

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

RASEMİK-2-PENTANOLÜN LİPAZ KATALİZLİ KİNETİK REZOLÜSYONU

Aslı SOYER MALYEMEZ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2015**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

03 Ağustos 2015

Aslı SOYER MALYEMEZ

ÖZET

Doktora Tezi

RASEMİK-2-PENTANOLÜN LİPAZ KATALİZLİ KİNETİK REZOLÜSYONU

Aslı SOYER MALYEMEZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Emine BAYRAKTAR

Bu çalışmada, Alzhemir ilaçlarının üretiminde kiral ara bileşen olarak kullanılan sekonder alkol olan S-2-pentanolün, rasemik-2-pentanolün transesterleşmesi ile kinetik rezolüzyonuna enzim ve açıl verici türünün, substrat derişiminin, açıl verici/rasemik-2-pentanol mol oranının etkisi incelenmiş, Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) ile substrat ve enzim derişiminin optimizasyonu yapılmıştır. Kesikli sistemde iç ve dış kütle aktarım kısıtlamaları incelenerek, tepkime kinetik modeli belirlenmiş, sürekli sistemde dolgulu biyoreaktörde üretim koşulları incelenmiş, dolgulu biyoreaktör modelleri oluşturularak çözülmüştür.

Öncelikle üretim parametrelerinin belirlenmesi için farklı enzimler, farklı açıl vericiler kullanılmıştır. Enzim olarak Novozyme 435, açıl verici olarak vinil bütirat ile 30 dakikada S-2-pentanol için %99 enantiyomerik aşırılığa ve %50 dönüşüme ulaşılmıştır. Substrat ve enzim derişiminin kinetik rezolüsyona etkisine RSM ile sistematik olarak bakılmış, başlangıç tepkime hızını maksimum yapan koşullar belirlenmiştir. Maksimum koşul olarak 1500 mM substrat derişiminde 4 mg/ml enzimle 24.88 mM/dk başlangıç tepkime hızı elde edilmiş, deneysel olarak ise 28.48 mM/dk elde edilmiş, modelin deney ile uyumlu olduğu görülmüştür. Tutuklanmış enzim kullanımında dış ve iç kütle aktarım kısıtlamaları araştırılmış, 150 rpm ve daha yukarı karıştırma hızında dış kütle aktarım kısıtlamasının, başlangıç tepkime hızının, incelenen aralıkta enzim tanecik boyutundan etkilenmemesi nedeniyle iç kütle aktarım kısıtlamasının ihmal edilebileceği belirlenmiştir.

Kesikli sistemde çalışılarak tepkime kinetiğinin inhibiyonsuz Ping Pong bi bi modeline uyduğu belirlenmiştir. Polymath 6.1 paket programı kullanılarak kinetik sabitler olarak maksimum hız, 4.16 mmol/dk/g enzim, alkol için K_{mA} 103.73 mM, vinil bütirat için K_{mB} 51.18 mM bulunmuştur.

Sürekli sistemde $L/D=10$ ve $L/D=12.5$ olan iki farklı dolgulu kolon biyoreaktörde farklı akış hızlarında ve substrat derişimlerinde çalışılmış, sistem modellenmiş, MATLAB’de yazılan program ile çözülmüştür.

Ağustos 2015, 124 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sekonder alkoller, rasemik-2-pentanol, S-2-pentanol, kinetik rezolüsyon, lipaz

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

LIPASE CATALYZED KINETIC RESOLUTION OF RACEMIC-2-PENTANOL

Ash SOYER MALYEMEZ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof.Dr. Emine BAYRAKTAR

In this study, the effects of enzyme, acyl donor, substrate concentration and acyl donor/racemic-2-pentanol mol ratio on the kinetic resolution of racemic-2-pentanol, of which have been used as a key chiral intermediate required in the synthesis of several potential anti-Alzheimer drugs, with transesterification were investigated, and substrate and enzyme concentration was optimized with Response Surface Methodology (RSM). Internal and external mass transfer limitations were studied at batch mode and reaction kinetic model was obtained. Then continuous flow production parameters and packed bed bioreactor models were built and solved.

First, production parameters were investigated with different type of enzyme and acyl donor. The optimum transesterification conditions were obtained with Novozyme 435 and vinyl butyrate with the 50% conversion, 99% of enantiomeric excess for the substrate at 30 minutes. These conditions were used on the RSM and the optimum conditions were obtained with 1500 mM substrate and 4 mg/ml enzyme concentration with 24.88 mM/min maximum initial reaction rate. Maximum initial reaction rate was verified experimentally, and obtained at 28.48 mM/min. The close rate values showed that the equation was suitable for the reaction. Due to the use of immobilized enzyme, external and internal mass transfer limitations were studied, and it is concluded that above 150 rpm external mass transfer limitation could be negligible and there were no internal mass transfer limitation due to the ineffectiveness of the enzyme particular size on initial reaction rate.

It was obtained that Ping Pong bi bi mechanism without inhibition was the appropriate reaction kinetic for this process according to the studies with batch mode. Kinetic parameters were determined with Polymath 6.1 software and maximum reaction rates, K_m for R-2-pentanol and K_m for vinyl butyrate were found 4.16 mmol/min/g enzyme, 103.73 mM and 51.18 mM, respectively.

Continuous flow mode studies were held with two different packed bed bioreactor, which had $L/D=10$ and $L/D=12.5$. Investigations were carried out with different flow rates and substrate concentrations and process model was solved with MATLAB.

August 2015, 124 pages

Key Words: Secondary alcohols, racemic-2-pentanol, S-2-pentanol, kinetic resolution, lipase

TEŞEKKÜR

Bilimsel gelişimim için her türlü desteği gösteren, bilgi ve tecrübelerini bütün samimiyeti ile bana aktaran, doktora çalışmamı şekillendiren, gönlünde hem bilimi hem de sevgiyi sonsuz miktarda barındıran değerli danışmanım Prof.Dr. Emine BAYRAKTAR'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) ve manevi desteklerinden dolayı kıymetli ailesine; bilimsel yaklaşımlarıyla çalışmalarına yön veren, yoğun programlarına rağmen akademik desteklerini ve ilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU'na, (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) Prof.Dr. Selma ATEŞ'e (Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı) ve Prof.Dr.Afife GÜVENÇ'e, (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı)

Analizlerimi yapabilmem için bana laboratuvarlarındaki gaz kromatografi cihazını kullanabilme imkânını sağlayan Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI'ya, (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) Prof. Dr. Nuray YILDIZ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) ve çalışma gruplarına, gaz kromatografi cihazını kullanmada bana destek olan Sn. Nilüfer VURAL'a, model çözümünde katkıda bulunan Abdulwahab Giwa'ya,

Çalışmamı destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne (BAP proje no: 14L0443003),

Maddi ve manevi her alanda sonsuz fedakârlıklarıyla bana ve çalışmalarına inanan, beni yüreklendiren, desteklerini bir an olsun esirgemeyen, ufkumu ve vizyonumu açan, hayatımı renklendiren, beni hep bir adım ileri götüren, neşe, mutluluk ve huzur kaynağım, hayattaki en büyük şansım canım annem Asiye SOYER, babam Bilgin SOYER, kardeşlerim Op.Dr. Canan SOYER ÇALIŞKAN, Yard.Doç.Dr. Yeşim SOYER, İç Mimar Dilek SOYER, hayat arkadaşım Cem MALYEMEZ'e; anne yarılarım, canım teyzelerim, değerli öğretmenlerim Cahide CAN KÖKSAL ve Macide Nermin CAN başta olmak üzere tüm aileme; karnımda taşıdığım andan itibaren bana şans getiren fıstık Bade'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tamamlamış olduğum bu tezi, bana olan emeklerinden ve göstermiş oldukları sevgiden dolayı canım anneme ve babama armağan ederim.

Aslı SOYER MALYEMEZ

Ankara, Ağustos 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Kiralite ve Asimetrik Karbon	3
2.2 Stereokimya	4
2.3 Enantiyomerler, Diastereomerler	5
2.4 Stereokimyasal Tepkimeler	7
2.4.1 Enantiyomerleri kristallendirerek ayırma	7
2.4.2 Enantiyomerleri diastereomerlere dönüştürme	8
2.4.3 Rasematın asimetrik transformasyonu	8
2.4.4 Kinetik rezolüsyon	8
2.4.5 Dinamik kinetik rezolüsyon	9
2.5 Stereokimyasal Tepkimelerin Etkinliği.....	9
2.5.1 Dönüşüm	9
2.5.2 Enantiyomerik aşırılık	10
2.5.3 Enantiyomerik oran (Enantiyoseçimlilik)	10
2.5.4 Verimlilik	11
2.5.5 Seçimlilik.....	12
2.6 Cevap Yüzey Yöntemi.....	13
2.7 Alkoller ve 2-pentanol.....	16
2.8 Biyokatalizörler, Lipazlar	19
2.9 Dolgulu Kolon Biyoreaktörün Matematiksel Analizi	22
2.10 Enzim Kinetiği.....	25
2.10.1 Michaelis Menten kinetiği	26
2.10.2 Çift substratlı tepkime kinetiği	27
2.11 Kaynak Araştırması.....	33
2.11.1 Rasemik alkollerin kesikli işletim ile kinetik rezolüsyonu	34
2.11.2 Rasemik alkollerin sürekli işletim ile kinetik rezolüsyonu.....	51
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	58
3.1 Materyal	58
3.2 Yöntem	58
3.2.1 Enzim aktivitesi	58
3.2.2 Rasemik 2-pentanolün kesikli sistemde kinetik rezolüsyonu.....	59
3.2.3. Rasemik 2-pentanolün sürekli sistemde kinetik rezolüsyonu	59
3.2.4 Analiz Yöntemi	61
3.2.5 Deneysel tasarım/Cevap Yüzey Yöntemi (RSM).....	62
3.2.6 Farklı tanecik boyutunda Novozyme 435 elde edilmesi	63
3.2.7 Enantiyomerik aşırılığın hesaplanması.....	64

3.2.8 Dönüşümün hesaplanması.....	64
3.2.9 Enantiyomerik oranın hesaplanması	64
3.2.10 Başlangıç tepkime hızının hesaplanması.....	65
3.2.11 Kinetik parametrelerin hesaplanması.....	65
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	66
4.1 Enzim Türünün Etkisi	66
4.2 Açıl Verici Türünün Etkisi.....	68
4.3 Enzim Tanecik Boyutunun Etkisi.....	70
4.4 Karıştırma Hızının Etkisi.....	73
4.5 Substrat Derişiminin Etkisi.....	76
4.6 Açıl verici/rasemik-2-pentanol Mol Oranının Etkisi	78
4.7 Cevap Yüzey Yöntemi ile Substrat-Enzim Derişiminin Optimizasyonu	80
4.8 Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi.....	84
4.9 Sürekli İşletim Koşullarının Kinetik Rezolüsyona Etkisi.....	89
4.9.1 L/D=10 için yapılan sürekli işletim çalışmaları.....	89
4.9.2 L/D=12.5 için yapılan sürekli işletim çalışmaları	90
4.10 Kesikli ve Sürekli Sistemin Karşılaştırılması	94
4.11 Dolgulu Kolon Biyoreaktörün Modellenmesi ve Modelin Çözümü	95
4.12 Dolgulu Kolon Biyoreaktörün Modellenmesi, Piston Akış Modeli	101
5. SONUÇLAR	104
KAYNAKLAR	106
EKLER.....	110
EK 1 2-pentanolün Fiziksel Özellikleri.....	111
EK 2 Kullanılan Açıl Vericiler ve Özellikleri	112
EK 3 Hekzanın Fiziksel Özellikleri.....	113
EK 4 Örnek Kromotogram.....	114
EK 5 Derişimin Zamanla Değimi.....	115
EK 6 L/D=12.5 Olan Biyoreaktör İçin Ön Çalışma Sonuçları.....	116
EK 7 Re Sayısı Hesabı.....	117
EK 8 L/D=12.5 Olan Dolgulu Kolon Biyoreaktör İçin Maksimum Hızın Hacim Başına Hesaplanması	118
EK 9 Dolgulu Kolon Biyoreaktör Modelinin MATLAB Yazılımı ile Çözümü.....	119
EK 10 Kesikli Sistemde Elde Edilen Sonuçların Özeti.....	121
EK 11 Sürekli Sistemde Elde Edilen Sonuçların Özeti.....	122
ÖZGEÇMİŞ.....	123

