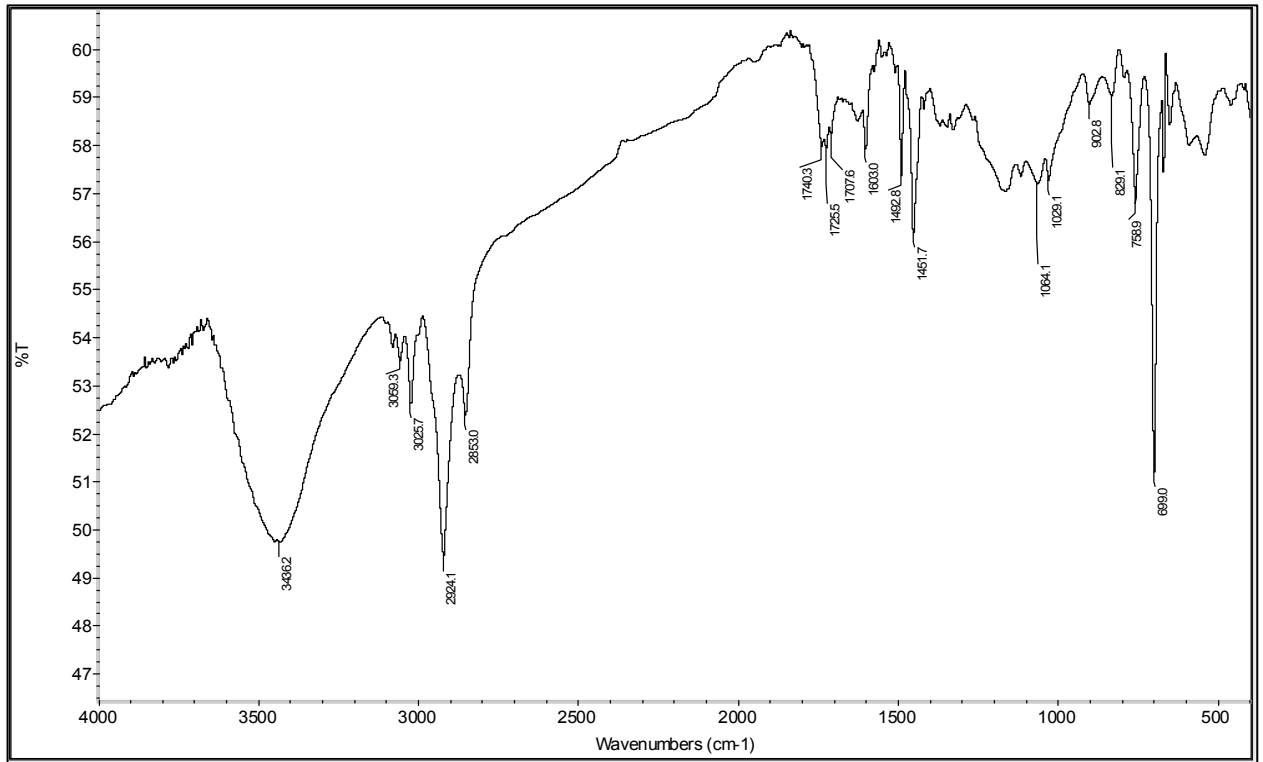


Şekil 4.2.1.2. İmmobilizasyon sonrası STR-DVB-PGA polimerinin SEM görüntüsü

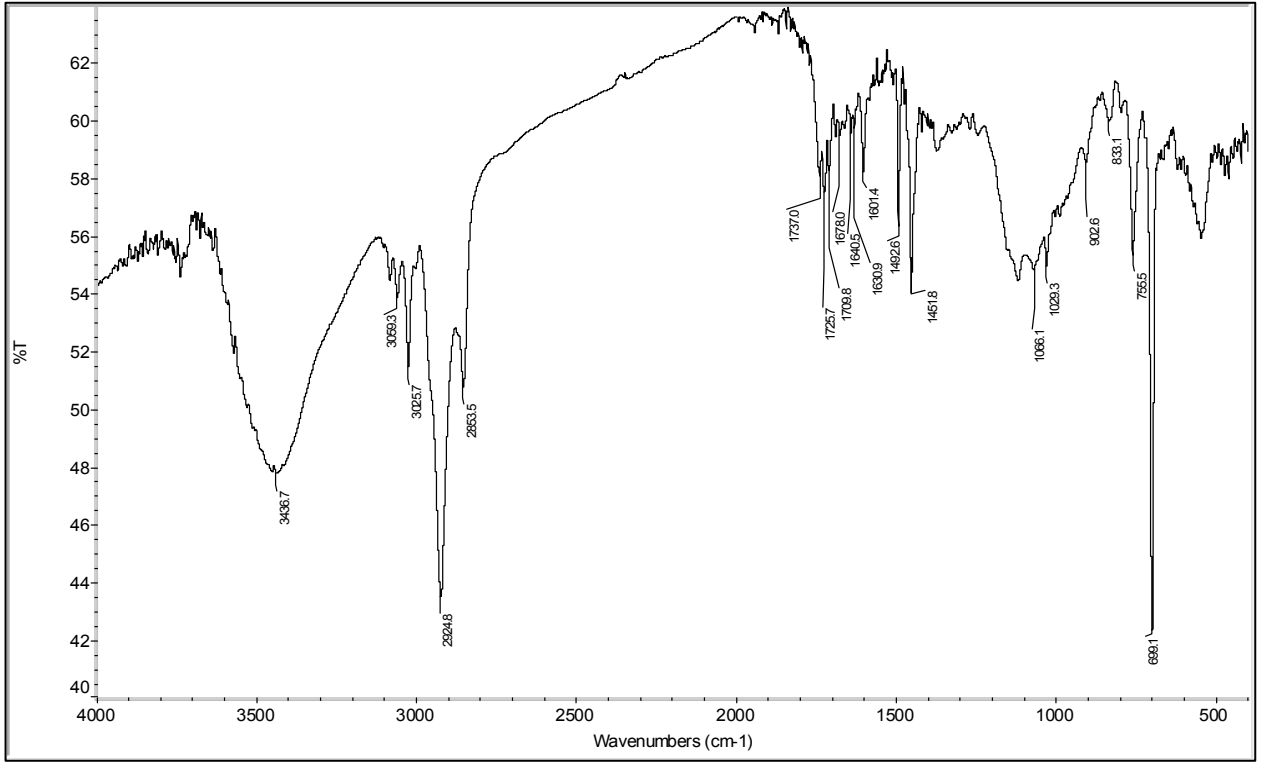
SEM görüntüleri incelendiğinde lipaz immobilizasyonu öncesi porların geniş olduğu, lipaz immobilizasyonu sonrasında ise lifli bir yapının oluştuğu ve porların daha dar olduğu gözlenmektedir.

