

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AYÇİÇEK ASİDİK YAĞININ ENZİMATİK ESTERLEŞMESİ

142601

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Müh. Ebru PİRİ
506011007

142601

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 12 Haziran 2003
Tezin Savunulduğu Tarih : 22 Mayıs 2003

Tez Danışmanı :

Doç.Dr. Ahmet SİRKECİOĞLU

Diğer Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Ayşe AKSOY

Yrd. Doç. Dr. Hakan BERMEK

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI
TEZ ENSTİTÜSÜ
BERMEK

HAZİRAN 2003

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bilgisi, fikirleri ve yapıcı eleştirileri ile beni daha iyiye yönlendiren değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Ahmet Sirkecioğlu'na, bilgisini, desteğini ve yakınlığını her zaman hissettiğim değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Melek Tüter'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne kadar her konuda maddi, manevi beni destekleyen ve her zaman bana sevgi, ilgi ve özveriyle yaklaşan aileme teşekkür ederim.

MAYIS, 2003

Kim. Müh Ebru PİRİ

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Giriş ve Çalışmanın Amacı	1
2. TEORİK ÇALIŞMA	3
2.1. Asidik Yağlar	3
2.2. Esterleşme Reaksiyonları	3
2.3. Transesterifikasyon Reaksiyonları	4
2.3.1. Alkoliz	4
2.3.2. Asidoliz	6
2.3.3. İçesterleşme	6
2.4. Esterler	7
2.5. Enzimler	8
2.5.1. Lipazlar	11
2.6. Enzimatik Esterleşme Reaksiyonları	12
2.6.1. Enzimatik Esterleşme Reaksiyon Kinetiği	13
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	20
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
3.2. Reaktan ve Ürün Karakterizasyonu	21
3.2.1. Ayçiçek Asidik Yağının Karakterizasyonu	21
3.2.2. Ester Karakterizasyonu	23
3.3. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonu	23
3.4 Kinetik Parametrelerin Hesaplanması	24
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve DEĞERLENDİRİLMESİ	25
4.1. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonuna Enzim Miktarının Etkisi	25

4.2. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonuna Sürenin Etkisi	27
4.3. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonuna Sıcaklığın Etkisi	28
4.4. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonuna Toplam Yağ Asidi/n-oktanol Mol Oranının Etkisi	30
4.5. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonunun Kinetik Çalışması	34
5. VARGILAR	38
KAYNAKLAR	39
EKLER	42
ÖZGEÇMİŞ	50



KISALTMALAR

AAY	: Ayçiçek asidik yağı
O	: n-oktanol
L	: Lipozyme TL IM (Thermomyces lanuginosa immobilized lipase)
H	: n-hekzan
T	: Sıcaklık
TYA	: Toplam yağ asidi
BAUN	: Batch Acidolysis Unit Novo
TLC	: İnce yüzey kromatografi (Thin layer chromatography)
FID	: Alev iyonizasyon dedektör (Flame ionization detector)
FAE	: Yağ asidi esterleri (Fatty acid ester)
TAG	: Triaçilgliserol
DAG	: Diaçilgliserol
MAG	: Monoaçilgliserol
FFA	: Serbest yağ asidi (Free fatty acid)

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Ayçiçek asidik yağının özellikleri.....	21
Tablo 3.2. Gaz kromatografisi analiz koşulları.....	22
Tablo 3.3. Ayçiçek asidik yağının toplam yağ asidi bileşimi.....	22
Tablo 4.1. Farklı enzim miktarlarında gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonlarından elde edilen esterlerin ağırlık %'si olarak zamana göre değişimi (Yağ miktarı 5g, TYA:O 1:1, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).....	26
Tablo 4.2. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonlarından elde edilen esterlerin ağırlık %'si olarak zamana göre değişimi (Yağ miktarı 5g, TYA:O 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, n-hekzan 25mL).....	29
Tablo 4.3. Farklı TYA/O mol oranlarında gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonlarından elde edilen esterlerin ağırlık %'si olarak zamana göre değişimi (Yağ miktarı 5g, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).....	31
Tablo 4.4. Farklı TYA/O mol oranlarında gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonlarından elde edilen oktil esterlerin ağırlık %'si olarak zamana göre değişimi (Alkol miktarı 2.84mL, Enzim miktarı 0.5g, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).....	33
Tablo 4.5. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunun deney koşulları ve hesaplanan kinetik parametreleri.....	36
Tablo A.1. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.15, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).....	42
Tablo A.2. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.05, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).....	43
Tablo A.3. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.20, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).....	43
Tablo A.4. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, sıcaklık 70°C, n-hekzan:25mL).....	44
Tablo A.5. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O	

	mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, sıcaklık 55°C, n-hekzan:25mL).....	45
Tablo A.6.	Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).....	46
Tablo A.7.	Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:0.5, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).....	47
Tablo A.8.	Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:2, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).....	48
Tablo A.9.	Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 2.5g, TYA:O mol oranı 1:2.0, enzim miktarı 0.5g, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).....	49



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	: Michaelis-Menten parametrelerinin belirlenmesi.....	17
Şekil 2.2.	: Lineweaver-Burk çizimi	19
Şekil 4.1.	: Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda farklı enzim/yağ ağırlık oranları için dönüşmenin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA/O mol oranı 1:1, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).....	27
Şekil 4.2.	: Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda farklı sıcaklıklar için dönüşmenin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA/O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, n-hekzan 25mL).....	30
Şekil 4.3.	: Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda farklı TYA/O mol oranları için dönüşmenin zamana göre değişimi (AAY 5g, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).....	32
Şekil 4.4.	: Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda farklı TYA/O mol oranları için dönüşmenin zamana göre değişimi (n-oktanol 2.84mL, Enzim miktarı 0.5g, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).....	34
Şekil 4.5.	: Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ilk hızların enzim ağırlığına (%) göre değişimi (Yağ miktarı 5g, TYA:O 1:1, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).....	35

SEMBOL LİSTESİ

E_t	: Toplam enzim konsantrasyonu
E	: Serbest veya bağlı olmayan enzim konsantrasyonu
S	: Substrat
$E.S$	: Enzim-substrat kompleksi
W	: Su
P	: Ürün
$-r_s$	: Substratın harcanma hız ifadesi
$r_{E.S}$	: Enzim-substrat kompleksinin net oluşma hız ifadesi
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
V_{max}	: Toplam enzim konsantrasyonu için maksimum hız ifadesi



AYÇİÇEK ASİDİK YAĞININ ENZİMATİK ESTERLEŞMESİ

ÖZET

Yağ kimyasalları, endüstriyel olarak ilgi çeken ürünlerin sentezleri için değerli ara ürünlerdir. Enzimlerin elde edilmelerinin ve kullanılmalarının kolay olmasından dolayı bu ürünlerin enzimatik reaksiyonlarla üretimleri önem kazanmıştır. Bu çalışmada, ticari olarak kolay elde edilen immobilize lipaz, Lipozyme TL IM (*Mucor miehei*) varlığında ayçiçek asidik yağının n-oktanol ile esterleşmesi farklı koşullar altında incelenmiştir.

Esterleşme reaksiyonu, kesikli olarak çalışan bir sistemde çözücü olarak n-hekzan kullanılarak, farklı süre, enzim miktarı, sıcaklık ve toplam yağ asidi/n-oktanol oranlarında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun ilerlemesi, reaktan ve ürünün İnce Yüzey Kromatografi-Alev İyonizasyon Dedektör (TLC-FID) kombine sistemi olan SIII rodlara sahip İatroscan TH 10 cihazında analizi ile gerçekleştirilmiştir. Lipaz varlığında gerçekleştirilen ayçiçek asidik yağı ile n-oktanolün esterleşmesinin kinetik parametreleri belirlenmiştir.

Ayçiçek asidik yağı esterleşme reaksiyonunda, yağ ağırlığı temel alınarak enzim miktarının % 10, sıcaklığın 40°C ve toplam yağ asidi/n-oktanol mol oranının 1:1 olduğu koşullar, optimum deney koşulları olarak belirlenmiştir. Maksimum ester eldesi 3 saat içinde yaklaşık % 90'a ulaşmıştır. Optimum koşullar için Michaelis-Menten sabiti, $K_m = 6.05 \times 10^3$ mol/mL olarak hesaplanmıştır.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, yemeklik yağ üretiminde yan ürün olarak açığa çıkan ayçiçek asidik yağının n-oktanol ile Lipozyme TL IM enzimi varlığında gerçekleşen enzimatik esterleşme reaksiyonu ile değerli yağ kimyasallarının sentezinde kullanılabilecek ara kimyasalların yüksek verimle sentezlenebileceğini göstermiştir.

ENZYMATIC ESTERIFICATION OF SUNFLOWER ACID OIL

SUMMARY

Oleochemical products are valuable intermediates for the synthesis of industrially interesting products. Their production via enzymatic reactions is gaining an importance due to ready availability and the ease to handle the enzymes. In this study lipase catalyzed esterification of sunflower acid oil with n-octanol in the presence of commercially available immobilized lipase, Lipozyme TL IM (*Mucor miehei*) was investigated under different reaction conditions.

Esterification reactions were carried out in batch mode, in the presence of n-hexane which was used as solvent, with varying the amount of enzyme, temperature and total fatty acid/alcohol ratios in order to obtain the optimum production conditions. Reactions were monitored by analyzing reactants and products by thin layer chromatography-flame ionization detection (TLC-FID) using an Iatroscan TH-10 analyzer with SIII rods. Kinetic parameters were then evaluated according to Michaelis-Menten kinetics.

The optimum condition of the esterification of sunflower acid oil was found to be the condition where 10 % enzyme (based on oil weight) was used. At this condition total fatty acid/n-octanol molar ratio used in reaction was kept as 1:1 at 40°C. Maximum ester yield was reached approximately 90 % in 3 hours. The Michaelis-Menten constant, $K_m = 6.05 \times 10^3$ mole/mL was obtained for the optimum conditions.

The results of the present study also indicate the potential use of enzymatic esterification reaction of sunflower acid oil which is produced as a byproduct during the production of edible oil, with n-octanol for the synthesis of valuable oleochemistry intermediates.

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı

Yağ kimyasallarından biri olan ve endüstride geniş kullanım alanı bulunan esterler, esterleşme ve transesterifikasyon reaksiyonları ile elde edilirler. İçerdikleri serbest yağ asidi miktarı yüksek ve bileşimleri itibarıyla ilaç, kozmetik ve diğer kimya sektörlerinin hammadde ihtiyacını karşılayacak yağ asidi esterleri üretimi için büyük bir potansiyele sahip olan asidik yağlar, bahsedilen bu reaksiyonlar için önemli başlangıç maddeleridir [1].

Geleneksel kimyasal yöntemler kullanılarak uygulanan esterleşme ve transesterifikasyon reaksiyonları yüksek sıcaklıkta, asit veya alkali katalizörler varlığında uzun sürelerde gerçekleşmekte ve istenmeyen yan ürünler elde edilmektedir. Bu dezavantajlardan dolayı günümüzde enzim varlığında, ılımlı koşullarda gerçekleştirilen ve enerji tasarrufu, ürün saflığı ve kalitesi sağlayan enzimatik esterleşme reaksiyonlarına endüstride hız verilmiştir [2].

Yağların ve yağ endüstrisi yan ürünlerinin değerlendirilmesinde ve endüstriyel kullanıma sunulmasında etkili olan ve önemi gittikçe artan lipazlar en önemli enzim çeşitlerinden biridir. Substratlarına karşı son derece seçici olmaları, uzun süre kararlı kalmaları ve dolayısıyla enzim yenilemelerini azaltıp reaksiyon maliyetlerini düşürmeleri lipazların endüstride geniş uygulama alanına sahip olmalarını sağlamıştır.

Bu çalışmanın amacı, yemeklik ayçiçek yağı üretimi sırasında açığa çıkan ayçiçek asidik yağının çözücü olarak kullanılan n-hekzan içinde n-oktanol ile, Lipozyme TL IM mikrobiyal lipazı varlığında, enzimatik esterleşme reaksiyonunu incelemektir. Kesikli olarak çalışan bir sistemde gerçekleştirilecek olan esterleşmede reaksiyon süresi, enzim miktarı, toplam yağ asidi/alkol mol oranı ve sıcaklık etkisi gibi

optimum reaksiyon koşulları saptanarak reaksiyonun Michaelis-Menten kinetiğine uyup uymadığı belirlenecek ve kinetik parametreler hesaplanacaktır.



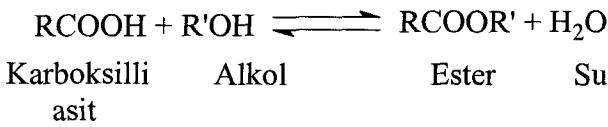
2. TEORİK ÇALIŞMA

2.1. Asidik Yağlar

Asidik yağlar, alkali rafinasyon işlemlerinin önemli bir yan ürünüdür. Soya fasulyesi, ayçiçeği, pamuk tohumu, pirinç kepeği, kolza, hardal, yerfıstığı ve hindistancevizinin asidik yağları ticari asidik yağlardır. Asidik yağlar genel olarak koyu renkli olup % 40-80 serbest yağ asidi, % 20-50 doğal gliserid, sabunlaşmayan madde ve safsızlıklardan oluşmaktadırlar. Günümüze kadar genellikle bu tipte yağlar, ticari olarak ucuz-kalite sabun üretiminde kullanılmaktaydı. Ancak kimyasal bileşimi göz önünde bulundurulduğunda her bir asidik yağın, yağ asidi esterleri üretimi için ilaç, kozmetik ve diğer kimya sektörlerinin hammadde ihtiyacını karşılayacak potansiyele sahip olduğu görülmektedir [1].