SİMGELER DİZİNİ

c	Dönüşüm
C_A	R-2-pentanol derişimi
C_B	Vinil bütirat derişimi
C_S	Rasemik-2-pentanol derişimi
C_{S0}	Rasemik-2-pentanol başlangıç derişimi
C_E	Enzim derişimi
d_p	Enzim tanecik boyutu
D	Kolon çapı
D_z	Eksenel yönde difüzyon katsayısı
F_A	A bileşeni için molar akış hızı
ee_S	Substrat için enantiyomerik aşırılık
ee_P	Ürün için enantiyomerik aşırılık
E	Enantiyomerik oran
k_S	S-enantiyomer için tepkime hız sabiti
k_R	R-enantiyomer için tepkime hız sabiti
K_{iA}	Alkol için inhibisyon sabiti
K_{MA}	Alkol için Michaelis-Menten sabiti
K_{MB}	Açıl verici için Michaelis-Menten sabiti
L	Dolgulu kolon reaktör uzunluğu
m_e	Reaktördeki enzim miktarı
N	Karıştırma hızı
N_A	A bileşeni için kütle aktarım akısı
P	Verimlilik
r	Reaktör hacmi başına tepkime hızı
r_a	Kütle aktarım hızı
r_0	Reaktör hacmi başına başlangıç tepkime hızı
r''	Katalizör kütlesi başına tepkime hızı
r_m	Reaktör hacmi başına maksimum tepkime hızı
r''_m	Katalizör kütlesi başına maksimum tepkime hızı
t	Zaman
T	Sıcaklık
τ	Kalma süresi
Q	Hacimsel akış hızı
ε	Kolon boşluk kesri
U	Akış hızı
U_0	Boş kolon hızı
V	Reaktör hacmi (Boş reaktör hacmi)
V_k	Katı hacmi
$V_{boş}$	Kolon boşluk hacmi
z	Dolgulu reaktör eksenel konumu

Kısaltmalar

A	R-2-pentanol
B	Vinil bütirat
CALB	Tutuklanmış <i>Candida antarctica</i> lipaz B
dk	Dakika
ED	Eksenel dağılımlı dolgulu kolon biyoreaktör
GC	Gaz kromotografi
L/D	Dolgulu kolon biyoreaktör için kolon yüksekliği/kolon çapı
n	Substrat mol oranı
Nov.435	Novozyme 435
P	Verimlilik
ppm	Su miktarı
rpm	Dakikada devir
R-alk	R-2-pentanol
RSM	Cevap Yüzey Yöntemi
S	Seçimlilik
UV	Ultraviyole
VB	Vinil bütirat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Rasemik-2-pentanolün lipaz katalizli kinetik rezolüsyonu.....	2
Şekil 2.1	Akiral ve kiral tartarik asit molekülü.....	4
Şekil 2.2	R-laktik asidin metil esterine dönüşmesi.....	5
Şekil 2.3	Diastereomer ve enantiyomer arasındaki ilişki.....	6
Şekil 2.4	Kinetik rezolüsyon.....	8
Şekil 2.5	Rasemik karışımın %50 verimle kinetik rezolüsyonu.....	9
Şekil 2.6	Rasemik-2-pentanolün lipaz ile kinetik rezolüsyonunda transesterleşme ve hidroliz tepkimeleri.....	12
Şekil 2.7	Sahip oldukları radikal gruplarına göre alkollerin sınıflandırılması.....	16
Şekil 2.8	Lipaz katalizli kinetik rezolüsyonda kullanılan rasemik alkil alkol örnekleri.....	18
Şekil 2.9	2-pentanol.....	18
Şekil 2.10	Rasemik-2-pentanolün R ve S enantiyomeri.....	19
Şekil 2.11	Dolgulu kolon biyoreaktör için Δz kalınlığındaki hacim elemanı.....	22
Şekil 2.12	Substrat derişimi ile tepkime hızı arasındaki ilişki.....	26
Şekil 2.13	Enzim substrat tepkimesi.....	26
Şekil 2.14	Enzim kinetiğinde Michaelis-Menten eğrisi.....	27
Şekil 2.15	Üçlü kompleks oluşumu için düzenli mekanizma.....	28
Şekil 2.16	Üçlü kompleks oluşumu için rastgele mekanizma.....	28
Şekil 2.17	Ping Pong bi bi mekanizması.....	29
Şekil 2.18	Ping Pong bi bi mekanizması Cleland notasyonu.....	29
Şekil 2.19	Ping Pong bi bi mekanizması basamakları ve hız bağıntıları.....	30
Şekil 2.20	Ping Pong bi bi mekanizması için C_A 'ya karşı $1/r$	32
Şekil 2.21	Ping Pong bi bi mekanizması için C_B 'ye karşı $1/r$	32
Şekil 2.22	Farklı substrat derişimleri için C_A 'ya karşı $1/r$	33
Şekil 2.23	Rasemik alkollerin vinil bütirat ile hekzan ortamında serbest CALB.....	35
Şekil 2.24	Rasemik alkollerin vinil bütirat ile hekzan ortamında serbest CALB ile transesterleşmesinde enantiyomerik oranın değişimi.....	35
Şekil 2.25	3-klor-1-fenoksi-2-propanol için Tutuklanmış ve serbest CALB kullanımının enantiyomerik orana etkisi.....	36
Şekil 2.26	Rasemik-ketoprofen etil esterin tutuklanmış <i>T.laiabacchi</i> lipazı ile hidrolizi.....	37
Şekil 2.27	Rasemik-ketoprofen etil esterin tutuklanmış <i>T.laiabacchi</i> lipazı ile hidrolizi için karıştıma hızı ve enzim molekül çapının dönüşüme etkisi.....	38
Şekil 2.28	Rasemik-2-pentanolün süksinik anhidritle transesterleşmesi.....	39
Şekil 2.29	Rasemik-2-pentanolün vinil propiyonat ve serbest CALB ile kinetik rezolüsyonu.....	40
Şekil 2.30	Rasemik-2-pentanolün ([Bmim][NTf ₂] ortamında vinil propiyonat ile transesterleşmesi.....	41
Şekil 2.31	CALB biyokatalizörlüğünde vinil asetat ve süksinik anhidritle rasemik-alkil alkollerin kinetik rezolüsyonu.....	42
Şekil 2.32	Vinil stereat ve 2-pentanolün transesterleşme tepkimesine enzim miktarının etkisi.....	44
Şekil 2.33	Vinil stereat ile pentanolün tranesterleşme tepkimesi için elde edilen Linewear-Burk grafiği.....	45
Şekil 2.34	Rasemik-2-pentanolün transesterleşme tepkimesine açıl verici etkisi.....	45
Şekil 2.35	Açıl verici olarak vinil propiyonat kullanılması durumunda su miktarına bağlı sentetik etkinlik ve seçimlilik grafiği.....	46
Şekil 2.36	Açıl verici olarak vinil bütirat kullanılması durumunda su miktarına bağlı sentetik etkinlik ve seçimlilik grafiği.....	47
Şekil 2.37	Rasemik-2-pentanolün kinetik rezolüsyonuna su miktarının etkisi.....	47

Şekil 2.38	Rasemik-2-pentanolün vinil asetatla transesterleşmesi.....	48
Şekil 2.39	Farklı enzimler için dönüşüm ve verimlilik.....	49
Şekil 2.40	Substrat inhibisyonlu Ping Pong bi bi mekanizması.....	50
Şekil 2.41	Substrat derişiminin başlangıç hızına etkisi.....	51
Şekil 2.42	Enzimin kullanım tekrarına bağlı olarak dönüşüm değerleri.....	51
Şekil 2.43	Ketoprofenin-2-kloroetil esterinin hidrolizi.....	52
Şekil 2.44	S-ketoprofenin eldesinde akış hızı ile dönüşüm ve başlangıç hızının değişimi.....	52
Şekil 2.45	S-ketapfon üretiminde L/D oranının başlangıç hızına etkisi.....	53
Şekil 2.46	S-ketoprofen üretiminde yüksek substrat derişiminin dönüşüm ve başlangıç hızına etkisi.....	54
Şekil 2.47	Rasemik-1-feniletanol, 1-siklo hekzil etanol ve 1-fenilpropan-2-ol sürekli sistemde kinetik rezolüsyonu.....	54
Şekil 2.48	Rasemik-1-fenil etanolün sürekli sistemde kinetik rezolüsyonunda zamana karşı dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık.....	55
Şekil 2.49	Rasemik 1-fenilpropan-2-ol için enantiyomerik seçimliliğin ve enantiyomerik oranın sıcaklıkla ve basınçla değişimi.....	57
Şekil 3.1	Rasemik-2-pentanolün kesikli sistemde kinetik rezolüsyonu.....	59
Şekil 3.2	L/D=10 olan dolgulu kolon biyoreaktörde sürekli sistem çalışması.....	60
Şekil 4.1	Farklı enzim türleri için enantiyomerik aşırılığının zamanla değişimi.....	67
Şekil 4.2	Farklı enzim türleri için dönüşümün zamanla değişimi.....	68
Şekil 4.3	Farklı açıl vericiler için enantiyomerik aşırılığının zamanla değişimi.....	69
Şekil 4.4	Farklı açıl vericiler için dönüşümün zamanla değişimi.....	69
Şekil 4.5	Farklı tanecik boyutundaki enzim için zamana karşı enantiyomerik aşırılık.....	71
Şekil 4.6	Farklı tanecik boyutundaki enzim için zamana karşı dönüşüm.....	71
Şekil 4.7	Enzim tanecik boyutuna karşı başlangıç tepkime hızları.....	72
Şekil 4.8	Farklı karıştırma hızları için enantiyomerik aşırılığın zamanla değişimi.....	74
Şekil 4.9	Farklı karıştırma hızları için dönüşümün zamanla değişimi.....	75
Şekil 4.10	Farklı karıştırma hızları için başlangıç tepkime hızları.....	75
Şekil 4.11	Farklı substrat derişimleri için enantiyomerik aşırılığın zamanla değişimi.....	76
Şekil 4.12	Farklı substrat derişimleri için dönüşümün zamanla değişimi.....	77
Şekil 4.13	Yüksek substrat derişiminin başlangıç tepkime hızına etkisi.....	78
Şekil 4.14	Farklı açıl verici/rasemik-2-pentanol mol oranı için enantiyomerik aşırılığın zamanla değişimi.....	79
Şekil 4.15	Farklı açıl verici/rasemik-2-pentanol mol oranı için dönüşümün zamanla değişimi.....	80
Şekil 4.16	Substrat ve enzim derişiminin başlangıç tepkime hızına ikili etkisi.....	83
Şekil 4.17	Substrat ve enzim derişiminin başlangıç tepkime hızına ikili etkisi.....	83
Şekil 4.18	Deneyisel verilerin RSM ile elde edilen modelle karşılaştırması.....	84
Şekil 4.19	150 mM vinil bütirat derişimine karşı farklı derişimlerdeki rasemik-2-pentanol tepkimesi için süreye karşı R-2-pentanol derişimi.....	85
Şekil 4.20	150 mM rasemik-2-pentanol derişimine karşı farklı derişimlerdeki vinil bütirat tepkimesi için süreye karşı R-2-pentanol derişimi.....	85
Şekil 4.21	Başlangıç R-2-pentanol derişimine karşılık deneysel, Michaelis-Menten ve Ping Pong bi bi kinetiklerinin başlangıç tepkime hızı için karşılaştırması.....	89
Şekil 4.22	L/D=10 biyoreaktör için 0.6 dk kalma süresi için yüksek substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüme etkisi.....	90
Şekil 4.23	L/D=12.5 biyoreaktör için farklı kalma sürelerinin dönüşüme etkisi.....	90
Şekil 4.24	L/D=12.5 biyoreaktör için farklı kalma sürelerinin dönüşüme etkisi.....	91
Şekil 4.25	L/D=12.5 biyoreaktör için $\tau=0.04$ dk kalma süresinde substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüme etkisi.....	91

