

Mikroalg yağının lipaz katalizli hidroliz tepkimesine etki eden proses parametrelerinin istatistiksel yöntemle optimizasyonu

Statistical optimization of hydrolysis reaction process parameters by lipase catalysis of microalgae oil

Togayhan KUTLUK*

Kocaeli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 41380, Kocaeli

• Geliş tarihi / Received: 06.04.2020 • Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 21.11.2020 • Kabul tarihi / Accepted: 26.11.2020

Öz

Birçok endüstriyel tesisin hammadde kaynağı olarak kullanılan yağların hidrolizi önemli bir kimyasal prosestir. Yağ asitleri yenilenebilir kaynaklardan üretilen yağların hidrolizi ile sentezlenir. Son yıllarda bitkisel ve hayvansal yağlara alternatif mikroalglerden elde edilen yağların hammadde kaynağı olarak kullanılması giderek yaygınlaşmaktadır. Bu çalışmada Design Expert bilgisayar programı yardımı ile *Chlorella protothecoides* mikroalg yağının Noopazyme lipazı katalizöründe hidroliz tepkimesine etki eden parametrelerin (lipaz miktarı, sıcaklık, yağ/su (g/g)) etkileri incelenerek yüksek dönüşümle serbest yağ asitleri (SYA) elde etmek amacı ile optimizasyonu yapılmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda en yüksek SYA içeriği (%98), lipaz miktarı %15, yağ/su oranı (g/g) 0.20 ve sıcaklık 55°C olduğu koşullarda elde edilmiştir. Ayrıca Noopazyme lipazının 4 kez tekrar kullanılması sonucunda aktivitesinin %40'ını kaybettiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Alg yağı, *Chlorella protothecoides*, Hidroliz, Lipaz, Yanıt yüzey yöntemi

Abstract

Hydrolysis of oils used as the raw material source of many industrial plants is an important chemical process. Fatty acids are synthesized by hydrolysis of oils produced from renewable sources. In recent years, the use of oils derived from microalgae as an alternative to vegetable and animal oils has become commonly increasing. In this study, the effects of the parameters (lipase amount, temperature, oil / water (w/w)) of *Chlorella protothecoides* microalgae oil were analyzed to obtain high conversion of free fatty acids with the Design Expert computer program. As a result of the experimental studies, the highest FFA content (98%) was obtained under the conditions where lipase amount was 15%, oil/water ratio (g/g) 0.20 and temperature was 55°C. In addition, as a result of 4 reuse of Noopazyme lipase, it was determined that it lost 40% of its activity.

Keywords: Algae oil, *Chlorella protothecoides*, Hydrolysis, Lipase, Response surface methodology

* Togayhan KUTLUK; togay71@gmail.com, Tel: (0262) 3033526, orcid.org/0000-0001-7249-9902

1. Giriş

Son zamanlarda hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilen katı ve sıvı yağların üretimi ve bu yağların kimyasal modifikasyonu sonucu elde edilen ürünlerin (serbest yağ asitleri ve gliserin) endüstriyel boyutlarda üretimi için araştırmalar hız kazanmıştır. Katma değeri yüksek çok sayıda ürünün üretimleri için de yağ asitlerine gereksinim duyulmaktadır. Bunlar, yapıştırıcılar, özel yağlayıcılar, şampuanlar ve diğer kozmetik ürünlerdir. Bitkisel ve hayvansal yağlardan başlıca kozmetik ve diğer birçok endüstriyel alanda kullanılan serbest yağ asitleri ve gliserinin sentezlenmesi için başlıca işlem hidrolizdir. Yağların yapısına su molekülleri katılarak bir katalizör (kimyasal veya enzim) yardımı ile yapı birimleri olan yağ asitleri ve gliserol molekülüne dönüştürülmesi işlemine hidroliz denilmektedir.

Hidroliz ile üretilen serbest yağ asitleri, kısa zincirli alkoller (metanol veya etanol) ve dallanmış ya da uzun zincirli alkoller (trimetilolpropan veya stearyl alkol) ile tepkimeye sokularak farklı fiziksel özelliklere sahip esterler sentezlenebilmektedir. Esterleşme tepkimeleri sonucunda ester ve su molekülleri açığa çıkmaktadır. Bu tepkime esterlerin üretimi için gereklidir. Çünkü ester üretiminde serbest yağ asitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu proses ile bitkisel yağlar, endüstriyel gres kalıntıları, atık pişirme yağları, rafine sıvı ve katı yağ yan ürünleri ve hatta son yıllarda mikroalglerden ya da makroalglerden elde edilen yağlar hammadde olarak kullanılabilir (Chu vd.,2003; Zenevics vd., 2016).

Kimyasal katalizörler kullanılarak gerçekleştirilen geleneksel yağ hidrolizi, yüksek sıcaklık ve basınçta (250°C ve 70 bar) yapılmaktadır (Murty vd., 2002). Yüksek basınç ve sıcaklık nedeni ile tepkime esnasında istenmeyen yan tepkimeler ortamdaki maddelerin oksidasyonuna, serbest yağ asitlerinin dehidrasyonuna veya trigliseritlerin esterleştirilmesine yol açarak yağların ve yağ asitlerinin yapılarının bozulmasına neden olabilmektedir. (Murty vd., 2002; Rooney ve Weatherley, 2001). Fakat lipazlar tarafından katalizlenen hidroliz tepkimeleri, enerji tasarrufu sağlamak için daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilirler. Lipazlar, yapıları gereği tek bir tepkimeyi katalizlerler. Bu özelliği ve ılımlı koşullarda çalışabilmeleri nedeniyle daha az tepkime yan ürünü oluşurken yüksek kalitede ürünler elde edilebilir (Murty vd., 2002; Castro vd., 2004; Hasan vd., 2009; Sharma vd., 2009). Son yıllarda, araştırmacıların ve büyük ölçekli

endüstrilerin (Deterjan, yağ, biyodizel ve yağlama yağı üretim tesisleri) lipazlara olan ilgisi geniş uygulama alanları, yüksek seçicilikleri, aynı zamanda ılımlı işletme koşulları nedeni ile giderek artmaktadır (Neena, 1997; Yadav ve Borkar, 2009; Yadav vd., 2008; Yadav ve Devi., 2004). Lipazlar varlığında katalizlenen yağların hidroliz tepkimeleri sonucunda yüksek saflıkta mono-di-tri gliseritler ve aynı zamanda geniş endüstriyel uygulama alanına sahip gliserol ılımlı koşullarda üretilebilmektedir. Lipazlar, ara yüzey enzimleri olmaları nedeni ile hidroliz tepkimelerinde yağ-su ara yüzeyinde oldukça aktifler (Yan vd., 2011; Maruyama vd., 2000). Hidroliz tepkimelerinde seçiciliği ve ürün verimini arttırmak için lipazların kullanımı oldukça uygundur (Sharma vd., 2012). Sonuç olarak lipaz katalizli hidroliz tepkimesi geleneksel kimyasal katalizli tepkimeler ile karşılaştırıldığında tepkime sıcaklıkları ve basınçlarında önemli ölçüde azalma sağlarken elde edilen ürün kalitesi de oldukça üstündür. Ekonomik olarak uygulanabilir bir performansta ürün elde edilebilmesi nedeni ile “yeşil kimya” tanımına uygun ve sürdürülebilir teknolojiler için önemli bir proses olacağı düşünülmektedir.

Literatürde lipaz katalizli alg yağının hidroliz tepkimesine etki eden parametreleri detaylıca inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bahadi vd., (2020) yaptıkları çalışmada potasyum hidroksit (KOH) katalizörlüğünde palmye çekirdeği yağının hidrolizine etki eden parametreleri istatistiksel yöntemle incelemişler ve %98 SYA içeriğine yaklaşık 2 saat tepkime süresi, 1.77 molar KOH derişimi, 70°C tepkime sıcaklığında ulaştıklarını rapor etmişlerdir. Hung vd., (2018) yaptıkları çalışmada bitkisel gac yağının lipaz katalizli hidroliz tepkimesine etki eden parametrelerini araştırmışlar ve deneysel çalışmalar ve optimizasyon sonucunda en yüksek SYA dönüşümünü (%94.16) 38°C derece tepkime sıcaklığında, %13.8 enzim varlığında 8 saatte elde ettiklerini belirtmişlerdir. Chen vd., (2014) keten tohumu yağının lipaz katalizli hidrolizi tepkimesine etki eden parametreleri araştırmışlar ve en yüksek SYA dönüşümünü (%93) yağ/su oranı 0.9 ve lipaz miktarı % 1.2 olduğu durumda belirlemişlerdir. Literatürde yapılan çarpıcı çalışmalar neticesinde lipaz katalizli hidroliz tepkimesinin ılımlı koşullarda yüksek hidroliz verimi ile gerçekleştiği vurgulanmaktadır (Chen vd., 2014).