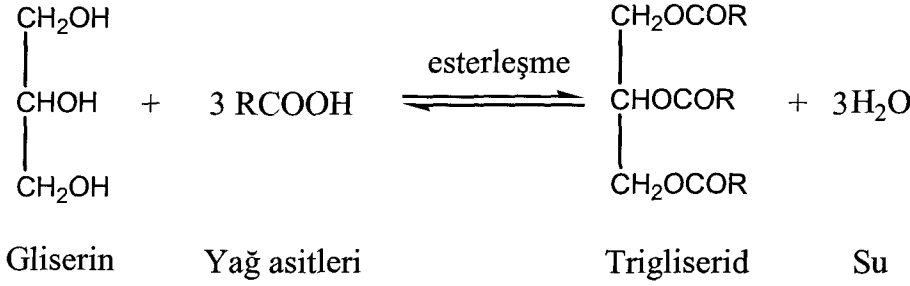
2.2. Esterleşme Reaksiyonları

Asidik yağların da reaktan olarak kullanıldığı esterleşme genel olarak organik asit ve alkolün reaksiyona girerek ester oluşturduğu, aşağıda genel formülü verilen endotermik reaksiyondur.



Yukarıdaki reaksiyonunun sol tarafa doğru gelişmesine hidroliz reaksiyonu denir. Reaksiyonu esterleşme lehine çevirmek için oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Yüksek sıcaklıklarda yürütülen esterleşme reaksiyonlarında son ürün olarak sayısız izomer ve yan ürünün bulunduğu renkli karışımlar oluşur [3]. Esterleşme reaksiyonlarında yan ürün oluşumu reaksiyonun asit katalizör veya enzim varlığında yürütülmesi ile engellenebilmektedir.

Yağların hidrolizi ile açığa çıkan ve fraksiyonlu distilasyonla saflaştırılan uzun ve orta uzunlukta zincir yapısına sahip yağ asitlerinin gliserinle aşağıda belirtilen esterleşme reaksiyonu sonucunda yağların ana bileşeni olan esterler (trigliserid) elde edilir. Bu ürünlerin gıda sanayiinde katkı maddelerinden, emülgatörlere kadar çok geniş kullanım alanı vardır [4,5].

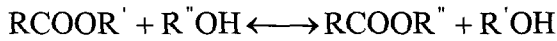


2.3. Transesterifikasyon Reaksiyonları

Transesterifikasyon, bir ester ile diğer bir bileşiğin alkoksi ya da açıl gruplarını karşılıklı değiştirerek yeni ester oluşturdıkları reaksiyondur. Transesterifikasyon reaksiyonları 3 grupta toplanır. Bunlar esterin bir alkol, asit ve bir esterle etkileşimi olan ve sırasıyla alkoliz, asidoliz, içesterleşme olarak adlandırılan geri dönümlü reaksiyonlardır [6].

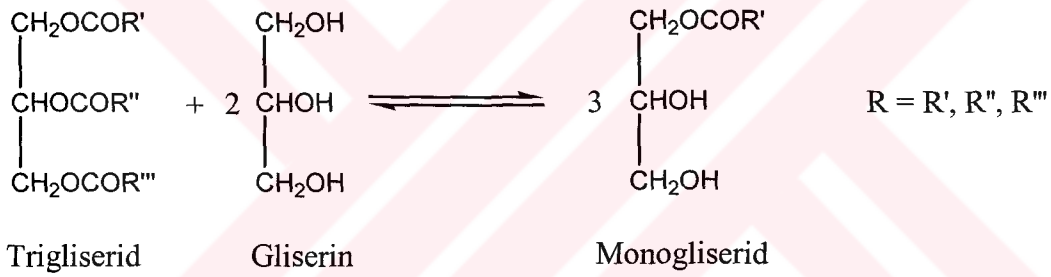
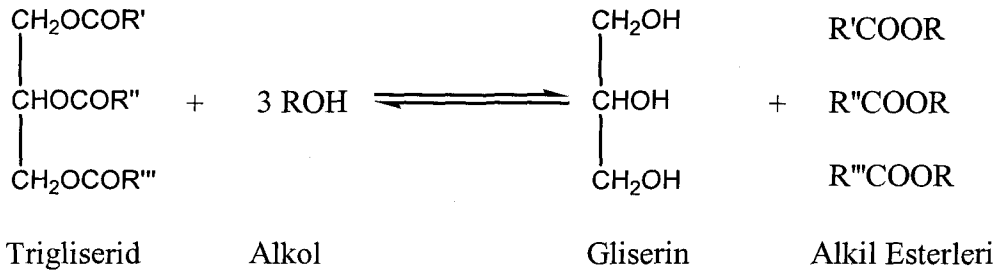
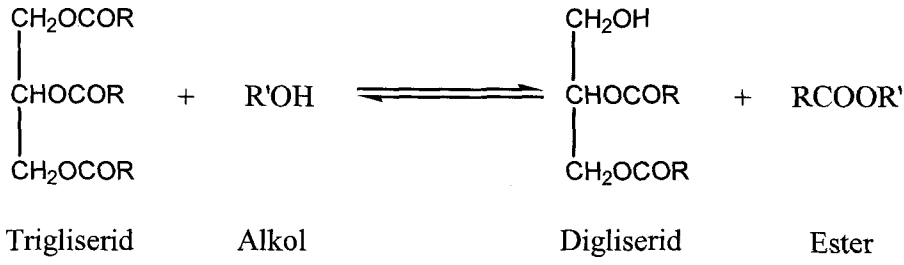
2.3.1. Alkoliz

Alkoliz, alkol ve esterin reaksiyona girdiği transesterifikasyon reaksiyonlarından biridir.



Bu reaksiyon çoğunlukla sıvı fazda gerçekleşir. Alkali katalizör kullanıldığında oda sıcaklığı ya da altındaki sıcaklıklarda çalışılır. Asit katalizör kullanıldığında reaksiyon sıcaklığı 100°C civarındayken, katalizörsüz gerçekleşen reaksiyonlarda sıcaklık 250°C'nin üzerindedir [6]. Bu reaksiyonlarda farklı alkol oranlarının kullanılmasıyla farklı ürünler elde edilebilir [7].

Aşağıda çeşitli alkoliz reaksiyonları verilmiştir.



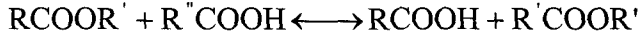
Alkoliz reaksiyonları hangi alkolle gerçekleştiriliyorsa, reaksiyon o alkolün adı ile tanımlanır. Örneğin, metanoliz ve etanoliz; metil ve etil alkollerle yürütülen reaksiyonları ifade etmektedir.

Yüksek kaynama noktalı esterlerin kaynama noktasını düşürmek için, metanol gibi kısa zincirli bir alkolle gerçekleştirilen alkoliz reaksiyonları, endüstriyel açıdan en elverişli ve yaygın olarak kullanılan transesterifikasyon reaksiyonlarıdır. Bitkisel ve hayvansal yağların alkolizi ile elde edilen yağ asidi alkil esterleri yağ kimyasalları için önemli ara ürünlerdir.

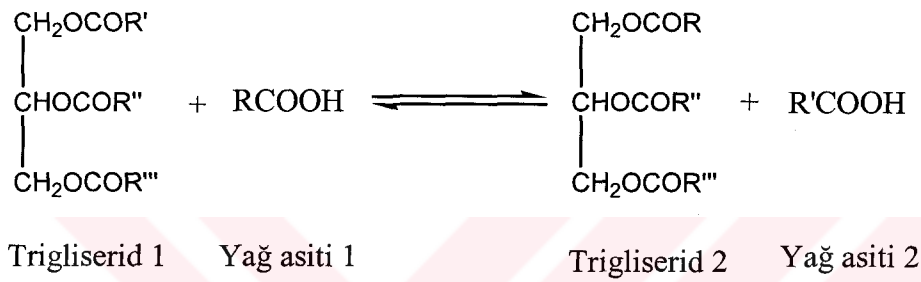
Bu reaksiyonların yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmesinden ve reaksiyon ortamına homojen olarak yayılan asit ve alkali katalizörlerin ayrılma ve tekrar kullanılmalarının mümkün olamamasından dolayı bilim adamları katalizör olarak lipaz kullanma yoluna yönelmişlerdir [8].

2.3.2. Asidoliz

Asidoliz, ester ve karboksilli asidin reaksiyonudur. Bu reaksiyon yüksek sıcaklıklarda asit katalizör varlığında tersinir olarak gerçekleşir [6].



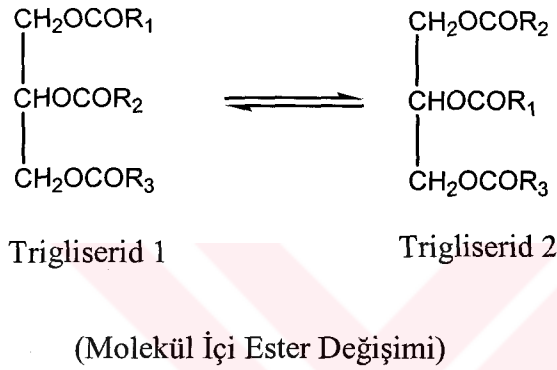
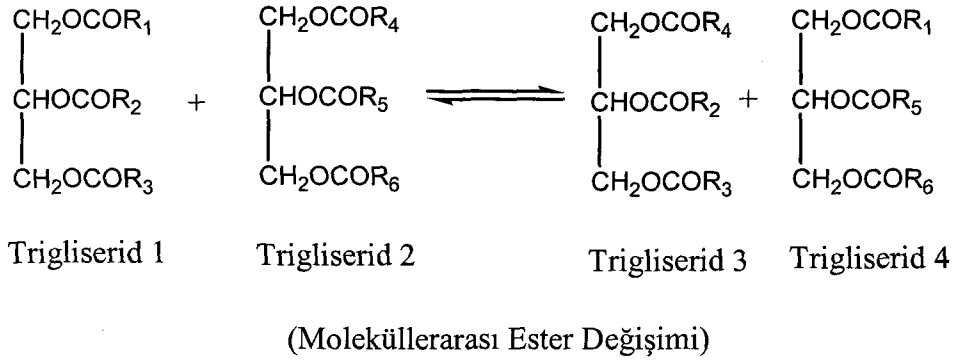
Ester bir yağ asidi fazlası ile reaksiyona sokulduğunda bu yağ asidi ile esterin orijinal alkil grubu birleşerek yeni ester oluşturur [9].



2.3.3. İçesterleşme

Bir esterin kendisi veya başka bir esterle reaksiyona girip yeni bir ester ya da esterler oluşturduğu tersinir reaksiyondur. Doğal yağların ve ester karışımlarının özelliklerinin geliştirilmesi, yağların erime noktalarının değiştirilmesi bu reaksiyonla mümkündür. Aynı esterlerin kullanıldığı alkoliz reaksiyonlarından daha yavaş gerçekleşen bu reaksiyonlarda katalizör olarak alkoliz reaksiyonlarında kullanılan katalizörler kullanılır. Katalizörsüz içesterleşme reaksiyonu ile 250°C'nin üstündeki sıcaklıklarda saatler süren reaksiyon sonucunda iki ester dengeye getirilebilir. Katalizör kullanılarak, belirtilen reaksiyonlar daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir [6].

Gıda endüstrisinde bitkisel yağların içesterleşme ve bunun gibi reaksiyonlarda katalizör olarak enzimler kullanılarak daha ılımlı reaksiyon koşullarıyla, reaksiyon sonunda elde edilecek ürünün tat, renk ve saflık açısından daha kaliteli olması sağlanmıştır [10]. Aşağıda içesterleşme reaksiyonlarından olan moleküller arası ester değişimi ve molekül içi ester değişimi gösterilmiştir.



2.4. Esterler

Bölüm 2.2’de de belirtildiği gibi esterler genel olarak karboksilli asit ve alkolün reaksiyona sokulması ile elde edilirler. Bunun yanı sıra alkol dehidrojenasyonu ve ester iç değişimi reaksiyonları ve asit anhidrit, asit klorür, amid, nitril, doymamış hidrokarbon, eter, aldehit, keton kullanılarak da elde edilebilirler.

Esterlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenirse, kısa zincirli esterlerin renksiz, uçucu ve çoğunun hoş kokuya sahip oldukları görülür. Buna karşın uzun zincirli doymuş yağ asidi esterlerinin birçoğu renksiz ve kokusuz, kristal yapılı katılardır. Çok uzun zincirli asit ve alkollerin esterleri sert, kırılkan ve parlak kristal yapılı katılar olup vaks olarak da adlandırılırlar. Bu vaksların birçoğu saf olarak bulunmayıp karışımlar halinde bulunurlar.