4.2.2. STR-DVB-PGA Polimerinin FTIR Analizi ile Yapı Karakterizasyonu

Enzim immobilizasyonunda kullanılan STR-DVB-PGA polimeri yapısal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla immobilizasyon işlemi öncesi ve sonrasında fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ile incelenmiştir. Şekil 4.2.2.1.'de destek maddesinin immobilizasyon öncesi ve şekil 4.2.2.2.'de *Thermomyces lanuginosus* lipaz enzimi immobilizasyonu sonrasındaki FTIR spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.2.2.1. Immobilizasyon öncesi STR-DVB-PGA polimerinin FTIR spektrumu

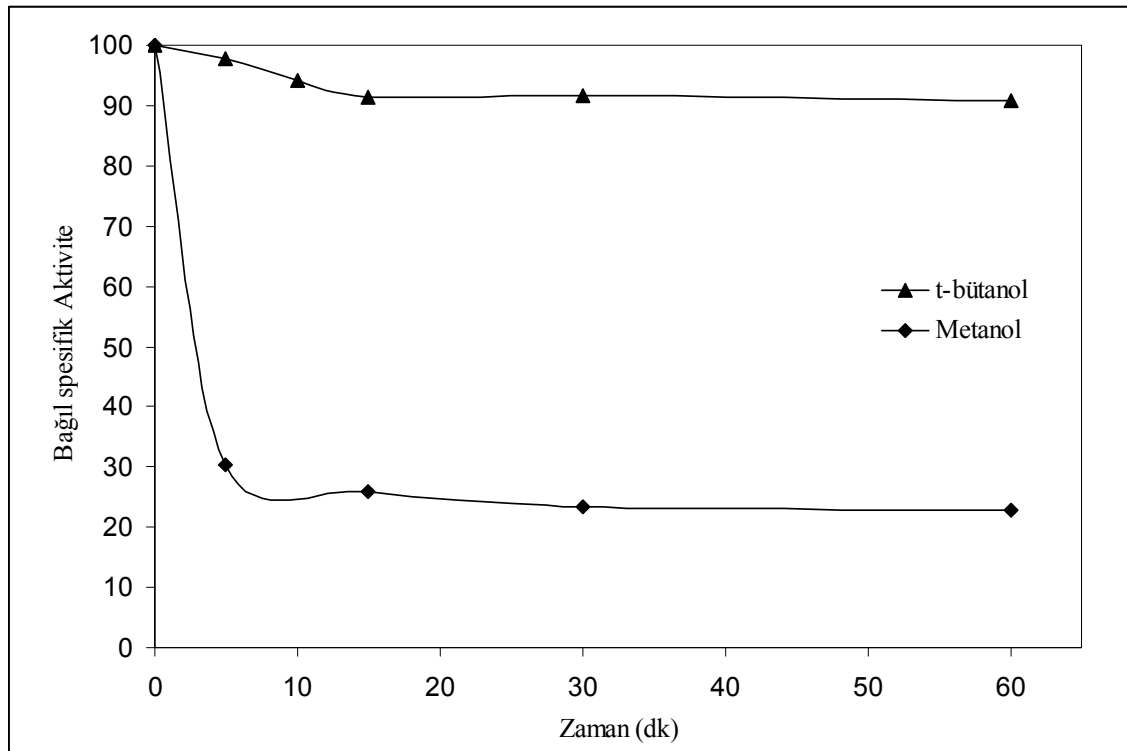


Şekil 4.2.2.2. İmmobilizasyon sonrası STR-DVB-PGA polimerinin FTIR spektrumu

Şekil 4.2.2.1. ve şekil 4.2.2.2. incelendiğinde 3436 cm^{-1} 'de polimerin sentez adımlarından gelen suya ait OH absorpsiyon bandı, 3059 cm^{-1} and 3025 cm^{-1} 'de aromatik C-H gerilmesi, 2924 cm^{-1} ve 2853 cm^{-1} 'de alifatik C-H gerilmesi, 1603 cm^{-1} , 1492 cm^{-1} ve 1451 cm^{-1} 'de aromatik C=C gerilmesi, 1064 , 1029 ve 902 cm^{-1} *p*-substitue benzen için aromatik C-H düzlem içi eğilmesi ve 829 , 758 ve 699 cm^{-1} 'de *p*-substitue benzen için aromatik düzlem dışı eğilmesine ait pikler görülmektedir. 1740 , 1725 ve 1707 cm^{-1} 'de görülen C=O gerilmesine ait pikler polimerin yapısında poliglutaraldehydin varlığını göstermektedir. İmmobilizasyon sonrası spektrumda görülen 1678 cm^{-1} 'deki pik, kovalent immobilizasyon sırasında lipaz enziminin amin grubu ($-\text{NH}_2$) ile polimerin karbonil grubu ($-\text{C}=\text{O}$) arasında imin ($-\text{C}=\text{N}$) bağı oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca immobilizasyon sonrası spektrumda görülen 1640 ve 1630 cm^{-1} 'de görülen amid I ve amid II pikleri polimer üzerinde enzim varlığını göstermektedir. İmmobilizasyon işlemi sonrasında destek maddesi tampon çözeltisi ile yıkanarak bağlanmayan enzim uzaklaştırıldığı için, bu pikler kovalent olarak bağlanan enzime ait piklerdir.

4.3. STR-DVB-PGA Polimerine İmmobilize Edilen Lipaz Enziminin Organik Çözücü Stabilitesi

STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilen *Thermomyces lanuginosus* lipaz enziminin metanol ve t-bütanol ile etkileşme süresine bağlı olarak aktivitesindeki azalma belirlenmiştir. Şekil 4.3.1.'de etkileşme zamanına bağlı olarak bağlı spesifik aktivitedeki değişim görülmektedir.



Şekil 4.3.1. Metanol ve t-bütanol ile etkileşme zamanına bağlı olarak enzimin bağlı spesifik aktivitesindeki değişim

Stabilite tayini için metanol ve t-bütanolün seçilmesinin nedeni ikisinin de biyodizel üretim sürecinde kullanılmasıdır. Metanol, trigliseridlerin transesterleştirilmesinde; t-bütanol, her bir biyodizel üretim reaksiyonu arasında destek maddesinin yağ ve gliserol gibi safsızlıklardan arındırılarak rejenerasyonu için kullanılmaktadır.

İmmobilize enzimin metanol ile muamele sonrasında bağlı spesifik aktivite 5 dk'da 30'a, 15 dk'da 20'ye inmektedir. Bu durum metanolün enzim molekülünün

katalizör olarak görev yapmasını sağlayan üç boyutlu yapısını bozmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle enzim, reaksiyon ortamında fazla miktarda metanol bulunduğunda stabilitesini koruyamaz. İmmobilize enzimin t-bütanol ile muamelesi sonrasında ise bağıl spesifik aktivite 5 dk'da 98'e, 15 dk'da 92'ye inmektedir. 60 dk'lık muamele sonucunda bağıl spesifik aktivitenin 90'ın altına inmediği belirlenmiştir.

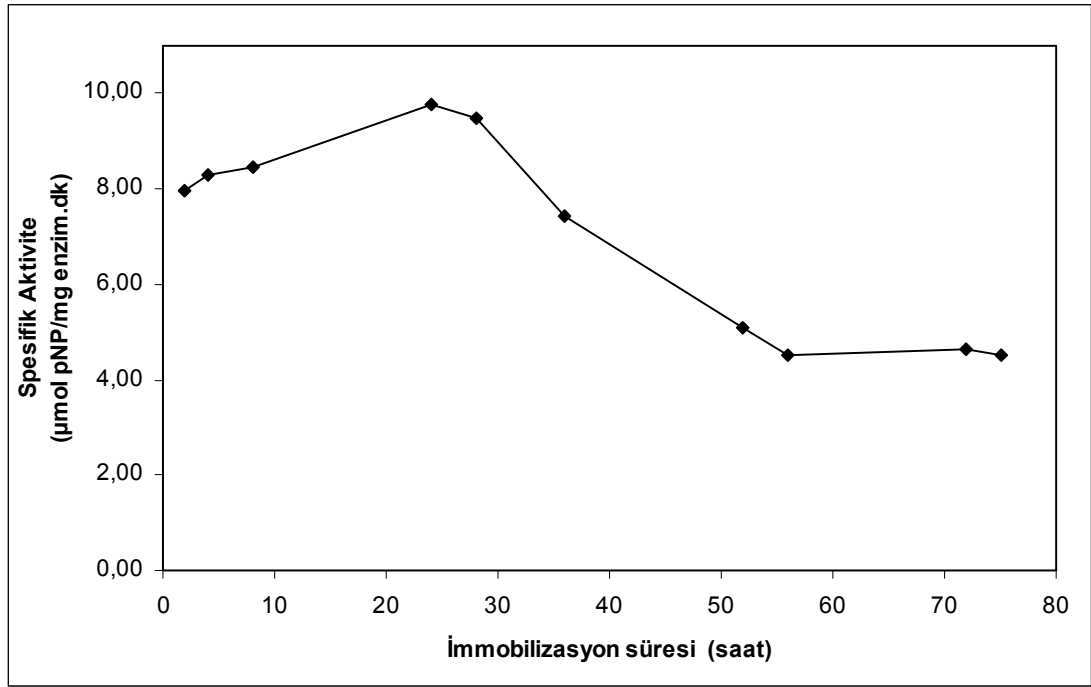
Metanolün enzimi inhibe etmesinin en aza indirilebilmesi için, biyodizel üretimi sırasında metanol reaksiyon ortamına dört basamakta eklenmiştir. Her bir biyodizel üretimi arasında destek maddesi t-bütanol ile yıkanarak, destek maddesinin üzerindeki yağ ve gliserol uzaklaştırılmıştır.

