

BİYODİZEL ÜRETİMİ İÇİN *THERMOMYCES LANUGINOSA* LİPAZININ FARKLI DESTEKLERE TUTUKLANMASI

Bahar Gürkaya, Melda Akbin, Başar Uyar, Nurcan Kapucu

Kimya Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi B Blok, Kocaeli Üniversitesi, Umuttepe, 41380, Kocaeli
(bgurkaya@gmail.com, m_akbin@yahoo.com, basar.uyar@kocaeli.edu.tr, nurcan.kapucu@kocaeli.edu.tr)

Özet

Biyodizel üretiminde kimyasal katalizörlerin kullanımı yüksek reaksiyon hızı ve dönüşüm için endüstride tercih edilir. Ancak; ayırma işlemlerinin maliyeti, yan ürünlerin giderilmesindeki zorluklar sebebiyle alternatif üretim yöntemleri araştırılmaktadır. Lipazlar yardımıyla gerçekleştirilen enzimatik transesterifikasyonda hem son ürün olarak çıkan gliserolün kolayca ayrılması hem de yüksek saflıkta ürün elde edilmesi biyodizel üretiminde dikkat çeken bir yöntemdir. Lipazların tutuklanarak kullanımı toplam maliyetin azaltılmasında etkilidir. Tutuklama için kullanılan destekler organik veya inorganik malzemeler olabilir. Hidrotalsitler gerek katalizör gerekse katalizör desteği olarak düşük maliyeti ve yüksek performansı sebebiyle yaygın olarak kullanılırlar. Kullanım amacına göre farklı yöntemlerle hidrotalsit sentezlenebilir. Bu çalışmada biyodizel üretiminde kullanılmak üzere, üre hidrolizi ve yanma yöntemiyle elde edilen Mg-Al hidrotalsit desteklere *Thermomyces lanuginosa* lipazı sıvı (Novozymes, Lipozyme TL 100 L) ve katı formda (Fluka, 06767) tutuklanmıştır.

Anahtar kelimeler: Biyodizel, *Thermomyces lanuginosa*, Mg-Al hidrotalsit, lipaz, tutuklama.

1.Giriş

Fosil yakıtların günden güne azalması, çevreye olan duyarlılığın artması, hızlı nüfus artışı ve sanayileşme sebebiyle fosil yakıtlara alternatif olarak kullanılacak enerji kaynakları arayışı gün geçtikçe artarak devam etmektedir. Bu arayışlar sonunda günümüzde, atık yağların yanısıra bitkisel, hayvansal ya da mikroorganizmalardan elde edilen yağların kısa zincirli alkollerle transesterifikasyonu ile biyodizel elde edilmektedir. Bitkisel yağlardan yağ asidi alkil

esterlerinin üretimi endüstride köklü bir uygulama alanına sahiptir. İnorganik asit veya baz katalizörlerle trigliserid/alkol karışımının kaynama noktasına yakın sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda ortamdaki tuzun esterlerden ayrılması, katalizörün ayrılarak nötralleştirilmesi oldukça zordur. Bu nedenle homojen katalizör yerine heterojen katalizörün kullanımı ile bu sorun azaltılmaya çalışılır. Heterojen katalizörler, reaksiyon ortamından daha kolay ayrılabilir ve tekrar kullanılabilirliği sebebiyle oldukça önemlidirler. Bununla ilgili literatürde birçok çalışma yapılmıştır. İyonik reçineler, enzimler, zeolitler, hidrotalsitler gibi pek çok örnek verilebilir [1].

Bunların yanında enzimlerin biyodizel üretiminde kullanımı ticari olarak pek yaygınlaşmamıştır. Ancak; kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında birçok avantaja sahiptirler. İlmli reaksiyon koşulları ve ürün saflaştırma basamaklarının azaltılması gibi nedenlerle başlıca tercih sebebi olarak gösterilebilir. Literatürde lipaz enzimi serbest veya tutuklanmış halde biyodizel üretiminde kullanılmıştır [2]. Tutuklama desteği olarak hidrotalsit, silika, celite, duolit, seramik ve çitosan gibi çok farklı destekler kullanılmıştır [1,3,4]. Hidrotalsit, birlikte çöktürme, üre hidrolizi ve yanma yöntemleri ile elde edilebilir. Birlikte çöktürme yönteminde hazırlanan çözeltideki pH farklılıkları sebebiyle kristal yapıları farklı olmakta ve tutuklanma verimini etkilemektedir. Üre hidrolizi yöntemiyle hidrotalsit hazırlarken kullanılan magnezyum ve alüminyum nitrat bileşiklerinin oranının önemli olduğu görülmektedir. Uygun mol oranı ile yüksek porozite ve geniş yüzey alanı elde edilebilir. Yanma yöntemi, üre, glisin, sakkaroz gibi bazı organik yakıtların patlayarak ayrışması esasına dayanmaktadır. Yanma yönteminin diğer hidrotalsit hazırlama