Genel olarak yağ asidi esterlerinin erime noktaları ilgili yağ asitlerinin erime noktalarından daha düşüktür. Aynı zamanda kısa zincirli asitlerin metil, etil ve propil esterlerinin kaynama noktaları da ilgili asit esterlerinin kaynama noktalarından düşüktür. Monoesterlerin birçoğu nemsiz ortamda belli sıcaklıklara kadar ısıtıl

kararlılık gösterdiklerinden genellikle bozulmadan distillenebilirler. Bu sebeple yağ asidi karışımlarının ayrılması ve belirlenmesi işlemlerinde kullanılırlar.

Esterler genelde suda çözünmezken birçok organik sıvıda çözünürler. Kısa zincirli esterler, birçok sıvı dahil olmak üzere organik bileşikler için iyi birer çözücüdürler. Özellikle selüloz bazlı reçineli vernikler için esterler çözücü olarak kullanılırlar.

Esterler reaktif bölgeleri, polarlıkları, yüzey aktif madde özellikleri, ekogüvenilirlikleri, sindirilme özellikleri ve zehirli olmayışları gibi özelliklerinden dolayı endüstride birçok alanda kullanılırlar. Kısa zincirli esterler boya ve verniklerde kullanılırken uzun zincirli esterler plastikleştirici olarak kullanılırlar. Ticari olarak kullanılan akrilatlar, metakrilatlar, vinil asetat ve benzerleri gibi vinil polimerlerin, polyester reçineleri ve plastik gibi pek çok polimerin ana bileşeni esterlerdir. Bu polimerler termoplastik malzemeler olup film, elyaf ve kalıplanmış plastik olarak da kullanılırlar. Doğal katı ve sıvı yağlar ile vakslar şeklinde bulunan esterler eski zamanlardan beri yağlayıcı olarak kullanılmaktadır. Özellikle alifatik esterler turbo jet motor yağlayıcıları için ana bileşen olarak kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra esterler ilaç sektöründe, tatlandırıcılarda, yumuşatıcı özelliklerinden dolayı kozmetik ürünlerinde ve sabun üretiminde de geniş kullanım alanına sahiptirler [6].

2.5. Enzimler

Enzimler, organizmalardaki kimyasal reaksiyonları aktivasyon enerjilerini düşürerek hızlandıran, bu reaksiyonların istenmeyen yan ürünlerinin oluşumunu engelleyip ılımlı koşullarda gerçekleşmelerini sağlayan organik katalizörlerdir.

Bazı enzimler yalnız proteinden oluşurken çoğunluğu protein yapısında olmayan kofaktör adı verilen gruplara da ihtiyaç duyarlar. Kofaktör biriminin olmaması durumunda enzimler katalitik aktivitelerini kaybederler. Bu yapıdaki enzimin aktif olmayan protein birimine apoezim, kofaktör içeren aktif enzime haloenzim denir. Kofaktör, bir metal iyonu veya koenzim olarak adlandırılan bir organik molekül olabilir [11].

Enzimatik reaksiyonların reaktanlarına substrat denir ve her enzimin kendine özgü substratı bulunur. Proteolitik enzimler dışında enzimler etkiledikleri reaksiyon tipinin veya substratın sonuna “az” eki getirilerek adlandırılırlar. Protolitik enzimler ise sonlarına “in” eki getirilerek adlandırılırlar. Bu şekilde isimlendirmede belirli bir düzen olmadığından ve zamanla birçok enzimin daha ortaya çıkarılmasından dolayı Uluslararası Enzim Komisyonu enzimleri sistematik isimlendirme ve sınıflandırma yoluna gitmiştir. Günümüzde enzimler, sistematik isimleri ve E.K. (Enzim Komisyonu) tarafından belirlenmiş kodları ile tanımlandıkları gibi daha kısa ve kolay olan geleneksel isimleri ile de adlandırılabilirler [12].

Enzimler, varlıklarıyla çok yavaş ilerleyebilecek kimyasal reaksiyonların hızını arttırmaları ve substrata özgü olduklarından yan ürün oluşumunu engelleyen, organik katalizörlerdir. Asit, baz, metal ve metal oksit gibi anorganik katalizörlere kıyasla çok seçicidirler. Enzimlerle düşük sıcaklık, pH ve basınçta çalışıldığı için yüksek enerji gereksinimine, yüksek maliyetli korozyonu önleyici ekipmana ihtiyaç duyulmaz. İstenmeyen yan ürün oluşumunun engellenmesi ve ürünün saflaştırma maliyetinin düşük olmasından dolayı endüstride diğer katalizörlere tercih edilir [13]. Ancak endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimlerin reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için enzimin en yüksek sıcaklıkta kısa zamanda tamamıyla bozundurulması veya ortama inhibitör katılması gerekir. Her iki işlem de ürünler için istenmeyen sonuçlar doğurabilir. Enzimlerin pahalı katalizörler olduğu dikkate alınırsa enzimlerin geri kazanılamaması maliyeti yükselten önemli bir etkidir. Tüm bu sorunları çözebilmek ve enzimleri endüstride çekici hale getirebilmek için enzimler immobilize edilerek kullanılmaktadır. Enzimler jel, membran veya mikrokapsülleme yoluyla tutuklanarak veya adsorpsiyon, iyonik bağlanarak, kovalent çapraz bağlanarak immobilize edilirler. Isı veya çözelti etkisiyle yapısında değişiklikler yapamaz dolayısıyla serbest enzimlere göre daha stabil hale gelirler ve geri kazanımlarıyla tekrar kullanılmaları mümkün olur [14].

Enzimlerin etkinlikleri, standart koşullar altında dakikada 1µmol substratı dönüşüme uğratan enzim miktarı olarak tanımlanan aktivite birimi ile tanımlanır [13]. Enzim aktivitesi sıcaklık, pH, çözeltinin iyon şiddeti, kofaktör, enzim ve substrat konsantrasyonu gibi etkenlerle değişebilmektedir. Bu etkenler tek tek incelenirse;

Sıcaklık : Diğer tüm kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzimatik reaksiyonlarda da reaksiyon hızı sıcaklık arttıkça arttırılabilir ancak bu artış belirli bir sıcaklıktan sonra duraklama ve gerileme şeklinde görülür. Bu durum yüksek sıcaklıkta enzim yapısında meydana gelen bozunmadan kaynaklanır. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklık optimum sıcaklık adını alır. Sıcaklık in vivo aktivite düzenleme aracı değildir [11].

pH: Her enzim için aktivitenin maksimum olduğu pH değerleri vardır ve bu değere optimum pH değeri denir. Bu değerın üzerinde ve altında aktivite düşer. Örneğın midede bulunan pepsin enzimi düşük pH'ta çalışabilirken bağırsakta bulunan tripsin ise yüksek pH'larda çalışabilir. Aşırı pH değışiminde enzim proteinin bozunması, optimum pH bölgesi dışında koenzimin enzim proteininden ayrılması gerçekleşecektir [15,16].

İyon Şiddeti: İyonik şiddet, tüm iyonik türlerin konsantrasyonlarının toplamının yarısı ile yüklerinin karesinin çarpımına eşittir. İyonik şiddetin etkisi özellikle yüklü moleküllerin birbirine bağı hareketleri ile gerçekleşen katalizlenme sırasında fark edilebilir. Yüklü substratların enzimlere bağlanması ve yüklü grupların katalitik aktif bölge içindeki hareketi ortamın iyonik kompozisyonundan etkilenir. Genel olarak tuz konsantrasyonun artması enzimatik aktiviteyi olumsuz yönde etkiler [13].

Kofaktör: Enzim aktivitesine etki eden bir başka faktör ise kofaktörler adı altında toplanan koenzimler, prostetik gruplar ve bazı metal iyonlarıdır. Apoenzime kovalent bağı prostetik gruplar ve kovalent bağıla bağlanmamış koenzimler, enzim aktivitesi için zorunlu gruplardır. Metal iyonları, enzimin aktif bölgesine veya başka bir bölgesine bağlanarak aktiviteyi arttırırken bazı metal iyonları da inhibitör görevi görürler. Ag^+ , Hg^{+2} , Cu^{+2} gibi metal iyonları enzimatik reaksiyonu inhibe ederler.

Enzim Konsantrasyonu: Enzim konsantrasyonun artmasıyla reaksiyon hızı da artar. Ancak deneysel olarak lineer bir artış görülmeyebilir. Bunun sebebi enzimlerin içerdikleri inhibitör ve aktivatörlerin dissosiyasyon olabilmeleridir. Bunun yanı sıra enzimler düşük konsantrasyonlarda dayanıksızdırlar.

Substrat Konsantrasyonu: Sabit enzim konsantrasyonunda reaksiyon hızı substrat konsantrasyonunun artmasıyla artar. Ancak belirli bir noktadan sonra substrat konsantrasyonunun artması reaksiyon hızını değiştirmmez [16].

Enzim uygulamalarının en geniş olduğu alanlar deterjan, deri, kağıt hamuru ve kağıt, nişasta ve şeker, yağ ve petrol fraksiyonları, şarap ve meyve suyu, hayvan ve yem, bira ve maya, tekstil endüştşleridir. Bunların yanı sıra analitik ve klinik amaçlı olarak da geniş bir uygulama alanı bulmaktadırlar.

2.5.1. Lipazlar

Lipazlar, bitki ve hayvanların çeşitli dokularından ya da bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar kullanılarak fermentasyon yolu ile elde edilen bir enzim grubudur. Endüşriyel uygulamalarda kolaylık sağlamalarından ve ekonomik olmalarından dolayı mikroorganizmalardan elde edilmiş olan lipazlar, bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen lipazlara göre daha çok tercih edilir.

Lipazlar, seçici olmayan, 1,3 pozisyonu ve yağ asidine seğicilik gösteren lipazlar olarak 3 grupta incelenmektedirler. Seçici olmayan lipazlar, rastgele pozisyonlardaki ağilgliserol molekül bağlarını kırarken, 1,3 pozisyon seğiciliği gösteren lipazlar, gliserol bağ yapısındaki 1 ve 3 pozisyonlarındaki yağ asidine etki ederler. Yağ asidine seğicilik gösteren lipazlar ise sadece belirli tipte yağ asidi ağilgliserol moleküllerinin serbest bırakılmasına yardımcı olurlar [17,18].

Lipazlar sulu çözeltilerde çözünebilmelerine rağmen substratları olan lipidler suda çözünmezler. Bu sebeple substrat ve enzimin temasının arttırılması için uygun bir organik çözücü kullanılabilir. Kullanılan organik çözücü, substrat çeşitliliğine bağlı olarak lipazın katalitik verimliliğini etkileyebilir [19]. Lipaz aktivitesi, pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu ve benzeri faktörler ile çözücü türü yanı sıra ortamda bulunan su miktarından da etkilenmektedir. Denge reaksiyonu olan esterleşme reaksiyonu sonunda ürünlerden biri olarak ağığa çıkan suyun çeşitli yöntemlerle ortamdan uzaklaştırılması ile düşük su konsantrasyonlarında aktivitesini koruyan lipazın etkin olması sağlanır.

Substratlarına karşı son derece seçici olması, uzun süre stabil kalması ve dolayısıyla enzim yenilenmesini azaltıp reaksiyon maliyetlerini düşürmesi, lipazların endüştride

yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır. Lipazlar öncelikli olarak açilgliseridlerin hidrolizinde etkin olmalarına karşın ters yöndeki reaksiyon olan sentezlemede de yüksek etkinlik göstermektedir. Asitlerin alkollerle esterleşmesinde, yağların içesterleşmesinde, biosurfaktan üretiminde, optikçe aktif bileşiklerin rasemik karışımlardan ayrılmasında kullanılırlar. Lipazlardan, yağların modifikasyonu, deri imalatı, atık arıtımı, deterjan, gıda, ilaç ve kozmetik sanayi, tıbbi uygulamalar, polyester üretimi ve bunlar gibi daha birçok alanlarda yararlanılır.

2.6. Enzimatik Esterleşme Reaksiyonları

Geleneksel metodlar kullanılarak uygulanan esterleşme ve içesterleşme reaksiyonları yüksek sıcaklıkta, asit veya alkali katalizörler varlığında uzun sürelerde gerçekleşmekte ve koyu renkli ürün ile istenmeyen yan ürünler elde edilmektedir. Bunların yanı sıra kullanılan kimyasal katalizörün korozyif etkisi ve reaksiyon sonunda üründen ayrılma işlemi endüstriyel açıdan büyük sorunlar yaratmaktadır. Enerji tüketiminin fazla olması, elde edilen ürünün safsızlığı ve yüksek maliyet gözönünde bulundurulup son zamanlarda daha ılımlı koşullarda gerçekleşen, ticari değeri yüksek ürünlerin elde edildiği enzimatik esterleşme uygulamalarına endüstride hız verilmiştir [2].

Enzimatik esterleşme reaksiyonları enerji tasarrufu, çevresel etki, ürün seçiciliği ve kalitesi açısından tercih edilir. Düşük sıcaklıklarda çalışıldığı için enerji maliyeti de düşüktür. İmmobilize edilmiş enzimler kullanılarak reaksiyon sonunda elde edilen ürünün saflığı arttırılır. Enzimlerin substrata karşı seçici olmalarından dolayı yan ürün oluşmadan istenilen ürün elde edilir [20].