4.4. Kitosan Kürelerine Lipaz Enzimi İmmobilizasyonu

Kitosan kürelerine enzim immobilizasyonuna enzim konsantrasyonu ve immobilizasyon süresinin etkisi incelenmiştir.

4.4.1. Kitosan Kürelerine Lipaz İmmobilizasyonuna İmmobilizasyon Süresinin Etkisi

Kitosan kürelerine optimum immobilizasyon süresini belirlemek amacıyla 1 g küre 5 mL %10'luk enzim çözeltisiyle değişik sürelerde manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Süre sonunda immobilize enzimin spesifik aktivitesi belirlenerek en uygun immobilizasyon süresi belirlenmiştir. İmmobilizasyona süresine karşılık, elde edilen spesifik aktivite değerleri şekil 4.4.1.1.'de gösterilmiştir.

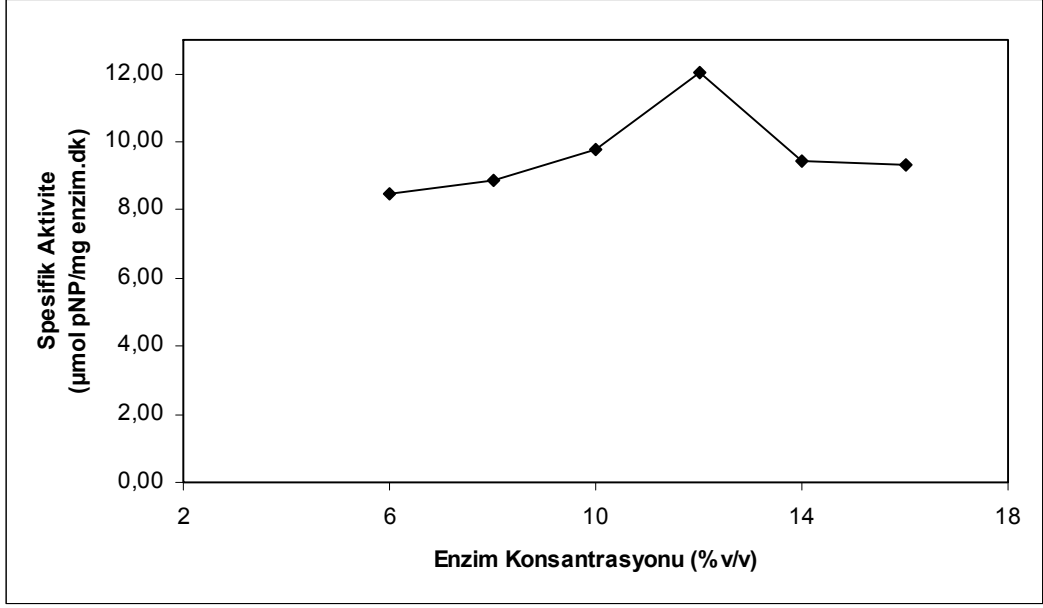


Şekil 4.4.1.1. İmmobilizasyon süresiyle spesifik aktivitedeki değişim

Spesifik aktivite zamana göre incelendiğinde, en yüksek spesifik aktivitenin 24 saat immobilizasyon süresi sonrasında sağlandığı görülmüştür. 24 saatin altındaki ve üstündeki sürelerde spesifik aktivitenin daha düşük değerde olduğu tespit edilmiştir.

4.4.2. Kitosan Kürelerine Lipaz İmmobilizasyonuna Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Kitosan kürelerine optimum immobilizasyon süresini belirlendikten sonra 1 g küre farklı konsantrasyonlardaki 5 mL enzim çözeltisiyle 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Süre sonunda enzimin spesifik aktivitesi tayin edilerek, enzim konsantrasyonuna karşı spesifik aktivite değeri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafik şekil 4.4.2.1.'de görülmektedir.



Şekil 4.4.2.1. Enzim konsantrasyonu ile spesifik aktivitedeki değişim

Spesifik aktivite enzim konsantrasyonuna göre incelendiğinde, en yüksek spesifik aktivitenin % 12 enzim konsantrasyonunda sağlandığı görülmüştür. % 12'nin altındaki ve üstündeki konsantrasyonlarda spesifik aktivitenin daha düşük değerde olduğu tespit edilmiştir.

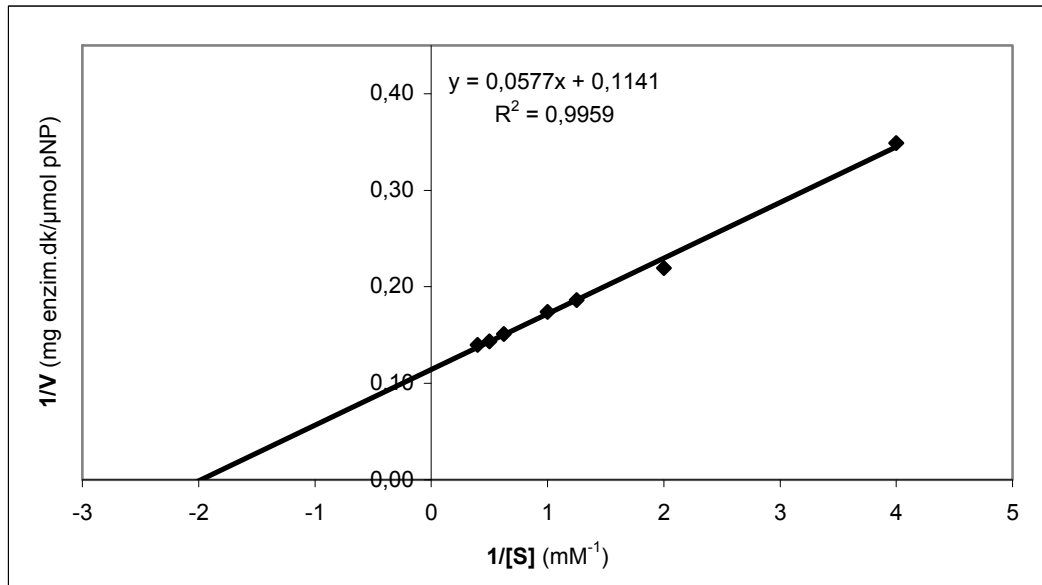
4.5. STR-DVB-PGA Polimerine İmmobilize Edilmiş Lipozyme TL 100L ve Kitosan Kürelere İmmobilize Edilmiş Novozyme 735 Enzimlerinin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş Lipozyme TL 100L enzimi için, değişik konsantrasyonlarda *p*NPP çözeltisi kullanılarak aktivite tayini yapıldığında elde edilen sonuçlar çizelge 4.5.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5.1. STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş Lipozyme TL 100L enzimi için [S] ve V değerleri

[S] (mM)	V ($\mu\text{mol pNP/mg}$ enzim.dk)	1/[S] (mM^{-1})	1/V (mg enzim.dk/ $\mu\text{mol pNP}$)
0,25	2,87	4	0,35
0,5	4,56	2	0,22
0,8	5,37	1,25	0,19
1	5,75	1	0,17
1,6	6,62	0,625	0,15
2	6,98	0,5	0,14
2,5	7,16	0,4	0,14

Çizelge 4.5.1.'deki değerleri kullanarak Lineweaver-Burk denklemine göre çizilen grafik şekil 4.5.1.'de görülmektedir.