Şekil 4.26	L/D=12.5 biyoreaktör için $\tau=0.05$ dk kalma süresinde substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüme etkisi.....	92
Şekil 4.27	L/D=12.5 biyoreaktör için $\tau=0.06$ dk kalma süresinde substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüme etkisi.....	92
Şekil 4.28	Enzimin uzun süre kullanılmasının enantiyomerik aşırılığa ve dönüşüme etkisi.....	94
Şekil 4.29	Akışkanlar için dolgulu kolon reaktörde Re ve Pe sayıları arasındaki ilişki.....	96
Şekil 4.30	3 ml/dk akış hızı için modelsel olarak derişimin konumla değişimi.....	98
Şekil 4.31	4 ml/dk akış hızı için modelsel olarak derişimin konumla değişimi.....	99
Şekil 4.32	5 ml/dk akış hızı için modelsel olarak derişimin konumla değişimi.....	99
Şekil 4.33	5 ml/dk akış hızı için Michaelis Menten kinetik modeli için modelsel olarak derişimin konumla değişimi.....	100
Şekil 4.34	5 ml/dk akış hızı için 150 mM eş molar substrat derişimi için Ping Pong bi bi ile Michaelis-Menten kinetiğinin model üzerine etkisi.....	101
Şekil 4.35	PAT hidrodinamiği.....	101
Şekil 4.36	Eksenel dağılıma sahip dolgulu kolon biyoreaktör ile piston akış hidrodinamiğine sahip biyoreaktör için konuma karşı substrat derişimi.....	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	E değerlerine karşılık %99 enantiyomerik aşırılık için gerekli dönüşüm	11
Çizelge 2.2	Bağımsız değişken sayısına karşılık n_0 ve α değerleri	15
Çizelge 2.3	Enantiyomerik saflıkta üretimi yapılan sekonder alkol örnekleri	17
Çizelge 2.4	Lipaz kaynakları	21
Çizelge 2.5	Farklı lipaz kaynakları ve ölçüm yönteminin transesterleşmeye etkisi.....	43
Çizelge 2.6	RSM deney matrisi	49
Çizelge 2.7	Sontakke ve Yadav çalışmasındaki kinetik parametreler.....	50
Çizelge 2.8	Kesikli ve sürekli işletimin kinetik rezolüsyona etkisi	56
Çizelge 3.1	Sürekli sistem için kullanılan borsal biyoreaktörlerin özellikleri	60
Çizelge 3.2	RSM ile iki bağımsız değişken için elde edilen kodlu ve gerçek değerler.....	62
Çizelge 3.3	RSM ile elde edilen kodlu ve gerçek deney koşullar.....	63
Çizelge 4.1	Çalışılan farklı açıl verici/rasemik-2-pentanol mol oranları (n).....	78
Çizelge 4.2	RSM ile iki bağımsız değişken için elde edilen kodlu ve gerçek değerler.....	80
Çizelge 4.3	RSM sonucu elde edilen kodlu ve gerçek deneysel koşullar ve cevap değişkenin deneysel sonucu	81
Çizelge 4.4	Model için ANOVA değerleri	82
Çizelge 4.5	Farklı başlangıç substrat derişimleri için başlangıç tepkime hızları	86
Çizelge 4.6	Ping Pong bi bi mekanizması için substrat inhibisyonlu ve inhibisyonsuz durum için belirlenen kinetik parametreler	87
Çizelge 4.7	Ping Pong bi bi mekanizması kinetik parametreler	87
Çizelge 4.8	Michaelis-Menten mekanizması için kinetik parametreler	88
Çizelge 4.9	$L/D=12.5$ olan dolgu kolon biyoreaktörde farklı akış hızları ve derişimlerde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen $\%ee_s$ ve $\%c$	93
Çizelge 4.10	Kesikli ve sürekli işletimin karşılaştırılması	94
Çizelge 4.11	Farklı akış hızlarına karşılık gelen kalma süreleri (τ) ve Re sayıları	95
Çizelge 4.12	Farklı akış hızlarına karşılık gelen D_z ve U_0/ε değerleri.....	96
Çizelge 4.13	Ping Pong bi bi mekanizması için elde edilen eksenel dağılımı içeren tepkime modelleri..	97
Çizelge 4.14	Ping Pong bi bi mekanizmasına sahip model için kullanılan sınır koşulları.....	98
Çizelge 4.15	Michaelis-Menten mekanizmasına sahip model ve sınır koşulları	100

1. GİRİŞ

İlaçlar, fizyolojik sistemleri veya patolojik durumları alanın yararı için değiştirmek veya incelemek amacı ile kullanılan ve biyolojik etkinliği olan saf bir kimyasal madde ya da ona eş değer olan bitkisel veya hayvansal kaynaklı, standart miktarda aktif madde içeren karışımlardır (<http://turuz.com>). Vücut ağırlığı, yaş, cinsiyet, veriliş yolu, veriliş zamanı, çevresel ve genetik faktörler, ilaç etkisini tamponlayan ikincil olaylar gibi kiralite de ilaçların etkinliğini değiştiren etmenler arasındadır (<http://nabaci.blogspot.com>).

Enantiyomerler, ayna görüntüsü üst üste çakıştırılamayan kiral moleküllerdir. Kiral özellikleri dışındaki erime noktaları, kaynama noktaları, kiral olmayan çözücülerdeki çözünürlükleri gibi özellikleri aynıdır. Ancak enantiyomerlerin düzlem polarize ışığı çevirme yönleri farklıdır. Enantiyomerler, düzlem polarize ışığı eşit açıda ancak zıt yöne çevirirler. Bu durum, enantiyomerlerin biyolojik etkinliklerinin farklı olmasına neden olmaktadır. Enantiyomerlerden biri biyolojik aktiviteye sahip iken diğeri toksik etki gösterebilmekle beraber, diğeri enantiyomerin etkisini yok etme eğiliminde olabilmekte ve istenmeyen safsızlık olarak nitelendirilmektedir (Maier vd. 2001).

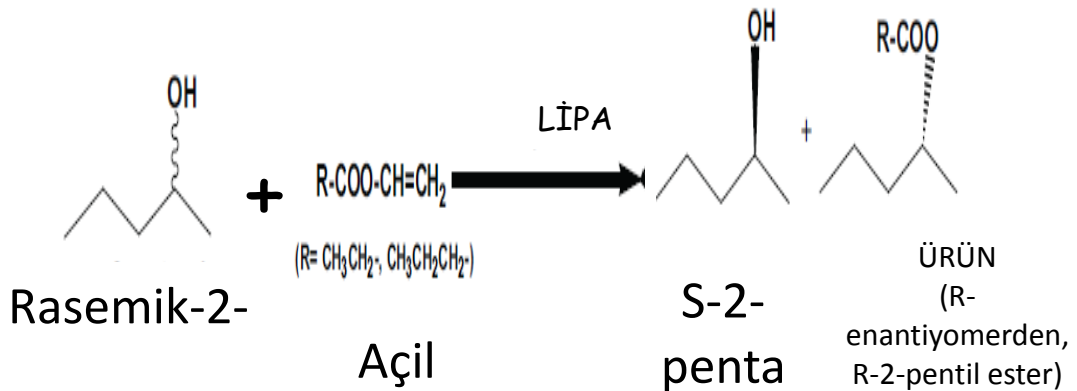
Farmasotik ilaç ve değerli kimyasal endüstrisinde tek enantiyomer elde edilmesi biyolojik ve ekolojik avantajlarından dolayı önemlidir. Pek çok ilacın etken maddesi kiral yapıya sahiptir. İlaçlarda sadece bir enantiyomer biyolojik olarak aktiftir ve farmakolojik açıdan etkinlik gösterir . Bu nedenle kiralite bir çok ilacın etkinliği için ana parametrelerden biridir. Örneğin, S-ketanin bir anesteziik ilaç iken, R-ketanin uyuşturucu maddedir. Bu tür etkilerden dolayı kiral ilaç sanayi son yıllarda çok büyük ilerlemeler göstermiş olup, dünyadaki ilaç üretim sanayisinin 1/3'ünü kiral ilaç sanayi oluşturmaktadır (de los Rios vd. 2010).

Kanser ilaçlarının, antihipertansiyon ilaçlarının, tromboksan A2 antagonistlerin, kalsiyum kanalı bloke edicilerin, potasyum kanalı açıcıların, anti Alzheimer ilaçlarının üretiminde kiral ara bileşenler kullanılmaktadır. Alzheimer ilaçları, β -amiloid peptit salınımını veya sentezini inhibe ederek etkisini göstermektedir. (S)-2-pentanol, bu tür ilaçların üretiminde kullanılan kiral ara bileşendir (Patel 2001).

Enzimler, kiral moleküller olduğu için kendileri gibi kiral olan diğer molekülleri tanırlar ve bu kiral özelliklerine göre tepkimeye girerler. Bu nedenle vücuda giren moleküllerin enantiyomerikçe saf olması ve doğru enantiyomerin alınması çok önemlidir. Enzimler ılımlı koşullarda etkinlik göstermelerinden, seçiciliklerinin yüksek olmasından dolayı, saf enantiyomer eldesinde yaygınca kullanılmaktadır. Biyokatalizör olarak enzimler, hem asimetrik sentez hem de kinetik rezolüsyon tepkimelerini katalizlemektedirler. Kinetik rezolüsyon ile daha fazla substrat kullanılabilmekte olup, asimetrik senteze göre ekonomik açıdan daha fazla tercih edilen bir yöntemdir (Suan ve Sarmidi 2004).

Kinetik rezolüsyon için optimum koşulların belirlenmesi için enzim kaynağı ve türü, substrat derişimi, tepkime ve işletme koşulları (kesikli işletim, sürekli işletim) incelenmektedir.