Hammadde kaynağı olarak kullanılan geleneksel yağların yerine mikro alglerin kullanılması araştırmacıların son yıllardaki ilgi odağı olmuştur. Oldukça yüksek fotosentez potansiyeli ve

karbondioksit tutma özelliği olan mikro alglerin yaygın kullanım alanı bulunmaktadır. Endüstriyel uygulamanın başlıca biyoteknolojik potansiyeli, alg biyokütlesinin temiz bir biyoyakıt kaynağı olarak görülmesidir. Temel bileşimleri proteinlerden, lipitlerden ve karbohidratlardan oluşan doğada tanımlanmış binlerce alg türü bulunur (Altın, 2017). Mikroalglerin türleri ve yetiştirme koşullarına göre yağ içerikleri %10-50 arasında değişim göstermektedir. Mikroalg yetiştirilmesi için geniş tarım arazilerine gerek duyulmaması da bir diğer avantajıdır. Bu özelliklerinden dolayı mikroalgler, endüstride (biyoyakıt üretimi, gıda, kozmetik, ilaç, vb.) ucuz ve doğal bir hammadde kaynağı olarak değerlendirilebilir. Mikroalg yağının Noopazyme katalizörü varlığında enzimatik hidrolizine etki eden tepkime parametreleri (lipaz miktarı, sıcaklık, yağ/su (g/g)) yüksek verimle serbest yağ asitleri elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla tepkime Design Expert 7.0.0 paket programı ile Yanıt Yüzey Yöntemi'nin Merkezi Kompozit Tasarımı (CCD: Central Composite Design) kullanılarak modellenmiştir. Yanıt Yüzey Yöntemi, matematiksel ve istatistiksel analizler çerçevesinde problemin modellenmesi ve çözümlenmesini sağlarken çeşitli parametre ve değişkenlerin de bu sonuçlara olan etkilerini belirlememizi sağlar. Bu kapsamda amaç, kullanılan değişkenlerin (girdi değişkenleri veya faktörler) etkilediği yanıtın (çıkıtı değişkenleri) iyileştirilmesidir. Bu yöntem, ikinci dereceden bir yüzeyin belirlenerek uyumlaştırılması için uygundur ve en az sayıda deney ile etkin parametrelerin belirlenerek kesinleştirilmesine yardım ederken değişkenler arasındaki etkileşimi de analiz eder. Tepkime parametrelerinin hidroliz verimi üzerindeki etkilerinin tanımlanması için, programın önerdiği CCD'ye dayalı olarak seri deneyler yapılmıştır. Deneysel sonuçlar programa tanımlanarak Denklem 1'e göre program tarafından değişkenlerin kodlanmış değerleri belirlenmiştir.

$$xi = \frac{xi - xo}{\Delta x} \quad (1)$$

Burada, xi - i değişkeninin kodlanmış değeri, Xi - kodlanmamış i'inci değeri, Xo test değişkeninin kodlanmamış değeri ve i merkez noktasıdır. Bir ikinci mertebeden polinom denklemi; bağımsız değişkenlerin bir fonksiyonu olarak hidroliz verimini (Y) ve aslında Denklem 2'yi ifade eder.

$$Y = bo + \sum_{i=1}^k biXi + \sum_{i=1}^k bijXi^2 + \sum_{i_1 < j}^k \sum_j^k b_{i_1 j} Xi Xj + e \quad (2)$$

Burada Y, tepki faktörüdür (% serbest yağ asidi içeriği) ve i ve j sırasıyla doğrusal ve ikinci dereceden katsayıları temsil etmektedir. Denklemde bo, kesişim, bi birinci dereceden model katsayısı, k faktörlerin sayısı ve e'nin rastgele bir sayı olduğu bilinmektedir.

Regresyon analizi, yanıt fonksiyonunu bir ikinci dereceden polinomu belirlemek ve tahmin edebilmek için yapılmıştır. Deneysel sonuçlardan elde edilen verilerin regresyon analizi ve regresyon denkleminin katsayı değerinin tahmin edilmesi program yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Modelin yeterliliği varyans analizi (ANOVA) kullanılarak belirlenmiştir. Test değişkenlerinin serbest yağ asidi içeriği üzerindeki bireysel ve etkileşimli etkilerini açıklamak için program tarafından tepki yüzeyleri oluşturularak yorumlanmıştır (Russel, 2009).

Bu çalışmada bitkisel ve hayvansal yağlara alternatif olarak kullanılması öngörülen *Chlorella protothecoides* mikroalg yağının enzim katalizli çevre dostu hidroliz prosesi ile işlenerek serbest yağ asitleri üretilmesi ve hidroliz tepkimesine etki eden önemli parametrelerin (lipaz miktarı, sıcaklık, yağ/su (g/g)) tespit edilmesi ve iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç ile hidroliz tepkimesine etki eden parametreler ve bu parametreler arasındaki etkileşimleri ortaya koyabilmek için istatistiksel deney tasarımı uygulanarak sonuçların optimizasyonu sağlanmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda yüksek içerikte serbest yağ asitleri elde edilmiş ve serbest yağ asidi profili belirlenmiştir. Ayrıca tepkimelerde katalizör olarak kullanılan ticari tutuklanmış lipaz Noopazyme'in tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

2. Gereç ve yöntem

2.1. Malzemeler

Hidroliz tepkimesi araştırmalarında kullanılan alg yağı (*Chlorella protothecoides*) Soley firmasından hibe edilmiştir. Ticari tutuklanmış lipaz katalizörü Noopazyme, Novozyme firmasından hibe edilmiştir. Analizlerde kullanılan ve adı geçen diğer kimyasallar (NaOH %99, n-Hekzan %99), Merck firmasının Türkiye temsilcisinden satın alınmıştır.

2.2. Serbest yağ asitleri sentez tepkimeleri

Mikroalg yağından lipaz katalizli hidroliz tepkimesi ile serbest yağ asitleri (SYA) üretilmesi amacı ile tepkimeye etki eden en önemli faktörler (yağ/su oranı (0.05-0.20 %g/g), lipaz miktarı (%))

0.15-0.50 (%g yağa göre)), sıcaklık (30-55°C), karıştırma hızı) araştırılmıştır. Tepkimeler INNOVA 40 marka soğutuculu çalkalamalı inkübatörde 25ml'lik ağzı kapalı erlenlerde eş zamanlı gerçekleştirilmiştir. Her tepkime için 3g yağ temel alınarak diğer reaktanlar ve katalizör miktarları hesaplanmıştır. Her tepkime için 3g yağ temel alınmasının nedeni küçük hacimli seri tepkimeler yaparak elimizde bulunan kısıtlı hammaddenin etkin bir şekilde kullanılabilmesi içindir. Aynı zamanda tüm deneylerde tepkime hacmini sabit tutarak ölçek büyütme veya küçültme işleminden gelecek olan olası hataların önüne geçmek içindir. Tepkime süresi 24 saat, karıştırma hızı 400 dev/dk'dır.

2.3. Yağ asidi içeriği ve profilinin belirlenmesi

Serbest yağ asidi profili, alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 30m x 320µm x 0.25µm kapiler kolon (CARBOWAX 20M) ile Agilent 7820 A model gaz kromatografi (GC) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Dedektör sıcaklığı 280°C ve split oranı 1:50'dir. Kolon sıcaklığı, 50°C'de 1 dakika beklemeden sonra dakikada 25°C/dk artışla 200°C'ye 3°C/dk artışla 230°C'ye ulaşılarak bu sıcaklıkta 18 dakika bekletilerek 40°C/dk artışla 280°C'ye çıkılarak ve bu sıcaklıkta da 3 dakika kalacak şekilde ayarlanmıştır. Helyum taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Cihaza enjekte edilecek örnek için yağların metil esterleri haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 0.1 gram yağ örneği, 20ml'lik cam tüp içerisine tartılarak ve üzerine 10ml n-hekzan ilave edilerek çözülmüştür. Daha sonra üzerine 2N potasyum hidroksit çözeltisinden 100µl eklenip, yarım dakika kadar vortekslenmiştir. Karışım santrifüj edilerek (5000 rpm, 5 dk) üst fazdan alınan 1µl örnek ile cihaza enjeksiyon yapılmıştır (David vd., 2005).

