

***Rhizopus arrhizus* İLE ATIK YEMEKLİK YAĞDAN  
BİYODİZEL ÜRETİMİNİN KESİKLİ SİSTEMDE  
İNCELENMESİ VE OPTİMİZASYONU**

**INVESTIGATION AND OPTIMIZATION OF BIODIESEL  
PRODUCTION FROM WASTE COOKING OIL BY  
*Rhizopus arrhizus* IN A BATCH SYSTEM**

**ŞEYDA ÇAĞATAY**

**PROF.DR. ZÜMRİYE AKSU**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

**DOKTORA TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2019

**Şeyda ÇAĞATAY**'ın hazırladığı "**Rhizopus arrhizus** ile Atık Yemelik Yağdan Biyodizel Üretiminin Kesikli Sistemde İncelenmesi ve Optimizasyonu" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

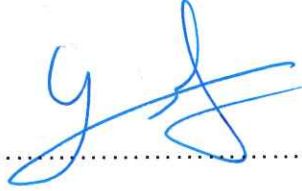
Prof. Dr. Deniz TANYOLAÇ  
Başkan

  
.....

Prof. Dr. Zümriye AKSU  
Danışman

  
.....

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ  
Üye

  
.....

Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN  
Üye

  
.....

Prof. Dr. Nuray OKTAR  
Üye

  
.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak ...../...../.....tarihinde onaylanmıştır.

Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Hayatımız anlamlı kızım Havvanur, oğlum Ahmet Yusuf ve  
eşim M. Turcan ÇAĞAÇI'ya*

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

04./10./2019

  
ŞEYDA ÇAĞATAY

## YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ..... ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

04.10.2019

  
ŞEYDA ÇAĞATAY

## ÖZET

# ***Rhizopus arrhizus* İLE ATIK YEMEKLİK YAĞDAN BİYODİZEL ÜRETİMİNİN KESİKLİ SİSTEMDE İNCELENMESİ VE OPTİMİZASYONU**

**Şeyda ÇAĞATAY**

**Doktora, Kimya Mühendisliği Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zümriye AKSU**

**Ekim 2019, 157 sayfa**

Bu tez çalışmasında, farklı koşullarda üretilen hücre içi lipaz enzimine sahip kurutulmuş *R. arrhizus* küf mantarının katalizör olarak doğrudan kullanıldığı kesikli sistemde, atık yemeklik yağ ve metanolden transesterifikasyon reaksiyonuyla biyodizel üretimi incelenmiş ve reaksiyonu etkileyen parametreler araştırılmıştır.

Çalışmanın ilk kısmında, 30 °C ve 120 rpm karıştırma hızında glukozdan, melastan ve atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'un hücre içi lipaz aktiviteleri karşılaştırıldığında, atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamında üretilen *R. arrhizus*'un en yüksek hücre içi lipaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu besin ortamında atık portakal kabuğunun içerdiği toplam indirgen şeker derişimindeki (TİŞ) 9-21 g/L değişimin mikrobiyal üreme hızına, verime ve hücre içi ve dışı lipaz hidroliz

aktivitelerine etkileri araştırılmıştır. En yüksek mikrobiyal üreme 3,83 g. kuru m.o./L olarak 21,0 g/L TİŞ içeren 70 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamında bulunmuşken, en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi ise 0,40 U/mg olarak 15,0 g/L TİŞ içeren 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamında elde edilmiştir.

50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamına hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin artırılması için indükleyici olarak derişimi 5-40 g/L aralığında değişen zeytinyağı veya atık yemeklik yağ (AYY) eklenerek, ilave yağ derişiminin mikrobiyal üremeye ve hücre içi lipaz hidroliz aktivitesine etkileri araştırılmıştır. AYY ilavesinin zeytinyağı ilavesine göre hem mikrobiyal üremeyi hem de hücre içi lipaz hidroliz aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. 10 g/L atık yemeklik yağ eklendiği durumda, hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin, AYY içermeyen besin ortamında elde edilen aktiviteye göre % 30 artarak 0,52 U/mg değerine ulaştığı gözlenmiştir. Biyodizel üretim çalışmalarında kullanılacak *R. arrhizus*'un üretilmesi için mikroorganizmanın en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi gösterdiği, 10 g/L AYY'ın ilave edildiği 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamı kullanılmıştır.

Tez çalışmasının ikinci kısmında ise kesikli sistemde biyodizel üretim çalışmaları gerçekleştirilmiş ve AYY'ın biyodizele dönüşümünü doğrudan etkileyen metanol/atık yağ molar oranı, karıştırma hızı, sıcaklık ve biyokatalizör miktarının etkileri araştırılmıştır. Taguchi yöntemine göre tasarlanan ve çalışılan 4 parametre ve 3 seviyelik L<sub>9</sub> deney sistemi ile elde edilen AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşüm değerleri Design-Expert paket programı kullanılarak ANOVA ile analiz edilmiştir. Deney sistemini en iyi tanımlayan ve çalışılan tüm parametrelerin dönüşüm üzerine eş zamanlı etkilerini veren ikinci derece kuadratik polinom eşitliği bulunmuştur. Seçilen parametrelerin AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkileri istatistiksel açıdan da değerlendirilmiş, üç boyutlu yüzey eğrileri elde edilmiştir.

En uygun işletim parametrelerinin saptanması için aynı paket programındaki nümerik optimizasyon fonksiyonu kullanılarak optimizasyon yapılmış ve 4:1

metanol/atık yemeklik yağ molar oranında, 177 rpm karıştırma hızında, 33 °C 'ta ve 1,3 g katalizör miktarında AYY'ın biyodizele dönüşümü en yüksek % 22,3 olarak elde edilmiştir.

Taguchi yöntemiyle tasarlanan deney sistemine göre yapılan dokuz adet deney içerisinde optimizasyon koşullarını en yakın karşılayan deneyler dikkate alınarak transesterifikasyon reaksiyonunun kinetik modellemesi yapılarak 25 ve 35 °C sıcaklıklarda reaksiyon hız sabitleri sırasıyla 0,0079 ve 0,0149 (mol/L)<sup>-2</sup>sa<sup>-1</sup>, aktivasyon enerjisi 48,42 kJ/mol ve frekans faktörü 2,43x10<sup>6</sup> (mol/L)<sup>-2</sup>sa<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.

**Anahtar Kelimeler :** Biyodizel, *R. arrhizus*, lipaz, lipaz hidroliz aktivitesi, atık yemeklik yağ, Taguchi deneysel tasarım yöntemi, optimizasyon, reaksiyon kinetiği.



## ABSTRACT

# INVESTIGATION AND OPTIMIZATION OF BIODIESEL PRODUCTION FROM WASTE COOKING OIL BY *Rhizopus arrhizus* IN A BATCH SYSTEM

**Şeyda ÇAĞATAY**

**Doctor of Philosophy, Department of Chemical Engineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Zümriye AKSU**

**October 2019, 157 pages**

In this thesis study, the production of biodiesel by transesterification reaction from waste cooking oil and methanol was investigated in a batch system using dried *R. arrhizus* fungus, cultivated in different conditions, containing intracellular lipase enzyme directly as a catalyst. Also the parameters affecting the reaction were researched.

In the first stage of study, *R. arrhizus* cultivated in the growth medium prepared from the waste orange peel at 30 °C and 120 rpm was determined having the maximum intracellular lipase activity compared to the intracellular lipase activities obtained from *R. arrhizus* grown in the nutrient media prepared from the glucose and the molasses. The effect of the initial concentration of total reducing sugar (TRS) of waste orange peel in the range of 9-21 g/L on microbial growth rate, yield and intracellular and extracellular lipase hydrolysis activities were investigated. While the maximum microbial growth was found as 3,83 g dried

m.o./L in the growth medium prepared from 70 g/L waste orange peel containing 21,0 g/L TRS, the maximum intracellular lipase hydrolysis activity was obtained as 0,40 U/mg in the growth medium prepared from 50 g/L waste orange peel containing 15,0 g/L TRS.

Olive oil or waste cooking oil (WCO) was added in the range of 5-40 g/L to the growth medium prepared from 50 g/L waste orange peel as an inducer to increase the intracellular lipase hydrolysis activity of the microorganism. The effects of additive oil concentrations on the microbial growth and intracellular lipase hydrolysis activity were examined. It was observed that the addition of WCO much more increased both microbial growth and intracellular lipase hydrolysis activity compared to olive oil addition. When 10 g/L WCO was added to the growth medium, intracellular lipase hydrolysis activity reached to 0,52 U/mg, increasing 30% compared to the activity obtained in the growth medium containing no WCO. The growth medium prepared from 50 g/L waste orange peel with 10 g/L WCO was used to grow the *R. arrhizus* fungus having the highest intracellular lipase hydrolysis activity to be used in biodiesel production studies.

In the second part, the biodiesel production studies were performed in a batch system, and the parameters of methanol/waste oil molar ratio, shaking rate, temperature and amount of biocatalyst, which directly affect the conversion of WCO to biodiesel were investigated. By using Design-Expert Programme with ANOVA, the conversion values of WCO to biodiesel by weight obtained by L<sub>9</sub> test system with 4 parameters and 3 level designed and studied according to Taguchi method were analyzed. A second order quadratic polynomial equation which describes the experimental system perfectly and gives the simultaneous effects of all parameters studied on conversion was found. The effects of selected parameters on the conversion of WCO to biodiesel were also evaluated statistically and three dimensional surface curves were also obtained.

In order to determine the most suitable operating parameters, optimization was done by using the numerical optimization function taking place in the same programme and the highest conversion of WCO to biodiesel was obtained as

22,3% at the operating conditions including 4:1 methanol/waste oil molar ratio, 177 rpm shaking rate, 33 °C temperature and 1,3 g catalyst amount.

The kinetic modeling of the transesterification reaction was performed by taking into consideration the experiments meeting the optimization conditions most closely in the nine experiments designed according to the Taguchi method. The reaction rate constants were obtained as 0,0079 ve 0,0149 (mol/L)<sup>-2</sup>sa<sup>-1</sup> at 25 and 35 °C, respectively. Activation energy and frequency factor were found as 48,42 kJ/mol and 2,43x10<sup>6</sup> (mol/L)<sup>-2</sup>sa<sup>-1</sup>, respectively.

**Key Words** : Biodiesel, *R. arrhizus*, lipase, lipase hydrolysis activity, waste cooking oil, Taguchi experimental design method, optimization, reaction kinetics.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana destek olan, sabrını ve samimiyetini benden esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof.Dr. Zümriye Aksu'ya,

Samimi ve içten tavırlarıyla ilgilerini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan sayın Prof.Dr. Deniz TANYOLAÇ ve Prof.Dr. Gönül DÖNMEZ'e,

Yardımları, bilgileri ve gülyüzleriyle her zaman desteklerini gördüğüm Dr. Pınar KODAL ve Dr. Hande GÜNNAN YÜCEL'e,

Deneysel sonuçlarımın enstrümental analizindeki katkı ve destekleriyle Kim.Müh. Belgin ASLAN'a,

Doktora çalışmam süresince bana gösterdikleri destek ve tutumlarıyla yardımlarını esirgemeyen mesai arkadaşlarım Sedat TAT'a, Emine KAÇAR'a, Nilüfer TİKEN'e, Serap KUZUCANLI'ya, Esra SU'ya, Çağıl AKKAYA ve laboratuvar personeline,

Çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan ve beni sonuna kadar destekleyen, hayatımın her aşamasında fikirleri ve önerileriyle beni güçlü kılan hayat arkadaşım, eşim Mehmet Tuncay ÇAĞATAY'a,

Doktora çalışmam süresince göstermiş oldukları sabır ve sevgileriyle güzel çocuklarım, hayatımın anlamı Havvanur ve Ahmet Yusuf ÇAĞATAY'a,

Hayatta doğruluğu, çalışkanlığı, güzelliği, yardımlaşmayı ve sevmeyi öğreten canım annem ve babama, beni her zaman destekleyen kardeşlerime,

En derin duygularıyla TEŞEKKÜR EDERİM.

Şeyda ÇAĞATAY

Ekim 2019, Ankara

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER.....	xii
ŞEKİLLER .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	4
2.1. Yağlar.....	5
2.1.1. Bitkisel ve Hayvansal Yağlar.....	5
2.1.2. Atık Yemeklik Yağlar (AYY) .....	7
2.2. Biyodizel.....	10
2.2.1. Biyodizelin Özellikleri .....	11
2.2.2. Biyodizel Üretim Yöntemleri.....	12
2.2.2.1. Piroлиз.....	12
2.2.2.2. Mikro-Emülsiyon .....	13
2.2.2.3. Seyreltme/Karıştırma .....	14
2.2.2.4. Transesterifikasyon.....	14
2.2.3. Atık Yemeklik Yağdan Biyodizel Üretimi .....	24
2.3. Mikroorganizmalar .....	26
2.3.1. Mikroorganizmaların Genel Özellikleri .....	26
2.3.1.1. Prokaryotlar .....	26
2.3.1.2. Ökaryotlar .....	26
2.3.2. Mikroorganizmaların Besin İhtiyaçları .....	27
2.3.2.1. Karbon .....	27
2.3.2.2. Azot .....	28
2.3.2.3. Mineraller.....	28

2.3.3.	Mikrobiyal Üremeye Etki Eden Fiziksel Parametreler .....	28
2.3.4.	Mikroorganizma Üreme Kinetiği .....	31
2.3.5.	Küf Mantarları (Funguslar) .....	32
2.4.	Enzimler .....	33
2.4.1.	Enzimlerin Özellikleri.....	33
2.4.2.	Enzim Aktivitesi.....	35
2.4.3.	Enzimlerin Çalışmasını Etkileyen Parametreler .....	35
2.4.4.	Enzim Kaynakları .....	36
2.4.5.	Enzimlerin Sınıflandırılması .....	37
2.5.	Lipaz Enzimi .....	37
2.5.1.	Lipaz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar .....	39
2.5.2.	Lipaz Enziminin Seçiciliği.....	40
2.5.3.	Serbest ve Tutuklanmış Lipazın Kullanımı.....	40
2.6.	Mikrobiyal Lipaz Katalizörlüğünde Biyodizel Üretimi ve Üretimi Etkileyen Parametreler.....	41
2.6.1.	Kültür Ortamına İndükleyici İlavesi.....	42
2.6.2.	Transesterifikasyon Reaksiyon Ortamındaki Su Miktarı.....	44
2.6.3.	Reaksiyon Ortamındaki Tepkiyen ve Ürünlerin İnhibitör Etkisi...46	
3.	DENEY SİSTEMİNİN MATEMATİKSEL TANIMLANMASI .....	48
3.1.	Mikrobiyal Üremenin Matematiksel Tanımlanması .....	48
3.1.1.	Mikroorganizmanın Özgül Üreme Hızı .....	48
3.1.2.	Substrata Bağlı Üreme Verimi.....	48
3.1.3.	Tek Substratın Kısıtlayıcı Olduğu Durumda Üreme Kinetiğinin Modellenmesi.....	49
3.1.4.	Mikrobiyal Enzim Üretiminde Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipaz Hidroliz Aktivitesinin Matematiksel Tanımlanması .....	50
3.2.	Taguchi Yöntemiyle Deney Sisteminin Matematiksel Tanımlanması....	51
3.2.1.	Sinyal / Gürültü Oranı (SGO) .....	54
3.2.2.	ANOVA Testi (Varyansın İstatistiksel Analizi) .....	55

3.3.	Biyodizel Üretiminin Matematiksel Tanımlanması .....	55
3.3.1.	Metanol Eşliğinde <i>R. arrhizus</i> Biyokütlesinden (Biyokatalizör) Biyodizel Üretiminde AYY'ın Ağırlıkça Biyodizele Dönüşüm %'sinin Tanımlanması .....	55
3.3.2.	Metanol Varlığında <i>R. arrhizus</i> Biyokütlesinden Biyodizel Üretiminde Reaksiyon Kinetiğinin Matematiksel Tanımlanması .....	56
4.	DENEY SİSTEMİ VE YÖNTEMLERİ .....	60
4.1.	<i>R. arrhizus</i> 'un Deneysel Çalışmalar İçin Hazırlanması .....	60
4.2.	Farklı Besin Ortamlarının <i>R. arrhizus</i> 'un Üretimi İçin Hazırlanması .....	63
4.3.	Atık Yemeklik Yağın Deneysel Çalışmalar İçin Hazırlanması .....	68
4.4.	Deney Sistemi .....	69
4.4.1.	<i>R. arrhizus</i> 'un Üretilmesi .....	69
4.4.2.	Biyodizel Üretimi .....	69
4.5.	Analiz Yöntemleri .....	73
4.5.1.	Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipaz Hidroliz Aktivitesinin Tayini .....	73
4.5.2.	Toplam İndirgen Şeker Derişiminin Tayini .....	74
4.5.3.	Kırılma İndisi Tayini .....	74
4.5.4.	AYY'ın Ağırlıkça Biyodizele Dönüşüm %'sinin Tayini .....	74
5.	DENEYSEL SONUÇLAR .....	79
5.1.	<i>R. arrhizus</i> 'un Üretim Çalışmaları .....	80
5.1.1.	Farklı Besin Ortamlarının Mikrobiyal Üremeye Etkisi .....	80
5.1.2.	Atık Portakal Kabuğundan Hazırlanan Doğal Besin Ortamında Başlangıç Toplam İndirgen Şeker Derişiminin Mikrobiyal Üremeye Etkisi .....	81
5.1.3.	Atık Portakal Kabuğundan Hazırlanan Doğal Besin Ortamına İlave Edilen İndükleyici Maddelerin Mikrobiyal Üremeye Etkileri .....	85
5.2.	<i>R. arrhizus</i> ' dan Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipaz Üretimi .....	89
5.2.1.	Farklı Besin Ortamlarının <i>R. arrhizus</i> 'un Hücre İçi ve Hücre Dışı Ürettiği Lipazın Hidroliz Aktivitesine Etkisi .....	89

5.2.2.	Atık Portakal Kabuğundan Hazırlanan Doğal Besin Ortamında Başlangıç Toplam İndirgen Şeker Derişiminin <i>R. arrhizus</i> 'un Ürettiği Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipazın Hidroliz Aktivitesine Etkisi .....	93
5.2.3.	Besin Ortamına Eklenen İndükleyici Maddelerin <i>R. arrhizus</i> 'un Ürettiği Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipazın Hidroliz Aktiviteleri Üzerindeki Etkisi .....	96
5.3.	Biyodizel Üretim Çalışmaları .....	101
5.3.1.	Metil Alkol/AYY Molar Oranının AYY'ın Biyodizele Dönüşümüne Etkisi .....	102
5.3.2.	Biyokatalizör Miktarının AYY'ın Biyodizele Dönüşümüne Etkisi .....	102
5.3.3.	İkinci Döngü Transesterifikasyon Reaksiyonunun AYY'ın Biyodizele Dönüşümüne Etkisi.....	103
5.3.4.	Sümfaktan Derişiminin AYY'ın Biyodizele Dönüşümüne Etkisi..	104
5.4.	Biyodizel Üretim Optimizasyonu .....	106
5.4.1.	Taguchi Yöntemiyle Deney Sisteminin Tasarlanması .....	106
5.4.2.	Seçilen Parametrelerin AYY'ın Biyodizele Dönüşümü Üzerine Etkisi .....	107
5.4.3.	ANOVA Analizi ile Parametre Etkisinin İncelenmesi .....	111
5.4.4.	Optimum Reaksiyon Koşullarının Belirlenmesi .....	122
5.5.	Biyodizel Üretim Prosesinin Kinetik Modellemesi .....	123
6.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	127
	KAYNAKLAR.....	135
	EKLER .....	150
	ÖZGEÇMİŞ.....	156



## ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Yağ asitlerinin kimyasal yapısı. ....	6
Çizelge 2.2. Çeşitli ülkelerde üretilen atık yağ miktarları. ....	8
Çizelge 2.3. AYY'ın fiziksel ve kimyasal özellikleri. ....	9
Çizelge 2.4. AYY'dan üretilen biyodizel ve ticari dizel yakıtın genel özelliklerinin karşılaştırılması. ....	25
Çizelge 2.5. Lipaz enzimi üreten küf mantarı türleri. ....	38
Çizelge 4.1. <i>R. arrhizus</i> 'un üretilmesi için kullanılan glukozlu yapay besin ortamı bileşenleri ve derişimleri. ....	63
Çizelge 4.2. <i>R. arrhizus</i> 'un üretilmesi için kullanılan melaslı besin ortamı bileşenleri ve derişimleri. ....	64
Çizelge 4.3. <i>R. arrhizus</i> 'un üretilmesinde kullanılan atık portakal kabuğundan hazırlanan farklı derişimlerdeki ( $C_{APK}$ ) besin ortamları ve içerdikleri toplam indirgen şeker derişimleri ( $S_{TIŞ}$ ). ....	66
Çizelge 4.4. 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına eklenen indükleyici bileşenler ve derişimleri. ....	67
Çizelge 4.5. Farklı % asetat tampon çözelti oranlarında elde edilen kırılma indisi değerleri (Reaksiyon koşulları: AYY miktarı= 4,4 g, Metil alkol/AYY molar oranı=4, T= 35 °C, K.H.=160 rpm, Katalizör miktarı= 0,5 g kuru m.o.). ....	71
Çizelge 4.6. Biyodizel üretiminde incelenen parametreler ve değerleri. ....	72
Çizelge 4.7. Taguchi $L_9$ ( $3^4$ ) ortogonal dizine göre oluşturulan deneysel tasarım. ....	73

- Çizelge 4.8. Soya fasulyesi yağının ve bu yağdan elde edilen biyodizel spektrumlarının karakteristik pikleri.....75
- Çizelge 5.1. *R. arrhizus*'un farklı başlangıç toplam indirgen şeker derişimi içeren atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamlarında üremesinde elde edilen özgül üreme hızı, en yüksek mikroorganizma derişimi ve üreme verimi değerleri. ....83
- Çizelge 5.2. *R. arrhizus*'un farklı derişimlerde zeytinyağının ve atık yemeklik yağın eklendiği 15 g/L toplam indirgen şeker derişimi içeren 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamında üretilmesinde elde edilen özgül üreme hızları, en yüksek kuru mikroorganizma derişimleri ve mikrobiyal üreme verim değerleri.88
- Çizelge 5.3. Farklı metil alkol/AYY molar oranlarında elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm değerleri. ....102
- Çizelge 5.4. Farklı biyokatalizör miktarlarında elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm değerleri. ....103
- Çizelge 5.5. Taguchi  $L_9$  ( $3^4$ ) ortogonal dizine göre oluşturulan deneysel tasarım. ....107
- Çizelge 5.6. Taguchi deneysel tasarımına göre belirlenen koşullarda yapılan deneyler sonucu elde edilen AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşüm % değerleri.....108
- Çizelge 5.7. AYY'ın biyodizele dönüşümü için ANOVA ile model regresyonu ve model terimleri. ....112
- Çizelge 5.8. Nümerik optimizasyon ile bulunan optimum dönüşüm koşulları. 123
- Çizelge 5.9. 6 ve 2 numaralı deneylerdeki metil alkol/AYY molar oranı, karıştırma hızı, sıcaklık, biyokatalizör miktarı değerleri, başlangıç metil alkol derişimi ( $[MA]_0$ ) ve bu koşullarda ilk 24 saatlik reaksiyon süresinde

elde edilen zamana bağlı molce metil alkol dđnüşđm kesri ( $X_{MA}$ ) değerleri.....	124
Çizelge 6.1. <i>R. arrhizus</i> 'un farklı türde ve farklı derişimlerde şeker (substrat) içeren besin ortamlarında üretilmesinde elde edilen en yüksek kuru hücre derişimleri ( $X_m$ ), substrata bağlı üreme verimleri ve hücre iği lipaz hidroliz aktivitesi değerlerinin karşılaştırılması.....	128
Çizelge 6.2. <i>R. arrhizus</i> 'un farklı derişimlerde zeytinyağı ve atık yemeklik yağ içeren 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamında üretilmesinde elde edilen en yüksek mikroorganizma derişimi ve hücre iği lipazın hidroliz aktivite değerlerinin karşılaştırılması. ...	129
Çizelge 6.3. Tez çalışmasında elde edilen sonuçların literatürde yer alan enzimatik transesterifikasyon yöntemiyle biyodizel üretim sonuçlarıyla karşılaştırılması.....	132

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Trigliseritlerin transesterifikasyonla biyodizele dönüşüm reaksiyonu.....	15
Şekil 2.2.	Önemli transesterifikasyon proseslerinin şematik gösterimi. ....	15
Şekil 2.3.	Mikroorganizmanın üreme evreleri.....	31
Şekil 2.4.	Lipazın katalizlediği reaksiyonlar.....	39
Şekil 2.5.	<i>R. oryzae</i> hücresinde lipaz enziminin oluşması ve hücre içinde yerleşiminin şematik gösterimi (Fukuda ve ark., 2008). ....	43
Şekil 3.1.	Taguchi L <sub>9</sub> (3 <sup>4</sup> ) ortogonal dizini. ....	53
Şekil 4.1.	PDA içeren besin ortamında üretilmiş <i>R. arrhizus</i> .....	61
Şekil 4.2.	Yapay sıvı besin ortamında üretilmiş <i>R. arrhizus</i> . ....	61
Şekil 4.3.	Biyodizel üretiminde kullanılan <i>R. arrhizus</i> biyokütlesi. ....	62
Şekil 4.4.	Glukozlu besin ortamında üretilen <i>R. arrhizus</i> . ....	63
Şekil 4.5.	Melaslı besin ortamında üretilen <i>R. arrhizus</i> . ....	65
Şekil 4.6.	Atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamında üretilmiş <i>R. arrhizus</i> . ....	66
Şekil 4.7.	Sırasıyla zeytinyağ ve atık yemeklik yağ içeren atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamlarında üreyen <i>R. arrhizus</i> . 68	
Şekil 4.8.	AYY'ın 1096 ve 1377 cm <sup>-1</sup> karakteristik pikleri. ....	77
Şekil 4.9.	DB Tarımsal Enerji Biyodizel Üretim Tesisinden elde edilen biyodizelin 1195 ve 1435 cm <sup>-1</sup> karakteristik pikleri. ....	77

- Şekil 4.10. AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşümü % 22,6 olarak elde edilen örneğe ait  $1435 \text{ cm}^{-1}$  biyodizel karakteristik piki.....78
- Şekil 5.1. *R. arrhizus* küf mantarının farklı besin ortamlarında elde edilen üreme eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm, Besin Ortamları: Glukozlu besin ortamı ( $S_G$ : 10 g/L ); melaslı besin ortamı ( $S_S$ : 2,5, 5 ve 10 g/L sakkaroz); 40 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamı ( $S_{TİŞ}$ : 12,1 g/L toplam indirgen şeker).....81
- Şekil 5.2. Atık portakal kabuğundan hazırlanan ve farklı derişimlerde toplam indirgen şeker içeren besin ortamlarında elde edilen *R. arrhizus*'un üreme eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm). .....82
- Şekil 5.3. Atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamında *R. arrhizus* için elde edilen  $1/\mu$ 'ye karşı  $1/S_{o,TİŞ}$  grafiği.....84
- Şekil 5.4. Deneysel ve Monod Eşitliğine göre bulunan teorik  $\mu$  değerlerinin  $45^\circ$  doğrusu üzerinde karşılaştırılması. ....84
- Şekil 5.5. *R. arrhizus*'un 50 g/L (15 g/L TİŞ) atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına farklı derişimlerde zeytinyağı (ZY) eklendiğinde elde edilen üreme eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm). .....86
- Şekil 5.6. *R. arrhizus*'un 50 g/L (15 g/L TİŞ) atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına farklı derişimlerde Atık Yemeklik Yağ (AYY) eklendiğinde elde edilen üreme eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm).....87
- Şekil 5.7. Farklı besin ortamlarında *R. arrhizus*'un ürettiği hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişimi (T=30 °C, K.H.= 120 rpm, Besin Ortamları: Glukozlu besin ortamı ( $S_G$ : 10 g/L ); melaslı besin ortamı ( $S_S$ : 2,5, 5 ve 10 g/L sakkaroz); 40 g/L atık portakal

- kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamı ( $S_{TİŞ}$ : 12,1 g/L toplam indirgen şeker). .....91
- Şekil 5.8. Farklı besin ortamlarında *R. arrhizus*'un ürettiği hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişimi ( $T=30$  °C, K.H.= 120 rpm, Besin Ortamları: Glukozlu besin ortamı ( $S_G$ : 10 g/L ); melaslı besin ortamı ( $S_S$ : 2,5, 5 ve 10 g/L sakkaroz); 40 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamı ( $S_{TİŞ}$ : 12,1 g/L toplam indirgen şeker). .....92
- Şekil 5.9. Atık portakal kabuğundan hazırlanan ve farklı derişimlerde toplam indirgen şeker içeren besin ortamlarında *R. arrhizus*'un ürettiği hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişimi ( $T=30$  °C, K.H.= 120 rpm).....94
- Şekil 5.10. Atık portakal kabuğundan hazırlanan ve farklı derişimlerde toplam indirgen şeker içeren besin ortamlarında *R. arrhizus*'un ürettiği hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişimi ( $T=30$  °C, K.H.= 120 rpm).....95
- Şekil 5.11. Farklı derişimlerde ZY içeren 50 g/L atık portakal kabuğu (15 g/L  $TİŞ$ )'ndan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'un hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişim eğrileri ( $T=30$  °C, K.H.= 120 rpm).....97
- Şekil 5.12. Farklı derişimlerde ZY içeren 50 g/L atık portakal kabuğu (15 g/L  $TİŞ$ )'ndan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'un hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişim eğrileri ( $T=30$  °C, K.H.= 120 rpm).....98
- Şekil 5.13. Farklı derişimlerde AYY içeren 50 g/L atık portakal kabuğu (15 g/L  $TİŞ$ )'ndan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'un hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişim eğrileri ( $T=30$  °C, K.H.= 120 rpm)..... 100

- Şekil 5.14. Farklı derişimlerde AYY içeren 50 g/L atık portakal kabuğu (15 g/L TİŞ)'ndan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'un hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişim eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm).....101
- Şekil 5.15. İkinci döngü transesterifikasyon reaksiyonunun AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi (Reaksiyon koşulları: Metil Alkol/AYY Molar Oranı=4, Sıcaklık= 35 °C, Karıştırma hızı= 160 rpm, Biyokatalizör miktarı= 0,5 g kuru m.o.).....104
- Şekil 5.16. İkinci transesterifikasyon reaksiyonunda ağırlıkça %1 ve %15 sürfaktan ilavesinin zamana bağlı AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi.....106
- Şekil 5.17. Taguchi deneysel tasarımına göre 1, 2 ve 3 numaralı deneyler için AYY'ın biyodizele dönüşümünün zamana bağlı değişimi (Deney No:1, Deney No:2, Deney No:3, Metanol/AYY Molar Oranı 3)...110
- Şekil 5.18. Taguchi deneysel tasarımına göre 4, 5 ve 6 numaralı deneyler için AYY'ın biyodizele dönüşümünün zamana bağlı değişimi (Deney No:4, Deney No:5, Deney No:6, Metanol/AYY Molar Oranı 4)...110
- Şekil 5.19. Taguchi deneysel tasarımına göre 7, 8 ve 9 numaralı deneyler için AYY'ın biyodizele dönüşümünün zamana bağlı değişimi (Deney No:7, Deney No:8, Deney No:9, Metanol/AYY Molar Oranı 5)...111
- Şekil 5.20. Artıkların dağılım grafiği. ....114
- Şekil 5.21. Tahmin edilen artıklar ile AYY'ın biyodizele dönüşüm %'si grafiği. ....115
- Şekil 5.22. Deneysel olarak elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm % değerlerinin modelden tahmin edilen % dönüşüm değerleriyle 45° doğrusu üzerinde karşılaştırılması. ....115

Şekil 5.23.	Uçdeğer t grafiği.....	116
Şekil 5.24.	Metanol/AYY molar oranının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi (T= 35 °C, K.H.= 160 rpm, Biyokatalizör miktarı= 1,0 g kuru m.o.).....	118
Şekil 5.25.	Karıştırma hızının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi (T=35 °C, Metanol/AYY molar oranı= 4, Biyokatalizör miktarı= 1,0 g kuru m.o.).....	118
Şekil 5.26.	Sıcaklığın AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi (K.H.= 185 rpm, Metanol/AYY molar oranı= 4, Biyokatalizör miktarı= 1,0 g kuru m.o.).....	119
Şekil 5.27.	Biyokatalizör miktarının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi (T= 35 °C, K.H.= 185 rpm, Metanol/AYY molar oranı= 4). ....	119
Şekil 5.28.	Metanol/AYY molar oranı ve karıştırma hızının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine ortak etkisi (T= 35 °C, Biyokatalizör miktarı= 1,0 g kuru m.o.).....	121
Şekil 5.29.	Metanol/AYY molar oranı ve sıcaklığın AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine ortak etkisi (K.H.: 160 rpm, Biyokatalizör miktarı= 1,0 g kuru m.o.). ....	121
Şekil 5.30.	Metanol/AYY molar oranı ve biyokatalizör miktarının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine ortak etkisi (K.H.: 160 rpm, T= 35 °C). ....	122
Şekil 5.31.	25 ve 35 °C'da elde edilen $\left[ \frac{1}{(1-X_{BD})^2} - 1 \right] \cdot \left[ \frac{1}{2[MA]_0^2} \right]$ ' ye karşı t grafikleri. ....	125
Şekil 5.32.	ln k'ya karşı 1/T grafiği.....	125



Şekil 6.1. AYY içermeyen ve 10 g/L AYY içeren 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'a ait üreme ve mikroorganizmanın ürettiği hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişim eğrileri. ....130

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$A_0$	Frekans faktörü [(mol/L) <sup>-2</sup> sa <sup>-1</sup> ]
$C_{APK}$	Atık portakal kabuğu derişimi (g/L)
$C_{NaOH}$	Titrasyonda kullanılan NaOH derişimi (mol/L)
$E_A$	Aktivasyon enerjisi (J/mol)
$i$	Deney numarası
$j$	Deneme numarası
$k$	Reaksiyon hız sabiti [(mol/L) <sup>-2</sup> sa <sup>-1</sup> ]
$K_s$	Doygunluk sabiti (g/L)
$L$	Seviye sayısı
$M_{k.m.o.}$	Kuru mikroorganizma miktarı (g)
$[MA]$	Herhangi bir t anında reaksiyon ortamındaki metil alkol derişimi (mol/L)
$[MA]_0$	Başlangıçta reaksiyon ortamında bulunan metil alkol derişimi (mol/L)
$n$	Deneme sayısı
$N$	Deney sayısı
$P$	Parametre sayısı
$r$	Reaksiyon hızı (mol L <sup>-1</sup> sa <sup>-1</sup> )
$R$	Termodinamik gaz sabiti (J/mol K)
$S$	t anında ortamdaki substrat derişimi (g/L)
$S_{0,TİŞ}$	Başlangıç toplam indirgen şeker derişimi (g/L)
$S_G$	Glukoz derişimi (g/L)
$s_i^2$	Varyans

$S_S$	Sakkaroz derişimi (g/L)
$S_{TİŞ}$	Toplam indirgen şeker derişimi (g/L)
$SS_f$	f'ninci parametre için karelerin toplamı
$SS_T$	Tüm parametrelerin karelerinin toplamı
$t$	Zaman (sa), Hidroliz süresi (dk)
$T$	Sıcaklık ( $^{\circ}C$ , K)
[TG]	Trigliserit derişimi (mol/L)
$U/mg$	Birim kuru mikroorganizma kütesinin zeytinyağından 1 dakikada 1 mikromol yağ asidini açığa çıkaran hidroliz aktivitesi ( $\mu\text{mol/dk. mg k.m.o}$ )
$U/mL$	Mikroorganizmanın üretildiği besin ortamının birim hacminin zeytinyağından 1 dakikada 1 mikromol yağ asidini açığa çıkaran hidroliz aktivitesi ( $\mu\text{mol/dk. mL besin ortamı}$ )
$V_{\text{besin ortamı}}$	Hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesi tayini için kullanılan besin ortamı hacmi (mL)
$V_{\text{NaOH}}$	Titrazyonda harcanan NaOH miktarı (mL)
$X$	Kuru mikroorganizma derişimi (g kuru m.o./L)
$X_o$	Başlangıç kuru mikroorganizma derişimi (g/L)
$X_m$	En yüksek biyokütle derişimi (g kuru m.o./L)
$X_{MA}$	Metil alkol dönüşüm mol kesri
$y_i$	Cevap ortalama değeri
$Y_{X/S}$	Birim substrat kütesi başına elde edilen mikroorganizma miktarı (g kuru m.o/g substrat)
$\mu$	Özgöl üreme hızı ( $\text{sa}^{-1}$ )
$\mu_{\text{den}}$	Deneysel özgöl üreme hızı ( $\text{sa}^{-1}$ )
$\mu_m$	En yüksek özgöl üreme hızı ( $\text{sa}^{-1}$ )

$\mu_{teo}$  Teorik özgül üreme hızı (sa<sup>-1</sup>)

### **Kısaltmalar**

ANOVA	Varyans Analizi
APK	Atık Portakal Kabuğu
ASTM	Amerikan Test Metodu
AYY	Atık Yemeklik Yağ
BD	Biyodizel
DG	Diğliserit
DNS	Dinitrosalisilik asit
EC	Enzim Komisyonu
GL	Gliserol
IEA	Uluslararası Enerji Ajansı
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
K.H.	Karıştırma Hızı
MA	Metil Alkol
MG	Monogliserit
PDA	Patates Dekstroz Agar
SGO	Sinyal/Gürültü Oranı
SYA	Serbest Yağ Asidi
TG	Trigliserit
TİŞ	Toplam İndirgen Şeker
YAME	Yağ Asidi Metil Esteri
ZY	Zeytinyağı

# 1. GİRİŞ

Hızla artan nüfus ve gelişen sanayinin enerji ihtiyacı kısıtlı kaynaklarla karşılanamamakta, enerji üretim ve tüketimi arasındaki fark giderek artmaktadır. Neredeyse tüm toplumların enerji sorunu ile karşı karşıya kalması, ekonomik kalkınmanın lokomotifi olan enerji konusunu sürekli gündemde tutmaktadır.

Dünya enerji tüketiminin yaklaşık %80'lik bir kısmı fosil yakıtlardan karşılanmaktadır. Ancak, fosil yakıtların yenilenebilir olmaması ve yakın gelecekte tükenecek olması, küresel iklim değişikliklerine sebep olan sera gazı emisyonlarındaki artış ve çevresel etkiler ile ham petrol ücretlerindeki değişkenlik ve ekonomik durum göz önünde bulundurulduğunda alternatif yakıt araştırmaları kaçınılmaz olmaktadır. Bu tür alternatifler, teknik olarak kabul edilebilir, ekonomik olarak yarışabilir, çevreyle uyumlu ve kolay temin edilebilir olmalıdır. Biyoçözünür ve toksik olmayan yakıt özelliğine sahip biyodizel, dizel yakıtlara alternatif olarak büyük ölçüde dikkat çekmektedir (Nie ve ark., 2006; Mu, Xiu ve Zhang, 2008).

Çevre dostu veya yeşil enerji olarak tanımlanan yenilenebilir enerji kaynaklarından biyodizel, hayvansal veya bitkisel yağlardan elde edilen alternatif bir dizel yakıttır. Bitkisel ve/veya hayvansal yağlar, dizel motorlarda dört temel yöntemle yakıtı dönüştürülebilir. Bunlar yağın doğrudan veya yakıtı karıştırılarak kullanımı, mikro-emülsiyon, termal parçalanma veya piroliz ve transesterifikasyon reaksiyonu şeklindedir. Bu yöntemler arasında transesterifikasyon, en çok tercih edilendir. Transesterifikasyon reaksiyonu, çeşitli yağ ve atık yağlar kullanarak geleneksel dizelin kalitesine oldukça yakın bir yakıtın üretimine imkân verir.

Transesterifikasyon reaksiyonu ile biyodizel üretiminde maliyeti etkileyen önemli bir husus prosesdeki işlem adımlarıdır. Transesterifikasyon reaksiyonlarında alkali ve asidik katalizörlerin kullanımı, yüksek dönüşümlü biyodizel eldesine imkân verdiği için yaygındır. Fakat, bu katalizörlerle çalışmada bazı sıkıntılar yaşanmaktadır. Gliserolün ortamdan uzaklaştırılması, reaksiyon ürünlerinden katalizörün ayrılması, yağın su ve serbest yağ asidi içerdiği durumlarda reaksiyon

ortamında sabun oluşumu, atık su arıtımı ve enerji ihtiyacı bu yöntemlerin dezavantajlarından (Hama ve ark., 2007; Pazouki ve ark., 2010).

Lipaz enziminin katalizör olarak kullanımı durumunda ise, proses işlemleri azalır, yan ürün olan gliserol ortamdan kolaylıkla ayrılır. Ancak, mikroorganizma tarafından salgılanan hücre dışı lipaz enziminin endüstride kullanılabilmesi için ihtiyaç duyulan saflaştırma işlemlerinden (ekstraksiyon, adsorpsiyon, kristalizasyon vb.) kaynaklı yüksek enzim maliyeti, enzimatik biyodizel üretim yönteminin ticarileşmesindeki en büyük engeldir (Bana ve ark., 2002; Zeng ve ark., 2006; Li ve ark., 2008; Salum ve ark., 2010; Sun ve ark., 2010). Hücre içi enzimi üreten mikroorganizmanın doğrudan katalizör olarak kullanılması durumunda ise düşük maliyetli etkin bir yöntemle biyodizel üretilebilmektedir (Fukuda, Kond ve Noda, 2001; Qin ve ark., 2008).

Bu tez çalışmasında atık yemeklik yağ ve metanol tepkiyen olarak kullanılarak *Rhizopus arrhizus* lipazı varlığında mikrobiyal biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Katalizör olarak saf lipaz enzimi yerine *Rhizopus arrhizus* küf mantarının kendisi kullanılmış, rafine yağ yerine atık yemeklik yağ tercih edilmiştir. *Rhizopus arrhizus*, Ankara Büyükşehir Belediyesi Portakal Suyu Üretim Tesisinin atığı olan portakal kabuklarından hazırlanan doğal besin ortamında çoğaltılmıştır. Böylelikle biyodizel üretiminin önündeki en büyük engellerden biri olan maliyet unsuru, düşük maliyetli kültür ortamı, tepkiyen ve katalizör seçimleriyle asgari düzeye indirgenmeye çalışılmıştır. Glukozdan, melastan ve atık portakal kabuğundan hazırlanan farklı besin ortamlarında ve farklı substrat derişimlerinde çoğaltılan *R. arrhizus*'un üreme kinetiği incelenmiş, *R. arrhizus*'un ürettiği hücre içi ve hücre dışı lipazların hidroliz aktiviteleri hesaplanarak optimum lipaz aktivitesinin elde edildiği büyüme koşulları tayin edilmiştir. Daha sonra biyodizel üretim çalışmalarına geçilerek, Taguchi yöntemi ile deney sistemi tasarlanmış ve kesikli sistemde metanol/atık yemeklik yağ molar oranı, karıştırma hızı, sıcaklık ve biyokütle (katalizör) miktarının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen değerler, Design-Expert paket programıyla analiz edilerek, ANOVA ile deney sistemini tanımlayan en

uygun model bulunmuştur. Aynı paket programıyla optimizasyon yapılarak en uygun reaksiyon koşulları tespit edilmiş ve bu koşullardaki reaksiyon mekanizması tanımlanarak, kinetik sabitler hesaplanmıştır.

## 2. TEMEL BİLGİLER

Ülkelerin, geliştikçe ve yaşam standartları iyileştikçe enerji ihtiyacı hızla artmaktadır. Bir sistemin iş yapabilme yeteneği olarak tanımlanan enerji ısı, ışık, mekanik, elektrik, kimyasal ve nükleer gibi değişik formlarda karşımıza çıkmaktadır.

Enerji kaynakları, herhangi bir yöntemle enerji üretilmesini sağlayan kaynaklardır ve oluşumlarına bağlı olarak yenilenebilir ve yenilenemez enerji kaynakları olmak üzere iki ana başlıkta incelenir. Ham petrol, kömür ve gaz, yenilenemez yani tükenebilir enerji kaynakları arasında ilk sıralarda yer almaktadır (Shafiee ve Topal, 2009). Bu tür enerjiler, yaşamları milyonlarca yıl önce sona ermiş bitki ve hayvan kalıntılarının fosillerinden faydalanılarak elde edilmektedir. Güneş, rüzgâr, hidrolik, jeotermal, biyokütle gibi kaynaklar ise yenilenebilir enerji kaynakları arasında yer alır ve bu enerji kaynakları, kendisini doğada sürekli yenileyen yani kısa sürede yerine konulan enerji kaynaklarıdır.

Konvansiyonel (yenilenemez) enerji kaynaklarının sınırlı rezervde olması ve yenilenebilir enerji kaynak kullanımının çevreye olan faydalarından dolayı yenilenebilir enerji kaynakları için araştırmalar günden güne artmaktadır. Bu kaynaklardan biri olan biyokütle; biyohidrojen, biyoetanol ve biyodizel gibi biyoyakıtlara dönüştürülebilmekte ve enerji ihtiyacı için kullanılabilir. Bu kaynaklardan biri olan biyohidrojen, biyoetanol ve biyodizel gibi biyoyakıtlara dönüştürülebilmekte ve enerji ihtiyacı için kullanılabilir.

Biyohidrojen yönteminde alg, yosun ve fotosentez yapan bakteriler azotsuz ve oksijensiz ortamda ışık enerjisini kullanarak büyütüldüklerinde ortamdaki organik bileşenlerin parçalanması yoluyla hidrojen üretmektedirler. Glukoz, ksiloz, melas ve nişasta hidrojen üreten mikroorganizmaların besin kaynaklarından bazıları olup, hidrojen üretimi enzim aktiviteleri sonucu oluşmaktadır. Şeker fabrikası, süt fabrikası atıkları ile atık kâğıt hamuru, patates kabukları gibi bazı evsel atıklar da hidrojen üretimi için kullanılabilir. Biyohidrojen üretimi, düşük enerji ihtiyacı ve çevre dostu oluşu sebebiyle yenilenebilir enerji sektöründe oldukça ilgi görmektedir (Bostancı, 2014).



Biyoetanol, hammaddesi şekerpancarı, mısır, buğday ve odunsular gibi şeker, nişasta veya selüloz esaslı tarım ürünlerinin hidrolizinden elde edilen şekerlerin fermentasyonu ile üretilen alternatif bir yakıttır. Modifiye gerektirmeden benzinle belirli oranlarda karıştırılarak oktan artırıcı olarak kullanılır. Biyoetanol, yakıt içerisindeki oksijen miktarını artırarak yakıtın daha verimli yanmasını sağlar ve egzoz emisyonunu azaltır (Anonim, 2019).

Biyodizel, bitkisel veya hayvansal yağlar ile alkolden, katalizörlü veya katalizörsüz ortamda üretilen uzun zincirli yağ asitlerinin mono alkil esterleri olarak tanımlanan bir yakıttır. Biyodizel, yüksek oranda biyoçözünürdür ve en az toksik etkiye sahiptir. Aromatik bileşiklerin ve çevreye yıkıcı etkisi olan diğer kimyasalların neredeyse hiçbirini içermemektedir. Petrol kaynaklı dizelde, her bir litre yakıtın yanması ile atmosfere yaklaşık 1,55 kg CO<sub>2</sub> emisyonu söz konusudur. Tüm yaşam döngüsü (ekim, yağın üretimi ve yağın biyodizele dönüşümü) dikkate alındığında ise; biyodizelin atmosfere çok daha az miktarlarda CO<sub>2</sub> salınımı bulunmaktadır (Carraretto ve ark., 2004; Janaun ve Ellis, 2010; Kafuku ve Mbrawa, 2010; Ahmad ve ark., 2011; Satyanarayana ve Muraleedharan, 2011). Dizel yakıtla karşılaştırıldığında biyodizel kükürt içermez. Daha az miktarda CO, daha az partikül madde, daha az koku ve hidrokarbon emisyonu ve daha fazla O<sub>2</sub> üretmektedir. Böylelikle; biyodizel kullanıldığında, motor emisyonundaki yanmamış hidrokarbonlar %68, partiküller %40, CO %44, sülfür oksit %100 ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar %80-90 aralığında önemli ölçüde azalmaktadır (Talebian–Kiakalaieh, Amin ve Mazaheri, 2013). Daha fazla oksijen üretimi ise; tam yanmaya ve emisyon azaltımına sebep olmaktadır (Fazal, Haseeb ve Masjuki, 2011; Silitonga ve ark., 2011).

## **2.1. Yağlar**

### **2.1.1. Bitkisel ve Hayvansal Yağlar**

Yağlar, yüksek miktarda hidrojen ve karbon içeren, suyla karışmama özelliği olan ve oda sıcaklığında yüksek viskoziteye sahip maddelerdir. Bitkisel ve hayvansal yağlar olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Bu yağlar, gliserol ve yağ asitlerinin esterleri olup gliserit ve trigliserit olarak adlandırılırlar.

Yağlarda doymuş ve doymamış olmak üzere iki çeşit yağ asidi bulunmaktadır. Doymuş yağ asitleri, tek karbon bağı içerirken, doymamış yağ asidi, bir veya daha fazla karbon-karbon çift bağı içerir. Yaygın yağ asitleri stearik, oleik, linolenik ve palmitiktir. Çizelge 2.1. farklı yağlardaki yağ asitlerinin kimyasal yapısını göstermektedir (Gerpen ve ark., 2004).

**Çizelge 2.1.** Yağ asitlerinin kimyasal yapısı.

Yağ Asidi	Yapısı	Yaygın Kullanımı	Metil Esteri
Palmitik Asit	$R-(CH_2)_{14}-CH_3$	C16:0	Metil palmitat
Stearik Asit	$R-(CH_2)_{16}-CH_3$	C18:0	Metil stearat
Oleik Asit	$R-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-CH_3$	C18:1	Metil oleat
Linoleik Asit	$R-(CH_2)_7-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_4-CH_3$	C18:2	Metil linoleat
Linolenik Asit	$R-(CH_2)_7-(CH=CH-CH_2)_3-CH_3$	C18:3	Metil linolenat

Yağların en fazla kullanım alanı yemeklik yağ olarak gıda endüstrisidir. Yemeklik yağ kaynakları, dünya üzerinde farklılık göstermektedir. Temel malzemesi mısır yağı, margarin, hindistan cevizi yağı, palm yağı, zeytinyağı, soya tohumu yağı, üzüm çekirdeği yağı ve kanola yağı gibi bitkisel kaynaklı yağlar veya tereyağı, balık yağı gibi hayvansal kaynaklı yağlardır. Malezya'da kullanılan en yaygın yemeklik yağ, maliyetinin diğer yağlara oranla düşük olmasından dolayı palm yağıdır. Bitkisel yağlar, gıda endüstrisine ilave olarak sabun üretimi ve kozmetik alanında da kullanılmaktadır.

Bitkisel yağlar, bitkilerden ekstraksiyon sonucu elde edilirler. Bitkisel yağların viskoziteleri, dizel yakıttan 11-17 kat fazladır (Goering ve ark., 1982). Hacimsel

ısı değerleri, bitkisel yağların 39-40 MJ/kg, dizel yakıtlarınsa 45 MJ/kg'dır. Bitkisel yağların parlama noktası, 200 °C'den fazla olup oldukça yüksektir.

