

MİKRO POROZ POLİMERİK ENZİM REAKTÖRLERİ KULLANARAK AYÇİÇEK YAĞINDAN BİYODİZEL ÜRETİMİ

Nadir DİZGE¹, Oltan CANLI², Bülent KESKİNLER¹, Aziz TANRISEVEN²

¹Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Çevre Mühendisliği, Muallimköy Kampüsü, Gebze

²Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü, Muallimköy Kampüsü, Gebze

e-mail: bkeskinler@gyte.edu.tr

ÖZET

Biyodizel, bitkisel veya hayvansal yağların kimyasal ya da enzimatik katalizatörlerle kısa zincirli bir alkolle (metanol veya etanol) reaksiyonu sonucunda açığa çıkan ve yakıt olarak kullanılan bir üründür. Bu çalışmada; aldehit fonksiyonel grubu ihtiva eden mikro poroz polimerik enzim reaktörüne (MPPER) Thermomyces lanuginosus lipaz (Lipozyme), %106 aktivite verimiyle immobilize edilerek ayçiçek yağı ve metanolün transesterifikasyonu ile biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Biyodizel üretimi; yağ ve metanol karışımının, 1 saat süreyle peristaltik pompa yardımıyla sürekli olarak MPPER'den sirküle edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörün 30 tekrar kullanımı sonunda, immobilize enzimin aktivitesinde belirgin bir azalma olmadığı gözlemlenmiştir. Enzim aktivite ölçümünde oluşan biyodizelin ince tabaka kromatografisinin kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyodizel (Yağ Asiti Esterleri), Mikro Poroz Polimerik Enzim Reaktörleri, Lipozyme

1. GİRİŞ

Dünyadaki mevcut enerji kaynaklarının sınırlı olması ve hızla azalmasına karşılık, insanoğlunun enerji ihtiyacı her geçen gün hızla artmaktadır. Enerji ihtiyacına olan bu talebin karşılanması için alternatif yenilenebilir enerji kaynakları gündeme gelmiştir. Bunlardan biri olan “biyokütle enerjisi” büyük bir potansiyele sahiptir. Biyodizel ham veya rafine edilmiş bitkisel ve hayvansal yağların kısa zincirli alkolle asidik, bazik ve enzimatik katalizi yoluyla elde edilen, biyokütle kökenli en önemli alternatif yenilenebilir yakıtlardan biridir. Biyodizelin en önemli avantajı çevre dostu olmasıdır. Doğada çok kısa sürede (21 gün) %99,6'ya varan oranlarda biyolojik olarak parçalanmaktadır. Biyodizelin yanması sonucu oluşan CO₂, atmosferdeki toplam CO₂ miktarını arttırmadığı için iklim değişikliğine neden olmaz. Yabancı kaynaklı petrole bağımlılığı azaltması nedeniyle de ülke ekonomisine katkıda bulunur. Yerel üretilebildiği için kırsal kesimin sosyo-ekonomik yapısında iyileşme sağlar, göçün önlenmesine katkıda bulunur.

Biyodizel üretimi (transesterifikasyon) için günümüzde kullanılan prosesler; sırasıyla kimyasal kataliz prosesleri, enzimatik transesterifikasyon ve süperkritik akışkanla transesterifikasyon olarak sıralanabilir. Bunların arasında enzimatik transesterifikasyon prosesi; reaksiyon yan ürünü gliserolün üründen kolay ayrılması, yağdaki mevcut yağ asitlerinin tümünün metil estere dönüşebilmesi ve yağda bulunması muhtemel suyun reaksiyonu olumsuz etkilememesi vb. gibi diğer proseslerde bulunmayan birçok avantaja sahiptir. Bu nedenle literatürde biyodizel üretimi ile ilgili çalışmalar enzimatik transesterifikasyon üzerine yoğunlaşmıştır[1-6]