$$\frac{U}{m_{genzim}} = \frac{(\text{Örnek, } ml_{harcanan} - \text{şahit, } ml_{harcanan})_{(NaOH)} \times [NaOH] \times 1000}{(m_{enzim, mg}) \times t} \quad (3)$$

2.6. Yanıt yüzey yöntemi uygulanarak lipaz katalizli hidroliz tepkime parametrelerinin modellenmesi ve optimize edilmesi

Noopazyme varlığında gerçekleştirilen hidroliz tepkimesine etki eden üç önemli faktör (lipaz miktarı, sıcaklık, yağ/su (g/g)) yapılan ön deneyler sonucunda bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Tepkime süresi 24 saat, karıştırma hızı 400 dev/dk. olarak belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin birleşmiş etkileri incelendiğinde, serbest yağ asidi dönüşümü ampirik modeli geliştirmek için

2.4. Biyokatalizörün tekrar kullanılabilirliği

Hidroliz tepkimesi sonucunda ürünler santrifüj (6000dev/dk, 10dk) yardımı ile tepkime ortamından ayrılmıştır. Santrifüj sonucunda üst faz serbest yağ asitleri ve gliserin içermektedir. Gliserin fazı beyaz görünümündedir. Alt fazda olan lipazlar ayrıldıktan sonra 3 kez 5ml'lik enjektör yardımı ile %99 saflıkta n-hekzan ile yıkanarak petri kabına aktarılmıştır. Lipazlar sonraki tepkimelerde kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Üst fazdaki serbest yağ asidi ve gliserin ayırma hunisi yardımı ile ayrılmıştır.

2.5. Biyokatalizörün aktivitesinin belirlenmesi

Noopazyme enziminin aktivitesi yaygın kullanılan bir yöntem olan zeytinyağı hidrolizi ile belirlenmiştir. Bir ünite enzim (U), zeytinyağından 1dk'da 1µmol yağ asidi hidroliz eden lipaz miktarı olarak tanımlanmıştır. Tepkime ortamı 25ml hacmindeki erlenlerde 2.5ml zeytinyağı ve 2.5ml fosfat tamponu (0.1M, pH7.0) çalkalamalı inkübatörde 37°C'ye kadar ısıtılmıştır. 0.1g Noopazyme tartılarak tepkime ortamına eklenmiştir. Hidroliz tepkimesi 30dk boyunca sürdürülmüş olup sonlandırmak için hacimce 1:1 oranında hazırlanmış eter/etanol karışımından 2.5ml ortama eklenmiştir. Daha sonra 1-2 damla olacak şekilde %1'lik fenolftalein indikatörü ortama eklenerek 0.1M NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Harcanan NaOH çözeltisi hacminden Denklem 3'e göre hesaplanmıştır. Titrasyonlar güvenilirliği arttırmak adına 5 tekrar yapılarak ortalaması alınmıştır (Stoytcheva vd., 2012; Özgen, 2013).

kullanılan bağımlı değişkendir ve modelin yanıtını teşkil etmektedir. En yüksek yanıt değeri için en iyi koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. CCD genelde altı merkezli bir tasarım olup, 2n faktöriyel çalışma ve 2(n) eksenel koşul içerir, burada n faktör sayısıdır. Deneyler 25ml'lik ağzı alüminyum folyo ve parafilmle ile kapatılmış erlenlerle IKA marka çalkalamalı inkübatörde yapılmıştır. Tepkimeye etki eden parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerlerini gösteren program verileri Tablo 1'de, program tarafından öngörülen 20 deney seti Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Noopazyme katalizörlüğünde mikroalg yağının hidroliz tepkimesi ile serbest yağ asitlerinin sentezi için etki eden parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerleri

Faktör	En düşük değer	En yüksek değer	Kodlanmış en düşük değer	Kodlanmış en yüksek değer	Ortalama	Standart sapma
A: Enzim Miktarı (%gr yağa göre)	0.15	0.50	-1.00	1.00	0.325	0.145
B: Yağ/su oranı (g/g)	0.050	0.20	-1.00	1.00	0.125	0.062
C: Sıcaklık (°C)	30	55.0	-1.00	1.00	42.50	10.329

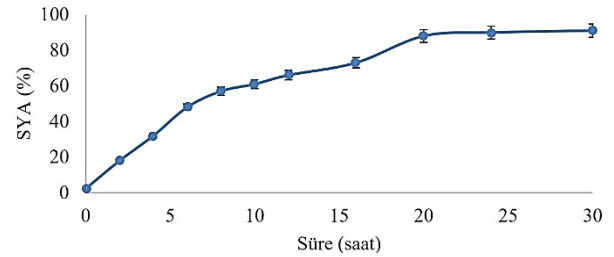
Tablo 2. Etki eden parametreler ve kodlanmış değerlerini içeren deney seti

Deney numarası	Faktör A: Enzim Miktarı (%gr yağa göre)	Faktör B: yağ/su oranı (g/g)	Faktör C: Sıcaklık (°C)	Yanıt: % SYA
1	0.32	0.13	42.50	94
2	0.32	0.25	42.50	95
3	0.32	0.13	42.50	93
4	0.50	0.20	55.00	96
5	0.32	0.13	42.50	92
6	0.03	0.13	42.50	92
7	0.32	0.13	42.50	90
8	0.50	0.05	55.00	98
9	0.15	0.05	30.00	83
10	0.62	0.13	42.50	93
11	0.50	0.20	30.00	84
12	0.50	0.05	30.00	87
13	0.15	0.05	55.00	97
14	0.32	0.13	63.52	99
15	0.32	0.13	21.48	73
16	0.32	0.13	42.50	92
17	0.15	0.20	55.00	97
18	0.32	0.13	42.50	90
19	0.15	0.20	30.00	81
20	0.32	0.13	42.50	92

3. Bulgular ve tartışma

3.1. Tepkime süresinin belirlenmesi

Chlorella protothecoides mikroalg yağının Noopazyme katalizörü varlığında hidroliz tepkime süresinin belirlenmesi amacıyla 55°C tepkime sıcaklığında, yağ/su oranı 0.10 ve enzim miktarı %0.15 olduğu koşullarda 24 saat süre ile deney yapılmıştır. Şekil 1'den açıkça görüldüğü üzere serbest yağ asidi miktarı 24 saate kadar artarak en yüksek içeriğe (%91) ulaşmış bu zamandan sonra belirgin bir değişim göstermemiştir. Tepkime süresi 24 saat olarak belirlenerek optimizasyon çalışması deneyleri 24 saat üzerinden tasarlanmıştır.

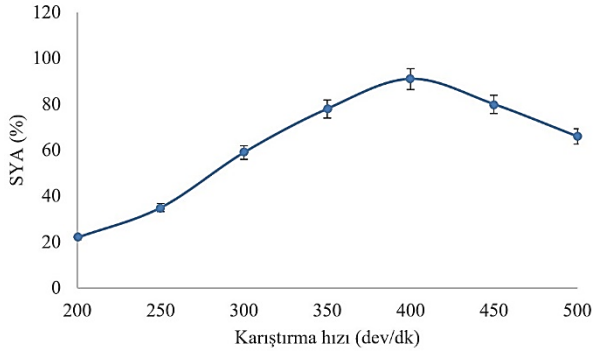


Şekil 1. Hidroliz tepkimesinde sürenin SYA dönüşümüne etkisi

3.2. Karıştırma hızının belirlenmesi

Kimyasal tepkimelerde optimum karışma ile tepkime ortamında kütle aktarım kısıtlamalarının önüne geçilerek yağ/su ara yüzeyinde gerçekleşen hidroliz tepkimesi için optimum verim sağlanmış olur. Düşük karıştırma hızlarında lipaz sıvı faz içinde homojen dağılamaz ya da yüksek hızlarda

reaktör çeperlerinden yukarı yönelerek yapışır. Bu tür karıştırma problemleri düşük verimlere neden olurlar (Xin vd., 2008). Lipaz katalizli mikroalg yağının hidrolizine karıştırma hızının etkisini incelemek amacı 55°C tepkime sıcaklığında, yağ/su oranı 0.10, enzim miktarı %0.15 olduğu koşullarda, 24 saat süre ile 200-250-300-350-400-450-500 rpm karıştırma hızlarında deneyler yapılmıştır. Karıştırma hızının SYA içeriğine etkisi Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. Hidroliz tepkimesinde zamanın SYA dönüşümüne etkisi

Karıştırma hızı arttıkça serbest yağ asidi içeriği belirgin bir şekilde artış göstermiştir. Karıştırma hızı 400rpm olduğu durumda en yüksek (%91) serbest yağ asidi içeriğine ulaşılmıştır. Düşük karıştırma hızları kütle aktarım kısıtlamalarının aşılmasında yeterli olmadığı aynı zamanda yüksek hızlarda katalizörün tepkime ortamı çeperlerine yapışarak ortamdaki uzaklaştığı görülmüştür.