Bitkisel yağların, geleneksel dizel motorlarda doğrudan kullanımı, yakıtın tipine ve derecesine bağlı olarak bazı problemlere yol açmaktadır. Yaygın problemler, karbon birikmesi, motor yağının jelleşmesi, kirlenmiş piston başlıkları vb.'dir (Bruwer ve ark., 1981; Ramadhas, Jayaraj ve Muraleedharan, 2004; Lam, Lee ve Mohamed, 2010). Bitkisel yağlar, dizel yakıtlarla karşılaştırıldığında daha yüksek akma ve bulutlanma noktasına sahiptir. Bu durumda; kışın kullanımı tavsiye edilmez (Soriano ve ark., 2005; Joshi ve Pegg, 2007). Buna ek olarak, bitkisel yağların setan sayısı çok yüksektir, bu da dizel motorda patlama gecikme süresini azaltır (Ahmad ve ark., 2009). Ayrıca; bitkisel yağlar, sahip oldukları yüksek iyodin değerinden dolayı oksidasyon hızını artırır. Bu nedenle; uzun süreli depolama bu tip yakıtlar için tavsiye edilmez (Lapuerta, Fernández ve Mora, 2009).

Biyodizel üretimi, bitkisel yağların hammadde olarak kullanıldığı önemli bir prosestir. Biyodizel, bu yağların transesterifikasyonu ile üretilir. Yapılan çalışmalar, biyodizelin ayçiçeği yağı, palm yağı ve soya tohumu yağı gibi bitkisel kaynaklı çeşitli yağlardan üretilebileceğini göstermektedir (Zhang ve ark., 2003b; Dizge ve ark., 2009; Campanelli, Banchemo ve Manna, 2010).

### **2.1.2. Atık Yemeklik Yağlar (AYY)**

Kızartma amaçlı kullanılan yağlarda, kızartma esnasında oluşan fiziksel ve kimyasal reaksiyonlar sonucunda çok sayıda bozunma ürünü oluşmakta ve bu nedenle yağın kullanıldıktan sonra kısa aralıklarla değiştirilmesi gerekmektedir. Bu durumda evlerden ve restoranlardan üretilen AYY miktarı, insan nüfusundaki muazzam artıştan dolayı hızla artmaktadır (Chen ve ark., 2009). Gıda tüketimindeki artış, aynı zamanda büyük miktarlarda AYY üretimine katkıda bulunmaktadır (Phan ve Phan, 2008).

Çizelge 2.2. bazı ülkelerde yağ kaynaklarından üretilen tahmini AYY miktarını göstermektedir. ABD, tek başına yıllık yaklaşık 10 milyon ton AYY üretmektedir (Gui, Lee ve Bhatia, 2008).

**Çizelge 2.2.** Çeşitli ülkelerde üretilen atık yağ miktarları.

Ülke	Miktar (milyon ton/yıl)	Kaynak
A.B.D.	10	Soya tohumu yağı
Çin	4,5	Salata yağı, hayvansal yağ
Avrupa	0,7-10	Kolza tohumu yağı, ayçiçek yağı
Japonya	0,45-0,57	Soya tohumu yağı, palm yağı, hayvansal yağ
Tayvan	0,07	Soya tohumu yağı, palm yağı, hayvansal yağ
Malezya	0,5	Palm yağı
Kanada	0,12	Hayvansal yağ, kanola yağı
İngiltere	1,6	Soya tohumu yağı, kanola yağı
İrlanda	0,153	Kolza tohumu yağı

Türkiye’de yılda 1,5 milyon ton bitkisel yağ gıda amaçlı kullanılmakta olup, bu yağlardan yaklaşık 150 bin ton atık yağ oluşmaktadır (Öztürk, 2018).

AYY’ın fiziksel ve kimyasal özellikleri, kızartma süresince oluşan değişimlerden dolayı taze yağa göre nispeten farklılıklar göstermektedir. Çizelge 2.3.’te Wen ve arkadaşları tarafından toplanan AYY’ın fiziksel ve kimyasal özellikleri gösterilmektedir (Wen ve ark., 2010).

**Çizelge 2.3.** AYY'ın fiziksel ve kimyasal özellikleri.

<b>Özellik</b>	<b>Birim</b>	<b>Değer</b>
Palmitik Asit	% Ağırlık	8,5
Stearik Asit	% Ağırlık	3,1
Oleik Asit	% Ağırlık	21,2
Linoleik Asit	% Ağırlık	55,2
Linolenik Asit	% Ağırlık	5,9
Diğerleri	% Ağırlık	4,2
Su İçeriği	% Ağırlık	1,9
Yoğunluk	g/cm <sup>3</sup>	0,91
Kinematik Viskozite (40 °C)	mm <sup>2</sup> /s	4,2
Sabunlaşma Değeri	mg KOH/g	207
Asit Değeri	mg KOH/g	3,6
İyot Sayısı	gl <sub>2</sub> 100 g <sup>-1</sup>	83
Sodyum İçeriği	mg/kg	6,9
Peroksit Değeri	mg/kg	23,1

Dünya üzerinde milyonlarca insan açlık ve beslenme yetersizliği çekerken biyodizel üretmek için gıda kaynaklarının (yenilebilir yağlar) kullanımı, bitkisel veya yenilebilir yağ talebinde artışa ve ekim için gereksiz ağaç kesimine sebebiyet vermesinden dolayı çeşitli sivil toplum kuruluşları tarafından ağır eleştiriler almaktadır (Tan, Lee ve Mohamed, 2011). Aynı zamanda ormanların tahrip edilmesi hayvan ve bitki ekosisteminin bozulması anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, evlerde ve restoranlarda atık yağ üretimindeki artışın çevresel

etkisi göz önünde bulundurulduğunda artan bir kaygı sözkonusudur (Chen ve ark., 2009). Doğrudan kanalizasyon sistemine boşaltılan veya çöp sahasına atılan AYY, su ve toprak kirliliğine sebep olmakta, su ekosistemini tahrip etmekte ve dolayısıyla insan sağlığını bozabilmektedir. Ayrıca, AYY'ın gıda hazırlamada yağ olarak tekrar kullanımının önemli olumsuz etkileri olabilecektir. Oysa ki, biyodizel üretiminde hammadde olarak AYY kullanımı durumunda yukarıda belirtilen problemler büyük ölçüde azaltılabilecektir.

Petrol bazlı dizelle karşılaştırıldığında; biyodizelin endüstrileşmesi ve ticarileşmesindeki en büyük engel, onun yüksek maliyetidir. Kullanılan hammadde stoğuna bağlı olarak, biyodizel maliyeti, petrol bazlı dizelin yaklaşık olarak 1,5 katıdır (IEA, 2004; Vaccaro ve ark., 2010). Maliyet dağılımının yaklaşık %70'lik kısmını ise hammadde olarak kullanılan rafine yağ oluşturmaktadır (Martin ve Grossmann, 2012). Atık yemeklik yağ maliyetinin bitkisel yağinkinden 2-3 kat daha ucuz olması sebebiyle, rafine yağ yerine atık yağın kullanımı ile biyodizel üretim maliyetinin %60-90 aralığında azaltılabileceği belirtilmektedir (Canakci ve Van Gerpen, 2001; Zhang ve ark., 2003b; Haas ve ark., 2006; Kulkarni ve Dalai, 2006; Marchetti, Miguel ve Errazu, 2008). Özellikle son yıllarda, biyodizeli ekonomik olarak elde edebilmek amacıyla rafine bitkisel yağların yerine düşük maliyetli atık yemeklik yağların ve hayvansal yağların kullanımı artış göstermektedir (Felizardo ve ark., 2006; Wang ve ark., 2007; Jacobson ve ark., 2008; Phan ve Phan, 2008; Halim, Kamaruddin ve Fernando, 2009;).

Sonuç olarak, AYY'ın toplanması ve biyodizel üretimine yönelik geri dönüşüme kazandırılması oldukça önemlidir. İhtiyacın artmasına bağlı olarak her yıl daha fazla miktarda fosil yakıt kullanıldığından AYY, biyodizel üretimi için mükemmel bir alternatiftir (Yaakob ve ark., 2013).

## **2.2. Biyodizel**

Uluslararası Enerji Ajansı (IEA)'nın "Orta Dönem Yenilenebilir Enerji Raporu 2015"e göre; yenilenebilir enerjinin toplam enerji tüketimindeki payının 2020 yılına kadar en az %26 artması beklenmektedir (IEA, 2015). IEA'nın 2013 Dünya

Enerji Görüşü'nde, önümüzdeki 20 yıl için dünya yakıt talebinin, ulaşım sektöründe yoğunlaşacağı ve bu talebin dizel yakıtta günlük 5,5 milyon varil olacağı vurgulanmaktadır (Biol, 2014). Dolayısıyla; dizel yakıt kullanımının, önümüzdeki yıllarda petrol kaynaklı yakıtlar içerisinde en yüksek paya sahip olacağı beklenmektedir. Bu da gösteriyor ki; çevreye olumsuz etkisi olmayan biyodizelin, konvansiyonel dizel yakıtın yerini alması daha pratik bir fırsat olarak görülmektedir.

### **2.2.1. Biyodizelin Özellikleri**

Biyodizel, açık sarı ile koyu sarı arasında renge sahip şeffaf bir sıvıdır. Kaynama noktası 200 °C üzerinde, parlama noktası 145-175 °C arasında, distilasyon aralığı 195-325 °C ve buhar basıncı (22 °C'de) 5 mm Hg'den azdır. Suda çözünmez, hafif küflü/sabunlu bir kokusu olup biyolojik olarak parçalanabilir. Kararlı reaktivitesi vardır, fakat güçlü oksitleyici ajanlarla temasından kaçınılmalıdır (Demirbaş, 2009a).

Biyodizelin fosil dizel yakıtla çok benzer özellikleri olduğu için petrol kaynaklı dizelle belirli karışım oranlarında kullanılabilir. Biyodizel, kömürle karşılaştırıldığında, daha yüksek ısı değerine sahiptir. Şöyle ki; bu değer biyodizelde 42,65 MJ/kg iken, kömürde 32-37 MJ/kg'dır. Diğer ticari fosil yakıtlarda ise ısı değeri, benzinde 46 MJ/kg, petrol bazlı dizelde 43 MJ/kg ve petrolde 42 MJ/kg olup, biyodizelle kıyaslanabilir derecededir. Biyodizel metil esterleri, dizel yakıt karışımının yağlayıcılık özelliğini artırır, petrol kaynaklı dizelden % 66 daha iyi yağlama özelliği sağlar. Petrol kaynaklı biyodizelle karşılaştırıldığında, biyodizelin bazı işletme dezavantajları söz konusudur. Bunlar, soğuk başlatma problemleri, düşük sıcaklıklardaki zayıf akış özellikleri, daha az enerji içeriği, yüksek bakır sıyırma korozyonu ve daha yüksek viskozite ile bulutlanma ve akma noktasından dolayı yakıt pompalama zorluklarıdır. Düşük sıcaklık özelliklerinden dolayı havacılık alanında da uygulanabilir değildir (Yusuf, Kamarudin ve Yaakob, 2011).

## **2.2.2. Biyodizel Üretim Yöntemleri**

Dizel motorlarında yakıt olarak yağ ve yağ besleme stok çeşitlerinin kullanımına imkân sağlayan son teknolojiler, genellikle piroliz, mikro-emülsiyon, doğrudan veya karıştırarak yağların kullanımı ve transesterifikasyon olarak tanımlanır. Transesterifikasyon, çoğu araştırmacı tarafından daha iyi kalitede yakıt üretimi için en çok tercih edilen yöntem olarak önerilmektedir (Meher, Sagar ve Naik, 2006; Leung, Wu ve Leung, 2010; Koh ve Ghazi, 2011).

### **2.2.2.1. Piroliz**

Piroliz, hava veya oksijen yokluğunda, termal enerji veya katalizör varlığında ısı uygulanarak bağların kırılması ve küçük moleküllerin oluşumuyla sonuçlanan kimyasal değişimlerdir. Piroliz, 400-600 °C aralığındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Piroliz hızına bağlı olarak, gaz, biyo-yag ve kömür oluşur. İşletme şartlarına bağlı olarak, piroliz prosesi; geleneksel, hızlı ve flash piroliz olarak 3 alt sınıfa ayrılır. Biyo-yag üretimi için hızlı piroliz yöntemi kullanılır. Hızlı pirolizde sıcaklık, 400-600 °C aralığındadır. Reaksiyon 0,5-2 saniye sürer.

Farklı reaksiyon yolları ve reaksiyon ürünlerindeki değişikliklerden dolayı, pirolitik kimyada karakterizasyon zordur (Ma ve Hanna, 1999). Bitkisel yağlar, hayvansal yağlar, doğal yağ asitleri ve yağ asidi metil esterleri pirolize edilebilir.

Bir çalışmada, piroliz sonucu elde edilen ürünlerin, petrol dizel yakıtı ve eş kaloriferik değere sahip yakıtlardan daha düşük viskozite, parlama ve alevlenme noktasına sahip olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak, piroliz ürünlerinin setan sayısı daha düşüktür. Yapılan bu çalışmaya göre; piroliz olmuş bitkisel yağların, kabul edilebilir ölçüde kükürt, su ve sediment ile bakır korozyon değerlerine sahip olduğu, ancak kabul edilemez miktarda kül, karbon atıkları ve akma noktası gösterdiği tespit edilmiştir (Mahanta ve Shrivastava, 2011).

Abbaszaadeh ve arkadaşları, piroliz süresince oksijenin gideriminden dolayı düşük değerli malzemeler üretildiğini tespit etmişlerdir (Abbaszaadeh ve ark., 2012). Bu prosesle üretilen biyodizelin uygulamada kullanımını sınırlayan bazı istenmeyen özellikleri söz konusudur. Düşük ısı değerleri, tamamlanmamış



uçuculukları ve kararsızlıkları bunlardan bazılarıdır (French ve Czernik, 2010). Fakat diğer bir çalışmada, trigliseritin termal pirolizinin üretim maliyetinin düşük olması, basitliği, daha az atık ve çevre kirliliğine sebebiyet vermesinden dolayı avantajları olduğu belirtilmektedir (Singh ve Singh, 2010).

Pirolizin belirtilen başka bir dezavantajı ise; farklı fraksiyonların ayrılması için distilasyon ekipmanına ihtiyaç olmasıdır. Ayrıca elde edilen ürün, benzin gibi kükürt içerdiğinden daha az çevre dostudur (Ranganathan, Narasimhan ve Muthukumar, 2008).

#### **2.2.2.2. Mikro-Emülsiyon**

Ham bitkisel yağların doğrudan yakıt olarak kullanılamamasının nedenlerinden biri onların viskoziteleridir. Mikro-emülsiyon, bitkisel yağlardaki viskozite problemi için en önemli potansiyel çözümlerden biridir (Ma ve Hanna, 1999).

IUPAC tanımına göre mikro-emülsiyon, su, yağ ve yüzey aktif maddelerden oluşan dispersiyondur, izotropik ve termodinamik olarak kararlı bir sistemdir. 1-100 nm aralığında değişen genellikle 10-50 nm arasında çapa sahip taneciklerden oluşan bir yapıdır (Aleman ve ark., 2011).

Biyodizel mikro-emülsiyon bileşenleri, dizel yakıt, bitkisel yağ, alkol, yüzey aktif maddeler ve setan arttırıcılardır. Metanol ve etanol gibi alkoller, viskozite düşürücü katkıları olarak kullanılırken, daha yüksek karbonlu alkoller, yüzey aktif maddeler ve alkil nitratlar setan arttırıcı olarak kullanılır (Chiaramonti ve ark., 2003).

Mahanta ve arkadaşları, mikro-emülsiyonun, ester ve dispersant (ko-solvent) ile bitkisel yağlardan veya dizel yakıtla veya yakıtsız olarak bitkisel yağlar, alkol, yüzey aktif madde ve setan arttırıcı ile yapılabileceğini rapor etmişlerdir (Mahanta ve Shrivastava, 2011). Bütanol, hekzanol ve oktanollü tüm mikro-emülsiyonlar, dizel yakıt için maksimum viskozite gereksinimini karşılamaktadır. 2-oktanol, triolein ve soya tohumu yağında metanolün misel çözünürleştirmesinde etkili bir amfifildir (Schwab, Bagby ve Freedman, 1987).

Mikro-emülsiyonlar, viskoziteyi düşürürler, setan sayısını arttıırırlar ve biyodizelde iyi spreyleme karakteristiği gösterirler. Fakat Parawira tarafından yapılan çalışmada, mikro-emülsifiye dizelin motorlarda sürekli kullanımının, enjektör iğnesinde yapışma, karbon birikimi ve tamamlanmamış yanma gibi problemlere sebep olduğu gösterilmiştir (Pairiawi, 2010).

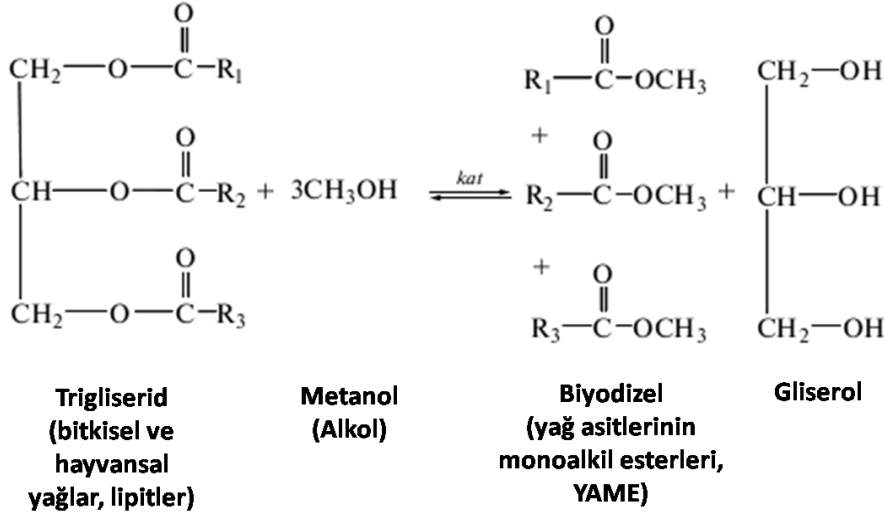
### **2.2.2.3. Seyreltme/Karıştırma**

Bitkisel yağların doğrudan kullanımı, doğrudan veya dolaylı dizel motorlar için pratikte pek uygun değildir. Depolama ve yanma süresince oksidasyon ve polimerizasyondan dolayı sakız oluşumu, yüksek viskozite, serbest yağ asidi içeriği, asit bileşimi, karbon birikimi ve motor yağı kalınlaşması gözlenen problemlerdendir. Ma ve arkadaşlarına göre; yağın bozulması ve tamamlanmamış yanma iki ciddi problemdir (Ma ve Hanna, 1999).

Dizel yakıt, çözücü veya etanolle bitkisel yağın seyreltilmesi bu gibi durumlarda yardımcı çözümlerdir. Bilgin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre dizel yakıtta %4 etanol eklenmesi, fren termal etkinliğini, fren torkunu ve fren gücünü arttırmakta, bu arada fren spesifik yakıt tüketimini azaltmaktadır. Ayrıca; etanolün dizel yakıttan daha düşük olan kaynama noktası, yanma prosesinin gelişimine yardımcı olabilecektir (Bilgin, Durgun ve Sahin, 2002).

### **2.2.2.4. Transesterifikasyon**

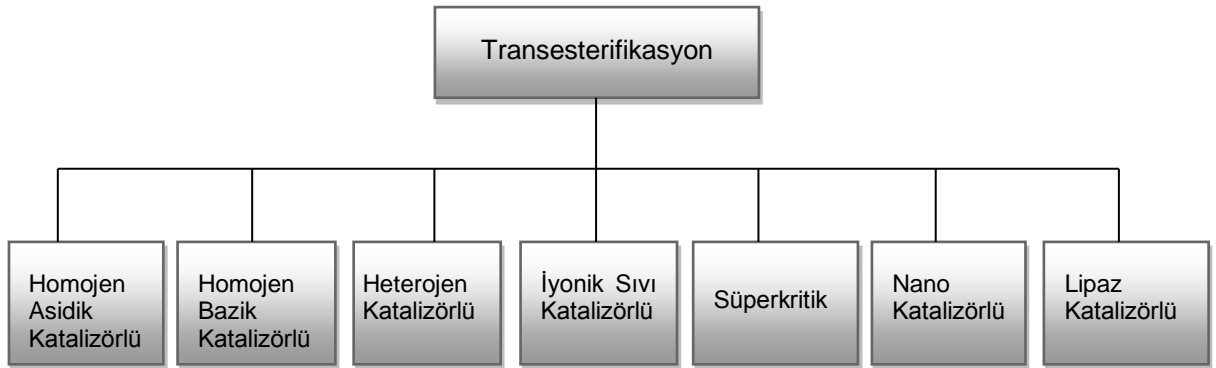
Kimyasal olarak petrol dizeline benzerlik gösteren yağlardan biyodizel üretiminde, transesterifikasyon geleneksel bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, yağlar ve trigliseritler yağ asitlerine dönüştürülür, elde edilen yakıt, dizel yakıtın viskozitesine yakın özellik gösterir ve mevcut petrol dizel motorlarında modifikasyon yapmaksızın kullanmaya imkân sağlar. Genellikle, transesterifikasyon tersinir bir reaksiyondur, ısı ve/veya basınç altında tepkiyenlerin karıştırılmasıyla basitçe ilerler. Fakat bazı katalizörlerin ortama eklenmesiyle reaksiyon hızlandırılır. Transesterifikasyon için temel kimyasal reaksiyon Şekil 2.1.'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.1.** Trigliseritlerin transesterifikasyonla biyodizele dönüşüm reaksiyonu.

Transesterifikasyon reaksiyonunda alkol olarak metanol, etanol, propanol gibi farklı alkol çeşitleri kullanılabilir. Fakat maliyetinin düşük olması, polar özelliği ve en kısa alkol zincirine sahip olması gibi özellikleri nedeniyle metanol tercih edilmektedir (Ma ve Hanna, 1999).

Transesterifikasyon yoluyla biyodizel üretiminde birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin genel olarak gösterimi Şekil 2.2.'de verilmiştir.



**Şekil 2.2.** Önemli transesterifikasyon proseslerinin şematik gösterimi.

Tüm katalitik transesterifikasyon proseslerinde bir alkol ile trigliserit, katalizör varlığında ester ve gliserol oluşturmak üzere reaksiyona girer. Trigliserit, 3 uzun zincirli yağ asidinin bağlandığı gliserin molekülüne sahiptir. Yağın özelliği gliserine bağlı yağ asitleri ile belirlenir. Yağ asitlerinin yapısı ise, biyodizelin karakteristiğini etkileyebilir (Lokanatham ve Rovindranath, 2013).

Etkili biyodizel üretimi için başarılı bir transesterifikasyon, reaksiyon sonrası oluşan ester ve gliserol katmanının ortamdan kolaylıkla ve etkin bir şekilde ayrılması anlamına gelir. Yan ürün olarak oluşan gliserol, eczacılık, kozmetik vb. diğer endüstrilerde kullanımı için saflaştırılabilir.

### **Homojen Asidik Katalizörlü Transesterifikasyon**

Asidik katalizörlü transesterifikasyon, etanol ve sülfürik asit kullanarak palm yağından biyodizel (etil ester) üretmek için literatürde ilk kez kullanılan bir yöntemdir (Gebremariam ve Marchetti, 2017).

Asidik katalizörlü proses, trigliseritin asit katalizör varlığında ester ve gliserol oluşturmak üzere alkolle reaksiyon oluşturmasıdır. Özellikle bu yöntem, yüksek miktarda serbest yağ asidi içeren yağlardan biyodizel eldesinde uygundur ve ekonomiktir. Fakat asit katalizörlü reaksiyonlar, alkali katalizörlü reaksiyonlara göre uzun reaksiyon süresi gerektirir ve daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleşir (Zhang, 2003a). Ayrıca; asit katalizörler çok fazla tuz etkileşimine, dolayısıyla korozyona sebep olurlar.

Asidik katalizör, bitkisel yağ ile doğrudan karıştırılır. Bu esnada esterleşme ve transesterleşme tek aşamada oluşur. Çünkü asit katalizör, esterleşme reaktifliği gösterir ve çözücü olarak davranır (Cervero, Coca ve Luque, 2008).

Asidik katalizörlü transesterifikasyon, alkil ester verimini düşürecek olan karboksilik asit oluşumundan kaçınmak amacıyla su yokluğunda yapılmalıdır (Mahanta ve Shrivastava, 2011). Park ve arkadaşları, sülfürik asit katalizörü varlığında oleik asitle metanolün transesterifikasyonunda suyun etkisini araştırmak için yağ/metanol oranlarını 1:3 ile 1:6 değerlerinde ve reaksiyon

sıcaklıklarını 60 ve 80 °C olarak çalışmışlar ve yağdaki su içeriğinin %20'ye kadar artışı durumunda oleik asidin esterifikasyonunda önemli miktarda azalma tespit etmişlerdir (Park, 2010).

Transesterifikasyon bir denge reaksiyonu olduğundan reaksiyonun ileri yönde devam etmesi için alkol miktarının yağın miktarından her zaman fazla olması gerekmektedir. Sıcaklık ve asit katalizör miktarı da transesterifikasyon hızını ve alkil ester verimini etkilemektedir. Fakat optimum miktarın üzerindeki alkol, daha fazla gliserol üretimine sebep olacağından gliserolün ortamdaki ayrılması esnasında ekstra maliyet oluşacaktır. Bu nedenle etkili bir üretim için yağ ve alkol oranlarında optimizasyon her zaman gereklidir. Bu kapsamda; literatürde yağ/alkol oranı ve sıcaklığın transesterifikasyon üzerine etkisini inceleyen birçok çalışma mevcuttur.

Zheng ve arkadaşları, atık yemeklik yağın asit katalizörlü transesterifikasyonunda en uygun proses parametrelerinin belirlenmesi ve reaksiyon kinetiği üzerine çalışmışlar, yağ:metanol:asit molar oranının ve sıcaklığın yağ asidi metil esteri verimini etkileyen en önemli parametreler olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmaya göre; yağ:metanol:asit molar oranı değerleri 70 °C'da 1:245:3,8 ve 80 °C'da 1:74:1,9 - 1:245:3,8 aralığında iken aşırı metanol kullanımının sonucu olarak transesterifikasyon, birkaç dakika içinde temel olarak birinci dereceden reaksiyon şeklinde gerçekleşmekte ve dört saat içerisinde % 99±1 dönüşüm ile tamamlanmaktadır (Zheng ve ark., 2006).

Sülfürik asit, sülfonik asit ve hidroklorik asit genel asit katalizörlerdir, ancak en çok kullanılan asit sülfürik asittir. Ayrıca alternatif asitler kullanılarak verim üzerine çeşitli çalışmalar da mevcuttur.

Marchetti ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, asit katalizörle biyodizel üretiminin dezavantajlarından biri olarak çok fazla miktarda serbest gliserol oluşumundan bahsetmişlerdir. Reaksiyon sonucunda üretilen gliserol, ASTM'nin izin verdiği en yüksek miktardan fazladır. Fakat bu durum, ürün saflaştırmada ilave ekipman

kullanarak veya reaktördeki kalış süresi gibi parametrelerin modifikasyonu ile iyileştirilebilir (Marchetti, Miguel ve Errazu, 2008).

### **Homojen Bazik Katalizörlü Transesterifikasyon**

Bazik katalizörlü transesterifikasyon prosesi, alkali metal alkoksitler ve hidroksitler gibi bazik katalizör varlığında ester (biyodizel) ve gliserol oluşturmak üzere alkolle trigliseritin reaksiyonu olarak tanımlanabilir. Bazik katalizörlü transesterifikasyon, asidik katalizörlü transesterifikasyona göre daha hızlıdır ve endüstriyel ekipmanlara daha az korozif etki gösterir. Bu nedenle ticari olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Chiaramonti ve ark., 2003; Cervero, Coca ve Luque, 2008; Marchetti, Miguel ve Errazu, 2008; Ranganathan, Narasimhan ve Muthukumar, 2008). Fakat su ve fazla miktarda serbest asit içeren yağlarda bazik katalizör, reaksiyon esnasında yağın sabunlaşmasına neden olmakta ve dolayısıyla emülsiyon oluşumu ve reaksiyon sonunda gliserolün ortamdaki uzaklaştırılması, yüksek fiyatlı katalizörün aşırı tüketilmesi gibi problemler ortaya çıkmaktadır (Pairiawi, 2010). Buna ek olarak, yüksek su içeriğine sahip bitkisel yağdan gelen veya sabunlaşma reaksiyonu süresince oluşan su, trigliseritin hidrolizine sebebiyet verir ve daha fazla serbest yağ asidi üretilir.

Genel olarak, transesterifikasyon reaksiyonlarında bazik katalizörlerin katalitik aktivitesi, asidik katalizörlerden daha fazladır, fakat sadece düşük serbest yağ asidine sahip (genellikle %0,5'ten daha düşük) rafine edilmiş bitkisel yağlardan biyodizel üretmeye seçicidirler (Demirbaş, 2009a). Bu durum, bazik katalizörlü transesterifikasyonun bitkisel kızartma yağları gibi sadece çok iyi kalitedeki rafine edilmiş yağların kullanımına, dolayısıyla biyodizel üretiminin pahalı bir yöntemle üretimine sebep olmaktadır. %0,5'ten fazla serbest yağ asidi içeren besleme hammadde stoklarının kullanımına imkân vermek için transesterifikasyona ilave esterifikasyon adımı eklenmekte, bu da prosesi daha kompleks yapmakta ve yine ekipman ve işletme maliyetlerini arttırmaktadır.

Bazik katalizörlü transesterifikasyonda genellikle kullanılan katalizörler, sodyum hidroksit, potasyum hidroksit ve sodyum metoksittir. Sodyum hidroksit, ortalama

katalitik aktivitesi ve daha düşük maliyetinden dolayı en çok tercih edilen katalizördür (Atadashi ve ark., 2013).

Dias ve arkadaşları, işlenmemiş ve atık soya tohumu yağı ile ayçiçek yağının transesterifikasyonu üzerine farklı bazik katalizörlerin performansını karşılaştırmışlar ve Avrupa biyodizel standartlarına uygun nihai ürün için işlenmemiş yağların ikisinde % 0,6 (ağırlıkça)  $\text{CH}_3\text{ONa}$ ; ayçiçek yağı için % 0,6 ve soya tohumu yağı için % 0,8 (ağırlıkça)  $\text{NaOH}$ ; atık kızartmalık yağ için sodyum bazlı her iki katalizör % 0,8 (ağırlıkça) kullanmışlar ve % 99,4 (ağırlıkça) saflıkta biyodizel üretimi gerçekleştirmişlerdir (Dias, Alvim-Ferraz ve Almeida, 2008).

### **Heterojen Katalizörlü Transesterifikasyon**

Homojen katalizörlerden özellikle bazik katalizörlerin kullanımı, yan ürün olan gliserolün saflaştırılması ve atıksu arıtım ihtiyacındaki zorluklarla ilişkilendirilmiştir. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için genellikle katı baz katalizörler olmak üzere heterojen katalizörlerin kullanımı tavsiye edilmektedir. Katı baz katalizörler, uygun reaksiyon koşulları, kolay ayırma ve yüksek aktivite, daha az kirlilik gibi avantajlara sahiptir (Jagadele, 2012).

Heterojen katı katalizörler, genellikle serbest yağ asitleri esterifikasyon reaksiyonunu katalizleyebilen asidik katılar, trigliserit transesterifikasyon reaksiyonunu katalizleyebilen bazik katılar ve aynı anda hem esterifikasyon hem de transesterifikasyon reaksiyonunu katalizleyebilen iki işlevli katılar (asit-baz karakterli) olarak sınıflandırılırlar (Borges ve Diaz, 2012).

Heterojen katalizörlü proseslerde asit ve baz formunda etkili katı katalizörler bulmak için çok çeşitli çalışmalar vardır. Bournay ve arkadaşları, sürekli transesterifikasyon prosesi için yeni katı katalizörden bahsetmiştir. Bu katalizör, katalizör kaybı olmaksızın transesterifikasyon reaksiyonunu yürüten çinko ve alüminyum oksit karışımıdır. Söz konusu katalizörle, homojen katalizörlü proseslere göre reaksiyon daha yüksek sıcaklıkta ve basınçta, aşırı metanolle yapılmaktadır. Ayrıca, Bournay ve arkadaşları bu yeni katı katalizörlerin

kullanılmasıyla ne su arıtımına ne de katalizör geri kazanımına gerek kalmadığından söz etmektedirler. Ürünlerin saflaştırma adımları, teorik değere yakın, çok yüksek metil ester veriminden dolayı çok daha basit olabilmektedir. İlave olarak, gliserin yüksek saflıkta (en az %98) herhangi bir tuz kirliliği olmaksızın üretilebilmektedir (Bournay ve ark., 2005).

Heterojen katalizörlerden amorf zirkonya, titanyum ve potasyum zirkonya bitkisel yağların transesterifikasyonunda katalizör olarak kullanılmaktadır. Furuta ve arkadaşları, 250 °C'de metanolle soya tohumu yağının transesterifikasyonu ve 175-200 °C'de metanolle n-oktanoik asitin esterifikasyonu için amorf zirkonya, titanyum-, alüminyum- ve potasyum- katkılı zirkonya geliştirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, titanyum ve alüminyum katkılı zirkonya ile her iki reaksiyon için soya tohumu yağından biyodizel üretiminde %95'in üzerinde yüksek performansta dönüşüm sağlanmıştır (Furuta, Matsunashi ve Arata, 2006).

Peng ve arkadaşları yüksek serbest asit içerikli düşük maliyetli çeşitli besleme hammadde stoklarından biyodizel üretimi için  $SO_4^{2-}/TiO_2-SiO_2$  içerikli katı asit katalizörün aktivitesini çalışmışlar ve karakterize etmişlerdir. Optimum verime 200 °C'de, metanol/yağ molar oranının 9:1 ve katalizör miktarının ağırlıkça %3 olduğu değerlerde ulaşmışlardır. Katı asit katalizör  $SO_4^{2-}/TiO_2-SiO_2$ , pahalı değildir ve çevre dostudur, yüksek katalitik aktiviteye sahiptir ve yüksek serbest yağ asidi içeren ucuz hammadde besleme stoklarından biyodizel üretiminde kararlıdır (Peng ve ark., 2008).

### **İyonik Sıvı Katalizörlü Transesterifikasyon**

İyonik sıvılar, oda sıcaklığında sıvı olan anyon ve katyonların organik tuzlarıdır. Anyonlar kimyasal özellikleri ve reaktiviteyi kontrol ederken, katyonlar iyonik sıvıların fiziksel özelliklerini (erime noktası, viskozite ve yoğunluk vb.) kontrol eder (Earle, Plechkova ve Seddon, 2009). Onların kendine özgü avantajları sentezlenme aşamasında istenilen reaksiyon koşullarına uyumluluklarının sağlanabiliyor olmasıdır.



Biyodizel üretimi için iyonik sıvı katalizörlü transesterifikasyonun diğer büyük avantajı ise; reaksiyon sonunda iki fazlı sistem oluşumudur. Organik fazda çözünmeyen iyonik sıvı, sulu fazda alkolle, kullanılan katalizörle ve reaksiyon süresince üretilen gliserolle kalır (Gamba, Lapis ve Dupont, 2008). Bu, son ürünlerin ayrılmasını çok kolaylaştırır. Çünkü üst fazın büyük çoğunluğu çok az miktardaki metanol ve biyodizeldir. Saf biyodizel, çok az miktardaki metanolün basit bir vakumla uzaklaştırılmasıyla izole edilebilir (Ren ve ark., 2014). Alt faz ise metanol, gliserol ve iyonik sıvıyı içerir. Alt fazdaki gliserol, suyla 3-4 kez yıkama sonrası veya distilasyonla yüksek saflıkta ayrılabilir (Dupont ve ark., 2009; Ren ve ark., 2014). Bu şekilde kalan saf iyonik sıvı, başka reaksiyonlar için doğrudan kullanılabilir.

Transesterifikasyon reaksiyonlarında en yaygın olarak 1-n-bütül-3-metilimidazolim katyonu içeren iyonik sıvılar kullanılmaktadır (Andreani ve Rocha, 2012).

Ren ve arkadaşları, transesterifikasyon reaksiyonunda katalizör olarak kullanılan morfolin alkali bazlı iyonik sıvı 1-bütül-3-metil morfolin hidroksitin ([Hnmm]OH) miktarının, metanol/soya tohumu yağı molar oranının, reaksiyon sıcaklığının ve sürenin etkilerini araştırmışlar ve %4 (ağırlıkça), [Hnmm]OH katalizör miktarında, metanol/soya tohumu yağı molar oranı 8:1'de, 70 °C sıcaklıkta ve 1,5 saatlik deney süresi sonunda %97 biyodizel verimi elde etmişlerdir. Katalizörün beş defa kullanımından sonra bile %90'dan fazla biyodizel verimi sağlamışlardır (Ren ve ark., 2014).

### **Süperkritik Transesterifikasyon**

Birbiriyle karışmayan tepkiyenlerle ilgili ve aynı zamanda katalizörden kaynaklı teknik sorunların üstesinden gelmek için mevcut yaklaşımlardan biri de süperkritik yöntemi kullanmaktır. Yüksek basınç ve sıcaklık altında gazlar ve sıvılar kritik noktanın ötesine geçtiğinde sıra dışı özellikler sergilerler. Bu durumda sıvı ve gaz fazı olarak sınırlandırılmazlar ve süperkritik faz üretilmiş olur. Süperkritik alkol transesterifikasyon reaksiyonu, çok yüksek sıcaklıklarda ve

basınçta meydana gelir. Bu yöntemde oda sıcaklığında birbiriyle karışmayan metanol ve yağ, yüksek sıcaklık ve basınçta homojen bir sıvı oluşturur. Böylelikle metanolün çözünürlüğünde keskin bir düşüş olur ve dielektrik sabitindeki azalma metanolü polar olmayan bir yapıya dönüştürür. Bu şartlarda kütle transferinde sınırlama olmayacağından reaksiyon hızlanacaktır (Leung, Wu ve Leung, 2010). Bu yöntemde, bitkisel yağın biyodizel dönüşürülmesi yaklaşık dört dakika sürer, ancak yöntemin çok yüksek sıcaklık ve basınç gerektirmesi maliyetin önemli ölçüde artmasına neden olmaktadır (Shahid ve Jamal, 2011).

Kiss ve arkadaşları, etil alkolle gerçekleştirdikleri süper kritik transesterifikasyon prosesinde sıcaklığın, basıncın ve zamanın etkilerini araştırmak amacıyla bir seri deney yapmışlar, 350 °C'de ve 12 MPa basınçta reaksiyon süresinin artırılmasıyla verimin %63,36'dan %93,22'ye çıktığını gözlemişlerdir. 350 °C'da basıncın düşürülmesiyle verim 30 dakika içerisinde %80,1'e düşmüştür. Yani basıncın düşürülmesi verimi azaltmıştır. Sıcaklığın 350 °C'dan 250 °C'a düşürülmesiyle ise verim azalmış, ancak bu durum reaksiyon süresinin uzun tutulmasıyla telafi edilebilmiştir. Minimum sıcaklık, basınç ve reaksiyon süresinde (250 °C, 8 MPa, 7 dak.) en düşük verim %14,8 olarak bulunmuştur (Kiss ve ark., 2014).

### **Nano Katalizörlü Transesterifikasyon**

Nano katalizörler, çeşitli homojen ve heterojen katalizör uygulamalarında katalizör olarak nano malzemelerin kullanılmasını kapsamaktadır. Nano ölçekteki katalizörler, oldukça yüksek spesifik yüzey alanına ve yüksek katalitik aktiviteyle sonuçlanan yüzey enerjisine sahiptir. Genellikle nano katalizörler, daha düşük sıcaklıklarda reaksiyonun oluşmasını sağlayarak, yan reaksiyonların oluşumunu önleyerek ve enerji tüketimini azaltarak reaksiyonun seçiciliğini artırır (Sharma ve ark., 2015). Böylelikle geleneksel katalizörlerde karşılaşılan kütle transfer problemlerini ortadan kaldırarak biyodizel üretimindeki verimi artırır.

Wen ve arkadaşları katı baz nano katalizör KF/CaO'i biyodizel üretiminde kullanmış ve %96'dan fazla verim elde etmişlerdir. 30-100 nm tanecik boyut

aralığında poroz bir yapıdaki bu katalizör, etkili bir şekilde yüksek asit içeriğine sahip yağı biyodizele dönüştürebilmiştir. Wen ve arkadaşları, X-ray toz difraksiyon analizinde KF/CaO'nin yeni kristal yapısı olan KCaF<sub>3</sub>'nin katalitik aktiviteyi ve stabiliteyi arttırdığını göstermişlerdir (Wen ve ark., 2010). Araştırmacılar, yüksek özgül yüzey alanı ve büyük gözenek boyutlarının, katalizör ve substrat arasındaki etkileşim için elverişli olduğunu ve bu durumun transesterifikasyonun veriminde etkili bir artışa neden olduğunu söylemişlerdir (Chaturvedi, Dave ve Shah, 2012).

Sidra ve arkadaşları, CaO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nano katalizörünü kullanarak transesterifikasyon prosesiyle jatrofa yağından biyodizel üretimini araştırmış ve metanol/yağ molar oranı 5:1 iken %82,3 verim elde etmişlerdir (Hashmi, 2016). Araştırmacılar başka bir çalışmalarında benzer şekilde nano boyutta MgO kullanmış, metanol/yağ molar oranı 5:1 iken 55 °C'da ağırlıkça %1,5 katalizörle, 45 dakika sonrasında % 98,7 ile en yüksek dönüşüm elde etmişlerdir (Pandian ve ark., 2013). Araştırmacılar, bu yüksek dönüşümün asıl nedeninin katalizörün yüzey alanının zenginleştirilmesi olarak açıklamışlardır. Ayrıca katalizörün kolaylıkla geri kazanıldığını ve basit rejenerasyon adımıyla sekiz defaya kadar kullanabildiklerini de bildirmişlerdir.

Son yıllarda Gupta ve arkadaşları, soya tohumu yağından biyodizel üretimine yönelik CaO nano partikülünün hazırlanması ve karakterizasyonu üzerine araştırma yapmışlar, kalsiyum nitrattan (CaO/CaN) ve salyangoz kabuğundan (CaO/SS) nanopartikül CaO sentezlemişlerdir. Bulunan sonuçlara göre salyangoz kabuğundan elde edilen nano katalizör, transesterifikasyon reaksiyonu için mükemmel katalitik aktiviteye ve stabiliteye sahiptir. Yapılan çalışmada metanol/yağ molar oranı 12:1 iken 65 °C sıcaklıkta, altı saat süresince %8 (ağırlıkça) katalizörle %96 verim elde edilmiştir (Gupta ve Agarwal, 2016).

### **Lipaz Katalizörlü Transesterifikasyon**

Katalizör olarak lipaz kullanılarak gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonu, biyoteknolojik yöntemlerin çevresel uygunluğu ve biyobozunurluk açısından

değerlendirildiğinde geleneksel proseslere karşı çevreci bir prosestir (Devanesan, Viruthagiri ve Sugumar, 2007; Mahanta ve Shrivastava, 2011).

Lipaz katalizörlü transesterifikasyon prosesi, ester (biyodizel) ve gliserol oluşturmak üzere katalizör olarak lipaz enziminin bulunduğu ortamda alkol ve trigliseritin reaksiyonudur. Bu yöntemde, diğer transesterifikasyon yöntemlerinde karşılaşılabilen sabunlaşma, saflaştırma, yıkama ve nötralizasyon gibi problemler oluşmamakta ve bu nedenle çoğunlukla tercih edilen bir yöntem olmaktadır. Yüksek serbest yağ asidi içeren hammadde besleme stoklarında uygulanabilmekte ve bu durumda daha fazla yağ biyodizele dönüşmektedir (Leung, Wu ve Leung, 2010).

Biyodizel üretiminde yüksek saflıkta ürün üretilmesi ve yan ürün olan gliserolün ortamdaki kolaylıkla uzaklaştırılmasından dolayı günümüzde oldukça dikkat çeken bir yöntem olduğuna işaret edilmektedir (Devanesan, Viruthagiri ve Sugumar, 2007; Mahanta ve Shrivastava, 2011). Buna ek olarak, prosesin işletme sıcaklığının 50 °C gibi düşük sıcaklıklarda gerçekleşmesi, diğer zor işletme şartlarındaki tekniklerle karşılaştırıldığında oldukça uygundur (Jin ve Bierma, 2010).

### **2.2.3. Atık Yemelik Yağdan Biyodizel Üretimi**

İşletme maliyeti açısından AYY kullanarak biyodizel üretimi, yemelik bitkisel yağ kullanımına göre büyük bir avantaj sağlamaktadır. AYY'ın maliyeti taze bitkisel yağdan 2-3 kat daha ucuzdur ve bu da biyodizel üretimi toplam işletme maliyetinde önemli bir düşüşe neden olur (Tan, Lee ve Mohamed, 2011). Ancak AYY'ın içerdiği safsızlıklar ve suyun olumsuz etkilerinden dolayı transesterifikasyon reaksiyonu öncesi ön işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Atık yağda su bulunması durumunda hidroliz reaksiyonu gerçekleşmekte, dolayısıyla su içeriğinin elimine edilmesi gerekmektedir. Sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri, AYY'ın 100 °C'ın üzerine ısıtılmasıdır (Banerjee ve Chakraborty, 2009). Alternatif olarak, endüstriyel ölçekte 0,05 barda vakum distilasyonu da yapılmaktadır (Felizardo ve ark., 2006). Ayrıca; AYY içeriğindeki

olası askıda katı taneciklerin, fosfolipitlerin ve diğ er safsızlıkların da sıcak suyla yıkanarak (Meng, Chen ve Wang, 2008) veya santrifüjle (Demirbaş, 2009b) ve filtre kâğıdıyla (Chen ve ark., 2009) uzaklaştırılması sağlanmalıdır.

AYY'dan üretilen biyodizel ve ticari dizel yakıtın özellikleri Çizelge 2.4.'te gösterilmiştir (Demirbaş, 2009b). Düşük emisyon ve kükürt içeriği, daha yüksek parlama noktası ve ateşleme özellikleri, toksik özellik göstermemesi gibi özellikleri sebebiyle biyodizel, ticari dizel yakıtı göre üstün özelliklere sahiptir.

**Çizelge 2.4.** AYY'dan üretilen biyodizel ve ticari dizel yakıtın genel özelliklerinin karşılaştırılması.

<b>Yakıt Özellikleri</b>	<b>Birim</b>	<b>AYY'dan Üretilen Biyodizel</b>	<b>Ticari Dizel Yakıt</b>
Kinematik Viskozite (40 °C)	mm <sup>2</sup> /s	5,3	1,9 - 4,1
Yoğunluk	g/cm <sup>3</sup>	0,897	0,75 - 0,840
Parlama Noktası	K	469	340 - 358
Akma Noktası	K	262	254 - 260
Setan Sayısı	-	54	40 - 46
Kül İçeriği	%	0,004	0,008 - 0,010
Kükürt İçeriği	%	0,06	0,35 - 0,55
Karbon Kalıntısı	%	0,33	0,35 - 0,40
Su İçeriği	%	0,04	0,02 - 0,05
Isıl Değeri	MJ/kg	42,65	45,62 - 46,48
Serbest Yağ Asidi (SYA)	mg KOH/g	0,10	--

## **2.3. Mikroorganizmalar**

Canlı ve yaşam devamlılığı açısından vazgeçilmez olan mikroorganizmalar enzim ve çeşitli ürünlerin üretimi, gıda endüstrisi, medikal uygulamalar, genetik çalışmalar gibi biyokimya mühendisliği kapsamındaki birçok alanda kullanıldığı gibi atık su arıtımının yer aldığı ekolojik süreçlerde de başrolü oynamaktadır (Kargı, 1993).

### **2.3.1. Mikroorganizmaların Genel Özellikleri**

Doğada yaşayan canlılar, belirgin özellikleriyle birbirlerinden ayrılırlar. Şekil, yapı, hareket, beslenme şekli vb. bu özelliklerden birkaçıdır. Bitkiler ve hayvanlar âleminin yanı sıra bazı morfolojik özellikleri bakımından hayvan ve bitkilere benzemeyen, çoğunlukla tek hücrelileri içine alan ve Protista Alemi olarak adlandırılan üçüncü bir âlem daha vardır. Protistalar doğada toprak, su, hava, bitki, insan, hayvan, gıda, vb. her türlü ortamda yaşar ve gelişir. Hücrenin bileşimi, mikroorganizmanın cinsine ve ortam şartlarına bağlı olarak değişim gösterir. Genellikle hücre yapılarında (virüsler hariç) %75-80 oranında su bulunmaktadır.

Protista Alemi hücre yapılarına göre prokaryotlar ve ökaryotlar olmak üzere iki gruba ayrılır.

#### **2.3.1.1. Prokaryotlar**

Tek kromozomlu basit yapılardır. DNA, nükleoplazma içinde yayılmış olarak bulunur. Hücre içi bölmeleri azdır. Mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organelleri ve çekirdek zarı yoktur. Bakteriler ve mavi-yeşil algler bu gruba dâhildir. Küresel, silindirik veya spiral gibi farklı şekilleri vardır. Boyları 0,5-3,0 µm arasında değişmektedir. Hızla büyürler. Karbonhidrat, hidrokarbon, protein ve CO<sub>2</sub> içeren çok çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilirler.

#### **2.3.1.2. Ökaryotlar**

Prokaryotlardan daha gelişmiş, bitki ve hayvan hücrelerinin yapısına benzeyen mikroorganizmalardır. Hücre zarlarına sahiptirler. Algler, protozoalar ve funguslar (şapkalı mantarlar, küf mantarları ve mayalar) bu grupta yer alır.

Ökaryotlarda belirgin ve gözenekli bir zarla çevrilmiş hücre çekirdeği mevcuttur. Çekirdekte mitozla bölünen birden fazla kromozom bulunurken, stoplazmada kloroplast, mitokondri ve plastidler yer almaktadır. Hücrede stoplazma zarının içeri doğru kıvrılmasıyla oluşan endoplazmik retikulum bulunmaktadır. Ökaryotların boyları prokaryotlara göre 5-10 kat daha büyüktür (Pekin, 1983).

### **2.3.2. Mikroorganizmaların Besin İhtiyaçları**

Mikroorganizmaların enerji sağlayabilmesi, hücre bileşenlerini yapabilmesi, büyümesi, çoğalması ve canlılığını sürdürebilmesi için beslenmesi ve dolayısıyla çeşitli gıda maddelerini alması gerekmektedir. Bu maddelerin bir kısmı doğrudan besin ortamından alınırken bir kısmı da hücre içinde sentezlenir. Böylece canlılığın sürdürülmesi için gerekli moleküller hazırlanır ve kullanılır.

Mikroorganizmaların yapıları incelendiğinde, kuru ağırlıklarının %95'inden fazlasının bazı temel elementlerden (karbon, oksijen, hidrojen, azot, sülfür, fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve demir) oluştuğu tespit edilmiştir. Bu temel elementlerden karbon, oksijen, hidrojen, azot, sülfür ve fosfor, proteinlerin, karbonhidratların, lipidlerin, nükleik asitlerin vb. lerinin yapısında yer almaktadır. Potasyum, kalsiyum, magnezyum ve demir ise, hücre içinde katyon olarak kalır ve çeşitli biyokimyasal işlemlerde görev alır.