Enzimatik esterleşme reaksiyonları bilimsel olarak birçok çalışmada incelenmiştir ve bu reaksiyonları etkileyen 4 ana parametrenin varlığı saptanmıştır.

1) Uygun enzim kullanımı: Reaksiyona girecek olan substratlar göz önünde bulundurulup o substratlara karşı seçici olan enzimlerin kullanılması gerekmektedir.

2) Alkol ve asit inhibisyonunu önlemek: Reaksiyona girecek olan asit ve alkolün özelliklerinin incelenip enzime karşı inhibitör etki yaratmayacak substratların

reaksiyona girmesi sağlanmalıdır. İnhibisyonu önlemek için optimum alkol/asit mol oranında reaksiyona sokulabilir.

3) Uygun organik çözücü seçimi: Bu aşamada enzimatik esterleşme reaksiyonunun uygulandığı endüstriyel alan önemlidir. Özellikle gıda endüstrisinde çözücüsüz ortamlarda çalışmak tercih edilir [21]. Enzimatik esterleşme reaksiyonlarında çözücü kullanmanın birçok avantajı vardır. Reaksiyon ortamının vizkozitesini azaltır, enzimlerin yüksek aktivite ve kararlılık göstermelerini ve homojen olarak dağılmalarını sağlar, enzimin aktivitesi için gerekli olan az miktardaki suyu enzimin etrafında tutarlar [22,23]. Sulu ortamlardaki hidrofobik substratların çözünürlüğünü arttırmak için de organik çözücüler kullanılır. Bunların yanı sıra organik çözücü kullanımının dezavantajları da vardır. Reaksiyon sonunda çözücülerin üründen ayrılması işlemi, çözücünün maliyeti, çözücünün yanıcı ve zehirli olma olasılıkları bu dezavantajlardan bazılarıdır [24,25].

4) Ürün inhibisyonunu yok etmek: Enzimatik esterleşme reaksiyonlarında iki bileşik üretilir. Esterin dönüşmeye etkisi çok belirgin olmazken, oluşan suyun rolü önemlidir. Katalizör olarak kullanılan lipazın aktivitesi için düşük miktarda su gereklidir. Ancak su konsantrasyonunun artması dengenin hidroliz yönüne kaymasına ve lipazın aktivitesini azaltmasına sebep olmasından dolayı oluşan suyun evaporasyon, pervaporasyon, silika jel veya moleküler elek kullanımı, reaksiyon ortamından kuru inert gaz geçirilmesi gibi yöntemlerle uzaklaştırılması gerekmektedir [26,27].

Lipazlarla katalizlenen esterleşme veya transesterleşme reaksiyonlarından; etil propionat, izoamil asetat, izobutil asetat gibi kısa ve orta uzunluktaki zincir yapısına sahip, lezzet verici olarak kullanılan esterler, emülgatör olarak kullanılan monoasitgliseroller ve kozmetik sanayiinde kullanılan vaks esterleri gibi pekçok maddenin üretimi için yararlanılır [2].

2.6.1. Enzimatik Esterleşme Reaksiyon Kinetiği

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarının incelendiği bir konudur. Kimyasal kinetiğin temel prensipleri burada da geçerlidir.

3 çeşit enzimatik reaksiyon vardır. Bunlar;

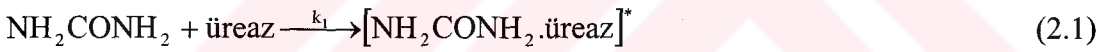
1) Çözünen enzim-çözünmeyen substrat: Çamaşır deterjanlarında bulunan proteaz veya amilaz gibi enzimlerin kullanımı örnek olarak verilebilir. Çözünen enzim çözültüdeyken kan lekesi gibi çözünmeyen substratı parçalar.

2) Çözünmeyen enzim-çözünen substrat: Günümüzde bu tip reaksiyonlara yönelik araştırmalar yapılmaktadır. Aktif enzim gruplarını, katı yüzeylere bağlayarak dolgu yatak reaktörlerine benzer sürekli proses üniteleri geliştirilebilir.

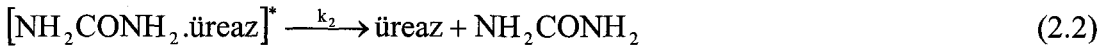
3) Çözünen enzim-çözünen substrat: Bu tip reaksiyonlar sıvı fazda homojen olarak gerçekleşen reaksiyonlardır. Bunlara biyolojik reaksiyonların birçoğu örnek olarak gösterilebilir.

Enzimatik reaksiyon kinetiğinin temel prensiplerini geliştirirken ürenin, üreaz enzimi varlığında amonyak ve karbondioksit bozunma reaksiyonu örnek verilebilir.

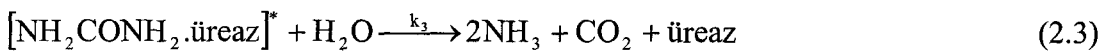
1) Üreaz enzimi substrat olan üre ile reaksiyona girerek enzim-substrat kompleksini (E.S) oluşturur.



2) Bu kompleks üre ve üreaza bozunabilir.



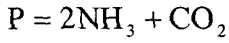
3) Ya da bu kompleks su ile reaksiyona girerek amonyak, karbondioksit ve üreaz verebilir.



Bu mekanizmadan da görüldüğü gibi enzimin bir kısmı üreye bağlanırken diğer bir kısmı ise bağlanmadan serbest kalır. Toplam enzim konsantrasyonu (E_t) (birimi kmol/m^3) kolayca hesaplanabilirken serbest enzim konsantrasyonunu (E) hesaplamak zordur. Yukarıda verilmiş olan (1), (2), (3) reaksiyonları sembollerle gösterilirse



elde edilir. Burada E=Enzim, S=Substrat, E.S=Enzim-Substrat Kompleksi, W=Su, P=Ürün'ü tanımlamaktadır.



Substratın harcanma hız ifadesi, $-r_s$,

$$-r_s = k_1(E)(S) - k_2(E.S) \quad (2.7)$$

Enzim-substrat kompleksinin net oluşma hız ifadesi, $r_{E.S}$,

$$r_{E.S} = k_1(E)(S) - k_2(E.S) - k_3(W)(E.S) \quad (2.8)$$

olarak ifade edilir. Reaksiyon mekanizmasından da anlaşıldığı gibi enzim, reaksiyon boyunca tükenmemektedir. Sistemdeki toplam enzim konsantrasyonu (E_t) sabit kalıp, serbest veya bağlı olmayan enzim konsantrasyonu (E) ile enzim-substrat kompleksinin konsantrasyonunun (E.S) toplamına eşittir.

$$(E_t) = (E) + (E.S) \quad (2.9)$$

(9). denklem yeniden düzenlenirse

$$(E) = (E_t) - (E.S) \quad (2.10)$$

yazılabilir. Bu denklem, denklem (8)'de yerine konur ve enzim kompleksinin hemen tükendiği varsayımıyla $r_{E.S}=0$ 'a eşitlenirse

$$r_{E.S} = 0 = k_1[(E_t) - (E.S)](S) - k_2(E.S) - k_3(E.S)(W) \quad (2.11)$$

yazılabilir. Bu denklemden (E.S) çekilir.

$$(E.S) = \frac{k_1(E_t)(S)}{k_1(S) + k_2 + k_3(W)} \quad (2.12)$$

(10). denklem, substratın harcanma hız ifadesine ($-r_s$) yerleştirilir.

$$-r_s = k_1[(E_t) - (E.S)](S) - k_2(E.S) \quad (2.13)$$

Bu denklemden (11). denklem çıkartılırsa

$$-r_s = k_3(W)(E.S) \quad (2.14)$$

elde edilir. (E.S) bu denklemde yerine konursa

$$-r_s = \frac{k_1 k_3 (W)(E_t)(S)}{k_1(S) + k_2 + k_3(W)} \quad (2.15)$$

hız ifadesi yazılabilir.

Üre ve üreazın reaksiyonu sulu ortamda gerçekleştiği için ortamda aşırı miktarda su bulunmaktadır. Bu sebeple su konsantrasyonunun fazla değişmediği, sabit kabul edilebileceği varsayılır.

$$k'_3 = k_3(W) \text{ ve } K_m = \frac{k'_3 + k_2}{k_1} \text{ olarak kabul edilir ve denklem (15)'in pay ve}$$

paydası k_1 'e bölünürse **Michaelis-Menten Denklemi** elde edilir.

$$-r_s = \frac{k'_3(E_t)(S)}{(S) + K_m} \quad (2.16)$$

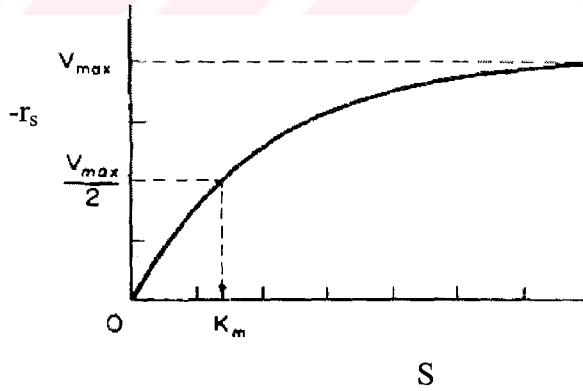
Yukarıdaki denklemde K_m Michaelis sabitidir. Substrat konsantrasyonunun çok yüksek değerlerinde $K_m \ll (S)$ olacağından Michaelis-Menten denklemi; $-r_s = k'_3(E_t)$ haline dönüşecektir. Bu ifade ise

$$V_{\max} = k'_3(E_t) \quad (2.17)$$

olarak tanımlanır. $V_{\max}$ verilen toplam enzim konsantrasyonu için maksimum hız ifadesini temsil eder. $V_{\max}$ ifadesi denklem (16)'da yerine konursa Michaelis-Menten Denklemi bilinen halini alır.

$$-r_s = \frac{V_{\max}(S)}{(S) + K_m} \quad (2.18)$$

Bilinen enzim konsantrasyonu için substratın harcanma hızının substrat konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak çizilen grafiği Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Michaelis-Menten parametrelerinin belirlenmesi

Düşük substrat konsantrasyonlarında ($(S) \ll K_m$);

$$-r_s \cong \frac{V_{\max}(S)}{K_m} \text{ denkleminde eşittir.}$$

Yüksek substrat konsantrasyonlarında ((S)»K_m);

$-r_s \cong V_{\max}$ denklemine eşittir.

$-r_s = \frac{V_{\max}}{2}$ olması durumunda

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}(S_{1/2})}{K_m + (S_{1/2})} \text{ elde edilir.} \quad (2.19)$$

Denklem (19)'un K_m için çözülmesiyle K_m = (S_{1/2}) elde edilir. Bu ifade de Michaelis sabitinin yorumudur. Michaelis sabiti, reaksiyon hızının maksimum hızın yarısına eşit olduğu andaki substrat konsantrasyonuna eşittir.

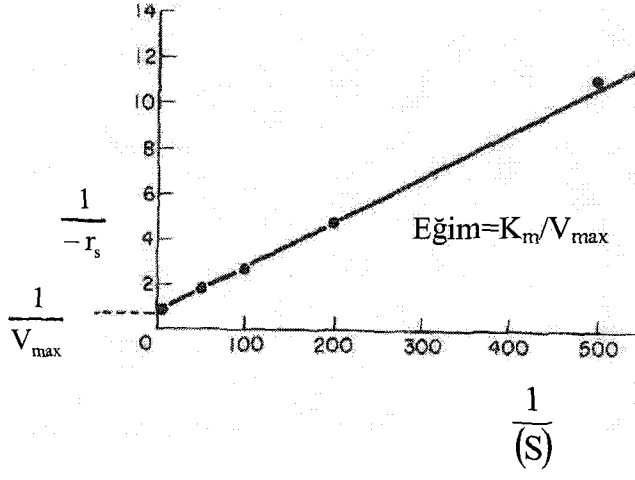
Michaelis-Menten kinetiği ile tanımlanan enzimatik reaksiyonların parametrelerinden V_{max}, toplam enzim konsantrasyonuna bağlı olmasına rağmen K_m toplam enzim konsantrasyonundan bağımsızdır.

V_{max} ve K_m'in saptanmasında kullanılan bir diğer yöntem ise Lineweaver-Burk yöntemidir. Bu yöntemde Michaelis-Menten eşitliği tersine çevrilir.

$$\frac{1}{-r_s} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{(S)} \right) \quad \text{Lineweaver-Burk Eşitliği} \quad (2.20)$$

Bu eşitlik doğru grafiğinin eşitliği olan y=mx+c şeklindedir. x'e karşı y grafiğinin eğimi m, y ekseninin kesim noktası c'dir.

Michaelis-Menten eşitliğine uyan sistemler için 1/(S)'ye karşı 1/-r_s grafiği (Lineweaver-Burk eğrisi) Şekil 2.2'de görülmektedir. Grafik, deneyler substrat derişimi doyurularak yürütülmediğinde bile lineer olabilir ve Şekil 2.2'de görüldüğü gibi K_m ve V_{max} değerleri çizilen grafikten saptanabilir [28,29].



