

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**ATIK YEMEKLİK YAĞLARIN LİPAZ KATALİZLİ BİYOKAYNAĞI
ÜRETİMİNDE HAMMADDE KAYNAĞI OLARAK KULLANIMI**

BAHAR GÜRKAYA KUTLUK

KOCAELİ 2020

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**ATIK YEMEKLİK YAĞLARIN LİPAZ KATALİZLİ BİYOKAYNAKÇI
ÜRETİMİNDE HAMMADDE KAYNAĞI OLARAK KULLANIMI**

BAHAR GÜRKAYA KUTLUK

Dr. Öğr. Üyesi Nurcan KAPUCU	
Danışman,	Kocaeli Üniversitesi
Doç. Dr. Didem SALOĞLU DERTLİ	
Jüri Üyesi,	İstanbul Teknik Üniversitesi
Doç. Dr. Başar UYAR	
Jüri Üyesi,	Kocaeli Üniversitesi
Prof. Dr. Sevil YÜCEL	
Jüri Üyesi,	Yıldız Teknik Üniversitesi
Prof. Dr. Nilüfer HİLMİOĞLU	
Jüri Üyesi,	Kocaeli Üniversitesi

Tezin Savunulduğu Tarih: 01.09.2020

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Akademik hayat, özveri ve emek isteyen uzun soluklu bir çalışma sürecidir. Bu süreçte akademisyenin bilgi ve çabasının yanı sıra çevresinin desteği de çok önemlidir. Yolun başında ailemin verdiği cesaret, ilerleyen zaman içerisinde onların da katkısı ile bugün doktora tez çalışmam nihayete ermiş bulunuyor.

Öncelikle, lisansüstü eğitimimin başından itibaren bilgisi, rehberliği ve yakınlığı ile destek veren hocam Dr. Öğr. Üyesi Nurcan KAPUCU'ya, fikir alışverişi yaptığım, sorularıma içtenlikle yanıt verip destek olan tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalar ve yetiştirilmesi gereken raporlar varken ailemin önemini bir kez daha anladım. Beni büyüten, eğiten, yol gösteren, beni ben yapan, bana çalışabilmem için alan ve zaman yaratmaya çabalayan, cesaretlendiren ailemin her bir ferdine ayrı ayrı teşekkür ederim.

Sonunu getiremeyeceğime inandığım anlarda umutsuzluğa kapılmama izin vermediği için, çalışmalarına sunduğu katkılar için yol arkadaşım, meslektaşım, eşime sonsuz kez teşekkür ederim.

Sevgili oğlum, yeterlilik aşamasından itibaren benimle birlikte olduğun için, uzun çalışma saatlerine katlandığın için, klavye başında geçen saatlere karşılık oyunlarından feragat ettiğin için en büyük teşekkürüm sanadır. Bu yaşında seninle birlikte iki doktora tezi büyüdü bu evde ve sen günlük yaşantını çalışmalarımızla paylaştın aslında. Öyle ki; laboratuvar çalışmalarının en keyifli anları senin de yanımızda olduğun günlerdir diyebilirim. Varlığın, sonsuz güçlü olduğuma dair inancımı her daim besleyen yegane kaynak oldu. Ortada bir başarı varsa, en büyük pay senindir. Bana kattığın herşey için teşekkür ederim oğlum.

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından 2018/099 proje numarası ile, Tübitak tarafından 217M525 proje numarası ile desteklenmiştir. Kurumlara katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Eylül-2020

Bahar GÜRKAYA KUTLUK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
GİRİŞ	1
1. BİYOAĞLAYICILAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER	2
2. KONU İLE İLGİLİ LİTERATÜRDE YER ALAN ÇALIŞMALAR	8
2.1. Tez Çalışmasının Literatüre Yapacağı Katkı	16
3. MALZEME VE YÖNTEM	17
3.1. Malzemeler	17
3.2. Deneysel Yöntem	17
3.2.1. Atık yemeklik yağdan serbest yağ asitleri üretimi	17
3.2.2. Atık yemeklik yağdan yağ asidi metil ester (AYAME) üretimi	18
3.2.3. Atık yağ serbest yağ asitlerinden biyoyağlama yağı üretimi	18
3.2.4. RSM kullanılarak atık yağdan elde edilen SYA ve AYAME'den biyoyağlayıcı üretiminin modellenmesi	19
3.2.5. Dean Stark sistemi ile en iyi koşullarda biyoyağlayıcı üretimi	25
3.3. Analiz Yöntemleri	26
3.3.1. Lipaz aktivitesinin tayini	26
3.3.2. SYA içeriği tayini	27
3.3.4. Yağ asidi karışımı ortalama molekül ağırlığının belirlenmesi	27
3.3.6. Mono di tri ester analizi	28
3.3.7. Su içeriği tayini	29
3.3.8. Biyoyağlama yağı fiziksel özelliklerinin analizi	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Atık Yağın Yağ Asidi Bileşimi	31
4.2. Enzim Aktiviteleri	32
4.3. Atık Yemeklik Yağdan Serbest Yağ Asitleri Üretimi	33
4.3.1. Enzim miktarının etkisi	33
4.3.2. Su/yağ oranının etkisi	34
4.3.3. Karıştırma hızının etkisi	35
4.3.4. Tepkime sıcaklığının etkisi	36
4.4. Atık Yemeklik Yağdan Yağ Asidi Metil Ester (AYAME) Üretimi	37
4.5. Yağ Asitlerinden Biyoyağlama Yağı Üretimi	37
4.5.1. Enzim miktarının etkisi	38
4.5.2. Başlangıç su içeriğinin etkisi	40
4.5.3. Tepkime sıcaklığının etkisi	42
4.5.4. Alkol / yağ asidi mol oranının etkisi	44
4.5.5. Karıştırma hızının etkisi	47
4.6. RSM Kullanılarak Biyoyağlayıcı Üretiminin Modellenmesi	51
4.7. Dean Stark Sistemi ile Biyoyağlayıcı Üretimi	75
4.8. Sentezlenen Biyoyağlama Yağı Fiziksel Özellikleri	76
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	83
EKLER	89

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	110
ÖZGEÇMİŞ	113



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Atık yağın hidrolizi ile serbest yağ asitleri üretimi.....	18
Şekil 3.2.	IKA marka inkübatör.....	19
Şekil 3.3.	Örnek bir üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği	20
Şekil 3.4.	Bir yanıt yüzeyinin kontür eğrileri.....	20
Şekil 3.5.	RSM'nin ardışık doğası	21
Şekil 3.6.	Maksimum için yanıt yüzeyi ve kontür eğrileri.....	22
Şekil 3.7.	Minimum için yanıt yüzeyi ve kontür eğrileri.....	22
Şekil 3.8.	Eyer noktası için yanıt yüzeyi ve kontür eğrileri	23
Şekil 3.9.	Dean Stark sistemi	25
Şekil 4.1.	Atık yağın yağ asidi bileşimi GC kromatogramı	31
Şekil 4.2.	Enzim miktarının serbest yağ asidi oluşumuna etkisi.....	34
Şekil 4.3.	Su/Yağ kütle oranının serbest yağ asidi oluşumuna etkisi	35
Şekil 4.4.	Karıştırma hızının serbest yağ asidi oluşumuna etkisi	36
Şekil 4.5.	Sıcaklığın serbest yağ asidi oluşumuna etkisi.....	37
Şekil 4.6.	Enzim miktarının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (TMP)	39
Şekil 4.7.	Enzim miktarının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Bütanol)	39
Şekil 4.8.	Enzim miktarının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Oleyil alkol)	40
Şekil 4.9.	Başlangıç su içeriğinin serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (TMP)	41
Şekil 4.10.	Başlangıç su içeriğinin serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Bütanol).....	41
Şekil 4.11.	Başlangıç su içeriğinin serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Oleyil alkol).....	42
Şekil 4.12.	Tepkime sıcaklığının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (TMP).....	43
Şekil 4.13.	Tepkime sıcaklığının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Bütanol)	43
Şekil 4.14.	Tepkime sıcaklığının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Oleyil alkol).....	44
Şekil 4.15.	Alkol/SYA mol oranının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (TMP)	45
Şekil 4.16.	Alkol/SYA mol oranının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Bütanol).....	46
Şekil 4.17.	Alkol/SYA mol oranının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Oleyil alkol).....	46
Şekil 4.18.	Karıştırma hızının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (TMP)	47
Şekil 4.19.	Karıştırma hızının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Bütanol).....	48
Şekil 4.20.	Karıştırma hızının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Oleyil alkol)....	48
Şekil 4.21.	Serbest yağ asitlerinin TMP ile esterleşme tepkimesi sonucunda elde edilen mono, di, triester kromatogramı	49
Şekil 4.22.	Serbest yağ asitlerinin bütanol ile esterleşme tepkimesi sonucunda elde edilen mono ester kromatogramı	50
Şekil 4.23.	Serbest yağ asitlerinin oleyil alkol ile esterleşme tepkimesi sonucunda elde edilen mono ester kromatogramı	50
Şekil 4.24.	Novozyme 435 katalizörlüğünde SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için residual normal grafiği	67
Şekil 4.25.	Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için residual normal grafiği	67
Şekil 4.26.	Resinase HT katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için residual normal grafiği	68

Şekil 4.27. Novozyme 51032 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için residual normal grafiği	68
Şekil 4.28. Lipozyme TL IM katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için gerçek değerlere karşı öngörülen değerler grafiği	69
Şekil 4.29. Novozyme 435 katalizörlüğünde SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için gerçek değerlere karşı öngörülen değerler grafiği	69
Şekil 4.30. Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için gerçek değerlere karşı öngörülen değerler grafiği	70
Şekil 4.31. Resinase HT katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için gerçek değerlere karşı öngörülen değerler grafiği	70
Şekil 4.32. Novozyme 51032 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için gerçek değerlere karşı öngörülen değerler grafiği	71
Şekil 4.33. Lipozyme TL IM katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için residual normal grafiği	71
Şekil 4.34. Novozyme 435 katalizörlüğünde SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için model optimizasyonu çalışması	72
Şekil 4.35. Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için model optimizasyonu çalışması	72
Şekil 4.36. Lipozyme TL IM katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için model optimizasyonu çalışması	73
Şekil 4.37. Resinase HT katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için model optimizasyonu çalışması	74
Şekil 4.38. Novozyme 51032 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için model optimizasyonu çalışması	74
Şekil 4.39. Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için Dean Stark çalışması	76
Şekil 4.40. Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ile TMP arasındaki transesterleşme sonucu sentezlenen biyoyağlama yağı GC Kromotogramı	77

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.	Biyoyağlayıcıların enzimatik sentezi üzerine yapılmış çalışmalar	15
Tablo 3.1.	Biyoyağlayıcı fiziksel özellik analizleri	30
Tablo 4.1.	Atık yağ SYA bileşimi	32
Tablo 4.2.	Bazı serbest ticari lipazların hidrolitik aktiviteleri	32
Tablo 4.3.	Bazı tutuklanmış ticari lipazların hidrolitik aktiviteleri	32
Tablo 4.4.	SYA için RSM'ye göre önerilen 30 deney için elde edilen deneysel sonuçlar (Novozyme 435)	52
Tablo 4.5.	AYAME için RSM'ye göre önerilen 30 deney için elde edilen deneysel sonuçlar (Novozyme 435)	53
Tablo 4.6.	AYAME için RSM'ye göre önerilen 30 deney için elde edilen deneysel sonuçlar (Novozyme 51032)	54
Tablo 4.7.	AYAME için RSM'ye göre önerilen 30 deney için elde edilen deneysel sonuçlar (Resinase HT)	55
Tablo 4.8.	AYAME için RSM'ye göre önerilen 30 deney için elde edilen deneysel sonuçlar (Lipozyme TL IM)	56
Tablo 4.9.	Novozyme 435 varlığında atık yağ SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için oluşturulan model istatistik verileri	57
Tablo 4.10.	Novozyme 435 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için oluşturulan model istatistik verileri	57
Tablo 4.11.	Lipozyme TL IM varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için oluşturulan model istatistik verileri	57
Tablo 4.12.	Resinase HT varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için oluşturulan model istatistik verileri	58
Tablo 4.13.	Novozyme 51032 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için oluşturulan model istatistik verileri	58
Tablo 4.14.	Novozyme 435 varlığında atık yağ SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için RSM Lack of fit test sonuçları	58
Tablo 4.15.	Novozyme 435 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için RSM Lack of fit test sonuçları	59
Tablo 4.16.	Lipozyme TL IM varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için RSM Lack of fit test sonuçları	59
Tablo 4.17.	Resinase HT varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için RSM Lack of fit test sonuçları	59
Tablo 4.18.	Novozyme 51032 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için RSM Lack of fit test sonuçları	59
Tablo 4.19.	Novozyme 435 varlığında Atık yağ SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi RSM modeli ANOVA analizi	60
Tablo 4.20.	Novozyme 435 varlığında Atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi RSM modeli ANOVA analizi	60
Tablo 4.21.	Lipozyme TL IM varlığında Atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi RSM modeli ANOVA analizi	61
Tablo 4.22.	Resinase HT varlığında Atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi RSM modeli ANOVA analizi	63
Tablo 4.23.	Novozyme 51032 varlığında Atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi RSM modeli ANOVA analizi	63
Tablo 4.24.	Novozyme 435 varlığında atık yağ SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri	64

Tablo 4.25.	Novozyme 435 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri.....	64
Tablo 4.26.	Lipozyme TL IM varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri.....	65
Tablo 4.27.	Resinase HT varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri.....	65
Tablo 4.28.	Novozyme 51032 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri.....	65
Tablo 4.29.	Novozyme 435 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri.....	75
Tablo 4.30.	Sentezlenen biyoyağlayıcı fiziksel özellik analizleri.....	77
Tablo 4.31.	Hidrolik sistem yağlarının sınıflandırılması	79
Tablo 4.32.	Bazı yağlayıcılarla sonuçların karşılaştırılması	80



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	:	Sıcaklık (Celcius)
dk	:	Dakika
M	:	Molekül kütlesi (g/mol)
m	:	Örnek kütlesi (mg)
rpm	:	Round per minute (dakikadaki devir sayısı)
U	:	Ünite (lipaz aktivitesi birimi)

Kısaltmalar

AB	:	Avrupa Birliği
ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
AYAME	:	Atık Yağ Asidi Metil Esteri
ASTM	:	American Society for Testing and Materials (Uluslararası Amerikan Test ve Materyalleri Topluluğu)
AYY	:	Atık Yemeklik Yağlar
EN	:	European Norm (Avrupa Standardı)
SYA	:	Serbest Yağ Asitleri
FID	:	Flame Ionization Detector (Alev İyonlaştırıcı Dedektör)
ISO	:	International Organization for Standardization (Uluslararası Standartlar Teşkilâtı)

ATIK YEMEKLIK YAĞLARIN LİPAZ KATALİZLİ BİYOAĞLAYICI ÜRETİMİNDE HAMMADDE KAYNAĞI OLARAK KULLANIMI

ÖZET

Bu çalışmada Atık Yemeklik Yağların (AYY) hidroliz edilmesiyle serbest yağ asitleri (SYA), metanol ile tepkimesi sonucunda da yağ asidi metil esterleri (AYAME, biyodizel) sentezlenmiştir. Farklı yapıdaki alkoller (trimetilolpropan (TMP), oleyil alkol ve bütanol) ile SYA'nın Novozyme 435 ile esterleşmesiyle, AYAME'nin ise serbest (Novozyme 51032 ve Resinase HT) ve ticari tutuklanmış (Lipozyme TL IM ve Novozyme 435) lipazlar kullanılarak TMP ile transesterleşmesiyle biyoyağlama yağı üretilmiştir. Yukarıda bahsedilen tüm tepkimelere etki eden parametreler (lipaz miktarı, asit/alkol, mol oranı, başlangıç su içeriği, sıcaklık) ele alınarak istatistiksel deney tasarımı ile optimizasyonu yapılmıştır. Deneyisel çalışmalar sonucunda SYA ve AYAME'den yüksek ester içerikli biyoyağlama yağı sentezlenmiştir. Esterleşme/transesterleşme tepkimeleri için ticari tutuklanmış lipazlar kullanılarak serbest lipazlara göre daha yüksek dönüşüm elde edilmiştir. Aynı zamanda tutuklanmış lipazlar arasından Novozyme 435 katalizörü varlığında en yüksek tri ester içeriği elde edilmiştir. Optimum tepkime koşullarında (%5 enzim içeriği, 500rpm çalkalama hızı, 50°C tepkime sıcaklığı, AYAME/TMP 4/1 mol, 48 saat süre) biyoyağlama yağı (AYAME dönüşümü %96, tri ester içeriği %89) üretilerek fiziksel özellikleri (100°C ve 40°C için vizkosite değerleri, vizkosite indeksi, akma noktası, alevlenme noktası, yoğunluk, toplam baz ve asit sayısı) belirlenmiştir. Üretilen biyoyağlama yağının fiziksel özellikleri incelendiğinde ISO SAE standartlarına uygun hidrolik sistem yağı (ISO VG 32 ile 37 arasında) olarak kullanılabilirliği önerilmektedir. Bu tez çalışması ile çevre dostu lipaz katalizli yenilenebilir kaynaklardan ticari ürünler ile yarışabilecek biyoyağlama yağı başarılı bir şekilde üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Atık Yemeklik Yağ, Biyoyağlama Yağı, Lipaz, TMP, Yağ Asidi Metil Esteri

THE USE OF WASTE COOKING OIL AS A RAW MATERIAL SOURCE IN THE PRODUCTION OF LIPASE CATALYZED BIOLUBRICANT

ABSTRACT

In this study, free fatty acids (SYA) by hydrolysis of waste frying oil (WFO) and fatty acid methyl esters (AYAME, biodiesel) by the reaction of WFO with methanol were synthesized. Alcohols of different structures (trimethylolpropane (TMP), oleyl alcohol, and butanol) and SYA lipase-catalyzed (Novozyme 435) were esterified, and bio-lubricant was synthesized with an environmentally friendly process. Also, bio-lubricant was synthesized as a result of the transesterification reaction of AYAME with TMP in the presence of free lipases (Novozyme 51032 and Resinase HT) and commercially immobilized lipases (Lipozyme TL IM and Novozyme 435). The effects of reaction parameters for all the reactions mentioned above (lipase amount, acid/alcohol molar ratio, initial water content, and temperature) were analyzed and optimized with statistical experiment design. As a result of the experimental studies, high ester content bio-lubricant was synthesized from SYA and AYAME. For esterification/transesterification reactions, the higher conversion was obtained from commercially immobilized lipases than free lipases. Under the optimum conditions (%5 enzyme content, 500rpm agitation speed, 50°C temperature, AYAME/TMP molar ratio of 4/1, 48h reaction time), bio-lubricant (AYAME conv. 96%, and tri-ester cont. 89%) was produced and physical properties (100°C and 40°C viscosity, viscosity index, pour point, flash point, density, total base, and acid number) were determined. When the physical properties of the produced lubricating oil are examined, it is recommended to use ISO SAE standards as hydraulic system oil (ISO VG 32 to 37). This thesis successfully produced bio-lubricating oil from environmentally friendly lipase-catalyzed renewable sources to compete with commercial products.

Keywords: Waste Edible Oil, Biolubricant, Lipase, TMP, Fatty Acids Methyl Ester

GİRİŞ

Yağlama yağlarının çevreye duyarlı alanlarda (suyla ilgili sektörler, belediye aktiviteleri, dağcılık sektörü, ormancılık ve ziraat) kullanımı sırasında, kazalar ve sızmalar ile çevreye %50 oranında yağ kayıpları olmaktadır. Yağlama yağlarının toksik özellikleri nedeniyle çevreye verdiği zarar oldukça yüksektir. Ayrıca doğada uzun yıllar bozunmadan kalabilirler. Çevrenin özellikle mineral bazlı yağlama ve hidrolik yağlarının yarattığı kirliliğe karşı korunması için kullanım esnasında oluşabilecek kayıpların mümkün olduğunca azaltılması ve yağın tekrar kullanılabilir özellikte olması gerekmektedir (Schneider, 2006; PETDER, 2018).

Son yıllarda geliştirilen yeni nesil ürün ve teknolojiler ile biyoyağlayıcıların kullanımı artırılarak çevreye verilen zararın azaltılması yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Çevre ile uyumlu, su, toprak ve havanın doğal yapısına zarar vermeyen yağlayıcılar çevre dostu biyoyağlayıcılar olarak adlandırılır (IENICA, 2004). Biyobozunur yağlayıcıların %95'i doğada bir yıl içerisinde bozunmaya uğrar. Hidrokarbon temelli sentetik yağlayıcılara göre daha ucuz, yenilenebilir, doğaya saygılı ve biyobozunur olmaları sebebiyle biyoyağlayıcıların kullanımında son yıllarda artış gözlenmektedir (Sarno ve diğ., 2019). Biyoyağlayıcıların genel uygulamaları, otomotiv, havacılık, soğutma ve kompresör uygulamaları, iki zamanlı motorlar, zincir testere yağları, biyogreslerin üretimi, metal işleme yağları, beton endüstrisi kalıp yağları, gıda endüstrisi cihaz yağları, hidrolik yağları vb.'dir. Petrokimya endüstrisinde kullanılan payın düşük olması ile beraber özellikle biyoyağlayıcı üretimi için atık yağların kullanıldığı bilinmektedir (Petran ve diğ., 2008).

Bu tez çalışmasında, yemeklik atık yağlar ve farklı alkoller kullanılarak lipaz katalizli biyoyağlayıcı sentezlenmesi amaçlanmıştır. Atık yağ serbest yağ asitleri ve atık yağ metil esterinin substrat olarak kullanıldığı çalışmada, tepkime parametrelerinin verime olan etkileri geleneksel deney tasarımı ve ayrıca Design Expert 7.0.0 paket programı kullanılarak Yanıt Yüzey Yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmanın nihai hedefi, belirlenen en uygun tepkime koşullarında üretilen biyoyağlayıcının fiziksel özellikleri analiz edilerek bazı ticari yağlayıcılar ile karşılaştırılması ve yarışabilir niteliklerde ürün elde edilebilmesidir.

1. BİYOYAĞLAYICILAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Biyoyağlayıcılar, mineral yağlara kıyasla, düşük toksik özellikleri ve hızlı biyobozunur olmalarının yanı sıra düşük ısı özellikleri sayesinde kullanımdan kaynaklanan kayıpları azaltmaları da oldukça önemlidir. Mineral yağ bazlı hidrolik akışkanlar, maliyet açısından halen uygun olmasına rağmen, petrol türevli bir ürün olduğu için yıllar geçtikçe fiyatlarında artış gözlenmektedir.

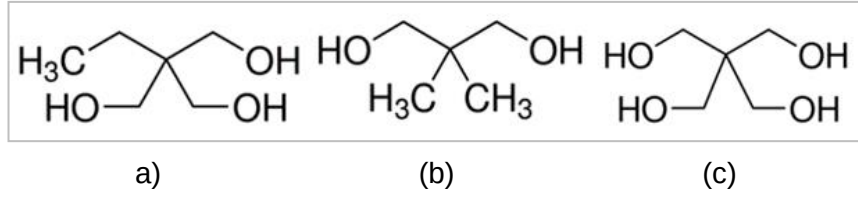
Bitkisel yağların kaynak olarak kullanıldığı biyoyağlayıcıların teknik özellikleri, mineral yağlarla yarışabilecek kadar iyi olmasına rağmen, ısı kararlılıkları ve düşük sıcaklıklardaki davranışları başlıca dezavantajlarıdır. Ayrıca, hidrolize karşı duyarlı olup, oksidasyona girme eğilimleri yüksektir.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

Katılma tepkimeleri ile yapıdan çift bağların uzaklaştırılmasıyla bitkisel yağların yağlayıcı olarak kullanılmaları mümkündür. Katkı maddelerinin eklenmesi ve yapıda kimyasal ya da biyoteknolojik modifikasyonların gerçekleştirilmesi ile kararlılık ve yüksek yağlayıcılık performansı elde edilebilir.

Literatürde bunun için çoklu doymamışlık problemine alkilleme, transesterleşme, hidrojenasyon, hidroformülasyon, epoksidasyon ve oligomerizasyon (polimerizasyon) gibi çeşitli yöntemler önerilmektedir. Bu sayede yeşil kimya için uygun bitkisel yağ temelli biyoyağlayıcılar elde edilir (Salimon, 2010).

Bu yöntemler arasında transesterleşme yöntemi biyoyağlayıcı ürün üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, bitkisel yağdaki gliserol, diğer bir polyol alkolle [trimetilolpropan ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), neopentil glikol ($(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_2$) ya da pentaeritritol ($\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_4$) gibi] yer değiştirir. Şekil 1.1 ile bu polyol alkollerin molekül yapıları verilmektedir.

Atık kızartma yağlarının biyoyağlayıcı olarak modifiye edilerek ekonomik ve yüksek performanslı bir ürün elde edilirken insan sağlığı ve çevreye karşı atık yağların oluşturduğu tehdidi de azaltmak mümkündür (Rajaeifar, 2017).



Şekil 1.1. Biyoyağlayıcı sentezinde en yaygın kullanılan bazı polyol alkoller (a) trimetilolpropan, (b) neopentil glikol, (c) pentaeritritol

Ayçiçek yağı ve kanola yağının biyobozunur trimetilolpropan (TMP) esterleri hidrolik akışkanlarının üretiminde kullanılabilirler. Düşük viskozite ve yüksek sıcaklık kararlılığına sahip TMP esterleri, jet türbini, araba motorları ve gaz türbin motorlarında yağlayıcı olarak kullanım için geliştirilmektedir. Kısa zincirli yapıdan uzun zincirli yapıya kadar (C5 - C18) karboksilik asit içeren sentetik esterler de çeşitli yağlama uygulamalarında rahatlıkla kullanılabilirler.

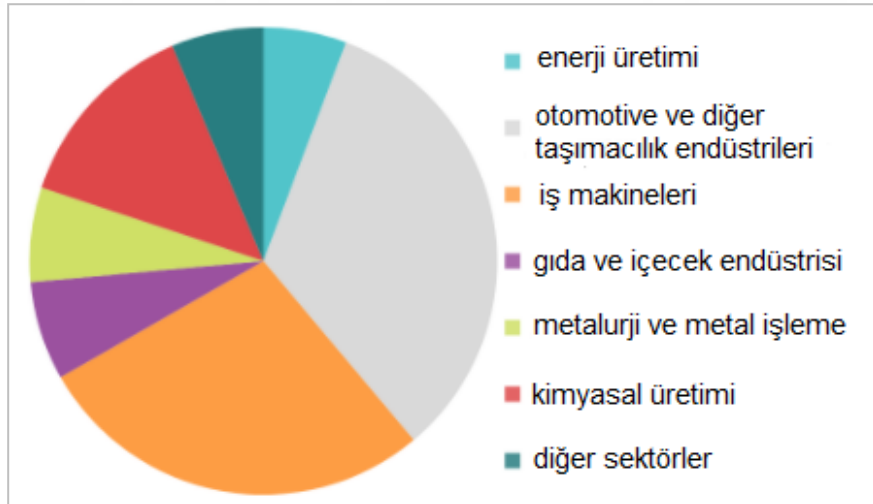
Transesterifikasyon tepkimeleri kimyasal ya da lipazlar kullanılarak enzimatik olarak gerçekleştirilebilir. Bu yolla elde edilen ürün, yarı sentetik olup biyobozunur bir yapıya sahiptir (Bremmer ve Plonsker, 2008). Birçok araştırmaya göre, kimyasal kataliz ile gerçekleşen tepkimelerde sıcaklık oldukça yüksek olup süre kısa iken lipaz katalizörlerin kullanımında ılımlı koşullarda daha uzun süreye gerek olabilir. Yağlar yerine yağ asitleri ya da yağ asidi metil esterleri de bu tepkimelerde girdi olarak kullanılabilir (Salimon ve diğ., 2010) ve TMP esterleri elde edilebilir (Şekil 1.2). Tepkimede yağ asidi metil esterleri kullanımında yüksek triester dönüşümü için geri yöndeki tepkimesi mümkün olduğunca baskılamak gerekir. Bunun için tepkime ortamı vakum altında tutulur. Bu sayede elde edilen indirgen basınç, oluşan metanolün tepkime ortamından eş anlı olarak uzaklaştırılmasını sağlayarak enzim üzerindeki inhibisyon etkisinin de önüne geçilmiş olur.

Dünya'daki toplam yağlayıcı pazarı 2020 yılında 128 milyar \$'lık bir hacme sahip iken, 2020 yılı verilerine göre bu değerin 2,0 milyar \$ kadar olan kısmı biyoyağlayıcılara aittir. Tahminlere göre biyoyağlayıcı pazarının %4,1'lik bir büyüme oranı ile 2025 yılında 2,4 milyar \$ olması beklenmektedir (URL-1, URL-2). Şekil 1.2 ile dünyadaki biyoyağlayıcı pazarının 2019-2024 yılları arasındaki tahmini büyüme hızının bölgelere göre dağılımı verilmiştir (URL-2).

Biyoyağlayıcıların iş güvenliği açısından ciltle temasında güvenilir ürünler olması, işçilik maliyetlerini düşürmesi, güvenli çalışma koşulları sağlaması, makine ömrünü uzatması ve enerji maliyetlerini düşürmesi nedeniyle kullanımları gün geçtikçe daha yaygın hale gelmektedir.



Biyoyağlayıcı üretim maliyetlerinin halen yüksek olması pazardaki büyümenin önündeki en büyük etkidir. Buna karşılık, özellikle taşımacılık ve üretim alanındaki gelişmeler sayesinde biyoyağlayıcı pazarı yükselen bir ivme ile büyümeye devam etmektedir. Şekil 1.3'te verilen grafikte 2018 yılı itibariyle biyoyağlayıcıların dünya genelindeki kullanımının sektörel olarak dağılımı açıklanmıştır. Otomotiv ve ağır iş makineleri dünyadaki en yüksek biyoyağlayıcı kullanımına sahip alanlardır (URL-2).



Sürdürülebilir ve çevreci yaklaşımlar ile yasal düzenlemelerin artması, biyoyağlayıcı kullanım miktarında artışı sağlarken biyoyağlayıcı alanındaki araştırma ve geliştirme çalışmalarının da artmasını sağlamıştır (URL-3). Kuzey Amerika ve Avrupa, 2019 yılında en yüksek biyoyağlayıcı pazar payına sahip olan bölge olmuştur (URL-4, URL-5, URL-6).

Sektördeki belli başlı üreticiler, Total S.A., UBL, Shell, ExxonMobil, Chevron & British Petroleum olarak sayılabilir. Bu üreticilerin son yıllarda biyoyağlayıcılara dair yaptıkları çalışmalar dikkat çekmektedir. Örneğin; ExxonMobil tarafından 2018 yılı Ocak ayında denizcilikte kullanılmak üzere yeni sistem üstün performanslı hidrolik yağları piyasaya sürülmüştür. Bu ürünün, şirkete denizcilik uygulamaları alanında biyoyağlayıcı pazarında diğerlerine göre rekabet avantajı sağlaması amaçlanmıştır. Total S.A. ise, Tablo 1.1 'de verilen bazı soya yağı temelli biyoyağlayıcı çeşitleri ile her bir ürün sınıfında biyoyağlayıcıların da yer almasını sağlamaktadır.

Tablo 1.1. Bazı soya yağı kökenli ticari biyoyağlayıcılar (URL-7)

BIOTRAFFIC 1000 FE	2 zamanlı motorlar
NEPTUNA 2T BIO-JET	2 zamanlı motorlar
BIOTRANS BV FE 75W-80	Dişli yağları
BIOTRANS LS FE 75W-90	Aks ve vites kısımları
BIOHYDRAN SE 32 BIOHYDRAN SE 46 BIOHYDRAN SE 68	Doymuş hidrolik yağları
BIOHYDRAN TMP 32 BIOHYDRAN TMP 46 BIOHYDRAN TMP 68	Doymamış hidrolik yağları

Biyoyağlayıcıların biyobozunur özelliklerinin tanımlanması amacıyla dünyada yaygın olarak kullanılan farklı çevreci etiket uygulamaları vardır. Bu uygulamalar, biyobozunurluğun tanımlanması ve kıyaslama yapılabilmesi için OECD 301 B biyolojik olarak parçalanabilirlik testini seçmişlerdir (URL-8).

Dünya'daki ilk çevreci etiket uygulaması 1978 yılında Almanya'da uygulanmaya başlanan Blue Angel'dir. Ayrıca EU Ecolabel, Nordic Swan ve USDA (ABD Tarım Bakanlığı) Biopreferred gibi birçok çevreci sertifikalandırma düzenlemeleri dünya genelinde uygulanmaktadır (Aydın-Şişman, 2019).

Yağlayıcıların sınıflandırılmasında uluslararası pek çok kalite standardı kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmaların en önemlileri şu şekilde özetlenebilir : Amerikan Petrol Enstitüsü (API) ve Rusya Otomotiv Mühendisleri Birliği (AAE) kullanılan motor türüne göre bir sınıflandırma uygulamaktadır. Avrupa Otomobil Üreticileri Birliği (ACEA), yakıt tasarrufu, enjeksiyon tipi, vizkozite değerleri, çevresel

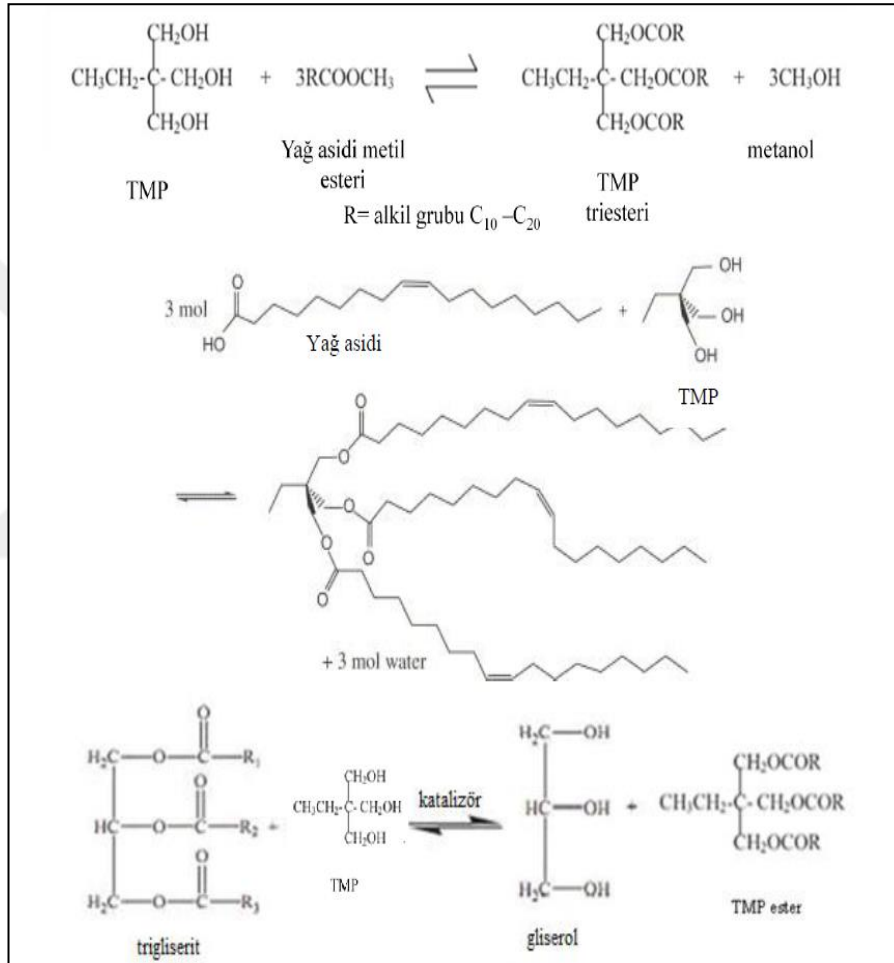
etki, araç tipi, yağ değişim süresi ve iklim koşulları koşulları gibi çok farklı parametreleri göz önünde bulundurarak sınıflandırmayı çeşitlendirmişlerdir. Ayrıca; Uluslararası Madeni Yağların Standardizasyonu ve Sertifikasyonu Komitesi (ILSAC) de kendi belirlediği standartlar çerçevesinde yağlayıcıların sınıflandırmasını yaparak ürün etiketlemesinde yer almaktadırlar. Harf ve rakamlardan oluşan ürün kodları ilgili kuruluş adı kısaltmasının yanında yazılarak ürünün özelliklerini ve dahil olduğu kalite standartlarını belirtir (URL-9).

Ülkemizde her yıl yaklaşık 1,5 milyon ton bitkisel yağ gıda amaçlı olarak tüketilmektedir. Lokanta, hızlı gıda sektörü, yemekhane, hazır yemek fabrikası, otel, motel, hastane, turistik tesis, tatil köyleri, gıda endüstrisi, askeri tesis gibi işletmelerde ve evlerde bitkisel yağların kullanımı sonucu yaklaşık 300 bin ton kızartmalık atık yağ oluşmaktadır. Bu atık yağın piyasadan geri toplanma miktarı ise 2017 yılında 38 bin ton olarak kayıtlara geçmiştir (URL-10).

Çevre ve Şehircilik Bakanlığı'nca verilen bilgilere göre dünyada kişi başı yağ tüketim ortalaması 15 kg/yıl, gelişmiş ülkelerde tüketim 30-38 kg/yıl arasında değişmektedir (URL-10). Atık yağlar denizlere, göllere ve akarsulara döküldüğünde su yüzeyini kaplayarak havadan suya oksijen transferini önleyerek balıkların ve diğer canlıların ölümüne neden olmaktadır. Lavaboya döküldüğünde kızartmalık yağlar evsel atık su kirliliğinin %25'ini oluşturur, ayrıca dren sistemine yapışarak kanalizasyon borusu içindeki atıkların boru cidarına tutunmasına, zamanla borunun daralmasına ve kanalizasyon sisteminin kullanılmaz hale gelmesine neden olur (Kutluk, 2013). Böylece atık su arıtma tesislerinin bakım, onarım ve işletim maliyetini artırır, böcek ve koku problemleri oluşabilir. Tıkanan borular evlerde ve caddelerde kanalizasyon taşkınlarına neden olarak çevre ve insan sağlığını tehdit eder. Dünya nüfusunun giderek artması nedeniyle yenilebilir bitkisel yağlar yerine yenmeyen yağlar, atık yağların biyoyağlayıcı üretiminde hammadde kaynağı olarak değerlendirilmeleri ve katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmeleri giderek önem kazanmaktadır.

Esterleşme ve transesterleşme tepkimelerinde kimyasal katalizörlere alternatif olarak kullanılan enzim katalizörler, fonksiyonellik (işlevsellik), kalite ve sağlığa uygunluk açısından saf ürünler elde edilebilmesini sağlar. Oda sıcaklığındaki yüksek aktiviteleri ve ılımlı tepkime koşulları altında bile stereoseçimliliklerini geniş bir substrat aralığında koruyabilmeleri ve enantiyomerik olarak saf ürünler elde edilmesini sağlar. Kimyasal katalizörlerle karşılaştırıldığında enzimlerin maliyeti dezavantajdır. Ancak, tutuklama tekniklerinin geliştirilmesi ile işletme kolaylığı ve maliyeti açısından her iki

proses yarışabilir ve lipazlarda endüstriyel proseslerde kullanılabilirler. Enzim katalizi sayesinde yalnızca istenen ürün sentezleneceği için kimyasal katalizörün getirdiği bir dizi ayırma işlemine ihtiyaç duyulmaz. Tutuklanmış lipaz tepkime ortamından kolayca ayrılabilirdiği için bir sonraki tepkimede rahatlıkla tekrar kullanılabilir (Bremmer ve Plonsker, 2008). Bir kilogram tutuklanmış lipaz ile birkaç bin kilogram ürün elde edilebilmesi, tutuklanmış katalizörün sabit yataklı reaktörlerde ya da yığın sistemlerde birkaç ay kullanılabilmesi, enzim katalizli tepkimeler için umut vericidir.



Şekil 1.4. Yağ asidi metil esterlerinden, yağ asitlerinden ve yağlardan (sırasıyla) TMP esteri eldesi

Biyoyağlayıcı üretiminde daha çok kimyasal katalizörlerle (asit ve baz) çalışmalar yapılmıştır. Enzim katalizli çalışmalar sınırlı sayıda olup tümünde serbest ya da ticari tutuklanmış lipaz formları ile çalışılmıştır. Biyoyağlayıcıların üretiminde, yağ asidi metil esterleri (YAME), serbest yağ asitleri (SYA) ya da doğrudan trigliseritler kullanılabilir. Şekil 1.4'te trimetilolpropan (TMP) polyol alkolü kullanılarak gerçekleşen TMP esterlerinin elde edilme tepkimeleri verilmiştir.

2. KONU İLE İLGİLİ LİTERATÜRDE YER ALAN ÇALIŞMALAR

Biyoyağlayıcı üretimi için literatürde 1980'lerden itibaren farklı yayınlara ulaşmak mümkündür. Son yıllarda konuyla ilgili çalışmalar artmış ancak atık yağın kullanıldığı çalışmalar halen sınırlı sayıdadır. Yağların, yağ asitlerinin ya da yağ asitleri metil esterlerinin düz zincirli yüksek molekül ağırlıklı alkollerle esterleşme/transesterleşme ürünü olan vaks esterler de biyoyağlayıcı olarak değerlendirilmektedir. Vaks ester üretimleri hem çözücülü hem de çözücsüz ortamlarda gerçekleştirilebilir. Üretim sonrası çözücünün uzaklaştırması ek maliyet ve enerji gerektirdiğinden ve çözücünün enzim üzerine olası toksik etkileri nedeniyle çözücsüz ortamda üretimler önem kazanmaktadır.

Biyoyağlayıcı sentezinde en çok kullanılan polyol alkollerden olan TMP esterlerinin farklı yağ kaynaklarından elde edilmiş AYAME ile transesterleşmesinde kimyasal katalizörlerle yapılmış çalışmalar aşağıda bir özet halinde yer almaktadır.