Doğada, çok farklı beslenme özelliği olan mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bunlardan bazıları, içinde çok az miktarda besin maddeleri içeren koşullarda gelişebilmekte ve canlılığını sürdürebilmekteyken, bir kısmı da özellikle, mutant suşlar, daha kompleks ve zenginleştirilmiş besi ortamlarında yaşayabilmektedirler.

Mikroorganizmaların temel olarak ihtiyaç duyduğu besin maddeleri, karbon, azot ve mineraller olmak üzere üç grupta toplanabilir.

#### **2.3.2.1. Karbon**

Karbon, mikro ve makro moleküllerin yapısına girdiğinden mikroorganizmalarda ihtiyaç duyulan önemli maddelerden biridir. Ototrof mikroorganizmalar gerekli

enerjiyi gün ışığında, karbon kaynağı olarak karbondioksiti veya çözeltildeki bikarbonatları kullanarak güneş enerjisinden sağlarken, karanlıkta glukoz ve sakkaroz gibi organik kaynaklardan elde eder. Heterotrof mikroorganizmalar ise karbon kaynağı olarak nişasta, şeker (sakkaroz, glukoz, fruktoz vb.), yağlar, organik asitler ve hidrokarbonlar gibi maddeleri kullanırlar (Aksu, 1988).

### **2.3.2.2. Azot**

Azot, bazı mikroorganizmalarda çeşitli moleküllerin yapısında yer almasının yanısıra enzimler, nükleik asitlerdeki pürin ve pirimidin bazlarında da bulunmaktadır. Bu sebeple kritik öneme sahip bir elementtir ve çeşitli kaynaklardan temin edilir. Mikrobiyal büyüme için gerekli azot kaynakları, genellikle  $\text{NH}_4$  ve  $\text{NO}_3^-$  gibi anorganik maddeler olabileceği gibi, ürin, pepton, maya ekstraktı, aminoasitler gibi organik azot kaynakları da olabilmektedir (Yücel, 2011).

### **2.3.2.3. Mineraller**

Mikroorganizmalar, karbon ve azot gibi temel elementlerin yanı sıra O, H, P, S, K, Ca, Mg ve Fe ile nadir de olsa Cu, Mn, Ni, Zn, Co gibi iz elementlere de ihtiyaç duymaktadır. Söz konusu maddeler, mikroorganizmaların gelişiminde ve ürün oluşturma süreçlerinde etkilidir (Pekin, 1983).

### **2.3.3. Mikrobiyal Üremeye Etki Eden Fiziksel Parametreler**

Mikroorganizmaların gelişmesi ve üremesi için besin miktarı kadar pH, nemlilik, sıcaklık gibi önemli parametrelerin de en uygun değerlerde sağlanması gerekmektedir ve tüm bu ortam gereksinimleri, mikroorganizmaya göre farklılık göstermektedir. Uygun şartlar sağlanmadığı takdirde mikroorganizmalar canlılıklarını yitirirler veya mevcut şartlara adapte olarak yaşamlarını sürdürürler. Adaptasyon durumu, ortam koşullarına ve mikroorganizmanın söz konusu ortam koşullarına karşı toleransıya bağlantılıdır (Pekin, 1983; Kargı, 1993).



## **Ortam pH'ı**

Mikroorganizmanın en iyi üremeyi gösterdiği en uygun pH değeri mikroorganizmanın çeşidine göre değişiklik gösterebilir. Bu değer, bakterilerde 3,0-8,0, mayalarda 3,0-6,0 ve küf mantarlarında 3,0-7,0 aralığındadır. Hücrelerde besin transferinde görevli enzimlerin belirli bir optimum çalışma pH değeri vardır. Bu değerlerin üzerindeki veya altındaki çalışma pH'larında, enzim aktivitesinde azalma ve hücre büyümesinde yavaşlama söz konusudur. Ayrıca, hücre dışının asidik veya bazik olması durumunda, hücre içi organeller de olumsuz etkilenmektedir.

Aynı mikroorganizmada, mikrobiyal üreme için gereken optimum pH ile mikrobiyal ürün üretimi için gereken optimum pH değeri arasında farklılık olabilir. Bu fark genelde ( $\pm 1$ )-( $\pm 2$ ) aralığındadır (Kargı, 1993).

## **Sıcaklık**

Her mikroorganizmanın gelişebildiği en düşük, en uygun ve en yüksek sıcaklık değerleri vardır. En uygun üreme sıcaklığı, mikroorganizmanın çeşidine göre değişiklik göstermektedir. Sıcaklığın artması veya azalması, ortamdaki çözülmüş oksijen derişimini, dolayısıyla biyolojik aktiviteyi etkileyebileceği gibi enzim aktivitesi üzerinde de değişikliklere sebep olabilmektedir. En uygun sıcaklık, mikroorganizmanın büyüme ve üremesi anlamında genellikle iyi olsa da, mikrobiyal süreçte oluşacak yan ürünlerden bazılarının (enzim, çeşitli metabolitler vb.) sentezlenmesi için her zaman iyi sonuçlar sağlayamayabilir.

## **Çözülmüş Oksijen İhtiyacı**

Mikroorganizmalar oksijen ihtiyaçlarına göre; aerobik, fakültatif, mikroaerofilik ve anaerobik olmak üzere dört kısma ayrılırlar. Aerobik mikroorganizmalar, üremeleri için havada bulunan oksijene ihtiyaç duymaktadırlar. (*B. anthracis*, *B. subtilis*, *P. multocida*, *M. tuberculosis*, vb.). Bu ihtiyaç, sürekli karıştırma yapılarak havadaki oksijenin besin ortamıyla etkileşimi sağlanarak elde edilir. Böylelikle substratın oksijenle teması sağlanmış olur. Bu gruptaki

mikroorganizmalar oksijensiz ortamlarda büyümezler veya üremeleri çok zayıftır. Fakültatif mikroorganizmalar, sahip oldukları özel enzimatik yapı sebebiyle, hem aerobik hem de anaerobik koşullarda gelişebilir ve üreyebilirler (Enterobakteriler gibi). Mikroaerofilik mikroorganizmaların üremesi için ortamda bulunan oksijenin miktarının düşürülmesi gerekmektedir. Bu nedenle laboratuvarlarda % 5-10 CO<sub>2</sub> kullanılır. *Brucella abortus* ve *Campylobacter fetus* gibi mikroorganizmaların ilk izolasyonlarında ekilmiş besi yerlerinin muhafaza edildiği etüv veya kavanozun havasına % 10 CO<sub>2</sub> eklenir. Anaerobik mikroorganizmalar, oksijenin toksik etkisi sebebiyle oksijeni alınmış besi yerlerinde ya da oksijen bulunmayan ortamlarda gelişebilirler (Klostridiumlar, *S. necrophorus*, vb.). Söz konusu ortamı oluşturmak için besin ortamına CO<sub>2</sub> veya N<sub>2</sub> eklenmesi uygulanan yöntemlerdendir (Kargı, 1993).

### **İnhibitörler**

Mikroorganizmanın içinde bulunduğu besi ortamında, üreme verimini ve hızını olumsuz bir şekilde etkileyen bileşikler inhibitör olarak tanımlanmaktadır. Bu bileşikler içinde ilk sırada fenol, pestisit gibi kimyasallar yer alırken, yüksek miktarda substrat veya ürün derişimi de inhibisyona neden olabilmektedir. Mikroorganizmaların inhibitörlere olan direnci ve adaptasyon kabiliyeti, ortamdaki bileşenlere, mikroorganizmaya ve o andaki fizyolojiye bağlı olarak farklılık göstermektedir (Öztürk, 1999).

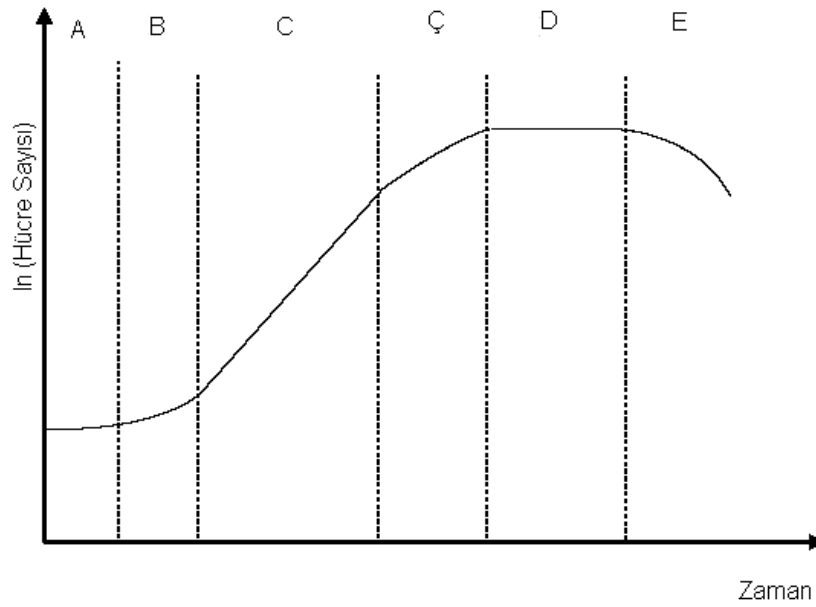
### **Aktivatörler**

Mikroorganizmanın üreme verimini ve hızını, dolayısıyla enzimlerin etkinliğini artıran maddelere aktivatör denilmektedir. Aktivatörlerin mikroorganizma üzerindeki etkisi, ortamdaki bileşenlere ve mikroorganizmaya göre değişmektedir.

### 2.3.4. Mikroorganizma Üreme Kinetiği

Endüstriyel ölçekli bir mikrobiyal üretimin planlama aşamasında, kullanılacak olan mikroorganizmanın seçimi, fizyolojik özelliklerinin tespiti, optimum ortam koşullarının belirlenmesi ve reaktör seçimi önemlidir.

Mikrobiyal üreme aşamasında besin ortamına kültürün eklenmesiyle başlayan çeşitli üreme safhaları söz konusudur ve mikroorganizmaların çoğalması belirli kurallar çerçevesinde gerçekleşir. Bu kapsamda söz konusu evreler 6 kısımda incelenir ve Şekil 2.3.'te gösterilmiştir (Şener, 2005).



**Şekil 2.3.** Mikroorganizmanın üreme evreleri.

**A Hazırlık evresi:** Bu evrede hücre bölünmesi görülmez ve ilk hücre bölünmesi görülene kadar hazırlık evresi sürer. Aşılama yapılan hücre sayısı sabittir. Besi ortamından alınan su ve diğer besin maddeleri RNA, ribozom ve proteinin sentezlenmesinde kullanıldığından hücre çoğalması olmadığı halde biyokütle artışı söz konusudur.

**B Hızlanma evresi:** Hücre çoğalması bu evrede başlar fakat yavaştır. DNA miktarında artma vardır, enzim sentezlenmesi devam eder, RNA miktarında önemli artış olur. Genelde A ve B evreleri birlikte değerlendirilir.

**C Logaritmik veya üstel üreme evresi:** Büyüme hızı pratikte sabittir ve en üst seviyeye ulaşmıştır. Hücre kütlesi ve sayısında ani bir artış söz konusudur. RNA ile karşılaştırıldığında DNA sentezinin daha fazla olduğu görülür. Hücreler diğer evrelere göre daha küçüktür. Hücrelerin kuru kütlelerinin hücre sayısına oranı diğer evrelerle karşılaştırıldığında daha azdır.

**Ç Duraklama evresi:** Ortamdaki besin maddelerinin tükenmeye başlaması ve toksik yapılardaki artıştan kaynaklı hücre çoğalma hızı önemli derecede azalır, ama hücre sayısı ve biyokütlenin artışı sürer.

**D Sabit evre:** Yeni oluşan hücre sayısı ve ölen hücre sayısı dengelenmiştir. Yani toplam hücre sayısı sabittir ve net üreme hızı sıfırdır. Biyosentezler ekseriyetle ikincil metabolit üretimine yöneliktir.

**E Ölüm evresi:** Ölen hücre sayısı, yeni oluşanlarınkinden daha fazladır. Otoliz nedeniyle ortam yoğunluğu ve viskozite azalır.

### **2.3.5. Küf Mantarları (Funguslar)**

Mikroorganizmalar içinde çok kapsamlı bir grup olup, endüstriyel ve medikal öneme sahiptirler. Silindirik, dallanmış filamentler veya ipliksi şekilde bulunurlar. Küf mantarları, çok çeşitli besin kaynakları üzerinde üreyebilen aerobik ve heteretrofik organizmalardır. Küf mantarları kültürlerinin morfolojisi, büyüme ortamı ve şartları, aşılama ve mantar türüne göre kontrol edilebilir. Erlendeki kültür ortamında kullanılan spor aşısının seviyesi, morfolojiyi etkileyebilir. Düşük miktardaki spor aşısı, pellet şeklinde büyümeye yol açarken, kritik seviyenin üzerindeki değerlerde filamentli büyüme gözlenebilir (Byrne ve Ward, 1989).

## ***Rhizopus arrhizus***

Filamentli mantarlardan *Rhizopus* cinsi mantarlar, taksonomik olarak Zygomycota şubesinde, Zygomycetes sınıfında, Mucorales takımında ve Mucoraceae familyasında yer alır.

*Rhizopus* cinsinin çeşitli türleri, gıda endüstrisinde ve çeşitli organik asit ve enzimlerin üretimi gibi endüstriyel proseslerde kullanılmaktadır. *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* ve *R. oryzae* gibi *R. arrhizus* da lifli mantarlardandır ve lipaz üretimi için en çok kullanılan türlerdendir. Bunların yanında; *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* ve *Geotrichum* cinsleri de lipaz enzimi üreten mikroorganizmalardandır.

*Rhizopus arrhizus*, spor oluşturan bir küf mantarıdır. En uygun üreme sıcaklığı 30-35 °C olup, en düşük 5-7 °C, en yüksek 44-49 °C olmak üzere geniş bir sıcaklık aralığında ürer. Koloniler üreme periyodunun değişik evrelerinde beyazdan kahverengiye dönüşerek ve genellikle sıvı besin ortamının yüzeyinde 10 nm yüksekliğe ulaşabilen küf oluşturarak ürerler. Patates, dekstroz agar, malt özütü, soya pepton, glukoz, sakkaroz gibi besinleri içeren ortamlarda özellikle pH 5,4-5,6 aralığında hızla büyürler (Çağatay, 2003).

## **2.4. Enzimler**

### **2.4.1. Enzimlerin Özellikleri**

Canlılarda yaşamsal faaliyetlerin devamı, enzimler aracılığı ile bazı kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesine bağlıdır. Enzimler, canlı dokuların bileşiminde az miktarda bulunan ancak çok önemli rolleri olan özel moleküllerdir.

Kimyasal tepkimelerin başlayabilmesi için aktivasyon enerjisi denilen belirli bir enerji düzeyine ihtiyaç bulunmaktadır. Enzimler aktivasyon enerjisi engelini aşmak için canlılar tarafından katalizör olarak kullanılırlar.

Her enzim belirli substratlara özeldir, yani her enzim çeşidi belirli yapıdaki moleküllere etki edebilir. Enzim ile substratı arasında anahtar-kilit uyumuna benzer bir uyum söz konusudur.

Enzimler, katalitik aktivitesinde ve özgül olmasında etkili olan üç boyutlu katlanmış protein moleküllerinden oluşan bir yapıya sahiptir. Bu yapı içerisinde, özgün substrat moleküllerinin bağlanabildiği ve katalizlemeden sorumlu aktif bölge denilen oluk ya da cep şeklinde özel bir bölüm bulunmaktadır. Bu bölüm, aminoasitlerden oluşan özel bir geometriye sahiptir ve bu nedenle enzimler yüksek spesifiklik gösterirler (Tutar, 2009).

Enzimlerin çalışması sürecinde, ilk olarak enzim substratını tanır ve enzimin aktif bölgesine geçici olarak bağlanır. Bu şekilde enzim ve substrattan meydana gelen geçici bir kompleks yani ara bileşik oluşur. Daha sonra enzimin aktif bölgesi, substrat üzerinde değişiklik yapar ve ürünler oluşur. Bundan sonra enzim, üründen ayrılarak hiçbir değişikliğe uğramadan reaksiyondan çıkar (Anonim, 2018).

Enzimlerin genel özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

- Her enzim çeşidi bir substrata özel olduğu için her enzim belirli reaksiyonu katalizler.
- Enzimler tüketilmezler ve hiçbir değişikliğe uğramadan reaksiyondan çıkarlar. Bu nedenle tekrar tekrar kullanılabilme özelliğine sahiptirler.
- Enzimler bir reaksiyonu başlatamazlar, sadece aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandırırlar.
- Enzimler hücre içerisinde üretilirler. Üretildikten sonra hücre içinde veya hücre dışında çalışabilirler. Yapay olarak da enzim üretimi söz konusudur.
- Enzimlerin etkileri substratın dış yüzeyinden başlar. Substratın yüzeyi ne kadar geniş ise enzim o kadar hızlı çalışır ve reaksiyon süresi kısaldır.

- Enzimler genellikle tersinir (çift yönlü) olarak çalışırlar. Bu şekilde, enzim bir reaksiyonu hem girenler hem de ürünler yönünde katalizleyebilir.

#### **2.4.2. Enzim Aktivitesi**

Enzim aktivitesi, enzim tarafından katalizlenen bir enzimatik tepkime için, en uygun çalışma koşullarında gerekli enzim miktarının belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Aktivitesi yüksek olan enzim, belirli bir sürede daha fazla substratı ürün haline dönüştürür. Enzim aktivitesini ifade etmek için en sık kullanılan birimler aşağıda tanımlanmıştır (Kargı, 1993).

**Enzim Ünitesi (U):** En uygun koşullarda, 1 dakikada, 1  $\mu$ mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.

**Spesifik Aktivite (U/mg):** 1 mg protein başına enzim ünitesidir. U/mg protein olarak hesaplanır. Enzimin saflık derecesini gösterir.

#### **2.4.3. Enzimlerin Çalışmasını Etkileyen Parametreler**

Enzimlerin çalışması ve enzimatik reaksiyonların hızı çeşitli etkenlere bağlı olarak değişim göstermektedir ve aşağıda özetlenmiştir (Anonim, 2018).

**Enzim derişimi:** Enzim derişiminin artmasıyla reaksiyon hızında da artış söz konusudur.

**Substrat derişimi:** Ortamdaki enzim miktarı sınırlıysa, reaksiyon hızı substrat derişimindeki artışa bağlı olarak önce artar ve daha sonra reaksiyon sabit hızla devam eder.

**Substrat yüzeyi:** Enzimler etkilerini substratın dış yüzeyinden başlattıkları için substratın toplam yüzey alanı arttıkça etki yüzeyi de artacağından enzimatik reaksiyonun hızı da artar.

**Sıcaklık:** Enzimler protein moleküllerinden oluştuğundan, ortamdaki sıcaklık değişimlerinden etkilenirler. Bir enzimin en iyi çalışabildiği sıcaklık değerine en

uygun sıcaklık denilmektedir ve ortam sıcaklığının bu değerden daha düşük veya yüksek olması enzimin çalışmasını olumsuz etkiler.

Sıcaklığın düşürölmesi durumunda enzimin çalışması yavaşlar, ancak enzimin yapısı bozulmaz. Sıcaklığın en uygun değerin üzerine çıkarılması ise, hem enzimin çalışmasını yavaşlatır hem de enzim yapısını bozabilir.

**pH:** Enzimler, buldukları ortamın pH değişimlerine çok duyarlıdırlar. Genellikle pH derecesinin nötr veya nötre yakın olduğu değerlerde çalışabilirler. Ancak her enzimin optimum çalıştığı bir pH değeri vardır ve bu değer enzimlerde farklılık gösterebilir.

**Ortamdaki su miktarı:** Enzimler ancak sulu ortamda çalışabilir. Ortamdaki su miktarının değişimi enzimin aktivitesini de değiştirir.

**Kimyasal maddeler:** Ortamdaki bazı kimyasal maddeler yani aktivatörler (Ca, Mg, vb.) enzimin etkinliğini arttırarak reaksiyonu hızlandırabilir. Aksine, inhibitörler (Cu, Hg, vb.) enzimin etkinliğini azaltarak reaksiyonu yavaşlatır veya durdurabilir.

#### **2.4.4. Enzim Kaynakları**

Enzimler, herhangi bir canlıdan elde edilebilir. Ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu küf mantarları ve mayalardan üretilmektedir. Bunun yanı sıra; bakterilerden, hayvanlardan ve bitkilerden de ticari enzim üretimi sağlanmaktadır. Günümüzde enzim kaynağı olarak mikrobiyal kaynaklar daha çok tercih edilmektedir. Çünkü üretimleri daha ucuzdur. Enzim içeriklerinin kontrolü daha kolay sağlanır. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre daha kararlı yapıdadırlar. Bunun yanı sıra mikrobiyal kaynaklarla karşılaştırıldığında, hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimler sağlığa zararlı maddeler içerebilmektedir (Marul, 2007).



#### **2.4.5. Enzimlerin Sınıflandırılması**

Enzimler, salgılanıp faaliyet gösterdikleri yere göre hücre içi ve hücre dışı olmak üzere iki sınıfta incelenir. Hücre içi enzimler, hücre içinde yer alır ve burada aktivite gösterirler. Hücre dışı enzimler ise, salgılandıkları yerden başka bir yerde faaliyet gösterirler.

Enzimler etki ettikleri reaksiyon çeşidine göre de sınıflandırmaya tabi tutulurlar. Bunlar oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı çeşittir (Tutar, 2009).

#### **2.5. Lipaz Enzimi**

Lipaz, 1856 yılında Claude Bernard tarafından keşfedilen ilk enzimdir. O zamandan beri araştırmacılar, enzim üreten mikroorganizmalara büyük ilgi göstermişlerdir. Bu ilgi, enzimlerin büyük ekonomik potansiyelinden dolayı yıldan yıla artmaktadır (Pogori, Xu ve Cheikhyoussef, 2007).

Lipazlar, dünya enzim marketinde proteaz ve karbohidrazlardan sonra yer almakta ve toplam enzim marketinin yaklaşık % 5'ini oluşturmaktadır (Marul, 2007). Lipaz, doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Hayvansal lipazlara doku lipazı (lipoprotein, karaciğer lipazı vb.), sindirim sistemi lipazı (pankreas, incebağırsak lipazı vb.) ve süt lipazı örnek olarak gösterilebilir. Buğday, mısır ve yulaf lipazları ise bitkisel kaynaklı lipazlardandır (Tutar, 2009). Fakat yalnızca mikrobiyal lipazlar, ticari anlamda önemlidir. Çünkü üretimleri daha ucuzdur. Bitki ve hayvan kaynaklı lipazlara göre daha kararlı yapıdadırlar. Özellikle gıda, deterjan ve ilaç endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahiptirler.

Mikrobiyal lipazlar, mayalar, küf mantarları ve bakteriler tarafından üretilir. Lipaz enzimi üreten küf mantarı türleri Çizelge 2.5.'te verilmektedir (Pogori, Xu ve Cheikhyoussef, 2007).

**Çizelge 2.5.** Lipaz enzimi üreten küf mantarı türleri.

<b>Cins</b>	<b>Tür</b>
<i>Rhizopus</i>	<i>R. delemar</i> <i>R. oryzae</i> <i>R. arrhizus</i> <i>R. nigricans</i> <i>R. homothallicus</i> <i>R. niveus</i>
<i>Mucor</i>	<i>M. miehei</i>
<i>Humicola</i>	<i>H. lanuginosa</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. japonicus</i>
<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i> <i>C. cylindracea</i> <i>C. deformans</i>

*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* gibi cinsler de bakteriyel kaynaklı lipaz üretiminde kullanılmaktadır.

Dünyadaki mikroorganizmaların ancak %2'si enzim kaynağı olarak test edilmiştir. Bu nedenle araştırmacılar, enzimlerin üretimlerini artırma yönündeki çalışmalarını sürdürmektedirler. Küf mantarları, yüksek katalitik potansiyel ve kararlılıkta lipaz enzimi üretir. Bu durum, onları çeşitli endüstriyel üretimler için uygun kılmaktadır.

Lipaz enzimi EC kodu ile birlikte gösterilir. Kodda verilen birinci basamak, enzimin ait olduğu sınıfı temsil eder. Kod numarasındaki ikinci ve üçüncü basamaklar ise, katalizlenen reaksiyonun türünü göstermektedir. Lipazın enzim numarası EC 3.1.1.3'tür. Burada;

**3:** Enzimin ana sınıfı olan hidrolazı,

**1:** Hidrolaz içinde birinci alt sınıfı ve etkilediği bağ olan ester bağı,

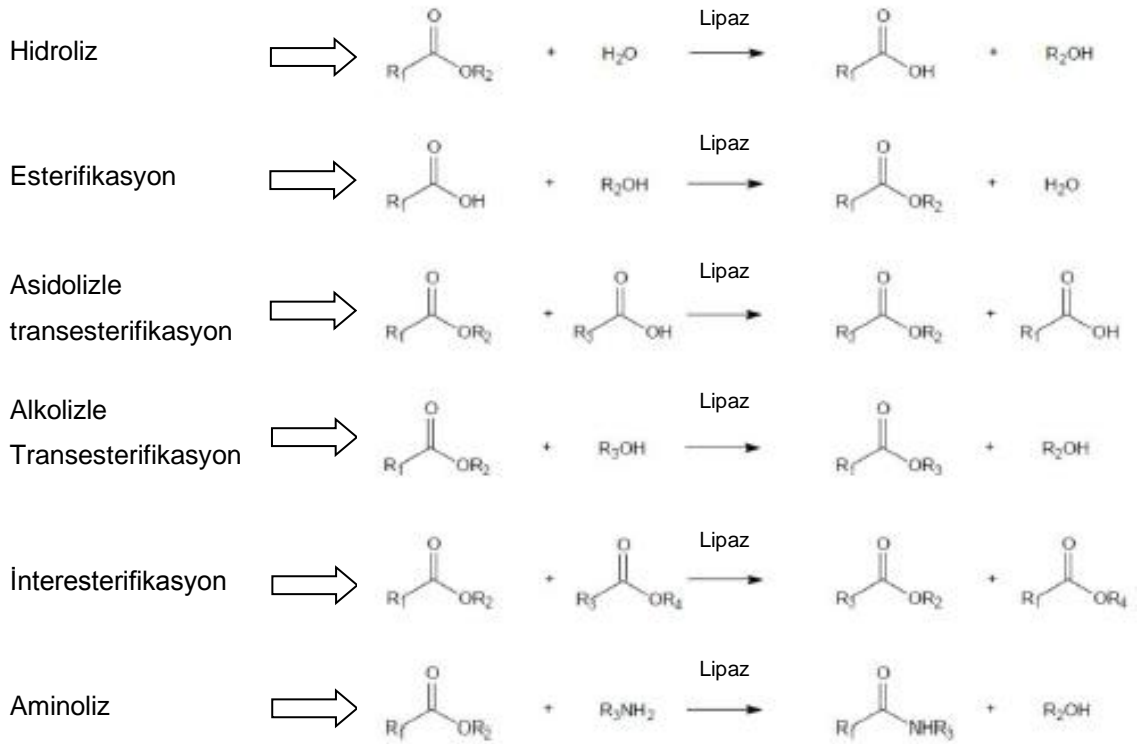
1: Alıcı olan karboksilik ester hidrolazını,

3: Enzim sıra numarasına göre lipazı

ifade etmektedir.

### 2.5.1. Lipaz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Lipazın katalizlediği reaksiyonlar, hidroliz, esterifikasyon, asidoliz ve alkolizle transesterifikasyon, interesterifikasyon ve aminoliz reaksiyonlarıdır. Reaksiyonlar Şekil 2.4.'te gösterilmektedir (Gül, 2013).



Şekil 2.4. Lipazın katalizlediği reaksiyonlar.

### 2.5.2. Lipaz Enziminin Seçiciliği

Enzimlerin, kimyasal tepkimelerde kullanılan katalizörlerden farklı kılan en önemli özellikleri seçici olmalarıdır. Lipaz enziminin seçiciliği, enzimin moleküler özellikleri, substratın yapısı ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörlerle ilişkilidir. Lipaz enziminin spesifikliğı üç gruba ayrılır. Bunlar: pozisyon, substrat ve stereo seçiciliktir (Öztürk, 2002).

Bazı lipaz enzimleri, yağdaki gliserit ile yağ asidi arasındaki bağları rastgele parçalar ve bu durumda gliserit molekülünün pozisyonu önemli değildir. *Candida rugosa*, *Cory mebacterium acnes*, *Chromobacterium* spp (çeşitli türleri) ve *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmaların salgıladığı lipaz enzimleri bunlara örnek verilebilir. Pozisyon seçiciliğı olan lipazlar ise, yağın sadece sn-1,3 pozisyonundaki yani dış taraftaki ester bağlarını parçalar. *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus* ve *Rhizopus delemar* mikroorganizmalarından üretilen lipaz enzimi bu gruba örnek olarak verilebilir. *R. arrhizus* lipazı, 1,3-pozisyonundaki trigliseritlerden yağ asitlerini hidrolize eder (Gerard ve Byrne, 1985). Kimi lipaz enzimi ise yağ asidi zincir uzunluğuna göre seçicilik gösterir. Örneğin, *Penicillium cyclopium* lipazı uzun zincirli yağ asitlerini parçalama özelliğı gösterirken, *Aspergillus niger* kısa zincirli yağ asitlerine karşı spesifiktir. Son olarak ise, yağ asidi seçici lipaz enzimleri bulunmaktadır. Örneğin *Geotrichum candidum* lipazı cis-9 pozisyonundaki çift bağ içeren uzun yağ asitlerine karşı seçicilik gösterir.

### 2.5.3. Serbest ve Tutuklanmış Lipazın Kullanımı

Lipaz enziminin üretimi, saflaştırma prosesinden dolayı yüksek maliyetlidir. Bu durumda, serbest lipaz enzimiyle biyodizel üretimi geleneksel yöntemle (dizel yakıt eldesi) karşılaştırıldığında ekonomik olmamaktadır. Daha iyi enzim yüklemesi yapmak, aktivite ve kararlılığı korumak, dolayısıyla enzimin kullanım süresini arttırmak ve böylece maliyeti düşürmek için lipaz bir destek üzerine immobilize edilerek kullanılabilir. Destek matriksini seçme ve dizayn etme, enzim immobilizasyonunda önemlidir (Ahmad ve Sardar, 2015).

Enzim immobilizasyonunda çeşitli yöntemler mevcuttur. Bunlar arasında çapraz bağlı enzim tutuklaması, mikro dalga destekli immobilizasyon, yüksek verimli (click) kimya teknolojisi, mezopor destekler ve son zamanlarda önem kazanan nano partikül bazlı enzim immobilizasyonu sayılabilir (Ansari ve Husain, 2012). Tutuklamada destek materyali olarak, geniş yüzey alanına ve gözenekliliğe sahip ağsı poliüretan köpük, polietilen, silika-jel, zeolit, tekstil membranları ve son zamanlarda da nano partiküller kullanılmaktadır (Elibol ve Özer, 2000; Ansari ve Husain, 2012). Sahip oldukları küçük boyutları ve geniş yüzey alanlarından dolayı nano partiküller, son zamanlarda enzim kararlılığı için mükemmel destek malzemesi olarak ortaya çıkmaktadır. İlave olarak nanopartiküler, sertlik ve elastisite gibi mekanik malzeme özelliklerini güçlü bir şekilde etkiler ve enzim immobilizasyonunda biyoyumlu çevre sağlar (Jin ve Bierma, 2010). Enzim immobilizasyonunun avantajı, ayırma olmaksızın enzimin tekrar kullanılabilir olması ve yüksek verim elde edilmesidir.

Saf enzim kullanımına alternatif olarak enzimi üreten mikroorganizmanın kendisinin kullanımı da önerilmektedir. Bu durumda özellikle mikroorganizmanın hücre duvarı veya membranında bulunan ve hücre içi enzim olarak bilinen enzim önem kazanmaktadır. Böylelikle, eldesi için kültür ortamından ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinin zorunlu olduğu hücre dışı enzim yerine hücrenin kendisi katalizör olarak kullanılır ve daha ucuz bir yöntemle elde edilmiş olur (Ban ve ark., 2001). Ayrıca kültür ortamına destek materyaller eklenerek de mikroorganizma immobilize edilebilir (Jin ve Bierma, 2010). Hücrenin kendisinin katalizör olarak doğrudan kullanılması üzerine önemli ölçüde çalışmalar yapılmaktadır (Devanesan, Viruthagiri ve Sugumar, 2007).

## **2.6. Mikrobiyal Lipaz Katalizörlüğünde Biyodizel Üretimi ve Üretimi Etkileyen Parametreler**

Mikrobiyal lipaz katalizörü kullanarak yapılan biyodizel üretim çalışmalarında, biyodizel verimini etkileyen en önemli parametrelerden biri lipaz aktivitesidir. Literatür çalışmaları incelendiğinde, lipaz aktivitesini arttırmaya veya lipaz inhibisyonunu önlemeye yönelik araştırmalar yapıldığı görülmektedir. Bu

kapsamda lipaz enzimini üreten mikroorganizmanın büyüdüğü kültür ortamına çeşitli indükleyici ilavesi yapılarak aktivitenin artırılması, transesterifikasyon reaksiyonu süresince lipaz aktivitesini olumsuz etkileyecek (inhibisyon) parametrelerin araştırılarak yeni tekniklerin geliştirilmesi önem kazanmaktadır.

### **2.6.1. Kültür Ortamına İndükleyici İlavesi**

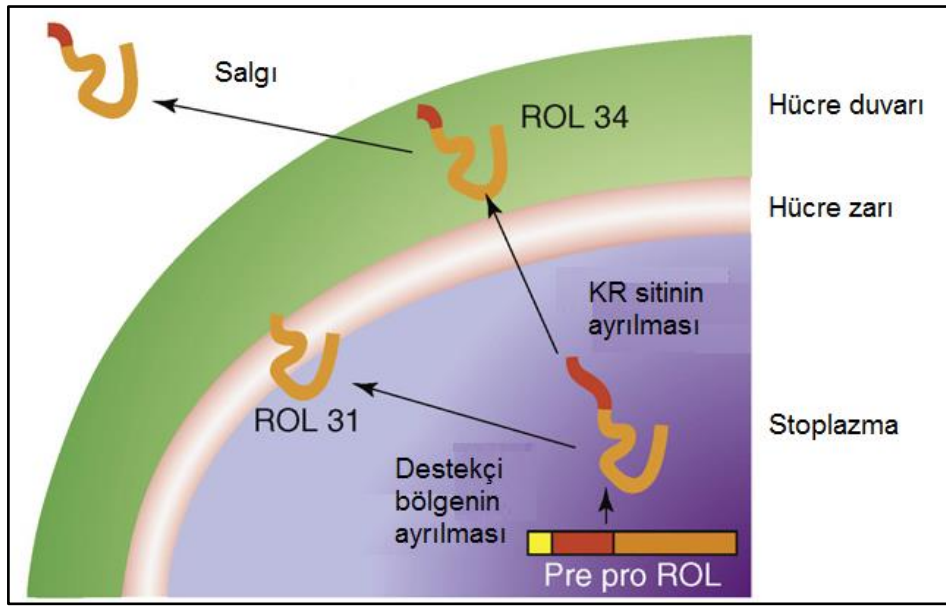
Literatürde *Rhizopus* mantarlarıyla yapılan çalışmalar incelendiğinde, yağ, yağ asidi veya sürfaktanlar ve diğer karbon ve azot kaynaklarının kültür ortamlarına eklendiğinde *Rhizopus* mantarlarının ürettiği lipazın artırılmasına yönelik indükleyici etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Çalışmalardan farklı türdeki *Rhizopus* mantarlarının hücre içi ve hücre dışı lipaz üretim mekanizmasının, büyüme ortamındaki farklı bileşenlerle farklılık gösterdiği saptanmıştır. *R. chinensis*'in hücre içi lipaz aktivitesi, besin ortamına eklenen oleik asit, zeytinyağı ve çay yağı gibi indükleyicilerle önemli derecede artış gösterirken, bu maddelerin olmadığı kültür ortamlarında hücre dışı lipaz aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Ancak; bazı funguslarda ise tam tersine indükleyici substratların varlığında daha yüksek hücre dışı lipaz enzimi üretilebildiği gözlenmiştir (Pogori, Xu ve Cheikhyoussef, 2007).

*R. oryzae*'nin kullanıldığı bir çalışmada kültür ortamına eklenen zeytinyağı, oleik asit, metil kaprot ve tween 80'nin lipaz aktivitesine etkisi araştırılmış, zeytinyağı ve oleik asidin hücre içi metanolizis aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmayla hücre içi lipaz üretiminde artış gözlenmiştir. Hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin ise ortamda zeytinyağı olmadığı durumda daha yüksek olduğu raporlanmıştır. Western blot analizi göstermiştir ki; zeytinyağında büyüyen hücrelerde lipaz salgısı etkili bir şekilde önlenmiş ve lipaz, hücre duvarı ve membrana yakın olarak sınırlandırılmıştır. Bu da alıkonmuş lipazın hücre içi aktivitesinde artışa sebep olmuştur. Aynı çalışma kültür ortamına eklenen doymamış yağ açıl zincirleri içeren oleik asit veya zeytinyağının eklenmesiyle kültür ortamına lipazın salgısının büyük ölçüde engellediğini belirtirken, palmitik ve stearik asit gibi doymuş yağ asitlerinin kültür ortamına eklendiğinde büyük

miktarda lipazın hücre dışına salgılandığını belirtmişlerdir (Fukuda ve ark., 2008).

Çoğu araştırmacı, filamentli mantarların çoğunlukla hücre duvarlarına yakın yerlerde lipazların yerleştiğini rapor etmişlerdir. Fakat, Davranov ve arkadaşları, *Oospora lactis*'in iki farklı lipaz ürettiğini, bunlardan birinin 43 kDa molekül ağırlığında ve periplasmik boşlukta bulunduğunu, ortamda serbestçe hareket edebileceğini, diğer lipazın ise 40 kDa molekül ağırlığında olduğunu ve hücre membranına sınırında yer aldığını rapor etmişlerdir. *R. oryzae* da *O. lactis*'e benzer özellikler göstermektedir (Bana, 2002).

Hama ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, westernblot analizi ile *R. oryzae* içerisinde moleküler ağırlık değerleri 34 ve 31 kDa olan iki tipte lipaz enzimi tespit edilmiştir. Şekil 2.5.'de görüldüğü gibi 34 kDa lipazı (ROL 34), hücre duvarına sınırda iken, 31 kDa lipazı (ROL 31) hücre membranında yer almaktadır (Fukuda ve ark., 2008).



**Şekil 2.5.** *R. oryzae* hücrede lipaz enziminin oluşması ve hücre içinde yerleşiminin şematik gösterimi (Fukuda ve ark., 2008).

Mikroorganizmanın büyüme sürecinde, hücre membranı sınırına yakın olan ROL 31 lipazının miktarı zamanla hücre içinde keskin bir şekilde azalmaktadır. Daha fazla miktarda olan ROL 34 substratla ilişkili bileşenlerden bağımsızken, ROL 31'in miktarı, substrata bağımlı ve zeytinyağı veya oleik asitin mevcut olduğu üreme ortamında daha büyük bulunmuştur. Daha önemlisi, membranda bulunan ROL 31 lipazının miktarının, hücre içi metanolizis aktivitesiyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Hama ve ark., 2006). Bu bulgular, ROL 31 miktarını artıracak denemelerin, aynı zamanda daha yüksek enzim aktivitesine sebep olabileceğini göstermektedir (Fukuda ve ark., 2008).

Başka bir çalışmada ise, besin ortamındaki kalsiyum ve sodyum iyonlarının lipaz enzimini aktive ederken, demir ve EDTA'nın ise aktiviteyi inhibe ettiği tespit edilmiştir (Gerard ve Byrne, 1985).

### **2.6.2. Transesterifikasyon Reaksiyon Ortamındaki Su Miktarı**

Lipaz, suda çözünebilir proteinlerdendir. Lipazla katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonlarında, lipazın katalitik aktivitesi yağ/su ara yüzey alanına bağlıdır ve tepkime yağ/su ara yüzeyinde birkaç adımda başarılıdır. Birinci adımda lipaz ara yüzeye adsorbe olur, ikinci adımda enzim-substrat kompleksi oluşur ve son ürün oluşumu ile katalitik proses tamamlanır. Lipaz enziminin aktif konformasyonunu (üç boyutlu yapısı) sürdürmesi, yağ/su ara yüzeyini oluşturması ve reaksiyonu katalizlemesi için reaksiyon ortamında minimum su miktarının bulunması gerekmektedir (Dobrevva ve ark., 2011). Diğer yandan, ortamda aşırı suyun bulunması, yağın hidrolizine ve serbest yağ asidi içeriğinde artışa neden olmaktadır. Bu sebeple, optimum su içeriği, hidrolizi önleyecek minimum düzeyle, biyokatalizörün aktif çalışmasını sağlayacak maksimum düzey arasında olmalıdır.

Yapılan çalışmalar, yüksek serbest yağ asidi içerikli ham maddelerin esterifikasyon/transesterifikasyonunda oluşan suyun uzaklaştırılmasıyla dönüşüm hızının iyileştirilebileceğini göstermiştir. Suyun ortamdaki uzaklaştırılması için birkaç yöntem kullanılmaktadır. Adsorbent olarak moleküler



elek kullanımı en yaygın kullanılan yöntemlerdendir. Moleküler elekler, hidrokarbon ve alkoller adsorplamadığından tercih edilirler. Azocar ve arkadaşları, 3A° moleküler eleği adsorbent olarak kullanarak Novozym 435 ile atık yağın metanolizis reaksiyonunda dönüşümde yaklaşık % 20 artış sağlamışlardır. Bazı çalışmalar immobilize lipazın yağla, metil ester ve alkolle ön işleminin, arkasından reaksiyon karışımına gliserol eklenmesinin reaksiyon dönüşümünü arttırdığını göstermiştir. Dışarıdan ilave edilen gliserol, suyu ortamdan uzaklaştırmakta ve bu durumda moleküler elek, silika jel gibi adsorbent ihtiyacı ortadan kalkmaktadır (Dobrev ve ark., 2011).

Diğer yandan bazı araştırmacılar reaksiyon ortamına suyun eklenmesinin, enzim aktivitesi için ihtiyaç duyulan gerekli ara yüzey oluşumunda transesterifikasyon reaksiyonundaki ester verimini arttırabileceğini belirtmişlerdir. Tan ve arkadaşlarına göre; *Candida spp* ile katalizlenen metanolle gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonunda (metanolizis) trigliseritler ilk olarak yağ asitlerine hidrolize olmakta, ardından bu serbest yağ asitleri metil esterlere dönüştürülmektedir. Böylece reaksiyonun ilk aşamasında, yüksek su içeriği yağın hidrolizine olanak vermekte, reaksiyonun son aşamasında ise interesterifikasyon önemli rol oynamaktadır. Li ve arkadaşları, metanolizis reaksiyonunu yüksek su içeriğinde, liyofilize tüm hücreyi biyokatalizör olarak kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Deng ve arkadaşları, *R. miehei* ve *T. lanuginosus*'dan immobilize lipazla %96 saflıkta etanol kullandıklarında susuz etanole göre daha iyi aktivite elde ettiklerini raporlamışlardır (Dobrev ve ark., 2011).

Shah ve arkadaşları, jatrofa yağından çözücüsüz ortamda biyodizel üretimi için üç farklı lipaz (*Chromobacterium viscosum*, *Candida rugosa*, *Porcine pancreas*) ile transesterifikasyon çalışmışlar, sadece *Chromobacterium viscosum* için kayda değer bir verim elde edebilmişlerdir. Celite-545 üzerinde *Chromobacterium viscosum* lipazının immobilizasyonu ile 40 °C'de 8 saatlik reaksiyon sonunda verim, %62'den %71'e çıkmıştır. Ortama su ilavesiyle, serbest ve immobilize enzim preparatları, verimi sırasıyla %73 ve %92'ye çıkartmıştır. Lipaz

immobilizasyonu ve transesterifikasyon koşullarının optimize edilmesiyle yeterli miktarda biyodizel verimi sağlanmıştır (Shah, Sharma ve Gupta, 2004).

Sonuç olarak, reaksiyon karışımındaki su içeriği çok önemli bir parametredir ve farklı tipteki biyokatalizörler ve farklı karakteristik reaksiyon ortamları için optimize edilmelidir. Bu optimizasyonda substrattaki (yağ ve alkol) su içeriği, reaksiyon sonunda oluşan su miktarı kadar önemlidir (Aguieiras, Cavalcanti-Oliveria ve Freire, 2015).

### **2.6.3. Reaksiyon Ortamındaki Tepkiyen ve Ürünlerin İnhibitör Etkisi**

Transesterifikasyon süresince enzimin aktivasyonunun ortamda aşırısı kullanılan metanol ve ürün gliserol ile inhibe edilmesi söz konusudur. Bu durumda, metanolün aşamalı olarak reaksiyon ortamına eklenmesi, genel açıl akseptör (alkol) yerine alternatif açıl akseptör kullanımı, çözücü ilavesi, sürekli olarak ürün gliserolün ortamdaki uzaklaştırılması inhibitör etkisini azaltmak için uygulanan yöntemlerden birkaçıdır (Ranganathan, Narasimhan ve Muthukumar, 2008).

Bu konuda yapılan çalışmalardan biri, biyodizel üretiminde kullanılan metanolün lipaz enzimi üzerindeki zehirleyici etkisini ortadan kaldırmaya yönelik, metanolün aşamalı olarak reaksiyon ortamına eklenmesiyle ilgilidir. Alkolün aşırısının kullanıldığı durumlarda aşamalı olarak alkolün eklenmesi, alkolün enzim denatürasyonunu önleyerek yüksek biyodizel verimi sağlamaktadır. Shimada ve arkadaşları, metil alkolün tek seferde ve aşırı miktarda kullanıldığında tersinmez lipaz inaktivasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. Metanolün üç basamakta eklenmesiyle ise, %96'nın üzerinde dönüşüm sağlanmıştır. Araştırmacılar, metanolü üç basamakta reaksiyon ortamına ekleyerek immobilize formdaki *C. antarctica* lipazı 50 döngüden fazla aktivite kaybı olmadan kullanabilmişlerdir (Shimada ve ark., 1999; Agueiras, Cavalcanti-Oliveria ve Freire, 2015).

Du ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, işlenmemiş soya tohumu yağı ve açıl akseptör olarak metanolün kullanıldığı transesterifikasyon reaksiyonunda düşük metil ester veriminin elde edildiği ve lipazın metanolden dolayı hızlıca aktivitesini kaybettiği rapor edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise, Du ve arkadaşları genel

akseptör olan metanol yerine lipaz enzimini inhibe etmeyecek metil asetat akseptörü kullanarak, *Novozym 435*'in soya tohumu yağıyla transesterifikasyonunda metil asetatın yağa molar oranı 12:1 iken %92 metil ester verimi elde etmişler ve 100 kesikli sistem deneyinde bile metil asetatın, enzim aktivitesine hiçbir olumsuz etkisi olmadığını gözlemişlerdir (Du ve ark., 2004).

Kısa zincirli alkollerin inhibisyonu sıklıkla bu alkollerin çözünmezliğinden dolayıdır. Çözücüler, alkollerin çözünürlüğünü artırarak enzimleri alkol denaturasyonundan korumak için kullanılır. Li ve arkadaşları kolza tohumu yağının lipazla transesterifikasyonunda metanole ilave tert-bütanol kullanarak, aşırı metanol kullanımının ve yan ürün olan gliserolün olumsuz etkilerini elimine etmişlerdir. %95'lik biyodizel verimine, tert-bütanol/yağ hacim oranı 1:1, metanol/yağ molar oranı 4:1, yağ ağırlığı üzerinden %3 *Lipozyme TL IM* ve %1 *Novozym 435*, sıcaklık 35 °C, 130 rpm'de 12 saat süreli reaksiyon koşullarında ulaşılmıştır. Reaksiyon ortamı olarak tert-bütanolla 200 döngümlük tekrarlanan reaksiyonda lipaz aktivitesinde kayıp gözlenmemiştir (Li ve ark., 2006). Tert-bütanole ilave olarak yaygın olarak kullanılan çözücüler, n-heptan, hekzan, 2-bütanol ve sikloheksandır (Aguieiras, Cavalcanti-Oliveria ve Freire, 2015).

Enzimatik transesterifikasyon reaksiyonlarıyla ilgili önemli parametrelerden biri de yan ürün olan gliserolün biyokatalizörü inaktive etmesidir. Gliserol hidrofildir ve yağda çözünmez, immobilize enzim yüzeyine kolaylıkla adsorbe olur. Bu da özellikle dolgu kolon reaktörlerde lipaz aktivitesinde ve işletme ile ilgili kararlılıkta azalmaya sebep olur. Gliserol kesikli sistemlerde ise reaksiyon ortamının viskozitesini artırır, kütle transfer zorluğuna ve karıştırmada düşük verime sebep olur. Ortama organik solvent eklenmesi, gliserolün olumsuz etkisini ortadan kaldırmak için kullanılan önemli yöntemlerden biridir (Aguieiras, Cavalcanti-Oliveria ve Freire, 2015).

### 3. DENEY SİSTEMİNİN MATEMATİKSEL TANIMLANMASI

#### 3.1. Mikrobiyal Üremenin Matematiksel Tanımlanması

##### 3.1.1. Mikroorganizmanın Özgül Üreme Hızı

Özgül üreme hızı, kesikli bir sistemde mikroorganizma üstel üreme evresindeyken, mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi olarak ifade edilir ve Eşitlik 3.1. ile gösterilir (Pekin, 1983; Kargı, 1993).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.1.)$$

Bu eşitlikte;

X : Kuru mikroorganizma derişimi (g k.m.o/L)

$\mu$  : Özgül üreme hızı (sa<sup>-1</sup>)

t : Zaman (sa)'dır.

t=0 anında X=X<sub>0</sub> ve t=t anında X=X sınır koşulları seçildiğinde, yukarıda verilen diferansiyel denklem Eşitlik 3.2. halini alır.

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad (3.2.)$$

ln(X/X<sub>0</sub>)'a karşı t grafiği çizildiğinde üstel üreme evresindeki doğrunun eğimi özgül üreme hızını verir.

##### 3.1.2. Substrata Bağlı Üreme Verimi

Üreme verimi, mikroorganizma derişimiyle besin ortamındaki üremeyi kısıtlayıcı substrat derişimi arasındaki sabit oran olarak tanımlanır ve Eşitlik 3.3. ile gösterilir.

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (3.3.)$$

Kesikli sistemde, başlangıçta  $X_0$  ve  $S_0$ ,  $t=t$  anındaysa  $X$  ve  $S$  değerleri alındığında Eşitlik 3.3., Eşitlik 3.4. halini alır.

$$Y_{X/S} = -\frac{X - X_0}{S - S_0} \quad (3.4.)$$

Burada;

$X_0$  : Başlangıç kuru mikroorganizma derişimi (g k.m.o./L)

$S_0$  : Başlangıç substrat derişimi (g/L)

$X$  :  $t$  anındaki kuru mikroorganizma derişimi (g k.m.o./L)

$S$  :  $t$  anında ortamdaki substrat derişimi (g/L)'dir.