Şekil 2.2. Lineweaver-Burk çizimi

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada bitkisel yağ sanayiinin yan ürünü olan ayçiçek asidik yağının (AAY) n-oktanol (O) ile *Mucor miehei* orijinli immobilize lipaz, Lipozyme TL IM (L) varlığında enzimatik esterleşme reaksiyonu farklı koşullarda incelenmiş ve reaksiyonun kinetik parametreleri belirlenmiştir.

Deneysel çalışma iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

1. Ayçiçek asidik yağının n-oktanol ile enzimatik esterleşme reaksiyonunda farklı enzim miktarları, sıcaklık ve toplam yağ asidi/n-oktanol (TYA:O) mol oranlarının etkilerinin incelenmesi.
2. Ayçiçek asidik yağının n-oktanol ile enzimatik esterleşme reaksiyonunun kinetik parametrelerinin belirlenmesi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan ayçiçek asidik yağı Kırılancı Yağ Fabrikasından sağlanmıştır. Ayçiçek asidik yağının esterleşme reaksiyonlarında *Mucor miehei* orijinli immobilize lipaz Lipozyme TL IM mikrobiyal lipazı kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan lipaz, Novo Nordisk A/S (Danimarka) firması tarafından sağlanmıştır. İçesterleşme reaksiyonlarında 1,3 pozisyon seçiciliği gösteren ve 30-70°C sıcaklık aralığında çalışılan bu lipazın, yüksek oranda oleik asit içeren ayçiçek yağı ve dekanolik asidin asidolizi yoluyla belirlenmiş aktivite değeri 5-6 BAUN (Batch Acidolysis Units Novo)/g'dır. Kullanılan immobilize enzim % 2-3 oranında su içeriğine sahiptir [30]. Kullanılan diğer kimyasal maddeler yüksek saflıkta ticari ürünlerdir.

3.2. Reaktan ve Ürün Karakterizasyonu

3.2.1. Ayçiçek Asidik Yağının Karakterizasyonu

Ayçiçek asidik yağının yoğunluğu, asit değeri, sabunlaşma değeri, sabunlaşmayan madde miktarı standart yağ analiz yöntemleri ile belirlenmiştir [31]. Bu özellikler Tablo 3.1’de verilmiştir. Asidik yağın İnce Yüzey Kromatografi-Alev İyonizasyon Dedektör (TLC-FID) kombine sistemi olan İatroscan TH 10 cihazı ile yapılan analizi sonucunda ağırlık %’si olarak % 33.11 triaçilgliserol (TAG), % 7.18 diaçilgliserol (DAG), % 59.71 serbest yağ asidi (FFA) içerdiği belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Ayçiçek asidik yağının özellikleri

Özellikler	Değer
Yoğunluk (kg/m ³)	323
Sabunlaşma Değeri (mg KOH/g)	175.26
Asit Değeri (mg KOH/g)	105
Sabunlaşmayan Madde Miktarı (% Ağırlık)	2.25

Ayçiçek asidik yağının yağ asidi bileşimi, Hewlett-Packard 5890 II gaz kromatografi cihazı kullanılarak belirlenmiştir [32]. Uygulanan kromatografik analiz sonuçları Tablo 3.2’de, ayçiçek yağının yağ asitleri bileşimi ise Tablo 3.3’te verilmiştir.

Tablo 3.2. Gaz kromatografisi analiz koşulları

Dedektör Tipi	FID
Dedektör Sıcaklığı (°C)	280
Enjektör Tipi	Dağıtmalı
Enjektör Sıcaklığı (°C)	250
Gaz Hızları (mL/dak)	
Taşıyıcı Gaz (N ₂)	4.5
Hidrojen	30
Hava	400
Dağıtma Oranı	88:1
Fırın Sıcaklığı (°C)	170 (5dak) 170-300 (10°C/dak) 300 (10dak)
Kolon Tipi	Kapiler Kolon Ultra 1 ⁽¹⁾

(1) 25m*0.32mm, 0.52µ kalınlığında % 100 dimetil polisiloksan

Tablo 3.3. Ayçiçek asidik yağının toplam yağ asidi bileşimi

Yağ Asitleri	% Ağırlık
14:0 (Miristik Asit)	0.17
16:0 (Palmitik Asit)	9.7
16:1 (Palmitoleik Asit)	0.45
18:0 (Stearik Asit)	4.61
18:1 (Oleik Asit)	21.51
18:2 (Linoleik Asit)	52.81
20:0 (Araşidik Asit)	0.86
20:1 (Gadoleik Asit)	0.46
20:4 (Araşidonik Asit)	0.43
22:0 (Behenik Asit)	1.0
24:0 (Lignoserik Asit)	1.41
Diğer	6.59
Σ Doymuşlar	17.75
Σ Doymamışlar	75.66

3.2.2. Ester Karakterizasyonu

Enzimatik esterleşme reaksiyonu ile elde edilen ester örnekleri TLC-FID sistemi ile analiz edilmiştir. Analiz işleminde yürütücü birinci sistem olarak benzen:kloroform:asetik asit (hacmen 50:20:0.7) ve ikinci sistem olarak da benzen:n-hekzan (hacmen 35:35) ikili sistemi kullanılmıştır. Ürün bileşenlerinin yürütülmesi için rodlar, 23 dakika birinci sistemde bekletildikten sonra çözücülerin giderilmesi için 60°C'lık etüve konulmuştur. Etüvde ~5 dakika bekletilen rodlar daha sonra ikinci sisteme alınmıştır. İkinci sistemde 30 dakika bekletilen rodların çözücüleri tekrar 60°C'lık etüvde 7 dakika tutularak giderilmiştir. Örneklerin TLC-FID sistemindeki analizi için hidrojen gazı debisi 160mL/dak, hava debisi 2200mL/dak ve tarama hızı 30s/tarama olarak seçilmiştir. Bu koşullar altında çalışılarak reaksiyon ürünlerinin içerdiği ester veya yağ asidi esteri (FAE), TAG, DAG, MAG ve FFA (serbest yağ asidi) miktarları ağırlık yüzdesi olarak belirlenmiştir.

3.3. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonu

Enzimatik esterleşme reaksiyonları, sıcaklığın $\pm 1^{\circ}\text{C}$ hassasiyetle kontrol edildiği manyetik karıştırıcı (Frame-Geratetechnik M22/1 5655) üzerinde bulunan su banyosu içine yerleştirilmiş 50mL hacimli dibi yuvarlak cam bir balonda gerçekleştirilmiştir. Karıştırma hızı reaksiyon boyunca 800dev/dak olarak sabit tutulmuştur.

Enzimatik esterleşme reaksiyonu için belirli oranlarda ayçiçek asidik yağı ve n-oktanol ile 25mL n-hekzan (H) reaksiyon balonuna yerleştirilerek ısıtılmıştır. Sistem çalışılacak sıcaklığa ulaştığında yağ ağırlığının %'sine göre tartılan miktarda enzim ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Belirli zaman aralıklarında santrifüj tüplerine alınan örnekler (~1mL) 90°C sıcaklıktaki su banyosunda 15 dakika bekletilerek enzim inaktive edilmiştir. Sonraki aşamada üzerlerine 2 mL su ve 5 mL n-hekzan ilave edilmiş numuneler santrifüjlenerek yağ ve su fazına ayrılmıştır. Pastör pipetleriyle ayrı şişelere alınan n-hekzan içindeki yağ fazını kurutmak için susuz Na_2SO_4 ilave edilmiştir. Bu şekilde kurutulan numuneler üzerine 2mL n-hekzan eklendikten sonra bileşimlerini belirlemek üzere analizleri Bölüm 3.2.2'de anlatılan yöntem uyarınca gerçekleştirilmiştir.

3.4. Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Farklı enzim miktarlarında gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar, zamana karşılık ester miktarı grafiğe geçirilmiştir. Bu grafiklerin başlangıcında doğru davranışı gösteren noktalarından yola çıkılarak reaksiyonlar için ilk hızlar belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen ilk hızlar enzim miktarına karşı çizilerek Michaelis-Menten kinetiğine uyup uymadığı belirlenmiştir. Reaksiyonların Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğu saptandıktan sonra farklı koşullarda gerçekleştirilen deneylerde elde edilen sonuçlar Polymath hazır paket programı kullanılarak Michaelis-Menten kinetik parametreleri hesaplanmıştır.



4. DENEYSEL SONUÇLAR ve DEĞERLENDİRİLMESİ

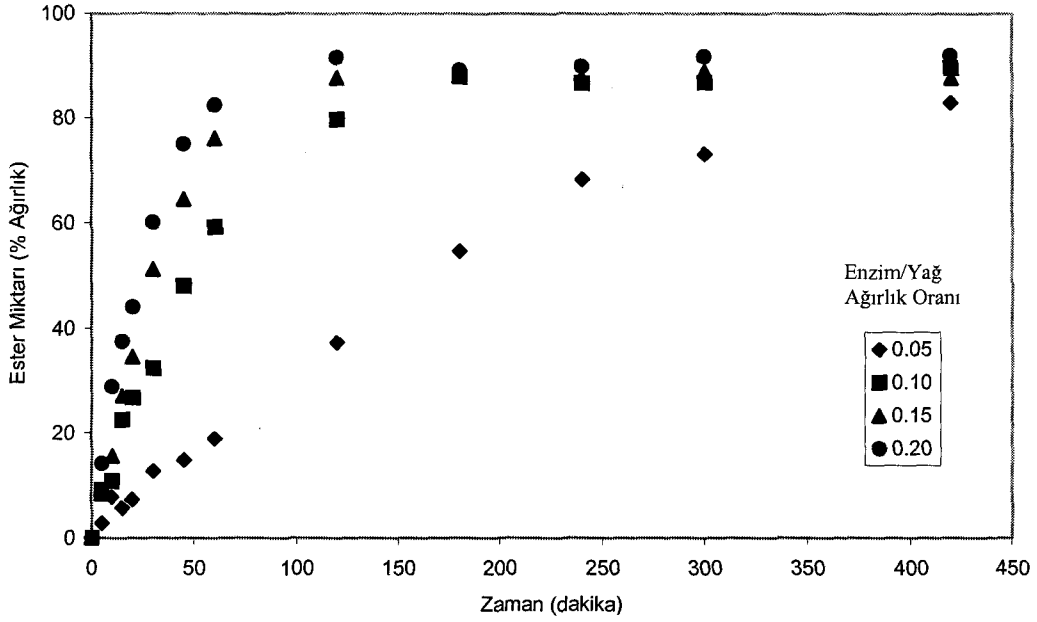
4.1. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonuna Enzim Miktarının Etkisi

Optimum enzim miktarının belirlenmesi amacıyla 40°C'ta, 1:1 TYA:O mol oranında ve kullanılan yağ miktarının (5g) % 5, % 10, % 15, % 20'si olmak üzere dört farklı enzim miktarlarında yürütülen reaksiyonlardan elde edilen ester içerikleri Tablo 4.1'de, ürün bileşimlerinin zamana göre değişimi Tablo A.1-A.3, A.6'da verilmiş, ester miktarının zamana göre değişimi ise karşılaştırmalı olarak Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Farklı enzim miktarlarında gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonlarından elde edilen esterlerin ağırlık %'si olarak zamana göre değişimi (Yağ miktarı 5g, TYA:O 1:1, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).

Zaman (dakika)	Enzim/Yağ Ağırlık Oranı			
	0.05	0.10	0.15	0.20
0	0	0	0	0
5	2.81	9.11	8.39	14.13
10	7.75	10.82	15.65	28.82
15	5.78	22.55	27.13	37.50
20	7.30	26.84	34.61	44.09
30	12.67	32.38	51.32	60.17
45	14.77	48.13	64.53	75.04
60	18.89	59.31	76.17	82.49
120	37.29	79.76	87.75	91.56
180	54.67	88.00	88.69	89.21
240	68.36	86.69	87.83	89.94
300	73.12	86.88	88.92	91.70
420	83.00	89.65	87.72	91.98
1440	88.36	88.00	88.39	89.83

Tablo 4.1'deki sonuçlar incelendiğinde enzim/yağ ağırlık oranı arttıkça reaksiyonun hızlı gerçekleştiği ve daha kısa sürede yüksek ester içeriğine ulaşıldığı görülmüştür. Enzim/yağ ağırlık oranı 0.20 olduğunda, 45 dakikada ulaşılan ester miktarına, enzim/yağ ağırlık oranı 0.05, 0.10 ve 0.15 olduğu durumda sırasıyla 300, 120 ve 60 dakikada ulaşılmıştır. Enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, 0.15 ve 0.20 iken 180 dakikalık reaksiyon sonunda elde edilen ester miktarları hemen hemen aynıdır. Enzimlerin uzun teknolojik işlemler sonucu elde edildikleri ve pahalı katalizörler oldukları göz önünde bulundurulursa ekonomik açıdan en uygun enzim/yağ ağırlık oranının 0.10 olması düşünülmüş, bundan sonraki reaksiyonlarda enzim/yağ ağırlık oranı bu düzeyde tutulmuştur.



Şekil 4.1. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda farklı enzim/yağ ağırlık oranları için ester miktarının zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA/O mol oranı 1:1, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).