TMP esterlerinin üretimi için sodyum metoksit katalizörü kullanılarak, *Jatropha curcas* yağı metil esteri ile vakum altında ve 200°C'de %47 dönüşüm elde edilmiş, elde edilen biyoyağlayıcının akma noktası ve viskozite indeksi belirlenmiş, soya ve palm yağından elde edilen biyoyağlayıcıların özellikleri ile karşılaştırılmış (Resul ve diğ. 2012); palm yağı metil esterleri ve palm çekirdek yağı metil esterlerinin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise kimyasal katalizle (Yunus ve diğ., 2002) polyol ester elde edilerek analizleri TLC, HPLC ve GC ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada katalizör olarak sodyum metoksit kullanılmışsa da, ilk kez polyol esterler için analiz yöntemleri karşılaştırıldığı için önem arz etmektedir.

Kolza yağından kimyasal katalizle üretilen kolza yağı metil esterleri girdi olarak kullanılarak, TMP esterlerinin üretimi çözücsüz ortam ve sabit vakum basıncı altında Duolite'e tutuklanmış *Candida rugosa* lipazı ve ticari tutuklanmış lipazlar (Lipozyme IM 20, Novozyme 435) ile gerçekleştirilmiştir. Toplam dönüşümün %90 olduğu üretimde triester verimi, Lipozyme IM 20 ile %75, tutuklanmış *Candida rugosa* lipazı ile %70 olmuştur. Novozyme 435 lipazı ile tri ester elde edilememiştir (Linko ve ark. 1997). Aynı araştırmacılar, metil ester ve TMP-esterin hem kimyasal sentezi (sodyum metoksit, sodyum etoksit ve sodyum hidroksit) hem de enzimatik sentezini (farklı desteklere tutuklanmış *Candida rugosa* lipazı) incelemişlerdir. Kimyasal ve enzimatik

sentez için %90 üzerinde tri ester verimi elde etmişler, en yüksek toplam dönüşüm ise %98 olmuştur (Uosukainen ve Linko 1998). Aynı grup farklı vakum basınçları altında üretim için, *C. rugosa*, *C. viscosum*, *R. miehei*, *P. Fluorescens* lipazlarını tutuklayarak kullanmış ve Lipozyme IM 20 ve Novozyme 435 ticari tutuklanmış lipazları ile karşılaştırmışlar ve bir önceki çalışmaya benzer sonuçlar elde etmişlerdir (Uosukainen ve diğ., 1999).

Diaz ve diğ., 2017’de yaptıkları çalışmada, kastor (hint) yağı biyodizeli ile TMP arasındaki enzimatik transesterleşme tepkimesini pervaporasyon membran reaktörde incelemişlerdir. Biyodizel/TMP mol oranı 4,5/1 olacak şekilde 40°C sıcaklıkta %0,4 lipaz ve %1 başlangıç su içeriğinde 50 saatlik tepkime sonucunda %88 biyodizel dönüşümü elde edildiğini belirlemişlerdir. Membran yardımıyla ortamdan metanolün ayrılması dönüşümü %115 arttırmıştır.

Bu çalışmaların devamında substrat olarak AYAME’nin farklı yağ alkolleri ile transesterleşmesine dair çalışmalar da yer almaktadır.

Kolza yağ asidi metil esterleri ve 1-hekzadekanolden izo-oktan çözücülü ortamında ticari tutuklanmış Lipozyme (*Mucor miehei*) ile vaks ester üretimi incelenmiş, ortamdan yan ürün olan metanolün uzaklaşmasına izin verildiğinde %83 olan denge dönüşümü %90’a çıkmıştır (Hallberg ve diğ. 1999).

Substrat olarak kolza yağı metil esterleri ve 2-etil-1-hekzanol kullanılarak Lipozyme TL IM ile vaks ester olan 2-etil-1-hekzil oleat üretimi çözücüsüz ortamda incelenmiş, %90 dönüşüm elde edilmiştir (Kleinaite ve arkadaşları, 2014).

Biyoyağlayıcı sentezinde substrat olarak AYAME kullanımının yanı sıra farklı yağ kaynaklarından elde edilen serbest yağ asitleri de kullanılarak çalışmalar yapılmıştır.

Akerman ve diğ. (2011), farklı yağ asitleri (oleik asit, vb.) ve TMP’nin transesterleşmesi ile TMP ester üretimini hem kimyasal katalizör hem de tutuklanmış lipaz katalizörlüğünde vakum basıncı altında çözücüsüz ortamda incelemişler, silika-sülfürik asit katalizörü ve Novozyme 435 lipazı, yağ asitlerinden biyoyağlayıcı üretiminde umut verici olarak değerlendirilmiştir.

2018 yılında Bedo ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise, izoamil alkol ile oleik asidin Novozyme 435 lipazı varlığında esterleşme tepkimesini çözücülü ortamda (n-hekzan ve iyonik çözücü[bmim]PF6) incelemişler, 40°C’de iyonik sıvı ortamında %90 ester verimi elde ettiklerini belirlemişlerdir. Mikrodalga yöntemi ile tepkime

ortamının ısıtılması ile lipaz aktivitesinin daha fazla korunduğunu ayrıca geleneksel ısıtmaya göre de 5. kullanımda %30 daha fazla aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir (Bedo ve diğ., 2018).

Oleyik asitin *Thermomyces lanuginosus* lipazı katalizörlüğünde isoamil alkol ile esterleşmesiyle %85 oleyik asit dönüşümü (Lage ve diğ. 2016) elde edilirken, n-oktanol ile esterleşmesiyle dönüşüm %90 olmuştur (Bassi ve diğ. 2016).

Duarte ve diğ., 2017'de yaptıkları çalışmada kastor (hint) yağının enzimatik hidrolizi ile elde edilen serbest yağ asitlerinin trimetilolpropan TMP, pentaeritritol (PE) ve neopentilglikol (NPG) ile esterleşme tepkimelerini incelemişlerdir. Kastor yağ asitlerinin risinoleik asit açısından zengin olduğu belirtilmiştir. Hidroliz tepkimesinde kastor çekirdekleri kullanılmış, 1 saatlik hidroliz için serbest yağ asidi verimi %94 elde edilmiştir. Esterleşme tepkimelerinde üç farklı enzim türü (Novozyme 435, Lipomod 34 MDP, Lipozyme RM-IM) kullanılmıştır. 96 saatlik esterleşme tepkimesi sonucunda en uygun enzim Lipomod olarak belirtilmiştir. En yüksek serbest yağ asidi dönüşümleri NPG için %90,2, TMP için %90,7 ve PE için %74,9 olarak elde edilmiştir.

Cavalcanti ve diğ., 2018 yılında yaptıkları çalışmada soya yağı yağ asitlerinin farklı alkoller (TMP, PE ve NPG) esterleşmesini farklı lipazlar (Lipomod 34 MDP (serbest *Candida rugosa*), Lipozyme RM-IM, Novozyme 435) varlığında incelemişlerdir. 24 saatlik esterleşme tepkimesi sonucunda en yüksek dönüşüm *Candida rugosa* varlığında NPG için %97, TMP için %100 ve PE için 55%, Novozyme 435 varlığında NPG için %65, TMP için %15 ve PE için %1, Lipozyme RM-IM varlığında sırasıyla %92, %39, %0 olarak belirlemişlerdir.

Fernandes ve diğ., 2018'de yaptıkları çalışmada, palm yağı serbest yağ asitleri ile NPG VE TMP arasındaki enzimatik esterleşme tepkimesine etki eden parametreleri (yağ asidi/alkol mol oranı, sıcaklık ve enzim miktarı) incelemişlerdir. Deneysel çalışmalar sonucunda, %4 Lipomod 34MDP varlığında, 45°C sıcaklıkta, TMP ve NPG kullanıldığında sırasıyla en yüksek dönüşüm değerlerini 10. ve 8. saatlerde %94 ve %87 olarak belirlemişlerdir.

Fernandes ve diğ. 2020 yılında yayınladıkları çalışmada ise aynı alkoller için *Candida rugosa* lipazı ile esterleşme tepkimelerini incelemişlerdir. Lipazın tutuklanmasının ardından soya yağı serbest yağ asidi distilatı çözücüsüz ortamda TMP ve NPG kullanılarak esterleştirilmiştir. Sonuçta tekrarlı kullanımda liyofilize lipazın hem serbest

hem de tutuklanmış halde aktivitesini büyük ölçüde koruduğu, elde edilen esterlerin petrol temelli yağlayıcılarla yarışabilir tribolojik özelliklere sahip olduğu vurgulanmıştır.

Kim ve diğ., 2019 yılında yaptıkları çalışmada Duolite A578 de tutuklanmış Lipozyme TL 100 L katalizörlüğünde TMP ile yüksek oleik asit içerikli palm yağı serbest yağ asitlerinin esterleşme tepkimesine etki eden parametreleri (sıcaklık, enzim miktarı) incelemişlerdir. Farklı enzimlerle triester dönüşümü üzerine çalışılmış sadece Novozyme 435 ve tutuklanmış *Thermomyces lanuginosus* lipazı triester üretebilmiştir. Deneysel çalışmalarda 9 saatlik esterleşme tepkimesi sonucunda en yüksek ester dönüşümünü %95 olarak 60°C sıcaklıkta, %15 enzim varlığında, 0,7kPa vakum altında ve SYA/alkol mol oranı 3/1 iken elde etmişlerdir. Yüksek vakum altında suyun ortamdan uzaklaşması nedeniyle enzim aktivitesini yitirmiştir. 60°C'den 70°C'ye çıkıldığında dönüşümde belirgin bir artış gözlenmemiş, 80°C'ye ulaşıldığında ise enzimin denatüre olmasıyla dönüşümde düşüş gözlenmiştir. Ester içeriği gaz kromatografisi ile hesaplanmıştır. Elde edilen TMP triesterin fiziksel özellikleri, kimyasal katalizle sentezlenmiş ticari bir TMP triester ile karşılaştırılmıştır. Ticari ürün ile vizkozite, viskozite indeksi, akma noktası ve bulutlanma noktası değerlerinde aynı sonuçlara ulaşılmış ve renk konusunda 6 kattan daha düşük bir değer ile iyileşme sağlanmıştır.

Palm yağının kullanıldığı başka bir çalışmada, palm stearinin metanol ile transesterleşmesi ile palm yağı metil esterleri sentezlenerek biyoyağlama yağı olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda, 60°C tepkime sıcaklıkta, 1:4 yağ:alkol mol oranı, %6 *Candida rugosa* lipazı varlığında %95 dönüşüm elde edilerek yüksek indeksli yağlama yağı elde ettiklerini belirtmişlerdir (Afifah ve diğ., 2019).

Doğrudan yağın kendisinin substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda ise hem kimyasal hem enzimatik katalizörler kullanılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır.

Palm yağı ve oleyil alkolün çözücü ortamında Lipozyme RM IM katalizörü varlığında transesterleşmesiyle palm yağı esterlerinin üretiminin incelendiği başka bir çalışmada estere dönüşüm %80 olmuştur. Esterin yoğunluk, refraktif indeks, yüzey gerilimi, iyodin değeri, asit değeri, sabunlaşma değeri gibi özellikleri de ASTM standartlarına uygun olarak ölçülmüştür (Keng ve ark. 2009).

Bitkisel yağdan (kolza yağı) biyoyağlayıcı üretiminin incelendiği bir çalışmada, kolza yağı 2-etil-1-hekzil esterleri için verim kimyasal katalizle %97 iken *Candida rugosa* lipaz katalizle çözücüsüz ortamda %87 olarak belirlenmiştir (Lämsä ve diğ. 1995).

Sun ve diğ., 2017 yılında yaptıkları çalışmada, castor yağının farklı lipazlar varlığında (Novozyme 435, Lipozyme RM IM ve LipozymeTL IM) gliserol ile tepkimesini incelemişlerdir. Tepkimeye etki eden parametreler (su içeriği, enzim miktarı, tepkime sıcaklığı, asit/alkol mol oranı, tepkime basıncı) belirlenmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda kullanılan lipazlar arasında en yüksek dönüşümler Novozyme 435 varlığında elde edilmiştir. Ayrıca %5 enzim varlığında, 90°C sıcaklıkta yağ/alkol mol oranı 1/6 olduğu durumda %42,5 ester dönüşümü elde etmişlerdir. Elde edilen bu ester içeriğinin de %54'ü mono gliseril risinoleat ve %46'sının da digliseril risinoleat olduğunu belirlemişlerdir.

Ceron ve diğ., 2018'de yaptıkları çalışmada, palm kernel yağı ile harmanlanmış farklı alkoller (%11,2 etil alkol, %10,6 bütül alkol ve %78,2 isoamil alkol) arasındaki enzimatik esterleşme tepkimesini incelemişlerdir. Tepkimelerde katalizör olarak silika hidroksi selüloz matrikse tutuklanmış *Burkholderia cepacia* lipazı kullanılmıştır. Yağ/alkol mol oranı 1/4 olacak şekilde ayarlanmış, 48 saatlik kesikli sistemdeki tepkime sonucunda %99 dönüşüm elde edildiği belirtilmiştir. Sürekli proseste ise aynı dönüşüme 8 saatlik boşluk zamanı sonunda ulaşılmıştır.

Castor ve soya yağının kullanıldığı bir diğer çalışmada, sırası ile Lipozyme RM IM ve Novozyme 435 lipazları katalizörlüğünde neopentil glikol ile esterleşme tepkimesi araştırılmıştır. Tepkimeler sonucunda her iki yağın hammadde olarak kullanıldığı durumda %95'e yakın ester dönüşümü elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca lipazların 6 tekrarlı kullanımı sonucunda Novozyme 435'in aktivitesinin %70'ini koruduğu buna karşılık Lipozyme RM IM lipazının %90'ını koruduğu belirlenmiştir. Fiziksel özellik testleri sonucunda soya yağından elde edilen biyoyağlayıcının vizkositesinin castor yağından elde edilen yağlayıcıya göre daha iyi özellikte olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte castor yağından elde edilen yağlayıcının düşük akma noktası (-20°C) belirlenerek her iki yağlayıcının da farklı alanlarda geleneksel yağlayıcılar yerine kullanılabilirliği desteklenmiştir (Aguieiras ve diğ., 2020).

Palm kernel yağının simule edilmiş fuzel yağı [(etil (%11.2), bütül (%10.6) ve izoamil alkol (%78.2)] ile epoksi reçineye tutuklu *Burkholderia cepacia* lipazı varlığında transesterleşme tepkimesinin incelendiği bir diğer çalışmada, %99 dönüşümle izoamil

esterler elde edilgi belirlenmiştir. Elde edilen esterlerin fiziksel özellikleri incelendiğinde biyoyağlama yağı olarak kullanılabilirliği öngörülmüştür (Annie ve diğ., 2018).

Bazı çalışmalarda biyoyağlayıcı olarak kullanılabilir esterlerin sentezlenmesinde farklı substrat kaynaklarının kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmaların bazılarında gıda güvenliğine uygun ve gıda saflığında ürünler elde edilirken, bazılarında ise endüstriyel atık suların değerlendirilmesi ile çevreci yaklaşımlar açısından yol gösterici olmuşlardır.

Torres ve diğ., 2018 yılında yaptıkları çalışmada, nişasta ve ayçiçeği yağının sulu çözeltisini hazırlayarak emülsiyon elde etmişlerdir. Elde edilen emülsiyon partiküllere amilaz lipazı tutuklayarak enzim yapılı parçacıklar oluşturmuşlardır. Yağlama aşınma testine tabi tutmuşlar, biyoyağlama yağlarına katkı maddesi olarak kullanılabilirliğini öngörmüşlerdir.

Papadaki ve diğ., 2018'de yaptıkları çalışmada, şeker ve buğday endüstrisi atık sularında yetiştirilen 5 farklı maya ve 2 farklı bakteri türü yetiştirilmiştir. Bu türler arasından *Rhodospiridium toruloides*, *Cryptococcus curvatus* mayalarından elde edilen yağların serbest yağ asitleri ile TMP ve NPG arasındaki enzimatik (Lipomod 34 MDP) esterleşme tepkimesini çözücüsüz ortamda incelemişlerdir. Araştırmalar sonunda, mayalardan elde edilen karma serbest yağ asitleri ile NPG arasındaki 72 saatlik esterleşme tepkimeleri için en yüksek dönüşüm değerleri belirtilen mayalar için sırasıyla %88 ve %82,7 olarak elde edildiği raporlanmıştır.

Papadaki ve diğ., 2018 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada, gıda endüstrisi atık sularında yetişen farklı tür mayalardan elde edilen yağın setil(palmitil), oleyil ve behenil alkol varlığında enzimatik tepkimesini incelemişlerdir. Deneysel çalışmalar sonucunda, Novozyme 435 kullanıldığında en yüksek dönüşüm setil ve behenil alkol için sırasıyla %69,1 ile %87,3 olarak elde edilmiştir. Sıcaklık artışıyla dönüşümün arttığı ve en yüksek dönüşüme 70°C sıcaklıkta ulaşıldığı belirtilmiştir. Ayrıca Novozyme 435'in aynı tepkime için 3 tekrarlı kullanıldığında başlangıç aktivitesini koruduğu da belirtilmiştir.

TMP ester sentezinde atık kızartma yağlarının kullanıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Atık kızartma yağından kimyasal katalizle yağ asidi metil ester üretimi gerçekleştirilmiş, ortamdan ayrılan metil esterler vakum basıncındaki reaktöre sürekli

olarak beslenmiş, TMP ile baz katalizör (KOH) eşliğinde yüksek sıcaklıkta transesterleşme sonunda TMP yağ asidi triesterleri dönüşümü ürünlerin ağırlıkça %87,5'i kadar olmuş, saflaştırma basamaklarından sonra %99,6 saflıkta TMP triester elde edilebilmiştir (Wang ve diğ., 2014).

Atık kızartma yağlarının kullanıldığı bir diğer çalışmada, *Candida rugosa* lipazı ile atık yağın hidrolizi sonucu yağ asitleri elde edilmiştir. Yağ asitlerinin oktanol ile esterleşmesinde, kimyasal katalizör (Chowdhury ve diğ., 2012) ve Novozyme 435 lipazı (Chowdhury ve diğ., 2013) kullanılarak biyoyağlayıcı üretimi için Taguchi deneysel tasarım yöntemi (Chowdhury ve diğ., 2014) kullanılmış, %95,5 dönüşüm elde edilmiştir.

Zhang ve ark. 2020'de yayınladıkları çalışmalarında atık kızartma yağları kullanılarak enzimatik hidroliz sonucunda (*Candida sp.* 99-125) doymamış yağ asitleri elde edilmiş ve üre kompleksi oluşturulmuştur. Bu yağ asitleri Novozyme 435 katalizörlüğünde 2-etilhekzanol ile esterleştirildikten sonra oktanoik asit ve H₂O₂ ile epoksidasyonu sağlanan esterler nükleofilik bir ajan (oktanoik asit) ve 1-hekzil-3-metilimidazolium hekzafluorofosfat [HMI][PF₆] katalizörü ile dioktilatlanmış dallanmış biyoyağlayıcı sentezi gerçekleştirmişlerdir. %81,2 dönüşümle elde edilen biyoyağlayıcının aynı viskozitedeki petrol temelli yağlayıcıdan oldukça üstün özelliklerde performans gösterdiği vurgulanmıştır.

Yağ kaynağı olarak bitkisel yağlar ve bu yağların serbest yağ asitleri ya da metil esterleri kullanılabildiği gibi atık kızartma yağlarının da substrat olarak kullanıldığı enzimatik tepkimeler üzerine de sınırlı sayıda çalışmalar yapılmıştır. Biyoyağlayıcı üzerine yapılmış çalışmalardan bazıları Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Biyoyağlayıcıların enzimatik sentezi üzerine yapılmış çalışmalar

Yağ Kaynağı	Alkol türü	Sıcaklık (°C)	Enzim miktarı (%)	Tepkime süresi (saat)	Dönüşüm (%)	Kaynak
Kolza yağı	TMP	58	40	24	75	(Linko ve diğ. 1997)
Kolza yağı	TMP	37	40	24	95	(Uosukainen ve diğ. 1998)
Kaprilik asit	TMP	40	16	24	93	(Tao ve diğ. 2012)
Oleik asit	TMP	30	1	18	86	(Trivedi ve diğ. 2015)
Kastor yağı	TMP	40	0,4	-	80	(Diaz, ve diğ. 2017)
Oleik asit	İzoamil alkol	45	20	0,5	85	(Lage ve diğ. 2016)
Kastor yağı	TMP/PE/NPG	40	4	96	16/55/0	(Duarte ve diğ. 2017)
Palm kernel yağı	Simule fuzel yağı	45	500U/g yağ	48	99	(Ceron ve diğ. 2018)
Atık kızartma yağı	Oktanöl	60	5	30	95	(Chowdhury ve diğ. 2013)
Atık kızartma yağı	2-etilhekzanöl	50	5	12	98	(Zhang ve ark. 2020)
Atık kızartma yağı	TMP	50	5	48	90	Bu çalışma

Biyoteknoloji araştırma grubumuz tarafından konu ile ilgili yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Lipozyme TL IM katalizörlüğünde atık yemeklik yağların hidroliziyle yağ asitleri üretim çalışmaları 2016 yılında başlamış olup, elde edilen ön deneme sonuçlarına göre yağ asidi içeriği %32 olarak belirlenmiştir. (Güler vd. 2016; Karasungur vd., 2016). Atık yağdan elde edilen yağ asitlerinin Novozyme 435 katalizörlüğünde TMP ile transesterleşmesi sonucu biyoyağlama yağı olarak kullanım potansiyeli olan TMP esterleri üretilmiş, tepkimede toplam yağ asidi dönüşümü %90 olarak belirlenmiştir

(Kutluk, 2016). Atık yağların metanol ile transesterleşmesi için *Thermomyces lanuginosus* lipazı kullanılarak yağ asidi metil ester içeriği %98 olarak belirlenmiştir (Kutluk, 2013). TMP esterleri, oleyik asitin tutuklanmış *Thermomyces lanuginosus* lipazı kullanılarak TMP ile esterleşmesi sonucu üretilmiş, tepkimede oleyik asit dönüşümü %90 olarak belirlenmiştir (Kutluk, 2012). Elde edilen TMP esterlerinin yağlama özellikleri için herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

2.1. Tez Çalışmasının Literatüre Yapacağı Katkı

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, literatürde atık yağlardan lipaz katalizli biyoyağlayıcı üretimine dair sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Atık yağdan elde edilen yağ asidi metil esterlerinden TMP esterlerinin (biyoyağlama yağı) üretimi ile ilgili olarak yer alan tek bir çalışmada kimyasal katalizörler kullanılmıştır. Atık yağdan enzimatik biyoyağlama yağı üretimine yönelik ise tek bir çalışma yer almakta; *C. rugosa* ile enzimatik hidroliz sonrası elde edilen yağ asitleri, Novozyme 435 kullanılarak oktanol ile esterleştirilerek biyoyağlama yağı üretilmiştir. Ancak her iki çalışmada da elde edilen biyoyağlama yağının yağlama ile ilgili fiziksel özellikleri analiz edilmemiştir.

Bu tez çalışmasında, literatürdeki çalışmalardan farklı olarak ilk defa atık yağ serbest yağ asitlerinin farklı alkoller (TMP, oleyil alkol, stearil alkol ve bütanol) ile çevre dostu bir proses ile lipaz katalizli (Novozyme 435) esterleşmesiye biyoyağlama yağı sentezlenmiştir. Ayrıca atık yağ asidi metil esterlerinin (AYAME) serbest lipazlar (Novozyme 51032 ve Resinase HT) ve ticari tutuklanmış lipazlar (Lipozyme TL IM ve Novozyme 435) katalizörlüğünde TMP ile transesterleşme tepkimesi sonucunda biyoyağlama yağı sentezlenmiştir. Yukarıda bahsedilen tüm tepkimelere etki eden parametreler (lipaz miktarı, SYA/alkol mol oranı, AYAME/alkol mol oranı, başlangıç su içeriği, sıcaklık) ele alınmıştır. Kullanılan alkol türünün ester içeriğine etkisi değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra sentezlenen biyoyağlama yağlarının mono, di, tri ester içerikleri de detaylı bir şekilde irdelenerek en uygun tepkime koşulları istatistiksel olarak belirlenmiştir. Belirlenen koşullarda sentezlenmiş biyoyağlama yağının fiziksel özellikleri belirlenmiş hali hazırda ticari olarak üretilen petrol kökenli yağlama yağları ile yarışabilirliği değerlendirilmiştir.

Bu çalışma ile geniş kapsamlı irdelenen çevre dostu proses ile atık yemeklik yağdan biyoyağlama yağlarının üretimi ve fiziksel özelliklerinin belirlenmesinin literatürdeki boşluğu doldurarak katkı sağlaması öngörülmektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Malzemeler

Atık kızartma yağları lokal restoranlardan temin edilmiştir. Kullanım öncesi atık kızartma yağında bulunan safsızlıklar (pişirme sonrası yağda kalan katı tanecikler) filtre kâğıdı kullanılarak vakum pompası yardımıyla nüçe erleninde süzölmüş, içeriğindeki su ise 105°C’de ısıtılarak uzaklaştırılmıştır.

Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*), Novozyme 435 (*Candida antarctica B*) Novozyme 51032 (*Humicola insolens*) ve Resinase HT (*Aspergillus oryzae*) lipazları Novozyme firmasından temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan diğer tüm kimyasallar Merck ve Sigma Aldrich firmalarından satın alınmıştır.

3.2. Deneysel Yöntem

Çalışmada hem atık yemeklik yağlar hidroliz edilerek serbest yağ asitleri (SYA) elde edilmiş, hem de atık yağın transesterleşmesi ile yağ asitleri metil esterleri (AYAME) sentezlenmiştir. Elde edilen SYA ve AYAME lipaz katalizli biyoyağlayıcı üretiminde ayrı ayrı girdi olarak kullanılmıştır. Her bir üretim için etki eden parametreler araştırılarak uygun değerleri belirlenmiştir. Aynı zamanda Yanıt Yüzey Yöntemi Kullanılarak SYA ve AYAME’den biyoyağlayıcı üretimi modellenmiştir.

3.2.1. Atık yemeklik yağdan serbest yağ asitleri üretimi

Atık yağların hidroliz tepkimesi ile serbest yağ asitleri (SYA) üretilmiştir. Elde edilen SYA biyoyağlayıcı üretiminde tepkime girdisi olarak kullanılmıştır. Lipozyme TL IM katalizörlüğünde atık yağın hidrolizine etki eden tepkime parametreleri (yağ/su oranı (%w/w), enzim miktarı, sıcaklık, karıştırma hızı) incelenmiştir. Tepkimeler IKA marka çoklu ısıtıcı manyetik karıştırıcılarda 100 ml’lik ağzı kapalı erlenlerde eş zamanlı yürütölmüştür. Hidroliz tepkimesi için en iyi koşullar belirlenmiştir. En iyi koşullarda biyoyağlama yağı üretiminde kullanılmak üzere 500 ml kapasite ile serbest yağ asitleri üretilmiştir. Yağ asitleri ikinci ürün olan gliserolden ayırma hunisi kullanılarak ayrılmıştır. Tepkime deney düzeneği Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Atık yağın hidrolizi ile serbest yağ asitleri üretimi

3.2.2. Atık yemeklik yağdan yağ asidi metil ester (AYAME) üretimi

Atık yağın metanol ile lipaz katalizli tepkimesi sonucu yağ asidi metil ester üretimi laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalar (Kutluk, 2013) ile belirlenen en uygun koşullarda (200 rpm karıştırma hızı, 1/4 yağ/metanol, %15 başlangıç su miktarı, 35°C sıcaklık, %5 Lipozyme TL IM) sentezlenmiştir.

3.2.3. Atık yağ serbest yağ asitlerinden biyoyağlama yağı üretimi

Atık yağdan elde edilen SYA'ların TMP/bütanol/oleyil alkol ile esterleşme tepkimesinde Novozyme 435 tutuklanmış lipazı katalizörlüğünde tepkime parametrelerinin (enzim miktarı, başlangıç su miktarı, yağ asidi/alkol mol oranı, sıcaklık, karıştırma hızı, zaman) etkilerini belirlemek amacı ile deneyler, oluşan suyun uzaklaşması için ağzı açık 100 ml'lik erlenlerde IKA çalkalamalı inkübatörde yapılmıştır (Şekil 3.2).

Tepkimede katalizör olarak görev yapan enzim için en uygun miktarın belirlenmesi amacı ile belirli oranlarda (%1-5-10-15-20-25) enzim kullanılarak, 40°C sıcaklıkta, 3/1 yağ asidi/TMP (ya da 1/1 yağ asidi/stearil alkol) mol oranında, 400 rpm karıştırma hızında deneyler yapılmıştır. En uygun enzim miktarı belirlendikten sonra en uygun değerler sabit tutulup diğer parametreler değiştirilerek deneylere devam edilmiştir. Başlangıç su miktarı (% 1-5-10-15), yağ asidi/TMP mol oranı (1/3-1/4-1/5-1/6), sıcaklık (30-40-50-60)°C, karıştırma hızı (200-300-400-500)rpm basamaklarında deneyler yapılarak en uygun tepkime parametreleri belirlenmiştir.

Ayrıca, Novozyme 435 katalizörlüğünde gerçekleşen atık yağ serbest yağ asitleri ile TMP arasındaki esterleşme tepkimesi için istatistiksel bir deney tasarımı yöntemi olan RSM (Yanıt Yüzey Yöntemi) kullanılarak ester dönüşümü üzerine iyileştirme de yapılmıştır.



Şekil 3.2. IKA marka inkübatör

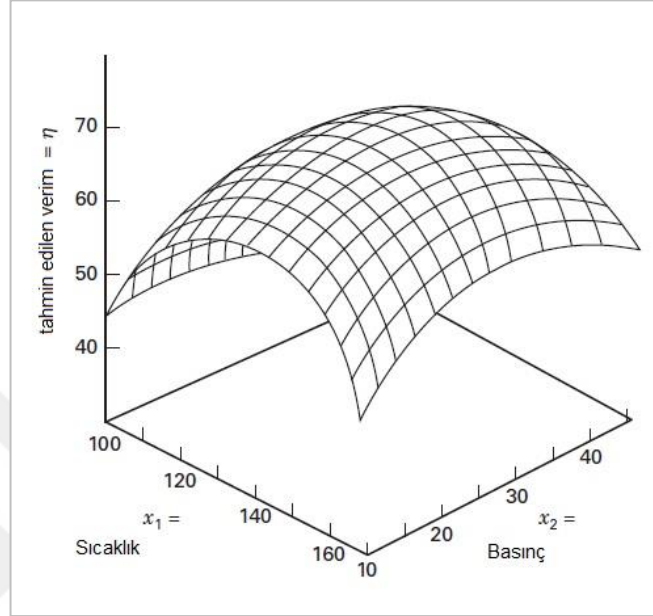
3.2.4. RSM kullanılarak atık yağdan elde edilen SYA ve AYAME'den biyoyağlayıcı üretiminin modellenmesi

Optimizasyon yani başka bir deyişle en uygunlaştırma bir prosesin belirlenen hedefleri doğrultusunda bağımsız değişkenlerin tekil ve birbirleri arasındaki etkileşimlerin hedefe/hedeflere olan etkisinin değerlendirilmesi ve bir araya getirilerek uygulanmasıdır.

Amaç, hedef yani yanıtın bulunduğu noktadan en iyileştirileceği noktaya taşınması amacıyla bağımsız değişkenlerin yer aldığı bir matematiksel model çalışması yapmaktır (Koç ve Ertekin, 2009). RSM (Yanıt Yüzey Yöntemi) bu amaçla en çok tercih edilen, matematiksel ve istatistiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntemdir. Üretimde verimin artırılması, kalitenin iyileştirilmesi ya da maliyetlerin düşürülmesi gibi nedenlerle tercih edilerek ekonomik bir çalışma yapılmasına olanak sağlar.

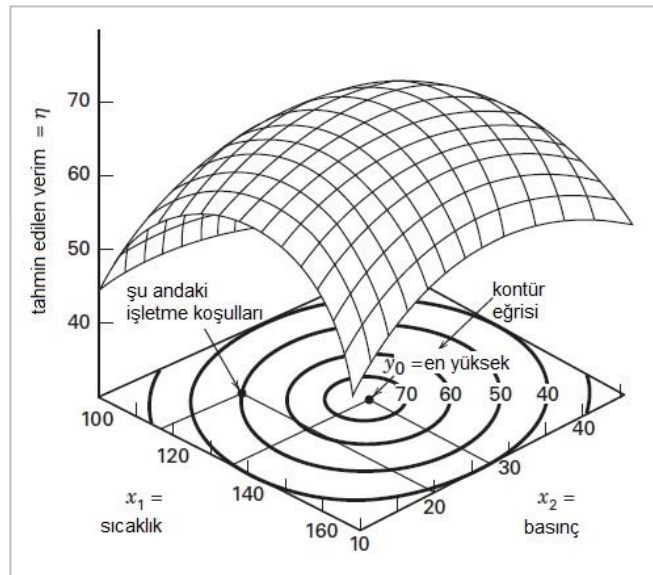
RSM, matematiksel ve istatistiksel tetkikler kullanılarak problemin modellenmesi ve analiz edilmesini sağlarken çeşitli değişkenlerin de bu sonuçlara olan etkilerini ortaya

koyabilmeyi sağlar. Amaç, birkaç bağımsız değişkenin (girdi değişkenleri veya faktörler) etkilediği yanıtın (çıktı değişkenleri) optimizasyonudur. Yanıt yüzeyi genellikle Şekil 3.3'te verildiği gibi grafiksel olarak gösterilir. Grafik, yanıtın (η), x_1 ve x_2 arasındaki farklı değerlerini temsil eder.



Şekil 3.3. Örnek bir üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği (Montgomery, 2013)

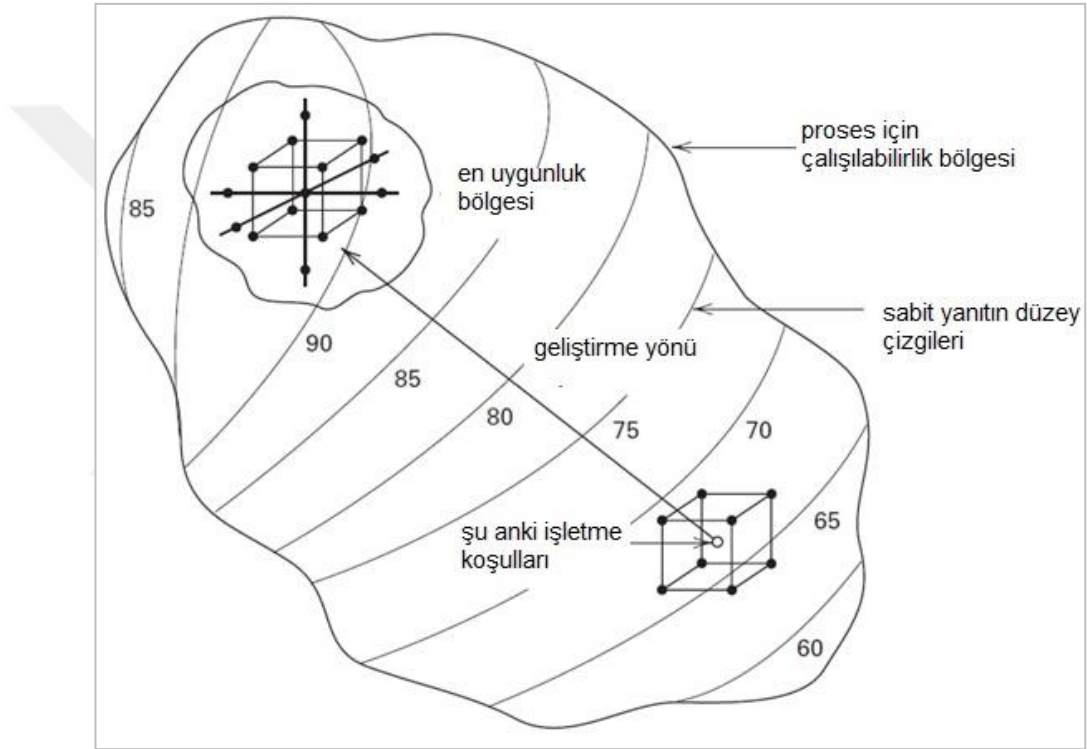
Kontür eğrileri eklenerek yanıt yüzeyinin daha iyi anlaşılması ve şeklinin görünür kılınması sağlanır. Her bir kontür eğrisi yanıt yüzeyinin belirli bir yüksekliğini temsil eder (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Bir yanıt yüzeyinin kontür eğrileri (Montgomery, 2013)

Genellikle RSM çalışmalarında bağımsız değişken ile yanıt arasındaki ilişkinin şekli bilinmez. Bu nedenle çalışmaya başlarken ilk adım yanıt ile bağımsız değişkenler kümesi arasında uygun bir yaklaşım bulmaktır. Çalışılan bağımsız değişkenlerin bazı bölgeleri düşük dereceli polinomlarla tanımlanabilir. Sistemde bir eğrilik varsa model 2. dereceden bir denklemle tanımlanır.

RSM ardışık bir yöntem olup, yanıt yüzeyinde herhangi bir noktada iken en uygun koşullardan uzaktadır. Bu nokta, Şekil 3.5'te “şu andaki işletme koşulları” olarak görülmektedir.



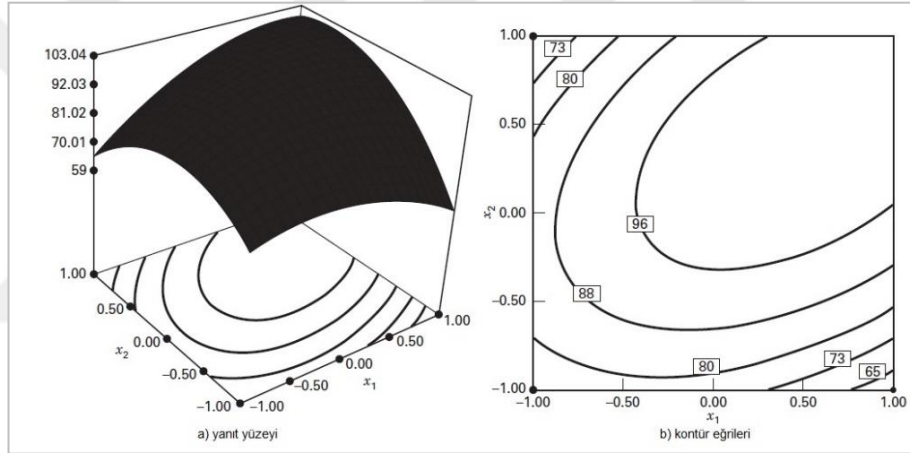
Şekil 3.5. RSM'nin ardışık doğası (Montgomery, 2013)

En uygun bölge bir kez tanımlandıktan sonra, model daha da detaylandırılarak (genellikle ikinci dereceden bir denklem ile) model en uygun noktaya taşınır. Şekil 3.5'ten görüleceği üzere bu bazen en tepe noktasından en yüksek yanıtın alındığı “tırmanan bir tepe” olacağı gibi, en düşük nokta en uygun yanıtın alındığı yer ise “bir vadiye iniş” olarak tanımlanabilir. RSM'nin nihai amacı en uygun işletme koşullarının tespit edilmesi ya da çalışma gereksiniminin olduğu tatmin edici bir faktör boşluğu bölgesinin tanımlanmasıdır (Montgomery, 2013; Myers, 2004).

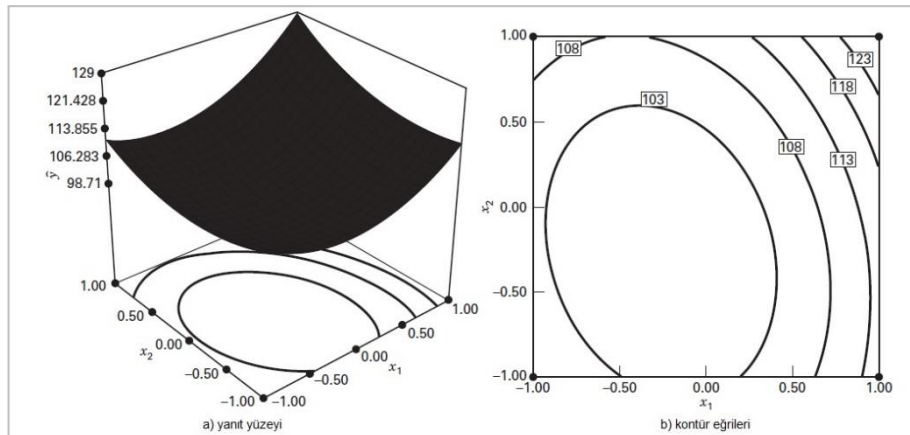
Genellikle, ilk tahmin optimum noktadan oldukça uzaktadır. Hızlı ve etkin bir tahmin ile optimum bölgeye yaklaşmak için basit ve ekonomik bir yöntem kullanılmalıdır.

Birinci dereceden bir model ile x 'lerin küçük bölgesinde gerçek yüzeye yeterli bir yaklaşım sağlamak mümkündür. Bu yöntem “en dik çıkış yöntemi” olarak adlandırılır. Yanıtın maksimum artışı yönünde adım adım ilerlenerek sonuca ulaşılır. Bu yöntem bölge araştırması için oldukça önemlidir (Myers, 2004). Elde edilen birinci dereceden modelin uygunsuzluk testi yapılarak modelin yeterliliği incelenir. Sonucu kesinleştirmek için daha fazla deney yapılmalıdır.

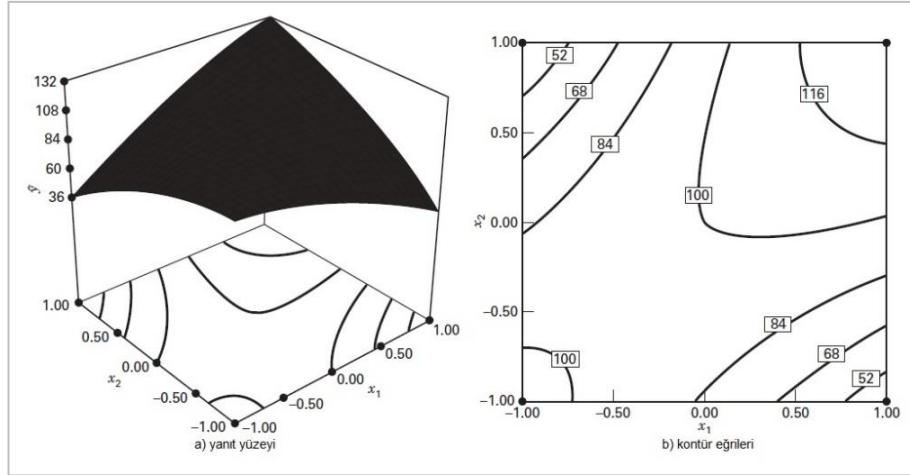
Eğer çalışmacı nispeten optimuma yakın bir noktada ise yanıt yüzeyi genellikle kavisli bir yapıda olur. Çoğunlukla 2. dereceden bir model yaklaşık bir optimum noktayı tanımlamak için yeterlidir. Bu yanıt yüzeyinde “kararlı nokta” olarak tanımlanan yer ise maksimum yanıt, minimum yanıt ya da eyer noktasına karşılık gelir. Bu terimlere karşılık gelen yanıt yüzeyleri ve kontür eğrileri Şekil 3.6, 3.7 ve 3.8 ile verilmiştir.