Fermentasyon sonunda üremeyi kısıtlayan substratın tümünün harcandığı yani  $S \approx 0$  olduğunda en yüksek biyokütle derişimine ( $X_m$ ) erişileceği ve başlangıçta aşırı mikroorganizma derişiminin yaklaşık olarak sıfır olduğu varsayılırsa Eşitlik 3.4., Eşitlik 3.5.'e dönüşür.

$$Y_{X/S} = -\frac{X_m}{S_0} \quad (3.5.)$$

$X_m$ 'e karşı  $S_0$  grafiğinin eğiminden  $Y_{X/S}$  üreme verimi hesaplanır.

### **3.1.3. Tek Substratın Kısıtlayıcı Olduğu Durumda Üreme Kinetiğinin Modellenmesi**

Kesikli sistemde substrat inhibisyonunun gözlenmediği durumlarda; özgül üreme hızı ile mikroorganizmanın üreme hızını kontrol eden substrat derişimi arasındaki ilişki Monod eşitliği ile ifade edilir (Pekin, 1983; Kargı, 1993) ve Eşitlik 3.6.'da gösterilmiştir.

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (3.6.)$$

Burada;

$\mu_m$  : En yüksek özgül üreme hızı ( $sa^{-1}$ )

$K_s$  : Doygunluk sabiti (En yüksek mikroorganizma üreme hızının sağlandığı substrat derişiminin yarısına karşılık gelen substrat derişimi) (g/L)'dir.

$\mu_m$  ve  $K_s$  değerleri, mikroorganizma ve kullanılan substrata bağılı olarak farklılık gösterir. Eşitlik 3.6. da gösterilen Monod eşitliği doğrusallaştırıldığında Eşitlik 3.7. elde edilir.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m S} \quad (3.7.)$$

$1/\mu$ 'ye karşı  $1/S_0$  grafiğı çizildiğinde, doğrunun y eksenini kesim noktasından  $\mu_m$  ve doğrunun eğiminden  $K_s$  bulunur.  $K_s$  değerinin düşük olması, mikroorganizmanın düşük substrat derişimlerinde daha hızlı ürediğinin bir göstergesidir.

#### 3.1.4. Mikrobiyal Enzim Üretiminde Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipaz Hidroliz Aktivitesinin Matematiksel Tanımlanması

*R. arrhizus* küf mantarının ürettiğı lipaz enzimi hidroliz aktivitesi cinsinden tanımlanmıştır. Hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi tampon çözeltideki belli miktardaki zeytinyağının belli miktardaki kurutulmuş mikroorganizmayla 10 dk karıştırılarak yağın hidrolizinden açığa çıkan yağ asitlerinin NaOH ile titrasyonundan Eşitlik 3.8. kullanılarak bulunmuştur. Hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesi ise mikroorganizma yerine belli hacimde mikroorganizmanın üreme ortamı alınarak benzer şekilde Eşitlik 3.9. kullanılarak bulunmuştur.

$$U/\text{mg kuru m. o.} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot C_{\text{NaOH}}}{M_{\text{k.m.o.}} \cdot t} \cdot 1000 \quad (3.8.)$$

$$U/\text{mL besin ortamı} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot C_{\text{NaOH}}}{V_{\text{besin ortamı}} \cdot t} \cdot 1000 \quad (3.9.)$$

Bu eşitlikte;

$U/mg$  : Birim kuru mikroorganizma kütlelerinin zeytinyağından 1 dakikada 1 mikromol yağ asidini açığa çıkaran hidroliz aktivitesi ( $\mu\text{mol/dk. mg k.m.o}$ ),

$U/mL$  : Mikroorganizmanın üretildiği besin ortamının birim hacminin zeytinyağından 1 dakikada 1 mikromol yağ asidini açığa çıkaran hidroliz aktivitesi ( $\mu\text{mol/dk. mL besin ortamı}$ ),

$V_{\text{NaOH}}$  : Titrasyonda harcanan NaOH miktarı (mL),

$C_{\text{NaOH}}$  : Titrasyonda kullanılan NaOH derişimi (M),

$M_{\text{k.m.o.}}$  : Kuru mikroorganizma miktarı (mg),

$V_{\text{besin ortamı}}$  : Hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesi tayini için kullanılan besin ortamı hacmi (mL),

$t$  : Hidroliz süresi (dk)'dır.

### 3.2. Taguchi Yöntemiyle Deney Sisteminin Matematiksel Tanımlanması

Deney tasarımı, üretim prosesini etkileyen önemli parametrelerin tespit edilmesinde ve optimizasyonunda önemli katkı sağlar. Klasik bir deney tasarımında, her yeni denemede mevcut parametrelerden birinin seviyesi değiştirilirken diğer parametreler sabit tutulur. Bu durumda; herhangi bir parametre için yapılacak deney sayısı,  $n$  parametre sayısını gösterdiğinde, parametre iki seviyede değiştiğinde  $2^n$ , üç seviyede değiştiğinde  $3^n$  olur. Yani parametre sayısının artışı, yapılacak deney sayısının geometrik artışına sebep olur. Deney sayısının artması maliyeti artırdığından ve önemli ölçüde zaman aldığından bu yöntem kullanılmaya elverişli olamamaktadır. Bu durumda, yine deney tasarımına dayalı ve bu dezavantajı ortadan kaldıran istatistiksel yöntemler geliştirilmekte ve kalite arttırmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Şirvancı, 1997).

Taguchi yöntemi, Japon bilim insanı Genuchi Taguchi tarafından geliştirilmiş olup elde edilen ürünün kalitesini yükseltmek için kullanılan istatistikî bir yöntemdir. Bu

yöntemde, deneysel tasarım yapmanın yanı sıra yüksek kalitede sistem tasarlamak mümkündür. Ayrıca; yapılacak deney sayısı, Taguchi yöntemiyle büyük oranda azaltılabilmektedir (Çiçek, Kıvak ve Samtaş, 2012).

Deney tasarımında ilk önce deney performansını etkileyeceği düşünülen parametreler ele alınır. Daha sonra, bu parametrelerin kaç farklı seviyede inceleneceği tespit edilir. Seviye en az iki olmak şartıyla üç ve daha fazlası olabilir.

Yapılacak deney sayısını hesaplamak için 3.10. eşitliği kullanılmaktadır (Kumar, Sureshkumar ve Velraj, 2015).

$$N = (L-1) \cdot P + 1 \quad (3.10.)$$

Bu eşitlikte;

N: Deney Sayısı

L: Seviye Sayısı (Parametre Değişim Aralığı)

P: Parametre Sayısı'dır.

Çok sayıda değişkenli deneyleri az sayıda deneme ile gerçekleştirmek için Taguchi yönteminde ortogonal dizinler kullanılır. Ortogonal dizinin en belirgin özelliği, birçok parametrenin en az sayıda deney ile değerlendirilmesini sağlaması ve geleneksel yöntemden farklı olarak parametre kademelerini birer birer değiştirmek yerine eş zamanlı olarak değiştirme yapılmasını önermesidir (Baynal, 2003).

Bu yöntemle ortogonal dizinler, setler şeklinde tablolaştırılarak standart ve kullanımı basit hale getirilir. Örnek bir tablo Şekil 3.1.'de verilmektedir (Taguchi ve Konishi, 1987).

Örnek dizinde tüm kolonlar karşılıklı ortogonaldır. Bu durumda; kolonlardaki herhangi bir çift seçildiğinde bütün parametre seviyeleri mevcut ve eşit sayıdadır.



	A	B	C	Ç
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

**Şekil 3.1.** Taguchi  $L_9$  ( $3^4$ ) ortogonal dizini.

Şekil 3.1. deki tablodan görüleceği üzere, 3 seviyeli ve 4 parametrelili (A, B, C ve Ç) bir deney sistemi tasarlanmıştır. Bu tasarım,  $L_9$  olarak isimlendirilir ve 9 adet deneyin yapılacağı anlamına gelir. Bu durumda,  $3^4$  yani 81 adetlik konfigürasyon sayısı 9 adete indirgenmektedir (Unal ve Dean, 1991).

Taguchi yönteminde parametreler, kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Deneysel tasarım yapılmasında maksat, kontrol edilebilen ve edilemeyen parametrelerin ürün üzerindeki etkisini tespit edebilmek ve kontrol edilebilir olanları düzenlemektir. Kontrol edilebilen parametreler, oluşturulan parametrelerken, kontrol edilemeyenler yani gürültü faktörleri, doğrudan kontrol edilemeyen, çevre şartlarının değişmesi sonucu oluşan toz, sıcaklık, nem ya da yüksek voltaj, vb.dir.

### 3.2.1. Sinyal / Gürültü Oranı (SGO)

Deneysel olarak elde edilen veriyle istenilen değer arasındaki sapma, kayıp fonksiyonu yardımıyla hesaplanır ve hesaplama sonucunda bulunan kayıp fonksiyon değeri Sinyal/Gürültü Oranı (SGO)'na dönüştürülür. Beklenen değerden sapma miktarı, optimizasyon probleminde amaç olarak kullanılan SGO ile hesaplanmış olur. 3 farklı SGO, problemin amacına göre kullanılır (Kumar, Sureshkumar ve Velraj, 2015). “Nominal En İyi”, Eşitlik 3.11.'de verilmekte ve normalizasyon problemlerinde uygulanmaktadır. “Daha Küçük Daha İyi”, Eşitlik 3.12.'de gösterilmiş olup, minimizasyon problemleri için kullanılır. Eşitlik 3.13.'te verilmiş olan “Daha Büyük Daha İyi” ise maksimizasyon problemlerinde tercih edilir.

$$SGO_i = 10 \log \left( \frac{\bar{y}_i^2}{s_i^2} \right) \quad (3.11.)$$

$$SGO_i = -10 \log \left( \sum_{j=1}^n \frac{y_j^2}{n} \right) \quad (3.12.)$$

$$SGO_i = -10 \log \frac{1}{n} \left( \sum_{j=1}^n \frac{1}{y_j^2} \right) \quad (3.13.)$$

Burada; i: deney numarası, j: deneme numarası,  $y_i$ : cevap ortalama değeri,  $s_i^2$  : varyans, n: deneme sayısı olup  $y_i$  ve  $s_i^2$  Eşitlik 3.14. ve Eşitlik 3.15. ile gösterilmiştir.

$$y_i = \frac{1}{n} \left( \sum_{j=1}^n y_{i,j} \right) \quad (3.14.)$$

$$s_i^2 = \frac{1}{n-1} \left( \sum_{j=1}^n y_{i,j} - \bar{y}_i \right) \quad (3.15.)$$

### 3.2.2. ANOVA Testi (Varyansın İstatistiksel Analizi)

ANOVA testiyle, çıktı değerini en çok hangi parametrenin etkilediği ve çıktı değerine her bir parametrenin katkı oranının ne olduğu hesaplanır (Kumar, Sureshkumar ve Velraj, 2015). Bu oranı hesaplamak için Eşitlik 3.16. kullanılır.

$$\% \text{ katkı faktörü} = \frac{SS_f}{SS_T} \cdot 100 \quad (3.16.)$$

Eşitlik 3.16.'da geçen  $SS_f$  ve  $SS_T$  terimleri sırasıyla Eşitlik 3.17. ve 3.18.'de verilmektedir.

$$SS_f = \sum_{j=1}^L n [(SGO_L)_{fj} - SGO_T]^2 \quad (3.17.)$$

$$SS_T = \sum_{i=1}^N (SGO_i - SGO_T)^2 \quad (3.18.)$$

Burada;

- $SS_f$  : f'ninci parametre için karelerin toplamı,  
 $SS_T$  : Tüm parametrelerin karelerinin toplamı,  
n : f faktörünün j seviyesindeki deney sayısıdır.

### 3.3. Biyodizel Üretiminin Matematiksel Tanımlanması

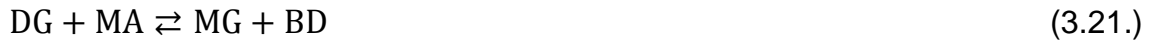
#### 3.3.1. Metanol Eşliğinde *R. arrhizus* Biyokütlesinden (Biyokatalizör) Biyodizel Üretiminde AYY'ın Ağırlıkça Biyodizele Dönüşüm %' sinin Tanımlanması

Metanol eşliğinde *R. arrhizus* biyokütlesinden biyodizel üretiminde AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşüm %' si Eşitlik 3.19. ile tanımlanmıştır.

$$\text{AYY'ın Ağırlıkça Biyodizele Dönüşüm \% 'si} = \frac{\text{Oluşan biyodizel miktarı (g)}}{\text{Başlangıç AYY miktarı (g)}} \cdot 100 \quad (3.19.)$$

### 3.3.2. Metanol Varlığında *R. arrhizus* Biyokütlesinden Biyodizel Üretiminde Reaksiyon Kinetiğinin Matematiksel Tanımlanması

Metanol varlığında lipaz içeren fungal biyokütleden biyodizel üretiminde gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu toplam üç basamakta ilerler. Söz konusu basamaklar Eşitlik 3.20., 3.21. ve 3.22.'de gösterilmiştir.



Burada;

TG: Trigliseritin, DG: Digliseritin, MG: Monogliseritin, MA: Metil Alkolün, GL: Gliserolun ve BD: Biyodizel (Yağ asidi metil esteri)'in kısaltması olarak tanımlanmıştır.

Transesterifikasyon reaksiyonu, katalizör ve birbiriyle karışmayan iki sıvı faz olmak üzere üç fazlı sistemden oluşan ve yukarıda sözü edilen reaksiyon ara basamaklarını içeren kompleks bir yapıdadır. Dolayısıyla; prosesin kinetik modellemesinde bazı kabuller yapılarak sistem tanımlanmıştır. Reaksiyon mekanizmasının tek adımda ve ileri yönde gerçekleştiği kabulüyle, toplam reaksiyon Eşitlik 3.23.'de (kısaltmalarla olanı ise Eşitlik 3.24.'te) gösterilmiştir. Tepkiyenler cinsinden reaksiyon hızı ( $r$ ) ise Eşitlik 3.25.'teki gibi tanımlanmıştır.



Burada R, alkil gruplarını,  $k'$  genel reaksiyon hız sabitini göstermektedir.

$$-r = k'. [TG]. [MA]^3 \quad (3.25.)$$

Burada;

[TG] : Trigliserit derişimi (mol/L),  
[MA] : Metil alkol derişimi (mol/L)

olarak tanımlanmıştır.

Deneysel olarak 72 saat sürdürülen transesterifikasyon reaksiyonlarında lipaz inhibisyonunun önlenmesi için metil alkol ortama  $t=0$  anında, 24 . ve 48. saatlerde gerekli olan miktarın üçte biri oranında katılmıştır. İlk 24 saatlik süre esas alındığında; reaksiyon ortamında trigliseritin fazlası bulunmaktadır.

Başlangıçta trigliserit derişiminin başlangıç alkol derişimine göre çok daha fazla olmasına rağmen, reaksiyonun başlangıç aşamasında trigliserit moleküllerinin biyokatalizör yüzeyine tutunmuş metanollü aktif bölgelere ulaşmasında dış taraf kütle aktarım kısıtlaması meydana gelecektir. Ancak; yeterli karıştırma hızı ve gerekli biyokatalizör miktarının (aktif yüzey alan bölgeleri) kullanılmasıyla bu kısıtlamanın ortadan kalkacağı, trigliseritin biyokatalizörün aktif bölgelerine kolaylıkla adsorplanacağı ve reaksiyonun adsorplanmış komşu trigliserit ve metanol molekülleri arasında oluşacağı varsayılmıştır. Ancak; metanolün başlangıç derişiminin trigliserit başlangıç derişimine oranla oldukça düşük olması, başka bir deyişle trigliseritin aşırısının ortamda bulunması göz önüne alınırsa reaksiyonun metanole bağımlı olarak tepkimenin üçüncü dereceden gerçekleşeceği, trigliserit derişiminin reaksiyon derecesini değiştirmeyeceği varsayılabilir. Yani, reaksiyon ortamında kısıtlayıcı olan metanol olacaktır.

Bu koşullar altında Eşitlik 3.25. tekrar düzenlendiğinde, Eşitlik 3.26. elde edilir.

$$-r = \frac{-d[MA]}{dt} = k_{göz} \cdot [MA]^3 \quad (3.26.)$$

Burada  $k_{göz}$ , gözlenen hız sabiti olup, kütle aktarımı ve reaksiyon hız sabitlerini de içerir. Reaksiyon hız sabiti sadece sıcaklığın fonksiyonu iken, kütle aktarım hız sabiti aynı zamanda karışımın bileşimine, sıcaklığa ve karıştırma hızına da bağlıdır.

Tepkimelerde kütle aktarım hızı, biyokatalizör yüzeyindeki reaksiyon hızından çok daha hızlıysa; bu durumda yüzeydeki bileşenin derişimi, yığında ölçülen ile aynı olacaktır. Gözlenen hız, gerçek reaksiyon hızıyla aynıdır ve tepkime reaksiyon kontrollü olarak adlandırılır. Reaksiyonun çok hızlı olduğu durumda ise; gözlenen hız, kütle aktarımından kaynaklı hızlıdır ve tepkime difüzyon kontrollü olarak isimlendirilir (Froment ve Bischoff, 1990).

Biyodizel üretiminde gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonunda, metanolün kütle aktarım hızının ve adsorpsiyon hızının Eşitlik 3.26.'da verilen toplam reaksiyon hızına kısıtlayıcı bir etkisinin olmadığı varsayılmış, deneysel olarak tespit edilmiş en uygun koşullarda (metanol/yağ molar oranı, karıştırma hızı, sıcaklık ve biyokatalizör miktarı) meydana gelen tepkime, reaksiyon kontrollü olarak kabul edilmiştir. Dolayısıyla Eşitlik 3.26.'da tanımlanan gözlenen hız sabiti,  $k_{göz}$ , doğrudan  $k$  olarak alınmış ve reaksiyon hızı Eşitlik 3.27.'de tekrar tanımlanmıştır. Buna ek olarak; reaksiyon sonucu meydana gelen ürünlerin, katalizör yüzeyi üzerinden desorpsiyonu ile kütle transfer hızlarının da aynı şekilde toplam transesterifikasyon reaksiyonu üzerinde kısıtlayıcı bir etkisinin olmadığı kabul edilmiştir.

$$-r = \frac{-d[MA]}{dt} = k \cdot [MA]^3 \quad (3.27.)$$

Dönüşüm, reaksiyona giren Metil Alkol (MA) cinsinden yazıldığında Eşitlik 3.28. elde edilir.

$$X_{MA} = 1 - \frac{[MA]}{[MA]_0} \quad (3.28.)$$

Burada;

$X_{MA}$  : Metil alkol dönüşüm mol kesri,

$[MA]$ : Herhangi bir anda reaksiyon ortamında bulunan metil alkol derişimi (mol/L)

$[MA]_0$ : Başlangıçta reaksiyon ortamında bulunan metil alkol derişimi (mol/L)' dir.

Eşitlik 3.28.  $[MA]$  cinsinden ifade edilirse Eşitlik 3.29. elde edilir.

$$[MA] = [MA]_0 (1 - X_{MA}) \quad (3.29.)$$

t=0 anında  $[MA] = [MA]_0$  ve t=t anında  $[MA] = [MA]_0(1 - X_{MA})$  sınır koşulları kullanılarak Eşitlik 3.27.'deki diferansiyel denklem çözüldüğünde Eşitlik 3.30. elde edilir.

$$\left[ \frac{1}{(1 - X_{MA})^2} - 1 \right] \cdot \left[ \frac{1}{2[MA]_0^2} \right] = k \cdot t \quad (3.30.)$$

Eşitliğin sol tarafı zamana (t) karşı grafiğe geçirilirse, elde edilen doğrunun eğiminden reaksiyon hız sabiti bulunur.

Kimyasal bir tepkimede, sıcaklığın tepkime hızı üzerindeki etkisi Arrhenius Eşitliği (Eşitlik 3.31.) ile verilir.

$$k = A_0 \cdot e^{\frac{-E_A}{R \cdot T}} \quad (3.31.)$$

Burada;

k : Reaksiyon hız sabiti ((mol/L)<sup>-2</sup>sa<sup>-1</sup>),

A<sub>0</sub> : Frekans faktörü ((mol/L)<sup>-2</sup>sa<sup>-1</sup>),

E<sub>A</sub> : Aktivasyon enerjisi (J/mol),

R : Termodinamik gaz sabiti (8,3145 J/mol.K),

T : Sıcaklık (K)'tır.

Arrhenius Eşitliği doğrusallaştırıldığında Eşitlik 3.32. elde edilir. ln k'ya karşı (1/T) karşı grafiğe geçirilirse; doğrunun y eksenini kesim noktasından frekans faktörü, doğrunun eğiminden ise aktivasyon enerjisi hesaplanır.

$$\ln k = \ln A_0 - \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.32.)$$

## 4. DENEY SİSTEMİ VE YÖNTEMLERİ

Tez çalışmasının ilk kısmında, biyodizel üretiminde biyokatalizör olarak kullanılacak olan *R. arrhizus* küf mantarının en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesini gösterdiği üreme ortamının belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Glukoz içeren yapay besin ortamı, bir şeker endüstrisi yan ürünü olan ve sakkaroz içeren melaslı besin ortamı ve atık portakal kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamı olmak üzere üç farklı ortam *R. arrhizus*'un üretiminde kullanılmıştır. Çalışmaların sonraki kısmında zeytinyağının ve atık yemeklik yağın mikroorganizmanın lipaz hidroliz aktivitesinin artırılması için indükleyici olarak kullanımı araştırılmıştır. Çalışmaların son kısmında biyodizel üretimi gerçekleştirilerek AYY'ın biyodizele dönüşümünü etkileyen parametreler araştırılmıştır. Tez çalışması süresince deneyler ikişer defa yapılmış ve veriler aritmetik ortalama alınarak kullanılmıştır.

### 4.1. *R. arrhizus*'un Deneysel Çalışmalar İçin Hazırlanması

Biyodizel üretiminde biyokatalizör olarak kullanılan *R. arrhizus* küf mantarı Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden katı agar ortamında temin edilmiştir. *R. arrhizus*'un uzun süre saklanabilmesi için 3,8 g/L Patates Dekstroz Agar (PDA) içeren besi ortamı hazırlanarak sterilize edilmiş ve mikroorganizma öze yardımıyla steril koşullarda taze agar ortamına aktarılarak oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. (Şekil 4.1.) Agar ortamında üretilen mikroorganizma 5,4 g/L soya peptonu ve 17 g/L malt özütü içeren ve sterilize edilmiş yapay sıvı besi ortamına aktarılmış ve mikroorganizmanın sıvı ortamda üretimi sağlanmıştır (Şekil 4.2.). Besin ortamlarının sterilizasyonu 121 °C'de, 1,1 atm'de çalışan otoklavda 20 dak. süresince yapılmıştır.





**Şekil 4.1.** PDA içeren besin ortamında üretilmiş *R. arrhizus*.



**Şekil 4.2.** Yapay sıvı besin ortamında üretilmiş *R. arrhizus*.

*R. arrhizus*'un kesikli sistemde farklı besin ortamlarında üretilmesi çalışmalarında, soya peptonu ve malt özütü içeren yapay sıvı besin ortamında üretilmiş üstel üreme evresindeki mikroorganizma çözeltisinden 5 mL alınarak 100 mL besin ortamı içeren 250 mL'lik erlenlere aşılama yapılmıştır. Erlenler 30 °C sabit sıcaklıkta ve 120 rpm karıştırma hızında çalışan Medline SI-600R marka ve model çalkalamalı inkübatöre yerleştirilerek altı gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Zamana bağlı olarak, mikrobiyal üremeyi ve mikroorganizmanın ürettiği hücre içi ve hücre dışı lipaz enziminin hidroliz aktivitesini takip etmek için aynı koşullarda hazırlanmış altı adet 100 mL besin ortamına aynı anda aynı ortamdan %5 aşılama yapılmış ve altı gün boyunca erlenler sırayla açılarak mikrobiyal kütle tartılmıştır. Ayrıca lipazın hücre içi ve dışı hidroliz aktivitesi tayin edilmiştir.

Biyodizel üretimi çalışmaları için hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin en yüksek bulunduğu besin ortamında çoğaltılan *R. arrhizus*, filtrasyonla besin ortamından ayrılmış, iki kere damıtık suyla yıkandıktan sonra, yaklaşık 1.5-2.0 mm aralığında parçalanarak 48 saat süreyle oda sıcaklığında doğal olarak kurutulmaya bırakılmış ve biyokatalizör olarak kullanılmıştır (Şekil 4.3.).



**Şekil 4.3.** Biyodizel üretiminde kullanılan *R. arrhizus* biyokütlesi.

#### 4.2. Farklı Besin Ortamlarının *R. arrhizus*'un Üretimi İçin Hazırlanması

*R. arrhizus*'un ekonomik olarak üretilmesi için melas ve atık portakal kabuğundan hazırlanan iki farklı besin ortamı kullanılmış ve sonuçlar glukoz içeren besin ortamında bulunanlarla karşılaştırılmıştır. Mikroorganizmanın üreme çalışmaları hazırlanan besin ortamlarının pH değerlerinde gerçekleştirilmiştir.

Glukozlu yapay besin ortamında kullanılan besin ortam bileşenleri ve miktarları Çizelge 4.1.de, bu ortamda üretilen *R. arrhizus* ise Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *R. arrhizus*'un üretilmesi için kullanılan glukozlu yapay besin ortamı bileşenleri ve derişimleri.

Bileşen	Derişim (g/L)
Glukoz	10
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
Maya Ekstraktı	2,0



**Şekil 4.4.** Glukozlu besin ortamında üretilen *R. arrhizus*.

Şekerpancarından şeker üretimi prosesinin sonunda atık olarak ortaya çıkan melas, çalışılan ikinci besin ortamında karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Melas, Ankara Şeker Fabrikası'ndan temin edilmiştir. Şekerin kristallenme yoluyla elde edilmesi aşamasında son ana şurup olarak geriye kalan melas önemli oranda şeker (sakkaroz) içerir. Melasın yaklaşık %50'si şekerdir. Geriye kalan %30'luk kısmını şeker dışı maddeler (kül, azot içermeyen bileşikler vb.) ve %20'lik kısmını su oluşturmaktadır (Higginbotham, 1998). *R. arrhizus*'un üretiminde melas besin ortamına 5, 10 ve 20 g/L olarak ilave edilmiştir. Kullanılan melaslı besin ortamı bileşenleri ve derişimleri Çizelge 4.2.'de, bu ortamda üretilen *R. arrhizus* Şekil 4.5.'te verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** *R. arrhizus*'un üretilmesi için kullanılan melaslı besin ortamı bileşenleri ve derişimleri.

Bileşen	Derişim (g/L)	S <sub>s</sub> (g/L)
Melas	5	2,5
	10	5
	20	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2	
Maya Ekstraktı	2,0	



**Şekil 4.5.** Melaslı besin ortamında üretilen *R. arrhizus*.

Çalışmalarda *R. arrhizus*'un üretiminde üçüncü olarak sadece atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamı kullanılmıştır. Atık portakal kabukları, Ankara Büyükşehir Belediyesi meyve suyu satış duraklarından temin edilmiştir. Portakal kabuğunda glukoz, fruktoz, sakkaroz gibi farklı şeker türleri bulunmaktadır. Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere atık portakal kabukları, ön işlem yapmadan doğrudan elle küçük parçalara bölünmüş, ardından açık havada kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulan kabukların öğütücü yardımı ile boyutları küçültülmüş, elek analizi ile istenilen boyutlara ayrılmış ve kullanılıncaya kadar karanlık bir ortamda saklanmıştır. Farklı derişimlerde atık portakal kabuğundan doğal besin ortamını hazırlamak için belirli miktardaki atık portakal kabuğu, kaynatılmış su ile karıştırılarak otoklavlanmıştır. Bu şekilde kabukta bulunan organik ve diğer maddelerin çözeltiye geçmesi sağlanmıştır. Süzme işlemiyle kabuklar sulu ortamdan ayrılmış ve sıvı ortam tekrar otoklavlanarak mikroorganizmanın üretimi için doğrudan kullanılmıştır. Kodal tarafından yapılan tez çalışmasında, kurutulmuş portakal kabuğunun inorganik madde içeriğinin ICP-MS cihazı ile yapılan analizinde, portakal kabuğunda mikroorganizmanın üremesini inhibe edecek düzeyde ağır metallerin yok denecek kadar az olduğu, mikroorganizmanın üremesini sağlayacak ve arttıracak Mg, K, Ca, P elementlerinin bulunduğu ve bu maddelerin otoklavlanma sonrası besin ortamına

geçtiği gösterilmiştir (Kodal, 2016). *R. arrhizus*'un üretiminde kullanılan atık portakal kabuklu besin ortamlarının hazırlanmasında portakal kabuğu derişimi 30-70 g/L arasında değiştirilmiştir. Çizelge 4.3.'te deneysel çalışmalarda kullanılan farklı derişimlerdeki atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamları ve içerdikleri toplam indirgen şeker derişimleri gösterilmiştir.

**Çizelge 4.3.** *R. arrhizus*'un üretilmesinde kullanılan atık portakal kabuğundan hazırlanan farklı derişimlerdeki ( $C_{APK}$ ) besin ortamları ve içerdikleri toplam indirgen şeker derişimleri ( $S_{Tiş}$ ).

Bileşen	$C_{APK}$ (g/L)	$S_{Tiş}$ (g/L)
Atık Portakal Kabuğu	30	9,1
	40	12,1
	50	15,0
	60	18,0
	70	21,0

Atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamında üreyen *R. arrhizus* Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.

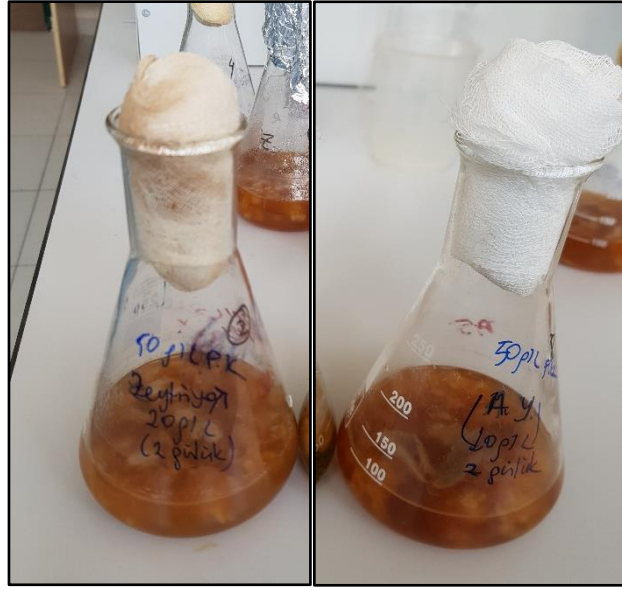


**Şekil 4.6.** Atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamında üretilmiş *R. arrhizus*.

Zeytinyağı ve atık yemeklik yağın *R. arrhizus*'un lipaz enzimi üzerindeki indükleyici özelliğinin araştırılması için 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamlarına Çizelge 4.4.'te gösterilen miktarlarda zeytinyağı ve atık yemeklik yağ eklenerek, lipazın hidroliz aktivitesi tayin edilmiştir. Söz konusu besin ortamlarında üreyen *R. arrhizus* ise Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.4.** 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına eklenen indükleyici bileşenler ve derişimleri.

İndükleyici Bileşen	Derişim (g/L)
Zeytinyağı	5
	10
	20
	30
	40
Atık Yemeklik Yağ	5
	10
	20
	30
	40



**Şekil 4.7.** Sırasıyla zeytinyağ ve atık yemeklik yağ içeren atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamlarında üreyen *R. arrhizus*.

#### **4.3. Atık Yemeklik Yağın Deneysel Çalışmalar İçin Hazırlanması**

İçeriğindeki suyu ve serbest yağ asitleri uzaklaştırılmış atık yemeklik yağ, Kocaeli'nde faaliyet gösteren DEHA Bitkisel Yağ Top.Geri Kazanım Biodizel Ürtm. San. Tic. A.Ş.'nden temin edilmiştir. Atık yemeklik yağ bileşiminde yaklaşık olarak %38 oleik asit, %30 linoleik asit, %21 palmitik asit, %5 stearik asit ve %6 diğer yağ asitleri ve safsızlıkları içermektedir. Oda sıcaklığında tutulan atık yemeklik yağ için deneysel çalışmalardan önce herhangi bir ön işlem yapılmamıştır. AYY'ın indükleyici etkisini araştırmak üzere, belli hacimdeki AYY, hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin en yüksek bulunduğu % 5 aşı içeren besin ortamlarına farklı miktarlarda eklenerek zamana bağlı mikrobiyal üreme ve mikroorganizmanın ürettiği hücre içi ve hücre dışı lipaz enziminin hidroliz aktivitesi takip edilmiştir.



## 4.4. Deney Sistemi

### 4.4.1. *R. arrhizus*'un Üretilmesi

Farklı besin ortamlarındaki *R. arrhizus*'un üreme çalışmaları kesikli düzende sabit sıcaklık ve karıştırma hızında çalışan inkübatörde 100 mL çalışma hacmi içeren 250 mL'lik erlenlerle gerçekleştirilmiştir. Üreme deneyleri altı gün sürdürülmüştür. Atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamında, başlangıç toplam indirgen şeker derişiminin mikrobiyal üreme ile hücre içi ve dışı lipazın hidroliz aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca; en yüksek hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin gözleendiği besin ortamına farklı derişimlerde zeytinyağı ve atık yemeklik yağ ilave edilerek, indükleyici madde derişiminin de mikrobiyal üreme ve hücre içi ve dışı lipaz enziminin hidroliz aktivitesine etkileri incelenmiştir.

### 4.4.2. Biyodizel Üretimi

Hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin en yüksek olduğu besin ortamında üretilen *R. arrhizus* biyokütlesinin biyokatalizör olarak doğrudan kullanıldığı biyodizel üretim çalışmaları, kesikli sistemde sabit pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve optimum mL tampon çözelti/g AYY oranında gerçekleştirilmiştir. 50 mL'lik ağzı kapaklı balonlara reaksiyon öncesi, birbiriyle karışmayan yağ ve su fazlarının biyokatalizörle etkileşimini arttırmak için belli miktarlarda atık yemeklik yağ, asetat tampon çözeltisi ve gerekli olan metanolün üçte biri konularak, 5 dakika süreyle ultrasonikasyon cihazında karıştırılmış, ardından kuru formda *R. arrhizus* biyokütlesi karışıma eklenerek balonlar sabit sıcaklık ve karıştırma hızında çalışan inkübatöre yerleştirilerek transesterifikasyon reaksiyonu başlatılmıştır. Reaksiyon, biyokütlenin hücre duvarında yer alan lipazın denatüre olmaması için metanolün t=0 anında, 24. ve 48. saatlerde toplam 3 seferde ilave edilmesiyle 72 saat sürdürülmüştür. Reaksiyon ortamından 6 ncı, 12 nci, 24 üncü, 48 inci ve 72 nci saatlerde örnek alınarak AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşüm %'si FTIR ile tayin edilmiştir.

Transesterifikasyon reaksiyonunda birbirine karışmayan yağ ve su fazlarının emülsiyon oluşturmaları önemlidir. Lipaz enziminin reaksiyonu katalizlemesi

basamağı hidrofobik (trigliserit) ve hidrofilik (metanol ve su) fazlar arasındaki ara katmanda oluştuğundan, su/yağ ara yüzeyi ne kadar büyük olursa, substratın lipaza erişebilirliği o derece kolaylaşır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri ultrasonikasyondur. Soya yağı ile yapılan bir biyodizel üretim çalışmasında, ultrasonikasyon işlemi öncesi ortamdaki su damlacıklarının çapları 100 µm iken, ultrasonikasyon sonrası su damlasının çapının 5 µm'nin altına düştüğü tespit edilmiştir. Bu da ultrasonikasyon kullanımı ile soya yağı ve suyun reaksiyon ortamında daha iyi karışarak emülsifiye olduğunu göstermektedir (Hama ve ark., 2007). Tüm biyodizel üretim çalışmalarında transesterifikasyon reaksiyonu öncesi, yağ ve su fazlarının iyi karışması için biyokatalizör içermeyen deney ortamı ISOLAB 621.05.003 marka ve model ultrasonikasyon cihazında 5 dakika süreyle karıştırılmıştır.

Transesterifikasyon reaksiyonu lipaz varlığında yağ/su ara yüzeyinde gerçekleşir ve reaksiyon ortamında bulunan su miktarı çok kritiktir. Transesterifikasyon reaksiyonunun gerçekleşmesi, hidroliz reaksiyonunun oluşmaması ve aynı zamanda lipaz enziminin aktifliğini sürdürebilmesi için reaksiyon ortamına birim AYY kütlesi başına eklenecek su miktarının tespit edilmesi gerekmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, reaksiyon ortamına eklenecek suyun genellikle fosfat veya asetat tampon çözeltileriyle sağlandığı görülmektedir. *R. arrhizus* lipazının en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 6,0 (Elibol ve Özer, 2000) civarında olduğundan, reaksiyon ortamına ilave edilecek su miktarı asetat tamponu (0,1 M, pH 5,6) ile karşılanmıştır.

Biyodizel üretim çalışmalarında AYY kütlesi başına eklenecek optimum tampon çözelti miktarını tespit etmek için, 5 farklı reaksiyon ortamında aynı miktar AYY'a farklı hacimlerde 0,1 M asetat tamponu eklenerek reaksiyon sonunda elde edilen karışımlar filtrasyonla biyokütleden ayrılmıştır. Ardından 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjleme yapılarak ve üst fazların içerdiği metil alkolün fazlası döner buharlaştırıcıda uçurularak her bir örneğin kırılma indisi değeri okunmuştur. Farklı % asetat tampon çözelti oranlarında elde edilen kırılma indisi değerleri Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Biyodizelin kırılma indisi değeri 25 °C'de yaklaşık 1,45

civarındadır. Çizelgeden biyodizelin kırılma indisine en yakın değer %2 asetat tampon çözelti oranında sağlandığından tüm biyodizel üretim çalışmalarında bu oranın kullanılmasına karar verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Farklı % asetat tampon çözelti oranlarında elde edilen kırılma indisi değerleri (Reaksiyon koşulları: AYY miktarı= 4,4 g, Metil alkol/AYY molar oranı=4, T= 35 °C, K.H.=160 rpm, Katalizör miktarı= 0,5 g kuru m.o.).

% Asetat tampon çözelti oranı [(mL tampon çözelti/g AYY) x 100]	Kırılma İndisi
0	1,4680
2	1,4666
4	1,4685
8	1,4687
17	1,4689

Kesikli sistemde gerçekleştirilen biyodizel üretimi çalışmalarında AYY'ın biyodizele dönüşümünü etkileyen en önemli parametrelerden metil alkol/yağ molar oranının, karıştırma hızının, sıcaklığın ve kuru mikroorganizma (biyokatalizör) miktarının, biyodizel verimi üzerine etkileri araştırılmış ve çalışılan değerler Çizelge 4.6.'da verilmiştir. Ayrıca; reaksiyon ortamına farklı başlangıç derişimlerinde biyodizel sürfaktan olarak eklenerek, AYY'ın biyodizele dönüşümünü arttırmaya yönelik etkileri incelenmiştir.

**Çizelge 4.6.** Biyodizel üretiminde incelenen parametreler ve değerleri.

Parametre	Çalışılan Değer
Metil Alkol/Atık Yağ Molar Oranı (mol/mol)	3:1
	4:1
	5:1
Karıştırma Hızı (rpm)	120
	160
	200
Sıcaklık (°C)	25
	35
	45
Biyokatalizör Miktarı (g)	0,5
	1,0
	1,5

AYY'ın biyodizele dönüşümünü etkileyen yukarıdaki parametreler göz önüne alınarak, Taguchi yöntemine göre tasarlanan 4 parametre ve 3 seviyelik L<sub>9</sub> deney sistemi (Çizelge 4.7.) ile elde edilen dönüşüm değerleri Design-Expert paket programı kullanılarak ANOVA ile analiz edilmiştir. Deney sistemini en iyi tanımlayan matematiksel modelden, parametrelerin AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine eş zamanlı etkileri bulunmuştur. En uygun işletim parametrelerinin saptanması için aynı paket programındaki nümerik optimizasyon fonksiyonu kullanılarak, incelenen dört parametreyle AYY'ın en yüksek dönüşümüne imkan veren optimum işletme koşulları belirlenmiş ve bu koşullardaki biyodizel üretim reaksiyonunun sıcaklığa bağlı kinetik sabitleri bulunmuştur.

**Çizelge 4.7.** Taguchi L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) ortogonal dizine göre oluşturulan deneysel tasarım.

Deney No	Metil Alkol/AYY Molar Oranı	Karıştırma Hızı (rpm)	Sıcaklık (°C)	Biyokatalizör Miktarı (g)
1	3:1	120	25	0,5
2	3:1	160	35	1,0
3	3:1	200	45	1,5
4	4:1	120	35	1,5
5	4:1	160	45	0,5
6	4:1	200	25	1,0
7	5:1	120	45	1,0
8	5:1	160	25	1,5
9	5:1	200	35	0,5

#### 4.5. Analiz Yöntemleri

Yapay ve doğal besin ortamlarında çoğaltılan *R. arrhizus*'un ürettiği lipazın hücre içi ve hücre dışı hidroliz aktiviteleri titrimetrik yöntemle, atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamındaki şekerlerin toplam derişimini veren toplam indirgen şeker tayini spektrofometrik yöntemle, elde edilen biyodizelin kırılma indisi kırılma indisi tayin cihazıyla, AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşüm % değerleri ise FTIR cihazı ile belirlenmiştir.

##### 4.5.1. Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipaz Hidroliz Aktivitesinin Tayini

*R. arrhizus*'un ürettiği lipaz enzimine ait hücre içi ve dışı lipaz hidroliz aktivitesinin tayini için Hama ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yer alan titrimetrik yöntem kullanılmıştır (Hama ve ark., 2006). Bu yöntemde hücre içi lipazın hidroliz

aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan kuru hücre miktarı (mg), mikroorganizma kuru ağırlık-yaş ağırlık çalışma doğrusundan (EK 1.) yararlanılarak belirlenmiştir. Hücre içi ve hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesinin hesaplanması için kullanılan titrimetrik yöntem ise EK 2.'de detaylandırılmıştır.

#### **4.5.2. Toplam İndirgen Şeker Derişiminin Tayini**

Atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamındaki toplam indirgen şeker derişimi, ortamdaki şekerlerin DNS ile yapmış olduğu sarı renkli kompleksin spektrofotometrik olarak 575 nm'de absorbands değerinin okunmasıyla g/L cinsinden Miller (DNS) yöntemiyle belirlenmiştir (Forouchi ve Gunn, 1983). Toplam indirgen şeker derişimi tayini EK 3.'te verilmiştir.

#### **4.5.3. Kırılma İndisi Tayini**

Transesterifikasyon reaksiyonu sonucu elde edilen ürün, biyokatalizörden filtrasyonla ayrılmış ve 10.000 rpm'de 10 dakika MPW-251 marka ve model santrifüjde santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası gliserolü ayrılmış örnek, içerdiği metanolün uzaklaştırılması amacıyla Heidolph marka Hei-VAP Precision model döner buharlaştırıcıda işleme tabi tutulmuş ve ardından kırılma indisi tayini cihazında kırılma indisi ölçülmüştür.

#### **4.5.4. AYY'ın Ağırlıkça Biyodizele Dönüşüm %'sinin Tayini**

AYY'ın transesterifikasyon reaksiyonu sonucu ağırlıkça biyodizele dönüşüm %'sini belirlemek için Thermo Scientific Nicolet 6700 FTIR cihazı kullanılmıştır. Bu amaçla; EK 4.'te biyodizel içeriği verilen ve DB Tarımsal Enerji Biyodizel Üretim Tesisinden temin edilen %98,7 saflıktaki biyodizelin, AYY ile %0-100 aralığında farklı oranlarda kütlece karışımları hazırlanarak, AYY'ın farklı ağırlıkça biyodizele dönüşüm % değerleri elde edilmiş ve her bir karışım için biyodizelin karakteristik frekans değerlerinde verdiği pik alanları FTIR cihazında ölçülmüştür. Pik alanlarına karşılık AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşüm % değerleri grafiğe alınarak elde edilen kalibrasyon grafiği EK 5.'te verilmiştir. Deneysel çalışmalarda santrifüjlenerek gliserolü ayrılmış ve metanolü uzaklaştırılmış örneğin FTIR analizi yapılarak, biyodizelin karakteristik frekans değerlerindeki pik alanları

ölçülmüş ve EK 5.'te verilen kalibrasyon grafiğinden faydalanılarak AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşüm %'si tayin edilmiştir.

Deneysel çalışmalarda biyodizel üretiminde karışımdaki biyodizelin karakteristik frekans değerlerinde verdiği pikleri tespit etmek için, yapılan literatür araştırması sonucunda soya fasulyesi yağı ve bu yağdan elde edilen biyodizelin FTIR spektrumlarının karakteristik piklerinin gösterildiği Çizelge 4.8. referans olarak kullanılmıştır.

**Çizelge 4.8.** Soya fasulyesi yağının ve bu yağdan elde edilen biyodizel spektrumlarının karakteristik pikleri.

Bölge (cm <sup>-1</sup> )	Bulunan Gruplar	Soya Fasulyesi Yağı	Soya Fasulyesi Yağından Elde Edilen Biyodizel	Referans
1425-1447	CH <sub>3</sub> asimetrik bükülme	yok	var	Siatis ve ark., 2006
1188-1200	O-CH <sub>3</sub> gerilme	yok	var	Siatis ve ark., 2006
1370-1400	TG, DG ve MG'de var olan gliserole ait O-CH <sub>2</sub> grupları	var	yok	Dube ve ark., 2004
1075-1111	O-CH <sub>2</sub> -C asimetrik eksenel gerilme	var	yok	Siatis ve ark., 2006
1700-1800	C=O gerilme	var	var	Zagonel ve ark., 2004, Soares ve ark., 2008,
2800-3000	CH <sub>2</sub> gerilme ve asimetrik CH <sub>3</sub> ve CH <sub>2</sub> gerilme	var	var	Oliveira ve ark., 2006

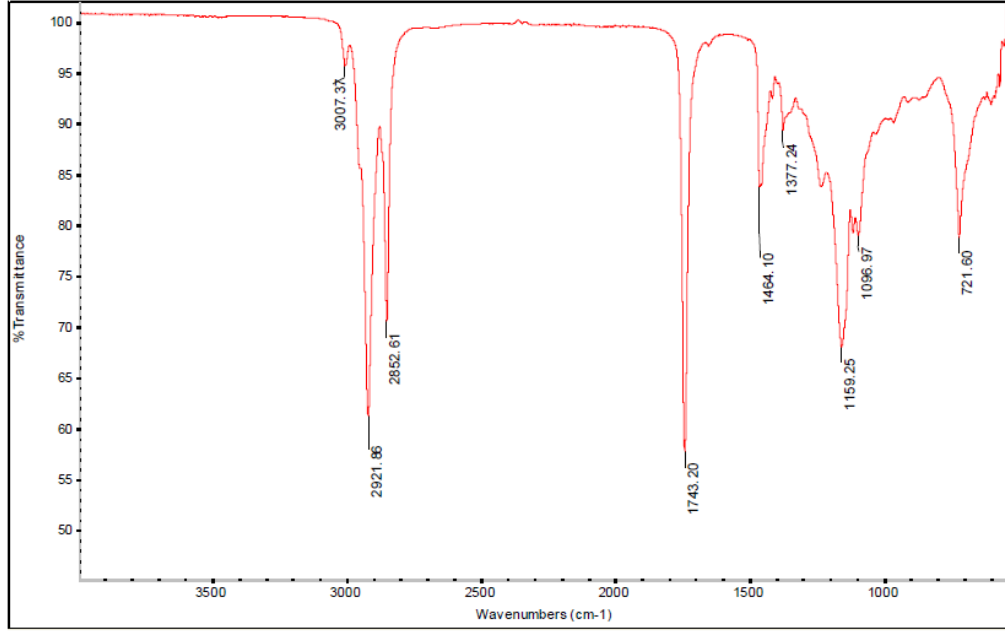
Çizelge 4.8'den; hem soya fasulyesi yağı hem de soya fasulyesi yağından elde edilen biyodizel için 1700-1800 cm<sup>-1</sup> bölgesinde elde edilen piklerin C=O ester bağlarındaki gerilmeden kaynaklandığı, 2800–3000 cm<sup>-1</sup> bölgesindeki piklerin ise

CH<sub>2</sub> gerilme ve asimetrik CH<sub>3</sub> ve CH<sub>2</sub> gerilme hareketlerini gösterdiği, yani bahsi geçen her iki bölgedeki piklerin hem yağ hem de biyodizel spektrumunda aynı şekilde görüldüğü için ayırt edici pikler olmadığı söylenebilir.

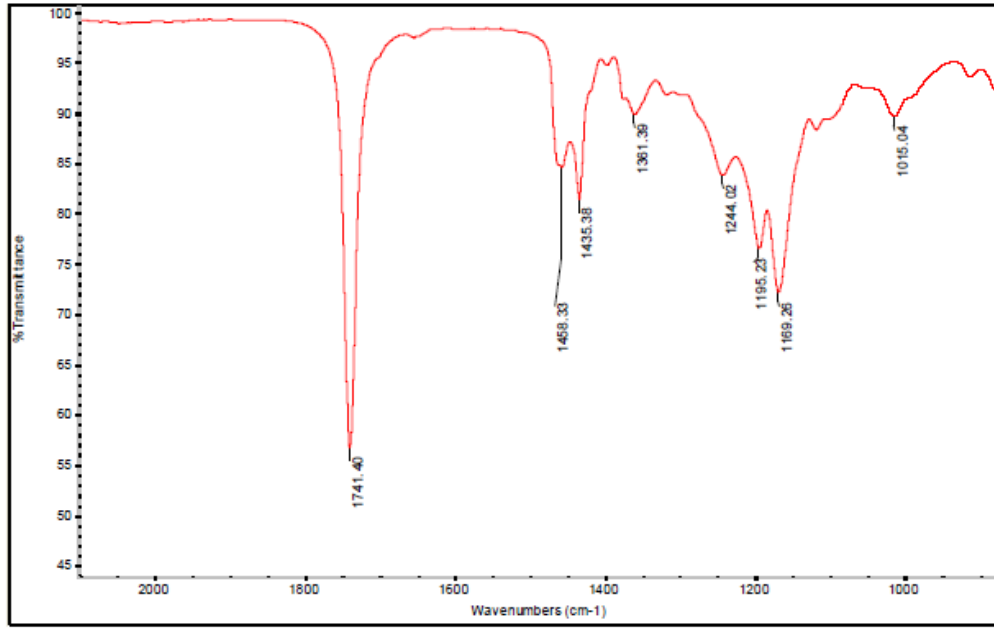
Yine aynı çizelgede 1425-1447 cm<sup>-1</sup> bölgesindeki pikin –CH<sub>3</sub> grubunun asimetrik bükülmesinden kaynaklandığı, 1188-1200 cm<sup>-1</sup> bölgesindeki pikin ise O-CH<sub>3</sub> grubuna ait gerilmeden kaynaklı olduğu ve bu piklerin biyodizele ait karakteristik pikler olduğu ve yağ spektrumunda olmadığı belirtilmiştir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan AYY ile DB Tarımsal Enerji Biyodizel Üretim Tesisinden tesisinden temin edilen biyodizelin de FTIR'da karakteristik pikleri elde edilmiş ve Çizelge 4.8.'de verilen sonuçlara benzer sonuçlar bulunmuştur. AYY'ın, biyodizel üretim tesisinden temin edilen biyodizelin ve ikinci döngü transesterifikasyon reaksiyonunda 72. saat sonunda elde edilen örneğin FTIR analizleri sırasıyla Şekil 4.8., 4.9. ve 4.10.'da sunulmuştur. Şekil 4.8.'den AYY'ın FTIR spektrumunda da Çizelge 4.8.'de yağın karakteristik pikleri olarak verilen 1370-1400 cm<sup>-1</sup> ve 1075-1111 cm<sup>-1</sup> bölgelerindeki pikler net olarak görülmektedir. Şekil 4.9.'dan biyodizel üretim tesisinden temin edilen biyodizelin FTIR spektrumunda da yine aynı çizelgede biyodizelin karakteristik pikleri olarak belirtilen 1425-1447 cm<sup>-1</sup> ve 1188-1200 cm<sup>-1</sup> bölgelerindeki pikler açıkça görülmektedir. Şekil 4.10.'dan transesterifikasyon reaksiyonu sonucu AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşümünün %22,6 olduğu örneğe ait FTIR spektrumunda da, beklenildiği üzere hem AYY'a hem de biyodizele ait karakteristik pikler görülmektedir.