Enantiyomerikçe saf alkoller farmasotik ilaç sanayide kullanımı çok yaygın olan, önemli bileşiklerdir (Maier vd. 2001). Bu çalışmada, Alzheimer ilaçlarının üretiminde kiral ara bileşen olarak kullanılan S-2-pentanolün, rasemik-2-pentanol'den transesterleşme ile kinetik rezolüsyonu (Şekil 1.1) için kesikli sistemde tepkime koşullarının optimizasyonu araştırılmış, tepkime kinetik modeli belirlenerek kinetik parametreler bulunmuş, sürekli sistemde işletim koşulları incelenmiş, temel kimya mühendisliği yaklaşımı ile biyoreaktör sistemi modellenip çözümü gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1.1 Rasemik-2-pentanolün lipaz katalizli kinetik rezolüsyonu

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kiralite ve Asimetrik Karbon

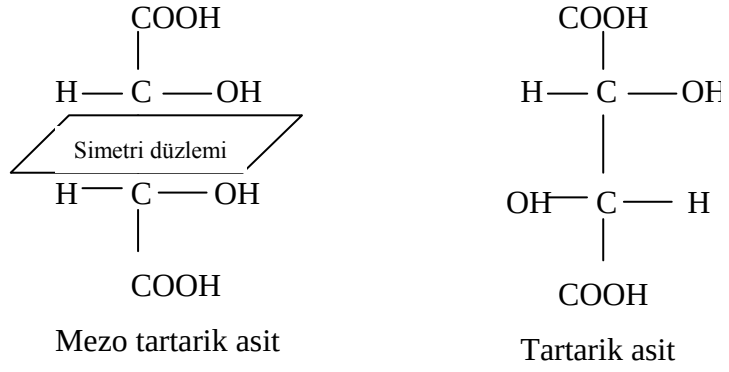
Kiral terimi, Yunancada el anlamına gelmektedir. Kiral moleküller arasındaki ilişki, sağ ve sol el arasındaki ilişkiye benzemektedir. Sağ ve sol elin parmak sayısı, parmakların sıralanışı birbirinin aynısıdır ve sağ el, sol elin ayna görüntüsüdür. Bununla birlikte sağ el, sol el ile üst üste çakıştırılmaz. Bu farklılık daha somut ve basit bir şekilde sağ eldivenin sol ele giyilememesi ile ifade edilebilir (Sheldon 1993).

Kiralite, bir molekülün düzlem polarize ışığın yönünü çevirebilme durumudur. Bu nedenle bir molekül ya “kiral” ya da “akiral”dır. Akiral bir molekülün kendisi ile ayna görüntüsü üst üste çakıştırılabilirken, kiral bir molekülün kendisi ile ayna görüntüsü üst üste çakıştırılmaz.

Normal (adi) ışık bir polarlayıcıdan geçirildiğinde, polarlayıcı elektriksel alanla etkileşerek, polarlayıcıdan çıkan ışığın elektriksel alanı (ve ona dik olan magnetik alan) yalnızca bir düzlemde titreşir. Düzlem polarize ışık, bazı özel maddelerden geçirildiğinde, polarize ışığın düzlemi çevrilir.

Kiral moleküller, düzlem polarize ışığın yönünü çevirebilen, optikçe aktif bileşiklerdir. Kiral moleküller, düzlem polarize ışığın yönünü aynı açıyla, ancak zıt yöne çevirir. Polarize ışığın yönünü sağa çeviren moleküller “+”, sola çeviren moleküller “-” ile gösterilmektedir.

Molekülünde dört farklı grup taşıyan karbon atomu; asimetrik karbon atomu, kiral karbon veya kiral merkez olarak adlandırılmaktadır. Bir molekülde asimetrik karbon atomu bulunması o molekülün kiral olduğu anlamına gelmez. Molekülün kiral olabilmesi için kiral merkeze sahip olması, buna karşın simetri düzlemine veya simetri eksenine sahip olmaması gerekir. Tartarik asit kiral bir molekül iken, mezo tartarik asit, simetri düzlemine sahip olduğu için kiral değildir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Akiral ve kiral tartarik asit molekülü (Elliel 1962)

2.2 Stereokimya

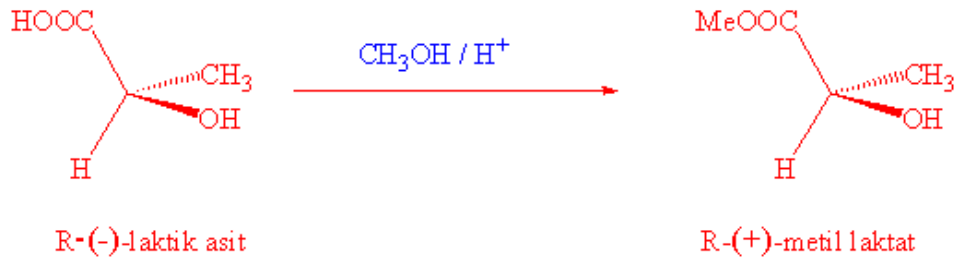
Stereokimya, moleküllerin üç boyutlu düzenlenmelerini ve bu düzenlenmeden kaynaklanan farklılıkları inceler.

Stereoizomerler, aynı sırayla birbirine bağlanmış, aynı atomlardan oluşan, üç boyutlu yapıları birbirinden farklı olan bileşiklerdir. Aynı bağlanma sırasında aynı molekül formülüne sahip olmaları nedeniyle stereoizomerlerin bazı fiziksel (düzlem polarize ışığı çevirme açısı, erime noktası, kaynama noktası, vb.) ve kimyasal özellikleri (kiral olmayan bileşenler tepkimeleri) aynıdır. Stereoizomerler, enantiyomerler ve diğer stereoizomerler (diastereoizomerler, cis-trans izomerleri vb.) olarak gruplandırılabilirler.

Stereoizomerlerin konfigürasyonları, Fisher izdüşümü veya Cahn, Ingold ve Prelog tarafından geliştirilen R/S konfigürasyonu ile belirlenebilmektedir. Son dönem çalışmalarına bakıldığında R/S konfigürasyonunun yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. R-S konfigürasyonu belirlenirken kiral merkeze bağlı dört grup öncelik sırasına konulur. Kiral merkeze bağlı grubun ilk atomunun atom numarası, önceliği belirlemede temel alınır. Atom numarası daha büyük olan grubun önceliği daha fazladır. Kiral merkeze doğrudan bağlı olan atomların iki ya da daha fazlası aynı atom numarasına sahip ise öncelik sırasını belirlemek için bu atomlara bağlı sonraki atomlara bakılır. Örneğin, kiral merkeze hem etil grubu hem de metil grubu bağlı ise etil grubu metil grubundan daha önceliklidir. Bu durum, metilde ikinci atomun hidrojen, etilde ise

ikinci atomun karbon olmasından kaynaklanmaktadır. Kiral merkeze bağlı dört grup öncelik sırasına konulduktan sonra, önceliği en az olan grup arkaya atılarak moleküle bakılır. Geriye kalan üç grubun öncelik azalma sırası saat yönünde ise molekülün konfigürasyonu R'dir. Eğer, bu azalma saat yönünün tersi yönde ise konfigürasyon S'dir.

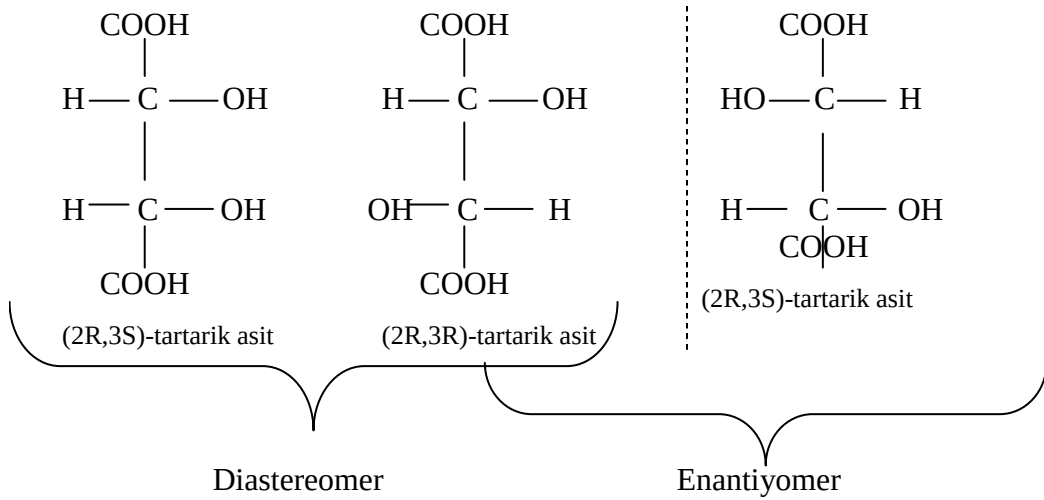
Optikçe aktiflik, yani düzlem polarize ışığın yönünün sağa veya sola çevrilmesi ile molekülün sahip olduğu konfigürasyon arasında belirgin bir ilişki yoktur. Örneğin R-laktik asit sola çeviren enantiyomerdir. R-laktik asit metil esterine dönüştürülürken, kirale karbon üzerindeki bağlar tepkimeye girmediği için konfigürasyon değişmezken, ürünün çevirme yönü (–) den (+) ya değişmektedir (Şekil 2.2) (Soyer 2007).



Şekil 2.2 R-laktik asidin metil esterine dönüşmesi

2.3 Enantiyomerler, Diastereomerler

Enantiyomerler, konstitüsyonları (molekülün sahip olduğu atomların türü, sayısı ve bağlanma şekli) aynı, konfigürasyonları (uzayda düzenleniş biçimleri) birbirinden farklı olan ve ayna görüntüsü üst üste çakıştırılmayan moleküllerdir. Konstitüsyonları aynı, konfigürasyonları farklı olan, birbirinin ayna görüntüsü olmayan izomerler ise diastereomer olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.3). Enantiyomerik durum, molekülde bir adet kirale (stereojenik) merkez bulunması halinde ortaya çıkar. Diastereomerik durum ise birden fazla kirale merkez bulunması halinde oluşabilir.



Şekil 2.3 Diastereomer ve enantiyomer arasındaki ilişki

Enantiyomerlerin erime noktaları, kaynama noktaları, yoğunlukları, spektrumları, kiral olmayan çözücüdeki çözünürlükleri, kiral olmayan bileşiklerle tepkimeleri aynıdır. Enantiyomerlerin kiral özellikleri yani düzlem polarize ışığı çevirme yönleri farklıdır. Bu nedenle enantiyomerlerin biyolojik etkinlikleri birbirinden farklıdır. Bir enantiyomer ilaç olarak kullanılırken, diğer enantiyomer etkisiz olabilir. (-) adrenalın kalp uyarıcı olduğu halde (+) adrenalın etkisizdir. Enantiyomerlerden biri antibiyotik olarak kullanılırken, diğeri toksik etki gösterebilir. Kirallığın ve enantiyomerlerin biyoloji dünyasındaki etkisi büyüktür. Bu durum biyolojik süreçlerin genellikle kiral moleküllerle yürümesinden kaynaklanmaktadır.

Biyolojik süreçlerde katalizör olarak görev yapan enzimler de kiral bileşiklerdir ve tepkimeye girecek oldukları moleküllerin kiral özelliklerini algılayarak, hangi enantiyomer ile tepkimeye gireceklerini ayırt ederler. Örneğin laktik asit dehidrojenaz enzimi, (+)-laktik asidi pürivik aside dönüştürürken, (-)-laktik asidi pürivik aside dönüştüremez. Birbirinin ayna görüntüsü olmayan diastereomerlerin kiral özellikleri de dahil olmak üzere birçok fiziksel ve kimyasal özellikleri de farklılık gösterir. Bu nedenle diastereomerler birbirlerinden farklı iki ayrı molekül olarak davranırlar.