Şekil 3.6. Maksimum için yanıt yüzeyi ve kontür eğrileri (Montgomery, 2013)



Şekil 3.7. Minimum için yanıt yüzeyi ve kontür eğrileri (Montgomery, 2013)



Şekil 3.8. Eyer noktası için yanıt yüzeyi ve kontür eğrileri (Montgomery, 2013)

Kontür eğrileri yanıt yüzeyinin şeklini belirlemek için oldukça önemlidir. Kullanılan bilgisayar yazılımları bu kontür eğrilerini kullanarak yanıt yüzeyinin şeklini karakterize ederken optimum noktayı makul bir hassasiyetle (reasonable precision) konumlandırmaya olanak tanır.

Elde edilen model ANOVA (Analysis of Variance) ile test edilerek doğruluğu ve geçerliliği hakkında bir değerlendirme yapılır. Ardından modele anlamlı etkisi olan en önemli parametreler ve bunlar arasındaki etkileşimlerin sayısal ve grafiksel olarak optimizasyonu gerçekleştirilir.

Bu çalışmada atık yağ SYA ve AYAME'den biyoyağlama yağı üretimi RSM kullanılarak esterleşme ve transesterleşme tepkimeleri için en uygun koşullar belirlenmiştir. SYA için Novozyme 435 lipazı varlığında AYAME için Novozyme 51032 ve Resinase HT lipazları varlığında optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Serbest lipazlar kullanılması sonucu düşük ester verimi alınmasından dolayı Novozyme 435 ve Lipozyme TL IM lipazları ile optimizasyon yapılarak yüksek ester içerikli biyoyağlama yağları sentezlenmiştir.

Tepkimeye etki eden parametre veya değişkenlerin etkilerini incelemek ve ardından sürecin optimize edilmesinde Design Expert 7.0.0 paket programı içerisindeki RSM ile birlikte Merkezi Kompozit Tasarım (CCD: Central Composite Design) kullanılmıştır. Bu yöntem, ikinci dereceden bir yüzeyin fit edilmesi için uygundur ve minimum sayıda deney ile etkin parametrelerin optimize edilmesine yardımcı olur. Aynı zamanda değişkenler arasındaki etkileşimi analiz etmeye yardımcı olmaktadır. Tepkime parametrelerinin esterleşme verimi üzerindeki etkilerini tanımlamak için, programın

önerdiği CCD'ye dayalı olarak seri deneyler yapılmıştır. Çıktılar programa tanımlanarak Denklem 3.1 temelinde değişkenlerin kodlanmış değerleri belirlenmiştir.

$$x_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x} \quad (3.1)$$

i değişkeninin x_i - kodlu değeri, X_i - kodlanmamış i'inci değeri, X_0 test değişkeninin kodlanmamış değeri ve i merkez noktasıdır. Bir ikinci mertebeden polinom denklemi (Denklem 3.2); bağımsız değişkenlerin bir fonksiyonu olarak esterleşme verimini (Y) ifade etmek için kullanılmıştır.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{i=1}^k b_{ij} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k b_{ij} X_i X_j + e \quad (3.2)$$

burada Y, tepki faktörüdür (% verim, SYA (ya da AYAME) dönüşümü) ve i ve j sırasıyla doğrusal ve ikinci dereceden katsayıları temsil eder; b_0 kesişim, b_i birinci dereceden model katsayısı, k faktörlerin sayısı ve e rastgele bir sayıdır.

Regresyon analizi, yanıt fonksiyonunu bir ikinci dereceden polinom olarak tahmin etmek için yapılmıştır. Elde edilen verilerin regresyon analizi ve regresyon denkleminin katsayı değerinin tahmin edilmesi program yardımıyla yapılmıştır. Modelin yeterliliğini belirlemek için varyans analizinde (ANOVA) modeli kullanılmıştır. Test değişkenlerinin ester verimi üzerindeki bireysel ve etkileşimli etkilerini belirlemek için tepki yüzeyleri oluşturulmuştur (Russel 2009 et al.).

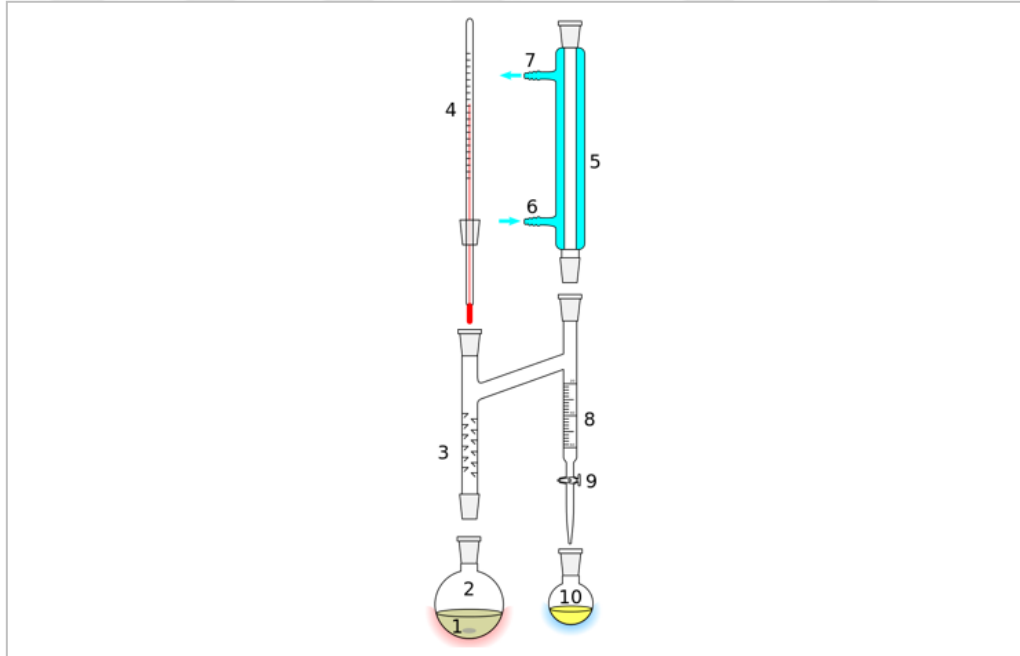
Ön denemeler sonucunda yanıtı etki eden bağımsız değişkenler her bir deney seti için ayrı ayrı değerlendirilerek en önemli dört faktör seçilmiştir. Novozyme 435 varlığında gerçekleştirilen esterleşme tepkimesine etki eden dört önemli faktör (sıcaklık, başlangıç su içeriği, enzim miktarı ve SYA/TMP mol oranı) yapılan ön deneyler sonucunda bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. AYAME/TMP transesterleşme tepkimelerinde her bir set için yanıtı etki eden dört önemli faktör serbest lipazlar için (enzim miktarı, başlangıç su içeriği, AYAME/TMP mol oranı, sıcaklık) belirlenmiştir. Novozyme 435 katalizörlüğündeki AYAME/TMP transesterleşmesi için başlangıç su içeriği yerine tepkime süresi bağımsız değişken olarak seçilmiştir.

Tepkime süresi ön denemeler için 24 saat olarak belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin birleşmiş etkileri incelendiğinde, ester verimleri (SYA dönüşümü ya da AYAME dönüşümü) ampirik modeli geliştirmek için kullanılan yanıt (bağımlı)

değişkendir. En yüksek yanıt değeri için en iyi koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. CCD genelde altı merkezli bir tasarım olur, $2n$ faktöriyel çalışma ve $2n$ aksenel koşul içerir, burada n faktör sayısıdır. Deneyler 25ml'lik ağzı açık erlenlerde IKA marka çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Tepkimeye etki eden parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerlerini gösteren program ekran görüntüsü, Novozyme 435 katalizörlüğünde SYA için EK A Tablo A.1'de ve AYAME'den biyoyağlayıcı üretimi için ise, Novozyme 435, Resinase HT, Novozyme 51032, Lipozyme TL IM katalizörü varlığında sırasıyla, EK-A Tablo A.2-A.5'de verilmiştir. Tablo A.6'da ise, programın öngördüğü 30 deney setinin kodlanmış değerlerle matris ekran görüntüsü yer almaktadır.

3.2.5. Dean Stark sistemi ile en iyi koşullarda biyoyağlayıcı üretimi

AYAME ile TMP arasındaki transesterleşme tepkimesi sonucu metanol açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan bu yan ürünün eş anlı olarak bu sistemde ortamdan ayrılarak ileri yönlü tepkime veriminin artırılması sağlanır. Deney tasarımı sonucunda kullanılan modelin önerdiği bazı tepkimeler Dean Stark sistemi (Şekil 3.3) ile üç boyunlu erlenlerde sisteme sabit vakum uygulanarak (100 mbar) çalışılmıştır.



Şekil 3.9. Dean Stark sistemi 1. manyetik karıştırıcı/karıştırma granülleri, 2. balon, 3. ayırma kolonu, 4. termometre, 5. yoğunlaştırıcı, 6. soğutma suyu girişi, 7. soğutma suyu çıkışı, 8. büret, 9. musluk, 10. toplama kabı

3.3. Analiz Yöntemleri

Bulguların elde edilmesi sürecinde yapılan tüm analizler 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş olup, değerlerin aritmetik ortalamaları sonuçlara yansıtılmıştır. Buna bağlı olarak hata barlarındaki değişim $\pm\%3-5$ aralığındadır.

3.3.1. Lipaz aktivitesinin tayini

Zeytinyağı hidrolizi yöntemiyle serbest ya da tutuklanmış bir lipazın hidrolitik aktivitesi hesaplanabilir. Lipaz aktivitesi tayininde sıklıkla kullanılan bir yöntem olup uygulaması kolaydır. Bir ünite enzim (U), zeytinyağından 1dk'da 1 μ mol yağ asidi hidroliz eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Aktivite tayininde serbest enzimler sıvı ortamlarından doğrudan hacimce alınarak kullanılmış, tutuklanmış lipazlar ise hassas tartımla ölçülerek kullanılmışlardır.

25ml hacmindeki erlenlerde 2,5ml zeytinyağı ve 0,1M pH7.0 fosfat tamponundan 2,5ml alınarak 37°C sıcaklıktaki çalkalamalı inkübatöre alınmıştır. Tepkime ortamının bu sıcaklığa ulaşmasının ardından ortama enzim eklenmiştir. Enzim miktarı sıvı form lipazlar için 0,1ml ve katı form lipazlar için 0,1g olarak belirlenmiştir. Hidroliz, enzimin tepkime ortamına eklenmesi ile başlamış ve 30dk süreyle devam etmiştir.

Hidrolizi sonlandırmak için hacimce 1:1 oranında hazırlanmış eter/etanol karışımından 2,5ml tepkime ortamına eklenmiştir. Tepkime ortamına 3 damla %1'lik fenoltalein indikatörü damlatılarak 0,1M NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Her bir lipaz için üçer tekrar yapılarak harcanan NaOH çözeltisi miktarından yola çıkılarak aşağıdaki eşitliklere göre hesaplanmıştır (Stoytcheva ve diğ., 2012, Özgen 2013).

$$\frac{U}{\text{ml enzim}} = \frac{(\text{Örnek, ml}_{\text{harcanan}} - \text{şahit, ml}_{\text{harcanan}})_{(\text{NaOH})} \times [\text{NaOH}] \times 1000}{(V_{\text{enzim, ml}}) \times t} \quad (3.3)$$

$$\frac{U}{\text{mg enzim}} = \frac{(\text{Örnek, ml}_{\text{harcanan}} - \text{şahit, ml}_{\text{harcanan}})_{(\text{NaOH})} \times [\text{NaOH}] \times 1000}{(m_{\text{enzim, mg}}) \times t} \quad (3.4)$$

Lipaz aktivite değerleri, U/ml enzim ve U/mg enzim cinsinden verilmiştir. Örnek hesaplama EK-A'da verilmiştir.

3.3.2. SYA içeriği tayini

Hidroliz ve esterleşme tepkimeleri sonucunda oluşan ve tepkimelerde girdi olarak kullanılan SYA miktarı ASTM-D5555-95 standardına göre NaOH çözeltisi ile titre edilmiş ve Denklem 3.5'e göre hesaplanmıştır. Örnek hesaplama EK-B'de verilmiştir.

$$\text{SYA içeriği (\%)} = (V \times N \times YMA) / (m \times 10) \quad (3.5)$$

V: Titrasyonda harcanan NaOH hacmi (ml)

N: NaOH normalitesi (mol/L)

YMA: Yağ asitlerinin ortalama molekül ağırlığı

m: Titre edilen örnek miktarı (g)

3.3.3. SYA bileşim tayini

Yağ asidi bileşimi alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 30 m x 320 µm x 0.25 µm kapiler kolon (CARBOWAX 20M) ile donatılmış olan Agilent marka 7820 A model gaz kromatografi (GC) cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Dedektör sıcaklığı 280°C ve split oranı 1:50'dir. Kolon sıcaklığı, 50°C'de 1 dakika beklemeden sonra dakikada 25°C/dk artışla 200°C'ye 3°C/dk artışla 230°C'ye ulaşılarak bu sıcaklıkta 18 dakika bekletilerek 40°C/dk artışla 280°C'ye çıkılarak ve bu sıcaklıkta da 3 dakika kalacak şekilde programlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. Yağ asitleri bileşiminin tayini için yağlar öncelikle metil esterleri haline getirilmiştir. Analiz edilecek örneğin hazırlanması için 0,1 gram yağ örneği, 20 ml'lik cam tüp içerisine tartılarak ve üzerine 10 ml n-hegzan ilave edilerek çözülmüştür. Daha sonra üzerine 100ml 2N metanolde çözülmüş potasyum hidroksit çözeltisi eklenip, vorteks karıştırıcıda 30 saniye karıştırılmıştır. Karışım 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek metil esterleri içeren üst fazdan 1µl hacminde enjeksiyon yapılmıştır (David ve diğ., 2005). EK-C'de referans alınan 37 bileşenli AYAME standardına ait kromatogram verilmiştir. Standarda ait kromatogramdaki alıkonma zamanları referans alınarak çalışmada kullanılan atık yağın SYA bileşimi tanımlanmıştır.

3.3.4. Yağ asidi karışımı ortalama molekül ağırlığının belirlenmesi

Tüm yağ asitlerinin yağ kaynağı birbirinden farklı olduğu için bileşimleri de birbirinden farklıdır. Yağ asitleri, zincir uzunluğu ve çift bağ sayısı gibi yapısal değişiklikler gösteren doğrusal karbon zincirlerinden oluşur. "n" sayıda karbon içeren doymuş bir yağ asidinin temel formülü $(CH_2)_{n-2}-COOH$ 'dir. Hayvansal veya bitkisel kökenli yağın moleküler ağırlığı, yağ asidi profiline bağlıdır. Yağ asidi profili gaz kromatografisi

kullanılarak belirlenir ve yağ asidi profili bilinen yağın ortalama moleköl ağırlığı buna göre hesaplanabilir (Singh, 2010). Tek bir yağ asidinin moleköl ağırlığı Denklem 3.6 yardımı ile hesaplanabilir.

$$\text{Moleköl Ağırlığı} = 14.027C - 2.016d + 31.9988 \quad (3.6)$$

Denklemde "C" karbon sayısı ve "d" çift bağ sayısıdır. Yağ asidi karışımının ortalama moleköl ağırlığı Denklem 3.7'ye göre hesaplanmıştır. Örnek hesaplama EK C'de verilmiştir.

$$\text{Yağ asitlerinin ortalama moleköl ağırlığı} = \sum f_i / \sum \frac{f_i}{MA} \quad (3.7)$$

3.3.5. AYAME analizi

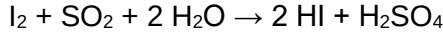
Transesterleşme tepkimesi sonucunda elde edilen karışımdaki AYAME miktarı, alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 30m x 320µm x 0.25µm kapiler kolon (CARBOWAX 20M) kullanılarak Agilent 7820 A model (Gaz Kromatografisi) GC analiz sistemi ile tayin edilmiştir. Analizlerde, EN 14103 standardına uygun olarak metilheptadekanoat iç standardı kullanılmıştır. Tepkime ortamı santrifüj ile fazlarına ayrıldıktan sonra üst fazdan kütlesi belirli örnek, derişimi belirli iç standart çözeltisi içinde seyreltilmiş ve kolona verilmiştir. AYAME içeriği EK-D'de verilen denklem yardımıyla örnek hesaplamaya uygun olarak belirlenmiştir.

3.3.6. Mono di tri ester analizi

Esterleşme tepkimesi sonucunda, mono-di-tri ester bileşimleri, alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve (12 m x 530 µm x 0.15 µm) SGE HT-5 marka kapiler kolon ile donatılmış olan Agilent marka 7820 A model gaz kromatografi cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Enjeksiyon sıcaklığı 300°C ve split oranı 1:10'dur. Kolon sıcaklığı, 80°C'de 3 dakika beklemeden sonra dakikada 6°C artarak 340°C'ye çıkarılmıştır. Bu sıcaklıkta 6 dakika bekletilerek analiz tamamlanmıştır. Dedektör sıcaklığı 360°C ve taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. Analiz edilecek örneklerden, 0,03 gram alınarak 1ml etil asetat içinde çözülmüştür. Daha sonra 0,5 ml BSTFA içine alınmış ve vortekste karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti 40°C su banyosunda 10 dakika bekletildikten sonra analiz edilmiştir (Yunus ve diğ., 2002). Örnek kromatogram ve hesaplama EK-E'de verilmiştir.

3.3.7. Su içeriği tayini

Reaktanların başlangıçta içerdği su (nem) miktarı Mettler Toledo marka Karl Fischer (KF) V20 model volumetrik nem tayini cihazı ile belirlenmiştir. Miktarı bilinen herhangi bir sıvı ya da katı örnekteki nem miktarı 100ppm-%100 aralığında tayin edilebilmektedir. R. W. Bunsen tarafından tanımlanmış aşağıdaki tepkimeye göre hesaplama yapılmaktadır:



İyot, büret yardımıyla titrasyon boyunca ortama eklenir. Volumetrik nem tayininde su ortamdaki temel ve büyük bileşenlerden biridir. Daha düşük miktarlar için (1ppm-%5) koulometrik Karl Fischer titrasyonu yapılmalıdır.

Volümetrik titrasyon analizinde kullanılan KF çözeltileri, Hydranal Solvent Oil ve Hydranal Titrant çözeltileridir. Karl Fischer hücrelerine çözücü konur ve çözücü su içeriği titrant çözeltisi kullanılarak giderilir. Daha sonra bir enjektör kullanılarak belli miktarda saf su ya da örnek KF hücrelerine eklenir. Enjeksiyon öncesi ve enjeksiyon sonrası tartım değerleri kullanılarak örnek miktarı belirlenir ve titrasyon sırasında cihaza girilir. Sonuçlar istenilen birimde alınır.

3.3.8. Biyoyağlama yağı fiziksel özelliklerinin analizi

Yağlayıcıların fiziksel özellikleri performanslarını önemli ölçüde etkiler. Bunlar arasında en önemlileri 40°C ve 100°C vizkosite değerleri, viskosite indeksi, akma noktası ve parlama noktasıdır.

Yağ asitlerinin ve bitkisel yağların viskozitesi, sıvının akışa karşı direncinin nicel bir ölçüsüdür. Yağlama yağlarının temel özelliğini oluştururlar. Viskosite değerleri, yağlama yağının performansını ve uygulama alanlarını belirlemede önemli bir faktördür; örneğin, otomotiv şanzıman yağları için düşük viskoziteli yağlayıcılar kullanılabilirken, dizel motor yağlarında daha yüksek viskoziteli yağlayıcılar kullanılır.

Diğer yandan Viskosite İndeksi (VI) de önemli bir parametre olup sıcaklık değişimlerinin yağlayıcının viskozitesi üzerindeki etkisini gösteren bir sayıdır. Düşük bir VI, ortam sıcaklığındaki değişimlerde viskozitede nispeten büyük bir değişime işaret eder (Salimon ve diğ., 2010). Başka bir deyişle, yağlayıcı yüksek sıcaklıklarda aşırı derecede incilir ve düşük sıcaklıklarda aşırı derecede kalınlaşır. Yüksek bir VI, geniş bir sıcaklık aralığında viskozitede nispeten az bir değişiklik olduğunu gösterir.

Çoğu amaç için ideal bir yağlayıcının, geniş bir sıcaklık aralığında sabit bir viskoziteye sahip olması beklenir.

Fiziksel özellik testleri Belgin Madeni Yağlar firması tarafından ücretsiz olarak yapılmıştır. Bu nedenle atık yağın metanol ile transesterleşmesinden elde edilen AYAME'den üretilen biyoyağlama yağının fiziksel özellikleri incelenebilmiştir. Belirtilen uluslararası standartlara göre yapılan analizler Tablo 3.1'de verilmiştir.

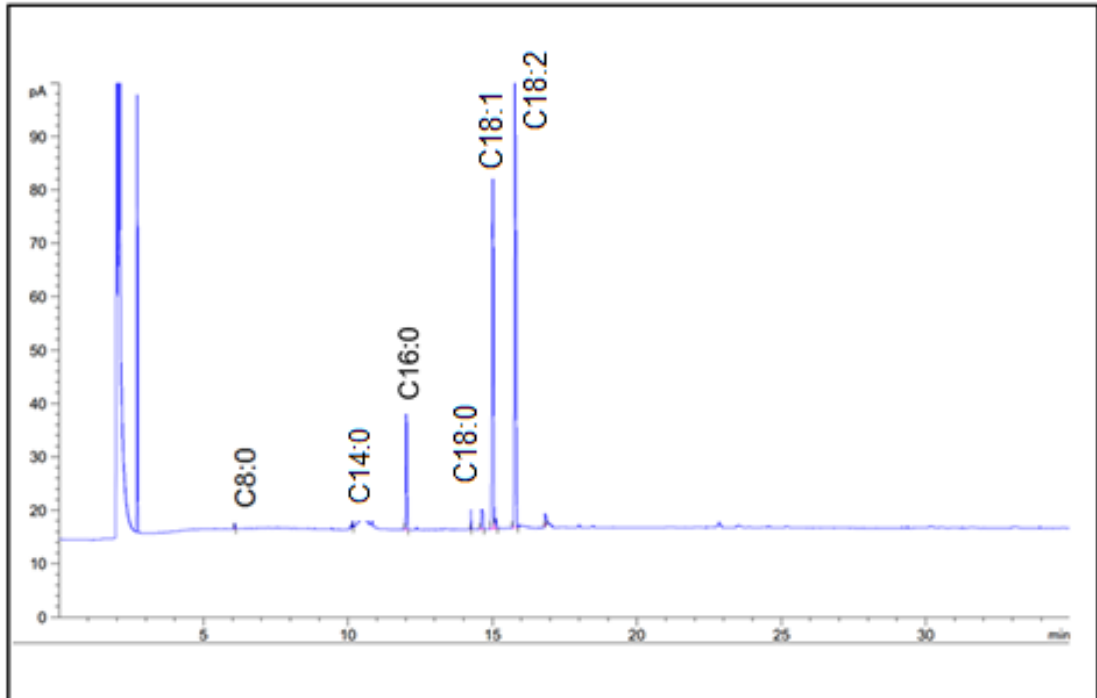
Tablo 3.1. Biyoyağlayıcı fiziksel özellik analizleri

Kinematik vizkosite 40°C, 100°C	ASTM D445, TS 1451 EN ISO 3104
Vizkosite index	TS 3096 ISO 2909, ASTM D2270
Yoğunluk	TS EN ISO 12185, ASTM D4052
Akma noktası	TS 1233 ISO 3016, ASTM D97
Parlama Noktası (Clevelend Açık Kap)	ASTM D92, TS EN ISO 2592
Toplam Baz Sayısı	ASTM D4739
Toplam Asit Sayısı	ASTM D664

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Atık Yağın Yağ Asidi Bileşimi

Çevre restoranlardan toplanıp deneysel çalışmalarda kullanılan atık yağın GC ile belirlenen SYA bileşimi Şekil 4.1’de verilmiştir. Atık yağın SYA bileşimi incelendiğinde doymamış yağ asitleri baskın olup, oleik asit (C18:1, %34,9) ve linoleik asitçe (C18:2, %51.4) zengin olduğu görülmektedir. Tablo 4.1 ile verilen SYA bileşimi kullanılarak atık yağdaki SYA ortalama molekül ağırlığı 278,127 g/mol olarak hesaplanmıştır (EK-C). Literatürde yer alan benzer bir çalışmada ise atık yemeklik yağdaki baskın yağ asitleri oleyik asit, palmitik asit, linoleik asit ve stearik asit olarak belirlenmiş, eser miktarda da miristik ve erusik asit varlığı bildirilmiş, atık yağdaki SYA ortalama molekül ağırlığı ise 271,7 g/mol olarak belirtilmiştir (Chowdhury, 2012). Wang vd (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada, biyoyağlayıcı sentezi için kullanılan atık yemeklik yağın oleyik asit (%49,2), palmitik asit (%27,6) ve linoleik asitçe (%19,4) zengin olduğu ifade edilmiştir.



Şekil 4.1. Atık yağın yağ asidi bileşimi GC kromatogramı

Tablo 4.1. Atık yağ SYA bileşimi

Yağ asidi	% Bileşim
C8:0 Kaprilik asit	0,28
C14:0 Miristik asit	0,16
C16:0 Palmitik asit	9,02
C18:0 Stearik asit	4,20
C18:1 Oleik asit	34,90
C18:2 Linoleik asit	51,44

4.2. Enzim Aktiviteleri

Deneyisel çalışmalarda kullanılan ve kullanılması planlanan lipazların aktivite değerleri hesaplanarak serbest lipazlar için Tablo 4.2’de, ticari tutuklanmış lipazlar için ise Tablo 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.2. Bazı serbest ticari lipazların hidrolitik aktiviteleri

Lipaz türü	Aktivite (U/ml _{lipaz})
Resinase HT (<i>Aspergillus oryzae</i>)	135,56
Palatase 20000L (<i>Rhizomucor miehei</i>)	55,00
Lipozyme TL 100L (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	164,44
Lipozyme CALB L (<i>Candida antarctica</i>)	31,67
Novozyme 51032 (<i>Aspergillus</i>)	42,22

Tablo 4.3. Bazı tutuklanmış ticari lipazların hidrolitik aktiviteleri

Lipaz türü	Aktivite (U/mg _{lipaz})
Novozyme 435 (<i>Candida antarctica</i>)	0,04
Lipozyme TL IM (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	0,05
Noopazyme (<i>Thermomyces lanuginosus</i> (donor) / <i>Aspergillus oryzae</i> (host))	0,23

4.3. Atık Yemeklik Yağdan Serbest Yağ Asitleri Üretimi

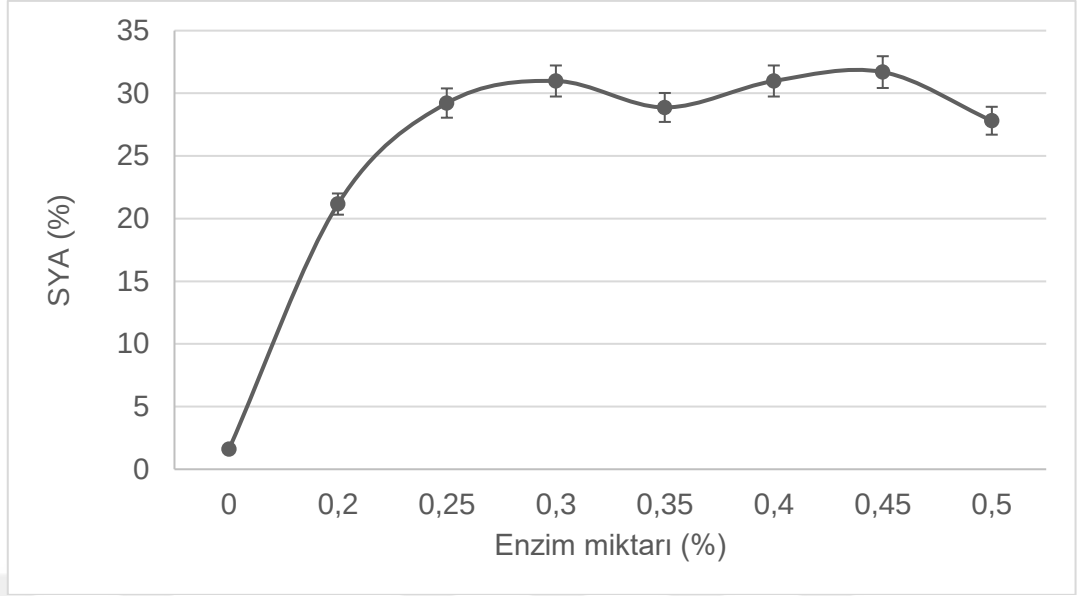
Yağ asitleri, temizlik, kozmetik, tekstil, boya ve yağlama yağı sektörlerine kadar uzanan geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Günümüzde yağ asitleri ve gliserol kimyasal katalizörler kullanılarak yüksek sıcaklık ve basınç altında yağların hidrolizi yöntemi ile elde edilmektedir (Bilyk, 1991). Kimyasal katalizli yöntem ile üretilen yağ asitlerinin pek çoğu yüksek sıcaklıktan dolayı bozunurlar ve istenilen kalitede olmazlar. Ayrıca ürün saflaştırma işlemleri zordur ve proses ekipman maliyeti yüksektir. Dezavantajları ortadan kaldırmak için son yıllarda yağların enzimatik hidrolizi ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır (Murphy, 2002). Esterleşme tepkimelerinde hammadde olarak kullanılması amacı ile atık yağın hidrolizi ile serbest yağ asitlerinin üretilmesi amaçlanmıştır. Hidroliz tepkimesinin en uygun koşulları (enzim miktarı, yağ/su oranı, karıştırma hızı, tepkime sıcaklığı) belirlenerek 500ml kadar serbest yağ asidi üretilmiş ve biyoyağlayıcı üretiminde girdi olarak kullanılmıştır.

4.3.1. Enzim miktarının etkisi

Lipaz katalizli tepkimelerde enzim miktarı önemli bir parametredir. Gereğinden fazla lipaz kullanımı işletme maliyetini artırmaktadır. Ortamdaki fazla lipaz enzimlerinin bir araya gelerek topaklaşmasından ve aktivitelerinin düşmesine bağlı olarak verimi de düşmektedir (Akerman, 2011, Chowdhury ve diğ., 2012).

Atık yağın hidrolizine, enzim miktarının etkisi incelenmiştir. Bunun için enzim miktarı (Lipozyme TL IM) yağa göre kütlece % (0 - 0,20 - 0,25 - 0,30 - 0,35 - 0,40 - 0,45 - 0,50) oranlarında değiştirilmiştir. Tepkimeler 35°C sıcaklık, 400rpm çalkalanma hızı, 10 su/yağ kütle oranı, 24 saat süre ile 100ml'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Tepkimede kullanılan enzim miktarının serbest yağ asidi oluşumuna etkisi Şekil 4.2'de verilmiştir.

Enzim miktarının artmasıyla serbest yağ asidi asit dönüşümü önce belirgin bir şekilde artmıştır. %0,3 enzim varlığında en yüksek serbest yağ asidi eldesi (%31) olarak belirlenmiştir.

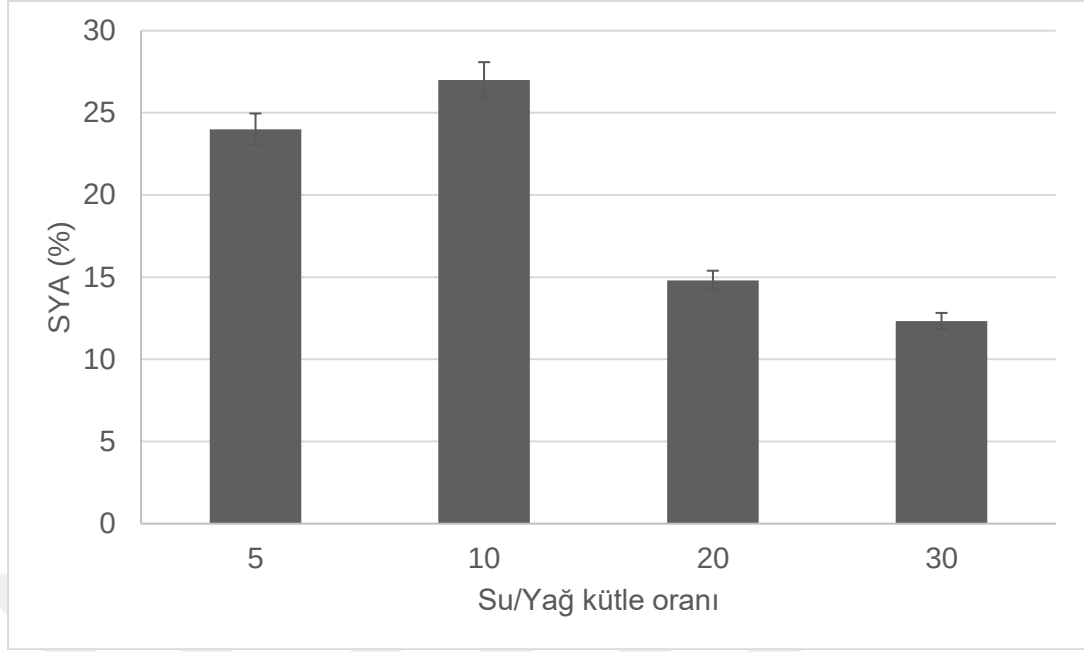


Şekil 4.2. Enzim miktarının serbest yağ asidi oluşumuna etkisi

Enzim miktarındaki artışın karışma problemlerine neden olduğu ve dolayısıyla kütle aktarımında bir engel oluşturduğu tahmin edilmektedir. Literatürde benzer sonuçlar vardır. Syaima ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada *Candida antarctica* lipazı ile palm yağının enzimatik hidrolizine en uygun enzim miktarı 20U/ml olduğu koşulda en yüksek hidroliz tepkime hızına ulaştıklarını belirtmişlerdir. Chowdhury ve ark. (2012), *Candida rugosa* lipazı ile atık yağın hidrolizinde 1g/L enzim varlığında %90 üzerinde serbest yağ asidi dönüşümüne ulaştıklarını belirtmişlerdir.

4.3.2. Su/yağ oranının etkisi

Enzimatik hidroliz tepkimelerinde yağ/su kütle oranı etkili bir parametredir. Yağ ile su emülsiyonunun iyi olması istenmektedir. İyi bir emülsiyon oluşması için su az veya fazla gelebilir. Su yeterli miktarda olmadığında hidroliz için enzim moleküllerinin substratla etkileşimi azalabilir. Su gereğinden fazla kullanıldığında ise enzimin substratla buluşmasını geciktirebilir (Syaima ve ark., 2015). Atık yağın hidrolizine, yağ/su kütle oranının etkisi incelenmiştir. Bunun için su/yağ oranı (5-10-20-30) aralığında değiştirilmiştir. Tepkimeler 35°C sıcaklık, 400rpm çalkalanma hızı, %0,3 enzim, 24 saat süre ile yapılmıştır. Su/yağ kütle oranının serbest yağ asidi eldesine etkisi Şekil 4.3'de verilmiştir.



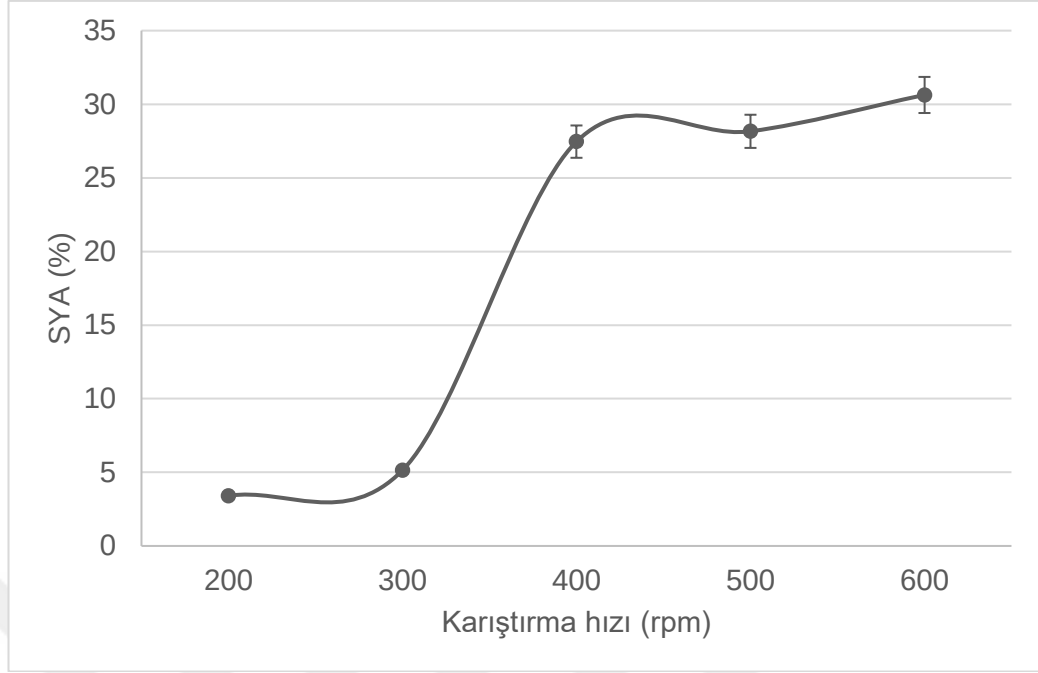
Şekil 4.3. Su/Yağ kütle oranının serbest yağ asidi oluşumuna etkisi

Su/Yağ kütle oranı arttıkça ortamdaki serbest yağ asidi miktarı belirgin bir şekilde düşüş göstermiştir. Su/yağ kütle oranı 10/1 olduğu durumda en yüksek (%27) dönüşüm elde edilmiştir.

Literatürde yapılan çalışmalarda görülmektedir ki artan su/yağ oranları ile enzim aktivitesinde düşüş gözlenmektedir (Yadav and Devi, 2004; Chua and Sarmidi, 2006). Bir diğer çalışmada ise sitokiyometrik oranın üzerindeki su içeriği değerlerinde tepkime serbest yağ asidi oluşumu yönünde ilerlerken oran 20/1'e yaklaştığında dönüşüm gittikçe düşmektedir (Zenevicz et al., 2016). Dolayısıyla elde edilen sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalarla da örtüşmektedir.

4.3.3. Karıştırma hızının etkisi

Uygun ve etkin karışma sayesinde tepkime ortamında kütle aktarım kısıtlamalarının önüne geçilerek yağ/su ara yüzeyinde gerçekleşen hidroliz tepkimesi için uygun koşullar sağlanmış olur. Düşük karıştırma hızlarında enzimler sıvı faz içinde homojen dağılamazlar ya da yüksek hızlarda tepkime ortamı çeperlerinden yukarı yönelerek yapışırılar bu tür karıştırma problemleri düşük verimlere neden olurlar (Xin, 2008; Kutluk, 2012). Atık yağın hidrolizine karıştırma hızının etkisini incelemek amacı ile 35°C sıcaklık, %0,3 enzim, 10 su/yağ kütle oranında, 24 saat süre ile (200-300-400-500-600)rpm karıştırma hızlarında deneyler yapılmıştır. Karıştırma hızının serbest yağ asidi oluşumuna etkisi Şekil 4.4'te verilmiştir.



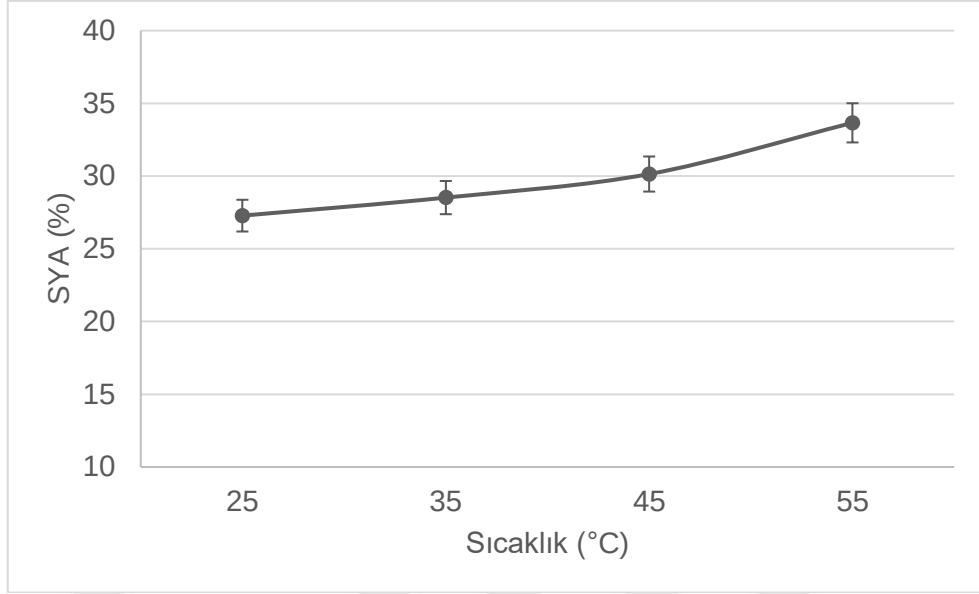
Şekil 4.4. Karıştırma hızının serbest yağ asidi oluşumuna etkisi

Karıştırma hızı arttıkça serbest yağ asidi miktarı belirgin bir şekilde artış göstermiştir. Karıştırma hızı 600 rpm olduğu durumda en yüksek (%31) serbest yağ asidi içeriğine ulaşılmıştır. Düşük karıştırma hızları kütle aktarım kısıtlamalarının aşılmasında yeterli olmadığı görülmüştür.