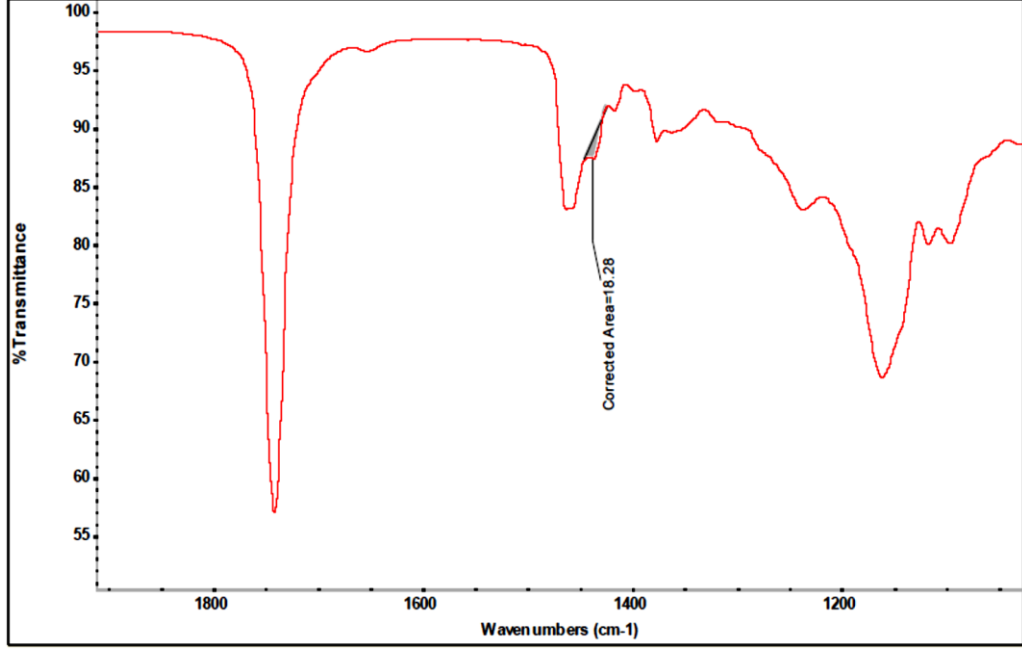




**Şekil 4.8.** AYY'ın 1096 ve 1377  $\text{cm}^{-1}$  karakteristik pikleri.



**Şekil 4.9.** DB Tarımsal Enerji Biyodizel Üretim Tesisinden elde edilen biyodizelin 1195 ve 1435  $\text{cm}^{-1}$  karakteristik pikleri.



**Şekil 4.10.** AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşümü % 22,6 olarak elde edilen örneğe ait 1435 cm<sup>-1</sup> biyodizel karakteristik piki.

## 5. DENEYSEL SONUÇLAR

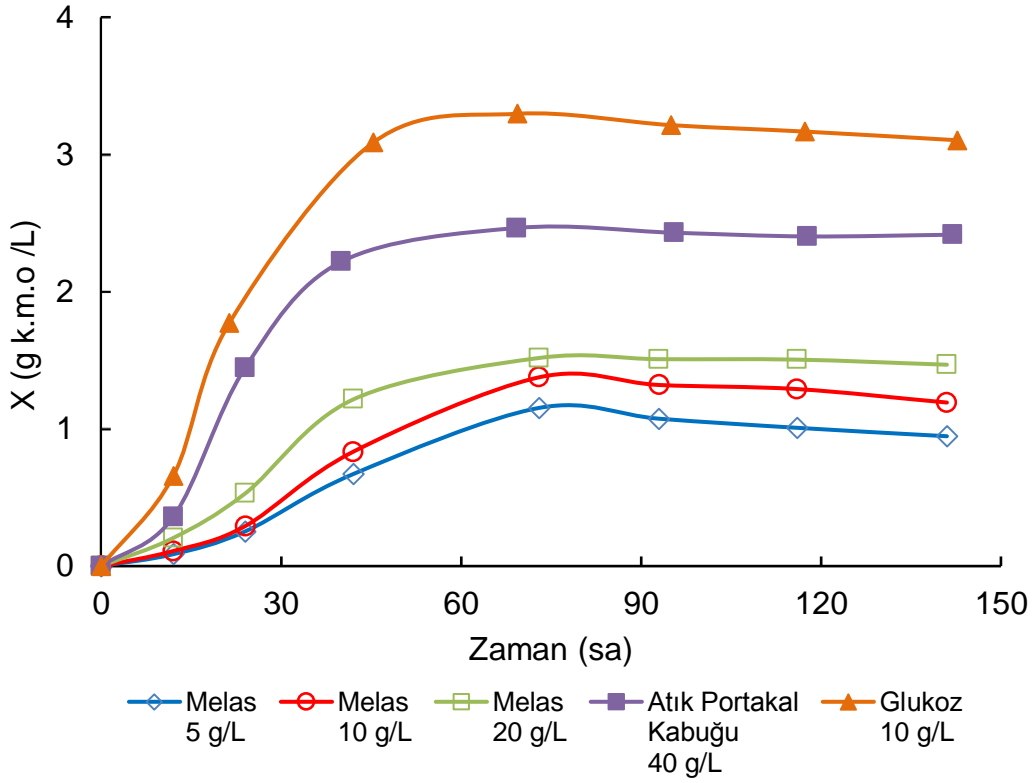
Tez çalışmasının ilk kısmı, kesikli sistemde biyodizel üretiminde biyokatalizör olarak kullanılacak olan *R. arrhizus* küf mantarının, en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesini gösterdiği üreme ortamının belirlenmesi ve bu ortamda çoğaltılan mikroorganizmanın biyodizel üretiminde kullanılmak üzere hazırlanmasını kapsamaktadır. Bu amaçla; glukoz, bir şeker endüstrisi yan ürünü olan ve sakkaroz içeren melas ve atık portakal kabuğundan besin ortamları hazırlanarak mikroorganizmanın en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi gösterdiği besin ortamı tayin edilmiştir. Çalışmaların sonraki kısmında bu ortamda başlangıç şeker (substrat) derişiminin ve lipaz hidroliz aktivitesinin arttırılması için indükleyici olarak kullanılan zeytinyağı ile atık yemeklik yağ derişimlerinin mikroorganizmanın ürettiği hücre içi ve hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesine etkileri araştırılmıştır.

Tez çalışmasının ikinci kısmında ise kesikli sistemde biyodizel üretim çalışmaları gerçekleştirilmiş ve AYY'ın biyodizele dönüşümünü doğrudan etkileyen metanol/atık yağ molar oranı, karıştırma hızı, sıcaklık ve biyokatalizör miktarının etkileri araştırılmıştır. Taguchi yöntemine göre tasarlanan ve çalışılan 4 parametre ve 3 seviyelik L<sub>9</sub> deney sistemi ile elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm değerleri Design-Expert paket programı kullanılarak ANOVA ile analiz edilmiştir. Deney sistemini en iyi tanımlayan matematiksel modelden, parametrelerin dönüşüm üzerine eş zamanlı etkileri bulunmuştur. En uygun işletim parametrelerinin saptanması için aynı paket programındaki nümerik optimizasyon fonksiyonu kullanılarak, incelenen dört parametreyle AYY'ın ağırlıkça en yüksek biyodizele dönüşümüne imkân veren optimum işletme koşulları belirlenmiş ve bu koşullardaki biyodizel üretim reaksiyonunun sıcaklığa bağlı kinetik sabitleri bulunmuş ve reaksiyon mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır.

## 5.1. *R. arrhizus*'un Üretim Çalışmaları

### 5.1.1. Farklı Besin Ortamlarının Mikrobiyal Üremeye Etkisi

Mikroorganizmanın üremesini doğrudan etkileyen ve büyümesini sınırlayan ana besin maddesi, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan şeker (glukoz, sakkaroz, fruktoz vb.) türleridir. Deneysel çalışmalarda glukozdan, melas sakkarozundan ve atık portakal kabuğundan hazırlanan ve farklı şekerleri içeren besin ortamları kullanılarak *R. arrhizus*'un üremesi incelenmiştir. Bu amaçla 30 °C'da ve 120 rpm karıştırma hızında 10 g/L glukoz, 5, 10 ve 20 g/L melas (2,5, 5 ve 10 g/L sakkaroz) ile 40 g/L atık portakal kabuğu (12,1 g/L toplam indirgen şeker) içeren besin ortamlarında mikroorganizma çoğaltılmış ve elde edilen üreme eğrileri Şekil 5.1.'de sunulmuştur. Şekilden mikroorganizmanın en hızlı glukozlu besin ortamında, en yavaş melas içeren besin ortamlarında ürediği, glukozlu besin ortamında ve atık portakal kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamında sabit evreye yaklaşık ikinci günün sonunda ulaşılırken, bu evrenin melaslı besin ortamlarında üç güne kadar çıktığı gözlenmiştir. Glukozlu besin ortamında en yüksek 3,30 g/L kuru mikroorganizma derişimi elde edilmiştir.



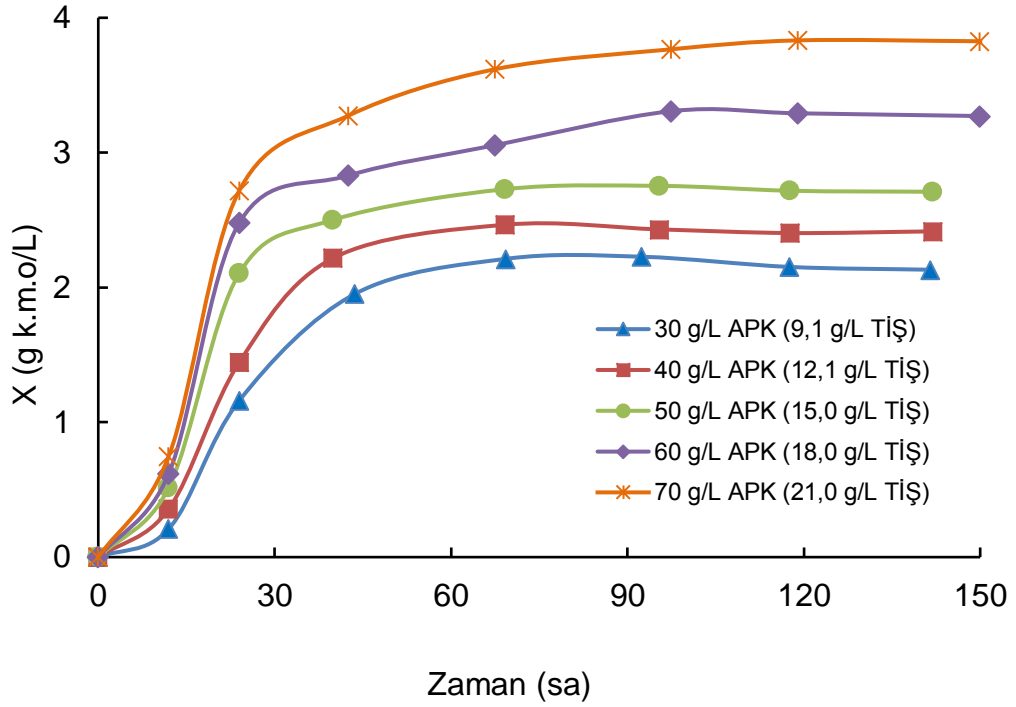
**Şekil 5.1.** *R. arrhizus* küf mantarının farklı besin ortamlarında elde edilen üreme eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm, Besin Ortamları: Glukozlu besin ortamı ( $S_G$ : 10 g/L ); melaslı besin ortamı ( $S_S$ : 2,5, 5 ve 10 g/L sakkaroz); 40 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamı ( $S_{TİŞ}$ : 12,1 g/L toplam indirgen şeker).

Biyodizel üretim çalışmaları için *R. arrhizus*'un hızlı ve yüksek verimde ve ekonomik olarak üretilmesine bağlı olarak atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamı seçilmiştir.

### 5.1.2. Atık Portakal Kabuğundan Hazırlanan Doğal Besin Ortamında Başlangıç Toplam İndirgen Şeker Derişiminin Mikrobiyal Üremeye Etkisi

30, 40, 50, 60 ve 70 g/L derişimlerinde atık portakal kabuğundan hazırlanan ve sırasıyla 9,1, 12,1, 15,0, 18,0 ve 21,0 g/L toplam indirgen şeker içeren besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'a ait üreme eğrileri Şekil 5.2.'de sunulmuştur.

Şekilden mikroorganizmanın tüm şeker derişimlerinde yaklaşık 10 saatlik bir gecikme süresinden sonra üstel üreme evresine girdiği, başlangıç şeker derişimi arttıkça mikroorganizma derişiminin arttığı, en yüksek mikroorganizma derişimine ise 70 g/L atık portakal kabuğundan (21 g/L toplam indirgen şeker) hazırlanan besin ortamında erişildiği görülmektedir. Bu ortamda en yüksek mikroorganizma derişim değeri 3,83 g/L kuru hücre olarak tespit edilmiştir.



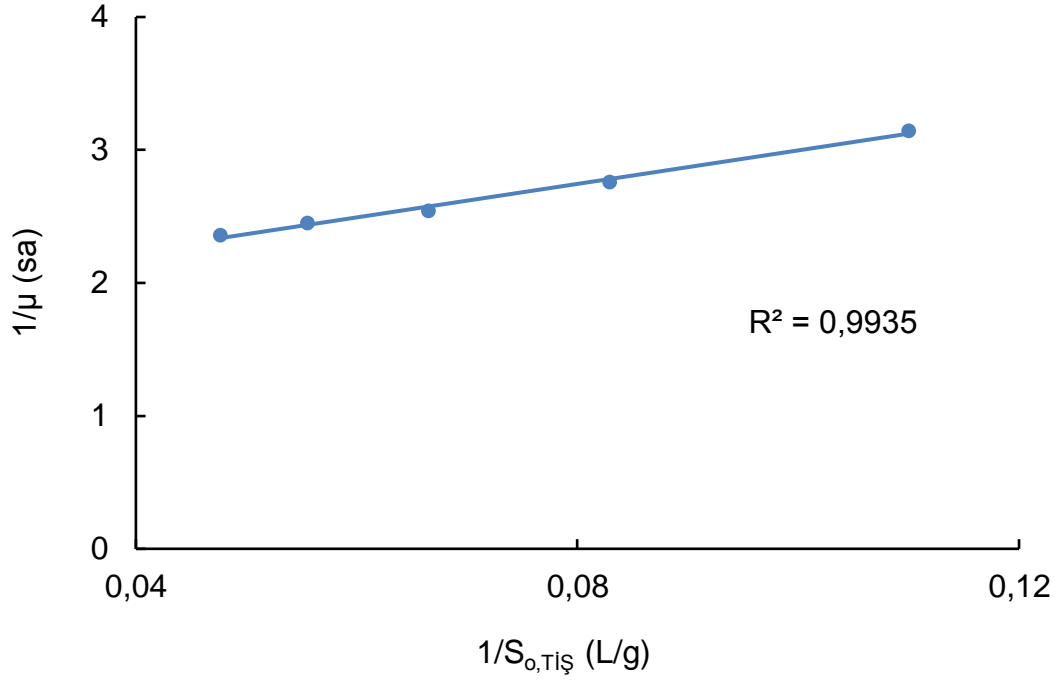
**Şekil 5.2.** Atık portakal kabuğundan hazırlanan ve farklı derişimlerde toplam indirgen şeker içeren besin ortamlarında elde edilen *R. arrhizus*'ün üreme eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm).

Çizelge 5.1.'de farklı başlangıç toplam indirgen şeker derişimi içeren atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamlarında elde edilen özgül üreme hızı, en yüksek mikroorganizma derişimi ve üreme verimi değerleri verilmiştir. Çizelgeden şeker derişiminin artmasıyla özgül üreme hızının ve en yüksek mikroorganizma derişiminin arttığı, substrata bağlı üreme veriminin ise azalarak sabit kaldığı görülmektedir. Ayrıca; çalışılan substrat derişimi aralığında substrat inhibisyonunun olmadığı gözlenmiştir.

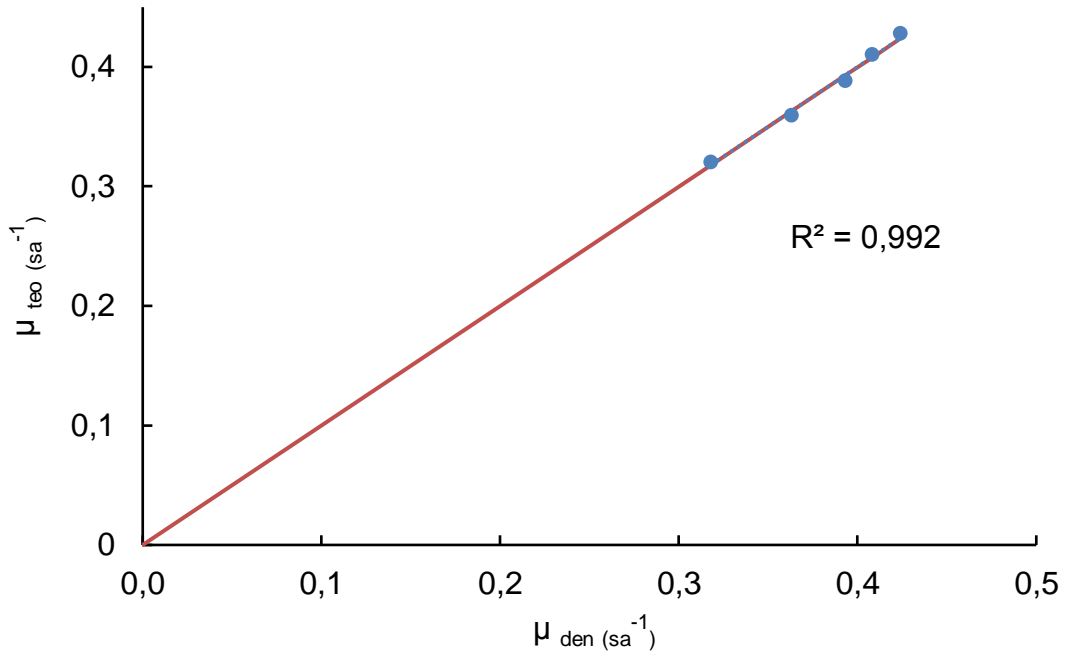
**Çizelge 5.1.** *R. arrhizus*'un farklı başlangıç toplam indirgen şeker derişimi içeren atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamlarında üremesinde elde edilen özgül üreme hızı, en yüksek mikroorganizma derişimi ve üreme verimi değerleri.

$C_{APK}$ (g/L)	$S_{o,TİŞ}$ (g/L)	$\mu$ (sa <sup>-1</sup> )	$X_m$ (g kuru m.o./L)	$Y_{X/S}$ (g kuru m.o./g TİŞ)
30	9,1	0,318	2,23	0,25
40	12,1	0,363	2,47	0,20
50	15,0	0,393	2,75	0,18
60	18,0	0,408	3,31	0,18
70	21,0	0,424	3,83	0,18

Monod eşitliğinin doğrusallaştırılmasıyla elde edilen ve Eşitlik 3.7'ye göre çizilen  $1/\mu$ 'ye karşı  $1/S_{o,TİŞ}$  grafiği Şekil 5.3.'de gösterilmiştir. Şekilden en yüksek özgül üreme hızı,  $\mu_m$ , 0,576 sa<sup>-1</sup>, doygunluk sabiti  $K_s$  ise 7,26 g TİŞ/L olarak bulunmuştur. Monod eşitliğinin deneysel verilerle ne kadar uyumlu olduğunu göstermek için teorik  $\mu$  ( $\mu_{teo}$ ) değerlerine karşılık deneysel  $\mu$  ( $\mu_{den}$ ) değerleri grafiğe alınarak 45° doğrusu üzerinde yer alıp almadıklarına bakılmış ve Şekil 5.4'ten deneysel ve teorik hız değerlerinin 45° doğrusu üzerinde yer aldığı görülerek Monod eşitliğinin atık portakal kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamındaki mikrobiyal büyümeyi oldukça iyi tanımladığı saptanmıştır.



**Şekil 5.3.** Atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamında *R. arrhizus* için elde edilen  $1/\mu$ 'ye karşı  $1/S_{0, TIŞ}$  grafiği.



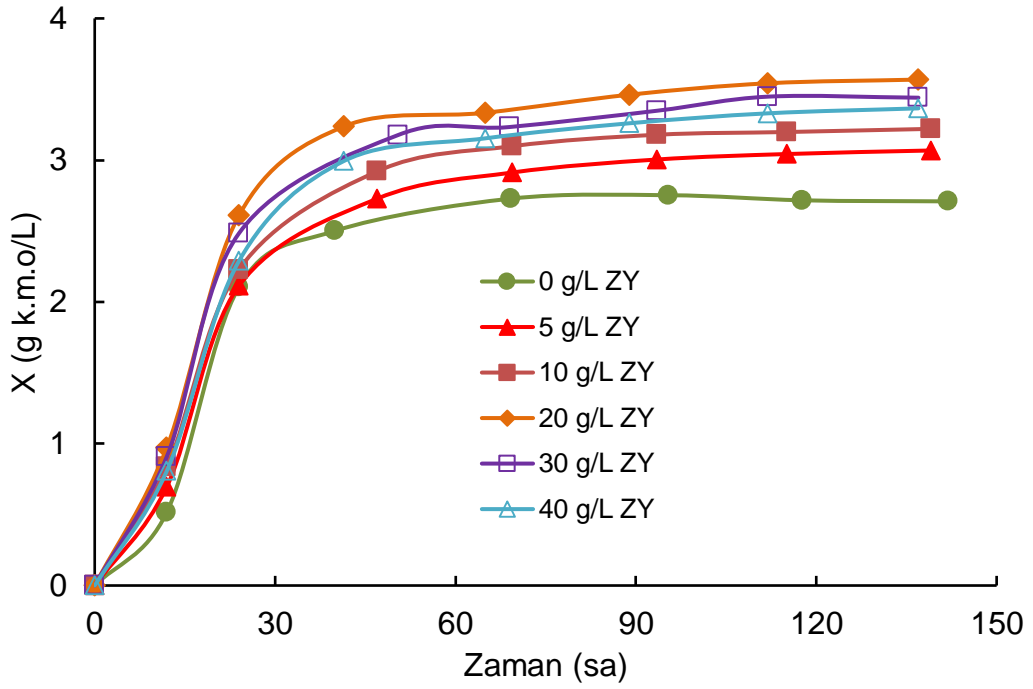
**Şekil 5.4.** Deneysel ve Monod Eşitliğine göre bulunan teorik  $\mu$  değerlerinin  $45^\circ$  doğrusu üzerinde karşılaştırılması.



### 5.1.3. Atık Portakal Kabuğundan Hazırlanan Doğal Besin Ortamına İlave Edilen İndükleyici Maddelerin Mikrobiyal Üremeye Etkileri

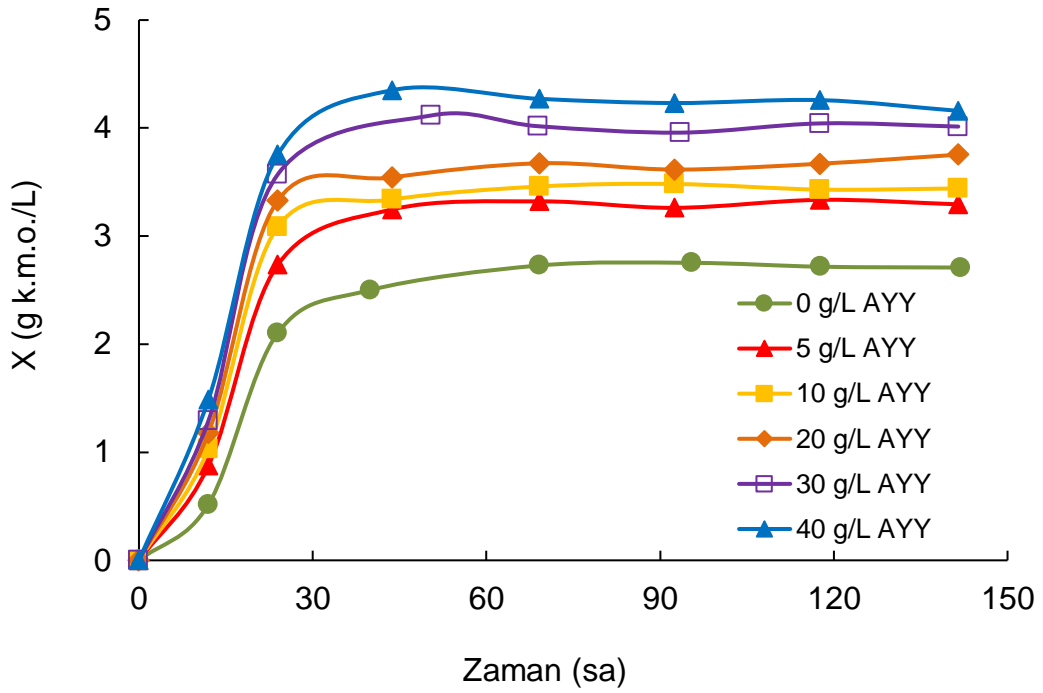
Besin ortamına, mikrobiyal üremeyi ve enzim üretimini doğrudan etkileyeceği düşünülerek zeytinyağı ve biyodizel üretim deneylerinde kullanılan atık yemeklik yağ ilave edilerek, söz konusu substratların *R. arrhizus* küf mantarının üremesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

50 g/L (15 g/L TİŞ) atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına ilk olarak derişimi 0-40 g/L arasında değişen zeytinyağı eklenerek mikroorganizmanın yaklaşık olarak altı gün süresince üremesi izlenmiş ve elde edilen üreme eğrileri Şekil 5.5.'de sunulmuştur. Şekilden besin ortamına zeytinyağı ilavesinin mikrobiyal üremeyi arttırdığı, en yüksek mikrobiyal biyokütlenin besin ortamına 20 g/L zeytinyağı eklendiğinde elde edildiği gözlenmektedir. Zeytinyağı derişimindeki daha fazla artışın mikrobiyal üreme verimini az da olsa olumsuz etkilediği yine aynı grafikten görülmektedir. Zeytinyağı içermeyen besin ortamında en yüksek mikroorganizma derişimi 2,75 g kuru hücre/L olarak tespit edilmişken, 20 g/L zeytinyağı içeren besin ortamında bu değer yaklaşık %30 artışla 3,57 g/L olarak saptanmıştır.



**Şekil 5.5.** *R. arrhizus*'un 50 g/L (15 g/L TİŞ) atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına farklı derişimlerde zeytinyağı (ZY) eklendiğinde elde edilen üreme eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm).

50 g/L (15 g/L TİŞ) atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına ikinci olarak derişimi 0-40 g/L arasında değişen atık yemeklik yağ eklenerek mikroorganizmanın yaklaşık olarak altı gün süresince üremesi izlenmiş ve elde edilen üreme eğrileri Şekil 5.6.'da sunulmuştur. Şekilden besin ortamına ilave edilen atık yemeklik yağın derişimi arttıkça mikrobiyal üremenin arttığı, en yüksek mikrobiyal biyokütlenin besin ortamına 40 g/L AYY eklendiğinde elde edildiği gözlenmektedir. AYY içermeyen besin ortamında en yüksek mikroorganizma derişimi 2,75 g kuru hücre/L olarak tespit edilmişken, 40 g/L AYY içeren besin ortamında bu değer yaklaşık %58 artışla 4,35 g/L olarak saptanmıştır.



**Şekil 5.6.** *R. arrhizus*'un 50 g/L (15 g/L TİŞ) atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına farklı derişimlerde Atık Yemelik Yağ (AYY) eklendiğinde elde edilen üreme eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm).

*R. arrhizus*'un farklı derişimlerde zeytinyağının ve atık yemeklik yağın eklendiği 15 g/L toplam indirgen şeker derişimi içeren 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamında üretilmesinde elde edilen özgül üreme hızları, en yüksek kuru mikroorganizma derişimleri ve mikrobiyal üreme verim değerleri Çizelge 5.2.'de gösterilmiştir. Çizelgeden besin ortamına indükleyici ilavesinin mikrobiyal üreme hızını ve verimini önemli ölçüde arttırdığı, besin ortamına atık yemeklik yağ ilavesinin ise mikrobiyal üremede zeytinyağından daha etkili olduğu görülmektedir.

**Çizelge 5.2.** *R. arrhizus*'un farklı derişimlerde zeytinyağının ve atık yemeklik yağın eklendiği 15 g/L toplam indirgen şeker derişimi içeren 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanmış besin ortamında üretilmesinde elde edilen özgül üreme hızları, en yüksek kuru mikroorganizma derişimleri ve mikrobiyal üreme verim değerleri.

İndükleyici	İndükleyici Derişimi (g/L)	$\mu$ (sa <sup>-1</sup> )	X <sub>m</sub> (g/L)	Y <sub>X/S</sub> (g kuru m.o./g TİŞ)
Zeytinyağı (ZY)	0	0,393	2,75	0,18
	5	0,418	3,07	0,21
	10	0,433	3,22	0,22
	20	0,446	3,57	0,24
	30	0,440	3,45	0,23
	40	0,430	3,37	0,23
Atık Yemeklik Yağ (AYY)	0	0,393	2,75	0,18
	5	0,437	3,34	0,22
	10	0,451	3,48	0,23
	20	0,462	3,75	0,25
	30	0,469	4,12	0,28
	40	0,481	4,35	0,29

## 5.2. *R. arrhizus*' dan Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipaz Üretimi

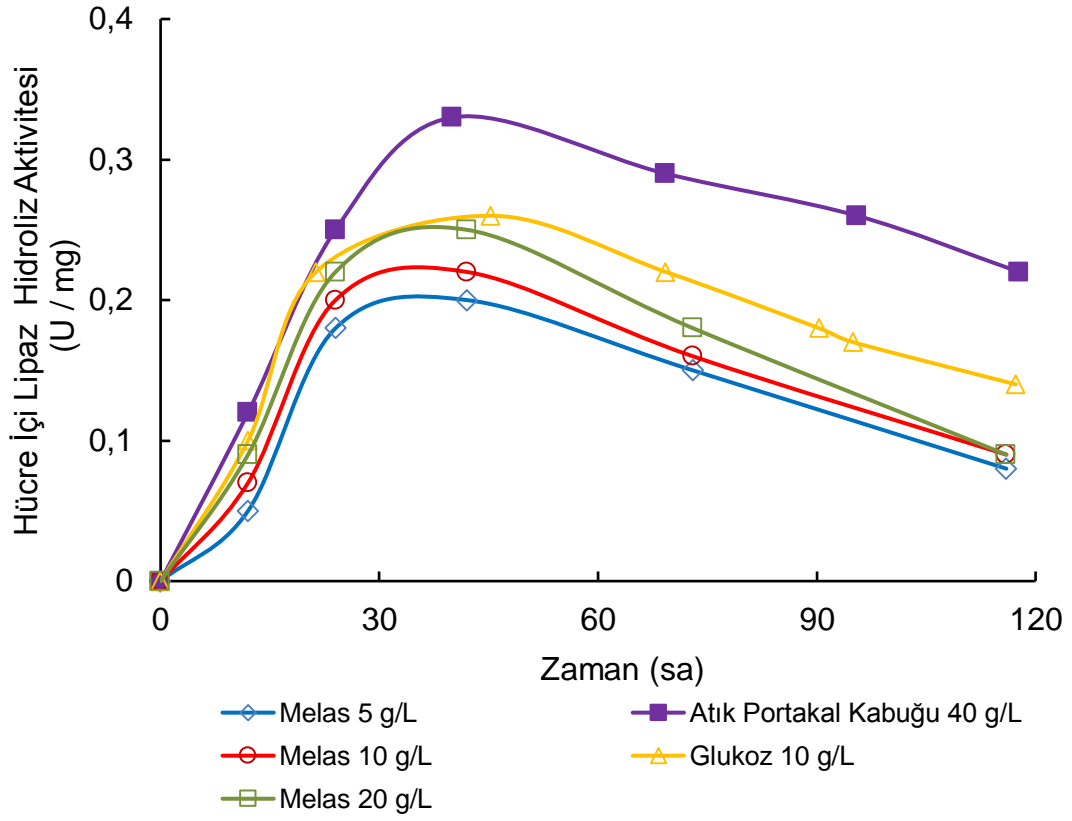
### 5.2.1. Farklı Besin Ortamlarının *R. arrhizus*'un Hücre İçi ve Hücre Dışı Ürettiği Lipazın Hidroliz Aktivitesine Etkisi

Literatürde yapılan çalışmalar, küf mantarları ve diğer mikroorganizmalardan lipaz üretiminin, ortam başlangıç pH'ı, sıcaklık, besiyeri bileşenleri, havalandırma vb. pek çok faktöre bağlı olduğunu göstermektedir (Yang ve ark., 2005). Her bir fungusun veya daha doğru bir ifadeyle lipaz üreticisinin, spesifik üreme koşullarına ve optimum besin ortamına ihtiyaç duyduğu belirtilmektedir. *R. arrhizus* ile yapılan bir çalışmada 30 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda lipaz aktivitesinin düştüğü ve mikrobiyal üremenin inhibisyona uğradığı rapor edilmiştir. Ayrıca fungal lipaz üretimi için en iyi karıştırma hızının 130 rpm'de gerçekleştiği belirtilmiştir. Giuseppin ve arkadaşları tarafından *R. delemar*'ın ürettiği lipaz miktarının kültür ortamındaki oksijen derişimine bağlı olduğu, oksijen derişiminin artırılmasının lipaz üretimini artırdığı söylenmiştir (Giuseppin, 1984). Ancak Genovefa ve arkadaşları, yüksek seviyedeki havalandırmanın hidrojen peroksit üretimiyle bağlantılı olarak bu maddenin mikroorganizma için inhibisyon etkisi oluşturduğunu rapor etmişlerdir (Genovefa, Wenzig ve Mersmann, 1994). Ayrıca, yüksek karıştırma hızlarında küf mantarı miselyumlarının büyümesinde kısıtlama olduğu ve dolayısıyla lipaz üretiminin azaldığı da başka bir çalışmada belirtilmiştir (Yang ve ark., 2005).

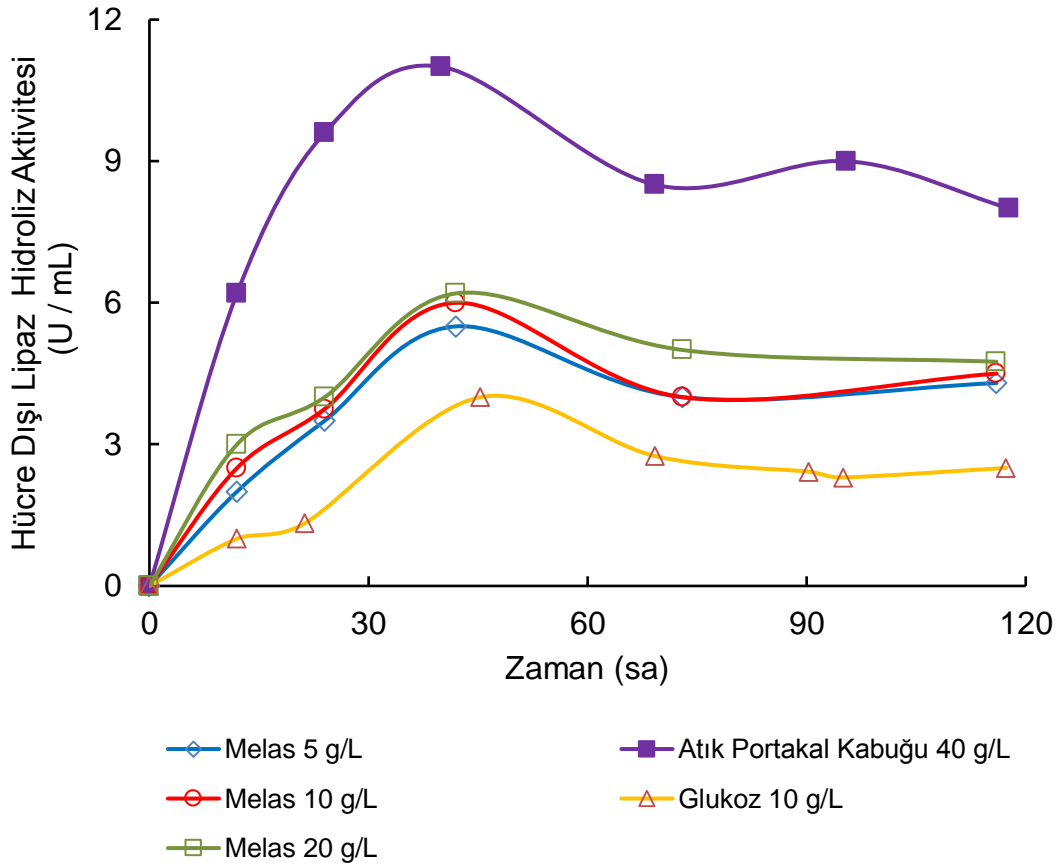
Tez çalışmasında, 30 °C sıcaklıkta ve 120 rpm karıştırma hızında, 10 g/L glukozdan, 5, 10 ve 20 g/L melas (2,5, 5 ve 10 g/L sakkaroz)'tan ve 40 g/L atık portakal kabuğu (12,1 g/L toplam indirgen şeker)'ndan hazırlanan besin ortamlarında çoğaltılan *R. arrhizus*'un ürettiği hücre içi ve hücre dışı lipaz enzimi beş gün süresince mikroorganizmadan ve kültür ortamından örnekler alınarak sırasıyla lipazın hücre içi ve hücre dışı hidroliz aktivitesi olarak belirlenmiştir. Farklı besin ortamlarında zamana bağlı elde edilen hücre içi lipazın hidroliz aktiviteleri Şekil 5.7.'de, hücre dışı lipazın hidroliz aktiviteleri ise Şekil 5.8.'de sunulmuştur.

Şekil 5.7.'den her ne kadar melas derişimi arttıkça *R. arrhizus*'un ürettiği hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin az da olsa arttığı gözlene de, melas içeren besin ortamlarında lipaz hidroliz aktivitelerinin en düşük olduğu tespit edilmiştir. En yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin ise 40 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamında üretilen *R. arrhizus*'dan elde edildiği görülmektedir. Bu ortamda en yüksek aktivite değeri 0,33 U/mg olarak saptanmıştır. Çalışılan tüm besin ortamlarında mikroorganizmanın ürettiği hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin üremenin 48. saatinde en yüksek değerine ulaştığı, üreme süresi arttıkça aktivitenin azaldığı yine aynı şekilde gözlenmektedir.

Şekil 5.8.'den glukozlu besin ortamında *R. arrhizus*'un ürettiği hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesinin en düşük olduğu, melaslı besin ortamında mikroorganizmanın ürettiği hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesinin daha yüksek olduğu, yine melas derişimi arttıkça *R. arrhizus*'un ürettiği hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesinin az da olsa arttığı gözlenmiştir. En yüksek hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin ise 40 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamında üretilen *R. arrhizus*'dan 11 U/mL olarak elde edildiği görülmektedir. Çalışılan tüm besin ortamlarında mikroorganizmanın ürettiği hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesinin üremenin 48. saatinde en yüksek değerine ulaştığı, üreme süresi arttıkça aktivitenin azaldığı yine aynı şekilde gözlenmektedir.



**Şekil 5.7.** Farklı besin ortamlarında *R. arrhizus*'un ürettiği hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişimi ( $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , K.H.= 120 rpm, Besin Ortamları: Glukozlu besin ortamı ( $S_G: 10\text{ g/L}$ ); melaslı besin ortamı ( $S_S: 2,5, 5\text{ ve }10\text{ g/L}$  sakkaroz); 40 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamı ( $S_{TİŞ}: 12,1\text{ g/L}$  toplam indirgen şeker).



**Şekil 5.8.** Farklı besin ortamlarında *R. arrhizus*'un ürettiği hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişimi (T=30 °C, K.H.= 120 rpm, Besin Ortamları: Glukozlu besin ortamı (S<sub>G</sub>: 10 g/L ); melaslı besin ortamı (S<sub>S</sub>: 2,5, 5 ve 10 g/L sakkaroz); 40 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamı (S<sub>TİŞ</sub>: 12,1 g/L toplam indirgen şeker).

*R. arrhizus*'un ürettiği hücre içi ve hücre dışı lipazların hidroliz aktiviteleri birlikte değerlendirildiğinde; mikroorganizmanın atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamında diğer ortamlara göre daha yüksek miktarlarda hücre içi ve dışı lipaz enzimi ürettiği söylenebilir. Bu durum gözönüne alınarak, biyodizel üretimi için yapılacak çalışmalarda *R. arrhizus*'un, atık portakal kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamında üretilmesinin uygun olacağına karar verilmiştir.



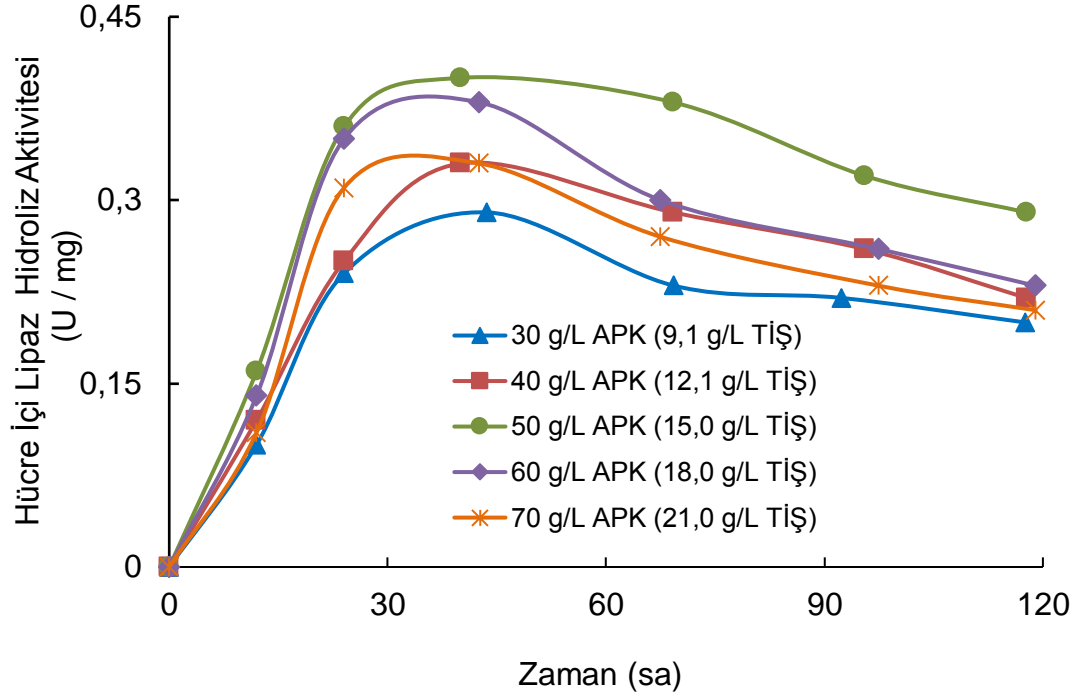
### 5.2.2. Atık Portakal Kabuğundan Hazırlanan Doğal Besin Ortamında Başlangıç Toplam İndirgen Şeker Derişiminin *R. arrhizus*'un Ürettiği Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipazın Hidroliz Aktivitesine Etkisi

30, 40, 50, 60 ve 70 g/L derişimlerinde atık portakal kabuğundan hazırlanan ve sırasıyla 9,1, 12,1, 15,0, 18,0 ve 21,0 g/L toplam indirgen şeker içeren besin ortamlarında *R. arrhizus*'un ürettiği hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişimi Şekil 5.9.'da, hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişimi ise Şekil 5.10.'de sunulmuştur.

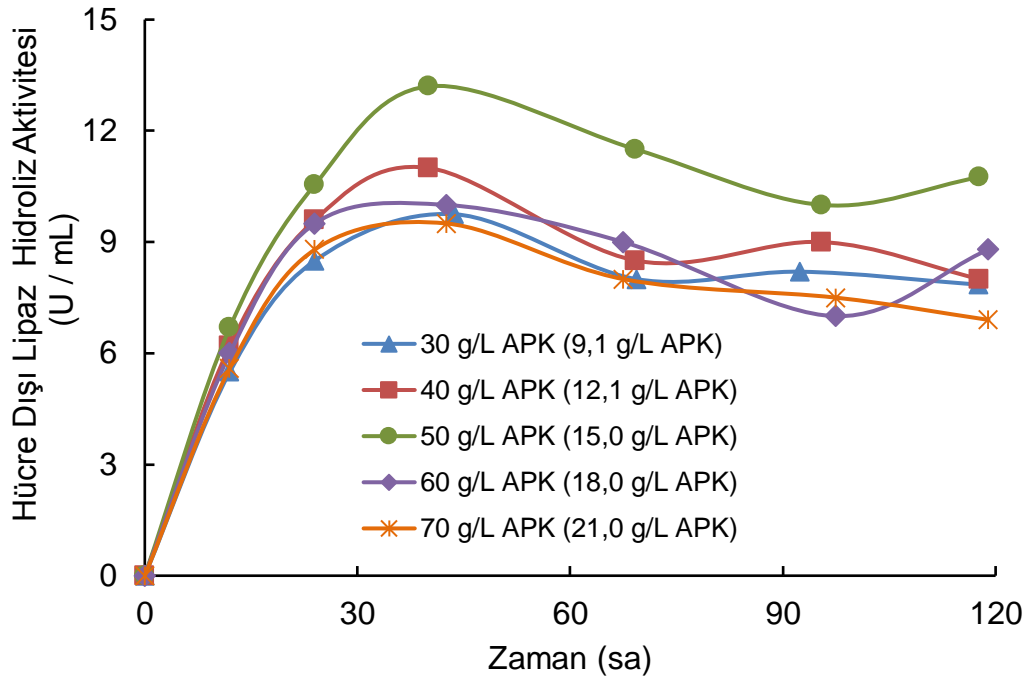
Şekil 5.9.'dan genel olarak çalışılan tüm atık portakal kabuğu derişimlerinde *R. arrhizus*'un ürettiği hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin üremenin ikinci gününde en yüksek değere ulaştığı, üreme süresi arttıkça hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin oldukça azaldığı görülmektedir. Bunun nedeni olarak üstel üreme evresinin sonunda daha fazla proteaz enzimi oluşumundan kaynaklı ürün inhibisyonu olabileceği ve/veya mikroorganizmanın zamanla karbon kaynaklarına daha az veya hiç ulaşamama durumu gösterilebilir (Athalye ve ark., 2013). Yine aynı şekilden atık portakal kabuğu derişimindeki 50 g/L (15 g/L TİŞ)'ye kadar artışın *R. arrhizus*'un ürettiği hücre içi lipazın hidroliz aktivitesini arttırdığı, atık portakal kabuğu derişimindeki daha fazla artışın ise substrat inhibisyonu nedeniyle hücre içi lipaz hidroliz aktivitesini azalttığı gözlenmektedir. En yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi 0,40 U/mg değeri ile 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamında sağlanmıştır.

Benzer şekilde Şekil 5.10.'dan da genel olarak çalışılan tüm atık portakal kabuğu derişimlerinde *R. arrhizus*'un ürettiği hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesinin üremenin ikinci gününde en yüksek değere ulaştığı, üreme süresi arttıkça hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin oldukça azaldığı görülmektedir. Yine aynı şekilden atık portakal kabuğu derişimindeki 50 g/L (15 g/L TİŞ)'ye kadar artışın *R. arrhizus*'un ürettiği hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesini arttırdığı, atık portakal kabuğu derişimindeki daha fazla artışın ise substrat inhibisyonu nedeniyle hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesini azalttığı gözlenmektedir. En yüksek hücre dışı lipaz

hidroliz aktivitesi 13,20 U/mL değeri ile 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamında sağlanmıştır.



**şekil 5.9.** Atık portakal kabuğundan hazırlanan ve farklı derişimlerde toplam indirgen şeker içeren besin ortamlarında *R. arrhizus*'un ürettiği hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişimi (T=30 °C, K.H.= 120 rpm).



**Şekil 5.10.** Atık portakal kabuğundan hazırlanan ve farklı derişimlerde toplam indirgen şeker içeren besin ortamlarında *R. arrhizus*'un ürettiği hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişimi (T=30 °C, K.H.= 120 rpm).

Biyodizel üretiminde mikrobiyal biyokütlenin kendisi biyokatalizör olarak doğrudan kullanılacağından mikroorganizmanın hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi önem kazanmaktadır. Her ne kadar en yüksek kuru mikroorganizma derişimi 70 g/L atık portakal kabuğu (21 g/L TİŞ)'ndan hazırlanan besin ortamında elde edilmiş olsa da, biyodizel üretim çalışmaları için kullanılacak *R. arrhizus* küf mantarının çoğaltılmasında besin ortamı olarak, en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin elde edildiği 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamı seçilmiştir.