Şekil 4.5.1. STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş Lipozyme TL 100L enzimi için çizilen Lineweaver-Burk denklemini grafiği

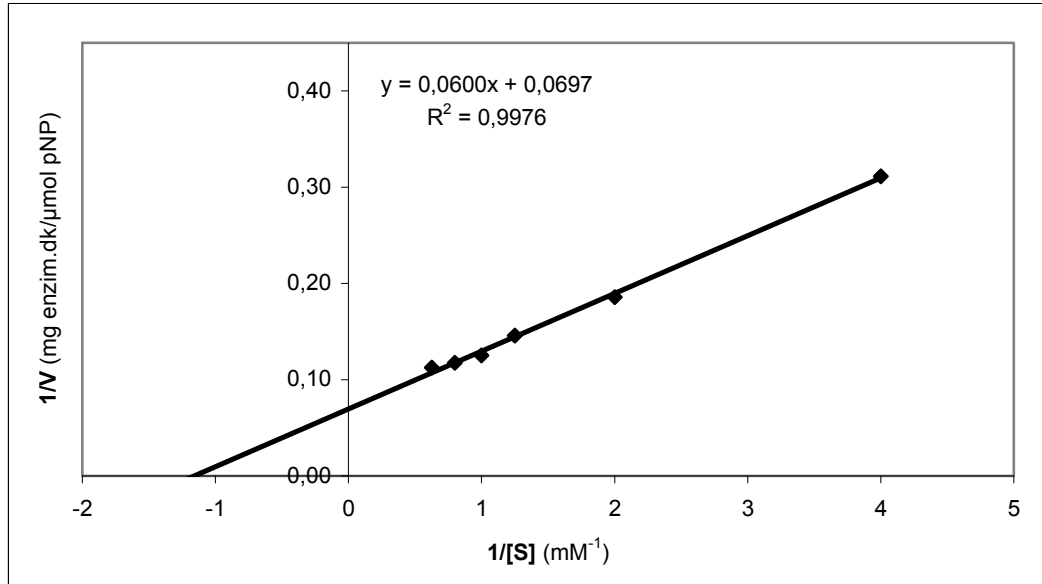
Çizilen grafik yardımıyla STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş Lipozyme TL 100L enzimi için K_m değeri 1,98 mM, V_{max} değeri ise 8,76 $\mu\text{mol pNP/mg}$ enzim.dk olarak belirlenmiştir.

Kitosan kürelere immobilize edilmiş Novozyme 735 enzimi için, değişik konsantrasyonlarda *p*NPP çözeltisi kullanılarak aktivite tayini yapıldığında elde edilen sonuçlar çizelge 4.5.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5.2. Kitosan kürelere immobilize edilmiş Novozyme 735 enzimi için [S] ve V değerleri

[S] (mM)	V ($\mu\text{mol } p\text{NP}/\text{mg}$ enzim.dk)	1/[S] (mM^{-1})	1/V (mg enzim.dk/ $\mu\text{mol } p\text{NP}$)
0,25	3,21	4	0,31
0,5	5,38	2	0,19
0,8	6,86	1,25	0,15
1	7,99	1	0,13
1,25	8,51	0,8	0,12
1,6	8,87	0,625	0,11

Çizelge 4.5.2.'deki değerleri kullanarak Lineweaver-Burk denklemine göre çizilen grafik şekil 4.5.2.'de görülmektedir.



Şekil 4.5.2. Kitosan kürelere immobilize edilmiş Novozyme 735 enzimi için çizilen Lineweaver-Burk denklemi grafiği

Çizilen grafik yardımıyla Kitosan kürelere immobilize edilmiş Novozyme 735 enzimi için K_m değeri 1,16 mM, V_{max} değeri ise 14,35 $\mu\text{mol } p\text{NP}/\text{mg enzim.dk}$ olarak belirlenmiştir.

4.6. Atık Kanola Yağının Özellikleri

Biyodizel üretiminde kullanılan atık kanola yağının iyot sayısı, asit sayısı, astitliği ve toplam polar madde miktarı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.6.1.'de görülmektedir.

Çizelge 4.6.1. Atık kanola yağının bazı özellikleri

	Sonuç
İyot sayısı	100,87 \pm 4,00 g iyot/ 100 g yağ
Asit sayısı	0,31 \pm 0,03 mg KOH/ g yağ
Asitlik	0,16 \pm 0,01 g oleik asit/100 g yağ
Toplam polar madde	% 8,32 \pm 0,32

4.7. Atık Kanola Yağından Biyodizel Üretimi

STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş *Thermomyces lanuginosus* lipaz enzimi ve kitosan kürelere immobilize edilmiş *Candida antarctica A* lipaz enzimi için en yüksek spesifik aktiviteyi sağlayan immobilizasyon koşulları belirlenmiştir. Optimum koşullarda immobilizasyon yapıldıktan sonra biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir.

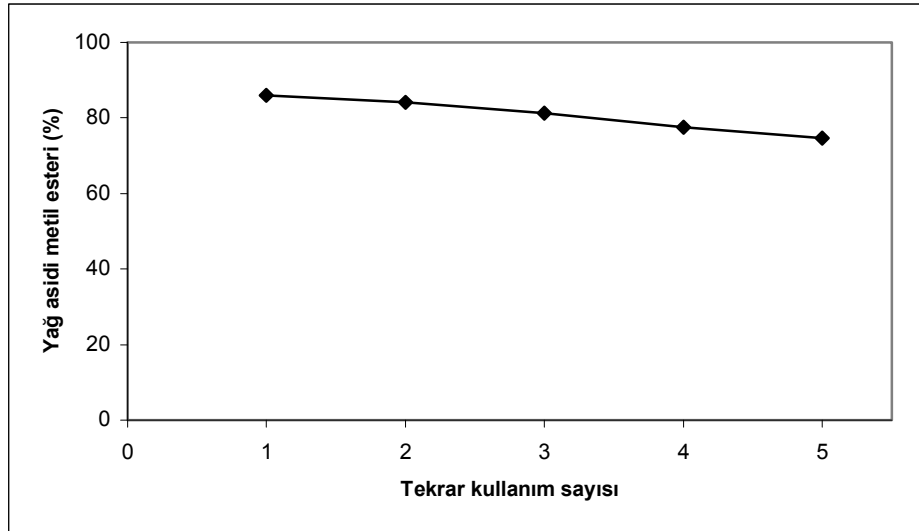
4.7.1. STR-DVB-PGA Polimerine Lipaz İmmobilizasyonu ile Biyodizel Üretimi

STR-DVB-PGA polimerine *Thermomyces lanuginosus* lipaz immobilize edilerek üretilen biyodizelin bazı özellikleri çizelge 4.7.1.1.'de verilmiştir. Tekrar üretim sayısı ile elde edilen biyodizel miktarı arasında ilişki şekil 4.7.1.1.'de görülmektedir.