Her iki enantiyomeri eşit miktarda içeren çözeltilere rasemat denilmektedir. Enantiyomerlerin biyolojik etkinlikleri birbirinden farklı olduğu için ilaç üretiminde rasemik karışım yerine saf enantiyomer kullanılması önemlidir.

Özetle, kimyasal maddelerin biyolojik özellikleri sadece içerdikleri atomlara bağlı değil, bu atomların uzayda düzenlenme biçimlerine de bağlıdır. Bu nedenle kullanılan ilaçlarda istenilen ve etkin olan enantiyomerin saf olarak alınması çok önemlidir (Faber 1953).

2.4 Stereokimyasal Tepkimeler

Kiral olmayan bileşiklerden kiral bir ürün elde edilirken, her iki enantiyomer aynı hızda ve eşit miktarda oluşur. Kiral bir bileşik ile kiral olmayan bir bileşiğin tepkimesinden yeni bir kiral merkez oluşursa, ürünler farklı hızda ve miktarlarda oluşur. İki enantiyomeri içeren karışımdan istenen enantiyomerin ayrılması gerekir. Bu işleme “rezolüsyon” denilmektedir. Rezolüsyon yöntemleri aşağıda özetlenmiştir.

2.4.1 Enantiyomerleri kristallendirerek ayırma

Rasematlar; konglomerat, rasemik bileşik ve psödorasematlar (katı çözelti) olmak üzere 3 farklı kristal türü oluştururlar. Konglomerat türü kristallenmede enantiyomerler mekanik olarak bire bir karışırlar ve her bir örgü bir enantiomerden oluşur. Başka bir deyişle tek bir kristal yapı, bir tek enantiyomerden oluşmaktadır. Bu sayede konglomerat türde kristallenen enantiyomerlerin, aşı kristalleri veya katkı maddeleri kullanılarak tercihli olarak kristallenmesi sağlanabilmektedir. Böylece enantiyomerlerden birinin kristallenmesi, diğerinin kristallenmemesi sağlanarak, istenilen enantiyomer rasemattan ayrılmış olur. Konglomerat türde kristallenebilen rasematlar, tüm rasematların ancak %20’sini oluşturmaktadır (Ghanem ve Aboul-Enein 2004).

2.4.2 Enantiyomerleri diastereomerlere dönüştürme

Enantiyomerler kiral bir bileşen ile tepkimeye girdiğinde diastereomer çifti elde edilmektedir. Bu yöntemle diastereomerlerin kiral olmayan özelliklerinin birbirinden farklı olmasından yararlanılarak, rasematın diastereomere dönüşmesi, sonrasında uygun yöntemle diastereomerlerin birbirinden ayrılması ve saflaştırılması sağlanır (Ghanem ve Aboul-Enein 2004). Devamında istenilen enantiyomerin elde edilmesi amacıyla, diastereomerin enantiyomere dönüştürülmesi ve tekrar saflaştırılması gerekir.

2.4.3 Rasematın asimetric transformasyonu

Rasematın kimyasal işlemle tek tip enantiyomere dönüştürülmesidir. Enantiyomerizasyon olarak da adlandırılmaktadır.

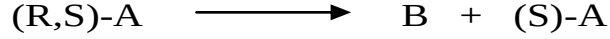
2.4.4 Kinetik rezolüsyon

İki enantiyomerin tepkimeye girme hızlarının birbirinden farklı olmasına dayanan bir ayırma yöntemidir. Kinetik rezolüsyonun gerçekleşebilmesi için bileşiğin R ve S enantiyomerinin tepkime hız sabitlerinin birbirinden farklı ($k_R \neq k_S$) olması gerekmektedir (Şekil 2.4). Kinetik rezolüsyonda kiral katalizör kullanılması durumunda süreç, “enzimatik kinetik rezolüsyon” veya “biyokatalitik rezolüsyon” olarak da adlandırılabilir (Kamal vd. 2008). Enantiyomerlerin tepkimeye girme hızlarının birbirinden çok farklı olduğu durumda, yani idealde (örneğin $k_R \gg 0$, $k_S = 0$ olması hali) sadece tek bir enantiyomer tepkimeye girer ve %50 dönüşüm gerçekleşir. Tepkime sonucunda %50 (S)-enantiyomer elde edilirken, %50 ürün oluşur (Şekil 2.5). Böyle bir durumda (R)-enantiyomer harcanıp B oluşurken, (S) enantiyomer tepkimeye girmeden tepkime ortamında kalmış olur.



Şekil 2.4 Kinetik rezolüsyon ($k_R, k_S \neq 0$)

$$k_R > k_S$$



Şekil 2.5 Rasemik karışımın %50 verimle kinetik rezolüsyonu

Kinetik rezolüsyonunun etkinliğini, enantiyomerlerin tepkimeye girme hızlarındaki farklılığı artırmak için araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalar arasında genellikle uygun çözücünün, açıl vericinin, sıcaklığın, substrat derişimin, enzim kaynağının belirlenmesi, kesikli sistemler için karıştırma hızı, sürekli sistemler için akış hızı gibi parametrelerin incelenmesi yer almaktadır.

2.4.5 Dinamik Kinetik Rezolüsyon

Kinetik rezolüsyonda verim teorik olarak en fazla %50 olabilmektedir. Dinamik kinetik rezolüsyon ile dönüşümün %50'nin üstüne çıkabilmesi için tepkimeye girmeyen S-enantiyomerin rasmenlenerek (enantiyomerikçe zenginleştirme: rasemata çevirip, enantiyomere döndürme) R-enantiyomere dönüşmesi ve R-enantiyomerin de R-ürüne dönüşmesi sağlanmaktadır (Ghanem ve Aboul-Enein 2004).

2.5 Stereokimyasal Tepkimelerin Etkinliği

Organik çözücü ortamında enzim katalizörlüğündeki tepkimeler için enantiyomerik oran (enantiyoseçimlilik) ve enantiyomerik aşırılık olmak üzere iki önemli kavram kullanılmaktadır (Ghanem ve Aboul-Enein 2004). Son yıllarda enantiyoseçimli tepkimelerin etkinliği için verimlilik ve seçimlilik kavramları da kullanılmaktadır. Söz konusu kavramlar aşağıda özetlenmiştir.

2.5.1 Dönüşüm

Kinetik rezolüsyon tepkimelerinde R, R-enantiyomerin; S, S-enantiyomerin belirli andaki derişimini; R_0 ve S_0 , R ve S enantiyomerlerinin başlangıç anındaki derişimlerini

göstermek üzere dönüşüm (c), eşitlik 2.1’de gösterildiği şekilde hesaplanmaktadır (Sontakke ve Yadav 2011).

$$c = 1 - \frac{R + S}{R_0 + S_0} \quad (2.1)$$

2.5.2 Enantiyomerik aşırılık

Enantiyomerik aşırılık, enantiyomerik saflığı ifade etmektedir. R enantiyomerin, S enantiyomerden fazla olduğu bir durum için R, R-enantiyomeri; S, S-enantiyomeri göstermek üzere substrat için enantiyomerik aşırılık, eşitlik 2.2’deki gösterildiği gibi hesaplanır.

$$ee_S = \frac{R - S}{R + S} \quad (2.2)$$

Bununla birlikte enantiyomerik aşırılık ürün için de tanımlanabilmektedir. Dönüşüm ve substrat için enantiyomerik aşırılık kullanılarak, ürün için enantiyomerik aşırılık (ee_P) aşağıdaki şekilde hesaplanabilir.

$$ee_P = \frac{ee_S}{(c - 1)} \quad (2.3)$$

2.5.3 Enantiyomerik oran (Enantiyoseçimlilik)

Enantiyomerik oran (E), enzimin enantiyoseçimliliğini, yani enantiyomerlerin tepkimeye girme hızlarının farklılığını ifade eder. Başka bir ifade ile enantiyomerik oran, kinetik rezolüsyonun etkinliğinin ölçüsüdür. Dönüşüm ve substrat için enantiyomerik aşırılık kullanılarak eşitlik 2.4 ile enantiyomerik oran hesaplanabilir. Daha yavaş tepkimeye giren enantiyomerin optikçe saf olarak elde edilebilmesi için dönüşümün %50’ye ulaştığı anda tepkime sonlandırılır. Böylece, tepkimeye girme hızı düşük olan enantiyomer (kalan enantiyomer), rasemik karışımdan enantiyomerikçe saf

olarak elde edilebilir. Dönüşümün %50'den fazla tutulması, kalan enantiyomerin tepkimeye girmesine neden olacağı için rezolüsyon oranını düşürür. %99 enantiyomerik aşırılık elde edilebilmesi için dönüşüme karşı E değerleri arasındaki ilişki (Sheldon 1993) çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 E değerlerine karşılık %99 enantiyomerik aşırılık için gerekli dönüşüm (Sheldon 1993)

E	% Dönüşüm	E	% Dönüşüm
5	86.6	200	51.1
10	72.1	300	50.6
20	61.9	500	50.3
50	54.9	1000	50.01
100	52.3		

Enantiyomerik oran, dönüşüm (c) ve enantiyomerik aşırılık (ee_s) değerleri kullanılarak aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmaktadır (Sontakke ve Yadav 2011).

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln[(1 - c)(1 + ee_s)]} \quad (2.4)$$

Optikçe saf enantiyomer elde edilebilmesi için E değeri en az 20 olmalıdır (Pellissier 2011, Sheldon 1993). Bununla birlikte iyi bir dinamik kinetik rezolüsyon için E'nin en az 30, tercihen 50-100 arasında olması gerektiği de belirtilmektedir (Kamal vd. 2008).

2.5.4 Verimlilik

Verimlilik (P), enantiyoseçimliliği ifade etmek için kullanılan kavramlardan biridir. Bir dakikada, 1 g enzim tarafından oluşturulan ürün miktarı olarak tanımlanmaktadır

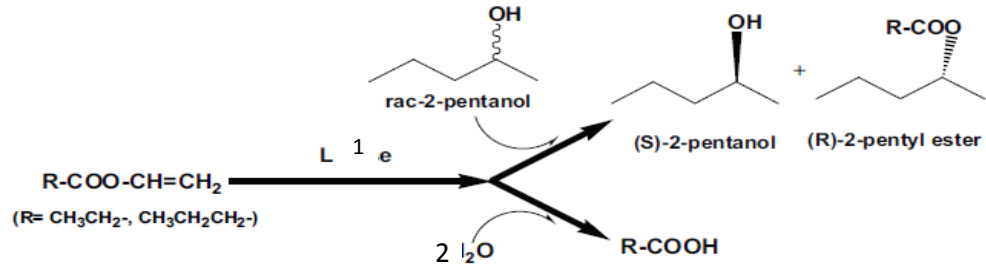
(Csajagi vd. 2008). C, ürün derişimini ($\mu\text{mol/mL}$); Q, akış hızını (mL/dk); m_e , kullanılan enzim miktarını (g); n, ürün mol miktarını (μmol); t, tepkime süresini (dk) göstermek üzere sürekli sistem için verimlilik, eşitlik 2.5’de, kesikli sistem için verimlilik, eşitlik 2.6’da gösterilmiştir. Ürün oluşum hızının, dönüşümün doğrusal fonksiyonu olmaması nedeniyle sürekli ve kesikli sistemin karşılaştırılabilmesi için aynı başlangıç derişimlerinde çalışılarak, aynı dönüşüm değerleri için hesaplama yapılması gerekmektedir (Csajagi vd 2008).

$$P_{\text{sürekli}} = \frac{C \times Q}{m_e} \quad (2.5)$$

$$P_{\text{kesikli}} = \frac{n}{t \times m_e} \quad (2.6)$$

2.5.5 Seçimlilik

İkincil alkollerin lipaz katalizli transterleşme tepkimesinde suyun varlığı dikkate alınarak, hidroliz tepkimesi ile esterleşme tepkimesinin (Şekil 2.6) yarışmalı olabileceği belirtilmektedir. Hidroliz tepkimesi sonucunda asit oluştuğu, esterleşme tepkimesi sonunda ürün oluştuğu göz önüne alınarak, seçimlilik (S), ürün oluşum hızının açıl verici tüketim hızına oranı olarak tanımlanmaktadır. v_e , bir dakikada oluşan μmol ürünü; v_a , bir dakikada oluşan μmol asit (hidroliz ürünü) miktarını göstermek üzere seçimlilik eşitlik 2.7 ile hesaplanır (de los Rios vd. 2010).