### **5.2.3. Besin Ortamına Eklenen İndükleyici Maddelerin *R. arrhizus*'un Ürettiği Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipazın Hidroliz Aktiviteleri Üzerindeki Etkisi**

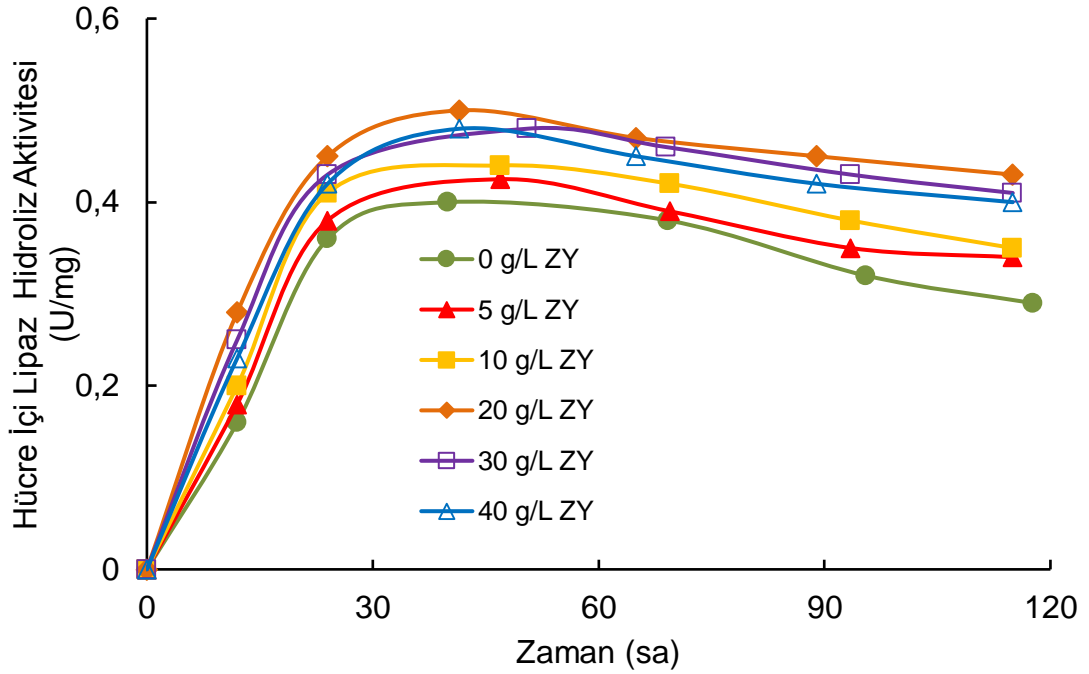
Hücre içi lipaz hidroliz aktivitesini artıran indükleyici maddelerle ilgili olarak zeytinyağı, oleik asit vb. maddelerin besin ortamına eklenmesiyle mikroorganizmanın hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinde artış olduğu bilinmektedir. *R. oryzae* ile yapılan bir çalışmada ortamda yağ ve glukozun bulunduğu büyüme ortamında, daha yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi tespit edilmiştir (Athalye ve ark., 2013). Ortamda bulunan glukozun daha yüksek biyokütle oluşumuna imkân verdiği, yağın ise lipaz üretimini artırmış olabileceği veya mikrobiyal büyüme sürecinde proteaz enziminin sebep olduğu lipaz degradasyonunu azaltmış olabileceği belirtilmiştir. Benzer sonuçlar, Ban ve arkadaşlarının *R. oryzae* biyokatalizörü ile yaptığı çalışmada elde edilmiş, immobilize kültürle 5 g/L glukoz ve 30 g/L zeytinyağı içeren besi ortamında daha yüksek metanolizis aktivitesi tespit edilmiştir (Ban ve ark., 2001).

Tez çalışmasının bu kısmında; mikroorganizmanın büyüme ortamına eklenen zeytinyağı ve atık yemeklik yağın *R. arrhizus*'un hücre içi ve hücre dışı lipazın hidroliz aktivitesine olan etkileri incelenmiştir.

### **Zeytinyağının *R. arrhizus*'un Ürettiği Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipazın Hidroliz Aktivitesine Etkisi**

50 g/L (15 g/L TİŞ) atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına derişimi 0-40 g/L arasında değişen zeytinyağı eklenerek zeytinyağı derişiminin mikroorganizmanın hücre içi ve hücre dışı lipaz üretimi üzerine indükleyici etkileri araştırılmış ve zeytinyağı derişiminin hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişimine etkisi Şekil 5.11.'de, hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişimine etkisi ise Şekil 5.12.'de gösterilmiştir. Şekil 5.11.'den ortamdaki zeytinyağı derişiminin 20 g/L'ye kadar arttırılmasıyla hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin arttığı, zeytinyağı derişimindeki daha fazla artışın ise hücre içi lipaz hidroliz aktivitesini az da olsa olumsuz etkilediği, en yüksek aktivite değerlerine

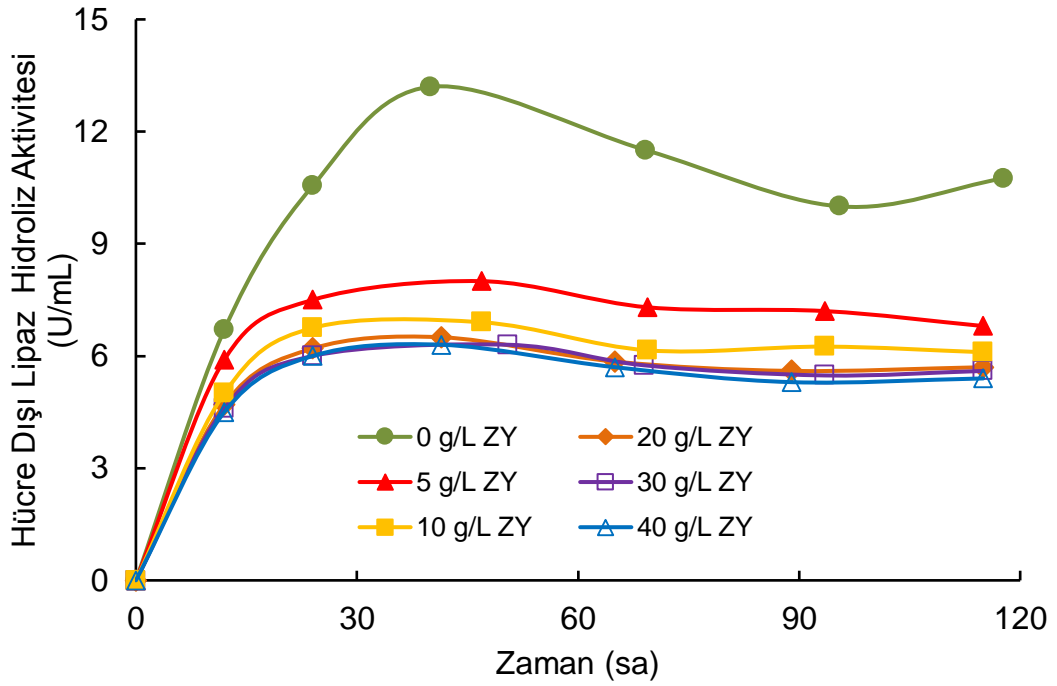
48. saatte ulaşıldığı yine aynı grafikten görülmektedir. Zeytinyağı içermeyen besin ortamında en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi 0,40 U/mg iken, 20 g/L zeytinyağı içeren besin ortamında bu değer yaklaşık %25 artışla 0,50 U/mg olarak saptanmıştır. Bu durumda; 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına 20 g/L derişime kadar zeytinyağının eklenmesinin mikroorganizmanın hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi üzerinde indükleyici etkisinin olduğu, bunun nedeninin ortamdaki zeytinyağının hücre içinde üretilen lipazın hücre dışına salınımını engellediği, böylelikle hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinde artışa sebep olduğu söylenebilir.



**Şekil 5.11.** Farklı derişimlerde ZY içeren 50 g/L atık portakal kabuğu (15 g/L TİŞ)'ndan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'un hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişim eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm).

Şekil 5.12.'den beklendiği üzere, ortamdaki zeytinyağı derişiminin 20 g/L'ye artırılmasıyla hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin azaldığı, daha yüksek zeytinyağı derişimlerinde hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin sabit kaldığı, en

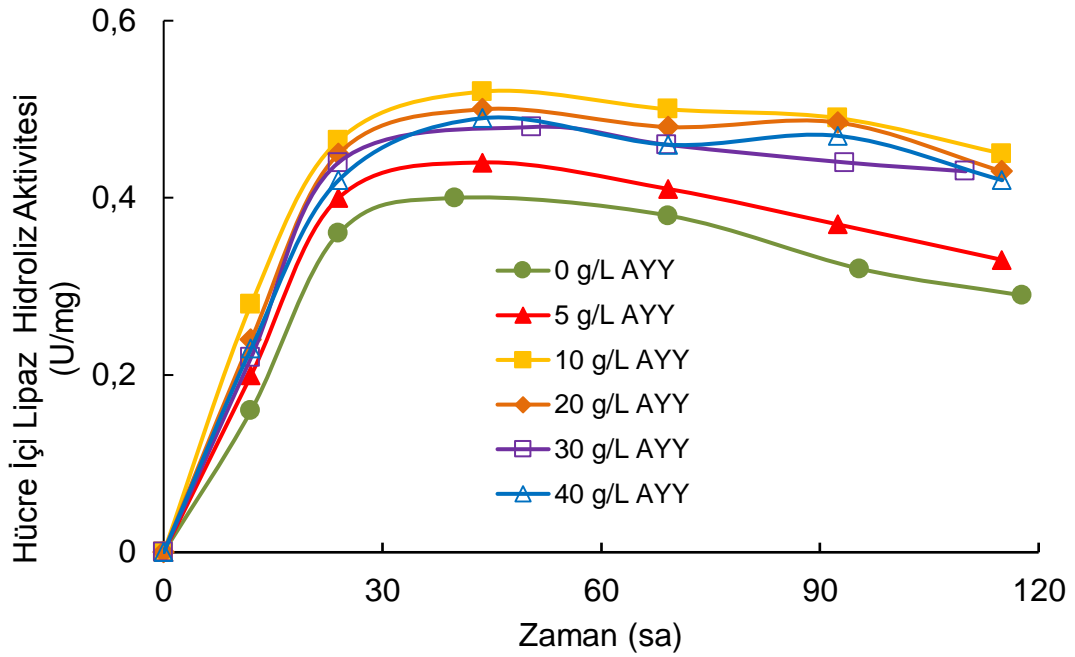
yüksek aktivite değerlerine 48. saatte ulaşıldığı, en yüksek hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin ise zeytinyağı içermeyen besin ortamında elde edildiği görülmektedir. Zeytinyağı içermeyen besin ortamında en yüksek hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesi 13,2 U/mL iken, 20 g/L zeytinyağı içeren besin ortamında bu değer yaklaşık %51 azalmayla 6,5 U/mL olarak saptanmıştır. Bu durum ortamdaki zeytinyağının hücre içinde üretilen lipazın hücre dışına salınımını engellemesi, böylelikle hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinde azalmaya neden olması şeklinde açıklanabilir.



**Şekil 5.12.** Farklı derişimlerde ZY içeren 50 g/L atık portakal kabuğu (15 g/L TİŞ)'ndan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'un hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişim eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm).

## **Atık Yemelik Yağın *R. arrhizus*'un Ürettiği Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipazın Hidroliz Aktivitesine Etkisi**

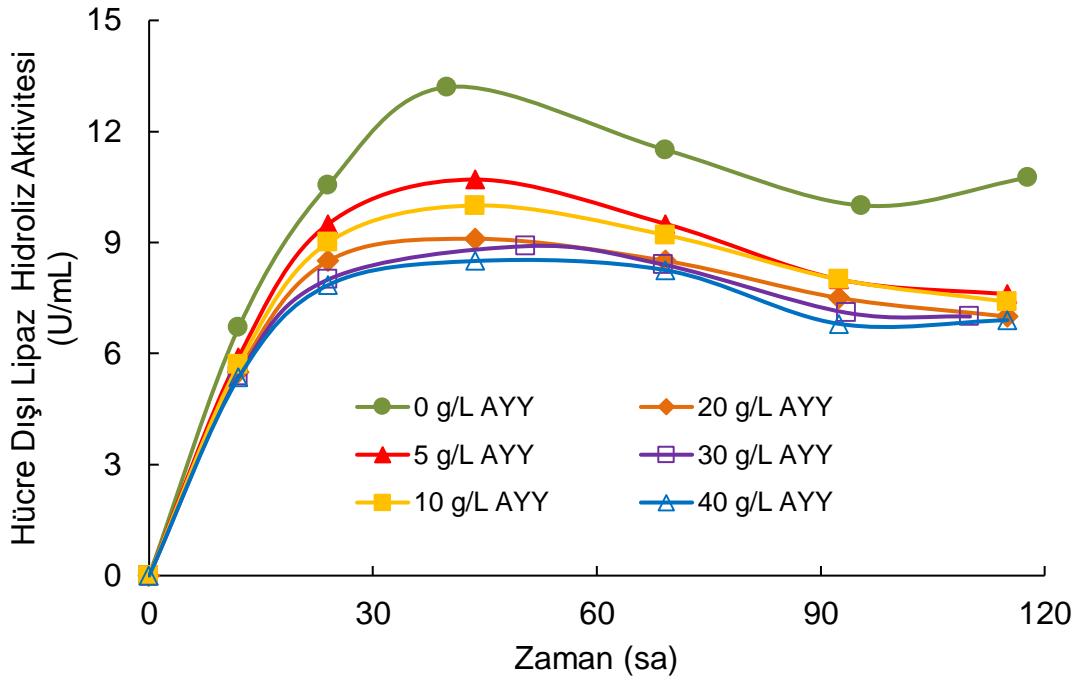
Biyodizel üretiminde kullanılacak olan atık yemeklik yağın mikroorganizmanın lipaz enzimi üretimi üzerine indükleyici etkisinin araştırılmasına yönelik olarak farklı derişimlerde atık yemeklik yağ, 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamlarına eklenmiş ve çoğaltılan mikroorganizmanın hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişim eğrileri Şekil 5.13.'de, hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişim eğrileri ise Şekil 5.14.'de gösterilmiştir. Şekil 5.13.'den ortamdaki AYY derişiminin 10 g/L'ye kadar artırılmasıyla hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin arttığı, AYY derişimindeki daha fazla artışın ise genel olarak hücre içi lipaz hidroliz aktivitesini azalttığı, en yüksek aktivite değerlerine 48. saatte ulaşıldığı yine aynı grafikten görülmektedir. AYY içermeyen besin ortamında en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi 0,40 U/mg iken, 10 g/L AYY içeren besin ortamında bu değer yaklaşık %30 artışla 0,52 U/mg olarak saptanmıştır. Bu durumda; 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına 10 g/L derişime kadar AYY'ın eklenmesinin mikroorganizmanın hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi üzerinde indükleyici etkisinin olduğu, bunun nedeninin ortamdaki AYY'ın hücre içinde üretilen lipazın hücre dışına salınımını engellediği, böylelikle hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinde artışa sebep olduğu söylenebilir.



**Şekil 5.13.** Farklı derişimlerde AYY içeren 50 g/L atık portakal kabuğu (15 g/L TİŞ)'ndan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'un hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişim eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm).

Şekil 5.14.'ten beklendiği üzere, ortamdaki AYY derişiminin 20 g/L'ye artırılmasıyla hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin azaldığı, daha yüksek AYY derişimlerinde hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin sabit kaldığı, en yüksek aktivite değerlerine 48. saatte ulaşıldığı, en yüksek hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin ise AYY içermeyen besin ortamında elde edildiği görölmektedir. AYY içermeyen besin ortamında en yüksek hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesi 13,2 U/mL iken, 20 g/L AYY içeren besin ortamında bu değer yaklaşık %31 azalmayla 9,1 U/mL olarak saptanmıştır. Bu durum ortamdaki AYY'ın hücre içinde üretilen lipazın hücre dışına salınımını engellemesi, böylelikle hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinde azalmaya neden olması şeklinde açıklanabilir.





**Şekil 5.14.** Farklı derişimlerde AYY içeren 50 g/L atık portakal kabuğu (15 g/L TİŞ)'ndan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'un hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin zamanla değişim eğrileri (T=30 °C, K.H.= 120 rpm).

En yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin elde edildiği 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan doğal besin ortamına 10 g/L AYY eklendiğinde, mikroorganizmanın hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi %30 artışla en yüksek değerine ulaştığından, biyodizel üretim çalışmalarında *R. arrhizus* küf mantarının üretilmesinde kullanılacak besin ortamına 10 g/L atık yemeklik yağ eklenmiştir.

### 5.3. Biyodizel Üretim Çalışmaları

Katalizör olarak kullanılacak *R. arrhizus* küf mantarı eşliğinde, atık yemeklik yağ ve kademeli olarak eklenen metanolden biyodizel üretiminde transesterifikasyon mekanizmasının anlaşılması ve Taguchi deneysel tasarım yönteminde seçilecek parametre ve seviyelerinin doğru olarak belirlenmesi amacıyla, biyodizel üretimi optimizasyon çalışmaları öncesi bir dizi deney yapılmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilerek sistem tasarlanmıştır. Biyodizel üretimi çalışmalarında metil

alkol/atık yemeklik yağ molar oranı, biyokatalizör miktarı, sıcaklık, ikinci döngü transesterifikasyon, sürfaktan ilavesi parametrelerinin AYY'ın biyodizele dönüşümüne etkileri araştırılarak, bulunan sonuçlar değerlendirilerek optimizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

### 5.3.1. Metil Alkol/AYY Molar Oranının AYY'ın Biyodizele Dönüşümüne Etkisi

Biyokatalizör kullanılarak gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonlarında ortamdaki metanolün miktarı, metanolün zehirleyici etkisinden dolayı çok önemlidir. Reaksiyon ortamına eklenen metanolün fazlası lipazın aktif merkezlerine ulaşarak enzimi inhibe edebilmektedir.

35 °C sıcaklıkta, 160 rpm karıştırma hızında, 0,5 g kuru mikroorganizmayla 4,4 g AYY kullanılarak yapılan transesterifikasyon reaksiyonunda Metil Alkol/AYY molar oranı 4,0 ve 4,5 olarak değiştirilerek, elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm % değerleri Çizelge 5.3.'de verilmiştir. Çizelgeden Metil Alkol/AYY molar oranının 4'ten 4,5'e artırılmasıyla biyodizele dönüşümün azaldığı gözlenmektedir. Bu da metil alkoldeki az bir artışın bile lipaz aktivitesinde inhibisyona sebep olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 5.3.** Farklı metil alkol/AYY molar oranlarında elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm değerleri.

Metil Alkol/AYY Molar Oranı	AYY'ın Biyodizele Dönüşümü (%)
4	20
4,5	18

### 5.3.2. Biyokatalizör Miktarının AYY'ın Biyodizele Dönüşümüne Etkisi

Biyokatalizör miktarı, hücre tarafından salgılanan enzim miktarıyla ilişkilidir. *R. oryzae* ile yapılan bir optimizasyon çalışmasında %72 dönüşüm için kuru fungal

biyokütlenin, reaksiyona giren yağın en az % 12 (ağırlıkça)' si kadar olması gerektiği tespit edilmiştir (Hama ve ark., 2004). 45 °C sıcaklıkta ve 160 rpm karıştırma hızında 4,4 g AYY kullanılarak metil alkol/AYY molar oranı 4'te tutularak biyokatalizör miktarı 0,5 ve 1,0 g olarak değiştirilen transesterifikasyon reaksiyonları sonucunda elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm değerleri Çizelge 5.4.'te verilmiştir. Çizelgeden, reaksiyon ortamındaki biyokatalizör miktarının dönüşümü çok fazla arttırmadığı gözlenmektedir. Bu sonuçlar aynı zamanda 0,5 g kuru hücreyle reaksiyon sıcaklığının 35 °C'dan 45 °C'a çıkartılmasıyla dönüşümün %20'den %18'e düştüğünü göstermektedir.

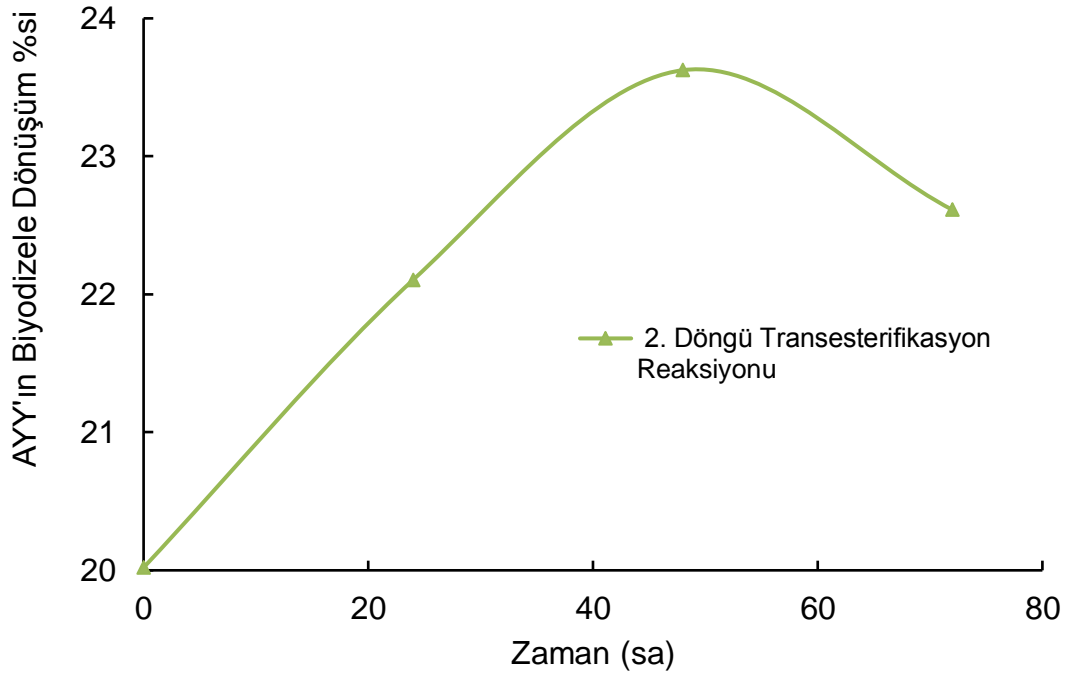
**Çizelge 5.4.** Farklı biyokatalizör miktarlarında elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm değerleri.

<b>Biyokatalizör Miktarı (g)</b>	<b>AYY'ın Biyodizele Dönüşümü (%)</b>
0,5	18
1,0	19

### **5.3.3. İkinci Döngü Transesterifikasyon Reaksiyonunun AYY'ın Biyodizele Dönüşümüne Etkisi**

Çalışmanın bu kısmında, biyodizel verimini arttırmak için, 35 °C sıcaklıkta, 160 rpm karıştırma hızında, metil alkol/AYY molar oranı 4'te gerçekleştirilen birinci döngü transesterifikasyon reaksiyonu sonucunda AYY'ın biyodizele dönüşüm değerinin % 20 olarak elde edildiği reaksiyon ortamının biyokütlesi, gliserolü ve metanolü uzaklaştırılarak, ortama yeniden 0,5 g biyokütle (biyokatalizör) ve metil alkol/AYY molar oranı 4 olacak şekilde metanol eklenerek aynı çalışma koşullarında ikinci döngü transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşümünün zamana bağlı değişimi Şekil 5.15.'de gösterilmiştir. Şekilden birinci döngü reaksiyon sonucu elde edilen %20 başlangıç dönüşüm değerinin 72 saatlik reaksiyon süresi sonrası %22,6'ya çıktığı,

dönüşümün çok fazla değişmediği görülmektedir. Bu sonuçlar, birinci döngüde elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm değerinin hemen hemen en yüksek değerine ulaştığını, dolayısıyla aynı reaksiyon koşullarında döngü sayısının artırılmasıyla dönüşümün çok fazla değişmeyeceğini göstermektedir.



**Şekil 5.15.** İkinci döngü transesterifikasyon reaksiyonunun AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi (Reaksiyon koşulları: Metil Alkol/AYY Molar Oranı=4, Sıcaklık= 35 °C, Karıştırma hızı= 160 rpm, Biyokatalizör miktarı= 0,5 g kuru m.o.).

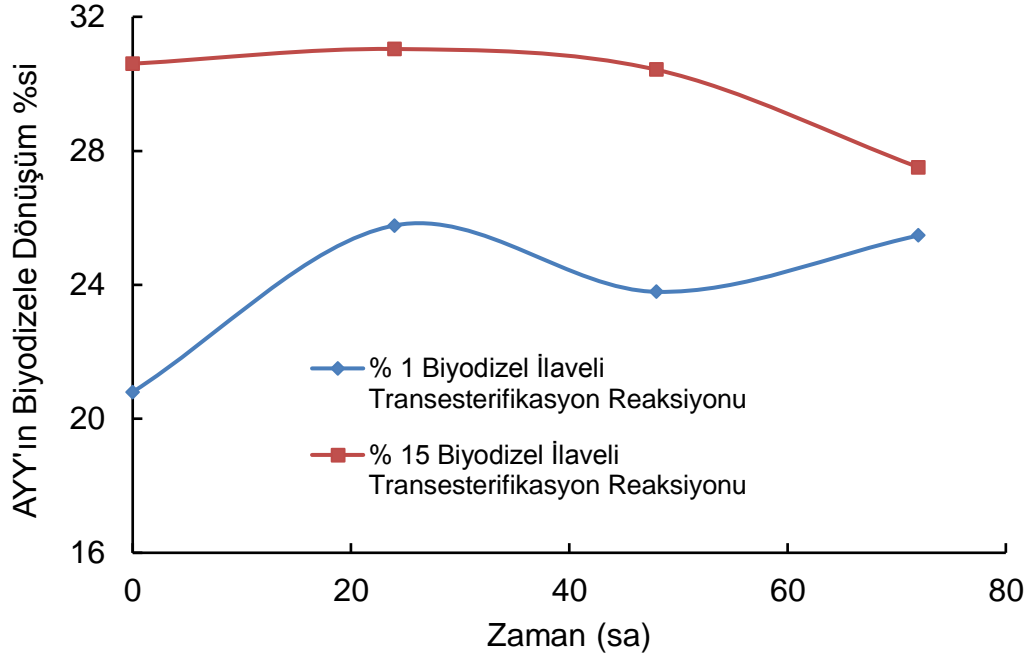
#### 5.3.4. Sürfaktan Derişiminin AYY'ın Biyodizele Dönüşümüne Etkisi

Literatür araştırmasında reaksiyon ortamına eklenen sürfaktanlar gibi bazı katkı maddelerinin, dönüşümü arttırdığı görülmüştür (Pogori, Xu ve Cheikhyoussef, 2007). Deneysel çalışmalarda, yaklaşık %99 saflıkta biyodizelin sürfaktan olarak reaksiyon ortamına eklenmesinin AYY'ın biyodizele dönüşümüne etkisi araştırılmıştır. Bu bağlamda 35 °C sıcaklıkta, 160 rpm karıştırma hızında, metil

alkol/AYY molar oranı 4'te gerçekleştirilen birinci döngü transesterifikasyon reaksiyonu sonucunda aynı dönüşüm değerlerinin elde edildiği iki reaksiyon ortamının biyokütlesi, gliserolü ve metanolü uzaklaştırılarak, aynı çalışma koşullarında ortamlara yeniden 0,5 g biyokütle ve metil alkol/AYY molar oranı 4 olacak şekilde metanol ve ağırlıkça % 1 ve % 15' lik saf (yaklaşık % 99) biyodizel eklenerek ikinci döngüde gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonu sonucunda elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşümlerinin zamana bağlı değişimleri Şekil 5.16.'da gösterilmiştir.

Şekil 5.16.'dan ağırlıkça %1 biyodizel ilavesiyle %21 olan başlangıç biyodizel %'sinin 72 saatlik reaksiyon süresi sonrası %26'ya çıktığı görülmektedir. Bu da biyodizelin sürfaktan etkisi gösterdiğini, böylelikle atık yemeklik yağ ve metanolün birbiriyle daha iyi karışmasını sağlayarak, biyokatalizörün temas alanını ve dolayısıyla AYY'ın biyodizele dönüşüm miktarını arttırdığını açıklamaktadır.

Yine aynı şekilden reaksiyon ortamına ağırlıkça %15'lik biyodizel eklenmesi sonucunda, %30'a çıkan başlangıç biyodizel %'sinin ise 72 saatlik reaksiyon süresi sonunda %27,5'e düştüğü gözlenmektedir. Biyodizelin iyi bir sürfaktan olma özelliğinin yanısıra diğer bir özelliği de transesterifikasyon reaksiyonunda "ürün" olmasıdır. Dolayısıyla ortama fazlası eklenen biyodizel aynı zamanda reaksiyonun ürün kısmında yer aldığı için, ürünün fazlası reaksiyonu sola yani tepkiyenler tarafına kaydırmış ve bu durumda dengeye gelinceye kadar biyodizelin trigliserite dönüşme süreci devam etmiştir.



**Şekil 5.16.** İkinci transesterifikasyon reaksiyonunda ağırlıkça %1 ve %15 sürfaktan ilavesinin zamana bağlı AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi.

#### 5.4. Biyodizel Üretimini Optimizasyonu

##### 5.4.1. Taguchi Yöntemiyle Deney Sisteminin Tasarlanması

Taguchi yönteminin en önemli özelliği, çok sayıda değişkenle az sayıda deney yaparak deneysel sistem tasarlamaktır. Yapılan biyodizel üretimi ön çalışmaları ve literatür araştırması sonucu, biyodizel üretimini en fazla etkileyen Taguchi yönteminde kullanılmak üzere metanol/AYY molar oranı, karıştırma hızı, sıcaklık ve biyokatalizör miktarı parametre olarak belirlenmiştir. Metanol/AYY molar oranı 3, 4 ve 5; karıştırma hızı 120, 160 ve 200 rpm; sıcaklık 25, 35 ve 45 °C; biyokatalizör miktarı ise 0,5, 1,0 ve 1,5 g olarak 3 seviyede seçilmiştir. Bu kapsamda, 4 adet parametre ve 3 seviye için hazırlanan Taguchi  $L_9$  ( $3^4$ ) ortogonal deneysel tasarım dizini Çizelge 5.5.'de verilmiştir. Bu tasarımla, 81 ( $3^4$ ) adetlik konfigürasyon sayısı 9 adete indirgenmektedir.

**Çizelge 5.5.** Taguchi L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) ortogonal dizine göre oluşturulan deneysel tasarım.

Deney No	Metanol/AYY Molar Oranı	Karıştıma Hızı (rpm)	Sıcaklık (°C)	Biyokatalizör Miktarı (g)
1	3	120	25	0,5
2	3	160	35	1,0
3	3	200	45	1,5
4	4	120	35	1,5
5	4	160	45	0,5
6	4	200	25	1,0
7	5	120	45	1,0
8	5	160	25	1,5
9	5	200	35	0,5

#### 5.4.2. Seçilen Parametrelerin AYY'ın Biyodizele Dönüşümü Üzerine Etkisi

Taguchi deneysel tasarımına göre belirlenen koşullarda yapılan deneyler sonucu elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm değerleri Çizelge 5.6.'da sunulmuştur.

**Çizelge 5.6.** Taguchi deneysel tasarımına göre belirlenen koşullarda yapılan deneyler sonucu elde edilen AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşüm % değerleri.

Deney No	Metanol/AYY Molar Oranı	Karıştıma Hızı (rpm)	Sıcaklık (°C)	Biyokatalizör Miktarı (g)	Dönüşüm (%)
1	3	120	25	0,5	13,3
2	3	160	35	1,0	18,8
3	3	200	45	1,5	17,8
4	4	120	35	1,5	20,8
5	4	160	45	0,5	18,3
6	4	200	25	1,0	20,4
7	5	120	45	1,0	16,9
8	5	160	25	1,5	18,9
9	5	200	35	0,5	16,8

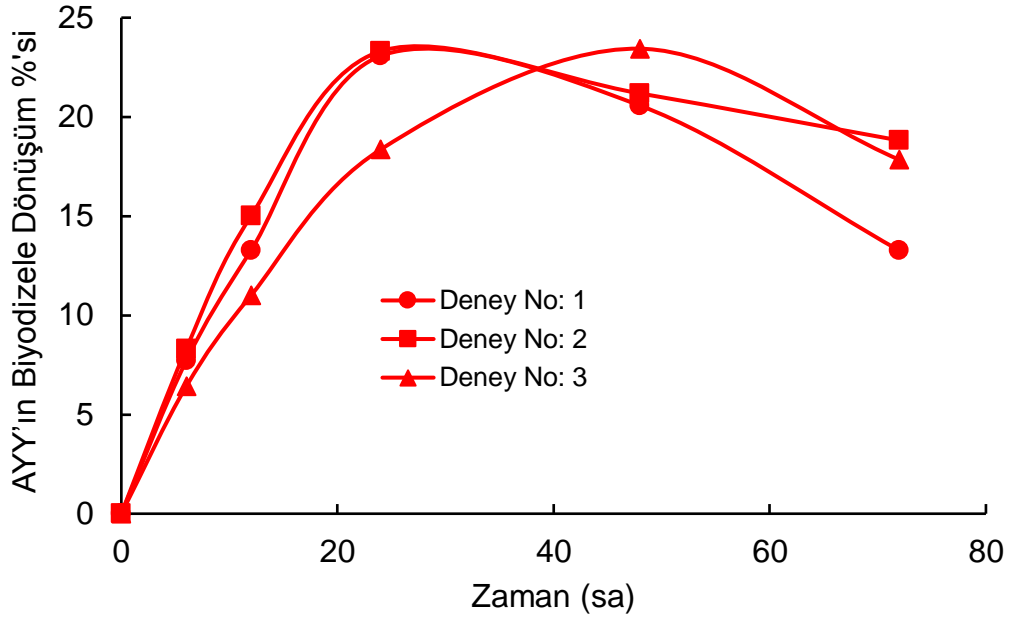
Taguchi deneysel tasarımına göre belirlenen koşullarda kesikli karıştırmalı sistemde 72 saat süreyle gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu bir denge reaksiyonu olduğu için deney sistemine eklenen metanol/AYY molar oranı oldukça önemlidir. Bu parametre ile ilgili her üç deney için sabit tutulan her bir Metanol/AYY molar oranında AYY'ın biyodizele dönüşümünün zamana bağlı değişimleri incelenmiş ve Metanol/AYY molar oranının 3 olduğu deney koşullarında elde edilen eğriler Şekil 5.17.'de, Metanol/AYY molar oranının 4 olduğu deney koşullarında elde edilen eğriler Şekil 5.18.'de ve Metanol/AYY molar oranının 5 olduğu deney koşullarında elde edilen eğriler Şekil 5.19.'da gösterilmiştir.



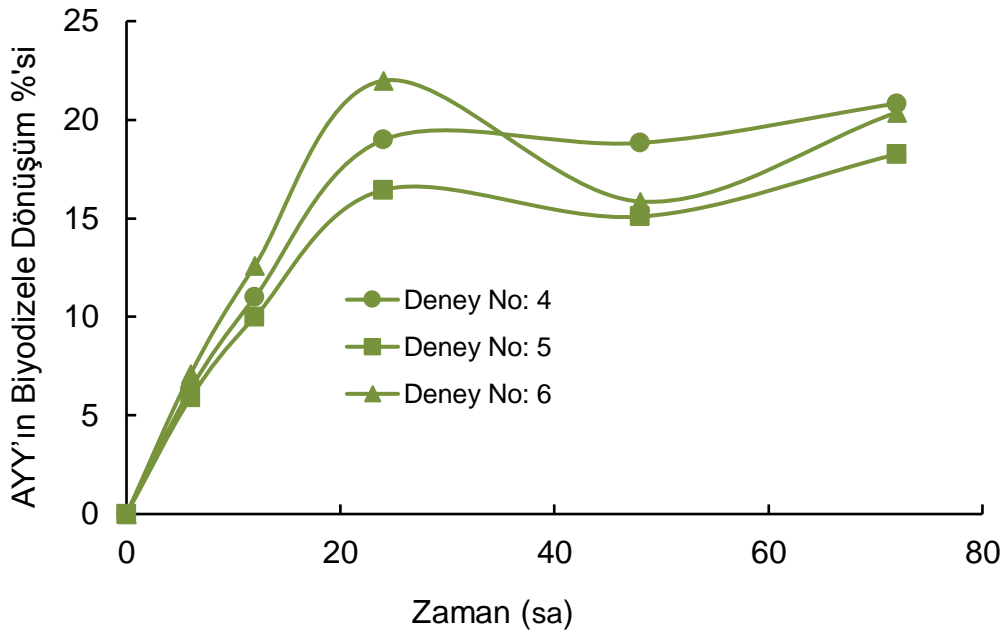
Şekil 5.17.'den Metanol/AYY molar oranının 3 olduğu durumda çalışılan tüm deneysel koşullarda özellikle reaksiyonun 48. saatinden sonra AYY'ın biyodizele dönüşümünün azaldığı görülmektedir. Başlangıçta AYY'ın fazlasının bulunduğu reaksiyon ortamına metanol, reaksiyonun başlangıcında, 24. ve 48. saatlerinde olmak üzere toplam 3 seferde eklenmektedir. Transesterifikasyon reaksiyonunda metanol için stokiyometrik katsayı 3'tür. Reaksiyonun başlangıcında ortama metanolün üçte biri eklendiğinden reaksiyon ürünler yönünde ilerlemekte, ancak 48. saatte eklenen metanolla, reaksiyonun stokiyometrik katsayısı 3'e ulaştığından tepkime denge durumuna gelmektedir. Bu durumda hem ileri yönde hem de geri yönde tepkimeler söz konusu olmaktadır. Dolayısıyla reaksiyon ortamında oluşan bir kısım biyodizel yani yağ asidi metil esteri, reaksiyonun geri yöndeki tepkimesi ile trigliserite dönüşmektedir.

Şekil 5.18.'den metil alkol/AYY molar oranının 4 olduğu durumda, AYY'ın biyodizele dönüşümünün reaksiyonun 24. saatine kadar arttığı, daha sonra azalmaya başladığı ve 48. saatten sonra tekrar artışa geçtiği gözlenmektedir. 24-48 saat aralığında ortamdaki metanolün stokiyometrik katsayısı 3'e yakındır, yani denge durumu söz konusudur. Ancak 48. saatten sonra eklenen metanolün fazlası ile molar oran 4'e ulaştığından tepkime ileri yönde seyretmekte ve dönüşüm artmaktadır.

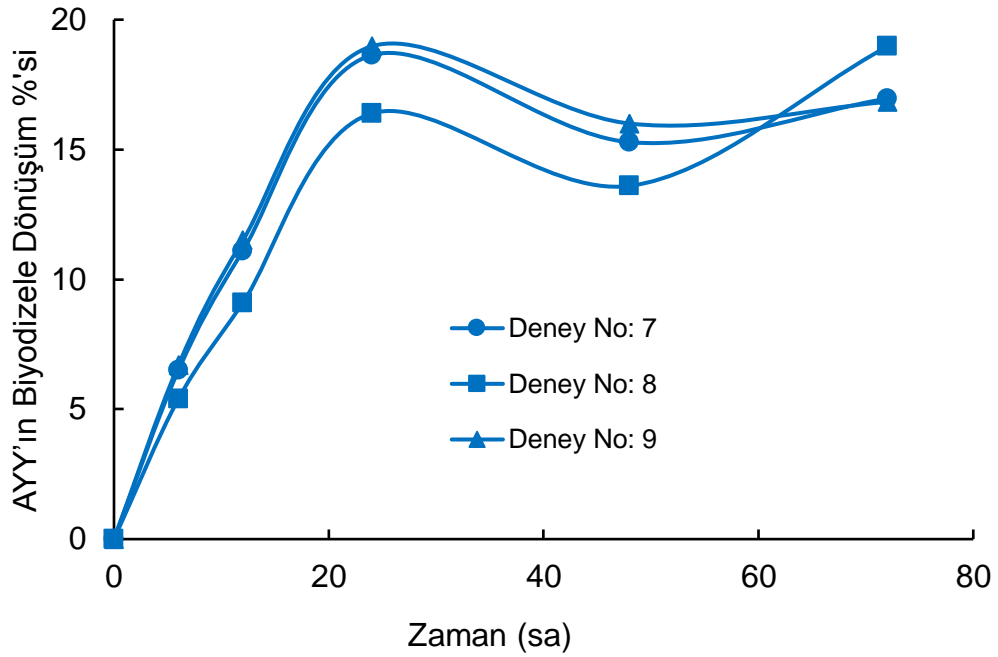
Şekil 5.19.'dan ise, metanol/AYY oranı 5 olduğu durumda AYY'ın biyodizele dönüşümünün yine reaksiyonun 24. saatine kadar arttığı, daha sonra azalmaya başladığı ve 48. saatten sonra tekrar artışa geçtiği gözlenmektedir. 24-48 saat aralığında ortamdaki metanolün stokiyometrik katsayısı 3'e yakındır, yani denge durumu söz konusudur. Ancak 48. saatten sonra eklenen metanolün fazlası ile molar oran 5'e ulaştığından tepkime ileri yönde seyretmekte ve dönüşüm artmaktadır.



**Şekil 5.17.** Taguchi deneysel tasarımına göre 1, 2 ve 3 numaralı deneyler için AYY'ın biyodizele dönüşümünün zamana bağlı değişimi (Deney No:1, Deney No:2, Deney No:3, Metanol/AYY Molar Oranı 3).



**Şekil 5.18.** Taguchi deneysel tasarımına göre 4, 5 ve 6 numaralı deneyler için AYY'ın biyodizele dönüşümünün zamana bağlı değişimi (Deney No:4, Deney No:5, Deney No:6, Metanol/AYY Molar Oranı 4).



**Şekil 5.19.** Taguchi deneysel tasarımına göre 7, 8 ve 9 numaralı deneyler için AYY'ın biyodizele dönüşümünün zamana bağlı değişimi (Deney No:7, Deney No:8, Deney No:9, Metanol/AYY Molar Oranı 5).

#### 5.4.3. ANOVA Analizi ile Parametre Etkisinin İncelenmesi

Taguchi yöntemine göre tasarlanan deney sistemine göre elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm değerleri için Design-Expert paket programında ANOVA analizi yapılarak, parametrelerin dönüşüm üzerine ortak etkileri incelenerek deney sistemini tanımlayan en uygun model bulunmuştur. Programda modelin deneysel parametrelerin belirlenmiş seviyeleri ölçüsünde minimum değerler için (-1) kodu, maksimum değerler için (+1) kodu tanımlanmıştır. Kodlu terimleri içeren en uygun model Eşitlik 5.1.'de verilmiştir. ANOVA model regresyonu ve model terimleri ise Çizelge 5.7.'de gösterilmiştir.

$$\begin{aligned} \% \text{ Dönüşüm} = & (+133,57 + 3,68 A + 5,21 B + 13,15 D \\ & - 23,65 A^2 - 7,84 B^2 - 10,37 C^2 - 8,76 D^2)^{0,629} \end{aligned} \quad (5.1.)$$

Burada;

A: Metanol/AYY Molar Oranını,

B: Karıştırma Hızını,

C: Sıcaklığı,

D: Biyokatalizör (Biyokütle) miktarını temsil etmektedir.

**Çizelge 5.7.** AYY'ın biyodizele dönüşümü için ANOVA ile model regresyonu ve model terimleri.

Kaynak	Karelerin Toplamı	DF	Karelerin Ortalaması	F-değeri	p-değeri (Prob > F)	
Model	2891,95	7	413,14	$1.547 \times 10^5$	0,0020	anlamlı
A	81,12	1	81,12	30365,57	0,0037	
B	163,14	1	163,14	61070,51	0,0026	
D	1038,08	1	1038,08	$3.886 \times 10^5$	0,0010	
A <sup>2</sup>	1118,24	1	1118,24	$4.186 \times 10^5$	0,0010	
B <sup>2</sup>	123,05	1	123,05	46063,82	0,0030	
C <sup>2</sup>	214,90	1	214,90	80443,89	0,0022	
D <sup>2</sup>	153,41	1	153,41	57428,60	0,0027	
Artık kalan	$2.671 \times 10^{-3}$	R <sup>2</sup> :1.0000; <b>Uyarlanmış R<sup>2</sup></b> :1.0000; Yeterli hassasiyet değeri (> 4 olmalı) : 1313,274				
Toplam	2891,95					

Çizelge 5.7.'den model terimlerine ait F ve p değerlerine bakıldığında A, B ve D lineer terimleri ile, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> ve D<sup>2</sup> ikinci derece terimleriyle anlamlı olduğu görülmektedir. Her bir terimin solundaki rakam, o parametrenin dönüşüm üzerindeki etkisinin büyüklüğünü göstermektedir. Bu durumda metil alkol/AYY

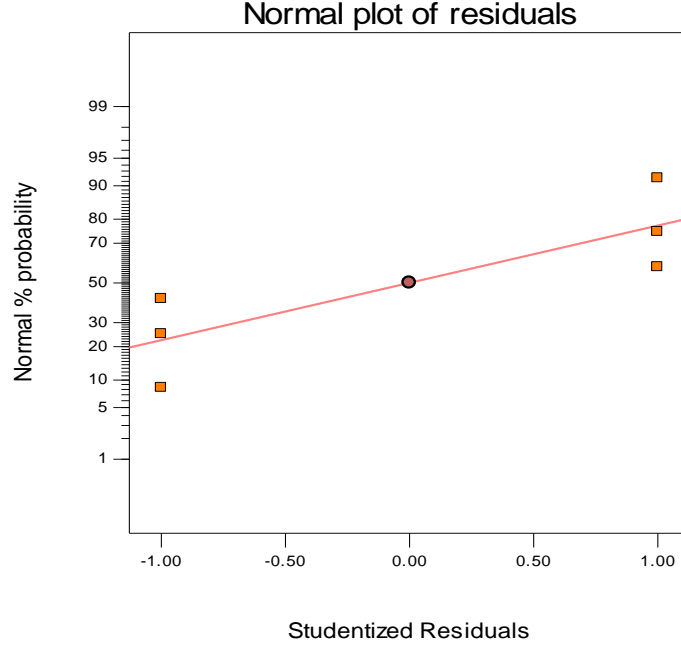
molar oranının karesinin ( $A^2$ ), dönüşüm üzerindeki en fazla etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Önerilen model ile deneysel verilerin uyumluluğu,  $F$ ,  $R^2$ , uyarlanmış  $R^2$  ve  $p$  değerleri ile anlam kazanır.  $F$  değeri ne kadar büyükse ve modelde bulunan her bir  $p$  değeri 0,05'den küçük ise model ve parametreleri anlamlılık kazanmaktadır. Çizelge 5.7. incelendiğinde modelde bulunan çok büyük  $F$  sayısı ( $1.547 \times 10^5$ ), bu modelin anlamlı olduğunu,  $F$  değerinin gürültü kaynaklı olma ihtimalinin ancak %0,20 olabileceğini gösterir. Yine aynı şekilde modelin  $p$  değerinin 0,002 olması da anlamlılığın bir ifadesidir.  $R^2$  ve uyarlanmış  $R^2$  sırasıyla 1.0000 ve 1.0000 olarak hesaplanmıştır. Tahmin edilen  $R^2$  değeri, uyarlanmış  $R^2$  değeri ile çok iyi uyum göstermiştir. Ayrıca sinyal/gürültü oranının bir ölçüsü olan ve 4 sayısından büyük olması istenilen yeterli hassasiyet değeri 1313,274 olarak bulunmuştur. Hesaplanan tüm bu değerler, modelin çok büyük anlamlılık ifade ettiğinin kanıtıdır.

Modelin yeterliliğinin değerlendirildiği diğer bir yöntem de "Artık Dağılım Analizi" dir. "Artık" terim olarak gerçek değer ile modelden tahmin edilen değer arasındaki sapmanın bir ölçüsüdür ve deneysel hatalar rastgeleylese artıkların normal bir dağılım göstermeleri beklenir (Körbahti ve Rauf, 2008).

Standart sapmaya bağlı olarak studentize (normalize) edilen artıklar için normal bir dağılım fonksiyonu belirlenir. Sonrasında en iyi uyan normal dağılım modeline göre tahmin edilen studentize edilen artıklar ve deneysel olarak elde edilen studentize artıklar grafiğe geçirilir. Şekil 5.20.'de gösterildiği gibi düz çizgi studentize artıkların normal bir dağılıma sahip olduğunu gösterir. Eğer çizgi düz

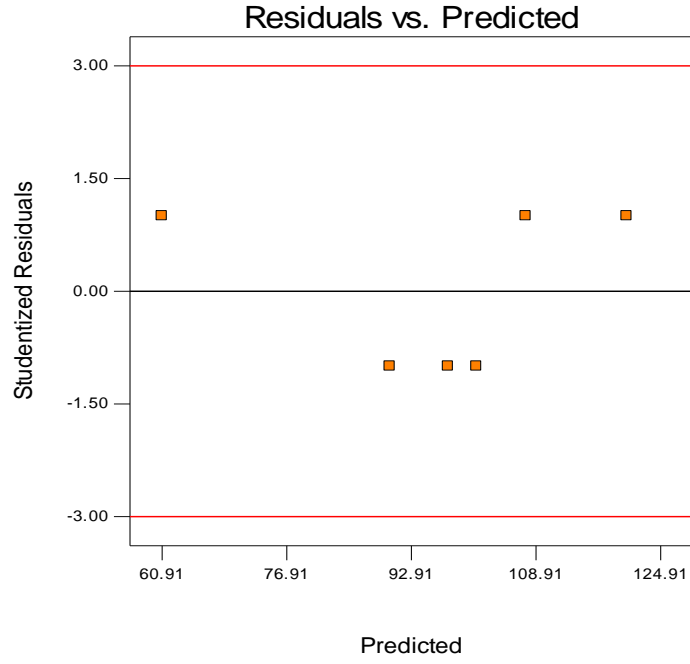
değil de "S" şeklindeyse artıkların normal bir dağılıma sahip olmadığı anlamına gelir ve önerilen model uygun değildir (Körbahti ve Rauf, 2008).



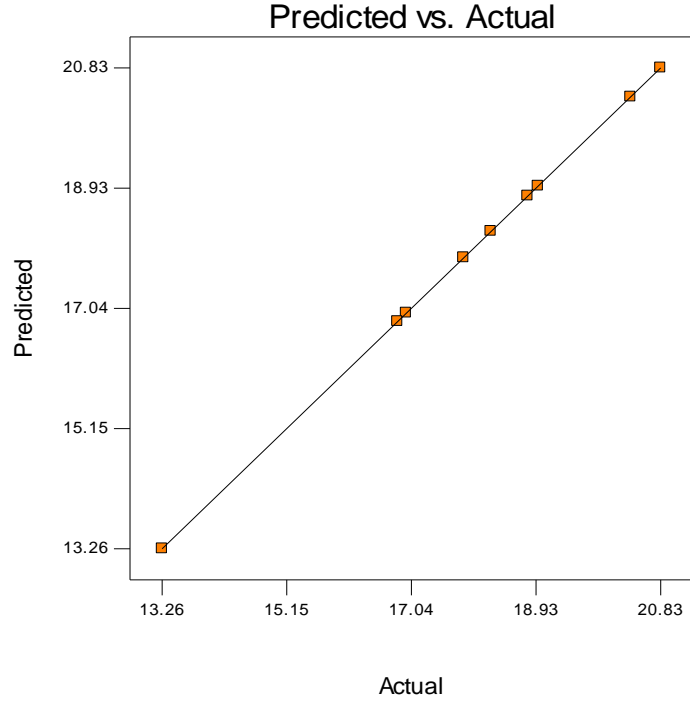
**Şekil 5.20.** Artıkların dağılım grafiği.

Şekil 5.21.'de studentize artık değerlerine karşı AYY'ın biyodizele dönüşüm %'sinin tahmini değerleri verilmiştir. Bu grafiğin rastgele saçılım göstermesi, önerilen modelin proses için uygun olduğunu göstermektedir.