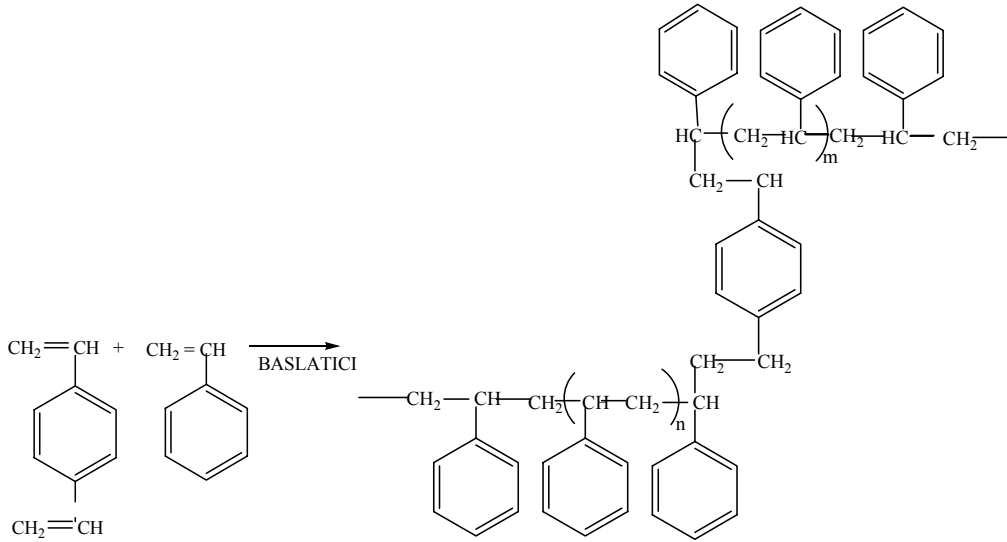
Enzimatik transesterifikasyon hücre dışı (reaksiyon ortamında immobilize enzim olarak) ve son yıllarda hücre içi (reaksiyon ortamında direkt mikrobiyal hücre olarak) şekilde uygulanmaktadır. Immobilize lipazlar kullanılarak biyodizel üretiminde alkol, yağ, çözücü ve farklı lipaz enzimlerinin etkileri araştırılmıştır[1-6]. Lipaz 1.5 moldan daha fazla metanol içeren ortamlarda inaktif olduklarından son yıllarda basamaklı transesterifikasyon çalışmaları yapılmıştır ve metanolün reaktör ortamına kesikli yüklenmesinin bu inaktivasyonu ortadan kaldırdığı rapor edilmiştir[1].

Enzimlerin kullanımını sınırlayan en önemli faktör, bu enzimlerin uygun mikroorganizmalardan elde edilme maliyetinin yüksek olmasıdır. Hücre dışı enzimlerin eldesi, saflaştırılmaları ve aktivitelerini kaybetmeden uygun bir matris üzerine immobilizasyonları, bu enzimlerin kullanımının en önemli basamağını teşkil eder. Gerek hücre dışı ve gerekse hücre içi enzimlerin immobilizasyonu için günümüzde çok farklı matrisler kullanılmaktadır (çeşitli reçineler, poroz veya poroz olmayan polimerik matrisler, inorganik matrisler ve jeller

vb.). Hücre İmmobilizasyon tekniklerinden birisi poroz biyokütle destek partikülleridir (BSPs). Bu partiküller Atkison ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Yüzey ve iç kısımları hücre ile kaplı bu partiküllerin çok sayıda avantajları vardır. Yapılan çalışmalarda poliüretan köpüklerde *R. oryzae* hücrelerinin kolayca immobilize olduğu görülmüş ve bu hücre dolu partiküllerin reaksiyon ortamına ilave edilmesi ile %10-20 sulu ortamda metanol le yapılan transesterifikasyon çalışmalarında %80-90 verime ulaşılmıştır. Bu çalışmanın, metil ester üretim seviyesinin aynı şartlarda hücre dışı lipaz enzimi (hücre) kullanılarak yapılan çalışma sonuçları ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir[1].