Çizelge 4.7.1.1. Üretilen biyodizelin bazı özellikleri

	Sonuç
İyot sayısı	91,26 ± 3,79 g iyot/ 100 g biyodizel
Asit sayısı	0,17 ± 0,01 mg KOH/ g biyodizel
Asitlik	0,09 ± 0,01 g oleik asit/100 g biyodizel

Üretilen biyodizelin asit sayısının, biyodizelin üretildiği atık kanola yağından düşük olması, atık yağ içindeki serbest yağ asitlerinin bir kısmının da lipaz enzimi tarafından biyodizele dönüştürüldüğünü göstermektedir.



Şekil 4.7.1.1. STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilen *Thermomyces lanuginosus* lipaz enzimi ile yapılan biyodizel üretiminde tekrar kullanım sayısı ile biyodizel verimindeki değişim

STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilen *Thermomyces lanuginosus* lipaz enzimi ile yapılan biyodizel üretiminde en yüksek yağ asidi metil esteri miktarı 1. üretimde % 85,95 olarak elde edilmiştir. 2.; 3.; 4. ve 5. tekrarlarda sırasıyla %1,81; %2,84; %3,71; %2,91 verim kaybı gözlenmiştir. 5. tekrar sonundaki ester verimindeki toplam azalma %11,27 olarak belirlenmiştir.

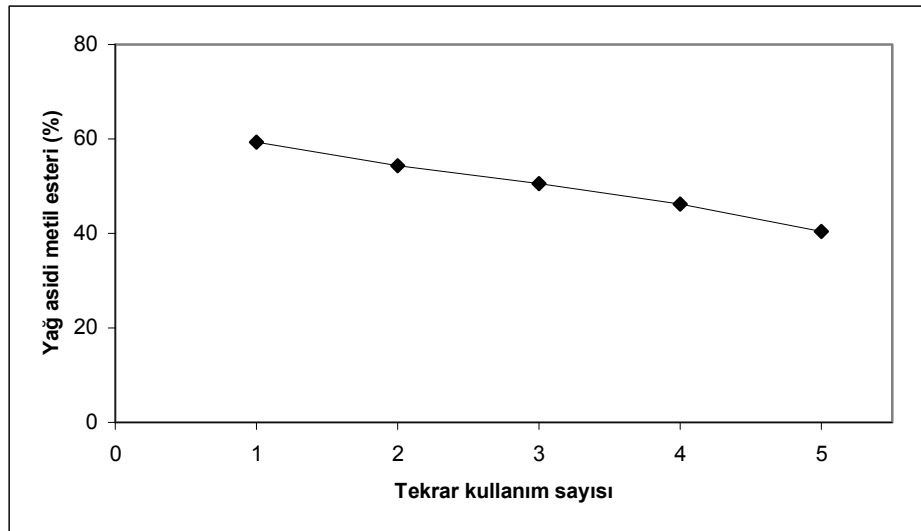
4.7.2. Kitosan Kürelere Lipaz İmmobilizasyonu ile Biyodizel Üretimi

Candida antarctica A lipaz enzimi immobilize edilmiş kitosan kürelerinden elde edilen biyodizel bazı özellikleri çizelge 4.7.2.1’de verilmiştir. Tekrar üretim sayısı ile elde edilen biyodizel miktarı arasında ilişki şekil 4.7.2.1.’de görülmektedir.

Çizelge 4.7.2.1. Üretilen biyodizelin bazı özellikleri

	Sonuç
İyot sayısı	97,38 ± 3,82 g iyot/ 100 g biyodizel
Asit sayısı	0,24 ± 0,01 mg KOH/ g biyodizel
Asitlik	0,12 ± 0,01 g oleik asit/100 g biyodizel

Üretilen biyodizelin asit sayısının, biyodizelin üretildiği atık kanola yağından düşük olması, atık yağ içindeki serbest yağ asitlerinin bir kısmının da biyodizele dönüştüğünü göstermektedir. Kitosan kürelere immobilize edilen lipaz ile üretilen biyodizel verimi STR-DVB-PGA polmerine immobilize edilmiş lipaz ile üretilenden daha düşük olduğu için asit sayısındaki azalma da daha az olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.7.2.1. Kitosan kürelere immobilize edilen *Candida antarctica A* lipaz enzimi ile yapılan biyodizel üretiminde tekrar kullanım sayısı ile biyodizel verimindeki değişim

Kitosan kürelere immobilize edilen *Candida antarctica* A lipaz enzimi ile yapılan biyodizel üretiminde en yüksek yağ asidi metil esteri miktarı 1. üretimde %59,32 olarak elde edilmiştir. 2.; 3.; 4. ve 5. tekrarlarında sırasıyla %4,95; %3,88; %4,24; %5,86 verim kaybı gözlenmiştir. 5. tekrar sonundaki ester verimindeki toplam azalma %18,93 olarak belirlenmiştir.

5. SONUÇ

Enzimler birçok avantajından dolayı, endüstriyel alanda geniş uygulama alanları bulmaktadır. Enzimlerin maliyeti oldukça yüksek olduğundan, kullanımlarının daha ekonomik hale getirilmesi için yapılan çalışmalar gittikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Serbest enzimlerin çözelti ortamında kararlılıklarının fazla olmaması, reaksiyonun sonlandırılmasının zor olması ve aktivitelerini kaybetmeden reaksiyon ortamından uzaklaştırılamamaları kullanımlarının sınırlandırılmasına neden olmaktadır. Bu olumsuz etkilerin ortadan kaldırılabilmesi için çeşitli enzim immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir.

Bu çalışmada enzim immobilizasyonu için iki farklı polimerik destek maddesi sentezlenmiş ve iki farklı mikroorganizmadan elde edilen lipaz enziminin kovalent olarak immobilizasyonunda kullanılmıştır. Mikroporoz stiren-divinilbenzen-poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) polimerine *Thermomyces lanuginosus* lipaz kovalent olarak immobilize edilmiş ve immobilizasyon koşulları en yüksek spesifik aktiviteyi sağlayacak şekilde kemometrik yöntemler kullanılarak optimize edilmiştir. Spesifik aktivite üzerine enzim konsantrasyonu, tampon pH'ı, tampon konsantrasyonu ve immobilizasyon süresinin etkisi incelenmiştir. Optimum immobilizasyon koşulları, enzim konsantrasyonu %4, tampon pH'ı 8, tampon konsantrasyonu 75 mM ve immobilizasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda immobilizasyon sonrasında immobilize lipaz katalizörlüğünde atık kanola yağından %85,95 verimle biyodizel elde edilmiştir.

Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak hazırlanan kitosan kürelere *Candida antarctica A* lipaz kovalent olarak immobilize edilmiştir. Immobilizasyon sonucu elde edilen spesifik aktivite üzerine enzim konsantrasyonu ve immobilizasyon süresinin etkisi incelenmiştir. En yüksek spesifik aktivite %12 enzim konsantrasyonu ve 24 saat immobilizasyon süresinde elde edilmiştir. Optimum koşullarda immobilizasyon sonrasında bu enzim atık kanola yağından biyodizel üretiminde katalizör olarak kullanılmış ve %59,32 verimle biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir.

Lipaz katalizörlüğünde trigliseridlerin yağ asidi metil esterlerine dönüştürülmesi, yan ürünlerin oluşmaması, oluşan ürünlerin kolaylıkla ayrılması, reaksiyon koşullarının ılımlı olması ve oluşan biyodizelin kullanımı için saflaştırma işlemlerine gerek duyulmaması gibi önemli avantajlara sahiptir. Enzimatik reaksiyonlar yağın serbest yağ içeriği ve su içeriğinden etkilenmediği için atık bitkisel yağlardan biyodizel üretiminde de rahatlıkla kullanılabilir. Atık bitkisel yağların biyodizel üretiminde kullanılmasıyla üretim maliyeti düşürülmekte, gıda olarak kullanılacak yağların biyodizel için kullanılmasının önüne geçilmekte ve çevreye zarar veren atık yağların bertarafı sağlanmaktadır.