4.2. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonuna Sürenin Etkisi

Bu çalışmada yürütülen esterleşme reaksiyonuna sürenin etkisi, Tablo 4.1’de verilen ve enzim/yağ ağırlık oranı 0.10 ve 0.15 olan deneylerin sonuçları incelenerek belirlenmiştir. 24 saat boyunca belirli aralıklarla alınan örneklerin sonuçları incelendiğinde reaksiyonun 180 dakika içinde hızla ilerlediği fakat daha sonra dönüşmenin hemen hemen sabit kaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak, reaksiyonun yürüyüşünü daha iyi izleyebilmek ve kinetik parametrelerin hesaplanmasında daha çok veri kullanıp daha doğru sonuçlar alabilmek için bu aşamadan sonraki reaksiyonlar, sık aralıklarla örnek alınarak 180 dakika yürütülmüştür.

4.3. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonuna Sıcaklığın Etkisi

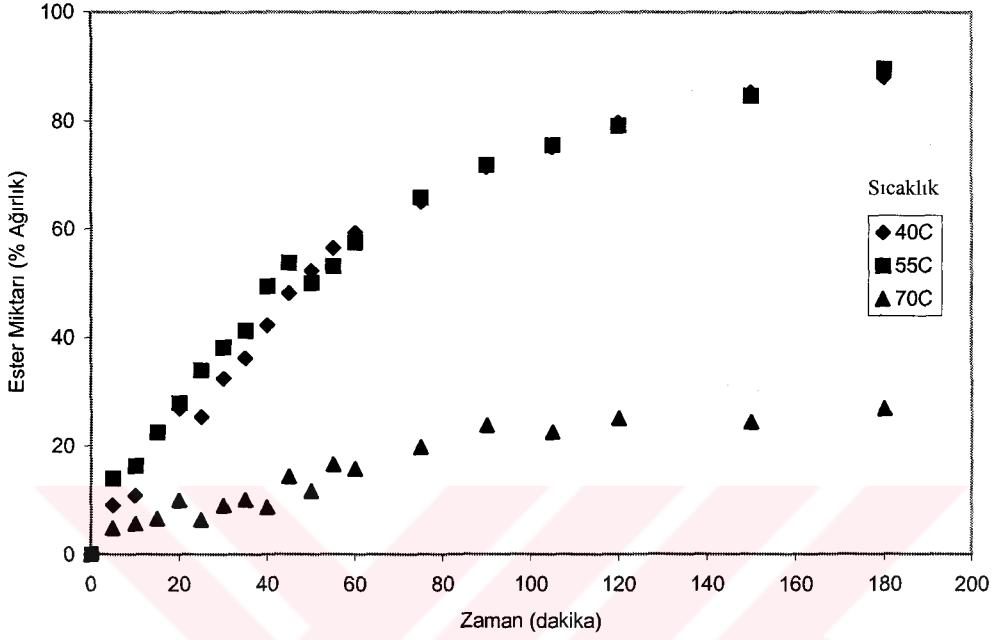
Bölüm 2.5'te de bahsedildiği gibi sıcaklık, enzim aktivitesi üzerine etki eden faktörlerden biridir. Bu faktör göz önünde bulundurularak bu bölümde sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Esterleşme reaksiyonunda kullanılan Lipozyme TL IM immobilize lipazının Bölüm 3.1'de de belirtildiği gibi çalışma aralığı 30-70°C'tir. Daha önce yapılan, petrol eterinin çözücü olarak kullanıldığı çalışmalarda da *Mucor miehei* orijinli lipazın çalışma aralığı 40-70°C olarak saptanmıştır [8]. Organik çözücü olarak hekzanın kullanıldığı bu çalışmada sıcaklığın reaksiyon üzerindeki etkisini görmek amacıyla 1:1 TYA:O mol ve 0.10 enzim/yağ ağırlık oranında gerçekleştirilen reaksiyonlarda sıcaklık 40°C, 55°C ve 70°C olarak değiştirilmiştir. Bu reaksiyonlar sonucunda elde edilen ürünlerin ester içerikleri Tablo 4.2'de, ürün bileşimlerinin zamana göre değişimi Tablo A.4-A.6'da verilmiş, ester miktarının zamana göre değişimi ise karşılaştırmalı olarak Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonlarından elde edilen esterlerin ağırlık %'si olarak zamana göre değişimi (Yağ miktarı 5g, TYA:O 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, n-hekzan 25mL).

Zaman (dakika)	Sıcaklık (°C)		
	40	55	70
0	0	0	0
5	9.11	13.98	4.81
10	10.82	16.33	5.67
15	22.55	22.55	6.58
20	26.84	27.97	10.04
25	25.30	33.95	6.42
30	32.38	38.17	9.09
35	36.22	41.32	10.16
40	42.22	49.37	8.72
45	48.13	53.81	14.41
50	52.25	49.96	11.73
55	56.46	53.21	16.68
60	59.31	57.54	15.83
75	65.11	65.92	19.76
90	71.47	71.91	23.84
105	75.10	75.56	22.50
120	79.76	79.13	25.09
150	85.32	84.66	24.40
180	88.00	89.62	26.88

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi 70°C'ta gerçekleştirilen deneyde elde edilen ester miktarında reaksiyon süresince çok yavaş artış olduğu belirlenmiştir. Yüksek ürün elde edilen 3 saat sonunda dahi ester ağırlık yüzdesi ancak % 26.88'e ulaşabilmiştir. Buna neden olarak hekzanın çözücü olarak kullanılmasında da Lipozyme TL IM'nin kaynaklarda diğer organik çözücüler için rapor edildiği gibi 70°C'ta aktivitesini kaybetmesi gösterilebilir. 40°C ve 55°C sıcaklıklarda yürütülen deneyler incelendiğinde sonuçların birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. 55°C'ta gerçekleştirilen deneyde elde edilen ester ağırlık %'si ilk 50 dakika için 40°C'ta yürütülen deneyin sonuçlarına kıyasla biraz daha yüksek olmasına karşın bu

süre sonrasında her iki sıcaklık için de birbirine çok yakın değerler elde edildiği Şekil 4.2’den görülebilmektedir. Bu nedenle enerji maliyeti de göz önünde bulundurularak bu çalışmada sıcaklık için uygun reaksiyon koşulu olarak 40°C seçilmiştir.



Şekil 4.2. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda farklı sıcaklıklar için ester miktarının zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA/O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, n-hekzan:25mL).

4.4. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonuna Toplam Yağ Asidi/n-oktanol Mol Oranının Etkisi

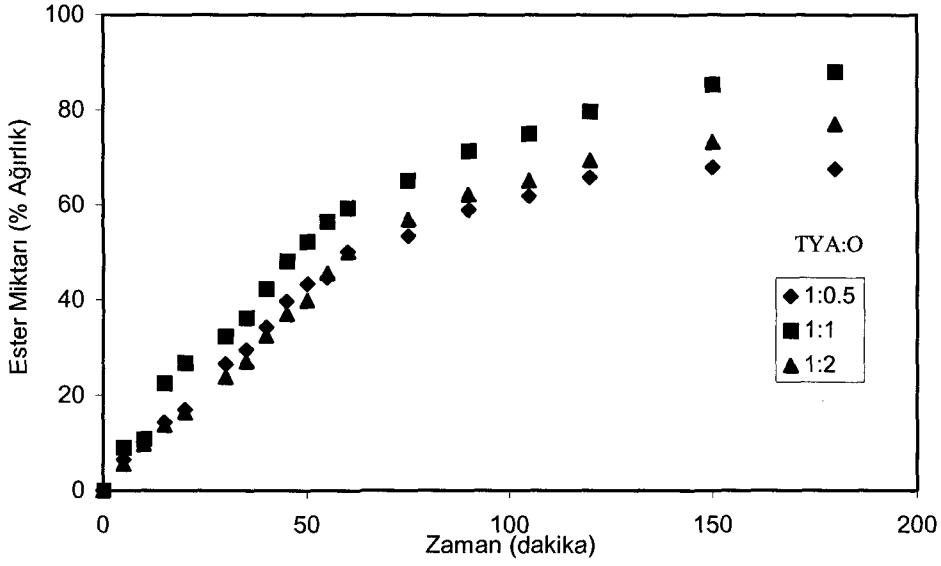
Bu bölümde TYA/O mol oranının etkisi 2 farklı koşulda incelenmiştir. İlk durumda AAY 5g, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, sıcaklık 40°C ve TYA/O mol oranı 1:0.5, 1:1, 1:2 olarak alınmıştır. Bu reaksiyonlar sonunda elde edilen ürünlerin ester içerikleri Tablo 4.3’te, ürün bileşimlerinin zamana göre değişimi Tablo A.6-A.8’de verilmiş, ester miktarının zamana göre değişimi ise karşılaştırmalı olarak Şekil 4.3’te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Farklı TYA/O mol oranlarında gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonlarından elde edilen esterlerin ağırlık %'si olarak zamana göre değişimi (Yağ miktarı 5g, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).

Zaman (dakika)	TYA/O		
	1:0.5	1:1	1:2
0	0	0	0
5	6.52	9.11	5.66
10	9.85	10.82	9.75
15	14.33	22.55	13.78
20	17.06	26.84	16.49
30	26.53	32.38	23.89
35	29.58	36.22	27.17
40	34.29	42.22	32.54
45	39.68	48.13	37.08
50	43.38	52.25	39.87
55	44.66	56.46	45.70
60	50.03	59.31	50.03
75	53.40	65.11	56.93
90	58.87	71.47	62.08
105	61.93	75.10	65.04
120	65.72	79.76	69.46
150	67.93	85.32	73.29
180	67.51	88.00	76.99

Tablo 4.3 ve Şekil 4.3'ten, TYA/O mol oranı 1:1 olduğunda ilk 10 dakikada reaksiyonun, 1:0.5 ve 1:2 mol oranlarına göre daha hızlı olduğu daha sonra ise hemen hemen artışın paralel gittiği görülebilir. Denenen TYA/O mol oranlarında en yüksek ester yüzdesi 1:1 oranında % 88 olarak elde edilmiştir. 1:0.5 TYA/O mol oranı kullanıldığında 3 saat sonunda elde edilen düşük ester miktarının n-oktanolün esterleşme reaksiyonu için yeterli miktarda olmadığından kaynaklandığı düşünülmektedir. 1:2 TYA/O mol oranı ile esterleşme reaksiyonu gerçekleştirildiğinde, reaksiyon sonunda elde edilen düşük ester miktarı ise, ortamdaki alkol miktarının kullanılan immobilize enzimin stabilitesini sağlayan gerekli su tabakasını bozacak kadar fazla olması ve bundan dolayı enzimin

aktivesinin azalması ile açıklanabilir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun TYA/O mol oranı 1:1 olarak seçilmiştir.



Şekil 4.3. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda farklı TYA/O mol oranları için ester miktarının zamana göre değişimi (AAY 5g, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, Sıcaklık 40°C ve n-hekzan 25mL).

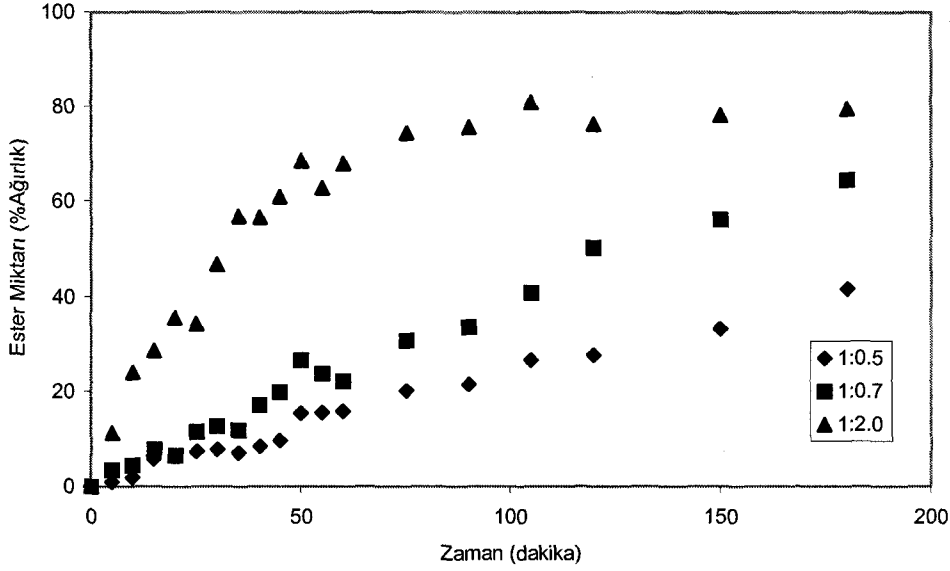
İkinci durumda ise n-oktanol 2.84 mL, Lipozyme TL IM 0.5 g, sıcaklık 40°C, TYA/O mol oranı ise 1:0.5, 1:0.7, 1:2 olarak alınmıştır. Bu aşamada yağ miktarı ve enzim/yağ ağırlık oranları sırasıyla; 10g ve % 5, 7.5g ve % 6.67, 2.5g ve % 20'dir. Bu reaksiyonların sonunda elde edilen ürünlerin ester içerikleri Tablo 4.4'te, ürün bileşimlerinin zamana göre değişimi Tablo A.9 verilmiş, ester miktarının zamana göre değişimi ise karşılaştırmalı olarak Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Farklı TYA/O mol oranlarında gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonlarından elde edilen esterlerin ağırlık %'si olarak zamana göre değişimi (Alkol miktarı 2.84mL, Enzim miktarı 0.5g, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).