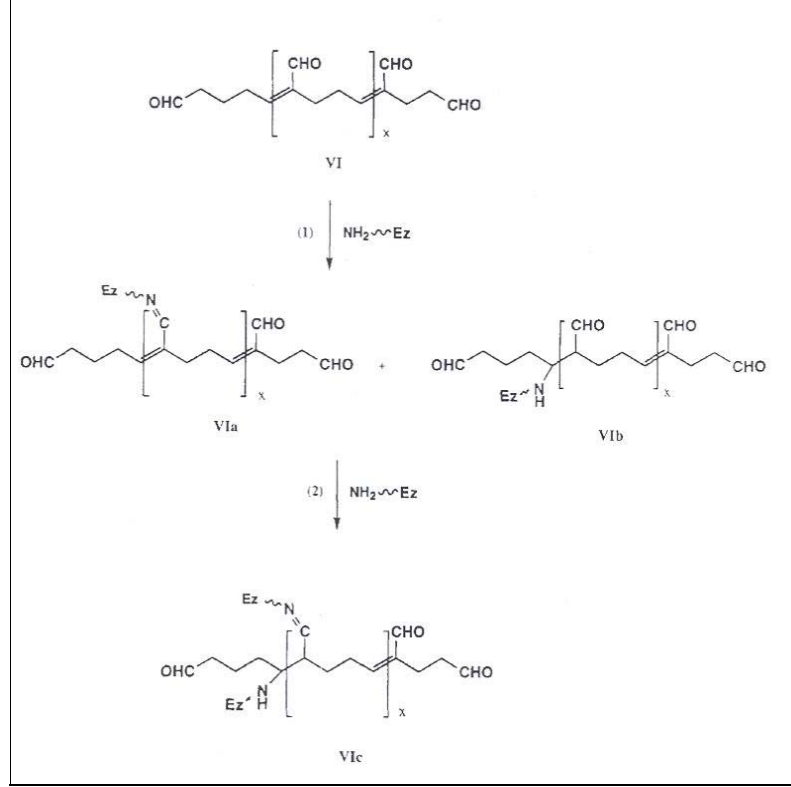
Kararlılık, tekrar kullanılabilme, sürekli işletme imkanı, reaksiyonun daha iyi kontrolü, yüksek saflık ve yüksek ürün dönüşümü gibi nedenler immobilize lipaz ve hücrelerinin kullanım avantajlarıdır. Lipazın hidrofobik polimer destek malzemelere immobilizasyonu literatürde geniş olarak yer almaktadır. Bu destek malzemelerinden birisi çalışmalarımızda kullandığımız hidrofobik mikroporoz poli(stiren-divinil benzen) polimeridir. Stiren-divinilbenzen kopolimerleri(STY-DVB) %99'a varan por hacminde, çok geniş por boyutlarında ve iç yapısı istenilen özellikte üretilmektedir.

Endüstride ve günlük hayatta oldukça yaygın olarak kullanılan polistiren divinil benzen özellikle membran teknolojilerinde, membrana dayalı biyoreaktörlerde kullanım alanı bulmuştur [7,8]. Bu polimer, lipazla birlikte başka enzimler için de iyi bir immobilizasyon matriksidir. (Şekil 1).



Şekil 1. Polistiren ve divinil benzenin radikalik polimerizasyon reaksiyonu

İmmobilizasyonda kullanılan bir diğer matriks ise poliglutaraldehittir. Bu polimer glutaraldehitin bazik ortamda polimerleşmesiyle elde edilir. Karbonil gruplarına sahip poliglutaraldehit, amin grubu bulunduran bileşiklerle schiff bazı reaksiyonuyla geri dönüşümsüz kovalent olarak bağlanır (Şekil 2). Glutaraldehit kullanılarak yapılan immobilizasyonlarda ise oluşan bağlar geri dönüşümlüdür ve indirgenme reaksiyonu ile ancak kararlı hale getirilebilir. Bu işlem hem maliyetli hem de enzim veya diğer biyolojik materyaller için olumsuz etkiye sahiptir. [9,10].



Şekil 2. Poligluteralehit kullanarak enzim immobilizasyonu

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1 Kimyasallar

Divinilbenzen (DVB), stiren (STY), potasyum persülfat, etil asetat, hekzan, asetik asit ve $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ Merck'ten, Span 80 ve K_2HPO_4 Fluka'dan ve α -naftol Sigma'dan satın alındı. Metil alkol ise teknik olup evaparatörde saflaştırılmıştır. Ticari olarak satılan rafine ayçiçek yağı kullanılmıştır.

2.1.2. Enzim

T. Lanuginosus Lipaz (Lipozyme) Novo Nordisk'ten satın alınmıştır. Enzimin aktivitesi 8,47 birim/mL. Aktivite birimi, 24 mL yağ ve 3 mL metanolden oluşan substrat karışımından 25 °C'da 1 saatte 1 g biyodizel oluşturan enzim miktarıdır.