3.3. Anova analizi

Noopazyme katalizörü varlığında gerçekleşen hidroliz tepkimesi için program tarafından tasarlanan model analizi Tablo 3'te gösterilmiştir. Program, lipaz katalizli hidroliz tepkimesi için kuadratik (2. dereceden) modeli önermiştir. Enzim katalizli tepkimelerde CCD'nin tam bir kübik modeli desteklemek için yeterli olması bilinmektedir. Parametrelerin birbirleri arası etkileşimin olduğu tepkime setlerinde genellikle önerilen durum ikinci dereceden bir matematiksel model ile tanımlanmasıdır. Önerilen modelin uygunluğu istatistiksel olarak desteklenmektedir. Önerilen modelin lack of fit test sonuçları Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 3. Noopazyme katalizörlüğünde mikroalg yağının hidroliz tepkimesi için model istatistik verileri

Model	Standart sapma	R ²	Hesaplanmış R ²	Öngörülen R ²
Doğrusal	2.63	0.86	0.83	0.76
2FI	2.81	0.87	0.81	0.70
2. Derece	1.81	0.96	0.92	0.76
Kübik	1.22	0.98	0.96	0.96

Tablo 4. Noopazyme katalizörlüğünde mikroalg yağının hidroliz tepkimesi için Yanıt Yüzey Yöntemi lack of fit test sonuçları

Model	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri olasılık>F
Doğrusal	102.22	11	9.29	5.26	0.039
2FI	93.85	8	11.73	6.64	0.026
2. Derece	23.83	5	4.77	2.70	0.150
Kübik	0.075	1	0.0075	0.0042	0.845

Program tarafından önerilen modelin lipaz katalizli hidroliz tepkimesinin ANOVA analizi Tablo 5'te verilmiştir. Tablodaki model değişkenlerinin hepsinin anlamlı olduğu görülmektedir. Önerilen model için F (gerileme) değeri 26.16 olarak belirlenmiştir. F değerleri, modelin önemli olduğunu; bu da p- 0.0001'den düşük değerlerde modelin önemli ölçüde uygunluğunu

göstermektedir (Kumar vd., 2003). Tepkimeye etki eden faktörler ve ikili etkileşimlerinden hangilerinin p değerleri 0.0001'den düşük ise tepkimeye önemli etkisinin olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca hidroliz tepkimesine etki eden en önemli faktörün sıcaklık olduğu (p-< 0.0001, F = 209.74) da bu tablodan anlaşılmaktadır.

Tablo 5. Noopazyme katalizörlüğünde mikroalg yağının hidroliz tepkimesi için modelin ANOVA analiz verileri

Faktör	Kareler toplamı	df	Ortalama kareler	F değeri	P değeri olasılık>F
Tüm Model	769.14	9	85.46	26.16	< 0.0001
A	5.52	1	5.52	1.69	0.2228
B	0.15	1	0.15	0.045	0.8372
C	685.08	1	685.08	209.74	< 0.0001
AB	1.12	1	1.12	0.34	0.5703
AC	6.12	1	6.12	1.88	0.2008
BC	1.13	1	1.13	0.34	0.5703
A ²	0.32	1	0.32	0.09	0.7590
B ²	0.32	1	0.32	0.09	0.7590
C ²	66.49	1	66.49	20.36	0.0011

Ayrıca F değerleri yüksek ve p değerleri de buna karşın düşük ise modelin uygunluğunun o derece iyi olduğu belirtilir. Bu oran Adeq. Precision, sinyal / gürültü olarak tanımlanır. Önerilen modelin uygunluğu için bu oranın 4'ten büyük bir değer olması beklenmektedir. Lipaz katalizli hidroliz tepkimesi için önerilen modelin oran 19.02'dir (Tablo 6).

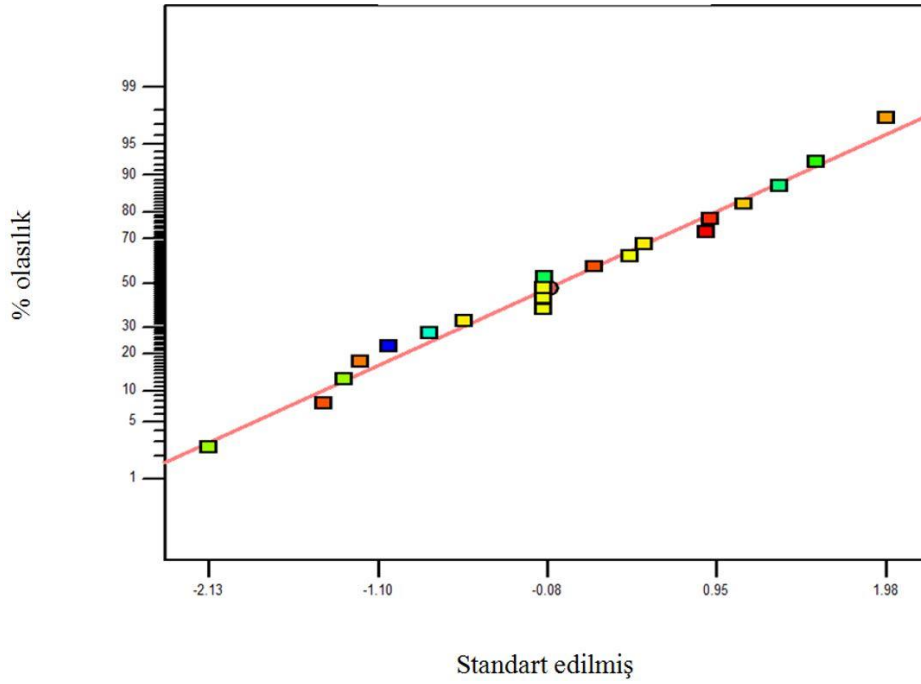
Tablo 6. Hidroliz tepkimesine ait önemli model değerleri

Standart sapma	1.81
Ortalama	90.90
C.V. %	1.99
Hesaplanmış R ²	0.93
Öngörülen R ²	0.75
Sinyal gürültü oranı	19.02

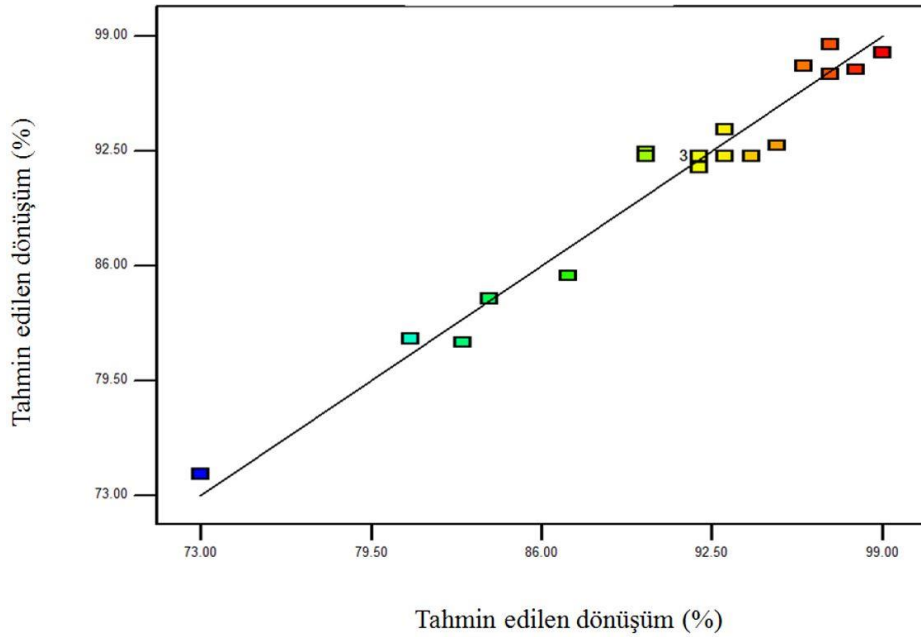
Bu değer 4'ten uzaklaştıkça modelin uyumluluğu da kuvvetlenmektedir. Ayrıca modelin uygunluğu öngörülen değerler ile gerçek değerler arasındaki ilişkiye de bağlı olduğu bilinmektedir. R² değeri ne kadar 1'e yakın ise istatistiksel veriler ve öngörüler o derece gerçeğe örtüşmektedir. Hidroliz

tepkimesi için Noopazyme katalizörlüğünde bu değer (Adjusted R²) 0.92 olduğu belirlenmiştir (Yuan vd., 2008; Shrivastavs, 2008). Ayrıca, model tasarlanırken değişken aralıkları ne derece dar seçilirse hesaplanmış ve öngörülen R² değerleri birbirlerine yaklaşmaktadır. Enzim katalizörü varlığındaki tepkimelerde tepkimeye etki eden değişkenlerin aralıklarının dar tutulması öngörülen R² değerini hesaplanmış R² değerlerine yaklaştırırken enzimler üzerine tepkime sıcaklığının önemli ölçüde etkisinin olduğu düşünüldüğünde aralıkların dar tutulması deneysel tasarım yapılırken yanıtıcı olabilmektedir (Montgomery vd., 2012).