Enzimatik biyodizel üretimi için geliştirilen deneysel düzenek sayesinde, biyodizel üretimi sırasında yan ürün olarak meydana gelen gliserol ayrı bölümde toplanarak gliserolün enzimi inhibe etmesi önlenmiştir. Ayrıca lipaz enzimi inhibe eden bir diğer reaksiyon bileşeni olan metanol, reaksiyon ortamına basamaklı olarak eklenerek enzimi inhibe etmesi en aza indirilmiştir.

Bitkisel atık yağlar, basit bir süzme işlemiyle içindeki katı maddelerin uzaklaştırılmasından sonra hiç bir ön işlem yapılmadan enzimatik biyodizel üretiminde kullanılabilir. Enzimatik yöntemle bitkisel atık yağlardan biyodizel üretilmesi amacıyla geliştirilen yöntemlerin, yapılacak çalışmalarla endüstriyel boyutlarda uygulanmaya başlaması mümkündür.

KAYNAKLAR

- AFACAN, T. 2009.** Biyoyakıtların Dünyadaki ve Türkiye'deki Durumu. Marmara Belediyeler Birliği, İstanbul, 09 Nisan 2009.
- AKSOY, C. 2003.** Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul. s.10.
- ALPTEKİN, E., M. ÇANAKÇI. 2005.** Biyodizel ve Türkiye'deki Durumu. Mühendis ve Makine 561(47):57-64.
- ALPTEKİN, E., M. ÇANAKÇI. 2008.** Farklı Hammaddelerden Üretilen Metil Ester ve Gliserinin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi, 23(3):549-556.
- ALTUN, Ş., A.M. GÜR. 2005.** Bitkisel Yağların Alternatif Yakıt Olarak Dizel Motorlarında Kullanılması. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 9(3):35-42.
- BARNWAL, B.K., M.P. SHARMA. 2005.** Prospects of Biodiesel Production from Vegetable Oils in India. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 9(4):363-378.
- BASTIDA, S., F.J. SANCHEZ-MUNIZ. 2001.** Thermal Oxidation of Olive Oil, Sunflower Oil and a Mix of Both Oils During Forty Discontinuous Domestic Fryings of Different Foods. Food Science Technology, 7:15–21.
- BINGÖL, G. 1977.** Vitaminler ve Enzimler. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ders Kitabı Serisi No:46, s. 41-45.
- BLUMENTHAL, M.M. 1991.** A New Look at the Chemistry and Physics of Deep-Fat Frying. Food Technology, 45(2):68–71.
- BOSKOU, G., F.N. SALTA, A. CHIOU, E. TROULLIDOU, N.K. ANDRIKOPOULOS. 2006.** Content of *Trans*, *Trans*-2,4-Decadienal in Deep-Fried and Pan-Fried Potatoes. European Journal of Lipid Science and Technology, 108:109-115.
- BULUT, C. 2008.** Atık Bitkisel Yağ Metil Esteri Kullanılan Dizel Motorunda Aşırı Doldurma Uygulamasının Motor Performansına Etkisinin İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, Sakarya Üniversitesi, Sakarya. s. 24.
- CHOE, E., D.B. MIN. 2005.** Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods. Journal of Food Science, 70:142-159.
- CHOE, E., D.B. MIN. 2007.** Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. Journal of Food Science, 72 (5):77-86.

CHRISTENSEN, M.W., L. ANDERSEN, T.L. HUSUM, O. KIRK. 2003. Industrial Lipase Immobilization : Restructured Lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105:318-321.

CHRISTOPOULOU, C.N., E.G. PERKINS. 1989. Isolation and Characterization of Dimmers Formed in Used Soybean Oil. *Journal American Oil Chemistry Society*, 66:1360-1370.

CHUNG, J., J. LEE, E. CHOE. 2004. Oxidative Stability of Soybean and Sesame Oil Mixture During Frying of Flour Dough. *Journal of Food Science*, 69:574-578.

CLARK, S.J., L. WAGNER, M.D. SCHROCK, P.G. PIENNAAR. 1984. Methyl and Ethyl Soybean Esters as Renewable Fuels for Diesel Engines. *Journal American Oil Chemistry Society*, 61(10):1632-1638.

CUESTA, C., F.J. SANCHEZ-MUNIZ, C. GARRIDO-POLONIO, S. LOPEZ-VARELA, R. ARROYO. 1993. Thermooxidative and Hydrolytic Changes in Sunflower Oil Used in Frying with a Fast Turnover of Fresh Oil. *Journal American Oil Chemistry Society*, 70:1069-1073.

ÇAKIR, N. 2009. Bitkisel Atık Yağlar. Kadıköy Belediyesi, Başkanlık Brifing Salonu. İstanbul, 25 Şubat 2009.

ÇANAKÇI, M., A.N. ÖZSEZEN. 2005. Atık Mutfak Yağlarının Alternatif Dizel Yakıtı Olarak Değerlendirilmesi Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 18:81-91.

DANA, D., M.M. BLUMENTHAL, I.S. SAGUY. 2003. The Protective Role of Water Injection on Oil Quality in Deep Fat Frying Conditions. *European Food Research and Technology*, 217:104-109.

DEMİR, C. 2008. Bitkisel Atık Yağların Kullanım Yerlerine Göre Gerekli Standartlar ve Kontrol Yöntemleri. Bitkisel Atık Yağların İnsan Sağlığı ve Çevreye Etkileri, Biyodizelin Önemi Sempozyumu. İstanbul, 15 Ocak 2008.

DEMİRBAŞ, A. 2005. Biodiesel Production from Vegetable Oils Via Catalytic and Non-catalytic Supercritical Methanol Transesterification Methods. *Progress in Energy and Combustion Science*, 31:466-487.

DEMİRBAŞ, A. 2006. Biodiesel Production Via Non-catalytic SCF Method and Biodiesel Fuel Characteristics. *Energy Conversion and Management*, 4:2271-2282.

DİZGE, N., O. CANLI, M. KARPUZCU. 2005. Biyodizel Kullanımının Çevre İçin Önemi. III. Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu. Mersin, 19-21 Ekim 2005.

DİZGE, N., B. KESKİNLER. 2008. Enzymatic Production of Biodiesel from Canola Oil Using Immobilized Lipase. *Biomass and Bioenergy*, 32(12):1274-1278.

DOBARGANES, M.C. 2000. Determination of Polar Compounds, Polymerized and Oxidized Triacylglycerols, and Diacylglycerols in Oils and Fats. *Pure and Applied Chemistry*, 72:1563-1575.

DOBARGANES, C., G. MARQUEZ-RUIZ, J. VELASCO. 2000. Interactions Between Fat and Food During Deep-frying. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102:521-528.

ENWEREMADU, C.C., M.M. MBARAWA. 2009. Technical Aspects of Production and Analysis of Biodiesel From Used Cooking Oil-A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, In Pres.

FELIZARDO, P., M.J.N. CORREIA, , I. RAPOSO, J.F. MENDES, R. BERKEMEIER, J.M. BORDADO. 2006. Production of Biodiesel from Waste Frying Oils. *Waste Management*, 26(5):487-494.

FREEDMAN, B., E.H. PRYDE, T.L. MOUNTS. 1984. Variables Affecting The Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils. *Journal American Oil Chemistry Society*, 61(10):1638-1643.