2.2. Metot

2.2.1. Enzim İmmobilizasyonu

Polimer diskler literatürde verilen üretim teknikleri kullanılarak üretilmiştir[11-13]. Deneylerde kullanılan polimer diskin çapı 27 mm, ağırlığı 400 mg ve kalınlığı 5 mm'dir. Şekil 3'deki sistem kullanılarak tampon çözelti ile yıkanan disklerden 24 saat poligluteralehit (25 mL, %5 v/v) geçirildikten sonra, farklı pH'lara sahip olan tampon çözeltiler (6; kalsiyum asetat, 7, 8, 9; potasyum dihidrojen fosfat) ile 30 mL'ye seyreltilen Lipozyme (3 mL) 24 saat aynı sistemden sirküle edilerek enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kovalent bağlanmayan enzimi ortamdan uzaklaştırmak için disk kalsiyum asetat tampon çözelti (500 mL, 25 mM pH6) ile yıkanmıştır.

2.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

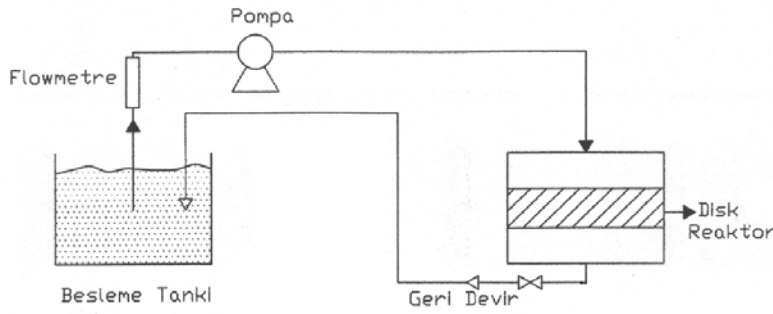
TLC, hekzan/etil asetat/asetik asit (90/10/1 v/v) çözelti sisteminde Whatman K5 silika tabakaların bir kez yürütülmesiyle yapılmıştır. Numunelerin ve standartların damlatıldığı ince tabakaların % 0,5 α -naftol ve %5 H₂SO₄ içeren etanol çözeltisine daldırılıp 140°C'da 10 dakika ısıtılmasıyla tabaka üzerindeki biyodizel noktaları görünür hale getirilmiştir.

2.2.3. Aktivite Tayini

Disk üzerinde kovalent immobilize edilmiş olan lipaz, 24 mL yağ ve 3 mL metanol kullanılarak biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Manyetik karıştırıcıda homojen hale getirilen, yağ metanol karışımı immobilize enzimin bulunduğu biyoreaktörün içinden bir peristaltik pompayla sabit debide (20 mL/min) geçirilerek biyodizel üretilmiştir. Reaksiyon ortamından 100 μ L numune karışımı alınıp, hekzan ile 500 μ L'ye seyreltilmiştir.

2.2.4. Biyodizel Üretimi

Biyodizel üretimi için Şekil 3'deki besleme tankında bulunan ayçiçek yağı (24 mL) ve metanol (3 mL) 20 mL/min debide biyokatalitik reaktörden sirküle edilmiştir. Reaktörün etkin çalıştırılabilme süresi, optimum şartlardaki reaktörün sürekli çalıştırılıp ortamdan alınan numunelere ince tabaka kromatografisi (TLC) yapılarak üretilen biyodizelin kantitatif analiziyle sürekli takip edilmiş ve optimum kullanım süresi bulunmuştur.