4.3.4. Tepkime sıcaklığının etkisi

Lipaz aktivitesi tepkime sıcaklığına bağlı bir parametredir ve sıcaklık oldukça önemlidir. Tepkimelerde kullanılan lipaz türüne bağlı olarak sıcaklık değişebilir. Çünkü her bir lipazın aktivitesi kendilerine özgü sıcaklıklarda en iyidir. Aktivite, aynı zamanda katalizlenen tepkimeye de bağlıdır (Yunus, 2002; Akerman, 2011). Atık yağın hidrolizinde, sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile 600 rpm çalkalanma hızı, 10 su/yağ kütle oranında, %0,3 enzim ve 24 saat süre ile (25 – 35 – 45 - 55) °C sıcaklıklarda deneyler yapılmıştır. Tepkime sıcaklığının serbest yağ asidi oluşumuna etkisi Şekil 4.5'de verilmiştir. Sıcaklık arttıkça serbest yağ asidi dönüşümü belirgin bir şekilde artış göstermiştir. Sıcaklık 55°C olduğu durumda en yüksek (%34) serbest yağ asidi içeriği elde edilmiştir. Lipozyme TL IM lipazı hidroliz tepkimesinde en yüksek aktivitesini 55°C'de gösterdiği açıkça görülmektedir.

Deneyler sonucunda uygun hidroliz koşulları 10 su/yağ kütle oranında, %0,3 enzim (yağa göre kütlece), 55°C sıcaklık, 600rpm çalkalanma hızında 24 saat süre olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Sıcaklığın serbest yağ asidi oluşumuna etkisi

4.4. Atık Yemeklik Yağdan Yağ Asidi Metil Ester (AYAME) Üretimi

Atık yağın metanol ile lipaz katalizli tepkimesi sonucu yağ asidi metil ester üretimi, %5 Lipozyme TL IM, 200rpm karıştırma hızı, 1/4 yağ/metanol, %15 başlangıç su miktarı, 35°C sıcaklık koşullarında gerçekleştirilmiştir. Tepkime sonunda AYAME içeriği %98 olarak belirlenmiştir. Belirlenen en iyi koşullarda üretim sonunda yaklaşık 500ml AYAME üretilmiştir. İkinci ürün olan gliserol 5000 rpm hızla 5dk süreyle santrifüj edilerek ayrılmıştır. Elde edilen AYAME biyoyağlama yağı üretiminde kullanılmak üzere girdi olarak hazırlanmıştır.

4.5. Yağ Asitlerinden Biyoyağlama Yağı Üretimi

Tez çalışmasında yağ asitlerinin esterleşmesi için alkol olarak hem TMP hem de stearyl alkol kullanımı planlanmıştır. Ancak stearyl alkol kullanımında tepkime sonrası elde edilen ürünün katı hale geçmesi nedeniyle örnekler analiz edilememiştir. Bu nedenle stearyl alkol yerine farklı zincir uzunluklarına sahip olan bütanol ve oleyil alkol kullanımına karar verilmiştir. Seçilen bu alkollerin atık yemeklik yağın hidroliziyle elde edilen yağ asitlerinin esterleşmesi sonunda biyoyağlayıcı üretiminin yapıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Sonucunda elde edilen yağ asitlerinin Novozyme 435 katalizöründe farklı zincir uzunluklarına sahip alkoller ile (TMP, bütanol, oleyil alkol) esterleşmesi ile biyoyağlama yağı üretimine etki eden parametreler (enzim miktarı, başlangıç su miktarı, yağ asidi/TMP mol oranı, sıcaklık, karıştırma hızı, süre) incelenmiştir.

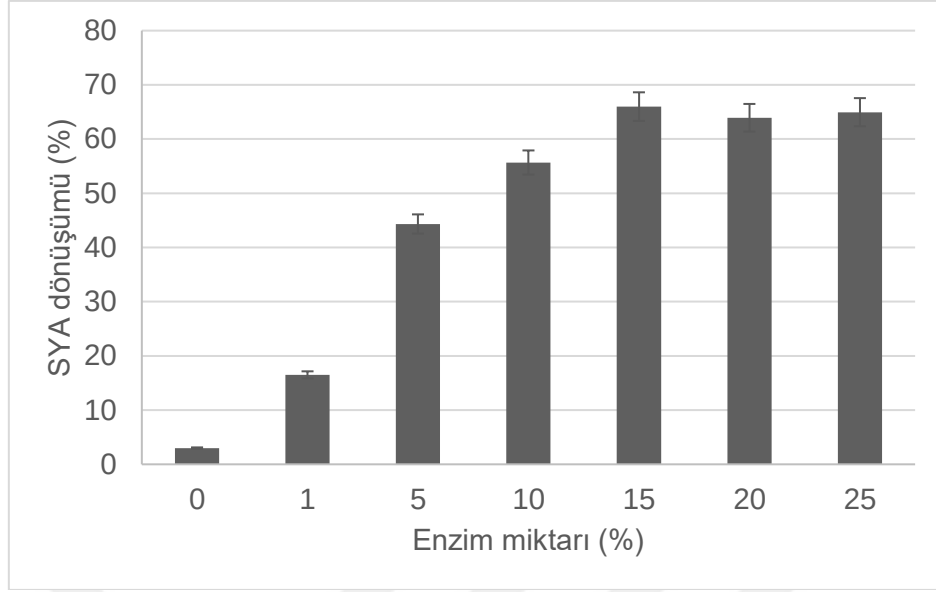
4.5.1. Enzim miktarının etkisi

Enzim miktarının ortamdaki substrat kütlesi ile paralel biçimde değiştirilmesi gerektiği bilinmektedir. Çünkü substrat ile anahtar-kilit ilişkisi yakalayarak esterleşmeyi gerçekleştiren lipazın en uygun sürede mümkün olduğunca çok yağ asidi molekülünü esterleştirmesi gerekmektedir. Günümüzde kimyasal katalizörlere nazaran pahalı bir katalizör olan enzim katalizörlerinin mümkün olduğunca az miktarda kullanılması maliyeti önemli ölçüde etkileyecektir. Fakat yeterli miktarda enzim kullanılmaması nedeniyle tepkime süresinin gereğinden fazla uzamamasına da dikkat edilmelidir. Lipazın yeterli derişimde kullanılmaması, dönüşümün yavaş gerçekleşmesine neden olacaktır.

Bu bilgiler doğrultusunda serbest yağ asitlerinin esterleşmesiyle biyoyağlayıcı üretimine enzim miktarının etkisi incelenmiştir. Deneyler 40°C sıcaklıkta, TMP için 3/1, bütanol ve oleyil alkol için 1/1 yağ asidi/alkol mol oranlarında ve 400rpm karıştırma hızında 24 saat süre ile yapılmıştır. Başlangıçta ortama su eklemesi yapılmamıştır. Enzim miktarının atık yağ asitlerinin TMP, bütanol ve oleyil alkol ile esterleşme tepkimeleri üzerine etkileri sırasıyla Şekil 4.6, 4.7, 4.8' de verilmiştir. TMP için enzim miktarı arttıkça serbest yağ asidi dönüşümü önce artmış, enzim miktarı %15 olduğunda en yüksek (%65) değere ulaşmış, sonra artan enzim derişimi ile dönüşüm azalmaya başlamıştır (Şekil 3.6).

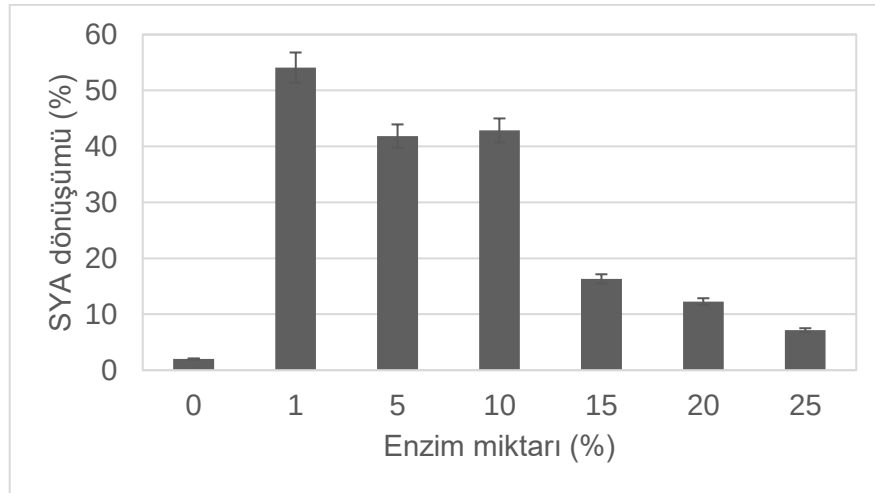
Bütanol ve oleyil alkol kullanılması durumunda enzim miktarının artması serbest yağ asidi dönüşümünü olumsuz etkilemiştir. Yüksek miktarlarda kullanılan enzim tepkime ortamı çeperlerine yapışarak substratlar ile yeterince etkileşim gösteremez. Diğer yandan birbirleri arasında topaklaşarak çökme eğilimi gösterir, bu nedenle gerçek aktivitelerini gösteremezler (Chowdhury ve diğ., 2014, Syaima ve diğ., 2015).

Ayrıca yüksek miktarda enzim kullanımının tepkime ortamında karışma problemleri yarattığı da bilinmektedir. En yüksek dönüşüm, bütanol ve oleyil alkol için sırasıyla, %54 ve %35 olarak %1 enzimin kullanıldığı tepkimelerde elde edilmiştir. Literatürde farklı lipazlar katalizörlüğünde biyoyağlama yağı üretimi için enzim miktarının etkilerini inceleyen çalışmalarda da benzer sonuçların elde edildiği belirtilmiştir (Decagny ve diğ., 1998, Mukherjee ve diğ., 1988).



Şekil 4.6. Enzim miktarının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (TMP)

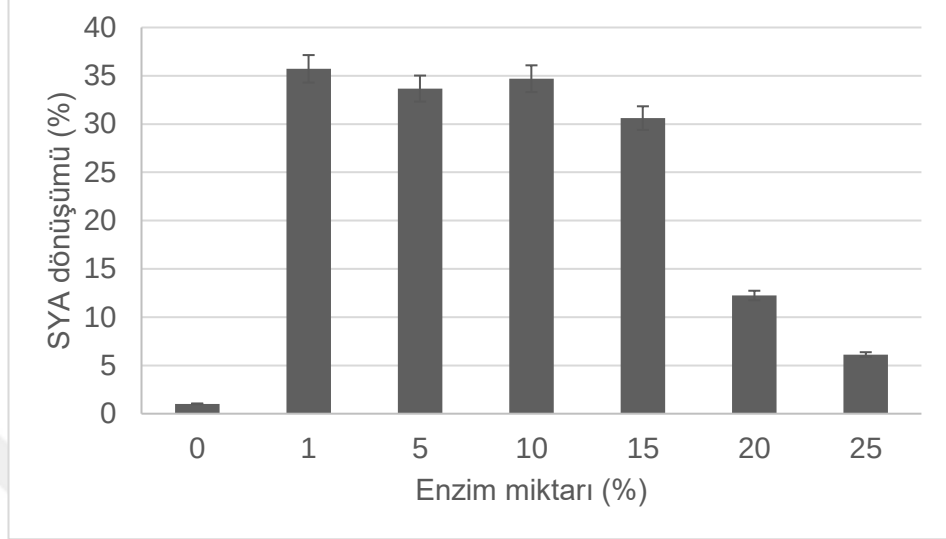
Kısa zincirli alkoller (metanol, etanol, bütanol, vb.) her ne kadar ekonomik olarak daha avantajlı olsalar da enzim üzerinde inhibisyona neden olurlar (Varma ve diğ., 2010). Bütanolün kullanıldığı tepkimelerde enzimin artışının inhibisyonun negatif etkisini azaltmadığı hatta yığın halinde arayüzey etkileşimini de olumsuz etkilediği düşünülmektedir.



Şekil 4.7. Enzim miktarının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Bütanol)

Alkol türünün enzimatik tepkimelerdeki etkisi için birçok parametreden bahsedilebilir. Bunlar substratın hidrofilik derecesi, zincir yapısı, çözücülü ya da çözücüsüz ortamda olmaları ve çözücü türü ve kullanılan lipazla olan afiniteleri olarak sıralanabilir (Varma ve diğ., 2010). Her bir substratın log P değerleri kullanılan lipazın aktivitesi üzerinde

etkilidir (Sun ve diğ., 2015). Bu durumda artan enzim miktarı tepkime ortamında kütle aktarım kısıtlamalarını artırarak verimin daha da düşmesine neden olmuştur. Deneysel çalışma sürecinde yapılan gözlemler de bu doğrultudadır.



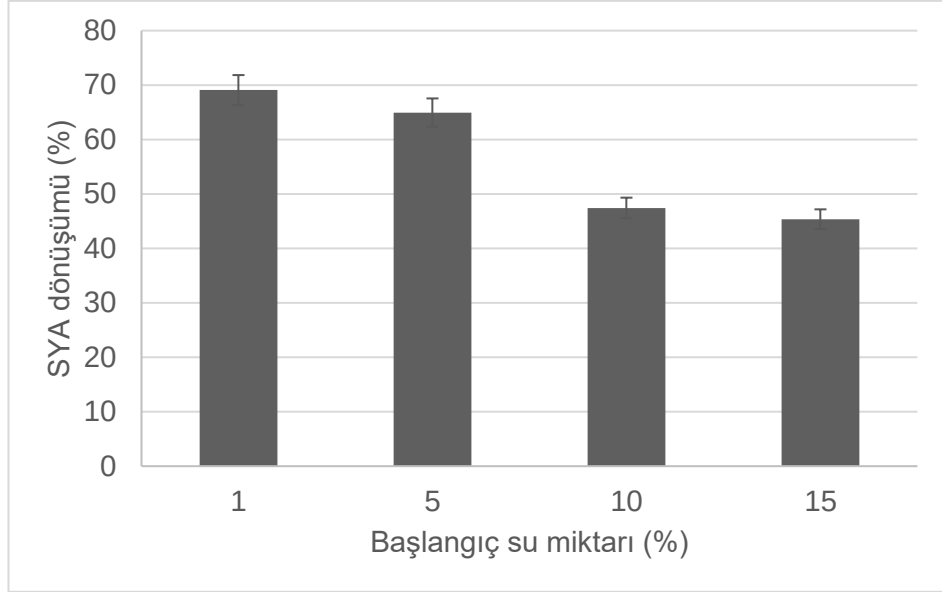
Şekil 4.8. Enzim miktarının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Oleyil alkol)

4.5.2. Başlangıç su içeriğinin etkisi

Lipazların tepkime ortamında aktivite göstermeleri için bir miktar suya ihtiyaç duyduğu bilinmektedir (Trupti ve diğ., 2011). Bu çalışmada, biyoyağlayıcı üretimi için yağa göre kütlece %(0 -1 – 5 – 10 – 15) oranlarında ortama eklenen suyun SYA dönüşümüne etkisi üç alkol için ayrı ayrı incelenmiştir.

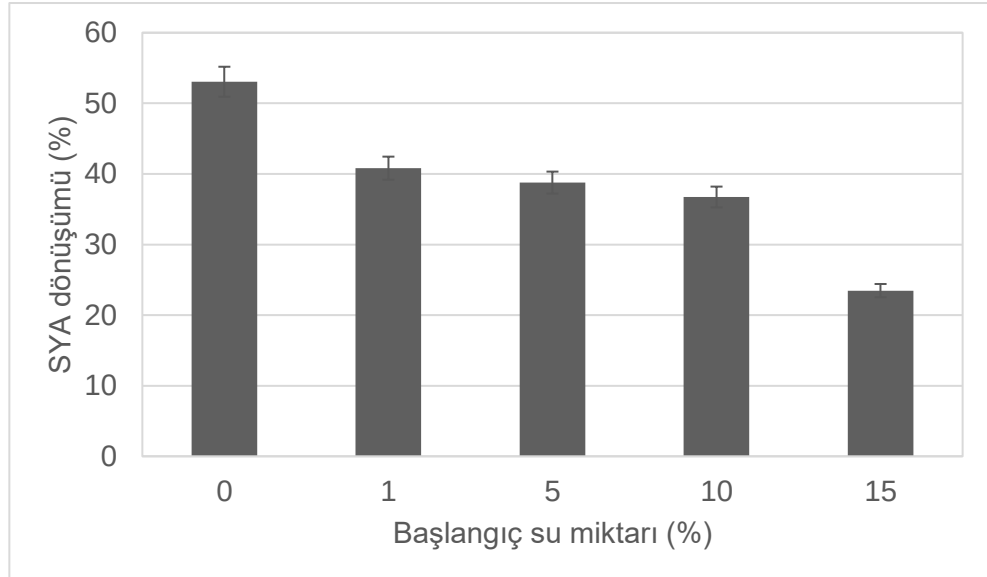
Enzim miktarı TMP için, %15, bütanol ve oleyil alkol için %1 olacak şekilde, her üç alkol için sıcaklık 40°C’de sabit tutularak, yağ asidi/alkol mol oranı TMP için 3/1, bütanol ve oleyil alkol için 1/1 iken, 24 saat süreyle ve 400rpm çalkalama hızında tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11’de sırasıyla TMP, bütanol ve oleyil alkol varlığında başlangıç ortam su içeriğinin SYA dönüşümüne etkisi görülmektedir.

Biyoyağlayıcı üretimi tersinir bir tepkime olup, tepkime sonunda ortamda esterler ve yan ürün olarak su oluşmaktadır. Dönüşümün artırılması için ileri yöly tepkime hızının artırılabilmesi nedeniyle ortamdaki suyun uzaklaştırılması gerekmektedir. Ağız açık erlenlerde yapılan deneylerde buharlaşma yardımıyla oluşan su tepkime ortamından kendiliğinden uzaklaştırılır.

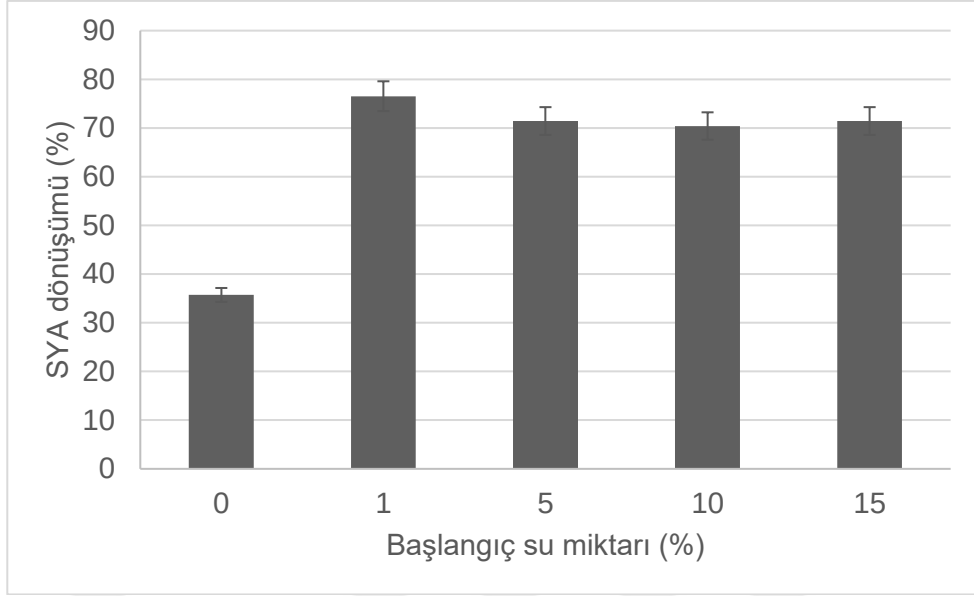


Şekil 4.9. Başlangıç su içeriğinin serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (TMP)

TMP ve oleyil alkol kullanımında en yüksek dönüşüm değerleri sırasıyla %69 ve %76 olarak ortamın başlangıçta %1 su içerdiği durumda elde edilmiştir. Bütanol için tepkime ortamına su eklenmediğinde en yüksek (%54) dönüşüm elde edilmiştir. Oleyil alkol için başlangıçta tepkime ortamına %1 (0,03 gr) oranında su eklendiğinde SYA dönüşümü keskin bir şekilde artış göstermiştir. Ortamlara eklenen su miktarı TMP ve bütanol esterleşme tepkimelerini tersi yönde etkilemiştir.



Şekil 4.10. Başlangıç su içeriğinin serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Bütanol)



Şekil 4.11. Başlangıç su içeriğinin serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Oleyil alkol)

Karl Fischer sonuçlarına göre tepkenlerin başlangıçtaki su içerikleri TMP, bütanol, oleyil alkol ve atık yağ serbest yağ asitleri için sırasıyla %0,09, %0,11, %0,25 ve %0,45 olarak belirlenmiştir. Tepkime ortamında kendiliğinden başlangıçta bütanol ve oleyil alkol kullanılan tepkimelerde sırasıyla 0,014 gr, 0,016 gr su, TMP kullanılan tepkimede ise 0,015 gr su bulunmaktadır. Bütanol kullanılan esterleşme tepkimeleri için bu miktar yeterli olmuştur. Literatürde enzim katalizli biyoyağlama yağı sentezinin incelendiği çalışmalarda benzer etkiler belirtilmiştir (Bondioli, 2003; Bondioli, 2004; Linko, 1997).

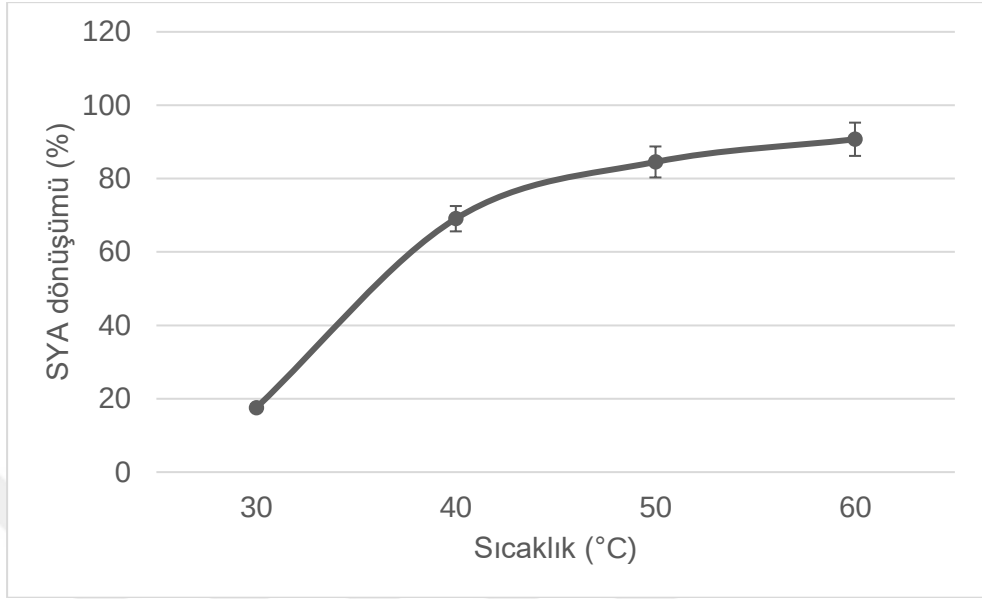
4.5.3. Tepkime sıcaklığının etkisi

Enzimlerin en iyi aktivitelerini gösterdiği uygun bir sıcaklık aralığı vardır. Bu sıcaklık ya da sıcaklık aralığı protein yapılı enzimin bozunmadan çalıştığı sıcaklıktır. Enzim aktivitesi, aynı zamanda katalizlenen tepkime türüne ve aktivasyon enerjisine de bağlıdır (Yunus, 2002; Akerman, 2011).

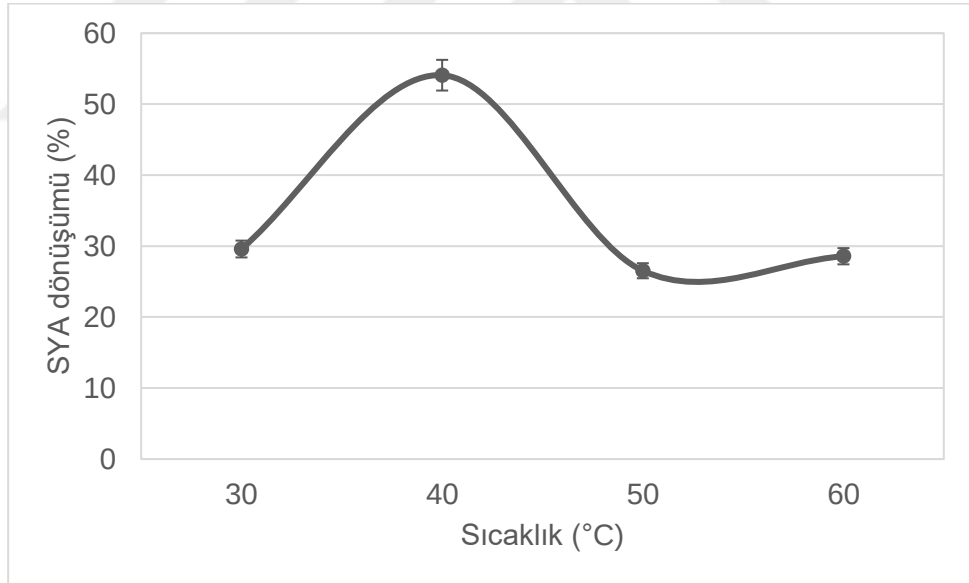
Biyoyağlayıcı üretiminde tepkime sıcaklığının SYA dönüşümüne etkisini belirlemek amacı ile enzim miktarı TMP için %15, bütanol ve oleyil alkol için %1 seçilmiştir. Başlangıçta ortamdaki su içeriği TMP ve oleyil alkol için %1 oranında eklenmiş, bütanol için ise ortama su eklenmeden hazırlanmıştır.

SYA/alkol mol oranı bütanol ve oleyil alkol için 1/1, TMP için 3/1 iken, 24 saat süreyle, 400 rpm çalkalama hızında tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Serbest yağ asitleri ile farklı

alkoller arasındaki esterleşme tepkime sıcaklığının SYA dönüşümüne etkisi TMP, bütanol ve oleyil alkol için sırasıyla Şekil 4.12, 4.13 ve 4.14'de görülmektedir.

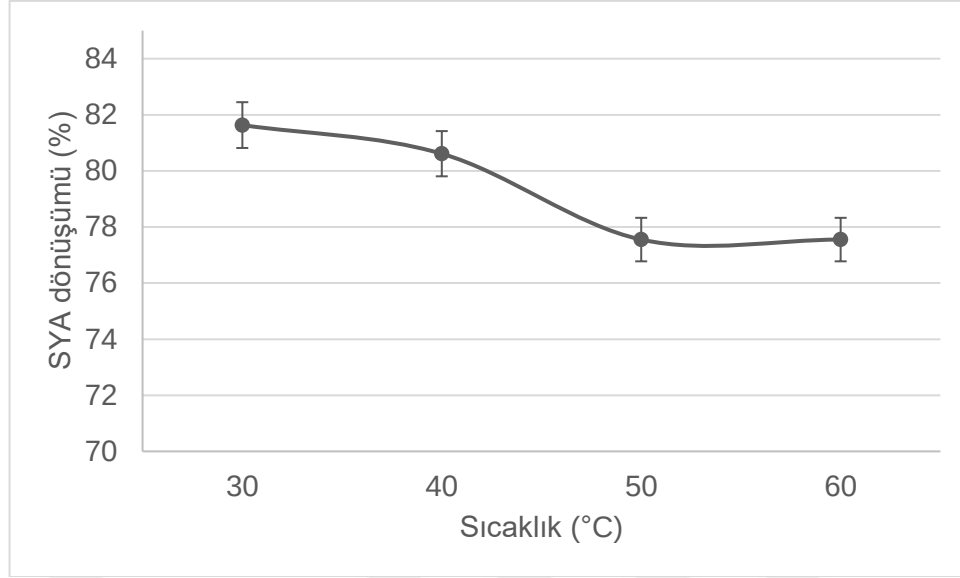


Şekil 4.12. Tepkime sıcaklığının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (TMP)



Şekil 4.13. Tepkime sıcaklığının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Bütanol)

Deneysel çalışmalar sonucunda en yüksek dönüşüm TMP, bütanol ve oleyil alkol için sırasıyla %90, %54 ve %81 olarak 60°C, 40°C ve 30°C sıcaklıklarda elde edilmiştir.



Şekil 4.14. Tepkime sıcaklığının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Oleyil alkol)

Sıcaklığın artması ile bütanol varlığında serbest yağ asidi dönüşümü belirgin bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Sıcaklık ile uçucu olan bütanolün ağız açık erlenlerden buharlaştığı buna bağlı olarak da dönüşümün azaldığı söylenebilir. Oleyil alkol kullanıldığında ise artan tepkime sıcaklığında SYA dönüşümünde belirgin bir azalma görülmemiştir. TMP için artan tepkime sıcaklığı ile dönüşüm artmıştır.

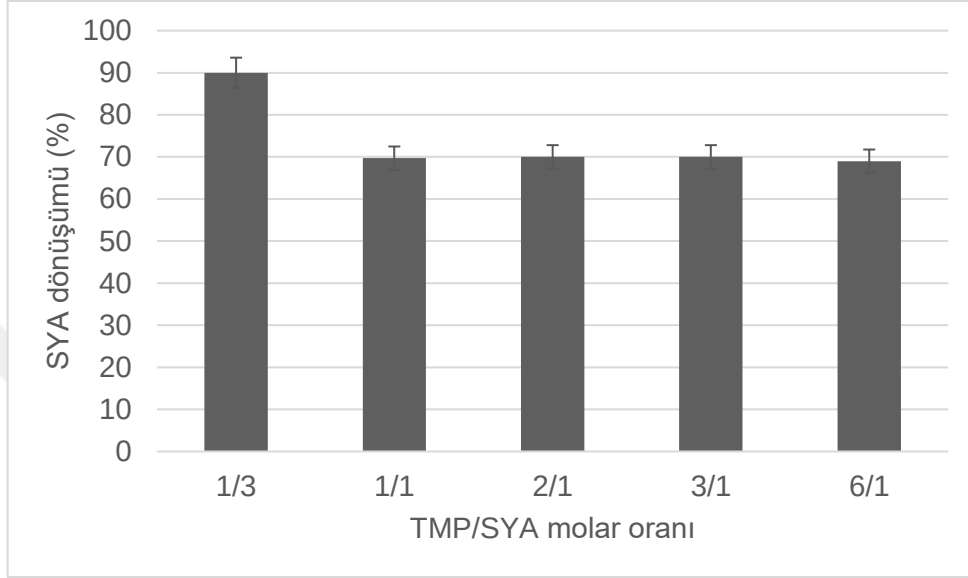
Literatürde yapılmış farklı esterleşme tepkimelerinde sıcaklığın tepkime ve enzim üzerine etkisi benzerdir. Ayrıca artan tepkime sıcaklığında yağın vizkozitesindeki azalmadan dolayı enzimler ile ara yüzey etkileşimlerinin azaldığı da literatürde belirtilmektedir (Baily, 1986, Tenova ve diğ., 2005).

4.5.4. Alkol / yağ asidi mol oranının etkisi

Serbest yağ asitlerinin esterleşme tepkimelerinde stokiometrik oran değiştirilerek ileri yöndeki tepkime hızında artış sağlamak dönüşüm üzerinde olumlu etki yaratmaktadır. Bu nedenle alkolün farklı oranlarda fazlası kullanılarak dönüşüm artırılabilir. Bütanol ve oleyil alkol ile serbest yağ asitlerinin esterleşme tepkimeleri için stokiometrik oran 1/1 dir. TMP için bu oran 1/3'dür. Kullanılan alkol türüne göre stokiometrik oranlar değişiklik göstermektedirler.

Biyoyağlayıcı üretiminde, alkol/yağ asidi mol oranının SYA dönüşümüne etkisini belirlemek amacı ile enzim miktarı TMP için %15, bütanol ve oleyil alkol için %1 seçilmiştir. Başlangıç su içeriği TMP ve oleyil alkol için %1, bütanol için %0 ve tepkime

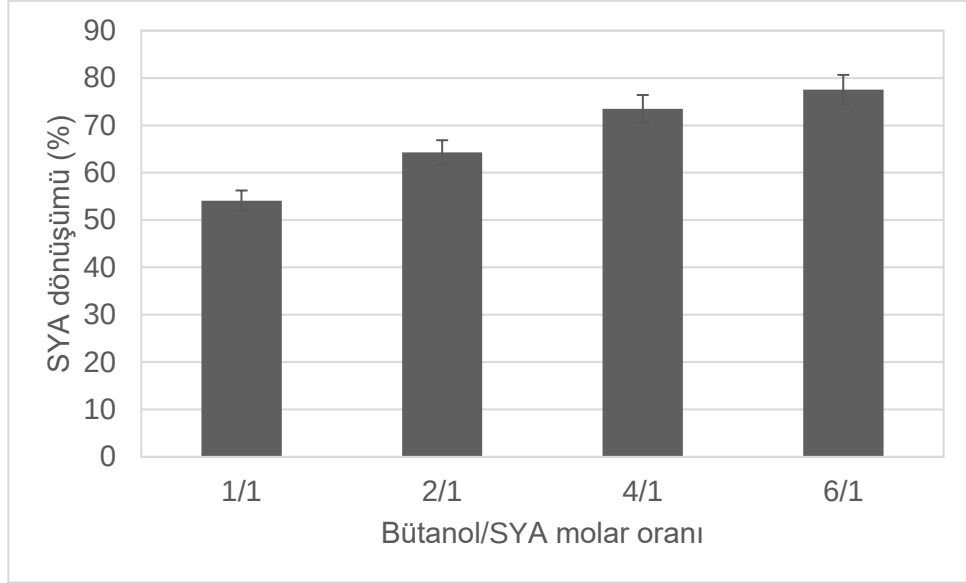
sıcaklıkları da oleyil alkol ve bütanol için sırasıyla 30°C ve 40°C iken, TMP için 60°C olarak seçilmiştir. 24 saat süreyle, 400rpm çalkalama hızında tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Serbest yağ asitleri ile farklı alkoller arasındaki esterleşme tepkimeleri için molar oranın SYA dönüşümüne etkisi TMP, bütanol ve oleyil alkol için sırasıyla Şekil 4.15, 4.16 ve 4.17’de verilmiştir.



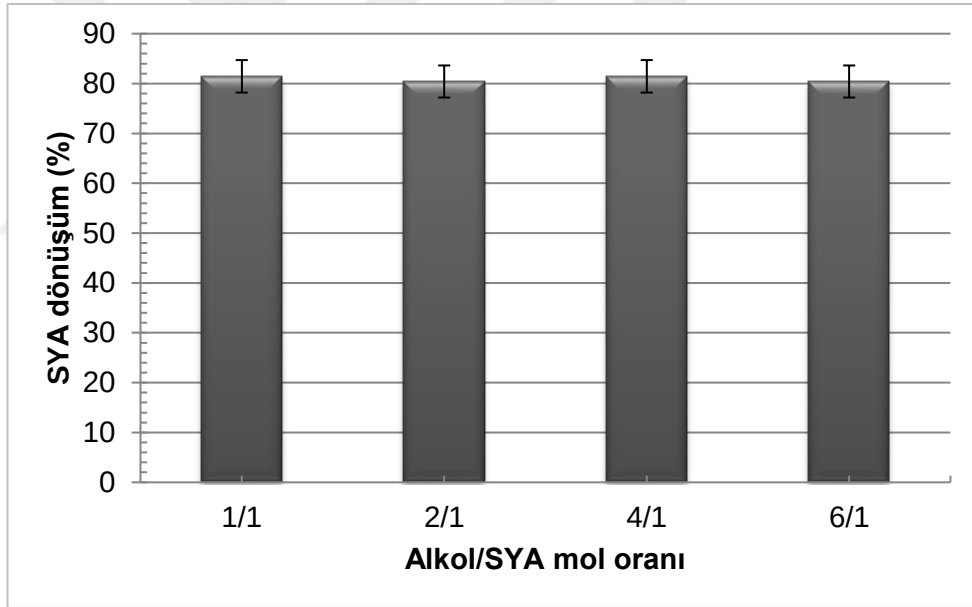
Şekil 4.15. Alkol/SYA mol oranının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (TMP)

TMP varlığında stokiyometrik oranda (1/3) en yüksek dönüşüm (%90) elde edilmiştir (Şekil 3.15). Alkol miktarının artırılmasıyla SYA dönüşüm değerlerinde azalma gözlenmiş, bu durumun ortamda fazlaca bulunan TMP’nin enzim üzerinde inhibisyon etkisi nedeniyle olabileceği değerlendirilmiştir.

Bütanol ile gerçekleşen esterleşme tepkimesi için alkol miktarının artırılması ile dönüşümün önemli derecede arttığı Şekil 3.16’dan açıkça görülmektedir. En yüksek SYA dönüşümü, 6/1 alkol/yağ asidi molar oranında %77,5 olarak elde edilmiştir. Ortama fazla eklenen alkolün tepkimeyi ürünlere doğru yönlendirdiği ve SYA dönüşümünü arttırdığı görülmektedir. Aynı zamanda uçucu olan bütanolün ortama fazla eklenmesi ile tepkime ortamından buharlaşma kaybı ile azalan alkolünde önüne geçildiği düşünülmektedir.



Şekil 4.16. Alkol/SYA mol oranının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Bütanol)

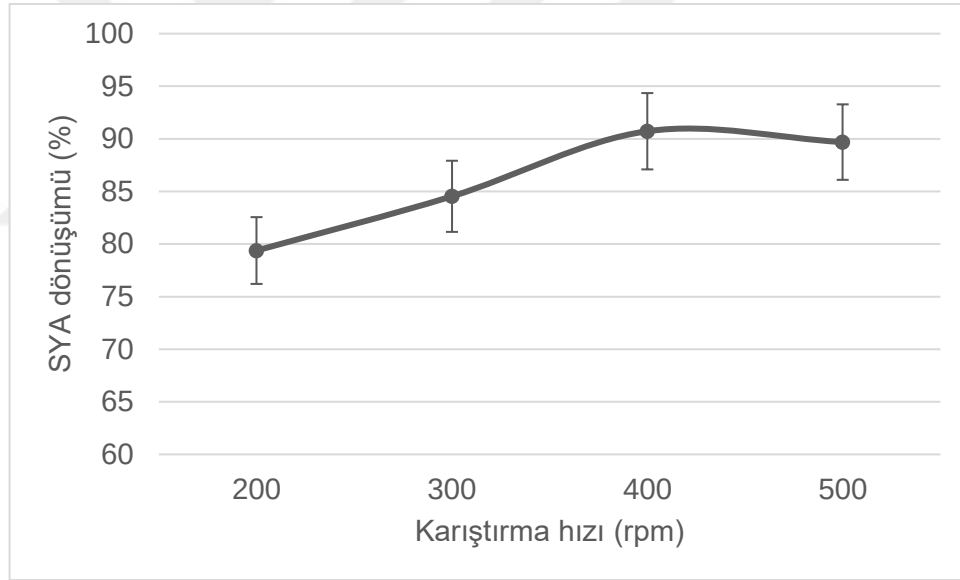


Şekil 4.17. Alkol/SYA mol oranının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Oleyil alkol)

Oleyil alkol varlığında gerçekleşen tepkimelerde alkol miktarının artırılmasının SYA dönüşümüne belirgin bir etkisine rastlanmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.17). En yüksek dönüşüm (%81,4) stokiyometrik oranda (1/1) elde edilmiştir. Sonuçlar literatürde farklı alkoller varlığında yağ asitlerinin esterleşme tepkimelerinin incelendiği çalışmalar ile örtüşmektedir (Sun ve diğ., 2017, Fernandes ve diğ., 2018).

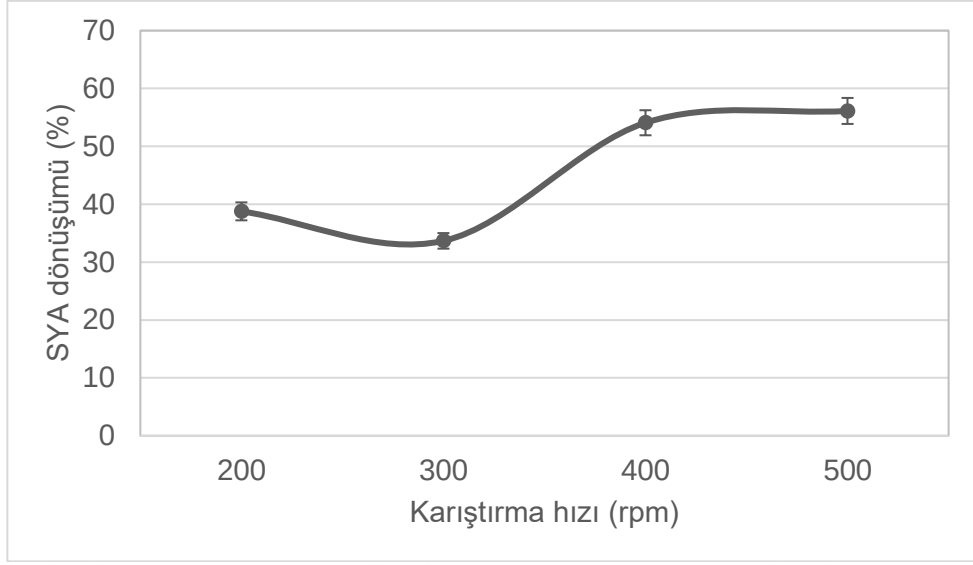
4.5.5. Karıştırma hızının etkisi

Etkin karışma sayesinde tepkime ortamında kütle aktarım kısıtlamalarının önüne geçilebilir. Düşük karıştırma hızlarında enzimler sıvı faz içinde homojen dağılamazlar ya da yüksek hızlarda tepkime ortam çeperlerinden yukarı yönelerek yapışırlar ve bu tür karıştırma problemleri düşük verimlere neden olur (Xin, 2008; Kutluk, 2012). Karıştırma hızının SYA dönüşümüne etkisini belirlemek amacı ile enzim miktarı TMP için %15, bütanol ve oleyil alkol için %1, başlangıç su içeriği oleyil alkol ve TMP için %1, bütanol için ortama su eklemesi yapılmadan, alkol/yağ asidi mol oranı TMP, bütanol ve oleyil alkol için sırasıyla 1/3, 1/1 ve 1/1 iken, 24 saat süreyle tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Tepkime sıcaklıkları TMP için 60°C, bütanol ve oleyil alkol için 40°C'dir. Serbest yağ asitleri ile farklı alkoller arasındaki esterleşme tepkimelerinde karıştırma hızının SYA dönüşümüne etkisi TMP, bütanol ve oleyil alkol için sırasıyla Şekil 4.18, 4.19 ve 4.20'de görülmektedir.