yöntemlerine göre avantajı, kimyasal reaksiyon çok hızlı gerçekleştiğinden daha kısa sürede ve daha az enerji harcayarak hidrotalsit üretilebilmesidir. Bu yöntemin diğer bir avantajı da herhangi bir çözücüye ihtiyaç duymaması ve bunun sonucu olarak yıkama işleminin önemli ölçüde azalmasıdır [5].

Bu çalışmada biyodizel üretiminde kullanılmak üzere, üre hidrolizi ve yanma yöntemiyle elde edilen Mg-Al hidrotalsite *Thermomyces lanuginosa* lipazı, tutuklanarak her iki desteğin enzim tutuklama performansları incelenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Serbest lipaz enzimi (Lipozyme TL 100 L) Novozyme (Danimarka) firmasından temin edilmiştir. Tutuklamada destek malzemesi olan Mg-Al hidrotalsit aşağıda belirtilen iki yonteme göre hazırlanmıştır. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

2.2. Hidrotalsitin hazırlanması

Üre hidrolizi yöntemiyle Mg-Al hidrotalsit hazırlanırken aşağıdaki yöntem izlenmiştir: $Mg(NO_3)_2$ ve $Al(NO_3)_3$ Mg/Al molar oranı 4.0 olacak şekilde saf suda çözülerek üre, $[üre]/[NO_3^-]$ oranı 4.0 olacak şekilde eklenir ve çözülür. $105^\circ C$ sıcaklıkta 300rpm'de 10 saat karıştırılarak, 8 saat karıştırılmadan ısıtılarak hidrolizi sağlanır. Oluşan katı parçalar filtrasyonla toplanır ve saf suyla yıkanarak $100^\circ C$ de 18 saat kurutulur. Kurutulan katı ince toz haline gelene kadar öğütülür ve $500^\circ C$ de 7 saat kalsine edilerek hidrotalsit haline getirilir.

Yanma yönteminde ise; Mg/Al ağırlıkça oranı 3.0 ve Na_2CO_3 /reaksiyon karışımı oranı ise; ağırlıkça 0.2 olacak şekilde katı karışım hazırlanarak 1g katı karışım başına 0.2g sakkaroz eklenir ve saf suyla çözülür. 400rpm'de sürekli karıştırma sağlanarak su buharlaştırılır. $500^\circ C$ sıcaklıktaki kül fırınında malzemenin rengi tamamen beyaza dönene kadar kalsine edilir. Kalsinasyondan elde edilen katı öğütülerek önce 1N Na_2CO_3 çözeltisiyle, ardından da saf suyla yıkanarak filtre edilerek ve $100^\circ C$ 'de 4 saat kurutulur.