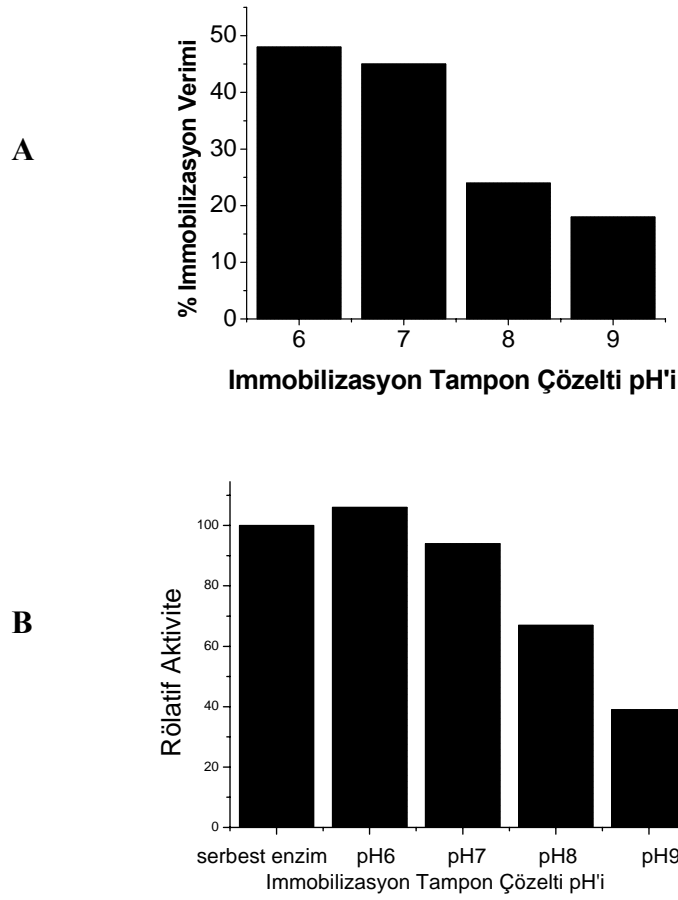


Şekil 3. Enzim immobilizasyonu ve biyodizel üretimi

3. SONUÇLAR

3.1. Enzim İmmobilizasyonu

3 mL Lipozyme tampon çözeltisi ile 30 mL'ye seyreltilmiştir. Farklı pH'larda [6 (Asetat, 25 mM), 7, 8, 9 (Fosfat, 25 mM)] yapılan immobilizasyon sonrasında, enzimin en yüksek kovalent bağlanma verimi kalsiyum asetat (25 mM, pH 6) tamponuyla elde edilmiştir. İmmobilizasyondan sonra yapılan Bradford analizleriyle enzimin bağlanma yüzdesinin, pH 6'da en yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4).



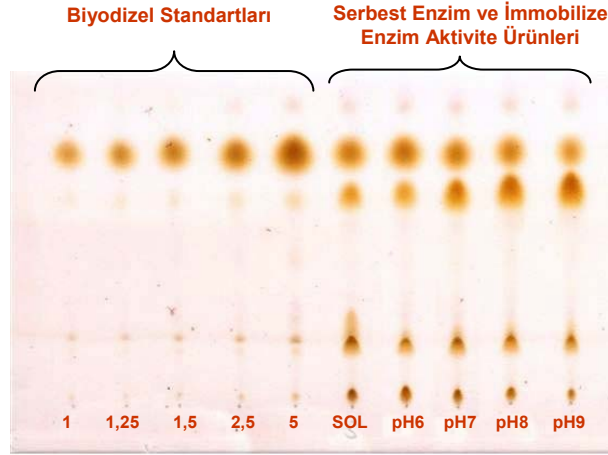
Şekil 4. A. Farklı pH'larda immobilize edilen Lipozyme'in % immobilizasyon verimi B. Immobilize enzimin aktivitesi (immobilize edilen enzimle aynı miktarda serbest enzim biyodizel üretimi için kullanılmıştır. Serbest enzimin aktivitesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin aktivasyon deneyleri için 24 mL yağ ve 3mL metanol 1 saat süreyle sabit debide (20 mL/min) reaksiyon edilmiştir).

3.2. Biyodizel Üretimi

Bu çalışmada, Lipozyme ayçiçek yağından biyodizel üretiminde kullanılmak üzere immobilize edilmiştir. Immobilizasyon verimi % 48 olup, immobilize enzimin 30 tekrar kullanımda aktivitesini kaybetmediği gözlenmiştir. Besleme tankına 24 mL ayçiçek yağı ve 1 mL metanol konulup, karıştırılarak pompa yardımıyla sabit debide (20 mL/min) MPPER'den süspanse yağ/metanol karışımı geçirilmiştir. Immobilize enzimin metanol konsantrasyonundan etkilenmemesi için metanol reaksiyon ortamına başlangıçta, 20. dakikada ve 40. dakikada olmak üzere 3 basamakta ilave edilmiştir. 1 saat sonunda substratın % 76'sının biyodizel dönüşümü gözlenmiştir.

3.3. Aktivite Tayini

Biyodizel üretiminde daha önce yapılan çalışmalarda genellikle aktivite tayini için HPLC veya GC kullanılmaktadır. Bu çalışmada, ince tabaka kromatografisi ilk defa aktivite tayini başarıyla kullanıldı. TLC metodu oldukça basit olup diğer analiz yöntemlerine kıyasla daha kısa sürede yapılabilmektedir. Standart olarak kimyasal yolla elde edilen biyodizel kullanıldı. Şekil 5'de görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda standartlar (172, 86, 57.3, 43, 34.4 µg/µL) kullanılarak kantitatif biyodizel analizleri yapıldı. İnce tabaka kromatografisinde gördüğümüz gibi serbest enzimin içinde bulunan sudan dolayı (1,5 mL kullanılmıştır), hidroliz ürünü oluşmuştur, immobilize enzimin aktivitesinin %106 olmasının sebebi bu olabilir.