Modelden tahmin edilen dönüşüm değerleri ile deneysel değerler arasındaki uyum Şekil 5.22.'de gösterilmektedir. Deneysel tasarımda  $R^2$ , ortalama değere bağlı olarak değişim miktarının hesaplanmasıyla elde edilir. Ancak, çok büyük  $R^2$  değeri de yanıltıcı olabilir, modelle ilgisi olmayan faktörlerin anlamlı olup olmamasına bağlı olmaksızın  $R^2$  büyüyebilir. Bu durumda uyarlanmış  $R^2$  kullanılır. Modele ilave bir faktör dahil edilse bile uyarlanmış  $R^2$  artış göstermez.  $R^2$  ve uyarlanmış  $R^2$  değerleri arasındaki fark ne kadar büyükse modelde o derece anlamsız terimler var demektir (Myers ve Montgomery, 2000).  $R^2$  ve uyarlanmış  $R^2$  değerlerinin 1 olarak bulunması, modelin deney sistemini çok iyi tanımladığını göstermektedir.

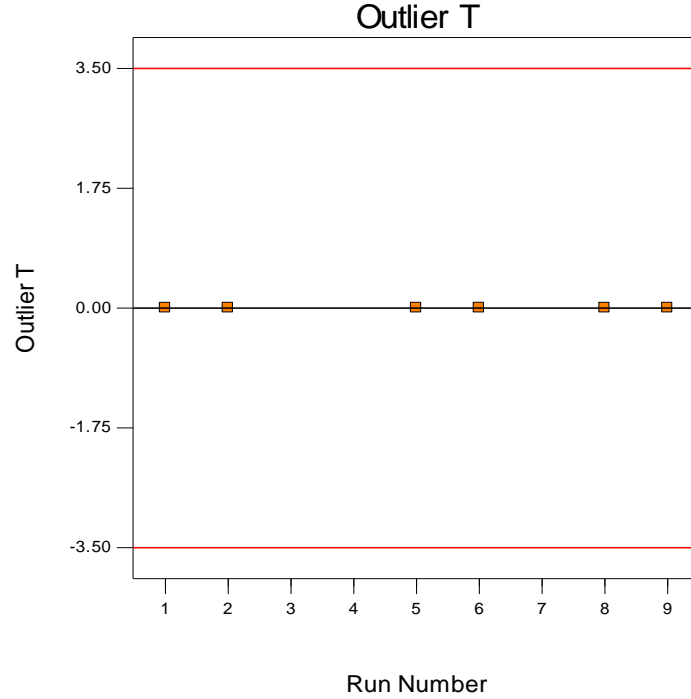


**Şekil 5.21.** Tahmin edilen artıklar ile AYY'ın biyodizele dönüşüm %'si grafiği.



**Şekil 5.22.** Deneysel olarak elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm % değerlerinin modelden tahmin edilen % dönüşüm değerleriyle 45° doğrusu üzerinde karşılaştırılması.

Şekil 5.23.'de biyodizel üretimine yönelik yapılan deneylerin uçdeğer t grafiği sunulmuştur. Uçdeğer t grafiği, artıkların büyüklüğünü ve bu durumda yapılan herhangi bir çalışmada çok büyük artık değerlere ulaşıp ulaşılmadığını gösterir. Standart sapma değeri 3 olarak alınır ve artıkların  $\pm 3$  aralığında kalması istenir. Artıklar bu aralığın dışındaysa bir hata söz konusudur. Şekil 5.23.'den de görüleceği üzere modelin tüm verilerle tutarlı olduğu görülmektedir.



**Şekil 5.23.** Uçdeğer t grafiği.

Programın önerdiği model, çalışılan her bir parametredeki değişimin AYY'ın biyodizele dönüşümünü nasıl değiştirdiğini grafiksel olarak da göstermektedir. Şekil 5.24.'te metanol/AYY molar oranının, Şekil 5.25.'te karıştırma hızının, Şekil 5.26.'da sıcaklığın ve Şekil 5.27.'de biyokatalizör miktarının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerindeki etkileri görülmektedir.

Şekil 5.24.'ten belirtilen reaksiyon koşullarında; metanol/AYY molar oranının artışıyla AYY'ın biyodizele dönüşümünün arttığı, ancak molar oranın yaklaşık 4'ten büyük olan değerlerinde dönüşümün azaldığı görülmektedir. Bu durumda

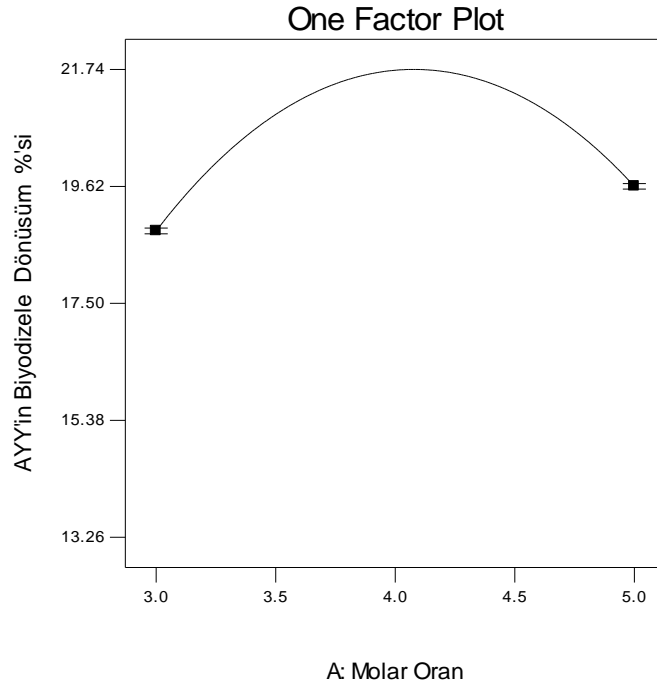


reaksiyona girmeyen metanolün fazlasının, lipaz enziminin aktivitesini olumsuz yönde etkilediği söylenebilir.

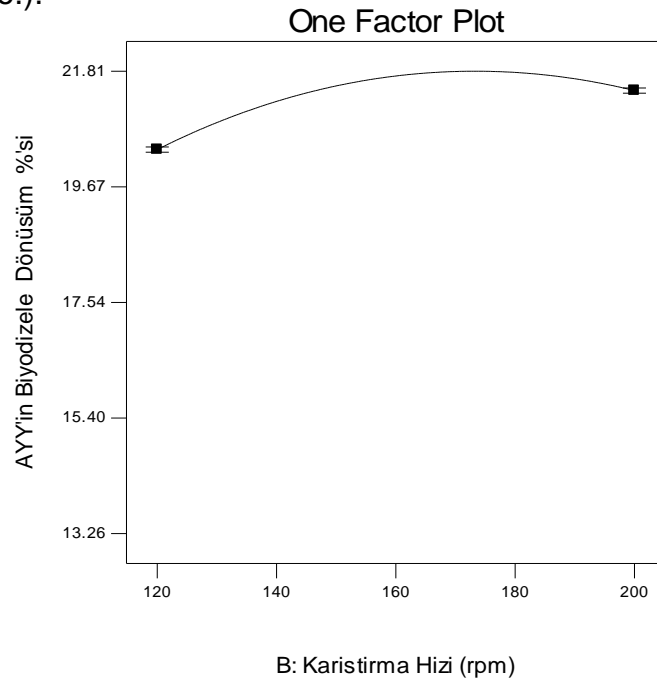
Şekil 5.25. belirtilen reaksiyon koşullarında; karıştırma hızının yaklaşık 175-180 rpm'e kadar artmasıyla AYY'ın biyodizele dönüşüm %'sinin arttığını göstermektedir. Karıştırma hızı, reaksiyon ortamındaki metanol ve AYY'nin birbirleriyle ve katalizörle etkileşimini arttırması, transesterifikasyon reaksiyonu esnasında zamanla oluşacak biyodizel ve gliserolün katalizör yüzeyinde birikimini, dolayısıyla kütle transfer kısıtlamasını en aza indirmesi açısından önemlidir. Ancak yüksek karıştırma hızının, kayma geriliminden kaynaklı olarak katalizör olarak kullanılan *R. arrhizus*'un misellerine zarar vermesi, dolayısıyla lipaz aktivitesini azaltması söz konusu olabilmektedir.

Şekil 5.26.'da belirtilen reaksiyon koşullarında; sıcaklığın yaklaşık 35 °C'a kadar artmasıyla AYY'ın biyodizele dönüşüm %'sinin arttığını göstermektedir. Yapılan literatür araştırmalarında genellikle *R. arrhizus* lipazı için optimum sıcaklık değeri 30-35 °C aralığında verilmektedir. Daha yüksek sıcaklıklarda ise enzimin yapısının bozulmasından dolayı lipaz aktivitesinde düşüş söz konusudur. Şekil 5.26.'da bu etkiden kaynaklı olarak daha yüksek sıcaklıklarda dönüşümde azalma gözlenmiştir.

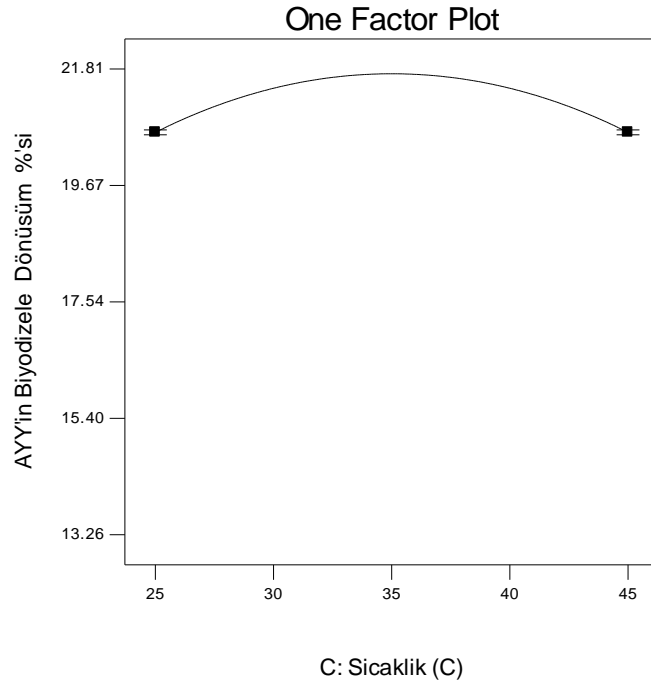
Şekil 5.27.'den belirtilen reaksiyon koşullarında; biyokatalizör miktarındaki yaklaşık 1,30 g'a kadar artışın AYY'ın biyodizele dönüşüm %'sini arttırdığı, biyokatalizör miktarındaki daha fazla artışın dönüşümü etkilemediği gözlenmektedir. Katalizörler, tepkime hızlarını artırarak reaksiyonun daha kısa sürede gerçekleşmesini sağlarlar. Dolayısıyla katalizörün tepkiyenlerle etkileşimi arttıkça, ürün veriminde artış söz konusudur. Reaksiyon ortamında biyokatalizör miktarı arttıkça, etkileşimin artmasından dolayı dönüşüm artmıştır. Ancak; biyokatalizör miktarının daha da arttırılması, tepkiyenlerin mol sayılarının belirli olması, katalizör taneciklerinin birbirlerine yapışarak kütle aktarım direnci oluşturmalarından dolayı AYY'ın biyodizele dönüşüm %'sini değiştirmemiştir.



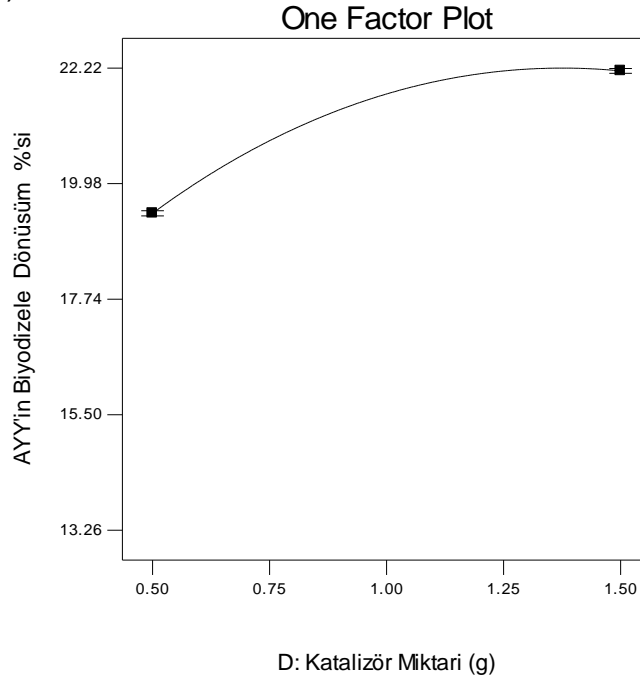
**Şekil 5.24.** Metanol/AYY molar oranının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi (T= 35 °C, K.H.= 160 rpm, Biyokatalizör miktarı= 1,0 g kuru m.o.).



**Şekil 5.25.** Karıştırma hızının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi (T=35 °C, Metanol/AYY molar oranı= 4, Biyokatalizör miktarı= 1,0 g kuru m.o.).



**Şekil 5.26.** Sıcaklığın AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi (K.H.= 185 rpm, Metanol/AYY molar oranı= 4, Biyokatalizör miktarı= 1,0 g kuru m.o.).



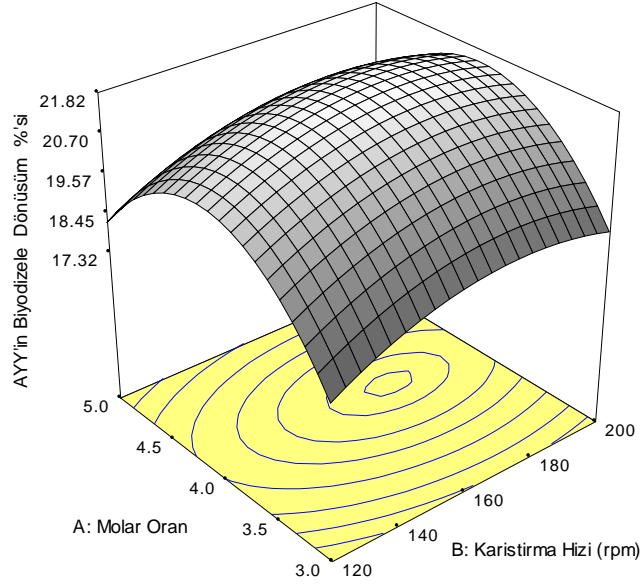
**Şekil 5.27.** Biyokatalizör miktarının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine etkisi (T= 35 °C, K.H.= 185 rpm, Metanol/AYY molar oranı= 4).

Kullanılan Design-Expert programında iki parametrenin AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine ortak etkisi, üç boyutlu grafiklerle de gösterilebilmektedir. Bu grafikler kullanılarak denenmemiş koşullardaki dönüşüm değerleri saptanabilmektedir. Şekil 5.28.'de metanol/AYY molar oranı ve karıştırma hızının, Şekil 5.29.'da metanol/AYY molar oranı ve sıcaklığın, Şekil 5.30.'da metanol/AYY molar oranı ve biyokatalizör miktarının AYY'ın biyodizele dönüşüm %'si üzerindeki ortak etkileri görülmektedir.

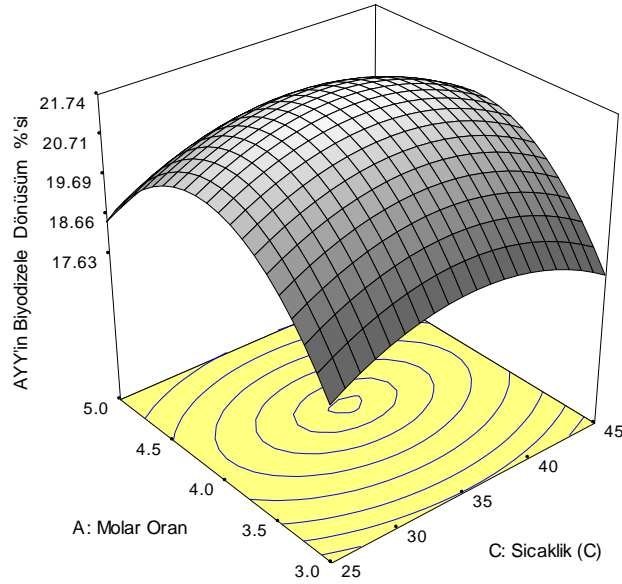
Şekil 5.28.'den metanol/AYY molar oranının 4'e kadar ve karıştırma hızının da yaklaşık 175 rpm'e kadar birlikte artışıyla AYY'ın biyodizele dönüşüm %'sinin arttığı, bu değerlerin üzerinde ise dönüşüm %'sinin azaldığı gözlenmektedir. Dönüşüme metanol/AYY molar oranının etkisinin, karıştırma hızının etkisinden daha fazla olduğu yine aynı grafikten görülmektedir.

Şekil 5.29.'dan metanol/AYY molar oranının 4'e kadar ve sıcaklığın 35 °C'a kadar birlikte artışıyla AYY'ın biyodizele dönüşüm %'sinin arttığı, bu değerlerin üzerinde ise dönüşüm %'sinin azaldığı gözlenmektedir. Dönüşüme metanol/AYY molar oranının etkisinin, sıcaklığın etkisinden daha fazla olduğu yine aynı grafikten görülmektedir.

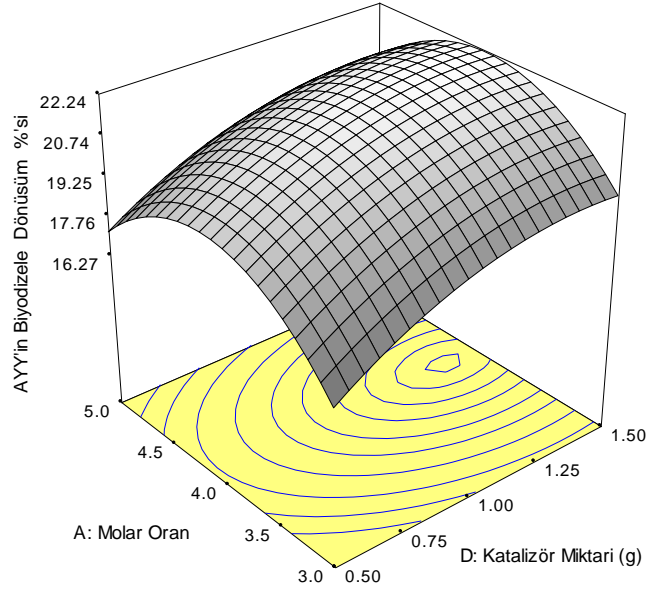
Şekil 5.30.'dan metanol/AYY molar oranının 4'e kadar ve biyokatalizör miktarının 1,3 g'a kadar birlikte artışıyla AYY'ın biyodizele dönüşüm %'sinin arttığı, bu değerlerin üzerinde ise metanol/AYY molar oranındaki daha fazla artışın dönüşüm %'sini azalttığı, biyokatalizör miktarının ise dönüşümü etkilemediği gözlenmektedir. Dönüşüme metanol/AYY molar oranının etkisinin, biyokatalizör miktarının etkisinden daha fazla olduğu yine aynı grafikten görülmektedir.



**Şekil 5.28.** Metanol/AYY molar oranı ve karıştırma hızının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine ortak etkisi (T= 35 °C, Biyokatalizör miktarı= 1,0 g kuru m.o.).



**Şekil 5.29.** Metanol/AYY molar oranı ve sıcaklığın AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine ortak etkisi (K.H.: 160 rpm, Biyokatalizör miktarı= 1,0 g kuru m.o.).



**Şekil 5.30.** Metanol/AYY molar oranı ve biyokatalizör miktarının AYY'ın biyodizele dönüşümü üzerine ortak etkisi (K.H.: 160 rpm, T= 35 °C).

#### 5.4.4. Optimum Reaksiyon Koşullarının Belirlenmesi

Design-Expert paket programının nümerik optimizasyon modülü, denenen alt ve üst parametre değerleri verilerek çalıştırılmıştır. AYY'ın biyodizele en yüksek dönüşüm %'sini veren metil alkol/AYY molar oranı, sıcaklık, karıştırma hızı ve biyokatalizör miktarı belirlenerek Çizelge 5.8.'de sunulmuştur. Çizelgeden görüleceği üzere bu koşullarda elde edilecek en yüksek dönüşüm değeri %22,3 olacaktır.

**Çizelge 5.8.** Nümerik optimizasyon ile bulunan optimum dönüşüm koşulları.

<b>Parametre</b>	<b>Değer</b>
Metanol/AYY Molar Oranı	4,0
Karıştırma Hızı (rpm)	177
Sıcaklık (°C)	33
Biyokatalizör Miktarı (g)	1,3
<b>AYY'ın Biyodizele Dönüşüm %'si</b>	<b>22,3</b>

### **5.5. Biyodizel Üretim Prosesinin Kinetik Modellemesi**

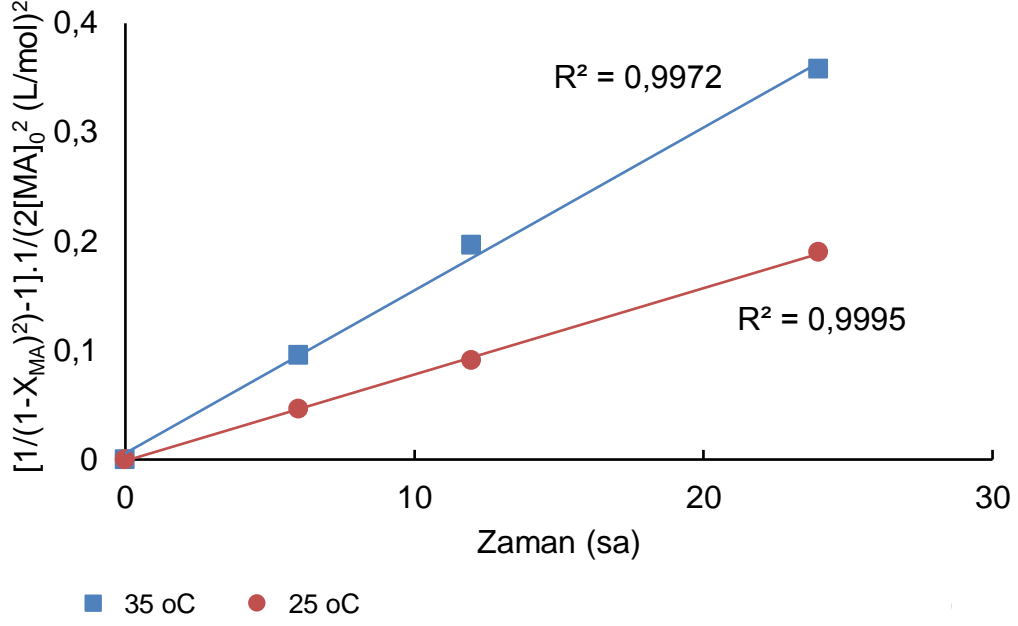
Genel olarak transesterifikasyon reaksiyonu endotermik bir tepkimedir. Deneysel sonuçlardan *R. arrhizus* lipazı ile gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonunda sıcaklığın 35 °C'a kadar artmasıyla AYY'ın biyodizele dönüşüm %'sinin arttığı, 35 °C üzerindeki sıcaklıklarda ise lipazın inaktivasyonuna bağlı olarak dönüşüm %'sinin azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla deneysel sisteme ait kinetik sabitlerin ve aktivasyon enerjisinin tayin edilmesi için 45 °C'da elde edilen verilerin yanıltıcı olacağı düşünülerek sadece 25 ve 35 °C sıcaklıktaki veriler kullanılmıştır. Bu bağlamda, yapılan ANOVA analizi ve optimizasyon çalışmaları göz önüne alınarak, optimum dönüşüm için gerekli olan metil alkol/AYY molar oranı, karıştırma hızı, sıcaklık ve biyokatalizör miktarı değerlerini 25 ve 35 °C'da en yakın karşılayan 6 ve 2 nolu deney koşullarında elde edilen veriler kullanılarak kinetik parametreler tayin edilmiştir. Çizelge 5.9.'da 6 ve 2 numaralı deneylerdeki metil alkol/AYY molar oranı, karıştırma hızı, sıcaklık, biyokatalizör miktarı değerleri, başlangıç metil alkol derişimi ve bu koşullarda ilk 24 saatlik reaksiyon süresinde elde edilen zamana bağlı molce metil alkol dönüşüm kesri değerleri verilmiştir.

**Çizelge 5.9.** 6 ve 2 numaralı deneylerdeki metil alkol/AYY molar oranı, karıştırma hızı, sıcaklık, biyokatalizör miktarı değerleri, başlangıç metil alkol derişimi ( $[MA]_0$ ) ve bu koşullarda ilk 24 saatlik reaksiyon süresinde elde edilen zamana bağlı molce metil alkol dönüşüm kesri ( $X_{MA}$ ) değerleri.

Deney No	Metanol/ AYY Molar Oranı	Karıştırma Hızı (rpm)	Sıcaklık (°C)	Katalizör Miktarı (g)	$[MA]_0$ (mol/L)	$X_{MA}$	
						6. sa	12. sa
6	4	200	25	1	1,30	0,07	0,13
						0,13	0,22
						0,22	
2	3	160	35	1	0,98	0,08	0,15
						0,15	0,23
						0,23	

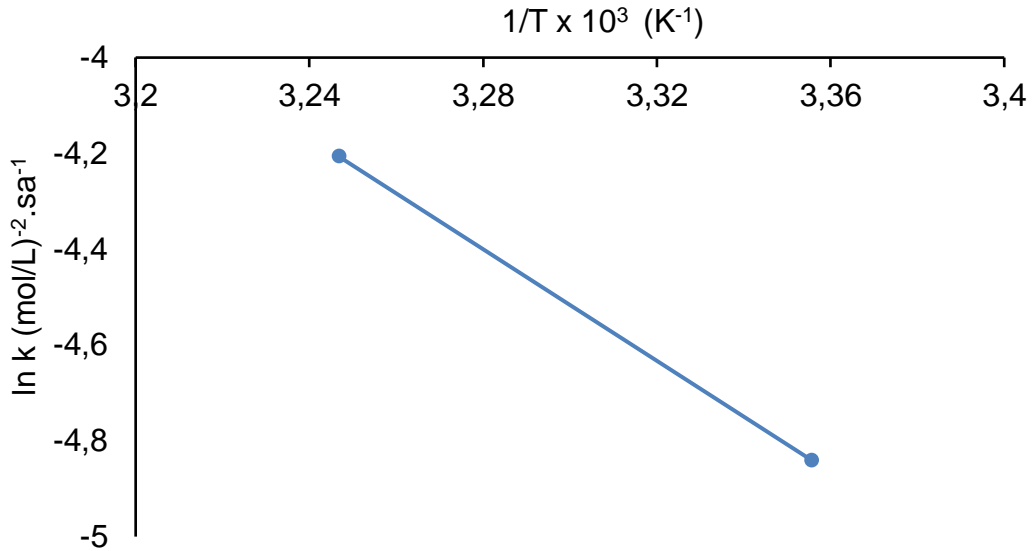
Eşitlik 3.30.'dan yararlanarak ve Çizelge 5.9.'daki 25 °C ve 35 °C'daki veriler kullanılarak  $\left[ \frac{1}{(1-X_{MA})^2} - 1 \right] \cdot \left[ \frac{1}{2[MA]_0^2} \right]$  'ye karşı t grafiklerinin (Şekil 5.31.) eğimlerinden *R. arrhizus* lipazı ile gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonuna ait hız sabitleri elde edilmiştir. 25 °C'daki hız sabiti 0,0079 (mol/L)<sup>-2</sup>.sa<sup>-1</sup>, 35 °C'daki hız sabiti 0,0149 (mol/L)<sup>-2</sup>.sa<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Şekil 5.31.'deki doğruların R<sup>2</sup> değerlerinin 1'e çok yakın çıkması, reaksiyon mekanizması ve kinetik sabitlerin bulunması için önerilen modelin sistemi çok iyi tanımladığını göstermektedir.





**Şekil 5.31.** 25 ve 35 °C'da elde edilen  $\left[ \frac{1}{(1-X_{MA})^2} - 1 \right] \cdot \left[ \frac{1}{2[MA]_0^2} \right]$ , ye karşı t grafikleri.

Eşitlik 3.32.'de verilen doğrusallaştırılmış Arrhenius Denklemi kullanılarak elde edilen  $\ln k$ 'ya karşı  $1/T$  grafiğinin eğiminden aktivasyon enerjisi,  $E_A$  48,42 kJ/mol, y eksenini kesim noktasından ise frekans faktörü,  $A_0$   $2,43 \times 10^6$  (mol/L)<sup>-2</sup>.sa<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.



**Şekil 5.32.**  $\ln k$ 'ya karşı  $1/T$  grafiği.

Literatür araştırmasında, soya yağı ile biyodizel üretiminde aktivasyon enerjisinin 33,6-84 kJ/mol aralığında bulunduğu rapor edilmiştir (Fredman et al., 1986). Ayrıca, enzim katalizörlü reaksiyonlarda aktivasyon enerjisinin 15-85 kJ/mol aralığında olduğu belirtilmektedir (Liu, 2017). Bu durumda, atık yemeklik yağdan mikrobiyal katalizör eşliğinde biyodizel üretim prosesi için tespit edilen kinetik parametrelerin literatür ile uyumlu olduğu söylenebilir.

## 6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında, kesikli sistemde hücre içi lipaz enzimi içeren kurutulmuş *R. arrhizus* biyokütlesi atık yemeklik yağ ve metanolle birlikte biyokatalizör olarak doğrudan kullanılarak, transesterifikasyon reaksiyonuyla mikrobiyal biyodizel üretimi incelenmiştir.

*R. arrhizus* besin ortamında çoğalırken ürettiği ve hücre duvarında yer alan bir kısım lipaz enzimini besin ortamına salgılamaktadır. Hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesi, genellikle çözüldüden saflaştırma işlemlerinin yapıldığı lipaz eldesinde önemlidir. Dolayısıyla biyodizel üretiminde katalizör olarak kullanılacak olan *R. arrhizus* için ürettiği hücre içi lipazın hidroliz aktivitesinin büyüklüğü önem kazanmaktadır. Tez çalışmasında ilk olarak kesikli sistemde biyodizel üretiminde biyokatalizör olarak doğrudan kullanılacak olan *R. arrhizus* küf mantarının, en yüksek mikroorganizma derişiminin ve en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin elde edildiği üreme ortamının belirlenmesi ve bu ortamda çoğaltılan mikroorganizmanın biyodizel üretiminde kullanılmak üzere hazırlanması için glukozdan, bir şeker endüstrisi yan ürünü olan ve sakkaroz içeren melastan ve atık portakal kabuğundan hazırlanan üç farklı besin ortamında mikroorganizmanın üremesi ve lipaz üretimi çalışmaları 30 °C sıcaklıkta ve 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. 10 g/L glukoz içeren glukozlu besin ortamında, 2,5, 5 ve 10 g/L sakkaroz içeren melaslı besin ortamlarında ve 9,1, 12,1, 15,0, 18,0 ve 21,0 g/L TİŞ içeren atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamlarında gerçekleştirilen çalışmalarda inkübasyon süresi sonunda elde edilen en yüksek kuru hücre derişimleri ( $X_m$ ), substrata bağlı üreme verimleri ve hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi değerleri Çizelge 6.1.'de karşılaştırılmıştır. Çizelgeden her ne kadar mikroorganizmanın en yüksek verimde glukoz ve melas içeren besin ortamlarında ürediği gözlene de, atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamlarında en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi değerleri elde edildiği görülmektedir. Bu durum, atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamının mikroorganizmanın lipaz aktivitesini arttıracak alkali metaller gibi bileşenleri içermesiyle açıklanabilir. Biyodizel üretim çalışmalarında kullanılacak

*R. arrhizus*'un üretilmesi için, mikroorganizmanın en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi gösterdiği 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamı kullanılmıştır.

**Çizelge 6.1.** *R. arrhizus*'un farklı türde ve farklı derişimlerde şeker (substrat) içeren besin ortamlarında üretilmesinde elde edilen en yüksek kuru hücre derişimleri ( $X_m$ ), substrata bağlı üreme verimleri ve hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi değerlerinin karşılaştırılması.

Besin Ortamı	Derişimi (g/L)	Şeker Derişimi (g/L)	$X_m$ (g kuru m.o./L)	$Y_{x/s}$	Hücre İçi Lipaz Hidroliz Aktivitesi (U/mg)	
Glukoz	10	10	3,298	0,33	0,26	
Melas	5	Sakkaroz	2,5	1,153	0,46	0,20
	10		5	1,376	0,28	0,22
	20		10	1,517	0,15	0,25
Atık Portakal Kabuğu	30	Toplam İndirgen Şeker	9,1	2,228	0,25	0,29
	40		12,1	2,465	0,20	0,33
	50		15,0	2,753	0,18	0,40
	60		18,0	3,308	0,18	0,38
	70		21,0	3,832	0,18	0,33

Çalışmaların daha sonraki kısmında, mikroorganizmanın lipaz hidroliz aktivitesinin artırılması için 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına indükleyici olarak farklı derişimlerde zeytinyağı ve atık yemeklik yağ ilave edilmiş ve yağların mikroorganizmanın üremesine ve ürettiği hücre içi lipazın hidroliz aktivitesine etkileri araştırılmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge

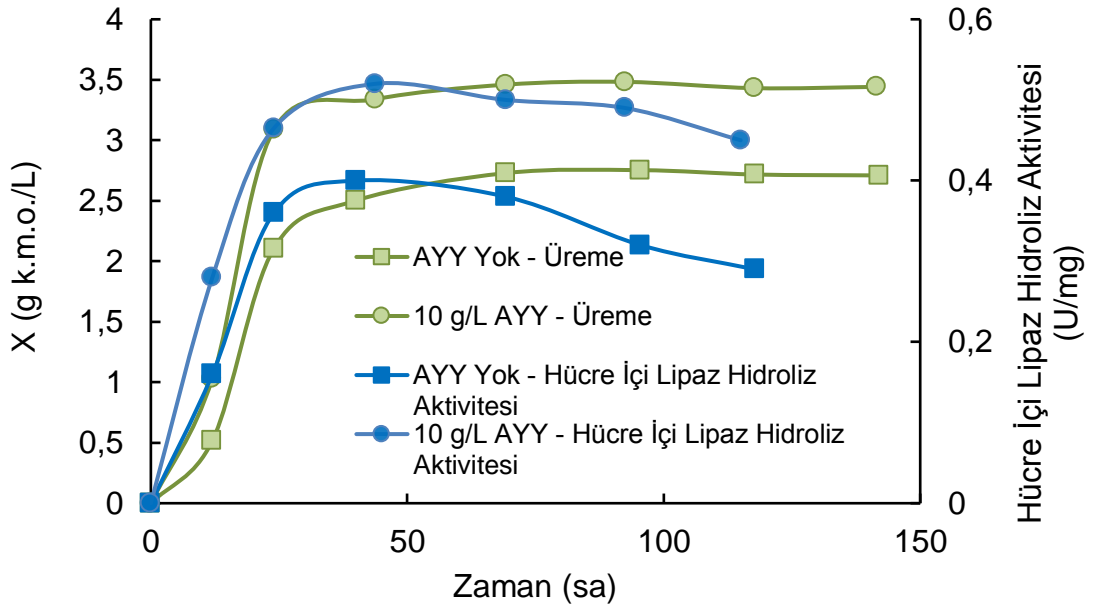
6.2.'de karşılaştırılmıştır. Çizelgeden besin ortamına AYY eklenmesinin ek bir maliyet girdisi olmaksızın mikroorganizmanın hem üremesini hem de hücre içi lipaz hidroliz aktivitesini arttırdığı, 10 g/L AYY derişiminde ise en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin elde edildiği görülmektedir. Biyodizel üretim çalışmalarında kullanılacak *R. arrhizus*'un üretilmesinde 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamına ayrıca 10 g/L AYY ilave edilmiştir.

**Çizelge 6.2.** *R. arrhizus*'un farklı derişimlerde zeytinyağı ve atık yemeklik yağ içeren 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamında üretilmesinde elde edilen en yüksek mikroorganizma derişimi ve hücre içi lipazın hidroliz aktivite değerlerinin karşılaştırılması.

İndükleyici	Derişimi (g/L)	$X_m$ (g kuru m.o./L)	Hücre İçi Lipaz Hidroliz Aktivitesi (U/mg)
Zeytinyağı	5	3,069	0,43
	10	3,221	0,44
	20	3,569	0,50
	30	3,448	0,48
	40	3,366	0,48
Atık Yemeklik Yağ	5	3,336	0,44
	10	3,483	0,52
	20	3,754	0,49
	30	4,117	0,48
	40	4,351	0,49

AYY içermeyen ve 10 g/L AYY içeren 50 g/L atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'a ait üreme ve mikroorganizmanın ürettiği

hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişim eğrileri Şekil 6.1.'de karşılaştırılmıştır. Şekilden besin ortamına AYY ilavesinin hem mikrobiyal üreme hızını, hem mikrobiyal biyokütleyi, hem de hücre içi lipaz hidroliz aktivitesini önemli derecede arttırdığı gözlenmektedir. Mikrobiyal üreme süresi sonunda AYY içermeyen besin ortamında özgül üreme hız sabiti  $0,393 \text{ sa}^{-1}$ , en yüksek mikroorganizma derişimi  $2,75 \text{ g/L}$ , en yüksek hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi  $0,40 \text{ U/mg}$  iken,  $10 \text{ g/L}$  AYY içeren besin ortamında bu değerler sırasıyla  $0,451 \text{ sa}^{-1}$ ,  $3,48 \text{ g/L}$  ve  $0,52 \text{ U/mg}$  olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, literatürde özellikle oleik asit veya zeytinyağının besin ortamına eklendiği *R. oryzae* vb. küf mantarlarıyla yapılan çoğu çalışmayla paralellik göstermektedir (Ban ve ark., 2001; Yoshida ve ark., 2012; Ghaderinezhad, Kariminia ve Yaghmaei, 2014).



**Şekil 6.1.** AYY içermeyen ve  $10 \text{ g/L}$  AYY içeren  $50 \text{ g/L}$  atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamlarında üretilen *R. arrhizus*'a ait üreme ve mikroorganizmanın ürettiği hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin zamana bağlı değişim eğrileri.

Tez çalışmasının ikinci kısmında ise kesikli sistemde biyodizel üretim çalışmaları gerçekleştirilmiş ve AYY'ın biyodizele dönüşümünü doğrudan etkileyen metanol/atık yağ molar oranı, karıştırma hızı, sıcaklık ve biyokatalizör miktarı parametrelerinin etkileri araştırılmıştır. Taguchi yöntemine göre tasarlanan deney sisteminde dört parametre ve üç seviye olmak üzere toplam dokuz adet biyodizel üretim deneyi 72 saat süresince gerçekleştirilmiş, elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm değerleri Design-Expert paket programı kullanılarak ANOVA ile analiz edilmiş, analiz sonucunda deney sistemini en iyi tanımlayan ve çalışılan tüm parametrelerin eş zamanlı etkilerini gösteren ikinci derece kuadratik polinom eşitliği bulunmuştur. Seçilen parametrelerin dönüşüm üzerine etkileri istatistiksel açıdan da değerlendirilmiş, üç boyutlu yüzey eğrileri elde edilmiştir. En uygun işletim parametrelerinin saptanması için aynı paket programındaki nümerik optimizasyon fonksiyonu kullanılarak optimizasyon yapılmış ve 4:1 metanol/atık yemeklik yağ molar oranında, 177 rpm karıştırma hızında, 33 °C 'ta ve 1,3 g katalizör miktarında AYY'ın biyodizele dönüşümü en yüksek %22,3 olarak elde edilmiştir.

Taguchi yöntemiyle tasarlanan deney sistemine göre yapılan dokuz adet deney içerisinde optimizasyon koşullarını en yakın karşılayan deneyler dikkate alınarak transesterifikasyon reaksiyonunun kinetik modellemesi yapılarak 25 ve 35 °C sıcaklıklarda reaksiyon hız sabitleri sırasıyla 0,0079 ve 0,0149 (mol/L)<sup>-2</sup>sa<sup>-1</sup>, aktivasyon enerjisi 48,42 kJ/mol ve frekans faktörü 2,43x10<sup>6</sup> (mol/L)<sup>-2</sup>sa<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar literatürde yer alan enzimatik transesterifikasyon yöntemiyle biyodizel üretim sonuçlarıyla Çizelge 6.3.'de karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, kesikli sistemde veya dolgulu kolon reaktörde gerçekleştirilen enzimatik transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanılan mikroorganizmalar, ürettikleri lipaz enzimlerinin kullanım şekilleri (serbest, immobilize), tepkiyen olarak kullanılan yağ cinsleri ve açıl akseptörler, reaksiyon koşulları ve elde edilen % biyodizel verimleri cinsinden karşılaştırılmıştır. Çizelgeden mikroorganizma türüne, lipaz enziminin kullanım şekline, yağın

cinsine, açıl akseptör çeşidine ve reaksiyon koşullarına göre farklı biyodizel üretim verimleri elde edildiği görülmektedir. Literatürle karşılaştırıldığında; tez çalışmasında optimum koşullarda elde edilen AYY'ın biyodizele dönüşüm %'sinin düşük seviyede olması, mikroorganizmanın lipaz hidroliz aktivitesinin yüksek olmaması, kullanılan yağın cinsi, metanolün lipaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi gibi nedenlerle açıklanabilir.

**Çizelge 6.3.** Tez çalışmasında elde edilen sonuçların literatürde yer alan enzimatik transesterifikasyon yöntemiyle biyodizel üretim sonuçlarıyla karşılaştırılması.

Mikroorganizma Adı	Lipazın Kullanım Şekli	Yağın Cinsi	Açıl-Akseptör	Reaksiyon Koşulları	Biyodizel Verimi (%)	Referans
<i>Rhizopus oryzae</i>	İmmobilize tüm hücre	Jatrofa yağı	Metanol	Metil alkol/yağ molar oranı 3:1, 30 °C, 60 sa	80	Tamalampudi ve ark, 2008
<i>Mucor miehei</i>	İmmobilize enzim	Ayçiçek yağı	Etanol	Metil alkol/yağ molar oranı 3:1, 30 °C, 5 sa	83	Selmi ve Thomas, 1998
<i>Candida antarctica</i>	İmmobilize enzim	Soya yağı	Metil asetat	Metil alkol/yağ molar oranı 12:1, 40 °C, 150 rpm, 14 sa	92	Du ve ark, 2004
<i>Pseudomonas fluoresces</i>	İmmobilize enzim	Ayçiçek yağı	Iso-bütanol	Metil alkol/yağ molar oranı 3:1, 40 °C, 24 sa	45	Deng ve ark, 2005
<i>Pseudomonas cepacia</i>	İmmobilize enzim	Jatrofa yağı	Etanol	Metil alkol/yağ molar oranı 4:1, 50 °C, 200 rpm, 8 sa	98	Shah ve Gupta, 2007
<i>Rhizopus oryzae</i>	Serbest tüm hücre	Atık kızartmalık yağ	Metanol	Metil alkol/yağ molar oranı 4,7:1, 45 °C, 160 rpm, 72 sa, 1 g biyokatalizör	83	Ghaderinezhad Kariminia ve Yaghmaei, 2014
<i>Rhizopus chinensis</i>	Tüm hücre	Soya yağı	Metanol	Metil alkol/yağ molar oranı 3:1, 30 °C, 72 sa	86	Qin ve ark, 2008



<i>Chromabacterium viscosum</i>	Serbest enzim	Jatrofa yağı	Etanol	Metil alkol/yağ molar oranı 4:1, 40 °C, 200 rpm, 8 sa	73	Shah ve ark, 2004
<i>Rhizopus oryzae</i>	İmmobilize tüm hücre	Pamuk tohumu yağı	Metanol	Metil alkol/yağ molar oranı 3:1, 35 °C, 150 rpm, 36 sa	28	Athalye ve ark, 2013
<i>Rhizopus oryzae</i>	İmmobilize tüm hücre, dolgulu kolon	Soya yağı	Metanol	Metil alkol/yağ molar oranı 4:1, 25 °C, 50 sa	91	Hama ve ark, 2007
<i>Thermomyces lanuginose</i>	İmmobilize enzim	AYY	Metanol	Metil alkol/yağ molar oranı 6:1, 65 °C, 5 sa	56	Avljas ve Nappi, 2009
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Serbest tüm hücre	AYY	Metanol	Metil alkol/yağ molar oranı 4:1, 33 °C, 177 rpm, 72 sa, 1,3 g. biyokatalizör	22,3 (*)	-

(\*) AYY'ın ağırlıkça biyodizele dönüşüm %'si

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de ve dünyada ilk defa *R. arrhizus* küf mantarının atık portakal kabuğundan hazırlanan ve hiçbir ilave besin bileşeni içermeyen besin ortamında üremesi sağlanmış ve hücre içi lipaz içeren bu biyokütleyle atık yemeklik yağdan metanol varlığında biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmayla, başka prosesler sonucu açığa çıkan atıkların (portakal kabuğu, atık yemeklik yağ gibi) değerlendirilerek üretime kazandırılması ve böylelikle hem ekonomik açıdan avantaj sağlanması hem de doğal kaynakların kullanımının en aza indirgenmesi hedeflenmiştir. Ancak, AYY'ın biyodizele dönüşümünün %20-22 civarlarında düşük değerde olması, biyodizel veriminin artırılması için prosesin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu amaçla öncelikle lipaz hidroliz aktivitesi daha yüksek olan mikroorganizma türlerinin kullanımı, transesterifikasyon reaksiyonunda açıl akseptör olarak kullanılan metil alkol yerine, alternatif açıl akseptörlerin (etil alkol, metil asetat vb.) kullanımı veya metanolün yağdaki çözünürlüğünü artırarak metanolün lipaz inhibisyonunu önleyecek çözücülerin (tert-bütanol, n-heptan vb.) tepkime ortamına eklenmesi gibi yöntemler önerilebilir. Ayrıca; kesikli sistem yerine dolgulu kolon reaktör

kullanılarak reaktör işletim koşulları değiştirilebilir. Literatür çalışmaları farklı destek materyallerin (yüksek poroziteli mikron seviyesinde por boyutuna sahip kübik poliüretanlar gibi) küf mantarlarının üreme ortamına eklenerek, mikroorganizmanın bu destek materyalleri üzerinde üretilmesiyle poliüretan yüzeylerine yakın yerlerde üreyen mikroorganizma sporlarının hücre yüzeylerindeki lipaz miktarının arttırılmasına bağlı olarak hem hücre içi lipaz hidroliz aktivitesinin hem de biyodizel veriminin arttığını göstermiştir. Dolayısıyla, deney sisteminin bu şekilde tasarlanması da biyodizel verimini arttırabilir. (Ogino ve Amoah, 2019).

## KAYNAKLAR

Abbaszaadeh, A., Ghobadian, B., Omidkhah, M.R., Najafi, G., Current Biodiesel Production Technologies: A Comparative Review, Energy Conversion and Management, 63 (2012) 138-148.

Aguieiras, E.C.G., Cavalcanti-Oliveira, E.D., Freire, D.M.G., Current Status and New Developments of Biodiesel Production Using Fungal Lipases, Fuel, 159 (2015) 52-67.

Ahmad, A.L., Mat Yasin, N.H., Derek, C.J.C. and Lim, J.K., Microalgae As A Sustainable Energy Source for Biodiesel Production: A Review, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15 (1) (2011) 584-593.

Ahmad, M., Rashid, S., Ajab, A.K., Zafar, M., Sultana, S., Gulzar, S., Optimization of Base Catalyzed Transesterification of Peanut Oil Biodiesel, African Journal Biotechnology, 8 (3) (2009) 441-446.

Ahmad, R., Sardar, M., Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix, Biochemistry&Analytical Biochemistry, 4 (178) (2015) 1-8.

Aksu, Z., Atıksulardaki Ağır Metal İyonlarının Yeşil Alglerden *Chlorella vulgaris*'e Adsorpsiyonunun Kesikli Düzendeki Karıştırılabilir ve Akışkan Yatak Tepkime Kaplarında İncelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1988.

Aleman, J.V., Gilbert, R.G., Hess, M., Horie, K., Jones, R.G., Kubisa, P., Meisel, I., Mormann, W., Penczek, S., Slomkowski, S., Stepto, R.F.T., Terminology of Polymers and Polymerization Processes in Dispersed Systems (IUPAC Recommendations 2011), Pure and Applied Chemistry, 83 (12) (2011) 2229-2259.

Andreani, L., Rocha, J.D., Use of Ionic Liquids in Biodiesel Production: A Review, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 29 (1) (2012) 1-13.

Anonim, <http://www.biyolojiportali.com/konu-anlatimi/2/31/Enzimler-Canlilarin-Yapisinda-Bulunan-Organik-Bilesikler-4> (Erişim tarihi: 20 Ağustos 2018).

Anonim, <http://www.yegm.gov.tr/yenilenebilir/biyoetanol.aspx> (Erişim tarihi: 15 Nisan 2019).

Ansari, S.A., Husain, Q., Potential Applications of Enzymes Immobilized on/in Nano Materials: A Review, *Biotechnology Advances*, 30 (3) **(2012)** 512-523.

Atadashi, I.M., Aroua, M.K., Abdul Aziz, A.R., Sulaiman, N.M.N., The Effects of Catalysts in Biodiesel Production: A Review, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19 (1) **(2013)** 14-26.

Athalye, S., Sharma-Shivappa, S., Peretti, S., Kolar, P., Davis, J.P., Producing Biodiesel from Cottonseed Oil Using *Rhizopus oryzae* ATCC #34612 Whole Cell Biocatalysts: Culture Media and Cultivation Period Optimization, *Energy for Sustainable Development*, 17 (4) **(2013)** 331-336.

Avlijas, N. and Nappi, F., Collection of Used Vegetable Oil: Experiences Around Europe, In:1st Biosire International Workshop, September 14th, Heraklion, Crete, **2009**.

Ban, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., Fukuda, H., Whole Cell Biocatalyst for Biodiesel Fuel Production Utilizing *Rhizopus oryzae* Cells Immobilized within Biomass Support Particles, *Biochemical Engineering Journal*, 8 (1) **(2001)** 39-43.

Bana, K., Hama, S.H., Nishizuka, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., Nodad, H., Fukuda, H., Repeated Use of Whole-Cell Biocatalysts Immobilized within Biomass Support Particles for Biodiesel Fuel Production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17 (3-5) **(2002)**157-165.

Banerjee, A., Chakraborty, R., Parametric Sensitivity in Transesterification of Waste Cooking Oil for Biodiesel Production-A Review Resources, Conservation and Recycling, 53 (9) **(2009)** 490-497.

Baynal, K., Çok Yanıtlı Problemlerin Taguchi Yöntemi ile Eniyilemesi ve Bir Uygulama, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, İstanbul, **2003**.

Bilgin, A., Durgun, O., Sahin, Z., The Effects of Diesel-Ethanol Blends on Diesel Engine Performance, *Energy Source*, 24 (5) **(2002)** 431-440.

Biol, F., *World Energy Outlook 2014*, Rotterdam: International Energy Agency, IEA, **2014**.

Borges, M.E., Diaz, L., Recent Developments on Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production by Oil Esterification and Transesterification Reactions: A Review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*,16 (5) **(2012)** 2839-2849.

Bostancı, O., Yemek Atığından Anaerobik Membran Biyoreaktör ile Biyohidrojen Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2014**.