Noopazyme katalizörlüğünde gerçekleşen hidroliz tepkimesi için model tarafından hesaplanan olasılık grafikleri sırasıyla Şekil 3'de, öngörülen sonuçlar ile gerçek değerler arasında çizilen grafik ise Şekil 4'de verilmiştir. Düz çizgiler boyunca dağılım gösteren noktaların, deneysel elde edilen sonuçlar ve yanıtın öngörülen değerleri arasında iyi bir ilişki olduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca seçilen tüm modellerin deneysel değerlerdeki yanıt değişkenlerinin öngörülmesi için yeterli olduğu görülmektedir.



Şekil 3. Noopazyme katalizörlüğünde hidroliz tepkimesi için olasılık grafiği



Şekil 4. Hidroliz tepkimesi için tahmin edilen ve gerçek dönüşüm karşılaştırması

Hidroliz tepkimesi için program tarafından oluşturulan ve tüm parametrelerin etkileşiminin tanımlandığı model denklemi denklem 4'te verilmiştir. Ayrıca parametrelerin birbirleri arasında etkileşimi incelendiğinde; düşük sıcaklıklarda hidroliz veriminin ya da diğer bir

deyişle elde edilen serbest yağ asidi miktarının azaldığı, aynı zamanda sıcaklık ve yağ/su oranı birlikte arttığında SYA dönüşümünün arttığı, birlikte azalması ile de düştüğü grafikten açıkça görülmektedir (Şekil 3a-3b-3c).

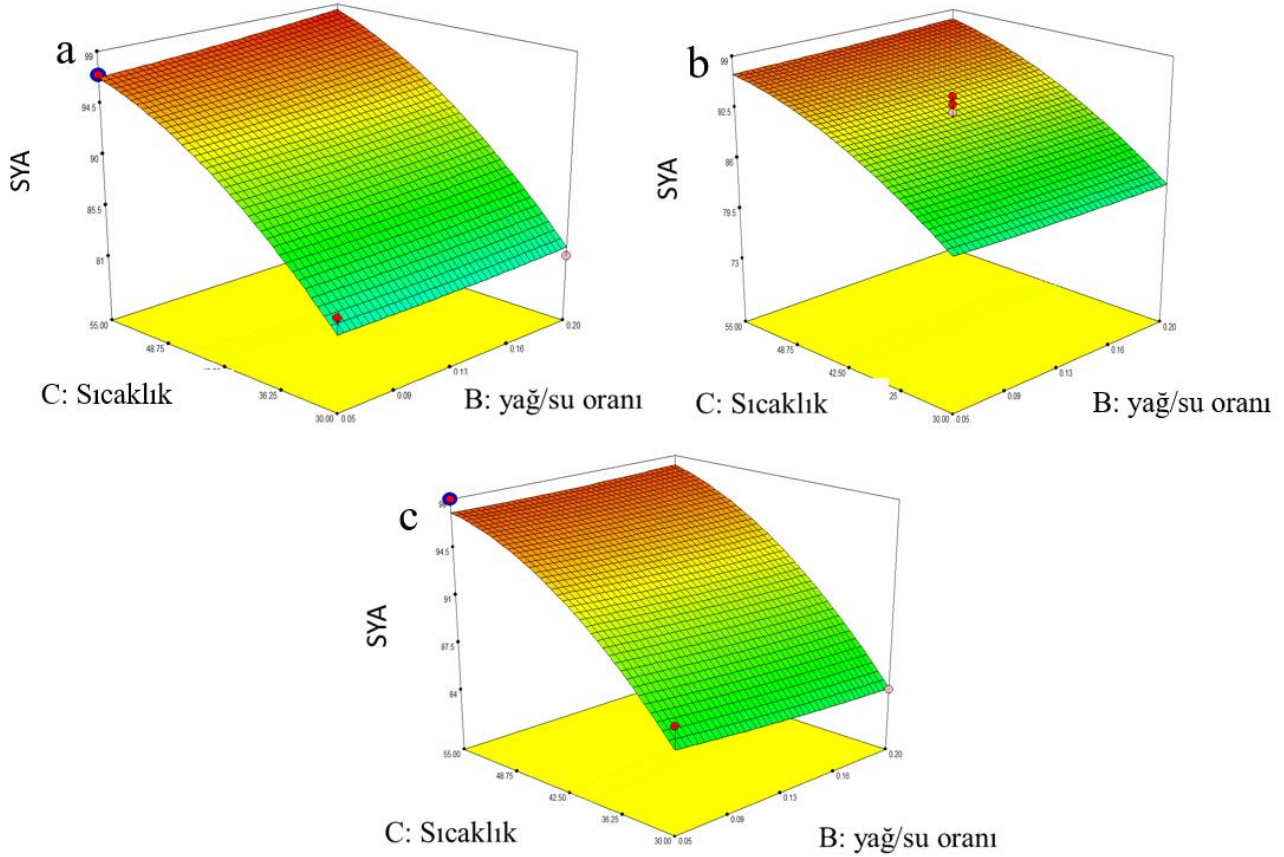
$$SYA = + 92.16 + 0.64 * A + 0.10 * B + 7.08 * C - 0.37 * A * B - 0.87 * A * C + 0.38 * B * C + 0.15 * A^2 + 0.15 * B^2 - 2.15 * C^2 \quad (4)$$

Sıcaklık ve yağ/su oranının birbirleri ile etkileşimi incelendiğinde, enzim miktarı %0.15, sıcaklık

55°C, yağ/su oranı 0.05 olduğu durumda en yüksek (%97) SYA dönüşümü elde edilmiştir. Enzim

miktarı aynı kalır iken sıcaklık 30°C, yağ/su oranı 0.20 olduğu durumda en düşük (%81) SYA dönüşümü elde edilmiştir (Şekil 5a). Enzim miktarı % 0.32, sıcaklık 42.5°C, yağ/su oranı 0.13 olduğu durumda en yüksek (%95) SYA dönüşümü elde edilmiştir. Enzim miktarı aynı kalır iken sıcaklık 22°C, yağ/su oranı 0.13 olduğu durumda en düşük

(%73) SYA dönüşümü elde edilmiştir (Şekil 5b). Enzim miktarı %0.50, sıcaklık 55°C, yağ/su oranı 0.05 olduğu durumda en yüksek (%98) SYA dönüşümü elde edilmiştir. Enzim miktarı aynı kalır iken sıcaklık 30°C, yağ/su oranı 0.20 olduğu durumda en düşük (%83) SYA dönüşümü elde edilmiştir (Şekil 5c).