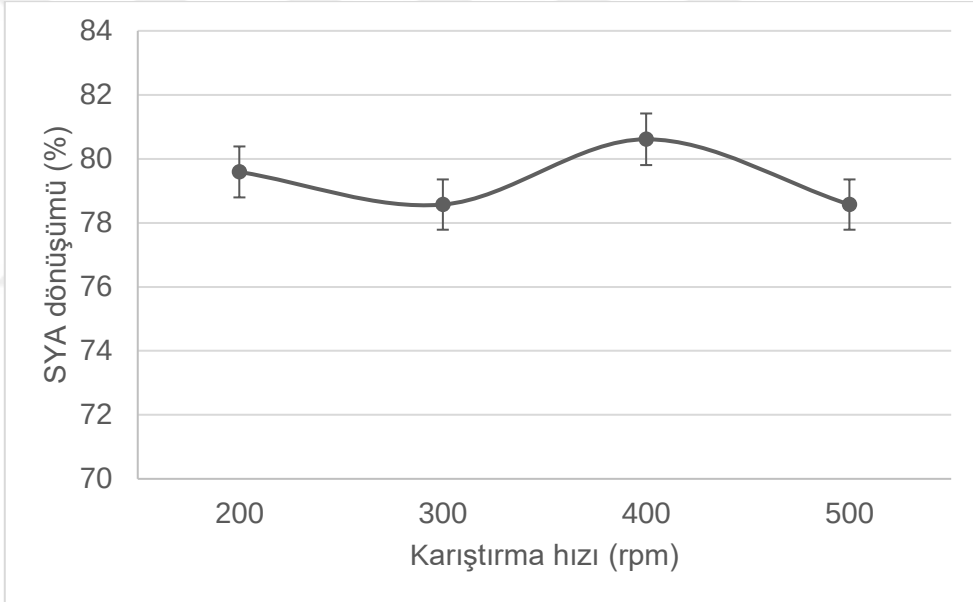


Şekil 4.18. Karıştırma hızının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (TMP)

TMP varlığında en yüksek SYA dönüşümü (%90) 400rpm'de elde edilmiştir (Şekil 4.18). Karıştırma hızı yükseldikçe tepkime ortamındaki enzimlerin kabın çeperlerine yapışarak ortamdaki ayrıldığı çalışmalar esnasında gözlenmiştir. Bu nedenle 500rpm hızında dönüşüm az da olsa azalmıştır. Bütanol varlığında karıştırma hızı arttıkça SYA dönüşümü belirgin bir şekilde artış gösterdiği Şekil 3.19'dan açıkça görülmektedir. 500rpm değerinde en yüksek dönüşüm %54 olarak elde edilmiştir. Düşük karıştırma hızlarının kütle aktarım kısıtlamalarının aşılmasında yeterli olmadığı bu tepkime için belirlenmiştir.



Şekil 4.19. Karıştırma hızının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Bütanol)

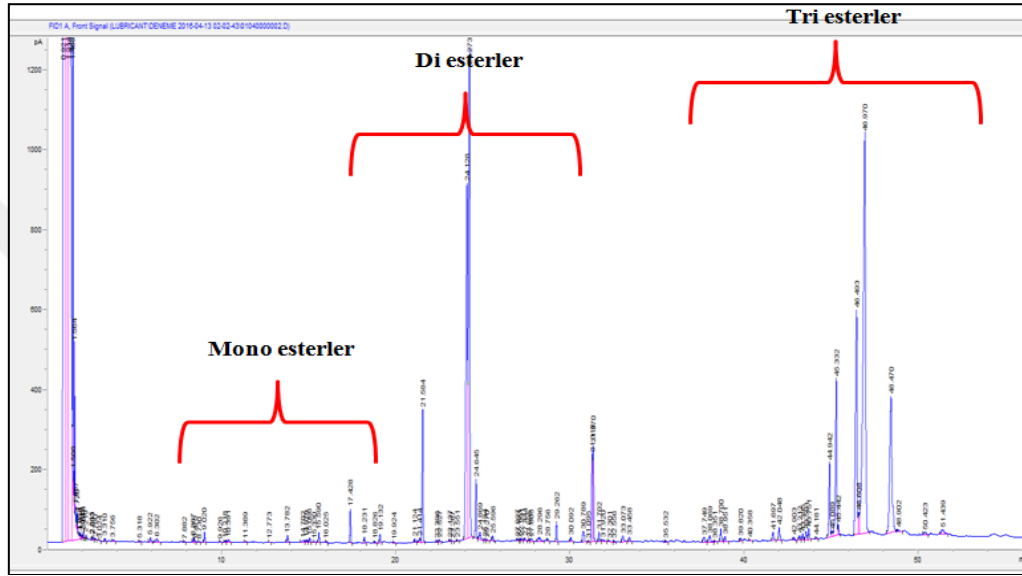


Şekil 4.20. Karıştırma hızının serbest yağ asidi dönüşümüne etkisi (Oleyil alkol)

Oleyil alkol varlığında karıştırma hızının artırılması SYA dönüşümüne belirgin bir etkisine rastlanmamıştır. En yüksek dönüşüme (%81,4) karıştırma hızının 400 rpm olduğu durumda ulaşılmıştır (Şekil 4.20). Oleyil alkol ile serbest yağ asitlerinin ara yüzey etkileşiminin düşük karıştırma hızlarında da kolayca oluştuğu öte yandan kütle aktarım kısıtlamalarının düşük hızlarda kolayca aşıldığı deneysel çalışmalar sonucunda belirlenmiştir.

Yapılan deneyler sonunda yağ asitlerinin farklı alkollerle esterleşmesi ile biyoyağlayıcı üretimi için uygun koşullar aşağıdaki gibi belirlenmiştir. TMP, bütanol ve oleyil alkol

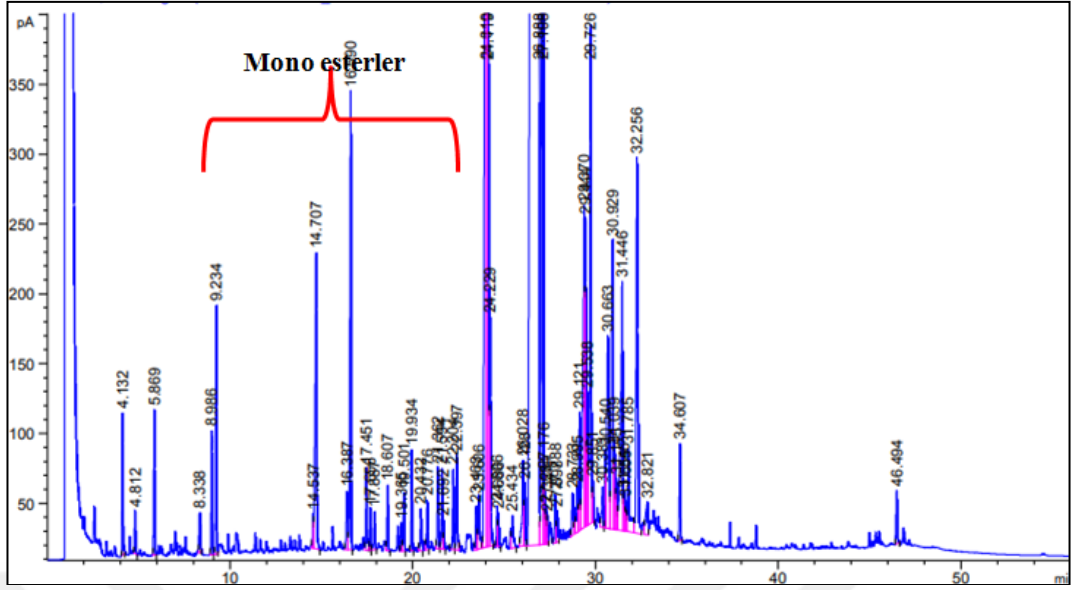
kullanımında, alkol/asit mol oranları sırasıyla, 1/3, 6/1 ve 1/1, enzim miktarları sırasıyla %15, %1 ve %1, ortama eklenen su miktarı %1, %0, %1, sıcaklıklar sırasıyla, 60, 40, 30°C, karıştırma hızları sırasıyla, 400, 500, 400 rpm olarak belirlenmiştir. Farklı alkoller ile atık yağ serbest yağ asitlerinden belirlenen uygun koşullarda elde edilen esterlerin ester içerikleri gaz kromatografisi yardımıyla incelenmiştir. Elde edilen esterlerin TMP kullanımında mono, di, tri ester içerikleri ile bütanol ve oleyil alkol kullanımında mono ester içerikleri sırasıyla Şekil 4.21, 4.22 ve 4.23'de verilmiştir.



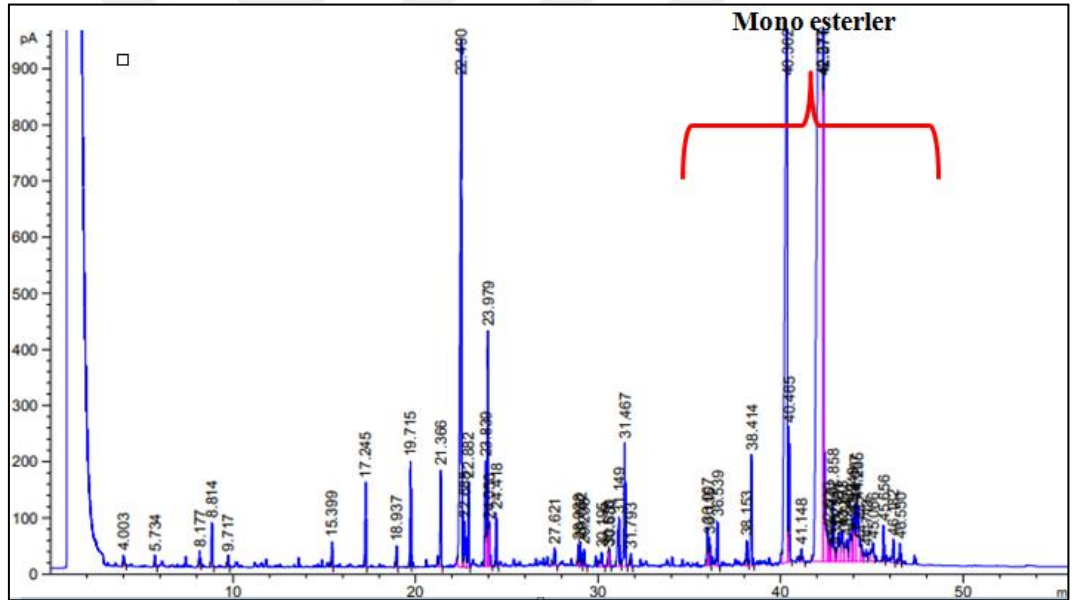
Şekil 4.21. Serbest yağ asitlerinin TMP ile esterleşme tepkimesi sonucunda elde edilen mono, di, triester kromatogramı

Alkol olarak TMP kullanımında esterleştirme tepkimesi sonucunda, monoester (ME), diester (DE) ve triester (TE) olmak üzere üç tip ester elde edilir. Görülen pikler, TMP'ye bağlanan alkil karbon grubunun sayılarına göre gaz kromatografisi yardımıyla belirlenmiştir.

Esterlerin gaz kromatografisinde belirlenme aralıkları (10-20dk arasında monoesterler, 20-30dk arasında diesterler, 30 ile 45dk arasında triesterler) karbon sayısı, zincir uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (Yunus, 2002). Buna bağlı olarak kromatogramda görülen piklerin alıkonma zamanlarına göre tanımlamaları yapılmış olup, pik alanlarının toplam pik alanına karşı oranlanması sonucunda son ürünün mono-, di- ve triester derişimleri hesaplanmıştır. Örnek hesaplama EK-E'de verilmiştir. Oleyil alkolün zincir uzunluğu bütanolden daha uzun olduğundan mono ester bölgesi daha ileride belirlenmiştir.



Şekil 4.22. Serbest yağ asitlerinin bütanol ile esterleşme tepkimesi sonucunda elde edilen mono ester kromatogramı



Şekil 4.23. Serbest yağ asitlerinin oleyil alkol ile esterleşme tepkimesi sonucunda elde edilen mono ester kromatogramı

Serbest yağ asitlerinin farklı alkoller ile esterleşmesi sonucunda elde edilen TMP için triester miktarı (%89), bütanol ve oleyil alkol için (monoester) sırasıyla %90 ve %91 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre elde edilen ürünlerin biyoyağlayıcı olarak tanımlanmaları uygun olacaktır.

Her bir kromatogramda görülen diester bölgesindeki 24.dakikadaki keskin pik etil asetat pikidir. Etil asetat, analiz yönteminde örneğin analize hazırlanmasında türevlendirme öncesinde kullanılmaktadır. Polyol alkollerin (TMP, vb.) girdi olarak

kullanıldığı durumlarda yağlayıcının kalitesini triester miktarı belirlemektedir. Elde edilen sonuçlar literatürde, Yunus ve ark. 2002'de yaptıkları palm yağı metil esterlerinin TMP ile esterleşme tepkimesinde elde ettiği sonuçlar ile örtüşmektedir.

Düz zincirli alkollerin kullanıldığı tepkimelerde ise kullanılan alkolün zincir uzunluğuna bağlı olarak elde edilen ürünün (monoester) yağlayıcılık özelliklerinin farklılık göstereceği bilinmektedir.

4.6. RSM Kullanılarak Biyoyağlayıcı Üretiminin Modellenmesi

Atık yağ SYA ve AYAME'den biyoyağlama yağı üretimi RSM kullanılarak esterleşme ve transesterleşme tepkimeleri için en uygun koşullar belirlenmiştir. SYA için Novozyme 435 lipazı varlığında, AYAME için Novozyme 51032 ve Resinase HT lipazları varlığında optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Serbest lipazlar ve özellikle Resinase HT lipazı varlığında düşük ester verimi alınmasından dolayı Novozyme 435 ve Lipozyme TL IM tutuklanmış lipazları ile optimizasyon yapılarak yüksek ester içerikli biyoyağlama yağları sentezlenmiştir.

Yönteme göre 30 deney için parametrelerin gerçek değerleri ve elde edilen deneysel sonuçlar Novozyme 435 lipazı varlığında SYA ve AYAME için sırasıyla Tablo 4.4 ve 4.5'de verilmiştir. Novozyme 51032 ve Resinase HT ve Lipozyme TL IM varlığında sırasıyla Tablo 4.6, 4.7 ve 4.8'de yine AYAME için verilmiştir.

Gerçekleştirilen esterleşme/transesterleşme tepkimelerine etki eden dört önemli faktör, sıcaklık, başlangıç su içeriği, enzim miktarı ve substrat mol oranı bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. AYAME'den üretimde Novozyme 435 ve Lipozyme TL IM lipazları kullanımında ise başlangıç su içeriği yerine tepkime süresi kullanılmıştır. Yanıt ise %SYA ya da %AYAME dönüşümü olarak tanımlanmıştır. Çalışılan (tüm modellerin) esterleşme/transesterleşme tepkimeleri ile biyoyağlayıcı üretimi için etki eden parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerleri EK-E'de verilmiştir.

Tablo 4.4. SYA için RSM'ye göre önerilen 30 deney için elde edilen deneysel sonuçlar (Novozyme 435)

Deney numarası	Faktör A: Enzim Miktarı (%g yağ+alkol)	Faktör B: Başlangıç Su Miktarı (% toplam substrata göre)	Faktör C: SYA/alkol oranı (mol/mol)	Faktör D: Sıcaklık (°C)	Yanıt: Dönüşen SYA (%)
1	0,00	0,00	3,00	30,00	14
2	25,0	0,00	3,00	30,00	48
3	0,00	15,00	3,00	30,00	14
4	25,0	15,00	3,00	30,00	47
5	0,00	0,00	8,00	30,00	14
6	25,0	0,00	8,00	30,00	22
7	0,00	15,00	8,00	30,00	13
8	25,0	15,00	8,00	30,00	46
9	0,00	0,00	3,00	60,00	13
10	25,0	0,00	3,00	60,00	82
11	0,00	15,00	3,00	60,00	14
12	25,00	15,00	3,00	60,00	83
13	0,00	0,00	8,00	60,00	14
14	25,00	0,00	8,00	60,00	86
15	0,00	15,00	8,00	60,00	14
16	25,00	15,00	8,00	60,00	73
17	0,00	7,50	5,50	45,00	13
18	25,00	7,50	5,50	45,00	58
19	12,50	0,00	5,50	45,00	68
20	12,50	15,00	5,50	45,00	76
21	12,50	7,50	3,00	45,00	78
22	12,50	7,50	8,00	45,00	75
23	12,50	7,50	5,50	30,00	44
24	12,50	7,50	5,50	60,00	88
25	12,50	7,50	5,50	45,00	82
26	12,50	7,50	5,50	45,00	78
27	12,50	7,50	5,50	45,00	81
28	12,50	7,50	5,50	45,00	80
29	12,50	7,50	5,50	45,00	77
30	12,50	7,50	5,50	45,00	82

Tablo 4.5. AYAME için RSM'ye göre önerilen 30 deney için elde edilen deneysel sonuçlar (Novozyme 435)

Deney numarası	Faktör A: Enzim Miktarı (%g yağa göre)	Faktör B: Tepkime süresi(saat)	Faktör C: Tepkime Sıcaklığı (°C)	Faktör D: Mol oranı (AYAME/ alkol)	Yanıt: Dönüşen AYAME (%)
1	0,00	0,00	55,00	0,17	0,00
2	5,00	48,00	35,00	0,25	94,20
3	5,00	48,00	45,00	0,25	97,60
4	0,00	0,00	55,00	0,33	0,00
5	10,00	96,00	55,00	0,33	99,88
6	0,00	0,00	35,00	0,17	0,00
7	0,00	96,00	55,00	0,17	0,00
8	0,00	96,00	35,00	0,17	0,00
9	0,00	96,00	35,00	0,33	0,00
10	5,00	48,00	45,00	0,25	96,90
11	10,00	96,00	35,00	0,33	99,29
12	5,00	48,00	45,00	0,25	97,58
13	5,00	48,00	45,00	0,33	99,29
14	0,00	96,00	55,00	0,33	0,00
15	10,00	0,00	35,00	0,33	0,00
16	5,00	48,00	45,00	0,25	97,40
17	5,00	48,00	55,00	0,25	99,48
18	10,00	0,00	55,00	0,17	0,00
19	10,00	48,00	45,00	0,25	99,00
20	5,00	48,00	45,00	0,17	97,00
21	5,00	96,00	45,00	0,25	99,57
22	5,00	48,00	45,00	0,25	97,80
23	5,00	0,00	45,00	0,25	0,00
24	10,00	0,00	35,00	0,17	0,00
25	5,00	48,00	45,00	0,25	97,26
26	10,00	96,00	35,00	0,17	97,80
27	10,00	0,00	55,00	0,33	0,00
28	10,00	96,00	55,00	0,17	99,10
29	0,00	48,00	45,00	0,25	0,00
30	0,00	35,00	35,00	0,33	0,00

Tablo 4.6. AYAME için RSM'ye göre önerilen 30 deney için elde edilen deneysel sonuçlar (Novozyme 51032)

Deney numarası	Faktör A: Mol oranı (yağ/alkol)	Faktör B: Tepkime Sıcaklığı (°C)	Faktör C: Su içeriği (%(yağ))	Faktör D: Enzim Miktarı (%yağ+su)	Yanıt: Dönüşen AYAME (%)
1	2,00	52,50	7,50	5,00	3,00
2	2,00	37,50	2,50	5,00	7,50
3	5,00	45,00	5,00	10,00	9,30
4	3,00	45,00	5,00	10,00	0,30
5	1,00	45,00	5,00	10,00	47,40
6	3,00	45,00	0,00	10,00	13,40
7	4,00	52,50	2,50	15,00	3,00
8	3,00	45,00	5,00	0,00	1,00
9	4,00	52,50	7,50	5,00	1,00
10	3,00	30,00	5,00	10,00	20,60
11	3,00	45,00	5,00	10,00	20,60
12	2,00	52,50	2,50	5,00	89,70
13	2,00	37,50	7,50	5,00	3,00
14	3,00	45,00	5,00	10,00	11,30
15	3,00	45,00	5,00	20,00	11,50
16	3,00	45,00	5,00	10,00	3,10
17	4,00	37,50	7,50	15,00	23,80
18	4,00	37,50	2,50	5,00	5,00
19	4,00	37,50	7,50	5,00	1,00
20	3,00	45,00	5,00	10,00	16,50
21	3,00	60,00	5,00	10,00	0,20
22	3,00	45,00	5,00	10,00	0,10
23	2,00	37,50	7,50	15,00	10,80
24	2,00	52,50	7,50	15,00	28,00
25	4,00	52,50	7,50	15,00	7,20
26	2,00	37,50	2,50	15,00	13,10
27	3,00	45,00	10,00	10,00	26,80
28	4,00	37,50	2,50	15,00	7,70
29	2,00	52,50	2,50	15,00	9,00
30	4,00	52,50	2,50	5,00	4,00

Tablo 4.7. AYAME için RSM'ye göre önerilen 30 deney için elde edilen deneysel sonuçlar (Resinase HT)

Deney numarası	Faktör A: Mol oranı (AYAME/alkol)	Faktör B: Tepkime Sıcaklığı (°C)	Faktör C: Su içeriği (%(yağ))	Faktör D: Enzim Miktarı (%yağ+su)	Yanıt Dönüşen AYAME (%)
1	2,00	52,50	7,50	5,00	22,70
2	2,00	37,50	2,50	5,00	2,40
3	5,00	45,00	5,00	10,00	29,00
4	3,00	45,00	5,00	10,00	34,00
5	1,00	45,00	5,00	10,00	50,50
6	3,00	45,00	0,00	10,00	25,80
7	4,00	52,50	2,50	15,00	6,90
8	3,00	45,00	5,00	0,00	3,10
9	4,00	52,50	7,50	5,00	0,20
10	3,00	30,00	5,00	10,00	41,20
11	3,00	45,00	5,00	10,00	34,00
12	2,00	52,50	2,50	5,00	15,50
13	2,00	37,50	7,50	5,00	31,70
14	3,00	45,00	5,00	10,00	31,00
15	3,00	45,00	5,00	20,00	40,20
16	3,00	45,00	5,00	10,00	38,10
17	4,00	37,50	7,50	15,00	32,40
18	4,00	37,50	2,50	5,00	5,90
19	4,00	37,50	7,50	5,00	8,80
20	3,00	45,00	5,00	10,00	33,00
21	3,00	60,00	5,00	10,00	6,20
22	3,00	45,00	5,00	10,00	23,70
23	2,00	37,50	7,50	15,00	29,10
24	2,00	52,50	7,50	15,00	35,00
25	4,00	52,50	7,50	15,00	61,90
26	2,00	37,50	2,50	15,00	26,50
27	3,00	45,00	10,00	10,00	35,00
28	4,00	37,50	2,50	15,00	21,90
29	2,00	52,50	2,50	15,00	22,70
30	4,00	52,50	2,50	5,00	17,60

Tablo 4.8. AYAME için RSM'ye göre önerilen 30 deney için elde edilen deneysel sonuçlar (Lipozyme TL IM)

Deney numarası	Faktör A: Enzim Miktarı (%gr yağa göre)	Faktör B: Tepkime süresi (saat)	Faktör C: Tepkime Sıcaklığı (°C)	Faktör D: Mol oranı (AYAME/ alkol)	Yanıt Dönüşen AYAME (%)
1	0,00	0,00	55,00	0,17	0,00
2	5,00	48,00	35,00	0,25	87,25
3	5,00	48,00	45,00	0,25	89,62
4	0,00	0,00	55,00	0,33	0,00
5	10,00	96,00	55,00	0,33	93,10
6	0,00	0,00	35,00	0,17	0,00
7	0,00	96,00	55,00	0,17	0,00
8	0,00	96,00	35,00	0,17	0,00
9	0,00	96,00	35,00	0,33	0,00
10	5,00	48,00	45,00	0,25	71,25
11	10,00	96,00	35,00	0,33	91,25
12	5,00	48,00	45,00	0,25	68,75
13	5,00	48,00	45,00	0,33	71,00
14	0,00	96,00	55,00	0,33	0,00
15	10,00	0,00	35,00	0,33	0,00
16	5,00	48,00	45,00	0,25	89,50
17	5,00	48,00	55,00	0,25	91,87
18	10,00	0,00	55,00	0,17	0,00
19	10,00	48,00	45,00	0,25	89,91
20	5,00	48,00	45,00	0,17	87,75
21	5,00	96,00	45,00	0,25	94,62
22	5,00	48,00	45,00	0,25	89,95
23	5,00	0,00	45,00	0,25	0,00
24	10,00	0,00	35,00	0,17	0,00
25	5,00	48,00	45,00	0,25	89,81
26	10,00	96,00	35,00	0,17	66,25
27	10,00	0,00	55,00	0,33	0,00
28	10,00	96,00	55,00	0,17	89,55
29	0,00	48,00	45,00	0,25	0,00
30	0,00	35,00	35,00	0,33	0,00

Novozyme 435 katalizörü varlığında program tarafından tasarlanan model analizleri Tablo 4.9 ve 4.10'da verilmiştir. Program, SYA ve AYAME için kuadratik modeli önermiştir. Lipozyme TL IM katalizörü varlığında ise AYAME için yine kuadratik model önerilmiştir (Tablo 4.11). Aynı zamanda her iki model için CCD (merkezi kompozit tasarım-central composite design) tam bir kübik modeli desteklemek için yeterli değildir.

Esterleşme/transesterleşme tepkimeleri için literatürde genellikle önerilen durum ikinci dereceden bir matematiksel model ile tanımlanmasıdır. Bu açıdan model uygunluğu literatür tarafından da desteklenmektedir. AYAME için serbest lipazlar Resinase HT ve Novozyme 51032 lipazlarının kullanıldığı koşullardaki model analizleri sırasıyla Tablo 4.12 ve 4.13'te verilmiştir.

Tablo 4.9. Novozyme 435 varlığında atık yağ SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için oluşturulan model istatistik verileri

Model	Standart sapma	R ²	Hesaplanmış R ²	Öngörülen R ²
Doğrusal	23,23	0,48	0,39	0,26
2FI	24,80	0,55	0,31	-0,49
2. Derece	7,37	0,97	0,94	0,83
Kübik	6,30	0,98	0,95	-0,86

Tablo 4.10. Novozyme 435 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için oluşturulan model istatistik verileri

Model	Standart sapma	R ²	Hesaplanmış R ²	Öngörülen R ²
Doğrusal	42,23	0,38	0,28	0,09
2FI	42,78	0,52	0,26	-0,62
2. Derece	12,55	0,98	0,94	0,86
Kübik	4,60	0,99	0,99	0,76

Tablo 4.11. Lipozyme TL IM varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için oluşturulan model istatistik verileri

Model	Standart sapma	R ²	Hesaplanmış R ²	Öngörülen R ²
Doğrusal	37,19	0,38	0,28	0,08
2FI	37,19	0,51	0,25	-0,64
2. Derece	14,32	0,94	0,89	0,78
Kübik	9,09	0,99	0,96	0,80

Resinase HT lipazı varlığında gerçekleşen esterleşme tepkimeleri için program tarafından doğrusal model önerilmiştir (Tablo 4.12). Ester dönüşümünün ise beklenenden düşük olduğu görülmüştür. Novozyme 51032 lipazı varlığında ise tepkimeye ikili etkileşiminin en yüksek olduğu parametreler (su içeriği ve enzim miktarı) için doğrusal 2FI modeli önerilmiştir (Tablo 4.13). Program tarafından önerilen modellerin lack of fit test sonuçları Novozyme 435 lipazı varlığında SYA ve AYAME için sırasıyla Tablo 4.14 ve 4.15’de, Lipozyme TL IM varlığında AYAME için 4.16’da, serbest lipazlar varlığında Resinase HT ve Novozyme 51032 için sırasıyla Tablo 4.17 ve 4.18’de görülmektedir. Lack of fit testlerinin amacı, seçilen modeldeki uyumsuzluğun ne kadar önemsiz olduğunun tanımlanmasıdır.

Tablo 4.12. Resinase HT varlığında atık yağ AYAME ve TMP’den biyoyağlayıcı üretimi için oluşturulan model istatistik verileri

Model	Standart sapma	R ²	Hesaplanmış R ²	Öngörülen R ²
Doğrusal	12,10	0,43	0,33	0,13
2FI	13,13	0,48	0,21	-0,97
2. Derece	12,99	0,60	0,23	-1,22
Kübik	8,35	0,92	0,68	-7,47

Tablo 4.13. Novozyme 51032 varlığında atık yağ AYAME ve TMP’den biyoyağlayıcı üretimi için oluşturulan model istatistik verileri

Model	Standart sapma	R ²	Hesaplanmış R ²	Öngörülen R ²
Doğrusal	17,62	0,17	0,03	-0,27
2FI	14,72	0,56	0,33	-0,67
2. Derece	14,97	0,64	0,30	-0,90
Kübik	13,48	0,86	0,43	-12,8

Tablo 4.14. Novozyme 435 varlığında atık yağ SYA ve TMP’den biyoyağlayıcı üretimi için RSM Lack of fit test sonuçları

Model	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri olasılık>F
Doğrusal	134469,13	20	673,45	153,06	< 0,0001
2FI	11667,16	14	833,37	189,40	< 0,0001
2. Derece	793,63	10	79,36	18,40	0,0026
Kübik	304,46	2	152,23	34,60	0,0012

Tablo 4.15. Novozyme 435 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için RSM Lack of fit test sonuçları

Model	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri olasılık>F
Doğrusal	44578,13	20	2228,91	22345,67	< 0,0001
2FI	34772,54	14	2483,75	24900,61	< 0,0001
2. Derece	2361,52	10	236,15	2367,52	< 0,0001
Kübik	145,37	2	72,68	728,69	< 0,0001

Tablo 4.16. Lipozyme TL IM varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için RSM Lack of fit test sonuçları

Model	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri olasılık>F
Doğrusal	34056,26	20	1702,81	16,32	0,0030
2FI	26615,17	14	1901,08	18,22	0,0024
2. Derece	2552,24	10	255,22	2,45	0,1678
Kübik	56,82	2	28,41	0,27	0,7723

Tablo 4.17. Resinase HT varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için RSM Lack of fit test sonuçları

Model	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri olasılık>F
Doğrusal	3547,07	20	177,35	7,67	0,0164
2FI	3157,79	14	225,56	9,76	0,0010
2. Derece	2415,24	10	241,52	10,45	0,0092
Kübik	372,08	2	186,04	8,05	0,0273

Tablo 4.18. Novozyme 51032 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için RSM Lack of fit test sonuçları

Model	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri olasılık>F
Doğrusal	7373,10	20	368,65	4,78	0,0453
2FI	3729,71	14	266,41	3,46	0,0889
2. Derece	2977,77	10	297,78	3,86	0,0744
Kübik	886,52	2	443,77	5,75	0,0505

Program tarafından önerilen modellerin ANOVA analizleri Novozyme 435 varlığında SYA ve AYAME için sırasıyla Tablo 4.19 ve 4.20’de, Lipozyme TL IM varlığında AYAME için Tablo 4.21’de, Resinase HT ve Novozyme 51032 için ise sırasıyla Tablo 4.22 ve 4.23’te verilmiştir. Her üç model için de tablolardaki tüm model değişkenlerinin hepsinin anlamlı olduğu görülmektedir. Tasarlanan modeller için F (gerileme) değerleri Novozyme 435 varlığında SYA ve AYAME için sırasıyla 32,84 ve 31,52 (Tablo 4.19, Tablo 4.20) olmuştur.

Tablo 4.19. Novozyme 435 varlığında Atık yağ SYA ve TMP’den biyoyağlayıcı üretimi RSM modeli ANOVA analizi

Faktör	Kareler toplamı	df	Ortalama kareler	F değeri	P değeri olasılık>F
Tüm Model	24995,74	14	1785,41	32,84	< 0,0001
A	9893,56	1	9893,56	181,95	< 0,0001
B	20,06	1	20,06	0,37	0,5527
C	72,00	1	72,00	1,32	0,2679
D	2334,72	1	2334,72	42,94	< 0,0001
AB	7,56	1	7,56	0,14	0,7144
AC	68,06	1	68,06	1,25	0,2808
AD	1620,06	1	1620,06	29,79	< 0,0001
BC	5,06	1	5,06	0,093	0,7645
BD	68,06	1	68,06	1,25	0,2808
CD	33,06	1	33,06	0,61	0,4477
A ²	3515,07	1	3515,07	64,65	< 0,0001
B ²	0,29	1	0,29	5,294E-003	0,9430
C ²	44,98	1	44,98	0,83	0,3775
D ²	103,92	1	103,92	1,91	0,1871

Lipozyme TL IM varlığında ise bu değer AYAME için 45,96 olduğu Tablo 4.21’den, serbest lipazlar Resinase HT ve Novozyme 51032 için ise sırasıyla 4,58 ve 2,40 olduğu Tablo 4.22 ve Tablo 4.23’ten görülmektedir. F değerleri, modelin önemli

olduğunu; bu da p-0.0001'den düşük değerlerde modelin önemli ölçüde uygunluğunu göstermektedir (Kumar et al.2003).

Serbest lipazlar varlığında ulaşılan düşük gerileme (F) değerleri model için uygun olduğu bilinmekle birlikte gerçekte değişkenlik gösterdiği yapılan tekrar deneylerle ispatlanmıştır. Çalışılan tüm modellerin program tarafından öngörülen denklemleri EK-F'de verilmiştir.

Tablo 4.20. Novozyme 435 varlığında Atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi RSM modeli ANOVA analizi

Faktör	Kareler toplamı	df	Ortalama kareler	F değeri	P değeri olasılık>F
Tüm Model	69484,69	14	69484,69	31,52	< 0,0001
A	13616,35	1	13616,35	86,47	< 0,0001
B	13647,72	1	13647,72	86,67	< 0,0001
C	2,86	1	2,86	0,018	0,8947
D	1,16	1	1,16	7,336E-003	0,9329
AB	79804,47	1	79804,47	62,26	< 0,0001
AC	0,22	1	0,22	1,418E-003	0,9705
AD	0,32	1	0,32	2,045E-003	0,9645
BC	0,22	1	0,22	1,41E-003	0,9705
BD	0,32	1	0,32	2,045E-003	0,9645
CD	0,032	1	0,032	2,001E-003	0,9889
A ²	4469,97	1	4469,97	28,39	< 0,0001
B ²	4408,84	1	4408,84	28,00	< 0,0001
C ²	87,27	1	87,27	0,55	0,4681
D ²	130,93	1	130,93	0,83	0,3763

Ayrıca literatürde, F değerleri ne kadar yüksek ve p değerleri de buna karşın ne kadar düşük ise modelin uygunluğunun o derece iyi olduğu belirtilir. Önerilen modeller için Adeq. Precision, sinyal/gürültü oranının 4'den büyük bir değer olması istenir.

Novozyme 435 varlığında SYA ve AYAME için sırasıyla bu oran sırasıyla 14,87 ve 12,55'dir (Tablo 4.24, Tablo 4.25).

Tablo 4.21. Lipozyme TL IM varlığında Atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi RSM modeli ANOVA analizi

Faktör	Kareler toplamı	df	Ortalama kareler	F değeri	P değeri olasılık>F
Tüm Model	54637,16	18	3035,40	45,96	< 0,0001
A	3952,49	1	3952,49	59,84	< 0,0001
B	4476,47	1	4476,47	67,77	< 0,0001
C	10,67	1	10,67	0,16	0,6954
D	140,28	1	140,28	2,12	0,1730
AB	7231,38	1	7231,38	109,48	< 0,0001
AC	39,53	1	39,53	0,60	0,4554
AD	50,94	1	50,94	0,77	0,3986
BC	39,53	1	39,53	0,60	0,4554
BD	50,94	1	50,94	0,77	0,3986
CD	28,76	1	28,76	0,44	0,5229
A ²	3336,37	1	3336,37	50,51	< 0,0001
B ²	2826,60	1	2826,60	42,79	< 0,0001
C ²	220,26	1	220,26	3,33	0,0951
D ²	2,41	1	2,41	0,037	0,8519
AC ²	956,51	1	956,51	14,48	0,0029
B ² C	0,97	1	0,97	0,015	0,9058
B ² D	183,49	1	183,49	2,78	0,1238
BC ²	1206,46	1	1206,46	18,27	0,0013

Tablo 4.22. Resinase HT varlığında Atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi RSM modeli ANOVA analizi

Faktör	Kareler toplamı	df	Ortalama kareler	F değeri	P değeri olasılık>F
Tüm Model	2683,74	4	670,93	4,58	0,0065
A	222,04	1	222,04	1,52	0,2297
B	88,93	1	88,93	0,61	0,4432
C	608,03	1	608,03	4,15	0,0523
D	1764,74	1	1764,74	12,05	0,0019

Tablo 4.23. Novozyme 51032 varlığında Atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi RSM modeli ANOVA analizi

Faktör	Kareler toplamı	df	Ortalama kareler	F değeri	P değeri olasılık>F
Tüm Model	5205,94	10	520,59	2,40	0,0480
A	1466,41	1	1466,41	6,77	0,0175
B	43,20	1	43,20	0,20	0,6602
C	49,31	1	49,31	0,23	0,6387
D	3,63	1	3,63	0,017	0,8983
AB	864,36	1	864,36	3,99	0,0603
AC	481,80	1	481,80	2,22	0,1522
AD	333,06	1	333,06	1,54	0,2300
BC	322,20	1	322,20	1,49	0,2375
BD	499,52	1	499,52	2,31	0,1453
CD	1142,44	1	1142,44	5,27	0,0332

Tablo 4.24. Novozyme 435 varlığında atık yağ SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri

Standart sapma	7,37
Ortalama	52,57
C.V. %	14,03
Hesaplanmış R^2	0,97
Öngörülen R^2	0,83
Sinyal gürültü oranı	14,87

Tablo 4.25. Novozyme 435 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri

Standart sapma	12,55
Ortalama	52,31
C.V. %	23,99
Hesaplanmış R^2	0,97
Öngörülen R^2	0,86
Sinyal gürültü oranı	12,56

Lipozyme TL IM varlığında ise AYAME için 15,6'dır (Tablo 4.26). Serbest lipazlar Resinase HT ve Novozyme 51032 için ise sırasıyla 7,5 ve 7,7'dir (Tablo 4.27 ve Tablo 4.28). Bu değer 4'ten ne derece uzaklaşırsa modelin uyumluluğu da artmaktadır. Bu oranlar önerilen tutuklanmış lipazlar için modellerin oldukça uygun, serbest lipazlar için uygun olduğunu göstermektedir.

Ayrıca modelin uygunluğu öngörülen değerler ile gerçek değerler arasındaki ilişkiye de bağlıdır. R^2 değeri ne kadar 1'e yakın ise model o derece iyidir. Novozyme 435 varlığında SYA ve AYAME için sırasıyla (Adjusted R^2) 0,94 ve 0,93'dür. Lipozyme TL IM varlığında ise AYAME için 0,96'dır. Resinase ve Novozyme 51032 için ise sırasıyla 0,43 ve 0,55'dir. Bu parametreler serbest lipazlar hariç modellerin uygunluğunu pekiştirmektedir (Yuan et al. 2008, Shrivastavs 2008).

Tablo 4.26. Lipozyme TL IM varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri

Standart sapma	8,13
Ortalama	45,35
C.V. %	17,92
Hesaplanmış R^2	0,99
Öngörülen R^2	0,90
Sinyal gürültü oranı	15,60

Tablo 4.27. Resinase HT varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri

Standart sapma	12,10
Ortalama	25,53
C.V. %	47,40
Hesaplanmış R^2	0,43
Öngörülen R^2	0,33
Sinyal gürültü oranı	7,52

Tablo 4.28. Novozyme 51032 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri

Standart sapma	14,72
Ortalama	13,10
C.V. %	110,66
Hesaplanmış R^2	0,56
Öngörülen R^2	0,67
Sinyal gürültü oranı	7,70

Sonuçlardan görülebileceği gibi önerilen tüm modellerin de p-değerleri 0,05'ten küçüktür. Fakat tutuklanmış lipazla yapılan çalışmalar için önerilen modeller üzerinde yapılan diğer hesaplamalar model uyumsuzluğunda modele göre en yüksek p-

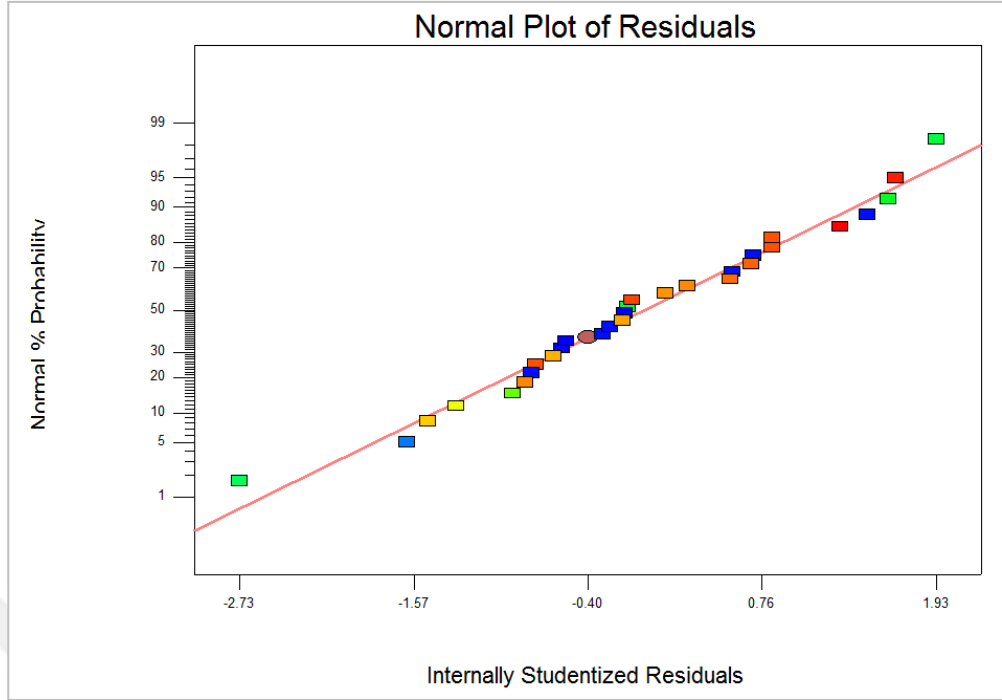
değerinin ve en düşük kareler toplamının, ANOVA analizlerinde ise en yüksek R^2 değerinin kuadratik model ile tespit edilebileceğini anlaşılmaktadır.