Zaman (dakika)	TYA/O		
	1:0.5	1:0.7	1:2
0	0	0	0
5	0.94	3.50	11.31
10	1.91	4.41	24.16
15	5.75	7.84	28.68
20	6.59	6.62	35.63
25	7.47	11.57	34.30
30	7.80	12.78	46.88
35	7.17	11.94	56.98
40	8.50	17.19	56.68
45	9.64	19.96	60.99
50	15.53	26.59	68.51
55	15.61	23.85	62.86
60	15.85	22.27	68.01
75	20.24	30.80	74.45
90	21.52	33.61	75.70
105	26.60	40.86	80.84
120	27.67	50.36	76.33
150	33.20	56.22	78.15
180	41.74	64.48	79.54

Tablo 4.4'ten de görüldüğü gibi 3 saat sonunda en yüksek ester miktarı 1:2 TYA/O mol oranında elde edilmiştir. TYA/O mol oranının 1:2 düzeyinde tutulduğu reaksiyonda 35 dakikada ulaşılan ester miktarına, TYA/O mol oranının düşmesi durumunda (TYA:O =1:0.7) yaklaşık 150 dakikada ulaşılmıştır. TYA/O oranın 1:0.5 olduğu deney sonuçları incelendiğinde ise belirtilen ester miktarının 3 saatlik süre sonunda elde edilemediği gözlemlenmiştir. Tablo 4.3'teki sonuçlarla kıyaslandığında hemen hemen aynı TYA/O mol oranında deneyler gerçekleştirildiği halde 2. durumda daha düşük sonuçlar alındığı görülmektedir. Buna sebep olarak 2. durumda yağ miktarının değişken, enzim ile alkol miktarının sabit tutulması ve bu koşullarda

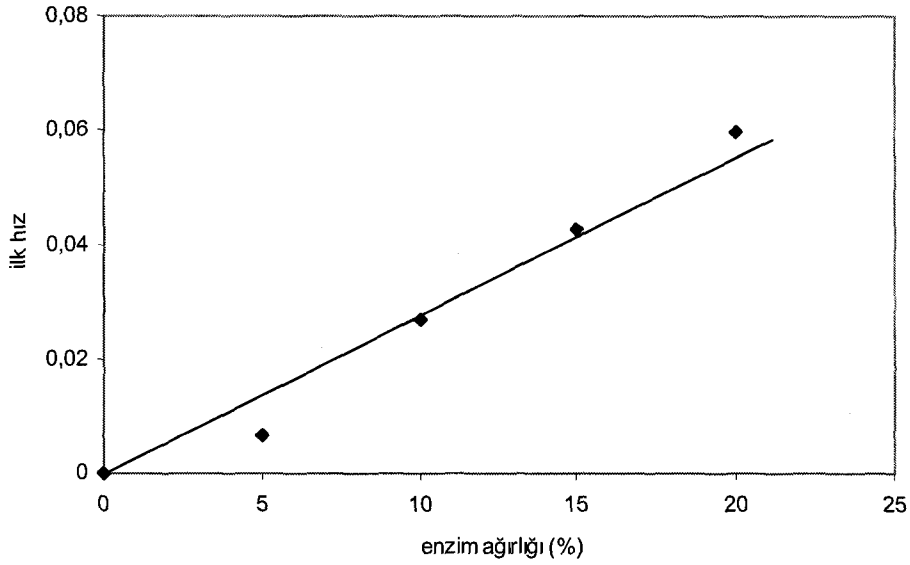
enzimin miktarının az olması nedeniyle enzimin substratla yeterli derecede kompleks oluşturamayıp istenilen dönüşmenin elde edilememesi gösterilebilir.



Şekil 4.4. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda farklı TYA/O mol oranları için ester miktarının zamana göre değişimi (n-oktanol 2.84mL, Enzim miktarı 0.5g, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).

4.5. Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşme Reaksiyonunun Kinetik Çalışması

Deneyler sonucunda elde edilen verilerin Michaelis-Menten kinetiğine uyup uymadığı, farklı enzim ağırlığı ile yürütülen reaksiyonlardan hesaplanan ilk hızların, Şekil 4.5'te gösterildiği gibi enzim ağırlığına karşı grafiğinin çizilmesi ile gösterilmiştir. Şekilden de görülebileceği gibi % 5 ve % 20 enzimle gerçekleştirilen reaksiyonlarda elde edilen ilk hız değerleri sırasıyla şekilde çizilen doğrunun altında ve üstünde yer almaktadır. Bu sapmanın ilk hızların hesaplanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.5. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ilk hızların enzim ağırlığına (%) göre değişimi (Yağ miktarı 5g, TYA:O 1:1, Sıcaklık 40°C, n-hekzan 25mL).

Şekil 4.5'ten de görülebileceği gibi doğrusallıktan sapmaların hesaplama hatalarından kaynaklandığı göz önünde bulundurularak bu çalışmada yürütülen deneylerin Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu söylenebilir. Ramamurthi ve çalışma arkadaşının, *Candida antarctica* orijinli Randozyme SP-435 varlığında gerçekleştirdikleri oleik asit ile metanol arasındaki enzimatik esterleşme kinetiğini inceledikleri çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir [33].

Bu sonuçtan yola çıkılarak Tablo 4.5'te bu çalışmada gerçekleştirilen deneyler sonucunda Bölüm 3.4'te anlatıldığı şekilde hesaplanan Michaelis-Menten sabitleri (K_m) verilmiştir. Deneyler sonucunda hesaplanan Michaelis-Menten sabitlerinin daha iyi kıyaslanabilmesi için Tablo 4.5'te deney koşulları da gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunun deney koşulları ve hesaplanan kinetik parametreleri.

Deneyler No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
AAV (g)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	2.5	7.5	10.0
O (mL)	2.84	2.84	2.84	2.84	2.84	2.84	1.42	5.69	2.84	2.84	2.84
L (g)	0.75	0.25	1.00	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
T (°C)	40	40	40	70	55	40	40	40	40	40	40
TYA:O	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:0.5	1:2	1:2.0	1:0.7	1:0.5
L:AAV (%)	15	5	20	10	10	10	10	10	20	6.67	5
K _m (mol/mL)×10 ³	0.51	0.98	1.93	102.00	7.49	6.05	8.00	1.74	102.00	0.13	102.00

Tablo 4.5'ten de görüldüğü gibi en yüksek K_m değeri deney 4, 9 ve 11'de elde edilmiştir. Bu sonuçlar K_m 'in tanımıyla incelenebilir. Bölüm 2.6.1'de de belirtildiği

gibi $K_m = \frac{k_3 + k_2}{k_1}$ olarak tanımlanmaktadır. Bu eşitliğe göre yüksek K_m değerleri,

enzim ve substrat arasındaki ilginin zayıf olduğunu gösterir. Enzimin substratı etkin şekilde bağlaması için yüksek substrat konsatrasyonu gereklidir. Deney 1, 2, 3, 8 ve 10'da ise düşük K_m değerleri elde edilmiştir. K_m 'in düşük değerde olması enzim ve substrat arasında güçlü ilgi olduğunu belirtir. Düşük miktarda substrat enzim için yeterlidir. Deney 5, 6 ve 7'de K_m değerleri birbirine çok yakındır. Deney 6'nın koşulları bu çalışmada en uygun koşullar olarak saptanmıştır ve K_m değeri de 6.05×10^{-3} mol/mL olarak belirlenmiştir.



5. VARGILAR

Bu çalışmada, ayçiçek asidik yağının, Lipozyme TL IM lipazı varlığında n-oktanol ile enzimatik esterleşme reaksiyonu farklı reaksiyon koşullarında incelenmiş ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

1. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonun süresi 3 saat, çalışma sıcaklığı 40°C, TYA:O mol oranı 1:1 olarak belirlenmiştir. Bu reaksiyonda kullanılacak Lipozyme TL IM miktarı AAY miktarının % 10'u olarak saptanmıştır.
2. Bu enzimatik esterleşme reaksiyonunun Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu gösterilmiştir.
3. Optimum deney koşulu olarak seçilen deney koşullarında $K_m = 6.05 \times 10^3$ mol/mL olarak elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] **Ghosh, S., Bhattacharyya, D.K.**, 1995. Utilization of Acid Oils in Making Valuable Fatty Products by Microbial Lipase Technology, *JAACS*, **72**, 1541-1544.
- [2] **Mukherjee, K.D.**, 1990. Lipase-Catalyzed Reactions for Modification of Fats and Other Lipids, *Biocatalysis*, **3**, 277-293.
- [3] **Ducret, A., Giroux, A., Trani, M., Lortie, R.**, 1996. Characterization of Enzymatically Prepared Biosurfactants, *JAACS*, **73**, 109-113.
- [4] **Swern, D.**, 1979. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 4th Ed., **Vol 1**, pp. 100-102, Interscience Publishers a Division of John Wiley and Sons Inc., New York.
- [5] **Kirk, R.E. and Othmer, D.F.**, 1965. Encyclopedia of Chemical Technology, 2nd Ed., **Vol 8**, pp. 312-362, Interscience Publishers a Division of John Wiley and Sons Inc., New York.
- [6] **Kirk, R.E. and Othmer, D.F.**, 1980. Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd Ed., **Vol 9**, pp. 291-327, Interscience Publishers a Division of John Wiley and Sons Inc., New York.
- [7] **Swern, D.**, 1979. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 4th Ed., **Vol 2**, pp. 97-127, Interscience Publishers a Division of John Wiley and Sons Inc., New York.
- [8] **Mittelbach, M.**, 1990. Lipase Catalyzed Alcoholysis of Sunflower Oil, *JAACS*, **67**, 168-170.
- [9] **Deuel, H.J.J.**, 1951. The Lipids, Their Chemistry and Biochemistry, **Vol. 1**, pp. 276-281, Interscience Publishers Inc., New York.
- [10] **Marangoni, A.G., Rousseau, D.**, 1995. Engineering Triacylglycerols: The Role of Interesterification, *Trends in Food Science&Technology*, **6**, 329-335.
- [11] **Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ.**, 2000. Biyokimya, Aktif Yayinevi, İstanbul.
- [12] **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry** 5th ed., 1987. **Vol A9**, pp. 345-349, 565-583, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- [13] **Chaplin, M.F. ve Bucke, C.**, 1990. Enzyme Technology, Cambridge University Press, London.
- [14] **Bonnet, C., Andreescu, S., Marty, J.**, 2003. Adsorption: An Easy and Efficient Immobilization of Acetylcholinesterase on Screen-printed Electrodes, *Analytica Chimica Acta*, **481**, 209-211.

- [15] **Gerhartz, W.**, 1990. Enzymes in Industry-Production and Applications, VCH, Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- [16] <http://hexane.chem.uiuc.edu/cyberprof/public/chemistry/102x/Lecture/lect30c.html>
- [17] **Yahya, A.R.M., Anderson, W.A., Moo-Young, M.**, 1998. Ester Synthesis in Lipase-Catalyzed Reactions, *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, 438-450.
- [18] **Schmid, R.D., Verger, R.**, 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 1608-1633.
- [19] **Gandhi, N.N.**, 1997. Applications of Lipase, *JAOCs*, **74**, 621-634.
- [20] **De, B.K., Chatterjee, T., Bhattacharyya, D.K.**, 1999. Synthesis of Geranyl and Citronellyl Esters of Coconut Oil Fatty Acids Through Alcoholysis by Rhizomucor Miehei Lipase Catalysis, *JAOCs*, **76**, 1501-1504.
- [21] **Linko, Y.Y., Lämsä, M., Huhtala, A., Rantanen, O.**, 1995. Lipase Biocatalysis in the Production of Esters, *JAOCs*, **72**, 1293-1299.
- [22] **Castro, H.F., Pereira, E.B., Anderson, W.A.**, 1996. Production of Terpene Ester by Lipase in Non-Conventional Media, *J.Braz.Chem.Soc.*, **7**, 219-224.
- [23] **Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S., Delorme, P., Willemot, R.M.**, 1990. Kinetic Study of Esterification by Immobilized Lipase in n-Hexane, *FEBS Letters*, **276**, (1,2) 181-184.
- [24] **Selmi, B., Thomas, D.**, 1998. Immobilized Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Sunflower Oil in a Solvent-Free Medium, *JAOCs*, **75**, 691-695.
- [25] **Sandoval, G., Condoret, J.S., Monsan, P., Marty, A.**, 2002. Esterification by Immobilized Lipase in Solvent-Free Media: Kinetic and Thermodynamic Arguments, *Biotechnology and Bioengineering*, **78**, 313-320.
- [26] **Gubicza, L., Kabiri-Badr, A., Keoves, E., Belafi-Bako, K.**, 2000. Large-Scale Enzymatic Production of Natural Flavour Esters in Organic Solvent with Continuous Water Removal, *Journal of Biotechnology*, **84**, 193-196.
- [27] **Arcos, J.A., Garcia, H.S., Hill, C.G.**, 2000. Continuous Enzymatic Esterification of Glycerol with (Poly)Unsaturated Fatty Acids in a Packed-Bed Reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, **68**, 563-570.
- [28] **Fogler, H.S.**, 1999. Elements of Chemical Reaction Engineering, 3rd Ed., Prentice Hall International, Inc., New Jersey.
- [29] **Palmer, T.**, 1994. Enzim Bilgisi, Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, İstanbul.
- [30] **Novo Nordisk Firması**, Web Sitesi, [www.novo.dk/enzymes/what are.htm](http://www.novo.dk/enzymes/what%20are.htm).
- [31] **Cocks, L.V., Van, R.C.**, 1966 . Laboratory Handbook of Oil and Fat Analysis, Academic Press, New York.