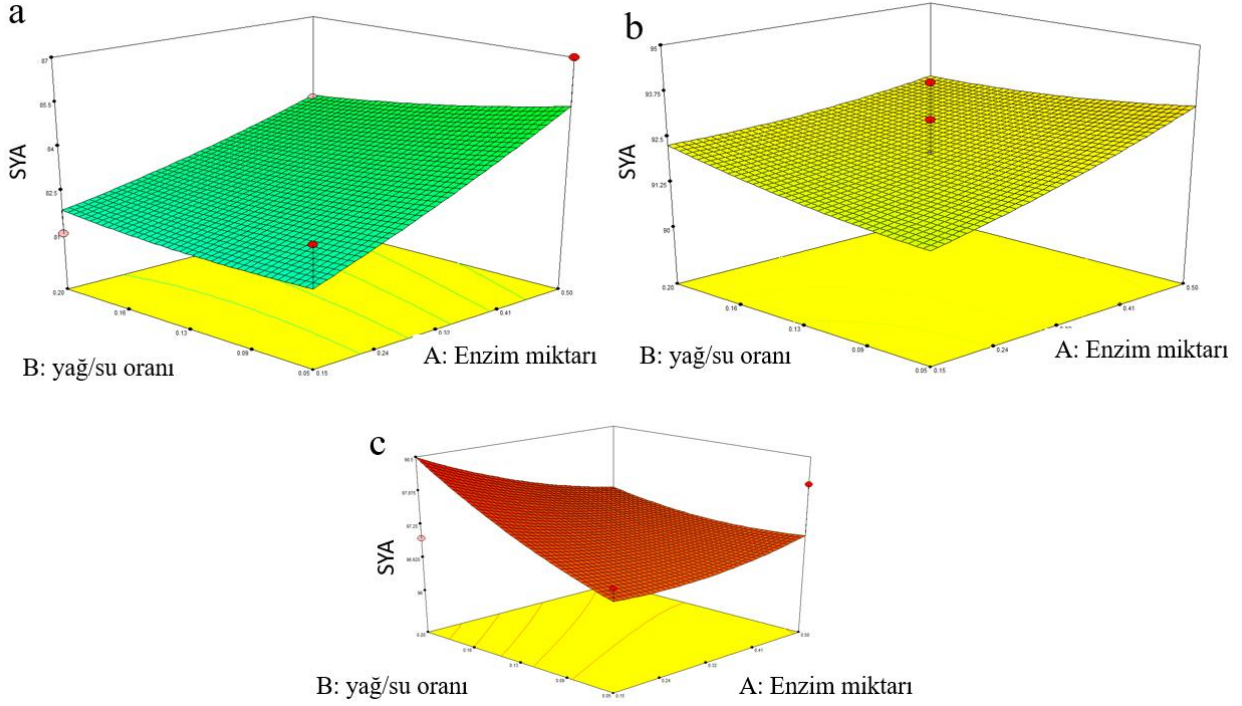


Şekil 5. Sıcaklık ve yağ/su oranının SYA dönüşümüne birlikte etkisi a) Enzim miktarı %0.15, b) Enzim miktarı %0.33, c) Enzim miktarı %0.50

Diğer yandan enzim miktarı ve yağ/su oranının SYA dönüşümüne birlikte etkisi incelendiğinde enzim miktarının artması veya azalmasının belirgin bir etkisi olmadığı parametrelerin birbirleri arasında sınırlayıcı bir etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır (Şekil 6a-6b-6c).

Yağ/su oranı ve enzim miktarının birbirleri ile etkileşimi incelendiğinde, sıcaklık 30°C, yağ/su oranı 0.05, enzim miktarı 0.50 olduğu durumda en yüksek (%87) SYA dönüşümü elde edilmiştir. Sıcaklık aynı kalır iken enzim miktarı 0.15, yağ/su oranı 0.20 olduğu durumda en düşük (%81) SYA dönüşümü elde edilmiştir (Şekil 5a). Sıcaklık 42.5°C, yağ/su oranı 0.13, enzim miktarı 0.32 olduğu durumda en yüksek (%94) SYA dönüşümü elde edilmiştir. Sıcaklık aynı kalır iken enzim miktarı ile yağ/su oranındaki değişimlerin SYA dönüşümüne belirgin bir etkisinin olmadığı

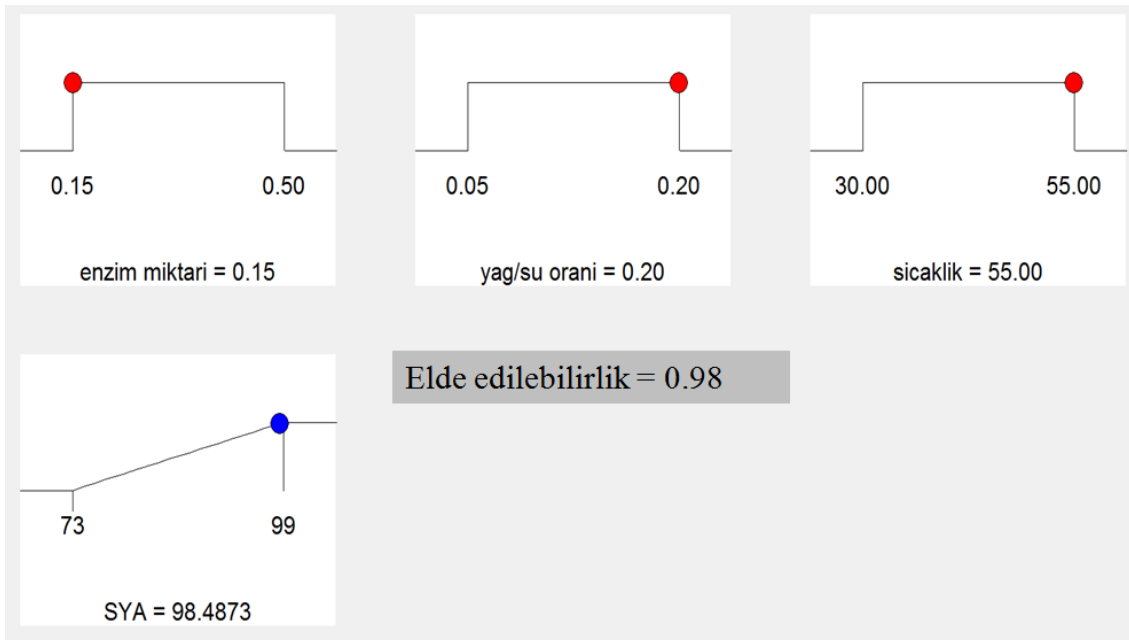
görülmüştür (Şekil 5b). Sıcaklık 55°C, yağ/su oranı 0.05, enzim miktarı 0.50 olduğu durumda en yüksek (%98) SYA dönüşümü elde edilmiştir (Şekil 5c). Bu grafikten anlaşıldığı üzere tepkime sıcaklığının SYA dönüşümü üzerine belirgin bir etkisinin olduğu anlaşılmaktadır. Tepkime ortamında enzim miktarı arttıkça dönüşüm azalmaktadır çünkü ortamda bulunan fazla enzim birbirleri arasında topaklaşma yaparak aktivitelerini kaybetmektedirler. Tepkime sıcaklığı ve yağ/su oranının birbirleri ile etkileşimi incelendiğinde hidroliz verimine belirgin bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Yağ/su oranı ve enzim miktarının birbirleri arasındaki etkileşimi incelendiğinde hidroliz verimine belirgin bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Hidroliz tepkimesi için en önemli parametrenin sıcaklık olduğu belirlenmiştir.



Şekil 6. Enzim miktarı ve yağ/su oranının SYA dönüşümüne birlikte etkisi a) Sıcaklık 30°C, b) Sıcaklık 42.50°C, c) Sıcaklık 55°C

Noopazyme katalizörü varlığında hidroliz tepkimesi için, model optimizasyonu sonucunda iyileştirme ile %15 lipaz, yağ/su oranı (g/g) 0.20 ve sıcaklık 55°C koşulları için program yanıtı (SYA

dönüşümü) %98 olarak belirlenmiştir (Şekil 7). Optimizasyon çalışması sonucunda en etkili parametrelerin sıcaklık ve enzim miktarı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 7. Noopazyme katalizörlüğünde hidroliz tepkimesi için model optimizasyonu çalışması

Tasarlanan modelin ve deneysel sonuçların doğrulanması için en yüksek ve en düşük SYA dönüşümleri çalışılmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda en yüksek SYA dönüşümüne (%99), enzim miktarı 0.32 (%gr yağa göre), yağ/su oranı

0.13 (gr/gr) ve 63.52 °C sıcaklıkta ulaşılmıştır. Aynı koşullarda modelin öngördüğü SYA dönüşümü %98'dir. En düşük SYA dönüşümü (%73) enzim miktarı ve yağ su oranı aynı kalırken 21.48 °C sıcaklıkta elde edilmiştir. Bu koşullarda

Programın öngördüğü en düşük SYA dönüşümü %74.17'dir.

Ayrıca, önerilen modelin Cook mesafesi ve DFFITS ölçümleri ve her iki değer, önerilen modelin uygunluğu için 1'den az olmalıdır. DFFITS değeri önerilen bir istatistiksel regresyonda bir noktanın ne kadar etkili olduğunu

göstermek için kullanılan teşhisdir (Nigiz, 2019). Elde edilen sonuçlara göre, verilen sınır değerlerde tepkime koşulları uygulandığında SYA dönüşüm sonuçlarının kontrol edilebilir olduğu kabul edilmektedir. Tablo 7'de deneysel ve modelin öngördüğü sonuçlarının Cook mesafesi ve DFFITS ölçümleri görülmektedir.