FREGA, N., M. MOZZON, G. LECKER. 1999. Effects of Free Fatty Acids on Oxidative Stability of Vegetable Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76:325-329.

FUKUDA, H., A. KONDO, H. NODA. 2001. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(5):405-416.

GERPEN, J.V. 2005. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*, 86(10):1097-1107.

GLISIC, S., D. SKALA. 2009. The Problems in Design and Detailed Analyses of Energy Consumption for Biodiesel Synthesis at Supercritical Conditions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49(2):293-301.

HAMA, S., H. YAMAJI, T. FUKUMIZU, T. NUMATA, S. TAMALAMPUDI, A. KONDO, H. NODA, H. FUKUDA. 2007. Biodiesel-Fuel Production in a Packed-Bed Reactor Using Lipase-Producing *Rhizopus Oryzae* Cells Immobilized within Biomass Support Particles. *Biochemical Engineering Journal*, 34(3):273-278.

HAMA, S., T. NUMATA, S. TAMALAMPUDI, A. YOSHIDA, H. NODA, A. KONDO, H. FUKUDA. 2009. Use of Mono- And Diacylglycerol Lipase as Immobilized Fungal Whole Cells to Convert Residual Partial Glycerides Enzymatically into Fatty Acid Methyl Esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 58:93-97.

HASAN, F., A.A. SHAH, A. HAMEED. 2006. Industrial Applications of Microbial Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:235-251.

HEİN, M., H. HENNING, H.D. ISENGARD. 1998. Determination of Total Polar Parts with New Methods for the Quality Survey of Frying Fats and Oils. *Talanta*, 47:447–454.

HIATT, R., T. MILL, K.C. IRWIN, T.R. MAYO, C.W. GOULD, J.K. CASTLEMAN. 1968. Homolytic Decomposition of Hydroperoxides. *Journal of Organic Chemistry*, 33:1416-1441.

HILAL, N., R. NIGMATULLIN, A. ALPATOVA. 2004. Immobilization of Cross-Linked Lipase Aggregates within Microporous Polymeric Membranes. *Journal of Membran Science*, 238:131–141.

HOUHOULA, D.P., V. OREOPOULOU, C. TZIA. 2003. The Effect of Process Time and Temperature on the Accumulation of Polar Compounds in Cottonseed Oil During Deep-Fat Frying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83:314-319.

http://www.eie.gov.tr/turkce/YEK/biyoenenerji/02-biyodizel/bd_yakit_ozellik.html,
Erişim tarihi: 16.07.2009. Konu: Biyodizelin yakıt özellikleri.

http://www.eie.gov.tr/turkce/YEK/biyoenenerji/02-biyodizel/bd_cevre.html, Erişim Tarihi: 16.07.2009. Konu: Biyodizelin çevresel özellikleri.

<http://www.epdk.gov.tr/lisans/petrol/bayilik/isleme.asp>, Erişim Tarihi: 15.08.2009. Konu: Lisanslı biyodizel üreticisi firmalar.

http://www.albiyobir.org.tr/dunyada_b.htm, Erişim Tarihi: 18.07.2009. Konu: Dünyada biyodizel.

http://www.albiyobir.org.tr/trde_b.htm, Erişim Tarihi: 18.07.2009. Konu: Türkiye’de biyodizel.

http://www.albiyobir.org.tr/aby_b.htm, Erişim Tarihi: 20.07.2009. Konu: Atık Yağların Çevreye Zararları.

<http://www.ebb-eu.org/stats.php>, Erişim Tarihi: 08.08.2009. Konu: The EU Biodiesel Industry.

<http://www.libralabs.com/TKT/Information/RefTPMIndustrial.pdf>, Erişim Tarihi: 03.08.2009. Konu: Establishing Discard Points for Industrial Frying Oils.

HUANG, X.J., A.G. YU, Z.K. XU. 2008. Covalent Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* onto poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) Electrospun Fibrous Membranes for Potential Bioreactor Application. *Bioresource Technology*, 99:5459–5465.

KARAOSMANOĞLU, F. 2008. Biyomotorin ve Türkiye. <http://www.biyomotorin-biodiesel.com/biomoto.html>, Erişim tarihi: 12.08.2009.

KIM, I.H., C.J. KIM, D.H. KIM. 1999. Physicochemical Properties of Methyl Linoleate Oxidized at Various Temperatures. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 31:600-605.

KULKARNI, M.G., A.K. DALAI. 2006. Waste Cooking Oils an Economical Source for Biodiesel: A Review. *Industrial&Engineering Chemistry Research*, 45:2901-2913.

LASCARAY, L. 1949. Mechanism of Fat Splitting. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 41:786-790.

LUISI, P.L., L. MAGID. 1986. Solubilization of Enzymes and Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar Solutions. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 20:409-474.

MA, F., L.D. CLEMENTS, M.A. HANNA. 1999. The Effect of Mixing on Transesterification of Beef Tallow. *Bioresource Technology*, 69:(3)289-293.

MA, F., M.A. HANNA. 1999. Biodiesel Production: A Review. *Bioresource Technology*, 70:1-15.

MANFRED, T.R. 2002. Lipases As Practical Biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6:145-150.

MARCHETTI, J.M., V.U. MIGUEL, A.F. ERRAZU. 2007. Possible Methods for Biodiesel Production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11(6):1300-1311.

MATEO, C., J.M. PALOMO, G. FERNANDEZ-LORENTE, J.M. GUISAN, R. FERNANDEZ-LAFUENTE. 2007. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity Via Immobilization Techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1451-1463.

MAY, W.A., R.J. PETERSON, S.S. CHANG. 1983. Chemical Reactions Involved in The Deep-Fat Frying of Foods: IX. Identification of the Volatile Decomposition Products of Triolein. *Journal American Oil Chemistry Society*, 60:990-995.

MELTZER, J.B., E.N. FRANKEL, T.R. BESSLER, E.G. PERKINS. 1981. Analysis of Thermally Abused Soybean Oils For Cyclic Monomers. *Journal American Oil Chemistry Society*, 58:779-784.

MIN, D.B., J.M. BOFF. 2002. Lipid Oxidation of Edible Oil. In: C.C. Akoh., D.B. Min (Editors), *Food lipids*. 2nd edition New York:Marcel Dekker Inc. p. 344.

MOREIRA, R.G., M.E. CASTELL-PEREZ, M.A. BARRUFET. 1999. Frying Oil Characteristics. In:Deep-fat frying; fundamentals and applications. Gaithersburg, Md.:Chapman&Hall Food Science Book. p. 33-74.

NAWAR, W.W. 1969. Thermal Degradation of Lipids: A Review. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 17:18-21.

NAWAR, W.W. 1984. Chemical Changes in Lipids Produced by Thermal Processing. *Journal of Chemical Education*, 61:299–302.

NAWAR, W.W. 1985. Chemistry of thermal oxidation. In: D.B. Min., T.H. Smouse (Editors), *Flavor Chemistry of Fats and Oils*, American Oil Chemists Society, p. 39-60.

NAZ, S., R. SIDDIQI, H. SHEIKH, S.A. SAYEED. 2005. Deterioration of Olive, Corn, and Soybean Oils Due to Air, Light, Heat, and Deep-frying. *Food Research International*, 38:127-134.

NOUREDDINI, H., X. GAO, R.S. PHILKANA. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* Lipase for Biodiesel Fuel Production from Soybean Oil. *Bioresource Technology*, 96:769–777.

OZIEWICZ, M.D., M.K. TYMOSZCZYK. 2005. Quality Changes in Selected Frying Fats During Heating in a Model System. *Journal of Food Lipids*, 12:159-168.

ÖZTÜRK, B. 2001. Immobilization Lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports. MSc Thesis, İzmir Institute of Technology, İzmir. p.102.