Şekil 2.6 Rasemik-2-pentanolün lipaz ile kinetik rezolüsyonunda transesterleşme (1) ve hidroliz (2) tepkimeleri (de los Rios vd. 2010)

$$S = \frac{v_e}{v_e + v_a} \quad (2.7)$$

2.6 Cevap Yüzey Yöntemi

Bir deney koşulunun değiştirilip diğer koşulların sabit tutulması şeklinde uygulanan klasik optimizasyon metotlarında, bağımsız değişkenlerin (parametrelerin) sürece etkisinin ayrı ayrı belirlenmesi nedeniyle zaman alıcı birçok deneyin yapılması gerektiği, bununla beraber bu deneylerle bağımsız değişkenlerin ikili etkileşiminin sürece etkisinin tespit edilemediği bilinmektedir (Murthy vd. 2000).

Cevap yüzey yöntemi (RSM), deneysel tasarım ile istatistiki ve matematiksel teknikleri içeren, bağımsız değişkenlerin, bağımlı değişkene (cevap değişkeni) etkisini belirten ve bağımsız değişkenlerin, yani tepkime parametrelerinin bağımsız değişkene, yani cevaba etkisinin modellenmesini sağlayan bir yöntemdir. Deneysel tasarım ile cevaba etki eden parametreler aynı anda incelenebildiğinden, yapılan deney sayısı klasik yöntemlere göre azalmaktadır (Bayraktar 2001). RSM sürecinde deneysel ve istatistiki veriler ile matematiksel model bir arada değerlendirilmekte ve böylece deneysel tasarım için sistematik yol belirlenmektedir. RSM ile en çok bilgiye ulaşılacak noktalarda deney yapılmasını sağlayarak, deneysel tasarım tekniklerindeki problemlerin (tepkime yolunun belirlenmesi, tepkime hız verilerinin tespiti vb.) azaltılmasına yardımcı olduğu (Bayraktar 2001) ve istatistiki yöntemler ile elde edilen sonuçlarla cevap değişkeninin (bağımlı değişken) deney yapılmadan öngörülebilmesinin sağlandığı (Murthy vd. 2000) ifade edilmektedir.

Deneysel tasarım için aşağıda belirtilen aşamalar dikkate alınır (Canpulat Kapucu 2003):

1. Problemin tanımlanması,
2. Problemin etkenlerinin (bağımsız değişkenlerin) seviyesinin ve aralığının seçilmesi,
3. Cevap değişkeninin belirlenmesi,

4. Deneysel tasarım seçimi,
5. Deneylerin gerçekleştirilmesi,
6. Deneysel verilerin istatistiki analizinin yapılması,
7. Sonuçların değerlendirilmesi.

Yukarıda belirtilen aşamalar neticesinde optimum parametreleri içeren matematiksel fonksiyon, yani cevap fonksiyonu elde edilir (Eşitlik 2.8).

$$Y=f(x_1,x_2,\dots,x_k)+\epsilon \quad (2.8)$$

Eşitlik 2.8'deki $x_1, x_2, \dots, x_k$ bağımsız değişkenlerdir ve faktör olarak adlandırılırlar. Y ise bağımlı değişken, yani cevap değişkenidir. Süreci tanımlayan bağımsız değişkenler cevabı doğrusal ise fonksiyon birinci derece elde edilir.

$$Y=\beta_0+\beta_1x_1+\beta_2x_2+\dots+\beta_kx_k+\epsilon \quad (2.9)$$

Süreçte herhangi bir kavislenme var ise, süreç tanımlaması yüksek dereceli polinomlar ile şu şekilde tanımlanır:

$$Y=\beta_0+\sum_{k=1}\beta_1x_i+\sum\beta_{ii}x_i^2+\sum\sum\beta_{ii}x_ix_j+\epsilon \quad (2.10)$$

Eşitlik 2.9 ve 2.10'daki β_0 regresyon eşitliğinin bağımsız terimini, β_i doğrusal terimi, β_{ii} ikinci derece terimi ve ϵ deney hatasını ifade etmektedir. Bu deneysel tasarım yönteminde boyutsuz koordinat sisteminde çalışılır. Boyutsuz koordinat sisteminde "0" merkez noktayı ifade etmektedir. Bağımsız değişkenler eşitlik 2.11'de belirtildiği gibi ifade edilmektedir. Buradaki x_1 , bağımsız değişkenin kodlu değerini, X_1 gerçek değerini, X_0^* merkez noktadaki gerçek değerini, ΔX ise basamak değişimini göstermektedir (Murthy vd. 2000).

$$x_1=(X_1X_0^*)/\Delta X \quad (2.11)$$

Bağımsız değişken sayısına göre süreçteki deney sayısı N , n_0 merkezi noktada yapılan deney sayısını, k bağımsız değişken sayısını göstermek üzere şu şekilde belirlenir:

$$N=2^k+2k+n_0 \quad k<5 \quad (2.12)$$

$$N=2^k+2k+n_0 \quad k\geq 5$$

İkinci derece eksen üzerinde α değeri eşitlik 2.13 ile ifade edilmektedir. Farklı k değerlerine karşılık n_0 ve α değerleri Çizelge 2.2’de gösterilmiştir (Canpulat Kapucu 2003).

$$\alpha = 2^{\frac{k}{4}}$$

$$\alpha = 2^{\frac{k-1}{4}} \quad (2.13)$$

Çizelge 2.2 Bağımsız değişken sayısına karşılık n_0 ve α değerleri (Canpulat Kapucu 2003)

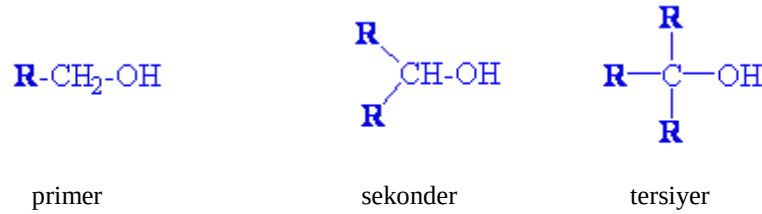
k	2	3	4	5	5	6	6	7	7
Tasarım	2^2	2^3	2^4	2^5	2^{5-1}	2^6	2^{6-1}	2^7	2^{7-1}
α	1.414	1.682	2.00	2.378	2.00	2.828	2.378	3.33	2.828
n_0	5	6	7	10	6	15	9	21	15

İstatistiki yöntemlerle sürecin optimum koşulları, regresyon denkleminin çözümü ile belirlenebilmekle beraber, cevap yüzeyin “contour” (ikili etkileşim) grafikleri ile de belirlenebilir. Bahse konu grafiklerde dairesel şekiller elde edilmesi, belirtilen bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin ihmal edilebilir olduğunu; eliptik veya eyer şekiller elde edilmesi ise bağımsız değişkenlerin birbirini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir (Murthy vd. 2000).

2.7 Alkoller ve 2-pentanol

Alkoller, önemli kiral ara bileşen olarak yaygın kullanım alanına sahiptirler. Bunun sebebi alkollerin bir çok farmakolojik ürünün çıkış maddesi olmasıdır. Örneğin 1-fenil-1-propanol türevleri ilaç etken madde olarak kanser ilaçlarının, uyarıcı ve solunum açıcı ilaçların elde edilmesinde kullanılmaktadır.

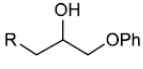
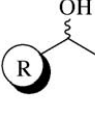
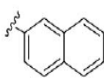
Alkoller, hidroksil ($-OH$) grubu içeren bileşikler olup, molekülün sahip olduğu hidroksil grubunun sayısına göre monoalkoller, dialkoller (glikoller), trialkoller, polialkoller olarak sınıflandırılabilirler. Alkoller, hidroksil grubunun bağlı olduğu karbon atomuna bağlı olan radikal grubu sayısına göre primer (birincil), sekonder (ikincil) ve tersiyer alkol olarak adlandırılmaktadır. Fonksiyonel grubun bağlı olduğu karbon atomuna bir radikal bağlıysa primer (RCH_2-), iki radikal grup bağlıysa sekonder (R_2CH-), üç radikal grup bağlıysa tersiyer (R_3C-) alkol olarak belirtilmektedir (Şekil 2.7).



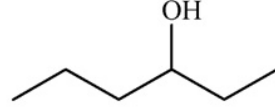
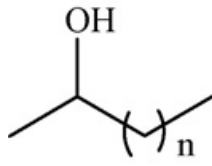
Şekil 2.7 Sahip oldukları radikal gruplarına göre alkollerin sınıflandırılması

Kiral sekonder alkoller, ketonların mikrobiyal indirgenmesi ve rasemik bileşiklerinin rezolüsyonu ile elde edilebilmektedirler. Rasemik bileşiklerin rezolüsyonu ile enantiyomerikçe saf alkol elde edilmesi çalışmalarında genellikle alifatik gruplar yerine, fenil grupları gibi büyük gruplar içeren bileşikler kullanılmıştır (Patel vd. 2000). Kinetik rezolüsyon yöntemi ile enantiyomerik saflıkta sekonder alkol elde edilmesi için yapılan çalışmalara çizelge 2.3’de örnek verilmiştir.

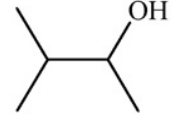
Çizelge 2.3 Enantiyomerik saflıkta üretimi yapılan sekonder alkol örnekleri

Bileşiğin açık hali			Bileşiğin adı	Araştırmacı
 R; a-ç	a	CH ₃	1-fenoksi-2-bütanol	Jacobsen vd. 2003
	b	CH ₂ CH ₃	1-fenoksi-2-pentanol	
	c	Br	1-brom-3-fenoksi-2-propanol	
	ç	Cl	1-klor-3-fenoksi-2-propanol	
 R; a-c	a		a. ras-1-fenil etanol	Nagy vd. 2006
	b		b. ras-1-siklohekzil etanol	
	c		c. ras-1-nafta2-yl-etanol	

Sekonder alkollerin optikçe saf enantiyomerleri tıp, gıda, ziraat, organik kimya gibi birçok alanda yaygınca kullanılan önemli bileşenlerdir (Cong vd. 2005). Örneğin 1-fenil etanol, ilaç, ziraat ve doğal ürün sentezinde önemli bir kiral bileşendir (Habulin ve Knez 2009). Sekonder alkil alkoller özellikle organik kimyada kullanılan önemli ara bileşiklerdir. Şekil 2.8’de lipaz katalizli kinetik rezolüsyonda kullanılan sekonder rasemik alkil alkol örnekleri yer almaktadır (Wang vd. 2009a).