Bournay, L., Casanave, D., Delfort, B., Hillion, G., Chodorge, J.A., New Heterogeneous Process for Biodiesel Production: A Way to Improve The Quality and The Value of The Crude Glycerin Produced by Biodiesel Plants, *Catalysis Today*, 106 (1-4) (**2005**) 190-192.

Bruwer, J.J., Boshoff, B.D., Hugo, F.J.C., Duplessis, L.M., Fuls, J., Hawkins, C., Vanderwalt, A.N., Engelbert, A., The Utilization of Sunflower Seed Oil as Renewable Fuel Diesel Engines, In: *Agricultural Energy*, Joseph, S.I., M.I. (Eds), Vol. 2, ASAE Publication, 4-81, **1981**.

Byrne, G.S., Ward, O.P., Growth of *Rhizopus arrhizus* in Fermentation Media, *Journal of Industrial Microbiology*, 4 (2) (**1989**)155-161.

Campanelli, P., Banchemo, M., Manna, L., Synthesis of Biodiesel from Edible, Non-Edible and Waste Cooking Oils via Supercritical Methyl Acetate Transesterification, *Fuel*, 89 (12) (**2010**) 3675-3682.

Canakci, M., Van Gerpen, J.H., A Pilot Plant to Produce Biodiesel from High Free Fatty Acid Feedstocks, ASAE Annual International Meeting, July 30-August 1, Sacramento, California, USA, **2001**.

Carraretto, C., Macor, A., Mirandola, A. Stoppato, A. and Tonon, S., Biodiesel as Alternative Fuel: Experimental Analysis and Energetic Evaluations, *Energy*, 29 (12-15) (**2004**) 2195-2211.

Cervero, J.M., Coca, J., and Luque, S., Production of Biodiesel from Vegetable Oils, *Grasas Y Aceites*, 59 (1) (**2008**) 76-83.

Chaturvedi, S., Dave, P.N., Shah, N.K., Applications of Nano-Catalyst in New Era, *Journal of Saudi Chemical Society*, 16 (**2012**) 307-325.

Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P., Wang, X., Synthesis of Biodiesel from Waste Cooking Oil Using Immobilized Lipase in Fixed Bed Reactor, *Energy Conversion and Management*, 50 (3) (**2009**) 668-673.

Chiaramonti, D., Bonini, M., Fratini, E., Tondi, G., Development of Emulsions from Biomass Pyrolysis Liquid and Diesel and Their Use in Engines-Part 1: Emulsion Production, *Biomass and Bioenergy*, 25 (1) (**2003**) 85-99.

Çağatay, Ş., Tekstil Endüstrisi Atıksularında Renk Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2003**.

Çiçek, A., Kivak, T., Samtaş, G., Application of Taguchi Method for Surface Roughness and Roundness Error in Drilling of AISI 316 Stainless Steel, *Strojnicki Vestnik-Journal of Mechanical Engineering*, 58 (3) **(2012)** 165-174.

Demirbaş, A., Progress and Recend Trends in Biodiesel Fuels, *Energy Conversion and Management*, 50 (1) **(2009a)** 14-34.

Demirbaş, A., Biodiesel from Waste Cooking Oil Via Base–Catalytic and Supercritical Methanol Transesterification, *Energy Conversion and Management*, 50 (4) **(2009b)** 923-927.

Deng, L., Xu, X.B., Haraldsson, G.G., Tan, T.W. and Wang, F., Enzymatic Production of Alkyl Esters Through Alcoholysis: A Critical Evaluation of Lipases and Alcohols, *Journal of the American Oil Chemist Society*, 82 **(2005)** 341-347.

Devanesan, M., Viruthagiri, T., Sugumar, N., Transesterification of Jatropha Oil Using Immobilized *Pseudomonas fluorescens*, *African Journal of Biotechnology*, 6 (21) **(2007)** 2497-2501.

Dias, J.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Almeida, M.F., Comparison of The Performance of Different Homogeneous Alkali Catalysts During Transesterification of Waste and Virgin Oils and Evaluation of Biodiesel Quality, *Fuel*, 87 (17-18) **(2008)** 3572-3578.

Dizge, N., Aydın, C., İmer, D.Y., Bayramoğlu, M., Tanrıseven, A., Keskinler, B., Biodiesel Production from Sunflower, Soybean and Waste Cooking Oils by Transesterification Using Lipase Immobilized onto A Novel Microporous Polymer, *Bioresource Technology*, 100 (6) **(2009)**1983-1991.

Dobreva, G., Zhekova, B., Nedelcheva, P., Chochkov, R., Krastanov, A., Characterization of Crude Lipase from *Rhizopus arrhizus* and Purification of Multiplicity Forms of the Enzyme, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25 (1) **(2011)** 2295-2300.

Du, W., Xu, Y., Liu, D., Zeng, J., Comperative Study on Lipase-Catalyzed Transformation of Soybean Oil for Biodiesel Production with Different Acyl Acceptors, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30 (3-4) **(2004)**125-129.

Dube, M.A., Zheng, S., Mclean, D.D., and Kates, M., A Comparison of Attenuated Total Reflectance-FTIR Spectroscopy and GPC for Monitoring Biodiesel Production, *Journal of the American Oil Chemist Society*, 81 (6) **(2004)** 599-603.

Dupont, J., Suarez, P.A.Z., Meneghetti, M.R., Meneghetti, S.M.P., Catalytic Production of Biodiesel and Diesel-Like Hydrocarbons from Triglycerids, *Energy & Environmental Science*, 2 (12) **(2009)** 1258-1265.

Earle, M.J., Plechkova, N.V., Seddon, K.R., Green Synthesis of Biodiesel Using Ionic Liquids, *Pure and Applied Chemistry*, 81 (11) **(2009)** 2045-2057.

Elibol, M., Özer, D., Lipase Production by Immobilised *Rhizopus arrhizus*, *Process Biochemistry*, 36 (3) **(2000)** 219-223.

Fazal, M., Haseeb, A., Masjuki, H., Biodiesel Feasibility Study: An Evaluation of Material Compatibility; Performance; Emission and Engine Durability, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (2) **(2011)** 1314-1324.

Felizardo Neiva, C.M., Raposo, I., Mendes, J.F., Berkemeier, R., and Bordado, J.M., Production of Biodiesel from Waste Frying Oil, *Waste Management*, 26 (5) **(2006)** 487-494.

Forouchi, E., Gunn, D.J., Some Effects on Metal Ions on The Estimation of Reducing Sugars in Biological Media, *Biotechnology & Bioengineering*, 25 (7) **(1983)** 1905-1911.

French, R., Czernik, S., Catalytic Pyrolysis of Biomass for Biofuels Production, *Fuel Process Technology*, 91 (1) **(2010)** 25-32.

Froment, G.F., Bischoff, K.B., *Chemical Reactor Analysis and Design*, Second Edition, Wiley:New York, **1990**.

Fukuda, H., Kond, A., Noda, H., Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils: A Review, *Bioscience Bioengineering*, 92 (5) **(2001)** 405-416.

Fukuda, H., Hama, S., Tamalampudi, S., Noda, H., Whole-cell Biocatalysts for Biodiesel Fuel Production, *Trends in Biotechnology*, 26 (12) **(2008)** 668-673.

Furuta, S., Matsushashi, H., Arata, K., Biodiesel Fuel Production with Solid Amorphous-Zirconia Catalysis in Fixed Bed Reactor, *Biomass Bioenergy*, 30 (10) **(2006)** 870-873.

Gamba, M., Lapis, A.A., Dupont, J., Supported Ionic Liquid Enzymatic Catalysis for The Production of Biodiesel, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 350 (1) **(2008)** 160-164.

Gebremariam, S.N., Marchetti, J.M., Biodiesel Production Technologies: Review, *AIMS Energy*, 5 (3) **(2017)** 425-457.

Genovefa, Z., Wenzig, E., Mersmann, A., Improvement of Lipase Production by Addition of Catalase During Fermentation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40 (5) **(1994)** 650-652.

Gerard, S., Byrne B.A., Growth and Production of Lipase by *Rhizopus arrhizus* in Submerged Culture, Doctoral Dissertation, National Institute for Higher Education, School of Biological Sciences, Dublin 9, **1985**.

Gerpen, V.J., Shanks, B., Pruszko, R., Clements, D., Knothe, G., Biodiesel Analytical Methods, National Renewable Energy Laboratory, August 2002-January 2004, Colorado, **2004**.

Ghaderinezhad, F., Kariminia, H.R., Yaghmaei, S., Production of Biodiesel from Waste Frying Oil Using Whole Cell Biocatalysts: Optimization of Effective Factors, *Waste Biomass Valor*, 5 (6) **(2014)** 947-954.

Ghaly, A.E., Dave, D., Brooks, M.S. and Budge, S., Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6 (2) **(2010)** 54-76.

Giuseppin, MLF., Effects of Dissolved Oxygen Concentration on Lipase Production by *Rhizopus delemar*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20 (3) **(1984)** 161-165.

Goering, C.E., Schwab, A.W., Daugherty, M.J., Pryde, E.H., Heakin, A.J., Fuel Properties of Elven Vegetable Oils, *Transactions of The ASAE*, 25 (6) **(1982)** 1472-1483.

Gui, M.M., Lee, K.T., Bhatia, S., Feasibility of Edible Oil vs. Non-Edible Oil vs. Waste Edible Oil As Biodiesel Feedstock, *Energy*, 33 (11) **(2008)** 1646-1653.

Gupta, J., Agarwal, M., Preparation and Characterization of CaO Nano Particle for Biodiesel Production, 2nd International Conference on Emerging Technologies, Jaipur, 302017, India: American Institute of Physics, **2016**.

Gül, U.D., Fungal Lipazlar ve Endüstride Kullanım Alanları, *AKU Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 13 (1) **(2013)** 1-8.

Haas, M.J., Mc Aloon, A.J., Yee, W.C., Foglia, T.A., A Process Model to Estimate Biodiesel Production Costs, *Bioresource Technology*, 97 (4) **(2006)** 671-678.

Halim, S.F.A., Kamaruddin, A.H., and Fernando, W.J.N., Continuous Biosynthesis of Biodiesel from Waste Cooking Palm Oil in A Packed Bed Reactor:



Optimization Using Response Surface Methodology (RSM) and Mass Transfer Studies, *Bioresource Technology*, 100 (2) **(2009)** 710-716.

Hama, S., Yamaji, H., Kaieda, M., Oda, M., Kondo, A., Fukuda, H., Effect of Fatty Acid Membrane Composition on Whole-Cell Biocatalysts for Biodiesel-Fuel Production, *Biochemical Engineering Journal*, 2 (1) **(2004)** 55-60.

Hama, S., Tamalampudi, S., Fukumizu, T., Miura, K., Yamaji, H., Kondo, A., Fukuda, H., Lipase Localization in *Rhizopus oryzae* Cells Immobilized within Biomass Support Particles for Use as Whole-Cell Biocatalysts in Biodiesel-Fuel Production, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (4) **(2006)** 328-333.

Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, T., Numata, T., Tamalampudi, S., Kondo, A., Noda, H., Fukuda, H., Biodiesel-Fuel Production in A Packed-Bed Reactor Using Lipase-Producing *Rhizopus oryzae* Cells Immobilized within Biomass Support Particles, *Biochemical Engineering Journal*, 34 (3) **(2007)** 273-278.

Hashmi, S., Gohar, S., Mahmood, T., Nawaz, U., Farooqi, H., Biodiesel Production by Using CaO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nano Catalyst, *International Journal of Engineering Research&Science*, 2 (3) **(2016)** 43-49.

Higginbotham, J.D., McCarthy, J., Quality and Storage of Molasses, In *Sugar Technology-Beet and Cane Manufacture*, Van Der Poel, P.W., Schiweck, H., Schawartz, T., Bartens, A. (Eds), Berlin, **1998**.

IEA, *Biofuels for Transport: An International Perspective*, IEA/EET, Paris, **2004**.

IEA, *Medium Term Renewable Energy Market Report, Executive Summary: Market Analysis and Forecasts to 2020*, Paris, **2015**.

Jacobson, K., Gopinath, R., Meher, L.C., and Dalai, A.K., Solid Acid Catalyzed Biodiesel Production from Waste Cooking Oil, *Applied Catalysis B: Environmental*, 85 (1) **(2008)** 86-91.

Jagadele, S.S.J.L.M., Review of Various Reaction Parameters and Other Factors Affecting on Production of Chicken Fat Based Biodiesel, *IJMER*, 2 (2) **(2012)** 407-411.

Janaun, J., Ellis, N., Perspectives on Biodiesel as a Sustainable Fuel, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (4) **(2010)** 1312-1320.

Jin, G., Bierma, T.J., Whole-Cell Biocatalysts for Producing Biodiesel from Waste Greases, *ISTC Reports*, Illinois State University Normal, Illinois, **2010**.

Joshi, R.M., Pegg, M.J., Flow Properties of Biodiesel Fuel Blends at Low Temperatures, *Fuel*, 86 (1-2) **(2007)** 143-151.

Kafuku, G., Mbrawa, M., Biodiesel Production from Croton Megalocarpus Oil and Its Process Optimization, *Fuel*, 89 (9) **(2010)** 2556-2560.

Kargı, F., Çevre Mühendisliğinde Biyoprosesler, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, **1993**.

Kiss, F.E., Micic, R.D., Tomic, M., Nikolic-Djoric, E.B., Supercritical Transesterification: Impact of Different Types of Alcohol on Biodiesel Yield and LCA Results, *The Journal of Supercritical Fluids*, 86 **(2014)** 23-32.

Kodal, S.P., Narenciye Atıklarından Gıda Katkı Maddesi Üretiminin Mikrobiyal Üretim ile Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2016**.

Koh, M.Y., Ghazi T.I., A Review of Biodiesel Production from *Jatropha Curcas L.* Oil, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (5) **(2011)** 2240-2251.

Körbahti, B.K. and Rauf, M.A., Response Surface Methodology (RSM) Analysis of Photoinduced Decoloration of Toludine Blue, *Chemical Engineering Journal*, 136 (1) **(2008)** 25-30.

Kulkarni, M.G., Dalai, A.K., Waste Cooking Oil-An Economical Source for Biodiesel: A Review, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45 (9) **(2006)** 2901-2913.

Kumar, R. S., Sureshkumar, K., Velraj, R., Optimization of Biodiesel Production from Manilkara Zapota (L.) Seed Oil Using Taguchi Method, *Fuel*, 140 **(2015)** 90-96.

Lam, M.K., Lee, K.T., Mohamed, A.R., Homogeneous, Heterogeneous and Enzymatic Catalysis for Transesterification of High Free Fatty Acid Oil (Waste Cooking Oil) to Biodiesel: A Review, *Biotechnology Advances*, 28 (4) **(2010)** 500-518.

Lapuerta, M., Fernández, J.R., Mora, E.F., Correlation for The Estimation of The Cetane Number of Biodiesel Fuels and Implications on The Iodine Number, *Energy Policy*, 37 (11) **(2009)** 4337-4344.

Leung, D.Y., Wu, X., Leung, M., A Review on Biodiesel Production Using Catalyzed Transesterification, *Applied Energy*, 87 (4) **(2010)** 1083-1095.

Li, L., Du, W., Liu, D., Wang, L., Li, Z., Lipase-Catalyzed Transesterification of Rapeseed Oils for Biodiesel Production with A Novel Organic Solvent As The Reaction Medium, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43 (1-4) **(2006)** 58-62.

Li, W., Du, W., Liu, D., Yao, Y., Study on Factors Influencing Stability of Whole Cell During Biodiesel Production in Solvent-Free and Tert-Butanol System, *Journal of Biochemical Engineering*, 41 (2) **(2008)** 111-115.

Liu, S., *Bioprocess Engineering Kinetics, Sustainability and Reactor Design*, Marinakis, K. (Ed), Elsevier, India, **2017**.

Lokanatham, R., Rovindranath, K., Extraction and Use of Non-Edible Oils in Bio-Diesel Preparation with Performance and Emission Analysis on C.I. Engine, *International Journal of Engineering Research and Development*, 6 (5) **(2013)** 35-45.

Ma, F., Hanna, M.A., Biodiesel Production: A Review, *Bioresource Technology*, 70 (1) **(1999)** 1-15.

Mahanta, P., Shrivastava, A., Technology Development of Bio-Diesel As An Energy Alternative, In *Challenges Strategies for Sustainable Energy Deficiency and Environment*, New Delhi: New Age International (P) Ltd., **2011**.

Marchetti, J.M., Miguel, V.U., Errazu, A.F., Techno-Economic Study of Different Alternatives for Biodiesel Production, *Fuel Process Technology*, 89 (8) **(2008)** 740-748.

Martin, M., Grossmann, I.E., Simultaneous Optimization and Heat Integration for Biodiesel Production from Cooking Oil and Algae, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51 (23) **(2012)** 7998-8014.

Marul, B., Fabrika Atıklarından İzole Edilen *Bacillus* sp.'den Aktif ve Kararlı Lipaz Üretim Koşullarının ve Üretilen Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanımının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, **2007**.

Meher, L., Sagar, D.V., Naik, S., Technical Aspects of Biodiesel Production by Transesterification-A Review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10 (3) **(2006)** 248-268.

- Meng, X., Chen, G. and Wang, Y., Biodiesel Production from Waste Cooking Oil via Alkali Catalyst and Its Engine Test, *Fuel Processing Technology*, 89 (9) **(2008)** 851-857.
- Mu, Y., Xiu, Z., Zhang, D., A Combined Bioprocess of Biodiesel Production by Lipase with Microbial Production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumonia*, *Biochemical Engineering*, 40 (3) **(2008)** 537-541.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, USA: John Wiley & Sons, **2000**.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F., Tan, T., Lipase Catalyzed Methanolysis to Produce Biodiesel: Optimization of The Biodiesel Production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43 (1-4) **(2006)** 142-147.
- Ogino, C., Amoah, J., *Energy Production: Biodiesel*, Ueda, M. (Ed), *Yeast Cell Surface Engineering*, Springer Nature Singapore Pte Ltd, Chapter 4, **2019**.
- Oliveira, J.S., Montalvao, R., Daher, L., Suarez, P.A. and Rubim, J.C., Determination of Methyl Ester Contents in Biodiesel Blends by FTIR-ATR and FTNIR Spectroscopies, *Talanta*, 69 (5) **(2006)** 1278-1284.
- Öztürk, İ., *Anaerobik Biyoteknoloji ve Atık Arıtımındaki Uygulamaları*, Su Vakfı Yayınları, İstanbul, **1999**.
- Öztürk, B., *Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları*, TMMOB Gıda Mühendisliği Dergisi, 12 Haziran **(2002)** 20-23.
- Öztürk, M., *Bitkisel ve Hayvansal Atık Yağlardan Biyodizel Üretimi*, Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Ankara, **2018**.
- Pairiawi, W., Biodiesel Production from *Jatropha Curcas*: A Review, *Scientific Research and Essays*, 5 **(2010)** 1796-1808.
- Pandian, S., Sankaranarayanan, S., Renganathan, S., Sivakumar, P., Studies on Sono-Chemical Biodiesel Production Using Smoke Deposited Nano MgO Catalyst, *Bulletin of Chemical Reaction Engineering&Catalysis*, 8 (2) **(2013)** 89-96.
- Park, J.Y., Wang, Z.M., Kim, D.K., Lee, J.S., Effects of Water on The Esterification of Free Fatty Acids by Acid Catalysts, *Renewable Energy*, 35 (3) **(2010)** 614-618.

- Pazouki, M., Zamani, F., Zamzamian, A.H., Fahar, M., Najafpour, G.H., Esterification of Free Fatty Acids by *Rhizopus oryzae* as Cell-Catalyzed from Used Cooking Oil for Biodiesel Production, *World Applied Sciences Journal*, 8 (16) **(2010)** 719-724.
- Pekin, B., *Biyokimya Mühendisliği*, Ege Üniversitesi Kimya Fakültesi Yayınları 4, **1983**.
- Peng, B., Shu, Q., Wang, J.F., Wang, G.R., Biodiesel Production from Waste Oil Feedstocks by Solid Acid Catalysis, *Process Safety and Environmental Protection*, 86 (6) **(2008)** 441-447.
- Phan, A.N., and Phan, T.M., Biodiesel Production from Waste Cooking Oils, *Fuel*, 87 (17) **(2008)** 3490–3496.
- Pogori, N., Xu, Y., Cheikhyoussef, A., Potential Aspects of Lipases Obtained from *Rhizopus* Fungi, *Research Journal of Microbiology*, 2 (2) **(2007)** 101-116.
- Qin, H., Yan, X., Yun, T., Dong, W., Biodiesel Production Catalyzed by Whole-Cell Lipase from *Rhizopus chinensis*, *Chinese Journal of Catalysis*, 29 (1) **(2008)** 41-46.
- Ramadhas, A.S., Jayaraj, S., Muraleedharan, C., Use of Vegetable Oils As I.C. Engine Fuels-A Review, *Renewable Energy*, 29 (5) **(2004)** 727-742.
- Ranganathan, S.V., Narasimhan, S.L., Muthukumar, K., An Overview of Enzymatic Production of Biodiesel, *Bioresource Technology*, 99 (10) **(2008)** 3975-3981.
- Ren, Q., Zuo, T., Pan, J., Chen, C., Li, W., Preparation of Biodiesel from Soybean Catalyzed by Basic Ionic Liquids [Hnmm]OH, *Materials*, 7 **(2014)** 8012-8023.
- Salum, T.H.F.C.H., Villeneuve, P., Barea, B., Yamamoto, C.I., Coccoc, L.C., Mitchell, D.A., Krieger, N., Synthesis of Biodiesel in Column Fixed-Bed Bioreactor Using The Fermented Solid Produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11, *Process Biochemistry*, 45 (8) **(2010)** 1348-1354.
- Satyanarayana, M., Muraleedharan, C., A Comparative Study of Vegetable Oil Methyl Esters (Biodiesels), *Energy*, 36 (4) **(2011)** 2129-2137.
- Schwab, A., Bagby, M., Freedman, B., Preparation and Properties of Diesel Fuels from Vegetable Oils, *Fuel*, 66 (10) **(1987)** 1372-1378.

Selmi, B. and Thomas, D., Immobilized Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Sunflower Oil In A Solvent-Free Medium, *Journal of The American Oil Chemists' Society*, 75 (6) **(1998)** 691-695.

Shafiee, S., Topal, E., When Will Fossil Fuel Reserves Be Diminished?, *Energy Policy*, 37 (1) **(2009)** 181-189.

Shah, S., Sharma, S., Gupta, M.N., Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of Jatropha Oil, *Energy&Fuels*, 18 (1) **(2004)** 154-159.

Shah, S. and Gupta, M.N., Lipase Catalyzed Preparation of Biodiesel from Jatropha Oil In A Solvent Free System, *Process Biochemistry*, 42 **(2007)** 409-414.

Shahid, E.M., Jamal, Y., Production of Biodiesel: A Technical Review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (9) **(2011)** 4732-4745.

Sharma, N., Ojha, H., Bharadwaj, A., Pathak, D.P., Sharma, R.K., Preparation and Catalytic Applications of Nanomaterials: A Review, *RSC Advances*, 5 (66) **(2015)** 53381-53403.

Siatis, N. G., Kimbaris, C. S., Tarantilis, P. A. and Polissiou, M. G., Improvement of Biodiesel Production Based on The Application of Ultrasound: Monitoring of The Procedure by FTIR Spectroscopy, *Journal of The American Oil Chemists' Society*, 83 (1) **(2006)** 53–57.

Silitonga, A.S., Atabani, A.I., Mahlia, T.M.I., Masjuki, H.H., Badruddin, I.A., Mekhilef, S., A Review on Prospect of Jatropha Curcas for Biodiesel in Indonesia, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (8) **(2011)** 3733-3756.

Singh, S.P., Singh, D., Biodiesel Production Through The Use of Different Sources and Characterization of Oils and Their Esters As The Substitute of Diesel: A Review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (1) **(2010)** 200-216.

Soares, I.P., Rezende, T.F., Silva, R.C., Castro, E.V.R and Fortes, I.C.P., Multivariate Calibration by Variable Selection for Blends of Raw Soybean Oil/Biodiesel from Different Sources Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Spectra Data, *Energy Fuels*, 22 (3) **(2008)** 2079-2083.

Soriano, N.U., Migo, V.P., Sato, K., Matsumura, M., Crystallization Behavior of Neat Biodiesel and Biodiesel Treated with Ozonized Vegetable Oil, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107 (9) **(2005)** 689-696.

Sun, T., Du, W., Liu, D., Dai, L., Improved Catalytic Performance of GA Cross-Linking Treated *Rhizopus oryzae* IFO4697, Whole-Cell for Biodiesel Production, *Process Biochem.*, 45 (7) **(2010)** 1192-1195.

Şener, A., Emir Üzümünün Şaraba İşlenmesinde Sıcaklığın ve Maya Suşunun Etil Alkol Fermantasyonu Kinetiğine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2005**.

Şirvancı, M., Kalite İçin Deney Tasarımı: Taguchi Yaklaşımı, Literatür Yayınları, İstanbul, **1997**.

Taguchi, G., Konishi, S., Taguchi Methods, Orthogonal Arrays and Linear Graphs: Tools for Quality Engineering, American Supplier Institute, Dearborn, MI, **1987**.

Talebian-Kiakalaieh, A., Amin, N.A.S. and Mazaheri, H., A Review on Novel Processes of Biodiesel Production from Waste Cooking Oil, *Applied Energy*, 104 **(2013)** 683-710.

Tamalampudi, S., Talukder, M.R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A., Fukuda, H., Enzymatic Production of Biodiesel from *Jatropha* Oil: A Comparative Study of Immobilized-Whole Cell and Commercial Lipases As A Biocatalyst, *Biochemical Engineering Journal*, 39 (1) **(2008)** 185-189.

Tan, K.T., Lee, K.T., Mohamed, A.R., Potential of Waste Palm Cooking, Oil for Catalyst-Free Biodiesel Production, *Energy*, 36 (4) **(2011)** 2085-2088.

Tutar, H., *Candida rugosa* Lipaz Enziminin Sporopollenin Üzerine Adsorpsiyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, **2009**.

Unal, R., Dean, E.B., Taguchi Approach to Design Optimization for Quality and Cost: An Overview, Proceedings of The 13th Annual Conference of The International Society of Parametric Analysts, 21-24 May, New Orleans, LA, USA, **1991**.

Vaccaro, G.L.R., Pohlmann, C., Lima, A.C., Santos, M.S., Souza, C.B., Azevedo, D., Prospective Scenarios for The Biodiesel Chain of A Brazilian State, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (4) **(2010)** 1263-1272.

Wang, Y., Ou, S., Liu, P., and Zhang, Z., Preparation of Biodiesel from Waste Cooking Oil Via Two-Step Catalyzed Process, *Energy Conversion and Management*, 48 (1) **(2007)** 184-188.

- Wen, L., Wang, Y., Lu, D., Hu, S., Han, H., Preparation of KF/CaO Nanocatalyst and Its Application in Biodiesel Production from Chinese Tallow Seed Oil, *Fuel*, 89 (9) **(2010)** 2267-2271.
- Wen, Z., Yu, X., Tu, S.T., Yan, J., and Dahlquist, E., Biodiesel Production from Waste Cooking Oil Catalyzed by TiO<sub>2</sub>-MgO Mixed Oxides, *Bioresource Technology*, 101 (24) **(2010)** 9570-9576.
- Yaakob, Z., Mohammad, M., Alherbawi, M., Alam, Z. and Sopian, K., Overview of The Production of Biodiesel from Waste Cooking Oil, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18 **(2013)** 184-193.
- Yang, X., Wang, B., Cui, F., Tan, T., Production of Lipase by Repeated Batch Fermentation with Immobilized *Rhizopus arrhizus*, *Process Biochemistry*, 40 (6) **(2005)** 2095-2103.
- Yoshida, A., Hama, S., Tamadani, N., Fukuda, H., Kondo, A., Improved Performance of a Packed-Bed Reactor for Biodiesel Production Through Whole-Cell Biocatalysis Employing A High-Lipase-Expression System, *Biochemical Engineering Journal*, 63 **(2012)** 76-80.
- Yusuf, N.N.A.N., Kamarudin, S.K., Yaakob, Z., Overview on The Current Trends in Biodiesel Production, *Energy Conversion and Management*, 52 (7) **(2011)** 2741-2751.
- Yücel, G., H., Şekerpancarı Küspesinin Biyoetanol Üretiminde Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, **2011**.
- Zagonel, G.F., Peralta-Zamora, P., Ramos, L.P., Multivariate Monitoring of Soybean Oil Ethanolysis by FTIR, *Talanta*, 63 (4) **(2004)** 1021-1025.
- Zeng, J., Du, W., Liu, X., Liu, D., Dai, L., Study on The Effect of Cultivation Parameters and Pretreatment on *Rhizopus oryzae* Cell-Catalyzed Transesterification of Vegetable Oils for Biodiesel Production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43 (1-4) **(2006)** 15-18.
- Zhang, Y., Dube, M.A., Mclean, D.D., Kates, M., Biodiesel Production from Waste Cooking Oil: 1. Process Design and Technological Assessment, *Bioresource Technology*, 89 (1) **(2003a)** 1-16.
- Zhang, Y., Dube, M.A., Mclean, D.D., Kates, M., Biodiesel Production from Waste Cooking Oil: 2 nd Economic Assesment and Sensitivity Analysis, *Bioresource Technology*, 90 (3) **(2003b)** 229-240.

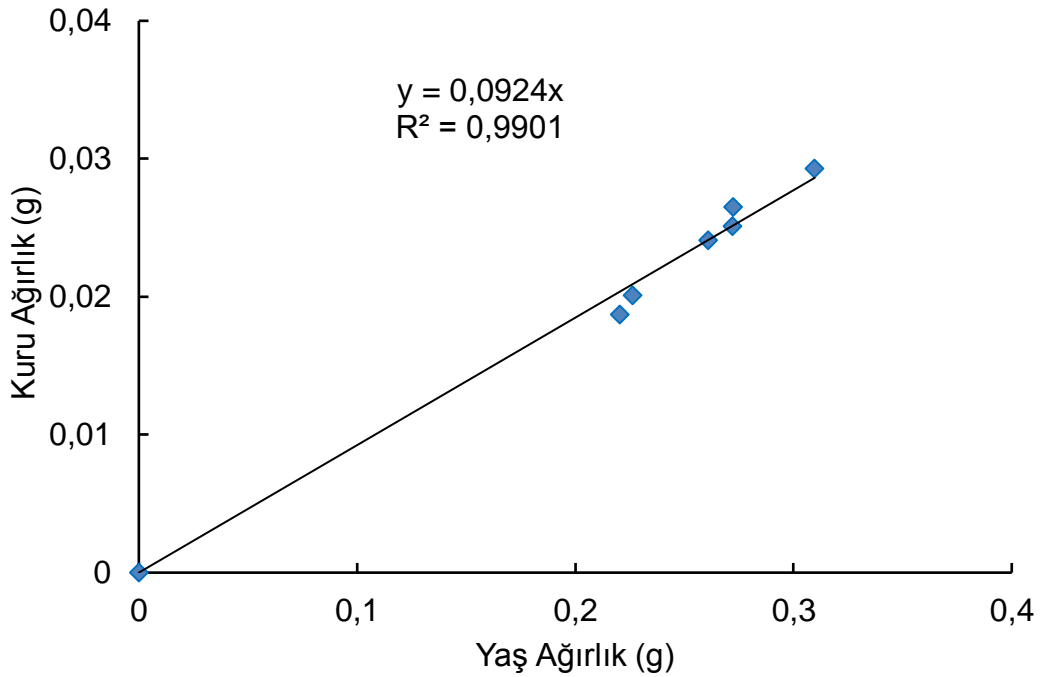


Zheng, S., Kates, M., Dube, M.A, Mclean, D.D., Acid-Catalyzed Production of Biodiesel from Waste Frying Oil, *Biomass and Bioenergy*, 30 (3) **(2006)** 267-272.

## EKLER

### EK 1. Mikroorganizma Kuru Ağırlık-Yaş Ağırlık Çalışma Doğrusu

Tüm mikrobiyal ve biyodizel üretim çalışmalarında *R. arrhizus*'un hücre derişimi kuru mikroorganizma ağırlığı üzerinden verildiğinden yaş ve kuru mikroorganizma ağırlıkları arasındaki ilişkinin tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla; 30 °C, 120 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde 5 gün süresince çoğaltılan mikroorganizma, besin ortamından filtrasyonla ayrılmış, saf suyla birkaç kere yıkanmış, daha sonra 5 dakika vakumla kurutma uygulanarak daha önceden boş olarak tartılan ve ağırlığı belli alüminyum folyolara farklı miktarlarda konularak yaş ağırlıkları tayin edilmiştir. Daha sonra mikroorganizmalar 60 °C sabit sıcaklıktaki etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutulmuş ve tekrar tartılmıştır. Kuru mikroorganizma ağırlığına karşı yaş mikroorganizma ağırlığı grafiğe alınarak kuru ağırlık-yaş ağırlık çalışma doğrusu oluşturulmuş ve Şekil E.1'de gösterilmiştir.



Şekil E.1. *R. arrhizus*'un Kuru Ağırlık-Yaş Ağırlık çalışma doğrusu.

## **EK 2. Hücre İçi ve Hücre Dışı Lipaz Hidroliz Aktivitesinin Tayini**

Hücre içi ve hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesinin tayini için titrimetrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde; ilk olarak 1 g zeytinyağı, 4,5 mL 0,1 M asetat tamponu (pH:5,6) ve 0,5 mL 0,05 M CaCl<sub>2</sub> 50 mL'lik kapaklı bir şişeye konulmuş, hücre içi lipaz hidroliz aktivitesi için 25 mg kuru hücre, hücre dışı lipaz hidroliz aktivitesi için ise 0,25 mL kültür ortamından karışıma eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon 30 °C'de 250 rpm karıştırma hızında ve 10 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. 10 dakika sonunda çözeltiliye 20 mL % 99,5'lik etanol eklenerek hidroliz reaksiyonu tamamlanmıştır. Hidroliz reaksiyonu sonrası açığa çıkan yağ asitleri, 0,025 M NaOH ile titre edilerek, harcanan mL NaOH kaydedilmiştir.

Referans değerinin bulunması için, yukarıda belirtilen işlemler, enzim (mikroorganizma hücresi veya kültür ortamı) kullanılmadan tekrarlanır. Burada harcanan NaOH, zeytinyağının içeriğinde doğal olarak bulunan serbest yağ asitlerini nötralleştirmek için kullanılan miktardır. Enzimli ve enzimsiz olarak yapılan deneylerde, harcanan NaOH (mL) miktarları arasındaki fark, doğrudan lipaz enziminin zeytinyağını hidrolize etmesi sonucu açığa çıkan yağ asitlerinin miktarını belirlemede kullanılır. Daha sonra Eşitlik 3.8. ve 3.9. kullanılarak hücre içi ve hücre dışı lipaz hidroliz aktiviteleri hesaplanır.

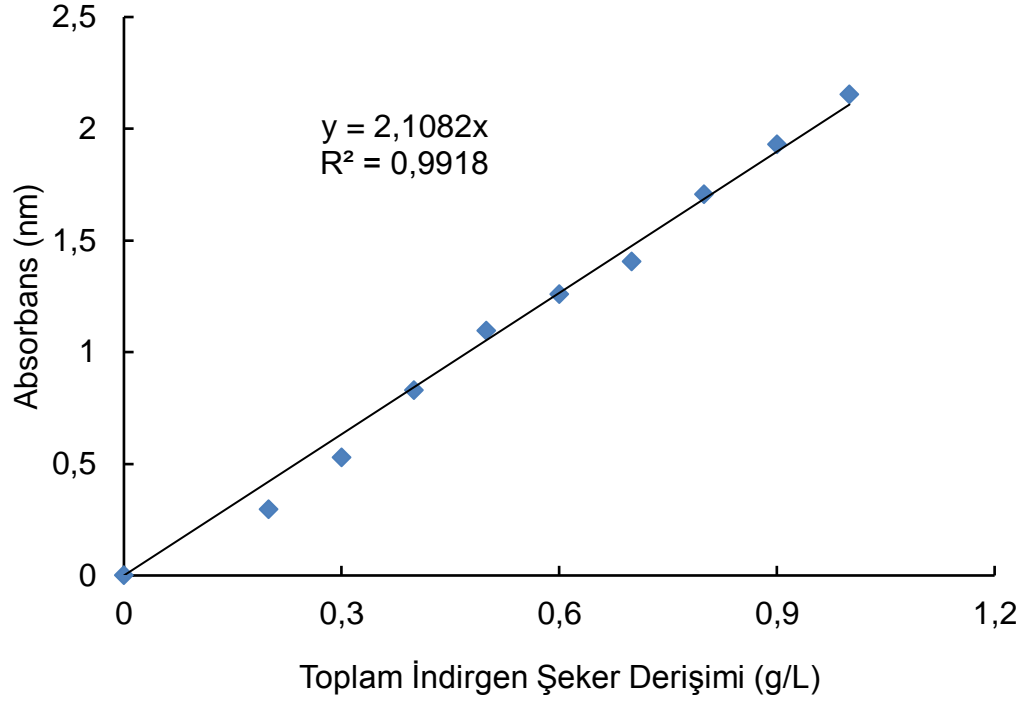
### **EK 3. Miller (DNS) Yöntemiyle Toplam İndirgen Şeker Derişimi Tayini**

Atık portakal kabuğundan hazırlanan besin ortamındaki toplam indirgen şeker, Miller yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

Besin ortamından alınan örnek, en yüksek derişim 0.5 g/L olacak şekilde seyreltilir. Seyreltilen çözeltiden alınan 0,75 mL örnek, cam deney tüpüne konularak üzerine 0,75 mL DNS çözeltisi ilave edilir ve tüpün ağzı streç filmle kapatılır. Kaynayan suyun içinde 10 dakika bekletildikten sonra, örneğe 0.25 mL Rochella tuzu çözeltisi eklenir ve oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutularak analize hazır hale getirilir. Referans olarak damıtık su kullanılan UV spektrofotometrede 575 nm'de hazırlanan örneğin absorbansı ölçülür. Şekil E 3.'de absorbans-toplam indirgen şeker derişimi çalışma doğrusu gösterilmektedir.




#### **Analiz Çözeltilerinin Hazırlanışı**

1. DNS Çözeltisi: 10 g 3,5 dinitro salisilik asit, 10 g sodyum hidroksit ve 1,6 g fenol 1 L damıtılmış suda çözülür. (Bu çözeltinin kullanmadan hemen önce 100 mL'sine 1 mL %1'lik sodyum sülfid eklenir.)
2. Rochella Tuzu Çözeltisi: 400 g potasyum sodyum tartarat 1 L damıtılmış suda çözülür.



**Şekil E.3.** Toplam indirgen şeker çalışma doğrusu.

# EK 4. Biyodizel GC Analiz Raporu

 <b>Intertek</b> Caleb Brett <small>Total Quality Assured</small>		
<b>ITS, Caleb Brett/Deniz Survey A.Ş.</b> İskenderun Laboratuvarı		ITS Caleb Brett Deniz Survey A.Ş. İskenderun Laboratuvarı Nardüzü Mh. Nardüzü Bul. Kaptan M.Sedat Altan Binası No:64 Arsuz / Hatay
<b>Deney Raporu</b> Test Report		AB - 0058 - T 10656/18 14.04.2018 Rev.No / Tarih 0 / -

## Biodiesel Analiz Raporu

Numune	Alanın	Yükümlünün Adı Soyadı / Unvanı	DB Tarımsal Enerji A.Ş.	
	Alanın	Adı Soyadı	ITS Caleb Brett/Deniz Survey A.Ş.	Unvanı
Teslim	Alınanın	Şirketi ve Adresi	ITS Caleb Brett/Deniz Survey A.Ş.	
	Edenin	Yöntemi	TS 900-1, ISO 3170	Tarihi
Deney	Alınanın	Yeri	Tank 9006	12.04.2018
	Tarihi ve Saati	Adı Soyadı	ITS Caleb Brett/Deniz Survey A.Ş.	Unvanı
	Tarihi	Şirketi ve Adresi	ITS Caleb Brett/Deniz Survey A.Ş.	
			No	Rapor Tarihi
				14.04.2018

ÖZELLİK	ÖZELLİK KODU	BİRİM	REFERANS SINIR DEĞERLERİ		ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ	ÖLÇÜM DEĞERİ	DENEY YÖNTEMİ
			EN AZ	EN ÇOK			
Yoğunluk	100	kg/m <sup>3</sup>	860,0	900,0	± 0,027	894,1	TS EN ISO 12185
Viskozite (Akmazlık)	110	mm <sup>2</sup> /s	3,50	5,00	± 0,041	4,244	TS 1451 EN ISO 3104
Toplam Kirlilik	160	mg/kg	-	24	± 0,253	4	TS EN 12662
Oksidasyon Kararlılığı	170	h	8,0	-	± 0,369	9,5	TS EN 14112
Parlama Noktası	200	°C	101	-	± 1,820	182	TS EN ISO 3679
Soğuk Filtre Tıkanma Noktası	210	°C	-	-	± 0,150	3	TS EN 116
Metanol	421	% (m/m)	-	0,20	± 0,000	0,01	TS EN 14110
Su	500	mg/kg	-	500	± 6,424	249	TS 6147 EN ISO 12937
Sülfatlanmış Kül	520	% (m/m)	-	0,02	± 0,003	0,005	TS 1985
Kükürt	540	mg/kg	-	10,0	± 0,238	4,0	TS EN ISO 20846
Fosfor	560	mg/kg	-	4,0	± 0,010	0,20	TS EN 14107
Sodyum	570	mg/kg	-	5,0	± 0,000	0,00	TS EN 14538
Potasyum	580	mg/kg	-	5,0	± 0,037	0,30	TS EN 14538
Kalsiyum	590	mg/kg	-	5,0	± 0,000	0,00	TS EN 14538
Magnezyum	600	mg/kg	-	5,0	± 0,000	0,00	TS EN 14538
iyot Sayısı	620	g. Iyot/100g	-	120	± 1,781	112	TS EN 14111
Gliserit	Monogliserit	651	% (m/m)	-	± 0,031	0,44	TS EN 14105
	Diğliserit	652	% (m/m)	-	± 0,014	0,13	TS EN 14105
	Triğliserit	653	% (m/m)	-	± 0,003	0,02	TS EN 14105
Gliserol	Serbest Gliserol	661	% (m/m)	-	± 0,017	0,01	TS EN 14105
	Toplam Gliserol	662	% (m/m)	-	± 0,020	0,14	TS EN 14105
Ester	670	% (m/m)	96,5	-	± 2,665	98,7	TS EN 14103
Linolenik asit metil esterleri	680	% (m/m)	-	12,0	± 0,033	0,5	TS EN 14103
Asit sayısı	690	mg KOH/g	-	0,50	± 0,028	0,33	TS EN 14104
Çoklu doymamış metil esterleri	700	% (m/m)	-	1,00	± 0,000	0,00	TS EN 14103
Setan sayısı*	820	-	51,0	-	-	51,5	TS EN 15195
Bakır şerit korozyonu	910	derece	Sınıt 1		-	1a	TS 2741 EN ISO 2160

\*Akredite değildir. \*Akredite ( AB-0157-T ) ITS Caleb Brett / Deniz Survey A.Ş. Mersin Laboratuvarına yaptırılmıştır.

NOT: Sodyum+Potasyum ve Kalsiyum+Magnezyum değerlerinin toplamına yukarıda belirtilmiş gibi bakılır.

\*\*\* EN 590'a uygun dizel yakıtı ile harmanlanmak için kullanılacak olan YAME için spek değeridir.

Yaz: 1 Nisan - 31 Ekim ( ± 15 gün ) Kış: Yaz dönemi dışında kalan dönem

**Açıklamalar:** Bu rapor 1 (bir) sayfadan oluşmaktadır ve laboratuvarın izni olmaksızın kopyalanıp çoğaltılamaz. İmzasız ve mühürsüz raporlar geçerlidir.

Sonuçlar analizi yapılan numuneye aittir. Deney sonuçlarına rapor tarihinden itibaren en geç 3 ( üç ) ay içinde itiraz edilebilir.

Mühür No: 11788041-42-43

Deney laboratuvarı olarak faaliyet gösteren ITS Caleb Brett / Deniz Survey A.Ş. İskenderun Laboratuvarı , TÜRKAK'tan AB-0058-T dosyası ile TS EN ISO 17025:2012 standardına göre akredite edilmiştir.

Türk Akreditasyon Kurumu(TÜRKAK) deney raporlarının konularlığı konusundaki Avrupa Akreditasyon Birliği(EA) ile Çık Tutarlı Anlaşma ve Uluslararası Laboratuvar Akreditasyon Birliği(ILAC) ile karşılıklı tanıma anlaşması imzalanmıştır.

(Akredite Laboratuvar Yetkileri tarafından doldurulup imzalanacaktır.)

Analiz Raporu tamzini yükümlülüğü olan **DB Tarımsal Enerji A.Ş.** 'den alınan Biodiesel numunesinin, yukarıda yer alan deney yöntemleri kullanılarak yapılan analiz sonucu, Teknik Düzenlemede yer alan TS EN 14214+A1:Nisan 2014 özelliklerine ( Uygun ) olduğu tespit edilmiştir.

(Yükümlüler tarafından doldurulacak ve imzalanacaktır.)

Alınan akaryakıtın niteliği ve niceliği doğrultusunda, Bu analiz raporu (.....) tarih ve (.....) sayılı (faturama/depo çıkış kutanağına) konu edilen akaryakıtta aittir.

Bu analiz raporu tarihi ve sayılı (faturama/gümrük giriş beyanname/depo çıkış kutanağına) konu edilen akaryakıtta aittir.

(I. Yeniden satışta yükümlüler tarafından doldurulup imzalanacaktır.)

Alınan akaryakıtın niteliği ve niceliği doğrultusunda, Bu analiz raporu (.....) tarih ve (.....) sayılı (faturama/depo çıkış kutanağına) konu edilen akaryakıtta aittir.

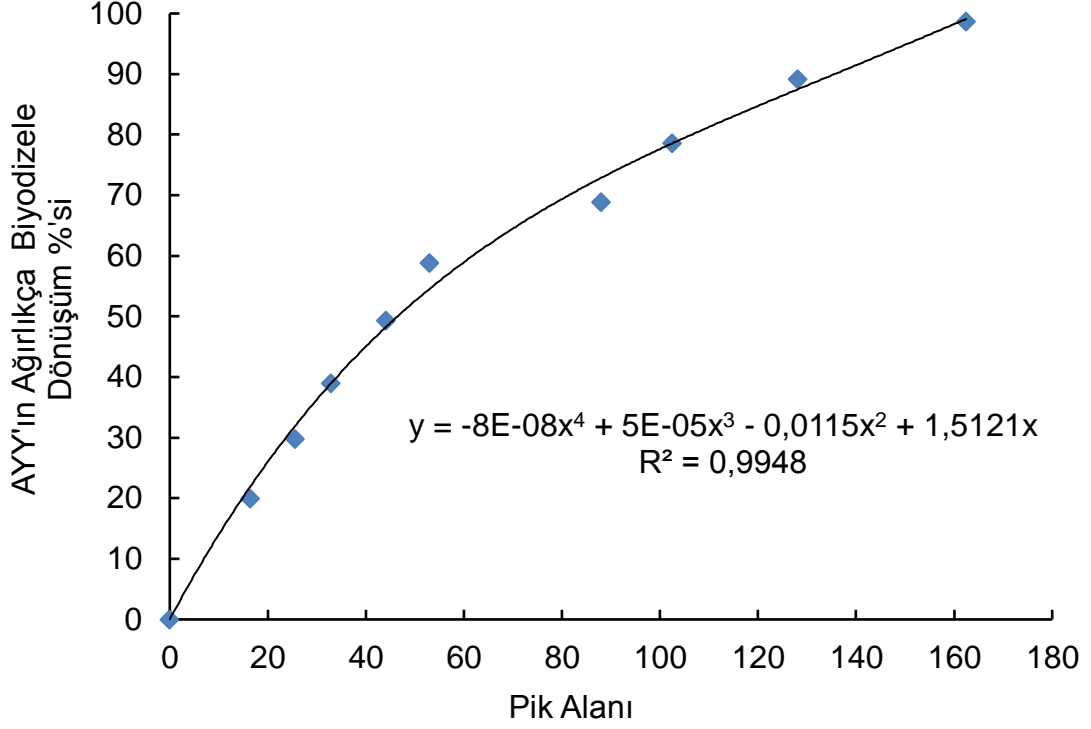
(Harmanlama ya tabii tutulan petrolde doldurulacaktır.)

Harmanlanan Ürünün Adı	Harmanlama Oranı (% (W/W))
Akaryakıt harmanlama sonrasında teknik düzenlemelere uygundur.	
Form No: KF-L_Q08	Yayın No:1
Rev.No / Tarih: 05 / 25.10.2016	Yayın tarihi: 25.12.2008

Hamide KARA  
Laboratuvar Müdürü  
**Intertek Caleb Brett** (msb) 91  
ITS, Caleb Brett/Deniz Survey S.A.

Hamide KARA  
ITS, Caleb Brett/Deniz Survey S.A.

## EK 5. AYY'ın Ağırlıkça Biyodizele Dönüşüm %'sinin Tayin Edilmesi



**Şekil E.5.** AYY'ın biyodizele dönüşüm %'sinin tayin edilmesi için kullanılan kalibrasyon grafiği.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 16/10/2019

Tez Başlığı / Konusu: *Rhizopus arrhizus* ile Atık Yemelik Yağdan Biyodizel Üretiminin Kesikli Sistemde İncelenmesi ve Optimizasyonu

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 134 sayfalık kısmına ilişkin, 16/10/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

16/10/2019  
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Şeyda ÇAĞATAY

Öğrenci No: N13148081

Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği

Programı: Tezli Doktora

Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Zümriye AKSU

(Unvan, Ad Soyad, İmza)



## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Şeyda ÇAĞATAY  
Doğum Yeri : Ankara  
Doğum Tarihi : 21.08.1977  
Medeni Hali : Evli  
E-posta : scagatay77@gmail.com  
Adres : Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü  
Beytepe/ANKARA

### Eğitim

Lise : Mimar Sinan Lisesi (1994)  
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (1999)  
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı  
(2003)

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce İyi Düzey (2018 YDS-3 81,25)

### İş Deneyimi

Hacettepe Üniversitesi (Araştırma Görevlisi, 2000-2002)

K.K.K.İği Tek.ve Prj.Ynt.D.Bşk.İği (Proje Etüt Uzmanı, 2002-2005)

K.K.K.İğı 1'inci ABMK.İğı (Çevre İşlem Sorumlusu, 2005-2011)

K.K.K.İğı 4'üncü ABMK.İğı (Kısım Amirliğı, 2011-2015)

MSB 5'inci ABFM.lüğü (Bölüm Amirliğı, 2015-2017)

MSB Ask.Fb.Gn.Md.lüğü (Milli Savunma Uzmanı, 2017-Devam)

### **Yayınlar (SCI)**

1. Aksu, Z., şen Çağatay, ř., Investigation of Biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G Reactive Dye by Dried *Rhizopus arrhizus* in Batch and Continuous Systems, Separation and Purification Technology, 48 **(2006)** 24-35.
2. Aksu, Z., şen Çağatay, ř., Gönen, F., Continuous Fixed Bed Biosorption of Reactive Dyes by Dried *Rhizopus arrhizus*: Determination of Column Capacity, Journal of Hazardous Materials, 143 **(2007)** 362-371.