Transesterleşme tepkimeleri için serbest lipazların uygun bir desteğe (hidrotalsit, kitosan vb.) tutuklanarak aktivite ve kararlılığının korunarak kullanılması sonraki çalışmalar için öngörülmüştür. Program tarafından oluşturulan modellerin R değerlerinin 1'den uzaklaştığı açıkça görülerek esterleşme/transesterleşme tepkimeleri için tutuklanmış lipazların kullanılmasının daha uygun olduğu araştırma ekibimizce belirlenmiştir.

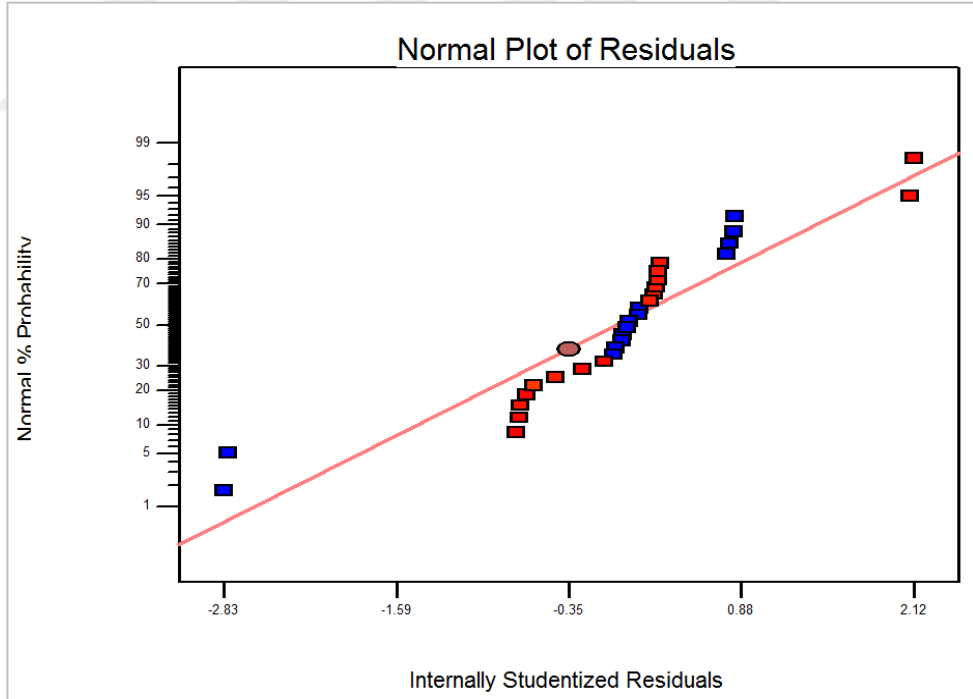
Novozyme 435 varlığında SYA ve AYAME için program tarafından hesaplanan residual grafikleri sırasıyla Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'de, Resinase HT ve Novozyme 51032 için de sırasıyla Şekil 4.26 ve 4.27'de verilmiştir. Lipozyme TL IM varlığında AYAME için residual grafiği Şekil 4.28'de verilmiştir.

Ayrıca öngörülen sonuçlar ile gerçek değerler arasında çizilen grafikler yine sırasıyla Novozyme 435 varlığında SYA ve AYAME için Şekil 4.29 ve 4.30'da, Resinase HT ve Novozyme 51032 için Şekil 4.31 ve 4.32'de verilmiştir. Lipozyme TL IM varlığında AYAME için öngörülen sonuçlar ile gerçek değerler Şekil 4.33'de (öngörülen) verilmiştir.

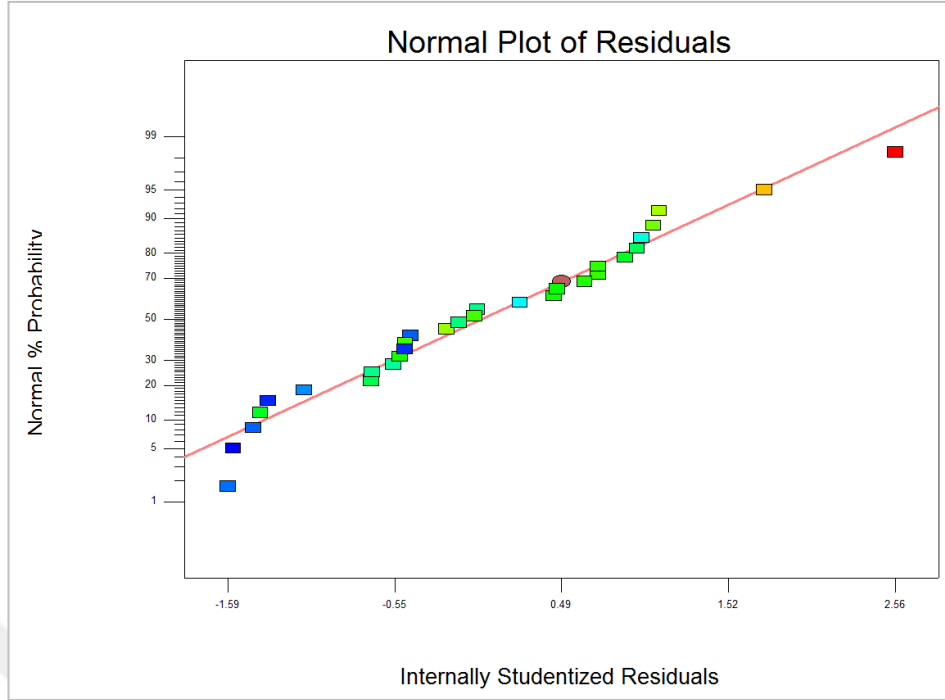
Noktaların düz çizgiler boyunca dağılımı, deneysel değerler ile yanıtın öngörülen değerleri arasında iyi bir ilişki olduğunu gösterir. Ayrıca seçilen tüm modellerin deneysel değerlerdeki yanıt değişkenlerinin öngörülmesi için yeterli olduğu tutuklanmış lipazlar (Novozyme 435 ve Lipozyme TL IM) varlığında gerçekleşen tepkimeler için görülmektedir. Çalışılan tüm modellerin 3 boyutlu model grafikleri EK-G'de verilmiştir.



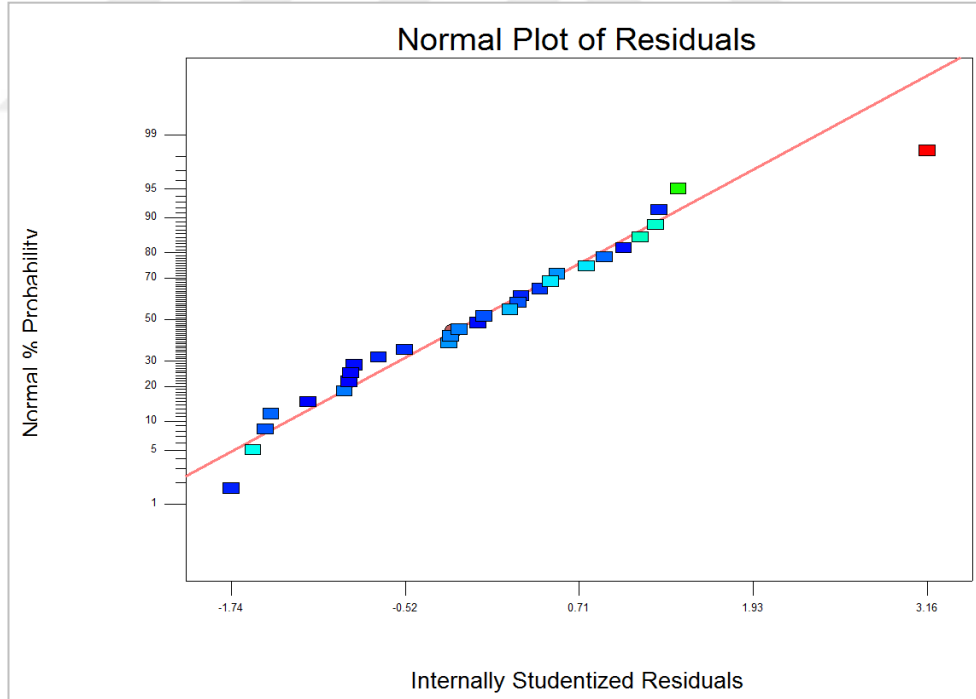
Şekil 4.24. Novozyme 435 katalizörlüğünde SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için residual normal grafiği



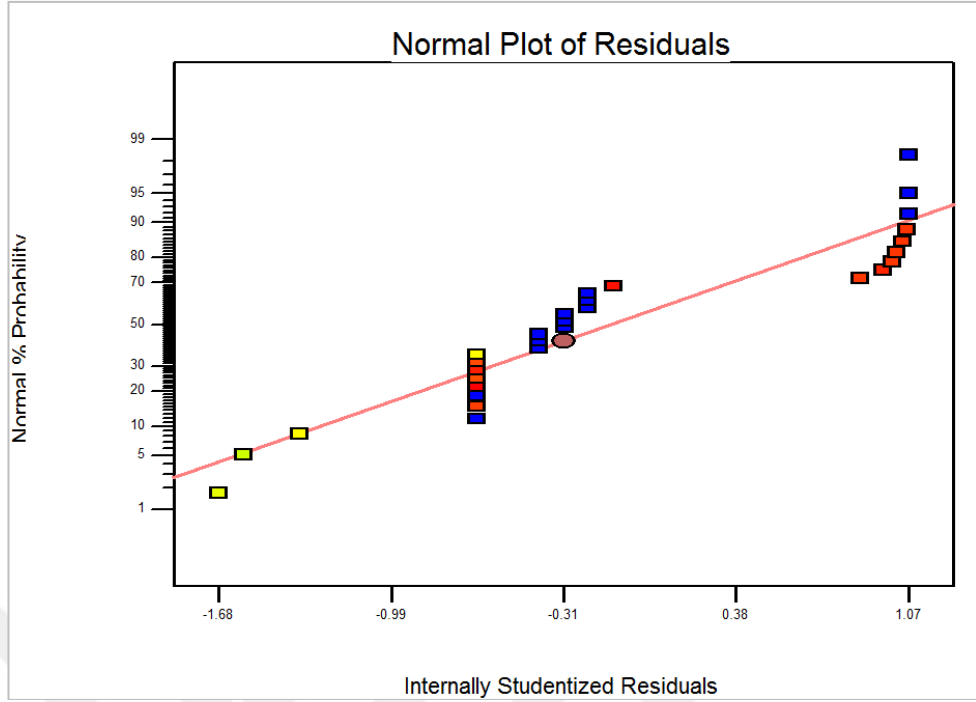
Şekil 4.25. Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için residual normal grafiği



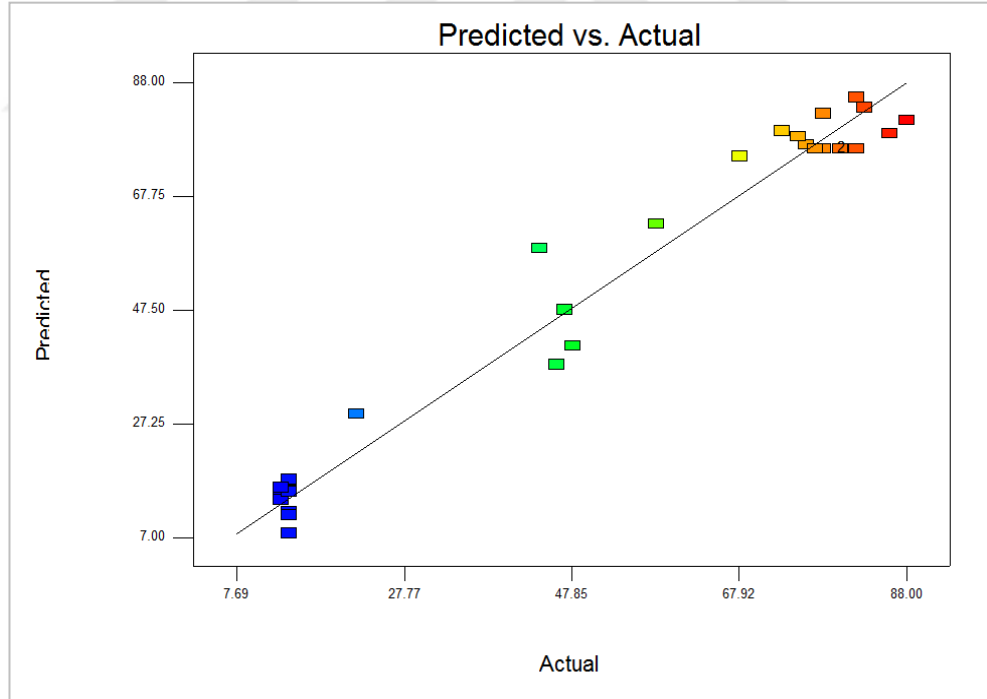
Şekil 4.26. Resinase HT katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için residual normal grafiği



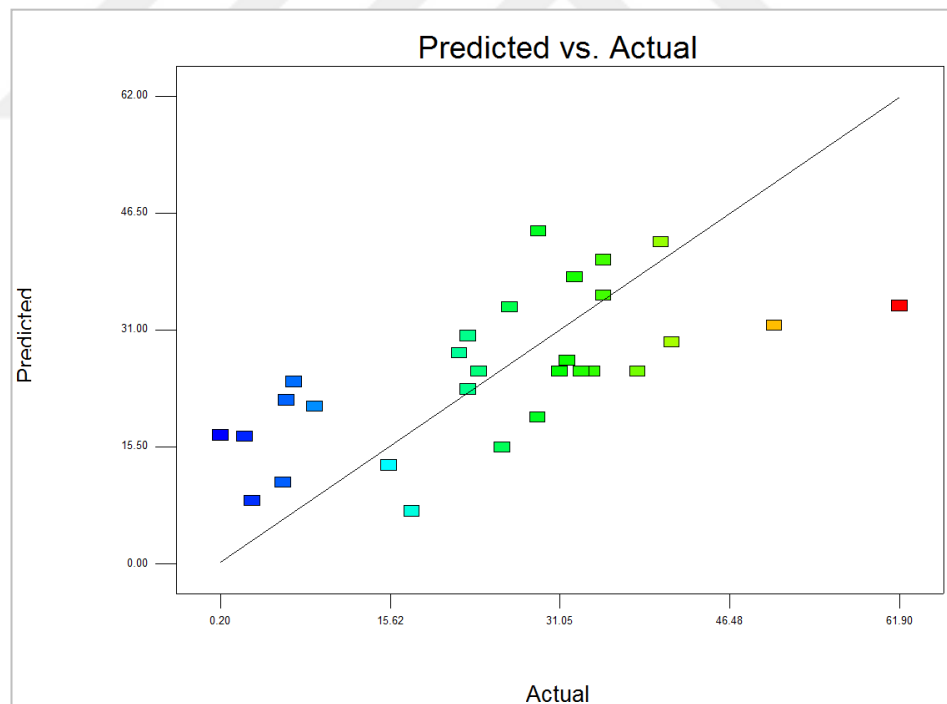
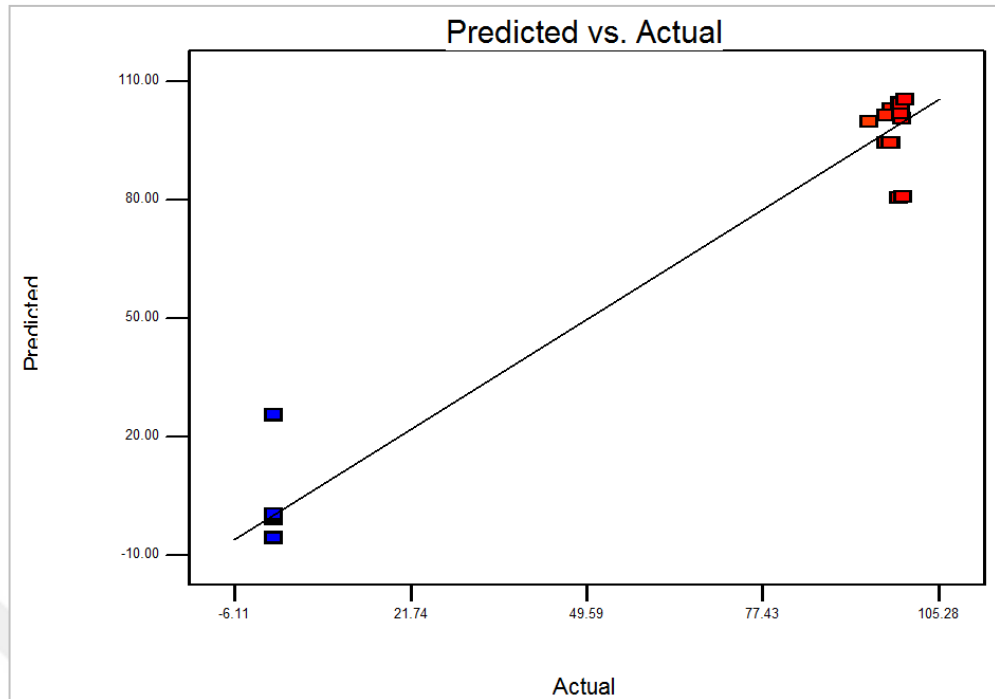
Şekil 4.27. Novozyme 51032 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için residual normal grafiği

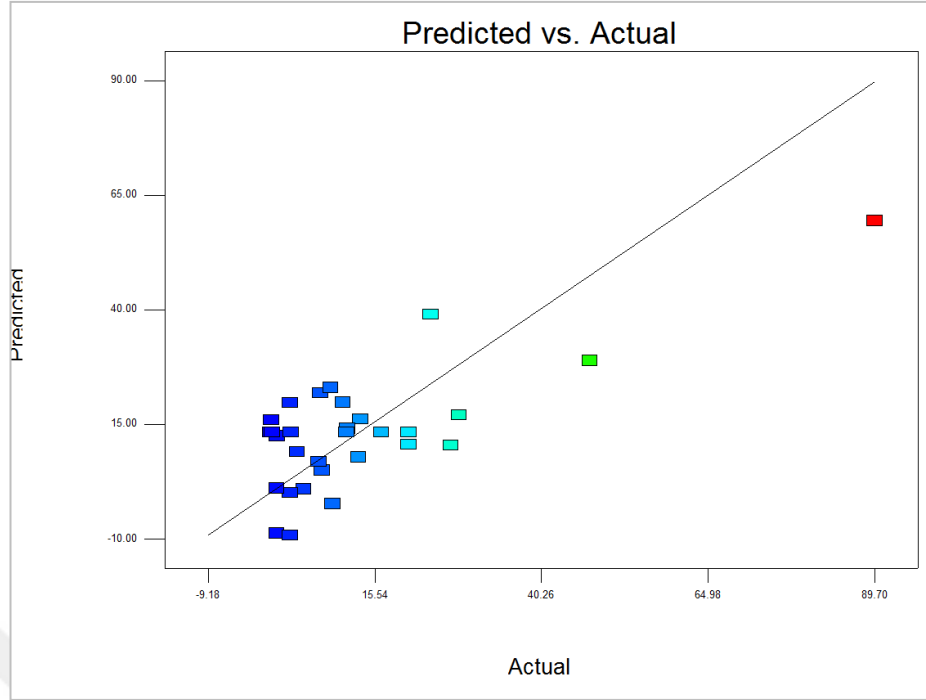


Şekil 4.28. Lipozyme TL IM katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için gerçek değerlere karşı öngörülen değerler grafiği

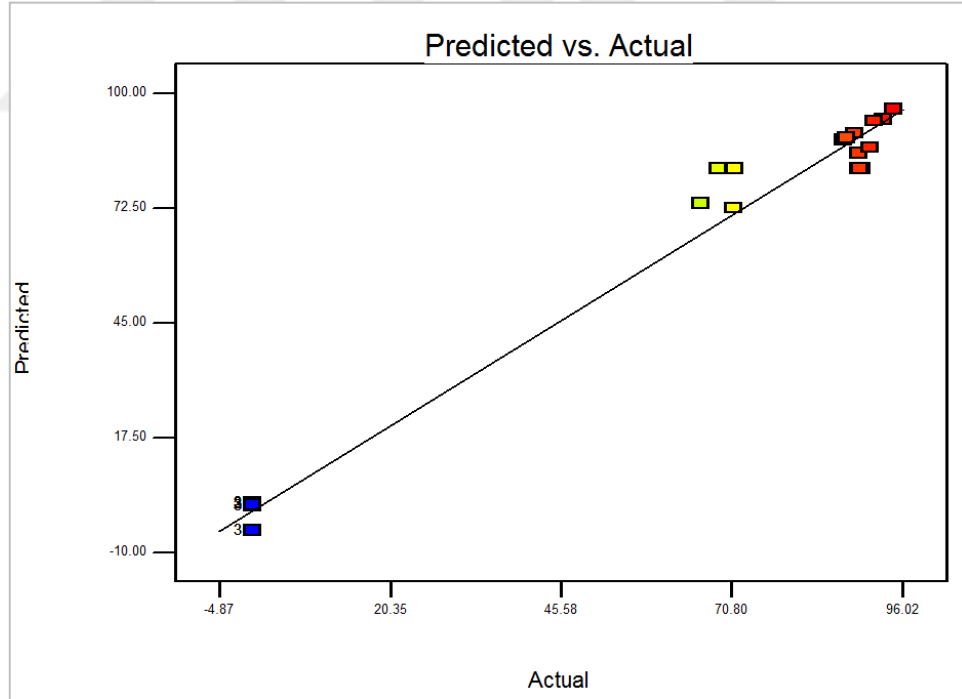


Şekil 4.29. Novozyme 435 katalizörlüğünde SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için gerçek değerlere karşı öngörülen değerler grafiği





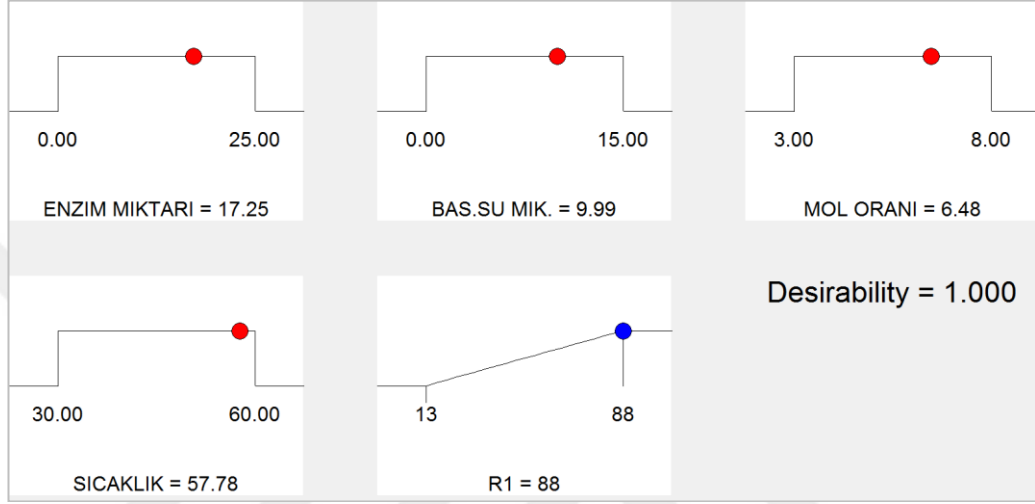
Şekil 4.32. Novozyme 51032 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için gerçek değerlere karşı öngörülen değerler grafiği



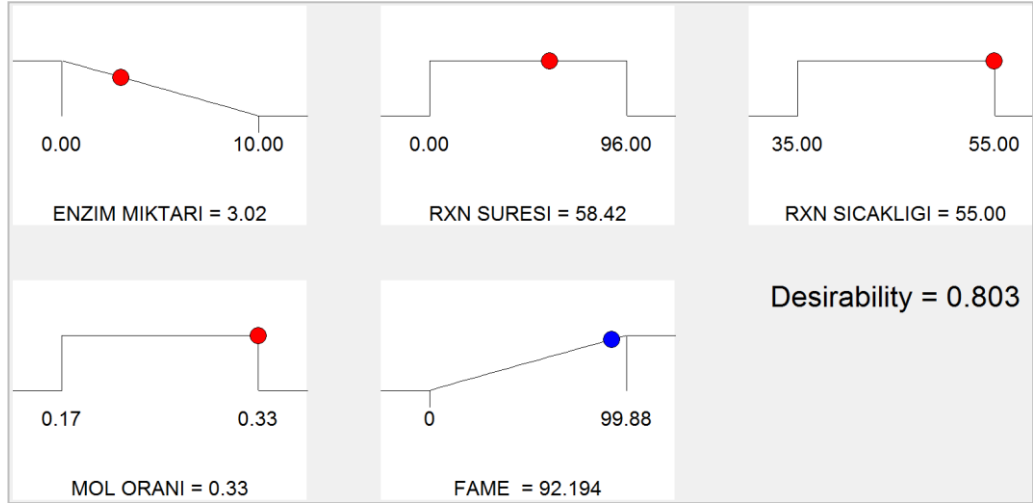
Şekil 4.33. Lipozyme TL IM katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için residual normal grafiği

Novozyme 435 katalizörü varlığında SYA ile TMP arasındaki esterleşme tepkimesi için, model optimizasyonu sonucunda iyileştirme ile %17,25 lipaz, %9,99 su, molar oran 6,48 ve sıcaklık 57,78°C koşulları için program yanıtı (SYA dönüşümü) %88

olarak belirlenmiştir (Şekil 4.34). Ayrıca, tepkime için sıcaklığın artması SYA dönüşümüne pozitif yönde etki ettiği ancak 60°C'den sonra enzim yapısının bozunarak dönüşümün azalacağı belirlenmiştir. Başlangıç su miktarın azalması ve artmasının belirgin bir etkisi olmamakla birlikte ağız açık erlenlerde yapılan deneylerden tepkime süresince ortamda oluşan su moleküllerinin buharlaştığı düşünülmektedir (Şekil G.1a, G.1d).



Şekil 4.34. Novozyme 435 katalizörlüğünde SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için model optimizasyonu çalışması

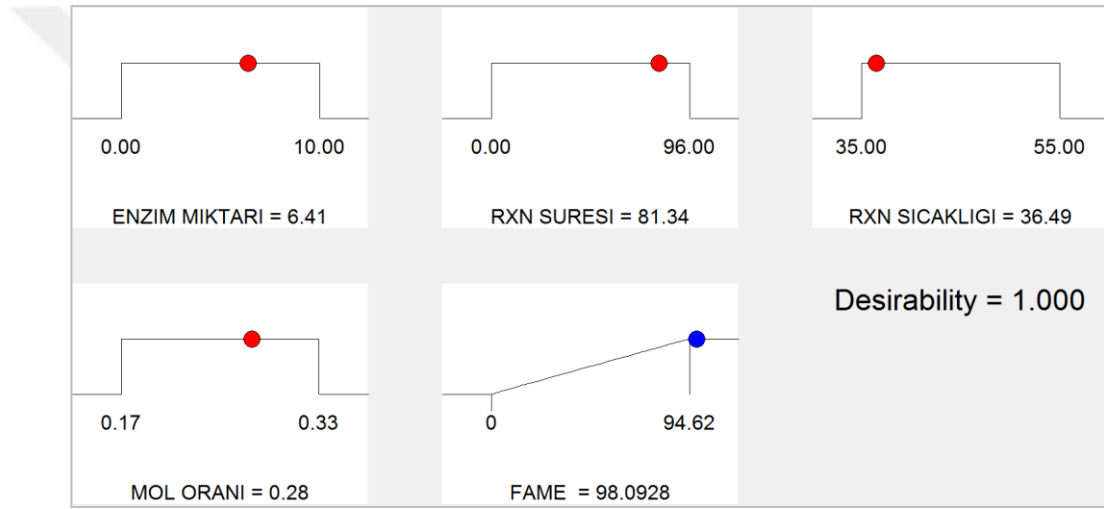


Şekil 4.35. Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için model optimizasyonu çalışması

Novozyme 435 katalizörü varlığında AYAME ile TMP arasındaki transesterleşme tepkimesi için, model optimizasyonu sonucunda önerilen koşullardan biri sonucundaki muhtemel yanıt değeri (%92,2 AYAME dönüşümü) Şekil 4.35'te verilmiştir. Tepkime süresinin artması ile birlikte AYAME dönüşümüne önemli bir etkisinin olmadığı

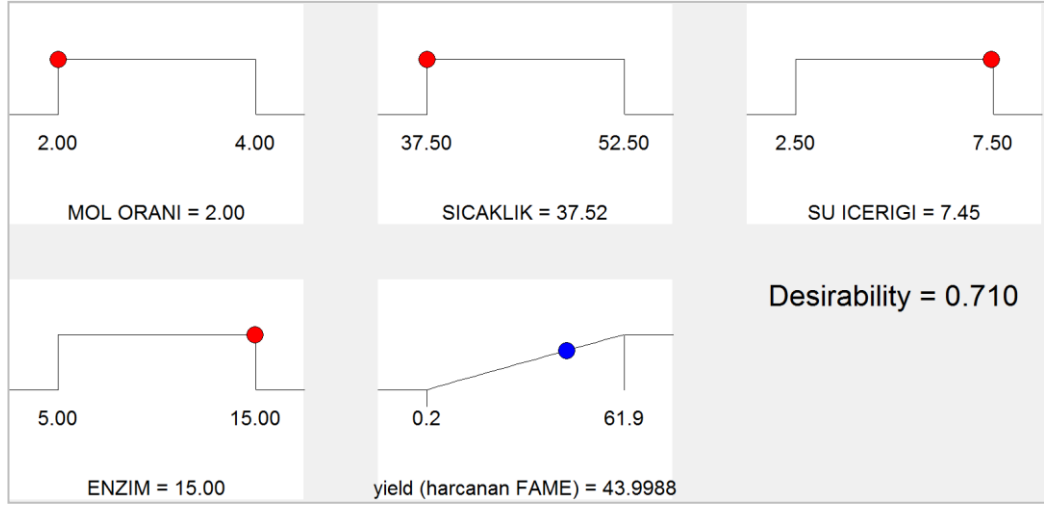
görülmektedir. Enzim miktarı ile tepkime süresi birlikte arttırıldığında yanıt değerinin de yükseldiği görülmektedir (Şekil G.2a). Tepkime sıcaklığı ile enzim miktarı arasındaki ilişki incelendiğinde, mol oranı ve tepkime süresi sabit iken enzim miktarının artması ile dönüşüm öncelikle artmış sonrasında azalmıştır (Şekil G.2b).

Enzim miktarı ile mol oranı arasındaki ilişki incelendiğinde yanıt yüzeyi her iki faktördeki artışla en yüksek AYAME dönüşümünün elde edileceğini ifade etmektedir. TMP/AYAME mol oranı 1/4 ve enzim miktarı %5 iken bu değerlerden uzaklaşıldığında AYAME dönüşümünde düşüş olduğu görülmektedir (Şekil G.2c). Benzer bir ilişki tepkime sıcaklığı ile tepkime süresi ve aynı zamanda mol oranı arasındaki ilişkide de mevcut olduğu belirlenmiştir (Şekil G.2d).



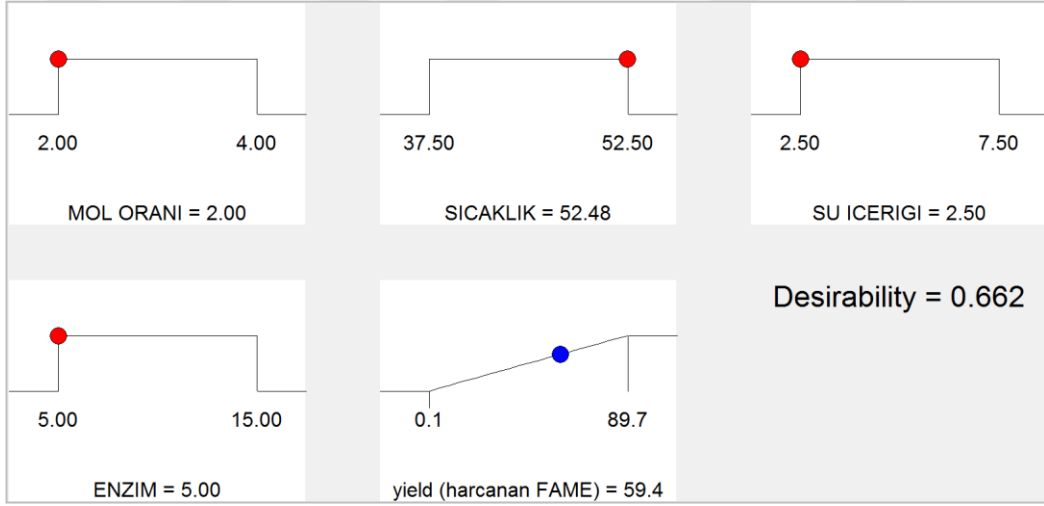
Şekil 4.36. Lipozyme TL IM katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için model optimizasyonu çalışması

Lipozyme TL IM katalizörü varlığında AYAME ile TMP arasındaki transesterleşme 36,5°C sıcaklık, 0,28 mol oranı ve %6,41 enzim ile 81,3 saatlik tepkime sonucunda %98 AYAME dönüşümü elde edileceği önerilen koşullardan yalnızca biridir (Şekil 4.36). Ayrıca, AYAME dönüşümünü artırmak için %5 ve daha fazla enzim miktarı ile çalışılması gerekmektedir (Şekil G.3b, G.3c). Enzim miktarı ile mol oranı arasındaki ilişki incelendiğinde enzim miktarının artması ile mol oranının azalması doğrultusunda AYAME içeriği artmıştır (Şekil G.3c). Tepkime sıcaklığı artarken tepkime süresinin de 48 saatten fazla olması ile birlikte yüksek AYAME dönüşümlerine ulaşılacağı gözlemlenmiştir (Şekil G.3d). Yanıta etki eden en önemli iki parametrenin enzim miktarı ve tepkime süresi olduğu yüzey grafiklerinden görülmektedir.



Şekil 4.37. Resinase HT katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için model optimizasyonu çalışması

Resinase HT katalizörü varlığında model oluştururken enzim miktarı %15, sıcaklık 52,5°C, su içeriği %7,5 ve mol oranı 4 olduğunda deneysel olarak belirlenen en yüksek AYAME dönüşümüne (%61,9) ulaşıldığı belirlenmiştir. Optimizasyon sonunda ise tüm faktörler seçilen aralıkta iken yanıtın %44 olacağı model tarafından öngörülmektedir (Şekil 4.37).



Şekil 4.38. Novozyme 51032 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için model optimizasyonu çalışması

Novozyme 51032 için model tasarımında çalışılan enzim miktarı %5, su içeriği %2,5, mol oranı 2 ve sıcaklık 52,5°C olduğu durumda deneysel olarak belirlenen en yüksek AYAME dönüşümüne (%89,7) ulaşılmıştır. Model optimizasyonu sonunda ise program, en yüksek yanıt değeri için Şekil 4.38'deki aralıklarda çalışılmasını öngörmektedir. Bu farklılık negatif değerli Pred.-R² değerinin anlamı ile örtüşmektedir.

Tepkime için sıcaklığın artmasının AYAME dönüşümüne pozitif yönde etki ettiği ancak, 55°C'den sonra enzimin bozunarak dönüşümün azaldığı her iki serbest enzimde (Resinase HT, Novozyme 51032) de görülmektedir (Şekil G.4b ve 4d, Şekil G.5a ve 5d).

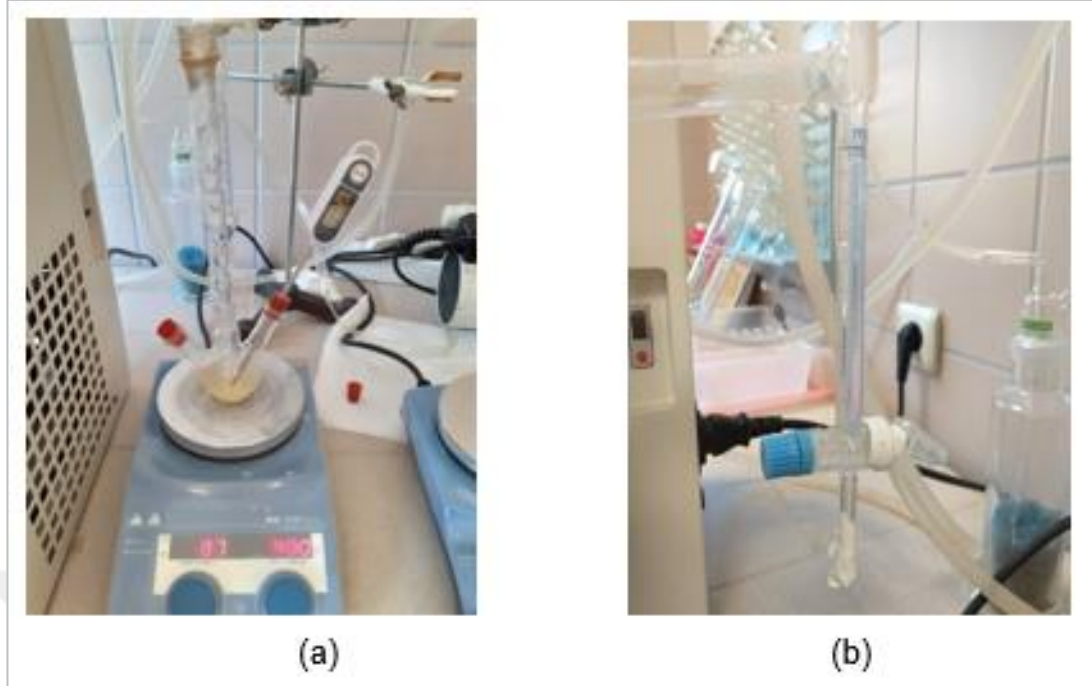
Bu parametrelerin yanı sıra başlangıç su miktarının artmasının ise yanıt üzerindeki etkisi olumlu yönde olmuştur. En etkili bağımsız değişken Resinase HT ile öngörülen modelde transesterleşme tepkimesi için enzim miktarı iken, Novozyme 51032 için ise mol oranı olarak belirlenmiştir.

4.7. Dean Stark Sistemi ile Biyoyağlayıcı Üretimi

Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME/TMP tepkimesi için model optimizasyonu sonucunda önerilen koşullardan (Tablo 4.29) %5 enzim, 48 saat, TMP/AYAME mol oranı 1/4, sıcaklık 50°C koşullarında ve 500 rpm karıştırma hızı seçilerek Dean Stark sisteminde çalışılmıştır (Şekil 4.39a). Optimizasyon sonucunda öngörülen AYAME dönüşümü değeri %95 iken, Dean Stark ile %90 AYAME dönüşümü sağlanmıştır. Sistem sağladığı vakum ile metanolün tepkime ortamından eş anlı olarak ayrılmasını sağlamıştır (Şekil 4.39b). Ayrılan metanol, sistem üzerindeki bürette takip edilebilmiştir.

Tablo 4.29. Novozyme 435 varlığında atık yağ AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimine ait model değerleri

Değişken	Hedef	Alt limit	Üst Limit	Alt etki	Üst etki	Önem derecesi
Enzim Miktarı (%)	5.00	0	10	1	1	4
Tepkime Süresi (saat)	48	0	96	1	1	4
Tepkime Sıcaklığı (°C)	50.00	35	55	1	1	3
Mol oranı	0.25	0.167	0.333	1	1	3
AYAME	Optimum	0	99.98	1	1	5



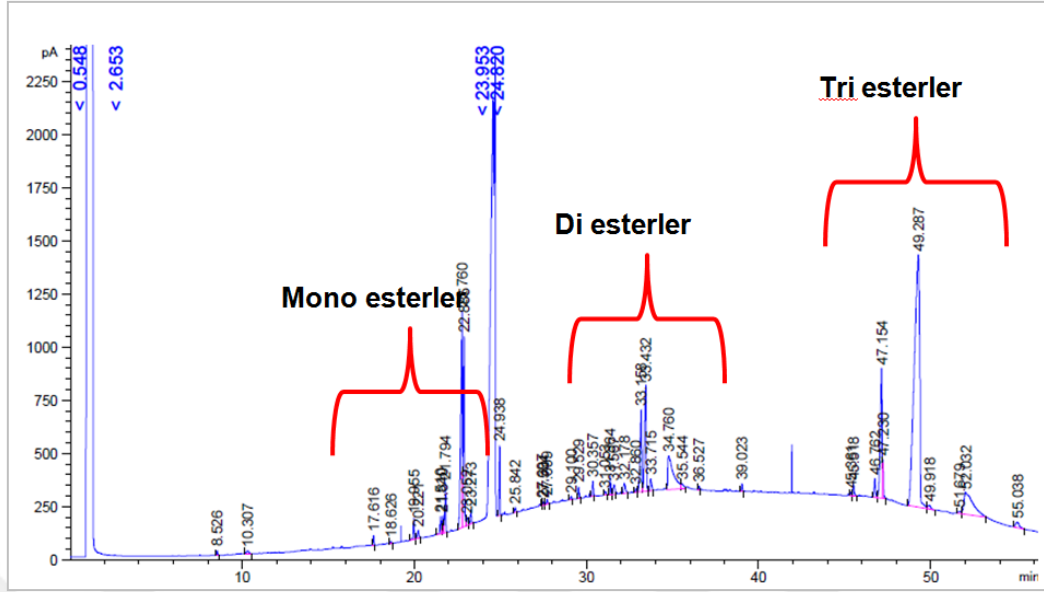
Şekil 4.39. Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretimi için Dean Stark çalışması

4.8. Sentezlenen Biyoyağlama Yağı Fiziksel Özellikleri

Biyoyağlama yağının fiziksel özelliklerinin belirlenmesi amacı ile araştırmalar sonucunda en yüksek AYAME dönüşümüne ulaşılan ve istatistiksel model tarafından öngörülen Novozyme 435 katalizörü varlığında AYAME ile TMP arasındaki transesterleşme tepkimesi seçilmiştir.