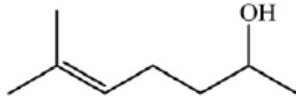


3-hekzanol

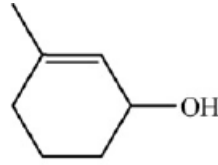


3-metil-2-bütanol

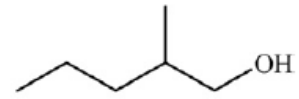
n=1: 2-bütanol
n=2: 2-pentanol
n=3: 2-hekzanol
n=4: 2-heptanol
n=5: 2-oktanol



6-metil-5-hepten-2-ol



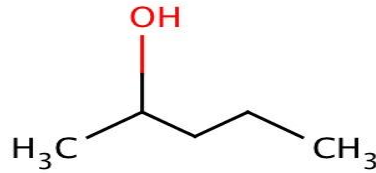
3-metil-2-siklohekzen-1-ol



2-metil-1-pentanol

Şekil 2.8 Lipaz katalizli kinetik rezolüsyonda kullanılan rasemik alkil alkol örnekleri (Wang vd. 2009a)

2-pentanol (Şekil 2.9), 119⁰C kaynama noktasına sahip, kapalı formülü $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (s-pentil alkol) olan sekonder bir alkoldür.



Şekil 2.9 2-pentanol (pentan-2-ol)

Rasemik-2-pentanolün R enantiyomeri polarize ışığın düzlemini saat yönünün tersine, S enantiyomeri ise saat yönünde çevirmektedir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Rasemik-2-pentanolün R ve S enantiyomeri

S-(+)-pentanol, β -amiloid peptid salınımını veya oluşumunu azaltan Alzheimer ilaçlarının üretiminde kullanılan kiral bir ara bileşendir (de los Rios vd. 2010). Bu nedenle ilaç üretiminde olabildiğince saf olarak kullanılması gerekmektedir.

2.8 Biyokatalizörler, Lipazlar

Kinetik rezolüsyonda katalizör olarak enzim kullanılmasının bir çok avantajı olduğu, kimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında tepkime hızını 10^{12} kat artırdığı, yüksek etkinlik ve enantiyoseçimlik değerlerine ulaşıldığı belirtilmektedir (Kamal vd. 2008). Bununla birlikte enzimler toksik olmayıp, biyolojik olarak bozunabildikleri için doğa dostu moleküller olup; kimyasal katalizörlere göre çok daha az zararlı ve kirleticilerdir. Enzimler, ılımlı koşullarda etkinlik göstermeleri, substrat seçimliliklerinin yüksek olması gibi nedenlerle rasemat rezolüsyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Karboksilik asit ester hidrolazları sınıfına giren lipazlar (EC 3.1.1.), önemli kimyasalların sentezlenmesinde geniş alanda kullanılan, kolay bulunabilen (hem tutuklanmış hem de serbest formları), kofaktöre ihtiyaç duymayan biyokatalizörlerdir. Lipazlar, sulu ortamlarda hidroliz tepkimelerini, susuz ortamlarda ise geri yöndeki esterleşme veya transesterleşme tepkimesini katalizlerler. Deterjan, süt, tanı, yağ üretimi, biyodönüşüm lipazların kullanıldığı başlıca alanlardır. Lipazlar, doğal olmayan molekülleri de substrat olarak kabul ettiklerinden dolayı organik kimya alanında da geniş bir yelpazede kullanılabilmektedir (Kamal vd. 2008). Günümüzde bu alanların arasına kinetik rezolüsyon tepkimeleri de eklenmiştir ve rasemik alkollerin transesterleşmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu durum lipazların enantiyomerik molekülleri ve grupları, yüksek enantiyoseçimlilikle tanınmasından kaynaklanmaktadır. Bu önemli özellik, lipazların rasemik bileşiklerden teorik olarak

%50 verimle kinetik rezolüsyon işlemini gerçekleştirmelerini sağlamaktadır. Lipazların etkinlikleri ve seçimlilikleri, reaksiyon ortamına bağlı olarak birçok faktörden etkilenmektedir (Berglund 2001). Bununla birlikte geniş bir aralıktaki alkoller substrat olarak kabul etmelerine rağmen, rasemik alkollerin transesterleşmesinde enantiyoseçimlilikleri daima yüksek değildir. Bu nedenle enantiyoseçimliliklerinin artırılması için inceleme yapılması gerekmektedir (Kawasaki vd. 2001). Enzimlerin enantiyoseçimliliklerini artırmak için tutuklama, kimyasal modifikasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bazı durumlarda bu yöntemler enzimin substrat seçimliliğini etkilediği belirtilmektedir. Örneğin serbest enzimlerin substrat olarak uzun yağ asidi (C14-C18) zincirlerini tercih ettiği, tutuklanmış enzimlerin ise kısa yağ asidini tercih ettiği (C2-C6); *P.cepacia* lipazının polipropilene tutuklandıktan sonra substrat seçimliliğinin değiştiği bildirilmektedir (Kapoor ve Gupta 2012).

Lipaz etkinliğinin alkollerin primer, sekonder veya tersinir olmasına göre değiştiği; etkinlik sırasının primer>sekonder>tersiyer alkol şeklinde olduğu ve tersiyer alkoller ile esterlerinin lipazlar için zayıf substrat olduğu bildirilmektedir (Kapoor ve Gupta 2012).

Organizmalarda çokça bulunan lipazlar; bakteri, mantar, insan ve bitki kaynaklı olabilir (Çizelge 2.4) ve ticari olarak elde edilebilirler. Lipazlar, hidroliz, esterleşme ve transesterleşme tepkimelerinde alkol, amin ve ester gibi molekülleri substrat olarak kabul ederler (Kapoor ve Gupta 2012).

Lipazların aktif konumunu perdeleyen, koruyan, “kapak” olarak adlandırılabilen bir oligopeptit sarmala sahip olduğu ve bu sarmalın enzimin aktif konumunu dış etkenlere karşı koruduğu, yağ damlacığı gibi hidrofobik arayüzeylerle etkileşime geçerek, aktif konum ile substratın daha kolay bir araya gelmesini sağladığı düşünülmektedir. Mantar kaynaklı lipazlar arasında yer alan *Candida antarctica* lipaz B’nin, diğer lipazlarla kıyaslandığında daha küçük ve daha basit bir kapağa sahip olduğu ve bu durumun *Candida antarctica* lipaz B’ye tepkimeye daha kolay girme özelliği kazandırdığı belirtilmektedir (Kapoor ve Gupta 2012).

Çizelge 2.4 Lipaz kaynakları (Kapoor ve Gupta 2012)

Lipaz kaynağı	Adı
Bakteri	<i>Bacillus thermocatenulatus</i> <i>Burkholderia glumae</i> (<i>Pseudomonas glumae</i>) <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>) <i>Bacillus subtilis</i> <i>Chromobacterium viscosum</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> ^a
Mantar	<i>Aspergillus niger</i> ^a <i>Candida rugosa</i> (<i>Candida cylindracea</i>) Non-specific <i>Candida antarctica</i> A ^b <i>Candida antarctica</i> B <i>Geotrichum candidum</i> <i>Penicillium camembertii</i> (<i>Penicillium cyclopeum</i>) <i>Penicillium expansum</i> <i>Rhizomucor miehei</i> (<i>Mucor miehei</i>) <i>Rhizopus delemar</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Thermomyces lanuginosa</i> (<i>Humicola lanuginosa</i>)
Bitki	<i>Brassica napus</i> (Kanola)
Hayvan	<i>Canis lupus familiaris</i> (dogs) <i>Equus caballus</i> (equine) Porcine pancreatic lipase ^a Human pancreatic lipase <i>Sus scrofa</i> (wild bear)

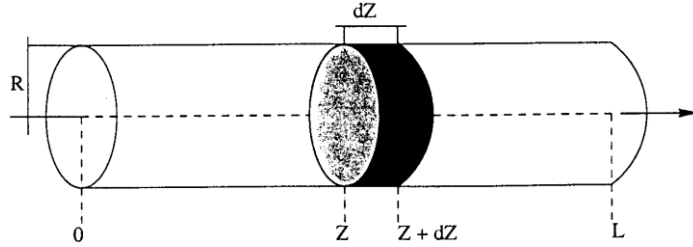
Lipazların etki mekanizması şu şekilde belirtilmektedir: Lipazın aktif konumdaki hidroksil grubu, esterdeki karbon grubuna nükleofilik etki gösterir ve tetrahedral yapı oluşturur. Bu yapıdan bir alkol çıkması ile açıl verici-enzim kompleksi meydana çıkar, bu kompleksden nükleofilik etki ile oluşan tetrahedral yapıdan asit kaybı ile ürün oluşur ve enzim doğal haliyle kalır (Kapoor ve Gupta 2012).

Bir substratın enantiyoseçimliliğinde lipaz kaynağı da önemli rol oynamaktadır. Primer alkollerin transesterleşmesinde *Pseudomonas cepacia* lipazının etkili olduğu bilinmektedir. Ancak sekonder alkollerde *Pseudomonas cepacia* lipazı kullanılabildiği

gibi *Candida antarctica*, *Porcine pancrease*, *Candida rugosa*, *Mucor miehei* lipazları da kullanılabilmektedir (Suan ve Sarmidi 2004). Bununla birlikte *Candida antarctica* lipaz B'nin sekonder alkoller için yüksek enantiyoseçimliliğe sahip olduğu bilinmektedir (Leonard vd. 2004). *Candida antarctica* lipaz B, enantiyoseçimliliğini rasemik alkolün R-alkolü yönünde kullanmaktadır. Diğer bir deyişle istenmeyen enantiyomer olan R-enantiyomerin açillenmesini katalizlerken, istenilen ürün olan S-enantiyomerin tepkimeye girmeyen bileşen olarak tepkime ortamında kalmasını sağlamaktadır (Patel vd. 2000).

2.9 Dolgulu Kolon Biyoreaktörün Matematiksel Analizi

Lipaz katalizörlüğünde yapılan kinetik rezolüsyon çalışmalarında tepkimeler izotermal şartlarda gerçekleşmektedir. Bu nedenle izotermal olarak işletildiği kabul edilen dolgulu kolon biyoreaktörün matematiksel analizi yapılmıştır. Dolgulu kolon biyoreaktör reaktör için Δz kalınlığında hacim elemanı alınarak (Şekil 2.11); N_A , A bileşeni için kütle aktarım akısını; r_a , kütle aktarım hızını göstermek üzere kütle korunum denkliği oluşturulmuştur.



Şekil 2.11 Dolgulu kolon biyoreaktör için Δz kalınlığındaki hacim elemanı (Lefevre vd. 2000)

Varsayımlar:

- Sistem koordinatları: r , z , θ .
- r yönünde dağılım ihmal edilmiştir.
- θ yönünde dağılım ihmal edilmiştir.