- [32] **Sampling and Analysis of Fats and Oils**, 1973. *Am. Oil Chem. Soc.*, Official Method Ce 2-66.
- [33] **Ramamurthi, S., McCurdy, A.R.**, 1994. Lipase-Catalyzed Esterification of Oleic Acid and Methanol in Hexane-A Kinetic Study, *JAOCS*, **71**, 927-930.



EK A

Tablo A.1. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAV 5g, TYA:O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.15, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).

Deney 1	ÜRÜN BİLEŞİMİ (% AĞIRLIK)					
Zaman (Dakika)	Sabunlaşmayan Madde	FAE	TAG	FFA	DAG	MAG
0.5	-	-	28.39	47.86	23.76	-
5	2.12	8.39	21.81	45.12	20.57	1.99
10	2.36	15.65	16.36	41.71	21.78	2.14
15	1.98	27.13	12.25	39.26	19.38	-
20	1.99	34.61	8.27	33.46	19.55	2.11
30	-	51.32	5.61	24.85	18.22	-
45	2.19	64.53	3.11	16.50	13.67	-
60	-	76.17	-	12.81	11.02	-
120	-	87.75	-	6.51	5.74	-
180	1.52	88.69	-	6.55	3.25	-
240	1.72	87.83	-	6.18	4.28	-
300	1.90	88.92	-	5.45	3.74	-
420	2.16	87.72	-	6.13	4.00	-
1440	1.55	88.39	-	6.30	3.75	-

Tablo A.2. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.05, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).

Deney 2	ÜRÜN BİLEŞİMİ (% AĞIRLIK)					
Zaman (Dakika)	Sabunlaşmayan Madde	FAE	TAG	FFA	DAG	MAG
0.5	2.23	-	27.39	48.66	19.80	1.93
5	2.06	2.81	28.04	48.45	18.64	-
10	2.46	7.75	25.04	46.72	18.03	-
15	2.33	5.78	23.82	50.23	17.83	-
20	2.36	7.30	21.87	47.90	18.05	1.52
30	2.40	12.67	20.29	44.60	18.01	2.02
45	2.19	14.77	20.37	43.63	19.04	-
60	2.59	18.89	16.02	42.97	19.52	-
120	2.15	37.29	9.76	30.81	18.17	1.82
180	2.07	54.67	5.98	20.80	16.49	-
240	-	68.36	3.63	14.18	13.84	-
300	-	73.12	2.62	11.62	12.64	-
420	-	83.00	2.01	6.78	8.21	-
1440	-	88.36	-	7.02	3.93	-

Tablo A.3. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.20, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).

Deney 3	ÜRÜN BİLEŞİMİ (% AĞIRLIK)					
Zaman (Dakika)	Sabunlaşmayan Madde	FAE	TAG	FFA	DAG	MAG
0.5	-	-	27.17	47.95	22.43	2.46
5	1.56	14.13	18.30	46.05	18.61	1.35
10	3.15	28.82	11.20	33.98	20.48	2.37
15	2.51	37.50	8.43	31.90	17.78	1.88
20	2.04	44.09	5.84	28.30	17.94	1.80
30	2.14	60.17	3.62	17.35	15.04	1.67
45	1.62	75.04	2.12	10.84	10.37	-
60	2.20	82.49	-	7.55	7.77	-
120	1.18	91.56	-	4.29	2.97	-
180	1.65	89.21	-	5.87	3.27	-
240	-	89.94	-	6.15	3.91	-
300	-	91.70	-	4.82	3.49	-
420	-	91.98	-	5.39	2.64	-
480	-	89.34	-	6.56	4.09	-
1440	-	89.83	-	6.98	3.19	-

Tablo A.4. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, sıcaklık 70°C, n-hekzan:25mL).

Deney 4	ÜRÜN BİLEŞİMİ (% AĞIRLIK)					
Zaman (Dakika)	Sabunlaşmayan Madde	FAE	TAG	FFA	DAG	MAG
0.5	-	-	28.74	50.39	18.95	1.92
5	-	4.81	26.40	50.12	18.67	-
10	-	5.67	25.04	48.96	20.34	-
15	-	6.58	23.80	51.05	18.57	-
20	2.11	10.04	20.04	45.93	19.94	1.93
25	-	6.42	22.76	49.43	20.06	1.33
30	2.04	9.09	21.06	47.97	19.84	-
35	2.23	10.16	20.98	47.58	19.05	-
40	-	8.72	21.67	48.72	20.89	-
45	1.81	14.41	20.28	45.82	17.68	-
50	-	11.73	19.89	47.38	18.19	2.82
55	1.21	16.68	19.46	46.03	15.22	1.41
60	2.18	15.83	17.35	47.50	17.14	-
75	1.99	19.76	16.65	45.62	15.98	-
90	2.36	23.84	16.02	42.19	15.59	-
105	2.14	22.50	15.10	43.15	17.11	-
120	1.63	25.09	12.63	44.85	15.81	-
150	-	24.40	12.86	44.71	16.79	1.24
180	2.81	26.88	9.21	43.97	15.86	1.27

Tablo A.5. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, sıcaklık 55°C, n-hekzan:25mL).

Deney 5	ÜRÜN BİLEŞİMİ (% AĞIRLIK)					
Zaman (Dakika)	Sabunlaşmayan Madde	FAE	TAG	FFA	DAG	MAG
0.5	-	4.19	25.17	52.51	18.12	-
5	-	13.98	21.22	49.92	14.88	-
10	2.89	16.33	17.08	43.69	17.25	2.76
15	2.07	22.55	18.81	41.45	15.13	-
20	-	27.97	14.10	39.82	18.11	-
25	3.82	33.95	14.42	27.11	20.70	-
30	-	38.17	10.15	35.53	14.50	1.64
35	-	41.32	10.60	31.71	14.62	1.75
40	-	49.37	8.51	29.05	13.08	-
45	-	53.81	6.13	27.82	12.23	-
50	1.65	49.96	6.01	25.51	14.85	2.01
55	1.59	53.21	6.14	24.83	14.22	-
60	1.85	57.54	4.59	21.29	14.72	-
75	2.26	65.92	3.62	16.15	12.05	-
90	1.67	71.91	2.23	10.48	11.05	2.66
105	1.65	75.56	1.88	9.36	9.16	2.39
120	1.25	79.13	1.74	8.64	7.70	1.53
150	1.68	84.66	-	7.03	6.63	-
180	-	89.62	-	5.46	4.92	-

Tablo A.6. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:1, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).

	ÜRÜN BİLEŞİMİ (% AĞIRLIK)					
Deney 6						
Zaman (Dakika)	Sabunlaşmayan Madde	FAE	TAG	FFA	DAG	MAG
0.5	2.05	-	28.14	48.52	18.86	2.43
5	2.01	9.11	24.97	47.84	16.06	-
10	-	10.82	20.79	45.64	19.84	2.91
15	1.95	22.55	18.06	41.58	15.85	-
20	1.77	26.84	14.45	38.00	16.70	2.25
25	2.08	25.30	13.10	38.09	19.00	2.42
30	-	32.38	12.61	37.46	17.56	-
35	2.26	36.22	9.14	32.77	17.64	1.96
40	2.08	42.22	8.03	29.68	17.99	-
45	1.95	48.13	7.60	27.22	15.11	-
50	1.98	52.25	5.64	23.62	14.76	1.76
55	1.60	56.46	5.84	23.07	13.04	-
60	1.57	59.31	3.99	18.87	13.88	2.37
75	1.85	65.11	3.06	15.56	12.77	1.65
90	1.63	71.47	2.09	11.28	11.84	1.69
105	-	75.10	1.67	9.81	10.87	2.55
120	1.35	79.76	1.55	8.48	7.53	1.33
150	1.70	85.32	-	6.66	5.00	1.33
180	-	88.00	-	5.57	3.52	-

Tablo A.7. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:0.5, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).

Deney 7	ÜRÜN BİLEŞİMİ (% AĞIRLIK)					
Zaman (Dakika)	Sabunlaşmayan Madde	FAE	TAG	FFA	DAG	MAG
0.5	1.94	1.32	23.17	57.77	13.78	2.01
5	2.02	6.52	27.44	51.80	12.21	-
10	1.94	9.85	23.04	48.60	14.27	2.30
15	2.46	14.33	20.76	49.29	13.15	-
20	2.03	17.06	18.24	44.78	15.21	2.68
25	-	21.17	17.36	44.76	14.45	2.27
30	2.05	26.53	17.34	40.99	13.09	-
35	2.39	29.58	14.05	38.35	15.63	-
40	2.47	34.29	12.87	36.03	14.34	-
45	2.70	39.68	13.28	32.72	11.63	-
50	1.98	43.38	10.89	31.72	12.03	-
55	-	44.66	11.95	30.71	10.90	1.77
60	2.02	50.03	10.32	27.14	10.48	-
75	1.34	53.40	7.88	21.99	11.85	3.54
90	2.01	58.87	12.16	16.64	9.04	1.28
105	1.87	61.93	7.75	18.22	8.52	1.71
120	1.59	65.72	8.62	18.18	5.89	-
150	-	67.93	6.35	18.79	6.93	-
180	1.79	67.51	5.56	19.15	5.99	-

Tablo A.8. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 5g, TYA:O mol oranı 1:2, enzim/yağ ağırlık oranı 0.10, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).

Deney 8	ÜRÜN BİLEŞİMİ (% AĞIRLIK)					
Zaman (Dakika)	Sabunlaşmayan Madde	FAE	TAG	FFA	DAG	MAG
0.5	1.94	1.71	24.37	43.00	26.80	2.18
5	1.73	5.66	23.00	42.74	24.86	2.00
10	-	9.75	18.57	40.53	28.21	2.95
15	2.10	13.78	15.19	40.28	26.51	2.14
20	2.20	16.49	12.98	37.06	28.21	3.05
25	-	-	-	-	-	-
30	2.08	23.89	10.49	33.97	27.07	2.51
35	-	27.17	8.02	30.91	30.36	3.54
40	-	32.54	6.89	30.01	27.90	2.66
45	1.88	37.08	5.29	26.53	26.05	3.17
50	1.50	39.87	4.32	24.62	25.95	3.74
55	1.56	45.70	3.81	23.06	22.82	3.05
60	-	50.03	2.48	19.52	24.71	3.27
75	-	56.93	-	17.21	22.28	3.59
90	1.52	62.08	-	11.85	20.58	3.97
105	-	65.04	-	10.11	20.55	4.31
120	-	69.46	-	8.97	17.17	4.40
150	-	73.29	-	6.29	16.11	4.32
180	-	76.99	-	5.66	14.30	3.05

Tablo A.9. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşme reaksiyonunda ürün bileşiminin zamana göre değişimi (AAY 2.5g, TYA:O mol oranı 1:2.0, enzim miktarı 0.5g, sıcaklık 40°C, n-hekzan:25mL).

Deney 9	ÜRÜN BİLEŞİMİ (% AĞIRLIK)					
Zaman (Dakika)	Sabunlaşmayan Madde	FAE	TAG	FFA	DAG	MAG
0.5	-	-	24.96	42.50	28.70	3.84
5	-	11.31	20.71	40.54	22.72	4.71
10	-	24.16	14.54	30.82	26.84	3.64
15	-	28.68	9.14	33.02	26.02	3.15
20	-	35.63	7.43	25.71	27.23	4.01
25	-	34.30	4.65	29.07	25.08	6.90
30	-	46.88	4.16	20.90	21.38	6.67
35	-	56.98	3.77	15.71	19.04	4.51
40	-	56.68	2.94	12.39	21.73	6.26
45	-	60.99	2.99	10.61	19.60	5.81
50	-	68.51	3.51	7.29	16.18	4.51
55	-	62.86	3.31	5.31	21.35	7.17
60	-	68.01	3.34	6.28	18.36	4.02
75	-	74.45	2.61	3.55	15.47	3.91
90	-	75.70	-	5.79	14.90	3.61
105	-	80.84	-	3.40	11.71	4.05
120	-	76.33	-	3.85	14.49	5.34
150	-	78.15	-	3.71	16.04	2.10
180	-	79.54	-	2.92	14.50	3.04

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında İzmir’de doğdu. İlk öğrenimini İstanbul’da Hamdullah Suphi Tanrıöver İlkokulu’nda, orta ve lise öğrenimini İstanbul’da Adnan Menderes Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 1997 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümüne girdi ve 2001 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2001-2002 öğrenim döneminde Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrencisidir.



T.B. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
EĞİTİM, KÜLTÜR VE YERLİLER BAKANLIĞI
Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı
Eğitim, Kültür ve Yerliler Bakanlığı