Tablo 7 Deneysel sonuçları ve öngörülen değerlerin Cook mesafesi ve DFFITS ölçümleri

Deney Numarası	Deneysel SYA (%)	Öngörülen SYA (%)	Artık	DFFITS	Cook Mesafesi
1	83.00	81.62	1.38	1.983	0.359
2	87.00	85.39	1.61	*2.41	0.488
3	81.00	81.82	-0.82	-1.107	0.128
4	84.00	84.10	-0.095	-0.124	0.002
5	97.00	96.78	0.22	0.238	0.009
6	98.00	97.05	0.95	1.285	0.168
7	97.00	98.49	-1.49	*-2.17	0.417
8	96.00	97.26	-1.26	-1.776	0.299
9	92.00	91.52	0.48	0.508	0.028
10	93.00	93.66	-0.66	-0.694	0.052
11	90.00	92.41	-2.41	*-3.40	0.702
12	95.00	92.76	2.24	*2.99	0.605
13	73.00	74.17	-1.17	-1.295	0.166
14	99.00	98.00	1.00	1.087	0.121
15	92.00	92.16	-0.16	-0.042	0.000
16	94.00	92.16	1.84	0.504	0.025
17	92.00	92.16	-0.16	-0.042	0.000
18	92.00	92.16	-0.16	-0.042	0.000
19	90.00	92.16	-2.16	-0.610	0.034
20	93.00	92.16	0.84	0.218	0.005

*Limit dışı

3.4. Literatür ile karşılaştırma

Bu çalışmada, literatürde ilk defa *Chlorella protothecoides* mikroalg yağının enzim katalizli hidrolizi prosesine etki eden parametrelerin istatistiksel optimizasyonu yapılmıştır. Lipaz enzimleri varlığında farklı kaynaklardan elde edilen yağların ılımlı proses koşullarında hidroliz edildiği ve ürün saflaştırma işlemlerinin kimyasal katalizörlü proseslere karşın çevreci olduğu bilinmektedir. Literatürde farklı lipazlar varlığında farklı hammadde kaynağı kullanılarak yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışma ile yenebilen 1. Nesil yağlara alternatif günümüzde 3. Nesil mikroalg yağlarının hammadde olarak

kullanılabilirliği doğrulanmıştır. Mikroalg yağlarının kullanımı tarım arazilerine gerek duymadan yüksek kapasitelerde yetiştirilmeleri ve yüksek fotosentez kabiliyetleri açısından daha çevreci bir proses olma özelliği sunmaktadır. Tablo 8'de literatürde yapılmış çalışmalardan bazı lipaz katalizli hidroliz tepkimeleri verilmektedir.

Optimizasyon sonucunda en yüksek verimle elde edilen alg yağı SYA için yağ asidi bileşimi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar alg yağının %63 oleik asit ve %20 linoleik asit içerdiğini göstermiştir. Yağ asidi bileşimi Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 8. Farklı yağ kaynaklarının lipaz katalizli hidroliz tepkime çalışmaları

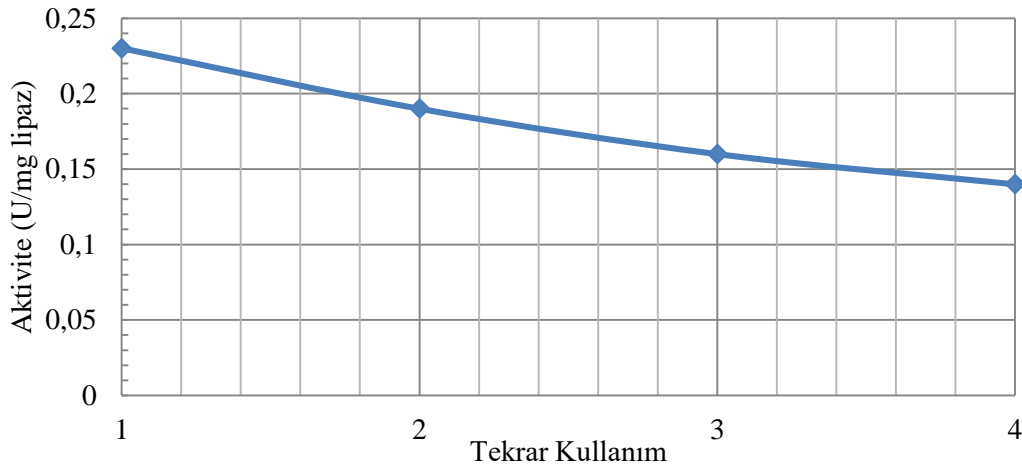
Yağ	Lipaz ve miktarı (yağa göre (gr))	Yağ/su oranı (g/g)	Sıcaklık(°C) ve zaman(saat)	SYA dönüşümü (%)	Kaynak
Soya	<i>Candida rugosa</i> %30	2/1	40 ve 5	88	Ting vd., 2008
Atık ayçiçek	<i>Candida rugosa</i> %5	1/1	30 ve 10	100	Talukder vd, 2010a
Soya	<i>Thermomyces lanuginosus</i> %2.3	1/1	60 ve 48	89	Oliveira vd., 2011
Fındık	<i>Jatropha curcas</i> L. %10	1/10	40 ve 2	98	Sousa vd., 2010
Palmiye macuaba	Lipozyme RM IM	1/2	30 ve 6	99	Aguieiras vd., 2014
Sabun stok	<i>Candida rugosa</i> %5	1/5	30 ve 24	92	Watanebe vd., 2007
Palmiye	<i>Candida rugosa</i> %1	1/1	30 ve 4	100	Talukder vd, 2010b
Mikroalg	Noopazyme %15	1/5	55 ve 24	96.5	Bu çalışma

Tablo 9. *Chlorella protothecoides* mikroalg yağının yağ asidi bileşimi

Yağ asidi	% Bileşim
C16:0 Palmitik	3
C16:1Palmitoleik	9
C18:1 Oleik asit	63
C18:2 Linoleik asit	20
C18:3α Linolenik asit	5

3.5. Noopazyme lipazının tekrar kullanılabilirliği

Elde edilen en yüksek SYA dönüşümüne (%98) ulaşılan deneysel koşullarda katalizörün tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması amacı ile aynı katalizör tepkimelerde tekrar kullanılmıştır. Her bir tepkime sonucunda lipazlar ortamdan ayrılıp buzdolabında bir sonraki tepkimede kullanılmak üzere +4°C de muhafaza edilmiştir. Ardışık kullanımı sonucunda lipazın aktivitesindeki değişim Şekil 8’de verilmiştir.

**Şekil 8.** Noopazyme lipazının tekrar kullanılması ile aktivitesinin değişimi

Şekil 8’den görüldüğü üzere Noopazyme enziminin hidroliz tepkimesinde 4 kez kullanımı sonucunda başlangıç aktivitesinin (0.23 U/mg Lipaz) yaklaşık %40’ını kaybettiği açıkça görülmektedir. Hidroliz tepkimeleri sonucunda lipaz ortamdan santrifüj ile ayrılarak n-hekzan ile yıkama işlemine tabi tutulmaktadır. Yıkama-ayırma periyotları sonucunda lipazın tutuklanmış olduğu iyonik olmayan reçinenin tepkime ve yıkama ortamında çözündüğü ve lipazın ayrıldığı düşünülmektedir. Ayrıca lipazın tekrar eden uzun tepkime süreleri boyunca protein yapısının bozularak aktivitesinin düştüğü bilinmektedir. Lipazın aktif bölgelerinin çözücü tarafından

olumsuz etkilenecek aktivitesinin olumsuz yönde etkileneceği bilinmektedir. Noopazyme lipazının tekrar kullanılabilirliğini arttırabilecek daha dayanıklı destek maddelerine (polimer yapılı örneğin kitosan ve polivinilalkol vb.) tutuklanarak kullanılması önerilmektedir.

4. Sonuçlar

Bu çalışmada son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı olan geleneksel (hayvansal, bitkisel) yağlara alternatif mikroalg yağının lipaz katalizörlüğünde çevre dostu ılımlı koşullarda gerçekleşen hidroliz prosesi ile birçok endüstride (kozmetik, petrol

yağlama yağı vb.) hammadde olarak kullanılan serbest yağ asitleri yüksek dönüşümlerle sentezlenmiştir. Lipaz katalizli hidroliz tepkimesine etki eden önemli parametrelerin (lipaz miktarı (%gr yağa göre), sıcaklık, yağ/su (g/g)) ve bu parametrelerin birbirleri ile ilişkileri/etkileşimleri istatistiksel olarak incelenmiştir.