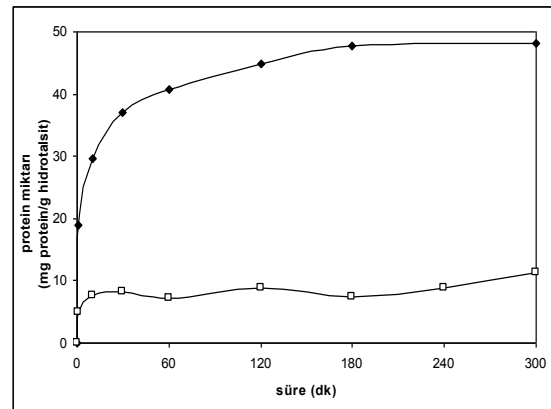
2.3. Lipazın desteklere tutuklanması

Yapılan ön deneyler doğrultusunda pH 9.0 Tris-HCl tamponu *Thermomyces lanuginosa* lipazının hidrotalsite tutuklanmasında kullanılmıştır. $17\mu l$ sıvı enzim/ml tampon ve 0,01g hidrotalsit/ml tampon oranları doğrultusunda enzim çözeltisi hazırlanarak hidrotalsite eklenmiştir. İnkübasyon $37^\circ C$, 200rpm karıştırma hızında, 3saat süreyle gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda süspansiyon 6000rpm'de santrifüjlenerek ayrılmış ve enzim çözeltisinin iki katı kadar tampon ile yıkanarak vakum altında $25^\circ C$ 'de 24 saat kurutulmuştur. Her iki destek türü için aynı yöntem uygulanmıştır. Çapraz bağlı *Thermomyces lanuginosa* lipazının hidrotalsite tutuklanmasında ise 2,5mg katı enzim/ml tampon oranı ile enzim çözeltisi hazırlanmış ve enzimin çözünen kısmı ile tutuklama aynı inkübasyon koşullarında gerçekleştirilmiştir.

3. Bulguların değerlendirilmesi

3.1. Lipazın desteklere tutuklanması

Üre ve yanma yöntemleriyle hazırlanan hidrotalsitlere sıvı formdaki *Thermomyces lanuginosa* lipazı tutuklanmış, tutuklanan enzim miktarının süreye göre değişimi Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Farklı yöntemlerle üretilen hidrotalsitlere tutuklanan enzim miktarlarının tutuklanma süresine göre değişimi. (◆): üre yöntemiyle hazırlanan hidrotalsit, (□): yanma yöntemiyle hazırlanan hidrotalsit.

Şekilde görüleceği üzere, üre yöntemiyle hazırlanan hidrotalsitin enzim tutuklama verimi 3. saatte 48 mg protein/g hidrotalsit düzeyine, yanma yöntemiyle hazırlanan hidrotalsit ise 10. dakikada 8 mg protein/g hidrotalsit düzeyine ulaşarak daha fazla artmamıştır. Bu sonuca göre üre yöntemiyle hazırlanan hidrotalsitin

enzim tutuklama kapasitesi yanma yöntemiyle hazırlanan hidrotalsitin enzim tutuklama kapasitesinin altı katı olduğu görülmektedir. Ayrıca üç saatlik tutuklanma süresinin yeterli olduğu da elde edilen diğer bir sonuçtur. Bu sonuç üzerine biyodizel üretiminde üre yöntemiyle elde edilen hidrotalsitin kullanılmasına karar verilmiştir.

3.2. Farklı lipaz formlarının hidrotalsite tutuklanması

Bir saatlik tutuklanma süresi sonunda farklı pH'ta hazırlanan çapraz bağlı ve sıvı *Thermomyces lanuginosa* lipazlarının üre hidrolizinden elde edilen hidrotalsite tutuklanma performanslarına etkisi Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Tutuklanan enzim miktarı (mg protein/g destek)

pH	<i>T.lanuginosa</i> (katı)	<i>T.lanuginosa</i> (sıvı)
7	14	52
7,5	15	57
8	17	53
8,5	36	53
9	42	70

Sıvı formdaki enzimin katı formdaki enzime göre daha yüksek tutuklanma performansı verdiği Tablo'dan görülmektedir. Ayrıca tutuklanma performansının pH'la arttığı da elde edilen diğer bir bulgudur.

4. Yorum

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda hidrotalsit üretim yöntemleri karşılaştırıldığında üre hidrolizinin yüksek tutuklanma performansı ile yanma yönteminin önüne geçtiği görülmektedir. Desteğe yüklenen enzim miktarı ne kadar yüksek ise biyodizel üretimi için gerekli tutuklanmış enzim miktarı o kadar az olur. Dolayısıyla, proses sonrası ayırma işlemleri kolaylaşacak ve katalizör maliyetleri de azalacaktır. Sıvı formdaki lipazın kullanımı serbest lipaz çözeltisinin hazırlanmasında kullanım açısından kolaylık sağlaması sebebiyle tercih edilmiştir.

5. Kaynaklar

- [1] F. Yagiz, D. Kazan, A.N. Akin, Chemical Engineering Journal 134 (2007) 262–267.
- [2] H. Zeng, K. Liao, X. Deng, Process Biochemistry 44 (2009) 791–798.
- [3] K. Lee, C. C. Akoh, Biotechnology Techniques Vol. 12, No 5, 1998, pp. 381-384.
- [4] M. Monier, Y. Wei, A.A. Sarhan, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 63 (2010) 93–101.
- [5] Virginia Da'vila, Enrique Lima, Silvia Bulbulian, Pedro Bosch, Microporous and Mesoporous Materials 107 (2008) 240–24.