Laboratuvar ölçeğindeki Dean Stark sistemi kullanıldığında elde edilebilecek ürün miktarı tek bir kesikli süreçte en fazla 25ml kadardır. Biyoyağlama yağının temel fiziksel özelliklerinin belirlenebilmesi için ise en az 500ml örnek gerekmektedir. Bu nedenle çalkalamalı inkübatörde ölçek büyütülerek aynı koşullarda çalışılmış ve %96 AYAME dönüşümü ile biyoyağlama yağı sentezlenmiştir.

Elde edilen bu yağın triester içeriğinin de GC analizi sonucu %89 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.40). Belirtilen uluslararası standartlara göre yapılan analizler ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.30'da verilmiştir.



Şekil 4.40. Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ile TMP arasındaki transesterleşme sonucu sentezlenen biyoyağlama yağı GC Kromotogramı

Tablo 4.30. Sentezlenen biyoyağlayıcı fiziksel özellik analizleri

Fiziksel Özellik	Sonuç	Analiz Standardı
Kinematik vizkosite 40°C (cSt) 100°C (cSt)	33,60 (40°C) 6,90 (100°C)	ASTM D445, TS 1451 EN ISO 3104
Vizkosite index	170	TS 3096 ISO 2909, ASTM D2270
Yoğunluk (g/ml)	0,92	TS EN ISO 12185, ASTM D4052
Akma noktası (°C)	-18	TS 1233 ISO 3016, ASTM D97
Parlama Noktası (Cleveland Açık Kap) (°C)	229	ASTM D92, TS EN ISO 2592
Toplam Baz Sayısı	0,98	ASTM D4739
Toplam Asit Sayısı	35,65	ASTM D664

Tez çalışması kapsamında sentezlenen yağlayıcının vizkosite indeksinin 170 olması, ürünün sıcaklık değişimlerinde vizkosite değerini koruyacağı için endüstriyel uygulamalar için umut verici nitelikte olduğunu göstermektedir.

Mekanik ekipman ve yüzeylerin yağlanması için yağlama yağı üretiminde akma noktası da bir diğer önemli parametredir. Buna göre, yağlayıcı için, sıvı ve katı fazlar arasındaki geçişin gerçekleştiği sıcaklığı bilmek ve genellikle düşük olacak şekilde üretmek önemlidir. Bu sıcaklık akma noktası (Pour Point) olarak bilinir ve yağlayıcı hareketinin gözlemlendiği en düşük sıcaklık olarak tanımlanır (Lynch 2008).

Sentezlenen biyoyağlama yağının akma noktası -18°C olarak belirlenmiştir. Yağın çalışabileceği en düşük nokta olarak da ifade edilebilir. Bu sıcaklık değerinin altındaki koşullarda elde edilen yağlayıcının kullanımı uygun değildir. Bazı dizel motorlar için bu akma noktası değeri uygun olabileceği gibi genellikle daha düşük sıcaklıklara inilebilmesi önemlidir. Dişli yağları ve transmisyon yağlarında ise bu değer -30°C ve daha da altında olması avantaj sağlar. Bazı yağa akma noktasını düşürücü katkı maddeleri eklenerek istenilen aralığa ulaşmak da mümkündür (Müjdecı ve Kaleli, 2010).

Parlama noktası ise, bir sıvının üzerinde tutuşabilir bir karışım oluşturmak için üzerinde yeterli miktarda buhar ürettiği minimum sıcaklık olarak tanımlanır. Parlama noktası düşük olan yağlar daha büyük yangın tehlikesi oluştururlar. Parlama noktası, güvenli çalışma ve maksimum çalışma sıcaklığında minimum buharlaşma sağlayacak kadar yüksek olmalıdır (Salimon ve diğ., 2012). Örneğin havacılık sektörlerindeki gibi zorlu uygulamalarda kullanılacak yağlayıcıların parlama noktasının 300°C 'nin üzerinde olması gereklidir. Hidrolik sistem uygulamaları için ise bu değer $200-250^{\circ}\text{C}$ civarlarındadır. Sentezlenen biyoyağlama yağının parlama noktası 229°C olarak belirlenmiştir. Piston sistemlerin yaygın kullanıldığı iş makineleri ve tarımsal makinelerde kullanılabilirliği öngörülmektedir.

Toplam Asit Sayısı (Total Acid Number - TAN) değeri, yağın bir mililitresindeki asidi nötralize edecek alkali madde potasyum hidroksit (KOH) miktarının gram olarak ifade etmektedir. TAN ve Toplam Baz Sayısı (Total Base Number - TBN) birbiri arasında ters orantılıdır. Sentezlenen biyoyağlama yağının TAN ve TBN değeri sırasıyla $35,65 \text{ mg KOH/g}$ ve $0,98 \text{ mg KOH/g}$ olarak belirlenmiştir. TAN sayısının yüksek olması korozyon etkisinden dolayı istenmeyen bir durumdur. Yağlayıcılar, depolanmaları ve kullanılmaları süreci boyunca dış etkilere maruz kalmaktadırlar (URL-11). Bu etkilerin yağdaki en önemli sonucu, karbon (C) ve hidrojen (H) atomlarından oluşan moleküllere oksijen (O) girişini sağlayarak, yağın asite (COOH) dönüşmesidir. Üretilen biyoyağlama yağının TAN değerinin yüksek oluşunun üretimden analize gidene kadarki saklama ve depolama koşullarından kaynaklandığı

düşünülmektedir. Bu durumun önüne geçilmesi için yağın içine alkali madde katılmaktadır (URL-12). Bu kimyasallar genellikle kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), çinko (Zn) ve fosfor (P) bileşikleridir. Üreticiler TAN sayısının yükselmesini bu yolla önlemektedirler.

Sentezlenen biyoyağlama yağının hidrolik sistem yağı olarak kullanılabilirliği öngörülmektedir. Hidrolik sistem yağları uluslararası standartlara göre ISO VG olarak sınıflandırılmaktadırlar. ISO Uluslararası Standartlar Örgütüdür. VG sayısı ne kadar yüksek ise sıvı o kadar viskozdur. VG numarası hangi hidrolik yağın daha kalın olduğunu belirtmektedir. Buna bazen hidrolik yağ ağırlığı da denir. Hidrolik sistem yağları için ISO SAE (Society of Automotive Engineers) sınıflandırmaları Tablo 4.31’de verilmiştir. ISO SAE standartları incelendiğinde sentezlenen biyoyağlama yağının hidrolik sistem yağı (ISO VG 32 ile 37 arasında) olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

Tablo 4.31. Hidrolik sistem yağlarının sınıflandırılması

ISO VG		ASTM D	Sonuç	22	32	37	46	68	100	150	220
Yoğunluk	15°C g/ml.	4052	0,92	0,872	0,877	0,874	0,884	0,887	0,895	0,899	0,900
Kinematik Vizkosite	40°C mm ² /s.	445	33,60	22	32	37	46	68	100	150	220
Kinematik Vizkosite	100°C mm ² /s.	445	6,90	4,5	5,4	5,7	6,4	8,5	10,9	14,7	18,9
Vizkosite index	-	2270	170	103	100	99	98	97	97	96	96
Parlama Noktası	°C	92	229	202	216	222	228	236	238	250	252
Akma Noktası	°C	97	-18	-24	-27	-24	-24	-24	-21	-12	-12

Literatürde yer alan başka bir çalışmada ise, ticari olarak kullanımda olan farklı hidrolik sistem yağları, iki zamanlı motor yağı ve bir transmisyon yağının fiziksel özelliklerinin bir karşılaştırması yapılmıştır. Bu çalışmada incelenen yağlayıcıların fiziksel özellikleri ile elde ettiğimiz yağlayıcının fiziksel özellikleri karşılaştırılmış, elde edilen bulgular Tablo 4.32’de verilmiştir (Tudor ve diğ. 2012). Tabloda yer alan sonuçlara göre, elde edilen yağlayıcı yoğunluk değeri açısından hem hidrolik hem de transmisyon yağı olarak kullanıma uygundur.

Tablo 4.32. Bazı yağlayıcılarla sonuçların karşılaştırılması

ISO VG	Sonuç	Bioral S	Bioral BM	Bioral BF	İki zamanlı motor yağı	T90EP2S
Yoğunluk	0,92	0,925	0,915	0,921	0,863	0,915
Kinematik Viskosite (40°C)	0,0336	0,05	0,06	0,05	0,035	0,07
Kinematik Viskosite (100°C)	0,0069	0,036	0,045	0,036	0,0057	0,097
Viskosite indeksi	170	120	120	120	140	85
Parlama Noktası	229	203	184	198	215	220
Akma Noktası	-18	-25	-25	-25	-30	-20

Kinematik viskozite değerleri açısından iki zamanlı motor yağlarına yakın değerler elde edilmiş, parlama noktası ise tüm bu yağlayıcılarla karşılaştırıldığında 229°C ile en iyi sonucu vermiştir. Viskozite indeks değerleri açısından karşılaştırıldığında, 170 indeks değeri ile en iyi sonuca sahip olduğu görülmektedir. Dolayısıyla sıcaklık değişimlerinden diğer örneklerle kıyaslandığında en az etkileneceği söylenebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, literatürdeki çalışmalardan farklı olarak ilk defa atık yağ serbest yağ asitlerinin farklı alkoller (TMP oleyil alkol ve bütanol) ile çevre dostu bir prosesle lipaz katalizli (Novozyme 435) esterleşme tepkimesiyle biyoyağlama yağı sentezlenmiştir. Ayrıca atık yağ asidi metil esterlerinin (AYAME) serbest lipazlar (Novozyme 51032 ve Resinase HT) ve ticari tutuklanmış lipazlar (Lipozyme TL IM ve Novozyme 435) katalizörlüğünde TMP ile transesterleşme tepkimesi sonucunda biyoyağlama yağı sentezlenmiştir. Yukarıda bahsedilen tüm tepkimelere etki eden parametreler (lipaz miktarı, SYA/alkol ve AYAME/alkol mol oranı, başlangıç su içeriği, sıcaklık, tepkime süresi) ele alınmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda;

Transesterleşme tepkimeleri için serbest lipazlar kullanıldığında tutuklanmış lipazlar ile gerçekleştirilen tepkimelerden daha düşük ester içerikleri elde edilmiştir.

Yağlayıcı üretiminde kullanılan alkol türünün ester içeriğine etkisi vardır. Biyoyağlama yağının üretiminde triesterler TMP varlığında gerçekleştirilen tepkimeler sonucunda elde edilmiştir. Oleyil alkol ve bütanol ile mono esterler elde edilmiştir. Bu da oleyil alkol ve bütanolün kimyasal yapısında bir –OH, TMP'nin ise üç –OH grubunun bulunmasından kaynaklanmaktadır.

Stearil alkol ile gerçekleştirilen esterleşme tepkimeleri sonucunda elde edilen ürün oda sıcaklığında katı faza geçmiş, bu nedenle ürün analiz edilememiştir.

Serbest lipazların çevre dostu bir desteğe (kitosan, PLA matrix, hidrotalsit vb.) uygun koşullarda tutuklanarak kullanımının enzim kararlılığını ve aktivitesini artırarak esterleşme/transesterleşme tepkimelerinde dönüşümü arttıracak önerilmektedir.

AYAME ile TMP arasında tutuklanmış lipazlar katalizörlüğünde gerçekleştirilen transesterleşme tepkimelerinde yüksek AYAME dönüşümü elde edilmesine rağmen Lipozyme TL IM katalizörlüğünde gerçekleştirilen tepkimeler sonucunda triester elde edilememiştir.

Novozyme 435 katalizörü varlığında AYAME ile TMP arasındaki transesterleşme tepkimesi sonucunda en yüksek AYAME dönüşümü elde edilmiştir. Deney tasarımı sonucunda programın öngördüğü en uygun tepkime koşullarında %96 AYAME

dönüşümü ile biyoyağlama yağı sentezlenmiş, elde edilen bu yağın triester içeriğinin de %89 olduğu belirlenmiştir.

Sentezlenen biyoyağlama yağının fiziksel özellikleri incelendiğinde ISO SAE standartlarına hidrolik sistem yağı (ISO VG 32 ile 37 arasında) olarak kullanılabilirliği önerilmektedir. Hidrolik sistem yağlarının çevre ve çalışma koşullarına bağlı olarak sıcaklık değişimlerinin çok fazla olduğu koşullarda kullanımı özellikle üreticiler tarafından tavsiye edilmektedir. Bazı hidrolik sistemlerde sistem verimliliği ve güvenilirliği açısından sıcaklık yükseldiğinde ya da düştüğünde viskozitedeki değişimlerin fazla olmaması istenir. Elde edilen biyoyağlama yağının hidrolik sistem yağlarında kullanılabilirliği öngörülmektedir.

Çevre dostu lipaz katalizli prosesler ile petrol kökenli geleneksel yağlama yağlarına alternatif özellikle halihazırda endüstriyel uygulamalarda kullanılan hidrolik sistem yağları ile yarışabilme potansiyeline sahip biyoyağlama yağı başarı ile sentezlenerek ilerideki pilot ölçekli uygulamalar için umut verici sonuçlara ulaşılması bu çalışmanın en büyük çıktısı ve başarısı niteliğindedir.

KAYNAKLAR

- Åkerman C. O., Hagström A. E. V., Mollaahmad M. A., Karlsson S., Hatti-Kaul R., Biolubricant synthesis using immobilised lipase: Process optimisation of trimethylolpropane oleate production, *Process Biochemistry*, 2011, **46**, 2225–2231.
- Afifah A. N., Syahrullail S., Azlee N. I.W., Sidik N. A. C., Yahya W. J., Rahime E. A., Biolubricant production from palm stearin through enzymatic transesterification method, *Biochemical Engineering Journal*, 2019, **148**, 178–184.
- Agueiras E.C.G., Cavalcanti E. D. C., Silva P. R., Soares V. F., Lafuente R. F., Assunção C. L. B., Silva J. A. C., Freire D. M. G., Enzymatic synthesis of neopentyl glycol-bases biolubricants using biodiesel from soybean and castor bean as raw materials, *Renewable Energy*, 2020, **148**, 689-696.
- Aydın-Şişman G., Eko-Etiketleme ve Türkiye Çevre Etiket, Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi, 2019, **4**(1): 40-47.
- Baily J. E., Ollis D. F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., NewYork: Mc Graw Hill Book Company, 1986.
- Bassi J. J., Larissa M. T., Flávia A. P. L., Gabrielly I., Khedy J. D. D., Ana P. C., Marilene A., Pinto A. A. M., Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, **92**, 900–909.
- Bedő S., Bélafi-Bakó K., Nemestóthy N., Gubicza L., Production of a biolubricant by enzymatic esterification: possible synergism between ionic liquid and enzyme, *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, 2018, **46**(2), 27-31.
- Bilyk A., Bistline R. G. Jr., Haas M. J., Fearheller S. H., Lipase-Catalyzed Triglyceride Hydrolysis in Organic Solvent, *Journal of American Chemical Society*, 1991, **68**, 320-323.
- Bondioli P., Della B. L., Manglaviti A., Synthesis of Biolubricants with High Viscosity and High Oxidation Stability, *Oilseeds & Fats Crops and Lipids (OCL)*, 2003, **10**, 150-154.
- Bondioli P., The Preparation of Fatty Acid Esters by Means of Catalytic Reactions, *Topics in Catalysis*, 2004, **27**, 77-81.
- Bremmer B. J., Plonsker L., *Bio-Based Lubricants-A Market Opportunity Study Update*, 1st ed., United Soybean Board, Omni Tech International, USA, 2008.
- Cavalcanti E. D. C., Agueiras E. C. G., Silva P. R., Duarte J. G., Cipolatti E. P., Lafuente R. F., Silva J. A. C., Freire D. M. G., Improved Production Of Biolubricants From Soybean Oil And Different Polyols Via Esterification Reaction Catalyzed By Immobilized Lipase From *Candida rugosa*, *Fuel*, 2018, **215**, 705–713.

Cerón A. A., Boas R. N. V., Biaggio C. F., Castro H. F., Synthesis of Biolubricant by Transesterification of Palm Kernel Oil with Simulated Fusel Oil: Batch and Continuous Processes, *Biomass and Bioenergy*, 2018, **119**, 166–172.

Charpe T. W., Rathod V. K., Biodiesel production using waste frying oil, *Waste Management*, 2011, **31**, 85-90.

Chowdhury A., Chakraborty R., Mitra D., Biswas D., Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physico-chemical characterization of the product, *Industrial Crops and Products*, 2014, **52**, 783–789.

Chowdhury A., Mitra D., Biswas D., Synthesis of Biolubricant Components from Waste Cooking Oil Using a Biocatalytic Route, *Wiley Online Library*, 2013, **33**, 933-940.

Chowdhury A., Mitra D., Biswas D., Biolubricant synthesis from waste cooking oil via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification, *Wiley Online Library*, 2012, **88**(1), 139-144.

Chua L. S., Sarmidi M. R., Effect of Solvent and Initial Water Content on (R, S)-1-Phenylethanol Resolution., *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, **38** (3–4), 551–556.

David F., Sandra P., Vickers A. K., Column selection for the analysis of fatty acids methyl esters, Application Agilent Technologies, 1-5, 2005.

Decagny B., Jan S., Vuilleumard J. C., Sarazin C., Seguin J. P., Gosselin C., Barbotin J. N., Ergon F., Synthesis of wax ester through triolein alcoholysis: choice of the lipase and study of the mechanism, *Enzyme Microbial Technology*, 1998, **22**, 578–582.

Diaz P. A. B., Kronemberger F. A., Habert A. C., A Pervaporation-Assisted Bioreactor to Enhance Efficiency in the Synthesis of a Novel Biolubricant Based on the Enzymatic Transesterification of a Castor Oil Based Biodiesel, *Fuel*, 2017, 204, 98–105.

Duarte J. G., Oliveira E. D. C., Da Silva J. A. C., Lafuente R. F., Freire D. M. G., Two-Step Enzymatic Production of Environmentally Friendly Biolubricants Using Castor Oil: Enzyme Selection and Product Characterization, *Fuel*, 2017, **202**, 196–205.

Fernandes K. Y., Papadaki A., Silva J. A. C., Lafuente R. F., Koutinas A. A., Freire D. M. G., Enzymatic Esterification of Palm Fatty-Acid Distillate for the Production of Polyol Esters with Biolubricant Properties, *Industrial Crops & Products*, 2018, **116**, 90–96.

Guler F., Karasungur N., Kutluk T., Uyar B., Kapucu N., A study on biocatalytic hydrolysis of waste edible oil, 1st International Black Sea Congress on Environmental Science, 31th August-3th September, 2016, Giresun, Turkey.

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

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

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

Kim H., Choi N., Kim Y., Kim H. R., Lee J., Kim I. H., Immobilized Lipase-Catalyzed Esterification for Synthesis of Trimethylolpropane Triester as a Biolubricant, *Renewable Energy*, 2019, **130**, 489-494.

Koç B., Ertekin F., Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları, *Gıda Dergisi*, 2010, vol.35, pp.63-70.

Kumar T., Kumar S., Kumar S., Adsorption of resorcinol and catechol on granular activated carbon: equilibrium and kinetics, *Pergamon Carbon*, 2003, **41**, 3015–3025.

Kutluk G. B., Biyoyağlama Yağlarının Tutuklanmış Lipaz Katalizli Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2012, 440655.

Kutluk T., Bitkisel Atık Yağlardan Tutuklanmış Lipaz Katalizli Biyodizel Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2013, 342546.

Kutluk T., Kutluk G. B., Uyar B., Kapucu N., Synthesis of trimethylolpropane ester from waste edible oil SYAs, *10th International Clean Energy Symposium*, İstanbul, Turkey, 24-26th October, 2016.

Lage J., Flávia A. P., Bassi B. C. C., Larissa M. T., Jaine H.H., Luiz A. A. M., Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system, *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, **84**, 56–67.

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

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

Lynch T.R., Process Chemistry of Lubricant Base Stocks. United States of America: CRC Press, 2008.

Mukherjee K. D., Kiewitt I., Preparation of esters resembling natural waxes by lipase-catalyzed reactions, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1988, **36**, 1333–1339.

Murphy V. R., Bhaf J. , Muniswanas P. K. A., Hydrolysis Of Oils By Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review, *Biotechnology Bioprocess Engineering*, 2002, **7**, 57-66.

Müjdeci S., Kaleli H., Motor Yağı Katkı Maddeleri, Özellikleri ve Etkileşimleri, *YTÜ Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi-Sigma*, 2010, **28**,138-149.

Özgen M., Halofilik Arkeal Kaynaklı Lipaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu Ve Aktif Lipazın Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2013, 425714.

Papadaki A., Fernandes K. V., Chatzifragkou A., Aguiéiras E. C. G., Silva J. A. C., Lafuente R. F., Papanikolaou S., Koutinas A., Freire D. M. G., Bioprocess Development for Biolubricant Production Using Microbial Oil Derived via Fermentation from Confectionery Industry Wastes”, *Bioresource Technology*, 2018, **267**, 311–318.

Papadaki A., Mallouchos A., Efthymiou M. N., Gardeli C., Kopsahelis N., Aguiéiras E. C. G., Freire D. M. G., Papanikolaou A., Koutinas A. A., Production of Wax Esters via Microbial Oil Synthesis from Food Industry Waste and By-Product Streams, *Bioresource Technology*, 2018, **245**, 274–282.

PETDER, 2018 Sektör Raporu, İstanbul, Türkiye.

Resul M. F. M. G., Ghazi T. I. M., Idris A., Kinetic study of jatropha biolubricant from transesterification of jatropha curcas oil with trimethylpropane: Effects of temperature, *Industrial Crops and Products*, 2012, **38**, 87– 92.

Russell V. L., Response surface methods in using RSM, J. Stat. Software, 2009.

Salimon J., Salih N., Abdullah B.M., Production of chemoenzymatic catalyzed monoepoxide biolubricant: optimization and physicochemical characteristics, *Journal of Biomed. Biotechnol.*, 2012, **7**, 693848.

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

Sarno M., Iuliano M., Cirillo C., Optimized procedure for the preparation of an enzymatic nanocatalyst to produce a bio-lubricant from waste cooking oil, *Chem. Eng. J.*, 2019, **377**, 120273.

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

Shrivastavs A., Sandagar P., Baja I., Singhal R., Media optimization for the production of U-linolenic acid by *Cunninghamella Echinulatavarielegans* MTCC 522 using response surface methodology, *International Journal of Food Engineering*, 2008, **4**, 1–32.

Stoytcheva M., Montero G., Zlatev R., León J. A., Gochev V., Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review, *Current Analytical Chemistry*, 2012, **8**, 400-407.

Sun J., Liu S. Q., Ester Synthesis in Aqueous Media, *Journal of Food Biochemistry*, 2015, **39**, 11-18.

Sun S., Wang G., Wang P. A., Cleaner Approach For Biodegradable Lubricants Production By Enzymatic Glycerolysis Of Castor Oil And Kinetic Analysis, *Journal of Cleaner Production*, 2018, **188**, 530-535.

Syaima M. T. S., Ong K. H., Ishenny M. N., Zamratul M. I. M., Brahim S. A., Hafizul M. M., The synthesis of bio-lubricant based oil by hydrolysis and non-catalytic of palm oil mill effluent (POME) using lipase, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, **44**, 669–675.

Tonova K., Lazarova Z., Nemestothy N., Gubicza L., Belafi-Bako K., Lipase catalysed esterification in a reversed micellar reaction system, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 2005, **12**, 175-180.

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

URL-1: Lubricants Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Industrial, Automotive, Marine, Aerospace), By Region, And Segment Forecast, 2019-2025, <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lubricants-market>, (Ziyaret tarihi: 09 Mayıs 2020).

URL-2: Lubricants Market-Growth, Trends, and Forecast (2020-2025), <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/lubricants-market> (Ziyaret tarihi: 20 Haziran 2020).

URL-3: Bio-lubricants Market by Base Oil (Vegetable oil, Animal fat), Application (Hydraulic oil, metalworking fluids, chainsaw oil, mold release agents, two-cycle engine oils, gear oils, greases), End-use, Region - Global Forecast to 2025, <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biolubricants-market-17431466.html>, (Ziyaret tarihi: 09 Mayıs 2020).

URL-4: Blue Angel The German Ecolabel, Our label for the environment, <https://www.blauer-engel.de/en>, (Ziyaret tarihi: 10 Temmuz 2020).

URL-5: Why choose ecolabelling?, <http://www.nordic-ecolabel.org/>, (Ziyaret tarihi: 12 Ağustos 2020).

URL-6: What is Biopreferred?, About the BioPreferred Program, <https://www.biopreferred.gov/BioPreferred/faces/pages/AboutBioPreferred.xhtml>, (Ziyaret tarihi: 12 Ağustos 2020).

URL-7: Total Lubricants, <https://catalog.lubricants.total.com/en/>, (Ziyaret tarihi: 16 Mayıs 2019).

URL-8: Motor yağı kutuları üzerindeki etiketler nasıl okunur?, <https://www.cleanpex.com.tr/motor-yagi-etiketleri-nasil-okunur>, (Ziyaret tarihi: 25 Mayıs 2020).

URL-9: Main Topics: What Exactly Does “Biodegradable” Mean?, https://www.lubricants.total.com/what-exactly-does-biodegradable-mean?field_topics_tid=33, (Ziyaret tarihi: 11 Ağustos 2020).

URL-10: Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Çevre Yönetimi Genel Müdürlüğü, Atık Madeni Yağlar, Bitkisel Atık Yağlar, Atık Piller, Atık Akümülatör, Atık Elektrikli ve Elektronik Eşyalar, Ömrünü Tamamlamış Lastik ve Araçlar, <http://cevreselgostergeler.csb.gov.tr/atik-madeni-yaglar-bitkisel-atik-yaglar-atik-piller-atik-akumulator-atik-elektrikli-ve-elektronik-esyalar-omrunu-tamamlamis-lastik-ve-araclar-i-85755>, (Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2020).

URL-11: Rymax Lubricants, Total Base Number? (TBN) This is how it works!, <https://www.rymax-lubricants.com/blog/total-base-number/>, (Ziyaret tarihi: 29 Ekim 2019).

URL-12: Crown Oil Fuels and Lubricants, Guide to Hydraulic Oil, <https://www.crownoil.co.uk/guides/hydraulic-oil-guide/>, (Ziyaret tarihi: 29 Ekim 2019).

Varma M.N., Madras G., Effect of Chain Length of Alcohol on the Lipase-Catalyzed Esterification of Propionic Acid in Supercritical Carbon Dioxide, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, **160**, 2342–2354.

Wang E., Ma X., Tang Z., Yan R., Wang Y., Riley W. W., Reaney M. J. T., Synthesis and oxidative stability of trimethylolpropane fatty acid triester as a biolubricant base oil from waste cooking oil, *Biomass and Bioenergy*, 2014, **66**, 371-378.

Xin C., Wei D., Liu D., Effect of several factors on soluble lipase mediated biodiesel preparation in the biphasic aqueous-oil systems, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, **24**, 2097-2102.

Yadav G. D., Devi K. M., Kinetics of Hydrolysis of Tetrahydrofurfuryl Butyrate in a Three Phase System Containing Immobilized Lipase from *Candida Antarctica*, *Biochem. Eng. J.*, 2004, **17**(1), 57–63.

Yuan X., Liu J., Zeng G., Shi J., Tong J., Huang G., Optimization of conversion of waste rapeseed oil with high SYA to biodiesel using response surface methodology, *Renewable Energy*, 2008, **33**, 1678–1684.

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

Zenevicz M. C. P., Jacques A., Furigo A. F., Oliveira J. V., Oliveira D., Enzymatic Hydrolysis of Soybean and Waste Cooking Oils under Ultrasound System, *Ind. Crops Prod.*, 2016, **80**, 235–241.

Zhang W., Ji H., Song Y., Ma S., Xiong W., Chen C., Chen B., Zhang X., Green preparation of branched biolubricant by chemically modifying waste cooking oil with lipase and ionic liquid, *Journal of Cleaner Production*, 2020, **274**, 122918.



EK-A

Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipozyme CALB L için aktivite hesabı

$$\frac{U}{\text{ml enzim}} = \frac{(\text{Örnek, ml}_{\text{harcanan}} - \text{şahit, ml}_{\text{harcanan}})_{(\text{NaOH})} \times [\text{NaOH}] \times 1000}{(V_{\text{enzim}}, \text{ml}) \times t}$$

$$\frac{U}{\text{ml enzim}} = \frac{(16,5 - 15,2)_{(\text{NaOH})} \times [0,1] \times 1000}{(0,1) \times 30} = 43,33$$

3 tekrar yapılarak ortalama aktivite belirlenmiştir.



EK-B

% Serbest Yağ Asidi (SYA) Tayini Örnek Hesaplama

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

$$V_{\text{titrant}} = 6,2 \text{ ml}$$

$$N_{\text{titrant}} = 0,1 \text{ N}$$

$$M_{A,OA} = 277,534 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{örnek}} = 0,58 \text{ g}$$

$$\%SYA = (6,2 \text{ ml} \times 0,1 \text{ mol/L} \times 277,534 \text{ g/mol}) / (0,58 \text{ g} \times 10) = \%29,7$$

EK-C

Atık Yağın Yağ Asitlerinin Ortalama Molekül Ağırlığı

$$M_{SYA} = \frac{\sum f_i}{\sum \frac{f_i}{M_A}}$$

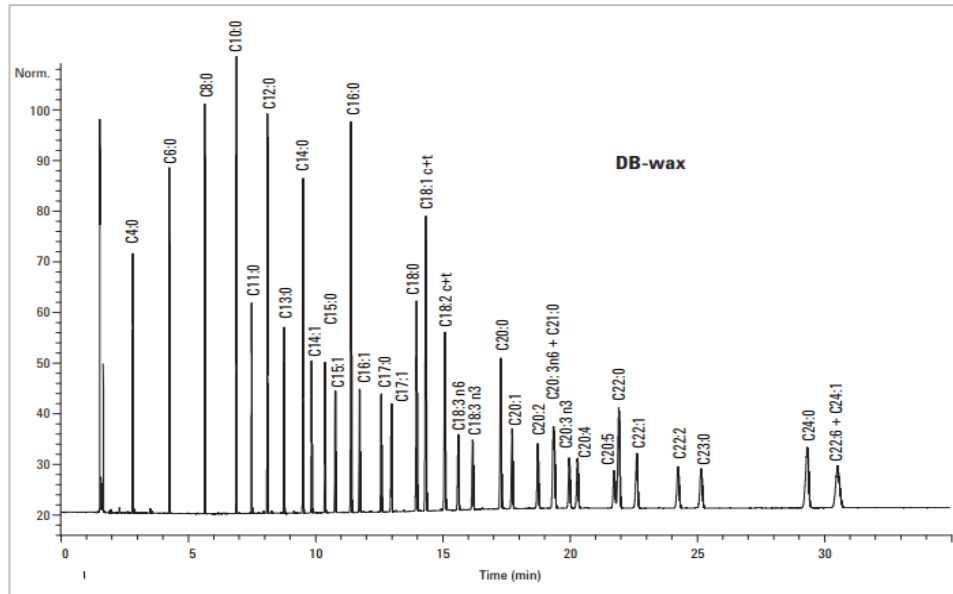
f_i : Yağ asidi kütlece bileşimi

M_A : Yağ asidi molekül ağırlığı, g/mol

M_{SYA} : Yağ asidi karışımının ortalama molekül ağırlığı, g/mol

$$M_{SYA} = \frac{0,28+0,16+9,02+4,20+34,90+51,44}{\frac{0,28}{144,214} + \frac{0,16}{228,380} + \frac{9,02}{256,430} + \frac{4,20}{284,480} + \frac{34,90}{282,468} + \frac{51,44}{280,460}} = 278.127 \text{ g/mol}$$

Yağ asidi	% Bileşim	Molekül Ağırlığı (g/mol)
C8:0 Kaprilik asit	0,28	144.214
C14:0 Miristik asit	0,16	228.371
C16:0 Palmitik asit	9,02	256.430
C18:0 Stearik asit	4,20	284.480
C18:1 Oleik asit	34,90	282.468
C18:2 Linoleik asit	51,44	280.460
	Toplam=100	



Şekil C.1. 37 bileşenli AYAME standart karışımın DB-wax kolondaki alıkonma süreleri (David ve diğ., 2005)

EK-D

Ayame İçeriğinin Belirlenmesi

$$\%AYAME = \frac{(\Sigma A) - A_{MH}}{A_{MH}} \cdot \frac{C_{MH} \cdot V_{MH}}{m} \cdot 100$$

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

A_{MH} : Metilheptadekanoat'ın karşılığı olan pik alanı.

C_{MH} : Metilheptadekanoat çözeltisinin konsantrasyonu (10 mg/ml çözelti).

V_{MH} : Metilheptadekanoat çözeltisinin hacmi (ml).

M : 100 mg

Esterleşme/Transesterleşme Modellerinin Kodlanmış Ve Gerçek Değerleri

Tablo F.1. Novozyme 435 katalizörlüğünde SYA ile TMP arasındaki esterleşme tepkimesi ile biyoyağlayıcı üretimi için etki eden parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerleri

Design Summary

Study Type	Response Surface	Runs	30
Initial Design	Central Composite	Blocks	No Blocks
Design Model	Quadratic		

Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded	Mean	Std. Dev.
A	ENZİM MİKTARI		Numeric	0.000	25.00	-1.000	1.000	12.500	9.682
B	BAS.SU MİK.		Numeric	0.000	15.00	-1.000	1.000	7.500	5.809
C	MOL ORANI		Numeric	3.00	8.00	-1.000	1.000	5.500	1.936
D	SICAKLIK		Numeric	30.00	60.00	-1.000	1.000	45.000	11.619

Response	Name	Units	Obs	Analysis	Minimum	Maximum	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
Y1	R1	FFA	30	Polynomial	13.000	88.000	50.000	28.036	6.769	None	Quadratic

Tablo F.2. Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ile TMP arasındaki esterleşme tepkimesi ile biyoyağlayıcı üretimi için etki eden parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerleri

Design Summary

Study Type	Response Surface	Runs	30
Initial Design	Central Composite	Blocks	No Blocks
Design Model	Quadratic		

Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded	Mean	Std. Dev.
A	ENZİM MİKTARI		Numeric	0.000	10.00	-1.000	1.000	5.000	3.873
B	RXN SURESI		Numeric	0.000	96.00	-1.000	1.000	48.000	37.181
C	RXN SICAKLIĞI		Numeric	35.00	55.00	-1.000	1.000	45.000	7.746
D	MOL ORANI		Numeric	0.17	0.33	-1.000	1.000	0.250	0.064

Response	Name	Units	Obs	Analysis	Minimum	Maximum	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
Y1	FAME	%	30	Polynomial	0.000	99.880	52.305	48.938	N/A	None	Quadratic

Tablo F.3. Resinase HT katalizörlüğünde AYAME ile TMP arasındaki esterleşme tepkimesi ile biyoyağlayıcı üretimi için etki eden parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerleri

Design Summary

Study Type	Response Surface	Runs	30
Initial Design	Central Composite	Blocks	No Blocks
Design Model	Quadratic		

Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded	Mean	Std. Dev.
A	MOL ORANI	MOL/MOL	Numeric	2.00	4.00	-1.000	1.000	3.000	0.894
B	SICAKLIK	C	Numeric	37.50	52.50	-1.000	1.000	45.000	6.708
C	SU İÇERİĞİ	% (yag)	Numeric	2.50	7.50	-1.000	1.000	5.000	2.236
D	ENZİM	% (yag+su)	Numeric	5.00	15.00	-1.000	1.000	10.000	4.472

Response	Name	Units	Obs	Analysis	Minimum	Maximum	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
Y1	yield (harcanan %	%	30	Polynomial	0.200	61.900	25.533	14.545	309.500	None	No model chose

Tablo F.4. Novozyme 51032 katalizörlüğünde AYAME ile TMP arasındaki esterleşme tepkimesi ile biyoyağlayıcı üretimi için etki eden parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerleri

Design Summary

Study Type	Response Surface		Runs	30							
Initial Design	Central Composite		Blocks	No Blocks							
Design Model	Quadratic										
Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded	Mean	Std. Dev.		
A	MOL ORANI	MOL/MOL	Numeric	2.00	4.00	-1.000	1.000	3.000	0.894		
B	SICAKLIK	C	Numeric	37.50	52.50	-1.000	1.000	45.000	6.708		
C	SU ICERIGI	% (yag)	Numeric	2.50	7.50	-1.000	1.000	5.000	2.236		
D	ENZİM	% (yag+su)	Numeric	5.00	15.00	-1.000	1.000	10.000	4.472		
Response	Name	Units	Obs	Analysis	Minimum	Maximum	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
Y1	yield (harcanan %		30	Polynomial	0.100	89.700	13.299	17.627	897.000	None	2FI

Tablo F.5. Lipozyme TL IM katalizörlüğünde AYAME ile TMP arasındaki esterleşme tepkimesi ile biyoyağlayıcı üretimi için etki eden parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerleri

Design Summary

Study Type	Response Surface	Runs	30								
Initial Design	Central Composite	Blocks	No Blocks								
Design Model	Quadratic										
Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded	Mean	Std. Dev.		
A	ENZİM MİKTARI		Numeric	0.000	10.00	-1.000	1.000	5.000	3.873		
B	RXN SURESI		Numeric	0.000	96.00	-1.000	1.000	48.000	37.181		
C	RXN SICAKLIĞI		Numeric	35.00	55.00	-1.000	1.000	45.000	7.746		
D	MOL ORANI		Numeric	0.17	0.33	-1.000	1.000	0.250	0.064		
Response	Name	Units	Obs	Analysis	Minimum	Maximum	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
Y1	FAME	%	30	Polynomial	0.000	94.620	45.348	42.959	N/A	None	RCubic

Tablo F.6. Etki eden parametreler ve kodlanmış değerlerini içeren deney seti matrisi

Std	Run	Block	Factor 1 A:ENZİM MİKTARI	Factor 2 B:BAS.SU MİK.	Factor 3 C:MOL ORANI	Factor 4 D:SICAKLIK	Response 1 R1 FFA
1	1	{ 1 }	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	
2	10	{ 1 }	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	
3	9	{ 1 }	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	
4	21	{ 1 }	1.000	1.000	-1.000	-1.000	
5	12	{ 1 }	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	
6	23	{ 1 }	1.000	-1.000	1.000	-1.000	
7	4	{ 1 }	-1.000	1.000	1.000	-1.000	
8	2	{ 1 }	1.000	1.000	1.000	-1.000	
9	29	{ 1 }	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	
10	24	{ 1 }	1.000	-1.000	-1.000	1.000	
11	15	{ 1 }	-1.000	1.000	-1.000	1.000	
12	6	{ 1 }	1.000	1.000	-1.000	1.000	
13	27	{ 1 }	-1.000	-1.000	1.000	1.000	
14	3	{ 1 }	1.000	-1.000	1.000	1.000	
15	20	{ 1 }	-1.000	1.000	1.000	1.000	
16	17	{ 1 }	1.000	1.000	1.000	1.000	
17	22	{ 1 }	-1.000	0.000	0.000	0.000	
18	14	{ 1 }	1.000	0.000	0.000	0.000	
19	19	{ 1 }	0.000	-1.000	0.000	0.000	
20	26	{ 1 }	0.000	1.000	0.000	0.000	
21	13	{ 1 }	0.000	0.000	-1.000	0.000	
22	16	{ 1 }	0.000	0.000	1.000	0.000	
23	18	{ 1 }	0.000	0.000	0.000	-1.000	
24	30	{ 1 }	0.000	0.000	0.000	1.000	
25	5	{ 1 }	0.000	0.000	0.000	0.000	
26	7	{ 1 }	0.000	0.000	0.000	0.000	
27	28	{ 1 }	0.000	0.000	0.000	0.000	
28	8	{ 1 }	0.000	0.000	0.000	0.000	
29	25	{ 1 }	0.000	0.000	0.000	0.000	
30	11	{ 1 }	0.000	0.000	0.000	0.000	

EK-G

RSM ile önerilen model denklemleri

SYA/TMP tepkimesi (Novozyme 435)

Yanıt (% SYA dönüşümü) = R1

$$\begin{aligned} R1 = & +76.17 \\ & +23.44 * A \\ & +1.06 * B \\ & -2.00 * C \\ & +11.39 * D \\ & +0.69 * A * B \\ & -2.06 * A * C \\ & +10.06 * A * D \\ & +0.56 * B * C \\ & -2.06 * B * D \\ & +1.44 * C * D \\ & -36.83 * A^2 \\ & -0.33 * B^2 \\ & +4.17 * C^2 \\ & -6.33 * D^2 \end{aligned}$$

AYAME/TMP tepkimesi (Novozyme 435)

Yanıt (%AYAME dönüşümü) =
=R1

$$\begin{aligned} & +94.23 \\ & +27.50 * A \\ & +27.54 * B \\ & +0.40 * C \\ & +0.25 * D \\ & +24.75 * A * B \\ & +0.12 * A * C \\ & +0.14 * A * D \\ & +0.12 * B * C \\ & +0.14 * B * D \\ & -0.044 * C * D \\ & -41.54 * A^2 \\ & -41.25 * B^2 \\ & +5.80 * C^2 \\ & +7.11 * D^2 \end{aligned}$$

AYAME/TMP tepkimesi (Resinase HT) 51032)

Yanıt (%AYAME dönüşümü) = R1 =

$$\begin{aligned} & +25.53 \\ & -3.04 * A \\ & -1.93 * B \\ & +5.03 * C \\ & +8.57 * D \end{aligned}$$

AYAME/TMP tepkimesi (Novozyme

Yanıt (% AYAME dönüşümü) = R1 =

$$\begin{aligned} & +13.30 \\ & -7.82 * A \\ & +1.34 * B \\ & -1.43 * C \\ & +0.39 * D \\ & -7.35 * A * B \\ & +5.49 * A * C \\ & +4.56 * A * D \\ & -4.49 * B * C \\ & -5.59 * B * D \\ & +8.45 * C * D \end{aligned}$$

Önerilen model denklemleri (devam):

AYAME/TMP tepkimesi (Lipozyme TL IM)

Yanıt (% AYAME dönüşümü) = R1 =

+81.74

+44.45 * A

+47.31 * B

+2.31 * C

-8.38 * D

+21.26 * A * B

+1.57 * A * C

+1.78 * A * D

+1.57 * B * C

+1.78 * B * D

-1.34 * C * D

-35.88 * A²

-33.03 * B²

+9.22 * C²

-0.96 * D²

-23.20 * A * C²

-0.74 * B² * C

+10.16 * B² * D

-26.05 * B * C²

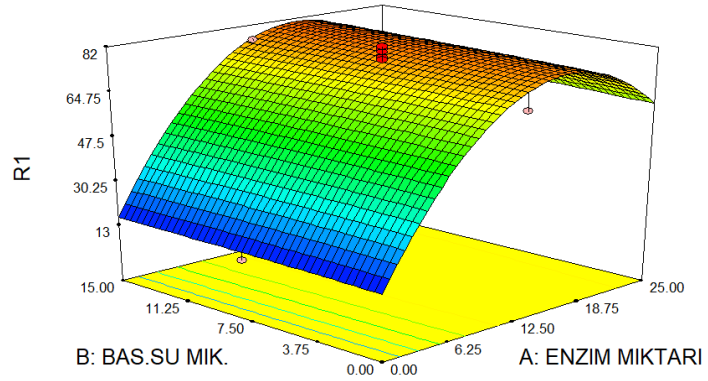
EK-H. ÜÇ BOYUTLU YÜZEY CEVAP GRAFİKLERİ

Design-Expert® Software

R1
88
13

X1 = A: ENZİM MIKTARI
X2 = B: BAS.SU MIK.