Deneysel çalışmalar sonucunda aşağıdaki sonuçlar çıkarılmıştır;

Noopazyme lipazı katalizörlüğünde *Chlorella protothecoides* mikroalg yağının hidroliz tepkimesi için sıcaklık ve lipaz miktarının SYA dönüşümüne etkilerinin en önemli olduğu, bunun yanında yağ/su (g/g) oranının kısıtlayıcı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

İstatistiksel çalışma ve optimizasyon sonucunda yüksek SYA dönüşümü (%98), lipaz miktarı %15, yağ/su oranı (g/g) 0.20 ve sıcaklık 55°C olduğu optimum koşullarda elde edilebileceği belirlenmiştir.

Lipazın bu tepkimelerde 4 tekrar kullanımı sonucunda aktivitesinde %40 oranında düşüş gözlenmiştir.

Hidroliz tepkimesi sonucunda serbest yağ asitleri başarılı bir şekilde sentezlenmiş aynı zamanda tepkime yan ürünü olan gliserol de elde edilmiştir. Serbest yağ asitleri ve gliserolün endüstride birçok kullanım alanı mevcuttur. Yapılan bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, ileride yapılacak olan çalışmalar ve kurulması planlanan çevre dostu endüstriyel işletmeler için umut verici niteliktedir. Ayrıca hammadde olarak mikroalglerin ve yağlarının, bitkisel ve hayvansal yağlara alternatif, birim zamanda ve alanda daha fazla üretilebilir ve ekonomik olmaları nedeni ile yakın gelecekte yaygın olarak kullanılabilirliği öngörülmektedir.

Kaynaklar

Aguieiras, E. C. G., Oliveira, E. D., Castro, A. M., Langone, M. A. P. and Freire, D. M. G. (2014). Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. *Fuel*, 135, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.06.069>

Altın, N. (2017). *Chlorella variabilis türü mikroalgin büyümesine ve yağ içeriğine etki eden parametrelerin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.

Bahadi, M., Yusoff, M. F., Salimon, J. and Derawi, D. (2020). Optimization of response surface methodology by d- optimal design for alkaline hydrolysis of crude palm kernel oil. *Sains Malaysiana*, 49, 29–41. <https://doi.org/10.17576/jsm-2020-4901-04>

Castro, H. F., Mendes, A. A., Santos, J. C. and Aguiar, C. L. (2004). Modification of oils and fats by biotransformation. *Química Nova*, 27, 146–156. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100025>

Chen, W., Sun, S., Liang, S., Peng, L., Wang, Y. and Shen, M. (2014). Lipase-catalyzed hydrolysis of linseed oil: optimization using response surface methodology. *Journal of Oleo Science*, 64, 619–628. <https://doi.org/10.5650/jos.ess13189>

Chu, B. S., Quek, S. Y. and Baharin, B. S. (2003). Optimization of enzymatic hydrolysis for concentration of vitamin E in palm fatty acid distillate. *Food Chemistry*, 80, 295–302. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00178-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00178-4)

David, F., Sandra, P. and Vickers, A. K. (2005). Column selection for the analysis of fatty acids methyl esters. Application Agilent Technologies Incorporation.

Hasan, F., Shah, A. A. and Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 27, 782–798. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.001>

Hung, C. S., Nguyen, C. H., Nguyen, M. L., Tran, P. T., Wang, F. M. and Guan, Y. L. (2018). Liquid lipase-catalyzed hydrolysis of gac oil for fatty acid production: Optimization using response surface methodology. *Biotechnology Progress*, 34, 1129–1136. <https://doi.org/10.1002/btpr.2714>

Kumar, T., Kumar, S. and Kumar, S. (2003). Adsorption of resorcinol and catechol on granular activated carbon: equilibrium and kinetics. *Pergamon Carbon*, 41, 3015–3025. [https://doi.org/10.1016/S0008-6223\(03\)00431-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6223(03)00431-7)

Maruyama, T., Nakajima, M., Ichikawa, S., Nabetani, H., Furusaki, S. and Seki, M. (2000). Oil–water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 77, 1121–1127. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0176-4>

Montgomery, C. D. (2012). *Design and Analysis of Experiments* (8th ed.). New York: John Wiley & Sons.

- Murty, V. R., Bhat, J. and Muniswaran, P. K. A. (2002). Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7, 57–66. <https://doi.org/10.1007/BF02935881>
- Neena, N. G. (1997). Application of lipase. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 74, 621–634. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0194-x>
- Nigiz, F. U. (2019). Synthesis of a novel graphene–kaolin–alginate adsorbent for dye removal, and optimization of the adsorption by response surface methodology. *Research on Chemical Intermediates*, 45, 3739–3753. <https://doi.org/10.1007/s11164-019-03818-z>
- Oliveira, E. D., Silva, P. R., Ramos, A. P., Aranda D. A. G. and Freire, D. M. G. (2011). Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. *Enzyme Research*, <https://doi.org/10.4061/2011/618692>.
- Özgen, M. (2013). *Halofilik arkeal kaynaklı lipaz üretim koşullarının optimizasyonu ve aktif lipazın saflaştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Rooney, D. and Weatherley, L. R. (2001). The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid–liquid reactor. *Process Biochemistry*, 36, 947–953. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00130-3)
- Russell, V. L. (2009). Response surface methods in using RSM. *Journal of Statistical Software*, 32, 1-17. <https://doi.org/10.18637/jss.v032.i07>
- Sharma, A., Chaurasia, P. S. and Dalai, A. K. (2012). Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. *Catalysis Today*, 207, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2012.05.006>
- Sharma, S., Gangal, S. and Rauf, A. (2009). Lipase mediated hydrolysis of *Mimusops elengi Parkinsonia aculeata* and seed oils for determining the positional distribution of fatty acids. *Industrial Crops and Products*, 30, 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.04.004>
- Shrivastavs, A., Sandagar, P., Baja, I. and Singhal, R. (2008). Media optimization for the production of U-linolenic acid by *Cunninghamella Echinulata var. elegans* MTCC 522 using response surface methodology. *International Journal of Food Engineering*, 4, 1–32. <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1178>
- Stoytcheva, M., Montero, G., Zlatev, R., León, J. A. and Gochev, V. (2012). Analytical methods for lipases activity determination: a review. *Current Analytical Chemistry*, 8, 400–407. <https://doi.org/10.2174/157341112801264879>
- Sousa, J. S., Cavalcanti-Oliveira, E. D., Aranda, D. A. G. and Freire, D. M. G. (2010). Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65, 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.003>
- Talukder, M. M. R., Wu, J. C., Fen, N. M. and Melissa, Y. L. S. (2010a). Two step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.015>
- Talukder, M. M. R., Wu J. C. and Chua, L. P. L. (2010b). Conversion of waste cooking oil to biodiesel via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. *Energy Fuel*, 24, 2016–2019. <https://doi.org/10.1021/ef9011824>
- Ting, W. J., Huang, C. M., Nair G. R. and Wu W. T. (2008). An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 39, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.jcice.2008.01.004>
- Watanabe, Y., Nagao, T., Nishida, Y., Takagi, Y. and Shimada, Y. (2007). Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 84, 1015–1021. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1143-4>
- Xin, C., Wei, D. and Liu D. (2008). Effect of several factors on soluble lipase mediated biodiesel preparation in the biphasic aqueous-oil systems. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2097–2102. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9714-6>
- Yadav, G. D. and Borkar, I. V. (2009). Synthesis of n-butyl acetamide over immobilized lipase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 420–426. <https://doi.org/10.1002/jctb.2056>
- Yadav, G. D. and Devi, K. M. (2004). Kinetics of Hydrolysis of Tetrahydrofurfuryl Butyrate in a Three Phase System Containing Immobilized Lipase from *Candida Antarctica*. *Biochemical Engineering Journal*, 17, 57–63. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00125-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00125-6)
- Yadav, G. D., Sajgure, A. D. and Dhoot, S. B. (2008). Insight into microwave irradiation and enzyme

catalysis in enantioselective resolution of RS-methyl mandelate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 145–1153. <https://doi.org/10.1002/jctb.1975>

Yan, J., Liu, S., Hu, J., Gui, X., Wang, G. and Yan, Y. (2011). Enzymatic enrichment of polyunsaturated fatty acids using novel lipase preparations modified by combination of immobilization and fish oil treatment. *Bioresource Technology*, 102, 7154–7158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.065>

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

Zenevicz, M. P., Jacques, A., Furigo, A., Oliveira, J. V. and Oliveira, D. (2016). Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. *Industrial Crops and Products*, 80, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.031>