ÖZTÜRK, M. 2004. Kullanılmış Bitkisel ve Hayvansal Yağlar. Çevre ve Orman Bakanlığı, Ankara.

ÖZTÜRK, M. 2006. Bitkisel ve Hayvansal Atık Yağdan Biyodizel Üretimi. Çevre ve Orman Bakanlığı, Ankara.

ÖZTÜRK, N., S. AKGÖL, M. ARISOY, A. DENIZLI. 2007. Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres. *Separation and Purification Technology*, 58:83–90.

PANDEY, A., S. BENJAMIN, C.R. SOCCOL, P. NIGAM, N. KRIEGER, V.T. SOCCOL. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and applied biochemistry* , 29:119-131.

PAUL, S., G.S. MITTAL. 1997. Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37:635-662.

PEDRESCHI, F., P. MOYANO, K. KAACK, K. GRANBY. 2005. Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. *Food Research International*, 38:1-9.

PEERS, K.E., P.A.T. SWOBODA. 1982. Deterioration of sunflower seed oil under simulated frying conditions and during small-scale frying of potato chips. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33:389-395.

POKORNY, J. 1989. Flavor chemistry of deep fat frying in oil. In: Min DB, Smouse TH, editors. *Flavor chemistry of lipid foods*. American Oil Chemists Society. p. 113-115.

RAJAKUMARA, E., P. ACHARYA, S. AHMAD, R. SANKARANARYANAN, N.M. RAO. 2008. Structural basis for the remarkable stability of *Bacillus subtilis* lipase (Lip A) at low pH. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784:302–311.

RANGANATHAN, S.V., S.L. NARASIMHAN, K. MUTHUKUMAR. 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, 99(10):3975-3981.

ROMERO, A., C. CUESTA, F.J. SANCHEZ-MUNIZ. 1998. Effect of oil replenishment during deep fat frying of frozen foods in sunflower oil and high-oleic acid sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75:161-167.

SARIYILDIZ, Ü., 2005. Petrol Darboğazında Alternatif: Biyodizel. <http://www.tepkime.net/2005/10/petrol-dar-boazna-alternatif-biyodizel.html>, 2009.

SHIMADA, Y., Y. WATANABE, A. SUGIHARA, Y. TOMINAGA. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17:133-142.

STEVENSON, S.G., M. VAISEY-GENSER, N.A.M. ESKIN. 1984. Quality control in the use of deep frying oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61:1102-1108.

TAKEOKA, G.R., G.H. FULL, L.T. DAO. 1997. Effect of heating on the characteristics and chemical composition of selected frying oil and fat. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45:3244-3249.

TAYLOR, R.F. 1991. Protein Immobilization Fundamentals and Applications. Marcel Dekker Inc. United States of America, p.73-139.

TEKMAN, Ş., N. ÖNER. 1994. Genel Biyokimya Dersleri. İstanbul Üniversitesi Yayınları, Eczacılık Fakültesi, İstanbul.

TELEFONCU, A. 1997. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

TOMPKINS, C., E.G. PERKINS. 2000. Frying performance of low-linolenic acid soybean oil. *Journal American Oil Chemistry Society*, 77:223-229.

TOSCHI, T.G., A. COSTA, G. LERCKER. 1997. Gas chromatographic study on high-temperature thermal degradation products of methyl linoleate hydroperoxides. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 74:387-391.

TSENG, Y.C., R.G. MOREIRA, X. SUN 1996. Total frying use time effects on soybean oil deterioration and on tortilla chip quality. *International Journal of Food Science & Technology*, 31:287-294.

TÜRKAY, S. 2007. Kızartma İşlemi ve Kızartma Yağları. *Biyoyakıt Dünyası*, 8:24-27.

TÜRKAY, S. 2008. Atık Bitkisel Yağların İnsan Sağlığına Etkileri. Atık Bitkisel Yağların İnsan sağlığı ve Çevreye Etkileri. Biyodizelin Önemi Sempozyumu. İstanbul, 10 Ocak 2008.

VAIDYA, B.K., G.C. INGAVLE, S. PONRATHNAM, B.D. KULKARNI, S.N. NENE. 2008. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles. *Bioresource Technology*, 99:3623–3629.

VILLENEUVE, P., J.M. MUDERHWA, J. GRAILLE, J.M. HAAS. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9:113-148.

WATANABE, Y., Y. SHIMADA, A. SUGIHARA, Y. TOMINAGA. 2001. Enzymatic Conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a Fixed-Bed Bioreactor. *Journal American Oil Chemistry Society*, 78(7):703-707.

WISEMAN, A. 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology. 2nd edition, John Wiley&Sons Chicester, England.

WU, W.H., T.A. FOGLIA, W.N. MARMER, J.G. PHILIPS. 1999. Optimizing Production of Ethyl Esters of Grease Using 95% Ethanol by Response Surface Methodology, 76:517-521.

WU, C.M., S.Y. CHEN. 1992. Volatile compounds in oils after deep frying or stir frying and subsequent storage. *Journal American Oil Chemistry Society*, 69:858-865.

YOON, S.H., M.Y. JUNG, D.B. MIN. 1988. Effects of thermally oxidized triglycerides on the oxidative stability of soybean oil. *Journal American Oil Chemistry Society*, 65(10):1652-1656.

EKLER

Tez Kapsamında Yapılan Bilimsel Faaliyetler

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

- Aybastier Ö., Dizge N., Yücel Y., Demir C., Keskinler B., Kanola Yağının Lipaz Katalizli Transesterifikasyonu, 1. Ulusal Yağlı Tohumlu Bitkiler ve Biyodizel Sempozyumu, 28-31 Mayıs 2007, Samsun.
- Aybastier Ö., Dizge N., Yücel Y., Demir C., Keskinler B., Lipaz Enziminin Değişik Matrikslere İmmobilizasyonu ve Biyodizel Üretiminde Kullanılması, 1. Ulusal Yağlı Tohumlu Bitkiler ve Biyodizel Sempozyumu, 28-31 Mayıs 2007, Samsun.
- Aybastier Ö., Yücel Y., Demir C., Bazı Lipaz Enzimlerinin Polimer Matriksi Üzerine İmmobilizasyonu ve Biyodizel Üretiminde Kullanılması, 3. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 12-14 Eylül 2007, Bursa.
- Aybastier Ö., Demir C., Lipozyme TL 100L Enziminin Stiren-Divinilbenzen Polimeri Üzerine İmmobilizasyon Parametrelerinin Kemometrik Optimizasyonu, IV. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 25-27 Haziran 2008, Elazığ.

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

- Aybastier Ö., Demir C., Optimization of Immobilization Conditions of *Thermomyces lanuginosus* Lipase on Styrene-divinylbenzene Copolymer Using Response Surface Methodology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, baskıda.

ÖZGEÇMİŞ

01.02.1983 tarihinde Bursa'da doğdu. İlk, orta, lise eğitimini Bursa'da tamamladı. 2001 yılında girdiği Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2005 yılında mezun oldu. 2006 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Şubat 2009'da başladığı araştırma görevliliğine halen devam etmektedir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamız boyunca bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, desteğini ve ilgisini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam Prof.Dr. Cevdet DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Verdiği destekten dolayı TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkürü borç bilirim.

Bu tezi "Bazı Enzimleri Kullanarak Biyodizel Üretimi ve Biyodizel Özelliklerinin Analitik Metotlarla Araştırılması" projesi (F-2004/43) ile destekleyen U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, tecrübelerinden faydalandığım Yrd.Doç.Dr. Yasin YÜCEL'e teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince benden desteğini esirgemeyen sevgili aileme anlayış ve hoşgörülerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.