Actual Factors
C: MOL ORANI = 5.50
D: SICAKLIK = 45.00



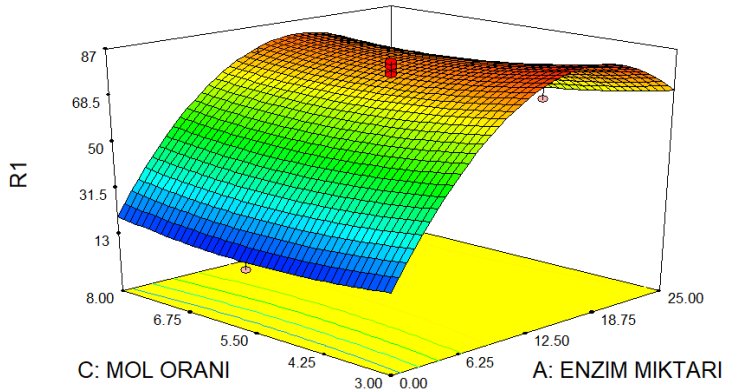
(a)

Design-Expert® Software

R1
88
13

X1 = A: ENZİM MIKTARI
X2 = C: MOL ORANI

Actual Factors
B: BAS.SU MIK. = 7.50
D: SICAKLIK = 45.00



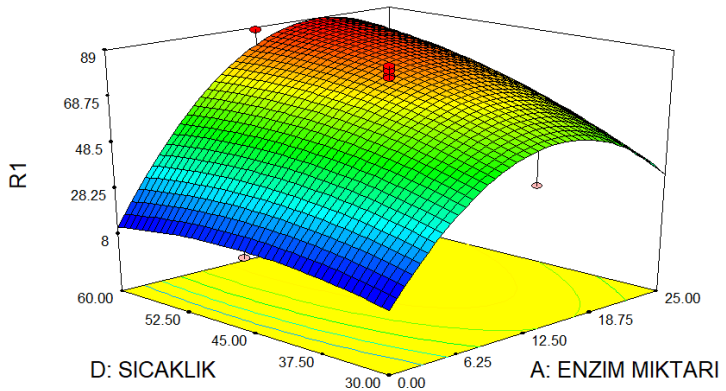
(b)

Design-Expert® Software

R1
88
13

X1 = A: ENZİM MIKTARI
X2 = D: SICAKLIK

Actual Factors
B: BAS.SU MIK. = 7.50
C: MOL ORANI = 5.50



(c)

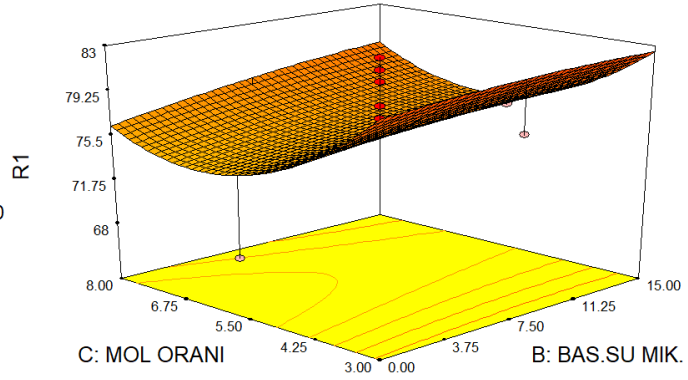
Şekil H.1. Novozyme 435 katalizörlüğünde SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretiminde tepkime parametrelerinin birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren 3 boyutlu yüzey cevap grafikleri (a)başlangıç su miktarı-enzim miktarı (b)mol oranı-enzim miktarı (c)sıcaklık-enzim miktarı

Design-Expert® Software

R1
88
13

X1 = B: BAS.SU MIK.
X2 = C: MOL ORANI

Actual Factors
A: ENZIM MIKTARI = 12.50
D: SICAKLIK = 45.00



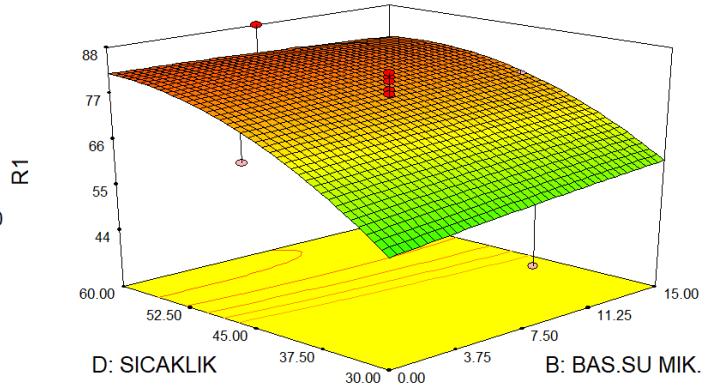
(d)

Design-Expert® Software

R1
88
13

X1 = B: BAS.SU MIK.
X2 = D: SICAKLIK

Actual Factors
A: ENZIM MIKTARI = 12.50
C: MOL ORANI = 5.50



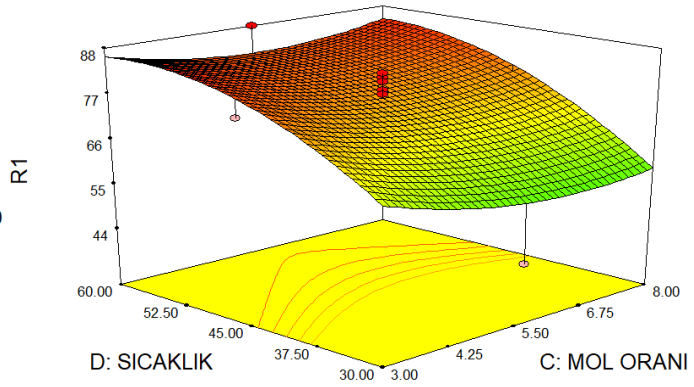
(e)

Design-Expert® Software

R1
88
13

X1 = C: MOL ORANI
X2 = D: SICAKLIK

Actual Factors
A: ENZIM MIKTARI = 12.50
B: BAS.SU MIK. = 7.50



(f)

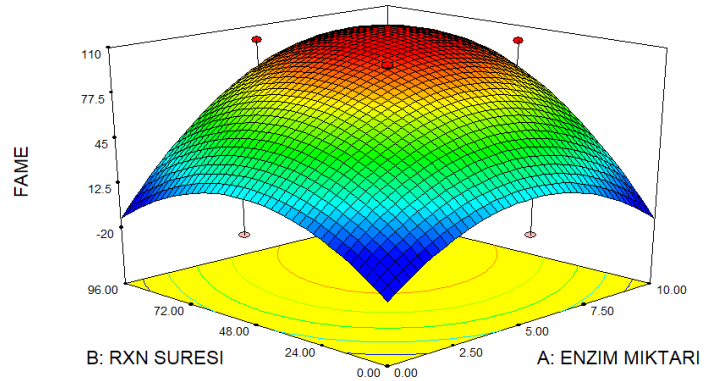
Şekil H.1.(devam). Novozyme 435 katalizörlüğünde SYA ve TMP'den biyoyağlayıcı üretiminde tepkime parametrelerinin birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren 3 boyutlu yüzey cevap grafikleri (d)mol oranı-başlangıç su miktarı, (e)sıcaklık-başlangıç su miktarı, (f)sıcaklık-mol oranı

Design-Expert® Software

FAME
99.88
0

X1 = A: ENZİM MİKTARI
X2 = B: RXN SÜRESİ

Actual Factors
C: RXN SICAKLIĞI = 45.00
D: MOL ORANI = 0.25



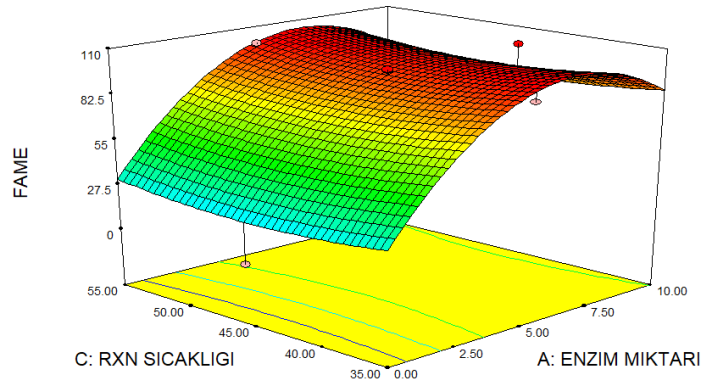
(a)

Design-Expert® Software

FAME
99.88
0

X1 = A: ENZİM MİKTARI
X2 = C: RXN SICAKLIĞI

Actual Factors
B: RXN SÜRESİ = 48.00
D: MOL ORANI = 0.25



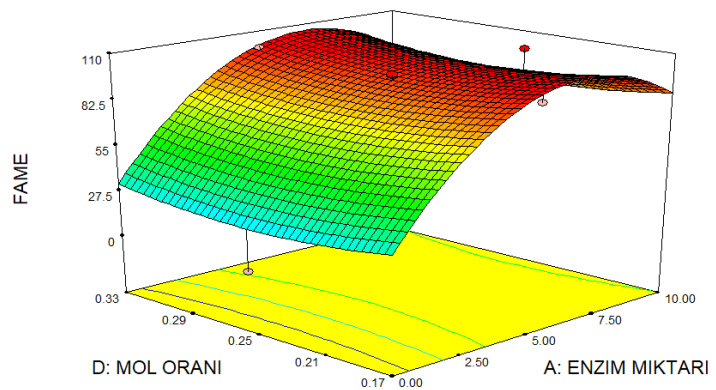
(b)

Design-Expert® Software

FAME
99.88
0

X1 = A: ENZİM MİKTARI
X2 = D: MOL ORANI

Actual Factors
B: RXN SÜRESİ = 48.00
C: RXN SICAKLIĞI = 45.00



(c)

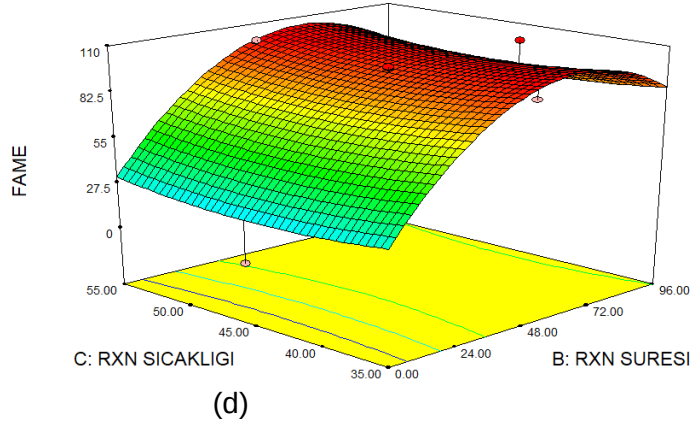
Şekil H.2. Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretiminde tepkime parametrelerinin birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren 3 boyutlu yüzey cevap grafikleri (a)tepkime süresi-enzim miktarı, (b)sıcaklık-enzim miktarı, (c)mol oranı-enzim miktarı

Design-Expert® Software

FAME
99.88
0

X1 = B: RXN SURESI
X2 = C: RXN SICAKLIGI

Actual Factors
A: ENZIM MIKTARI = 5.00
D: MOL ORANI = 0.25

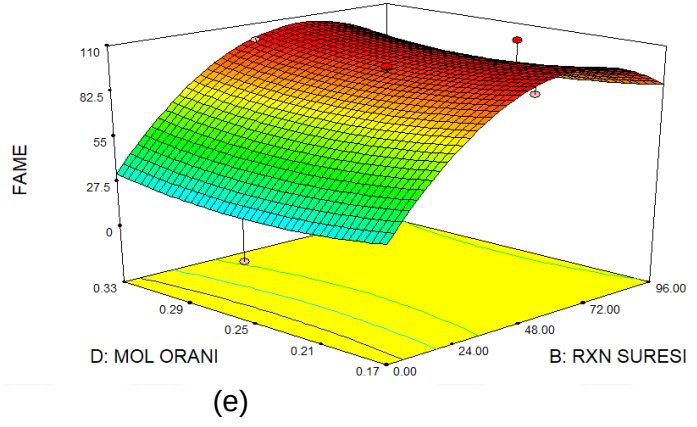


Design-Expert® Software

FAME
99.88
0

X1 = B: RXN SURESI
X2 = D: MOL ORANI

Actual Factors
A: ENZIM MIKTARI = 5.00
C: RXN SICAKLIGI = 45.00

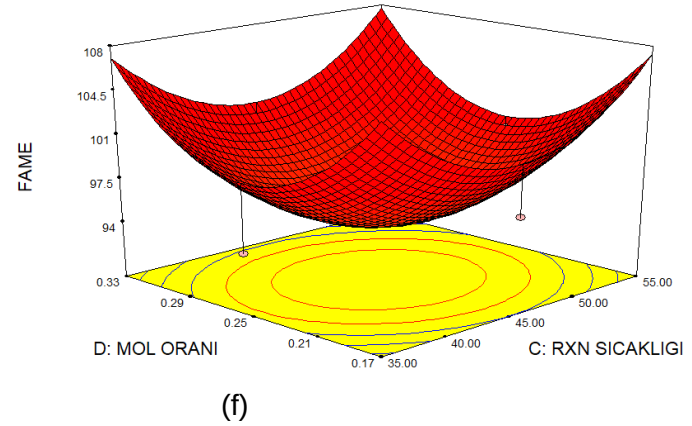


Design-Expert® Software

FAME
99.88
0

X1 = C: RXN SICAKLIGI
X2 = D: MOL ORANI

Actual Factors
A: ENZIM MIKTARI = 5.00
B: RXN SURESI = 48.00



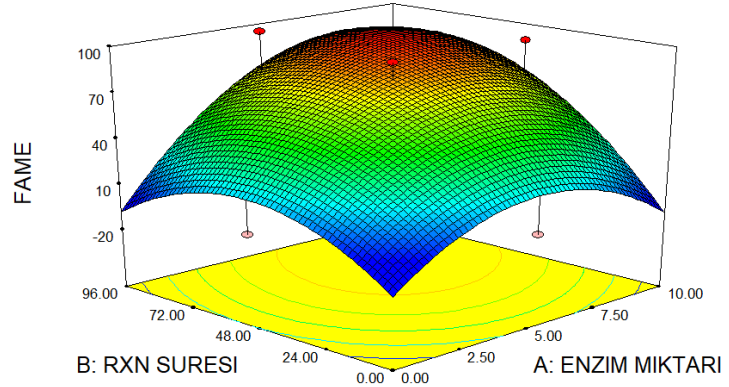
Şekil H.2.(devam). Novozyme 435 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretiminde tepkime parametrelerinin birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren 3 boyutlu yüzey cevap grafikleri (d)sıcaklık-tepkime süresi, (e)mol oranı-tepkime süresi, (f)mol oranı-sıcaklık

Design-Expert® Software

FAME
94.62
0

X1 = A: ENZİM MIKTARI
X2 = B: RXN SURESI

Actual Factors
C: RXN SICAKLIGI = 45.00
D: MOL ORANI = 0.25



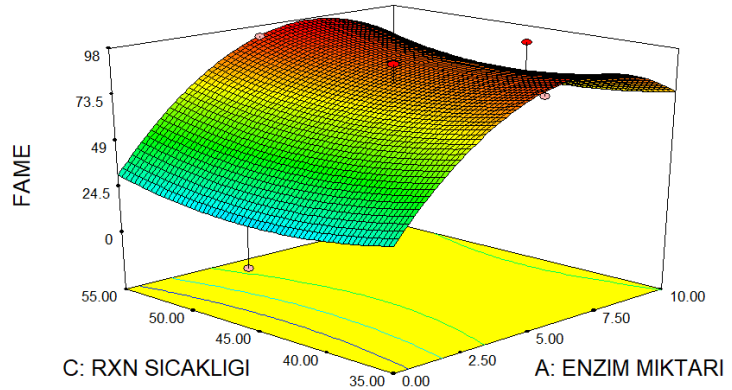
(a)

Design-Expert® Software

FAME
94.62
0

X1 = A: ENZİM MIKTARI
X2 = C: RXN SICAKLIGI

Actual Factors
B: RXN SURESI = 48.00
D: MOL ORANI = 0.25



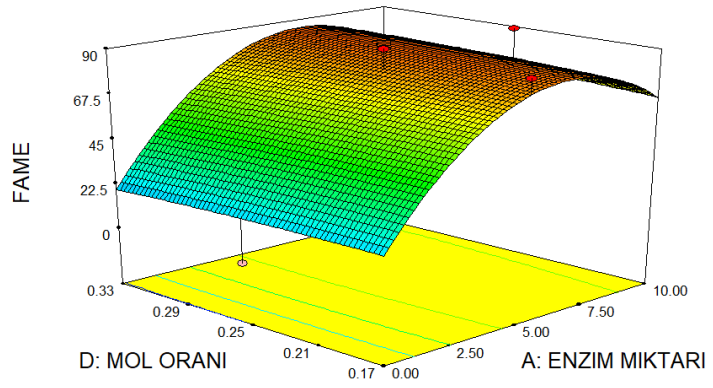
(b)

Design-Expert® Software

FAME
94.62
0

X1 = A: ENZİM MIKTARI
X2 = D: MOL ORANI

Actual Factors
B: RXN SURESI = 48.00
C: RXN SICAKLIGI = 45.00



(c)

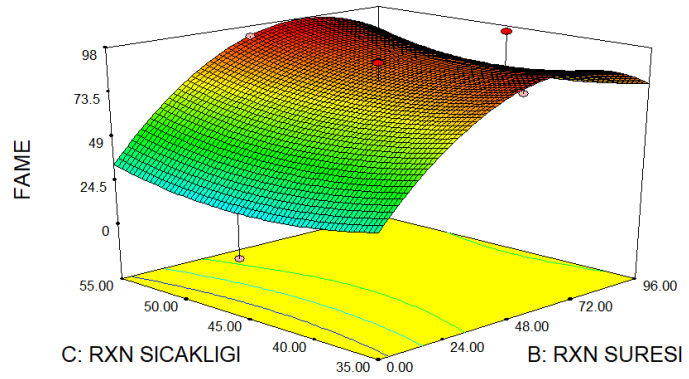
Şekil H.3. Lipozyme TL IM katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretiminde tepkime parametrelerinin birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren 3 boyutlu yüzey cevap grafikleri (a)tepkime süresi-enzim miktarı, (b)sıcaklık-enzim miktarı, (c)mol oranı-enzim miktarı

Design-Expert® Software

FAME
94.62
0

X1 = B: RXN SURESI
X2 = C: RXN SICAKLIGI

Actual Factors
A: ENZIM MIKTARI = 5.00
D: MOL ORANI = 0.25



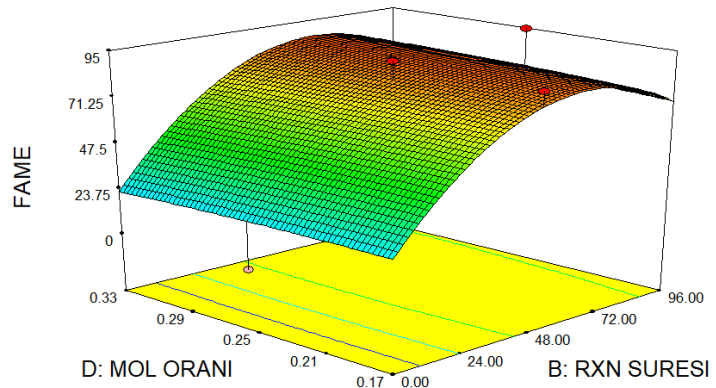
(d)

Design-Expert® Software

FAME
94.62
0

X1 = B: RXN SURESI
X2 = D: MOL ORANI

Actual Factors
A: ENZIM MIKTARI = 5.00
C: RXN SICAKLIGI = 45.00



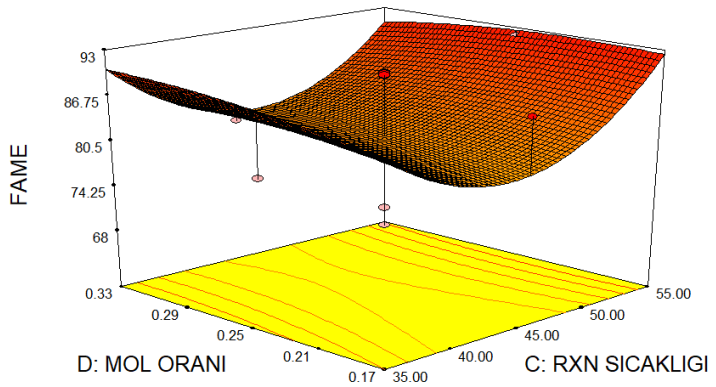
(e)

Design-Expert® Software

FAME
94.62
0

X1 = C: RXN SICAKLIGI
X2 = D: MOL ORANI

Actual Factors
A: ENZIM MIKTARI = 5.00
B: RXN SURESI = 48.00



(f)

Şekil H.3.(devam). Lipozyme TL IM katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretiminde tepkime parametrelerinin birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren 3 boyutlu yüzey cevap grafikleri (d)sıcaklık-süre, (e)mol oranı-süre, (f)mol oranı-sıcaklık

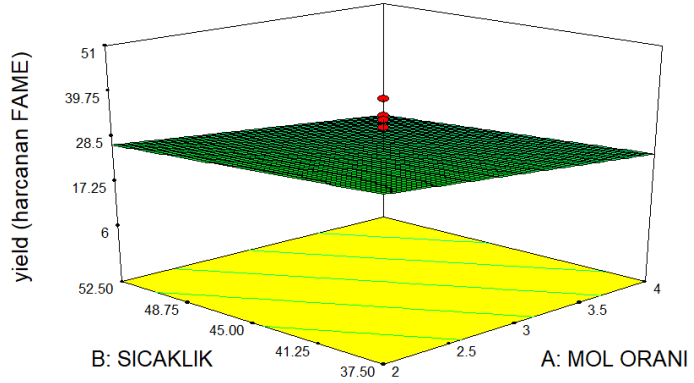
Design-Expert® Software

yield (harcanan FAME)



X1 = A: MOL ORANI
X2 = B: SICAKLIK

Actual Factors
C: SU ICERIGI = 5.00
D: ENZIM = 10.00



(a)

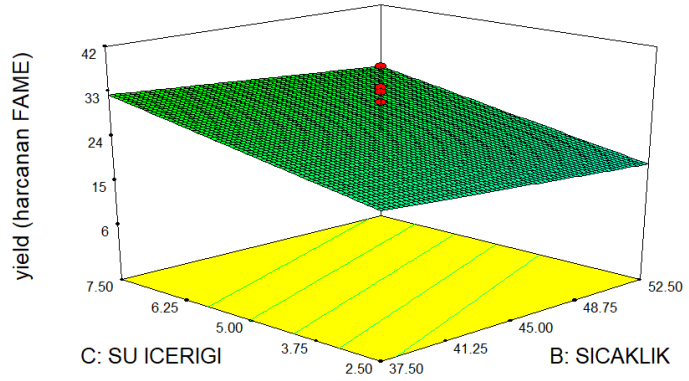
Design-Expert® Software

yield (harcanan FAME)



X1 = B: SICAKLIK
X2 = C: SU ICERIGI

Actual Factors
A: MOL ORANI = 3.00
D: ENZIM = 10.00



(b)

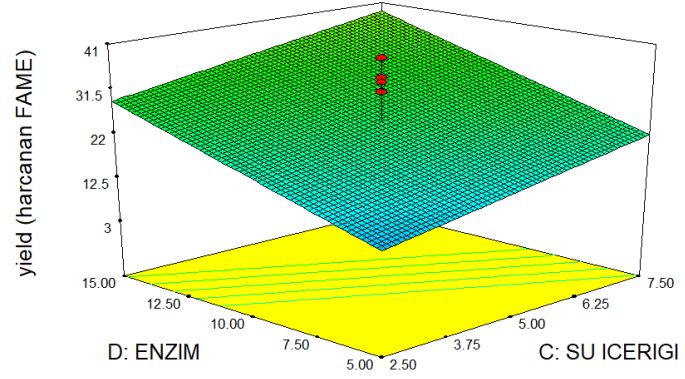
Design-Expert® Software

yield (harcanan FAME)



X1 = C: SU ICERIGI
X2 = D: ENZIM

Actual Factors
A: MOL ORANI = 3.00
B: SICAKLIK = 45.00



(c)

Şekil H.4. Resinase HT katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretiminde tepkime parametrelerinin birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren 3 boyutlu yüzey cevap grafikleri (a)sıcaklık-mol oranı, (b)su içeriği-sıcaklık, (c)enzim-su içeriği

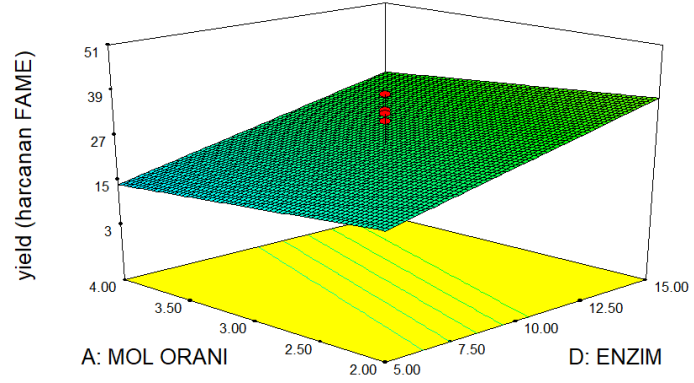
Design-Expert® Software

yield (harcanan FAME)



X1 = D: ENZİM
X2 = A: MOL ORANI

Actual Factors
B: SICAKLIK = 45.00
C: SU ICERIGI = 5.00



(d)

Şekil H.4.(devam). Resinase HT katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretiminde tepkime parametrelerinin birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren 3 boyutlu yüzey cevap grafikleri (d)mol oranı-enzim

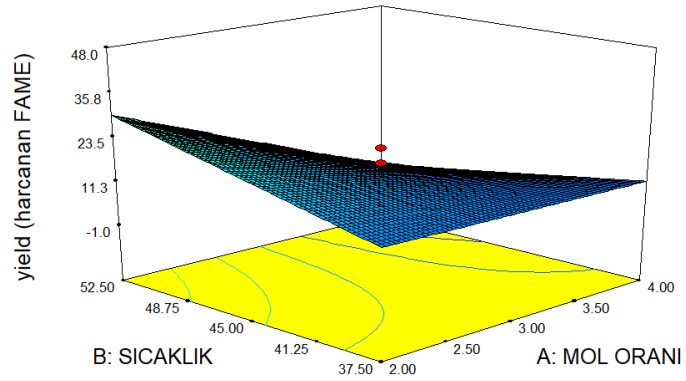
Design-Expert® Software

yield (harcanan FAME)



X1 = A: MOL ORANI
X2 = B: SICAKLIK

Actual Factors
C: SU ICERIGI = 5.00
D: ENZIM = 10.00



(a)

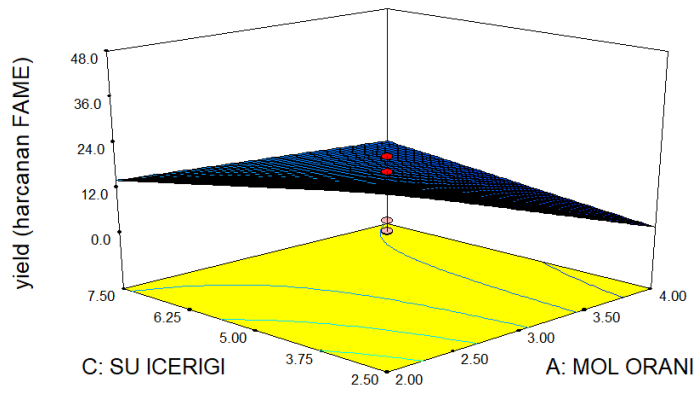
Design-Expert® Software

yield (harcanan FAME)



X1 = A: MOL ORANI
X2 = C: SU ICERIGI

Actual Factors
B: SICAKLIK = 45.00
D: ENZIM = 10.00



(b)

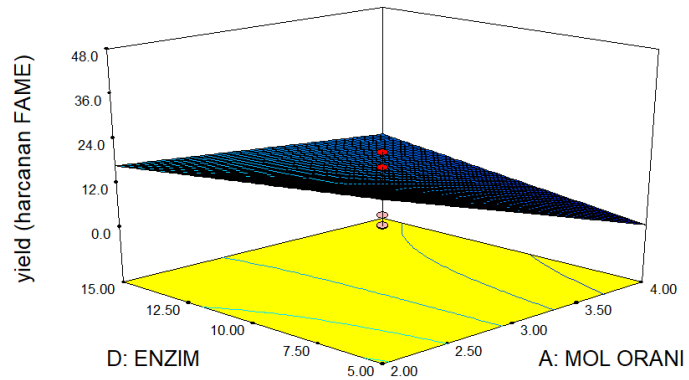
Design-Expert® Software

yield (harcanan FAME)



X1 = A: MOL ORANI
X2 = D: ENZIM

Actual Factors
B: SICAKLIK = 45.00
C: SU ICERIGI = 5.00



(c)

Şekil H.5. Novozyme 51032 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretiminde tepkime parametrelerinin birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren 3 boyutlu yüzey cevap grafikleri (a)sıcaklık-mol oranı, (b)su içeriği-mol oranı, (c)enzim-mol oranı

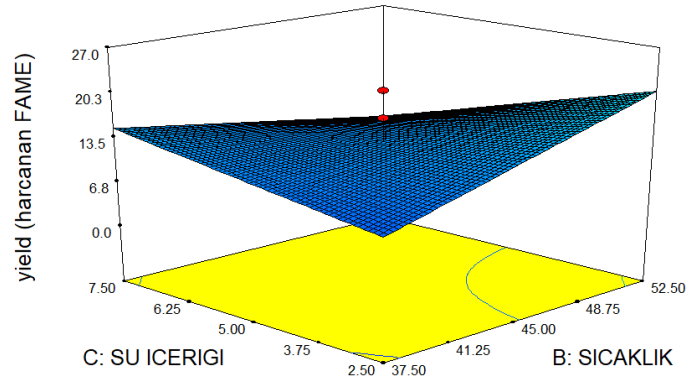
Design-Expert® Software

yield (harcanan FAME)



X1 = B: SICAKLIK
X2 = C: SU ICERIGI

Actual Factors
A: MOL ORANI = 3.00
D: ENZIM = 10.00



(d)

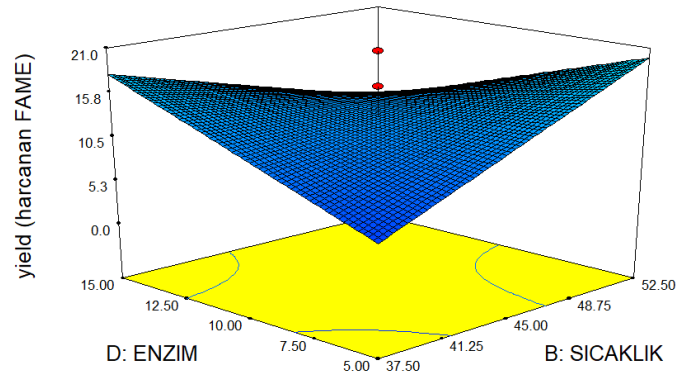
Design-Expert® Software

yield (harcanan FAME)



X1 = B: SICAKLIK
X2 = D: ENZIM

Actual Factors
A: MOL ORANI = 3.00
C: SU ICERIGI = 5.00



(e)

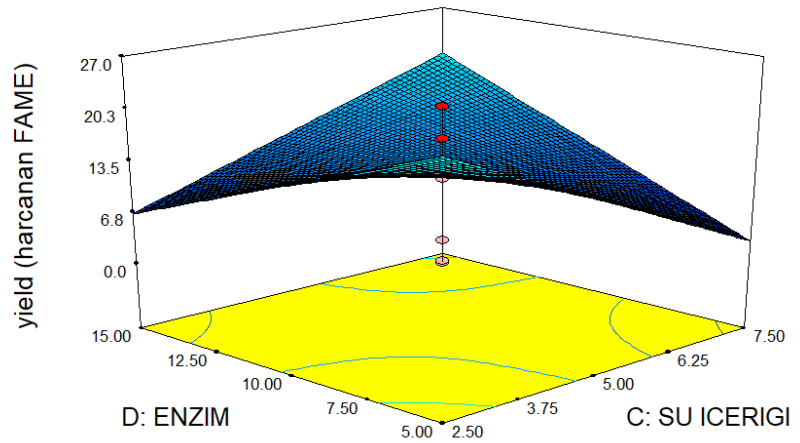
Design-Expert® Software

yield (harcanan FAME)



X1 = C: SU ICERIGI
X2 = D: ENZIM

Actual Factors
A: MOL ORANI = 3.00
B: SICAKLIK = 45.00



(f)

Şekil H.5.(devam). Novozyme 51032 katalizörlüğünde AYAME ve TMP'den biyoyağlayıcı üretiminde tepkime parametrelerinin birbirleri arasındaki ilişkiyi gösteren 3 boyutlu yüzey cevap grafikleri (d)su içeriği-sıcaklık, (e)enzim-sıcaklık, (f)enzim-su içeriği

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Akbin H. M., **Gürkaya B.**, Uyar B., İlgen O., Kapucu N., Production of biodiesel catalyzed by immobilized thermomyces lanuginose lipase from canola oil: process optimization using response surface methodology, *New Biotechnology*, 2012, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.08.104>

Kutluk B. G., Kutluk T., Uyar B., Kapucu N., Butyl esters synthesis from waste cooking oil fatty acids as a green product for lubrication, International Eurasian Conference On Science, Engineering And Technology, Ankara, Turkey, 22-23 November 2018.

Kutluk B. G., Kutluk T., Uyar B., Kapucu N., Waste Frying Oils Management: Production Of Biolubricants By Environmentally Friendly Processes, International Marmara Science And Social Sciences Congress, Kocaeli, Turkey, 23-25 November 2018.

Kutluk B. G., Kutluk T., Uyar B., Kapucu N., Optimization Of Enzymatic Reaction Parameters Of Trimethylolpropane Esters From Biodiesel Via Response Surface Methodology (RSM), 11. Euroasian Biochemical Approaches & Technologies Congress, Antalya, Turkey, 27-30 October 2018.

Kutluk G. B., Akbin H.,M., Kutluk T., Kapucu N., Survey Of Buffer Solution And Ph Effect On Immobilization Of Lipozyme TL 100L On Celite, Journal of Selçuk University Natural and Applied Science, 2014, 917-926.

Kutluk G. B., Kutluk T., Kapucu N., Biolubricant Production From Waste Edible Oil Biodiesel Via Immobilized Thermomyces Lanuginosus Lipase Catalysis, International Advanced Researches Engineering Congress, Osmaniye,Turkey, 16-18 November 2017.

Kutluk G. B., Kutluk T., Kapucu N., Synthesis Of Bioesters From Waste Sunflower Oil Biodiesel Using A Biocatalytic Route, 1st International Technology Sciences and Design Symposium, Giresun, Turkey. 28-30 June 2018.

Kutluk G.,B., Kutluk T., Kapucu N., Alternative Approach To Waste Edible Oil Management: Biolubricant Production Via Green Processes, *International Conference On Advances In Science And Arts*, Istanbul, Turkey, 29–31 March 2017.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Akbin, H.M., Kapucu N., Survey Of Buffer Solution And Ph Effect On Immobilization Of Lipozyme TL 100L On Celite, *2nd international Conference on Environmental Science and Technology*, Antalya, Turkey, 14-17 May 2014.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Bioterrorism, *National Safety Congress*, Kocaeli, Turkey, 8-10 October 2013.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Effects Of Catalyst Loading And Reusability On Transesterification Of Waste Sunflower Oil Using Immobilized Lipase *Thermomyces Lanuginosa*, *Journal of Selçuk University Natural and Applied Science*, 2014, 927-930.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Effects Of Catalyst Loading And Reusability On Transesterification Of Waste Sunflower Oil Using Immobilized Lipase *Thermomyces Lanuginosa*, *2nd international Conference on Environmental Science and Technology*, Antalya, Turkey, 14-17 May 2014.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Effects Of Different Solvent Types On The Production Of Fatty Acid Methyl Esters From Waste Edible Oil Via Enzymatic Process, *7th International Ege Energy Symposium and Exhibition*, Uşak, Turkey, 18-20 June 2014.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Enzim Biyoreseptörler, Biyo&Nano Teknoloji Kongresi, İstanbul, Türkiye, 1-3 Ekim 2013.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Enzymatic Transesterification Of Algae Oil From *Chlorella Protothecoides*, *Advanced Materials World Congress*, İzmir, Turkey, 16-19 September 2013.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Examination Of Methanol Inhibition Effect On Biodiesel Production Via Enzymatic Processes From Waste Comestible Oil, *International "Enzymes for Biocatalysis" Workshop*, İstanbul, Turkey, 3-5 June 2014.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Immobilization Of *Thermomyces Lanuginosa* And *Candida Artartica* Lipases Onto Calcinated Eggshell, *Advanced Materials World Congress*, İzmir, Turkey, 16-19 September 2013.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Investigation Of Different Support Materials For Lipase Immobilization, *International "Enzymes for Biocatalysis" Workshop*, İstanbul, Turkey, 3-5 June 2014.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Lipase Catalyzed Production Of Green Products From Renewable Resources, 5. Ulusal Kataliz Kongresi, Adana, Türkiye, 23-26 Nisan 2014.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Lipaz Katalizörlü Biyodizel Üretimi İçin Farklı Nesil Yağların Karşılaştırılması, 11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Eskişehir, Türkiye, 2-5 Eylül 2014.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Kapucu N., Production Of Biolubricants From Oleic Acid Via Enzymatic Process, *7th International Ege Energy Symposium and Exhibition*, Uşak, Turkey, 18-20 June 2014.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Uyar B., Kapucu N., *Biodiesel Production by Immobilized Lipase From Vegetable Waste Oil*, *19th International Energy Environment Fair and Conference*, İstanbul, Turkey, 24-26 April 2013.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Uyar B., Kapucu N., Çevre Dostu Polimerlerin Enzimatik Sentezi, *1. Uluslararası Plastik & Kauçuk Teknolojileri Sempozyumu ve Ürün Sergisi*, Ankara, Turkey, 29-31 Mayıs 2013.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Uyar B., Kapucu N., Doğal Polimer Kitosana Lipaz Tutuklama, *1. Uluslararası Plastik & Kauçuk Teknolojileri Sempozyumu ve Ürün Sergisi*, Ankara, Turkey, 29-31 Mayıs 2013.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Uyar B., Kapucu N., Enzymatic Production Of Biodiesel From Waste Cooking Oil, *The international Conference on Environmental Science and Technology*, Nevşehir, Turkey, 18-21 June 2013.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Uyar B., Kapucu N., Lipase Catalyzed Production Of Trimethylolpropane Esters, *The international Conference on Environmental Science and Technology*, Nevşehir, Turkey, 18-21 June 2013.

Kutluk T., **Kutluk G. B.**, Uyar B., Kapucu N., Oleyik Asit Polyol Esterlerin Biyokatalitik Üretimi, *10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi*, İstanbul, Türkiye, 3-6 Eylül 2012.

Ünügöl T., Kutluk T., **Kutluk G.B.**, Kapucu N., Environmentally Friendly Processes from Coffee Wastes to Trimethylolpropane Esters to be Considered Biolubricants, *Journal of the Air & Waste Management Association*, 2020, <https://doi.org/10.1080/10962247.2020.1788664>

ÖZGEÇMİŞ

Bahar Gürkaya Kutluk, 1 Eylül 1986 yılında İzmir ili Bergama ilçesinde dünyaya gelmiştir. İlkokulu, Karaveliler Köyü Birleştirilmiş Sınıflı İlkokulu'nda 1997 yılında tamamlamıştır. Orta öğrenimini Yukarıbey İlköğretim Okulu'nda tamamlamıştır. Lise öğrenimini 2004 yılında Bergama Akif Ersezgin Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2009 yılında T.C. Kocaeli Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden mezun olmuştur. Yüksek Lisans derecesini 2012'de yine aynı bölümden almıştır. Danışmanı Dr. Öğr. Üyesi Nurcan Kapucu yürütücülüğünde “Biyodizel Yakıt ve Biyoyağlayıcıların Yenilenebilir Kaynaklardan Lipaz Katalizli Üretimi” ve “Atık Yemeklik Yağların Lipaz Katalizli Biyoyağlama Yağı Üretiminde Hammadde Kaynağı Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması” başlıklı 2 adet Tübitak Destekli Bilimsel Araştırma Projesi'nde görev almıştır. Temel çalışma alanları: Biyoteknoloji, Yenilenebilir Enerji Teknolojileri, Esterleşme ve Transesterleşme Tepkimelerinde Optimizasyon Çalışmaları, Enzimatik Biyodizel ve Biyoyağlayıcı Üretim Prosesleri, Enzim Tutuklama Prosesleri'dir. Aynı bölümde araştırma görevlisi olarak görev yapan Dr.Togayhan Kutluk ile evlidir ve Togay Atlas isimli bir erkek çocuk annesidir.