Şekil 5. Farklı pH'larda immobilize edilen enzim aktivitesi (aktivite deneyleri 24 mL ayçiçek yağı üzerine 3 mL metanol kademeli olarak eklenerek yapılmıştır. Yağ-metanol karışımı polimer diskten 1 saat süreyle sirkülasyon edilerek gerçekleştirilmiştir).

Ayrıca Ca^{2+} iyonlarının lipaz enziminin aktivitesini arttırdığı literatürde gösterilmiştir [14], immobilizasyon tampon çözeltisindeki kalsiyum iyonları, immobilize enzimin aktivitesinin serbest enzime göre daha yüksek çıkmasının bir başka nedeni de olabilir. Immobilize Lipozyme'in 30 tekrar kullanım sonunda aktivitesinde azalma gözlenmemiştir. Enzimatik yöntemlerle ürettiğimiz biyodizel, kimyasal yöntemlerle elde edilen biyodizel gibi homojen katalizör kalıntıları içermediğinden ayrıca nötralizasyon basamakları içermez. Bu da maliyeti düşürdüğünden geliştirdiğimiz bu yöntem endüstride kullanılabilir potansiyele sahiptir.

LİTERATÜR

1. Fukuda,H., Kondo,A., and Nodo,H., Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils Biosci.Bioeng., 92(5), 405-416(2001).
2. Pizarro,A.V.L. and Park,E.Y., Lipase-catalyzed Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oils Contained in waste Activated Bleaching Earth(article in press) Process Biochem.(2002)
3. Samukawa,T.,Kaieda,M.,Matsumoto,T.,Ban,K.,Kondo,A.,Shimada,Y., Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. J.Biosci. Bioeng. 90(2),180-183(2000)
4. Abigor,R., Uadia,P., Foglia,T., Haas,M., Jones,K., Okpefa,E., Obibuzor,j. ve Bafor,M., Lipase-catalysed production of Biodiesel Fuel from same Nigerian Lauric Oils. Biochem.soc.Trans.,28,979-981(2000)
5. Watanabe,Y., Shimada,Y.,Sugihara,A.,Noda,H.,Fukuda,H. ve Tominaga,Y., Cont. Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized *C.antarctica* lipase. J.Am.Oil Chem.Soc.,77,355-360(2000)
6. Gandhi,N.N., Patil,N.S., Sawant S.B. ve Joshi,J.B. Lipase-Catalyzed Esterification, Catal.Rev.Sci.Eng., 42(4), 439-480 (2000)
7. Serizawa T., Kamimura S., Akashi M., "Electrostatic adsorption of polystyrene particles with different surface charges onto the surface of an ultrathin polymer film", *Colloids and Surfaces A:Physicochemical and Engineering Aspects*, 164:237-245, 2000
8. Jones R.A.L., Lehnert R.J., Schönherr H., Vansco J., "Factors affecting the preparation of permanently end-gafted polystyrene layers", *Polymer* 40:525-530, 1999
9. Margel S. ve Rembaum A., "Synthesis and Characterization of Poly(glutaraaldehyde). A Potential Reagent for Protein Immobilization and Cell Separation", *Macromolecules*, 13:19-24, 1980
10. Walt D.R. ve Agayn V.I., "The Chemistry of Enzyme and Protein Immobilization with Gluteraldehyde"
11. Barby, D.; Haq, Z., Low density porous cross-linked polymeric materials and their preparation and use as carriers for included liquids, European Patent 0 060 138 (Unilever, appl,cant) September, 1982.
12. Williams, J. M. Toroidal Microstructures from Water-in-Oil Emulsions, *Langmuir*, 4: 44-49, 1988.
13. Sumner, C. G. Clayton's The Theory of Emulsions and Their Tech. Treatment; Blakiston Co.:NewYork 1954
14. Wakako Tsuzuki, Akemi Ue, Akihiko Nagao ve Kazuaki Akasaka, Fluorimetric analysis of lipase hydrolysis of intermediate- and long-chain glycerides, *Analyst*, 2002, 127, 669-673