- Sistem yatışkın koşuldadır.
- Reaktör boyunca aksel dağılma katsayısı sabittir.
- A_z akışa dik kesit alanıdır ve reaktör boyunca sabittir.
- Tepkime sıvı fazda değil, katı katalizör yüzeyindedir.

$$(N_{Az}A_z)_z - (N_{Az}A_z)_{z+\Delta z} + r_A A_z \Delta z = 0 \quad (2.14)$$

Eşitlik 2.14, $A_z \Delta z$ ile bölünüp, $\Delta z \rightarrow 0$ limiti alınırsa eşitlik 2.15 elde edilir:

$$-\frac{dN_{Az}}{dz} + r_a = 0 \quad (2.15)$$

C_A , A bileşeninin yığın derişimini; U_0 , boş kolon hızını; D_z , A bileşeni için z yönündeki dağılma katsayısını (aksel dağılma) göstermek üzere kütle aktarım akısı N_{Az} :

$$N_{Az} = C_A \frac{U_0}{\varepsilon} - D_z \frac{dC_A}{dz} \quad (2.16)$$

Kütle aktarım akısı eşitlik 2.15’de yerine konulursa:

$$D_z \frac{d^2 C_A}{dz^2} - \frac{U_0}{\varepsilon} \frac{dC_A}{dz} + r_a = 0 \quad (2.17)$$

Bağımlı ve bağımsız değişkenler bilinen değerlere bölünerek, eşitlik 2.17 boyutsuzlaştırılabilir:

C_{A0} , A bileşeninin başlangıç derişimini; L , dolgulu kolon reaktör boyunu göstermek üzere:

$$f = \frac{C_A}{C_{A0}} \quad (2.18)$$

$$\alpha = \frac{z}{L} \quad (2.19)$$

$$dC_A = C_{A0} df \quad (2.20)$$

$$dz = L d\alpha \quad (2.21)$$

$$D_z \frac{d}{L d\alpha} \left(\frac{C_{A0}}{L} \frac{df}{d\alpha} \right) - \frac{U_0}{\varepsilon} \frac{C_{A0}}{L} \frac{df}{d\alpha} + r_a = 0 \quad (2.22)$$

$$\frac{D_z C_{A0}}{L^2} \frac{d^2 f}{d\alpha^2} - \frac{U_0}{\varepsilon} \frac{C_{A0}}{L} \frac{df}{d\alpha} + r_a = 0 \quad (2.23)$$

Yukarıdaki denklem $U_0 \frac{C_{A0}}{L}$ ile bölünürse:

$$\frac{D_z \varepsilon}{L U_0} \frac{d^2 f}{d\alpha^2} - \frac{df}{d\alpha} + \frac{\varepsilon L}{U_0 C_{A0}} r_a = 0 \quad (2.24)$$

Eşitlik 2.24'deki $\frac{D_z \varepsilon}{L U_0}$, $\frac{1}{Pe}$ sayıdır. Bu eşitlik 2.mertebe bir denklem olup, C_{A0} başlangıç substrat derişimi olmak üzere, 2 tane sınır koşulu ile çözülebilir:

$$z = 0 \text{ yani } \alpha = 0 \text{ için } C_A = C_{A0}; \quad (2.25)$$

$$z = L \text{ yani } \alpha = 1 \text{ için; } \frac{dC_A}{dz} = 0 \quad (2.26)$$

Yatışkın koşulda r , hacim başına tepkime hızını ifade etmek üzere, katalizör yüzeyinde kütle korunum denkliği kurulurarak aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$r_a = r \quad (2.27)$$

Bu durumda kinetik model şu şekilde elde edilmiş olur:

$$D_z \frac{d^2 C_A}{dz^2} - \frac{U_0}{\varepsilon} \frac{dC_A}{dz} + r = 0 \quad (2.28)$$

Eşitlik 2.28'daki hız ifadesinde katalizör kütlesi başına tanımlanan hız (r'') kullanılırsa m_e reaktörde kullanılan enzim miktarını; V reaktör hacmini, ε boşluk kesrini göstermek üzere model aşağıdaki şekilde ifade edilebilir:

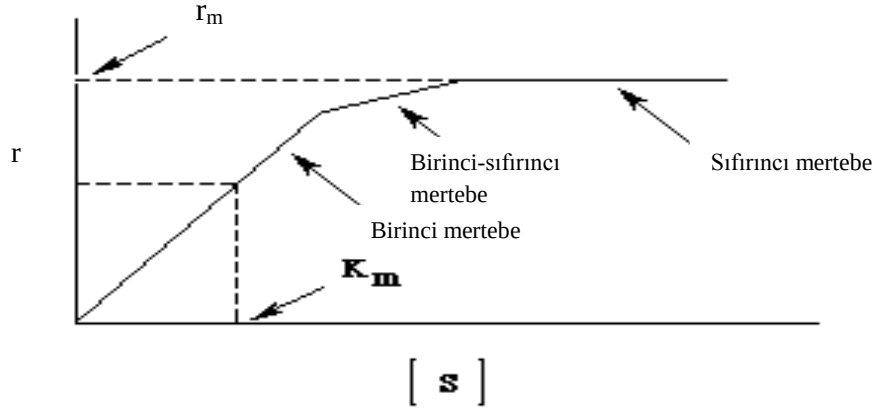
$$D_z \frac{d^2 C_A}{dz^2} - \frac{U_0}{\varepsilon} \frac{dC_A}{dz} + \frac{r'' m_e}{\varepsilon V} = 0 \quad (2.29)$$

2.10 Enzim Kinetiği

Enzim katalizli bir reaksiyonda $[E]$ enzim derişimini, $[S]$ substrat derişimini, $[Ü]$ ürün derişimini göstermek üzere reaksiyon hızı aşağıdaki şekilde tanımlanır (Tüzün 1997):

$$r = \frac{-dS}{dt} = \frac{dÜ}{dt} \quad (2.30)$$

Enzim katalizli tepkimeler için enzimin substrata doygunluğu önemli bir özelliktir. Düşük substrat derişiminde tepkime hızı, substrat derişimi artıkça artar. Substrat derişimi artıkça tepkime hızının artışında azalma başlar ve substrat derişiminin daha da artması ile tepkime hızı sabitleşir ve substrat derişimi ile değişmez. Bu durum enzimin doygunluğu ile ilgili olup, her enzim için doygunluk substrat derişimi farklılık gösterir. Şekil 2.12'de gösterildiği üzere substrat derişiminin artması ile tepkime hızının artışı süreçte tepkime hızı substrata göre birinci mertebe, tepkime hızının artışında azalma gözlenen süreçte tepkime birinci mertebe ile sıfıncı mertebe arasında, tepkime hızının değişmediği süreçte tepkime sıfıncı mertebedir (www.mku.edu.tr).

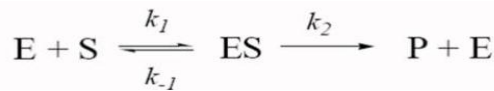


Şekil 2.12 Substrat derişimi ile tepkime hızı arasındaki ilişki (www.mku.edu.tr)

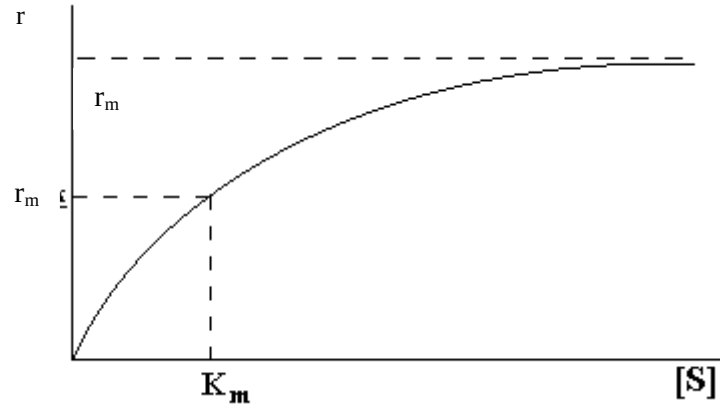
2.10.1 Michaelis Menten kinetiğı

Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimatik tepkimelerin ilk basamağında enzim-substrat kompleksi oluşumundan ve enzimin doygunluk özelliğinden yola çıkarak, enzimatik tepkimeler için kinetik model geliştirmişlerdir. Bu model, enzim kinetiğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaklaşımlarında enzim derişimi sabit tutularak, substrat derişimi geniş yelpazede değıştirilmiş ve tepkime hızının substrat derişimine bağıllığı incelenmiştir. Tepkime mekanizması Şekil 2.13’de gösterilmiş olup; şekildeki E, enzimi; S, substratı; ES, enzim-substrat kompleksini ve P, ürünü göstermektedir. Sonuç olarak, substrat derişimi ile tepkime hızı arasında hiperbolik bir ilişki (Şekil 2.14) bulunmaktadır (Tüzün 1997).

r_m ve K_m , enzimin özelliğini belirten önemli parametrelerdir. r_m maksimum tepkime hızı K_m ise maksimum tepkime hızının yarısına karşılık gelen substrat derişimidir. Bu derişimler enzim sabitleri olarak adlandırılmaktadır (Tüzün 1997).



Şekil 2.13 Enzim substrat tepkimesi



Şekil 2.14 Enzim kinetiğinde Michaelis-Menten eğrisi

Enzimlerin K_m değeri birbirinden farklılık gösterir ve enzim derişiminden bağımsızdır. Bir enzimin birden fazla substratı olması durumunda, her bir substrat için K_m değeri farklılık gösterir. K_m , enzim-substrat bağının (ES) gücünün ve enzimin substrata olan ilgisinin göstergesidir. Yüksek K_m bu bağın zayıf olduğunu, düşük K_m ise bu bağın kuvvetli olduğunu göstermektedir.

K_m ve r_m değerleri, değişik substrat derişimlerinde çalışılarak, tepkime başlangıç hızları ölçülerek belirlenir.

Michaelis-Menten kinetiğinin matematiksel ifadesi eşitlik 2.31’de gösterilmiştir.

$$r = \frac{r_m C_S}{K_m + C_S} \quad (2.31)$$

2.10.2 Çift substratlı tepkime kinetiği

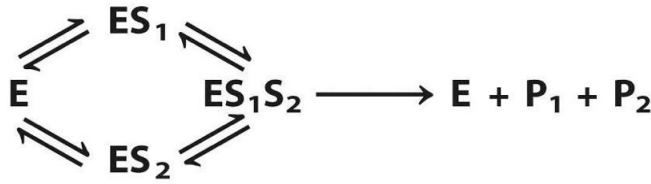
Michaelis-Menten kinetiği tek substratlı enzimatik tepkimeler için türetilmiştir. Ancak enzimatik tepkimeler, çoğunlukla birden fazla substratlı ve ürünlü olarak gerçekleşmektedir. Substratın tepkimeye dahil olması ve ürün oluşum sırasına göre çift substratlı tepkimeler, üçlü kompleks (ternary complex mechanism) veya ikili kompleks (Ping Pong) tepkime mekanizmasına sahip olabilirler (Sontakke ve Yadav 2011).

Üçlü kompleks mekanizmasında ürün oluşmadan önce substratlar enzimle bağlanarak üçlü kompleks oluşturur. Substrat bağlanması düzenli (ordered) veya rastgele (random) mekanizmaya sahip olabilir. Düzenli mekanizmada substratlardan biri enzimle bağlanır, sonrasında ikinci substrat bu bağlanmaya dahil olacak şekilde üçlü kompleks oluşur (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Üçlü kompleks oluşumu için düzenli mekanizma

Rastgele mekanizmada ise düzenli mekanizmadaki gibi substrat bağlanma sırası yoktur. Bağlanma sırası her iki substrat için de öncelikli olabileceği gibi, çok hızlı bir şekilde üçlü kompleks oluşumu da gerçekleşebilir (Şekil 2.16).

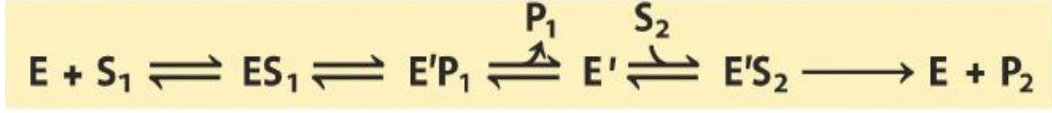


Şekil 2.16 Üçlü kompleks oluşumu için rastgele mekanizma

Üçlü sistem için tepkime kinetiği aşağıda gösterilmiştir.

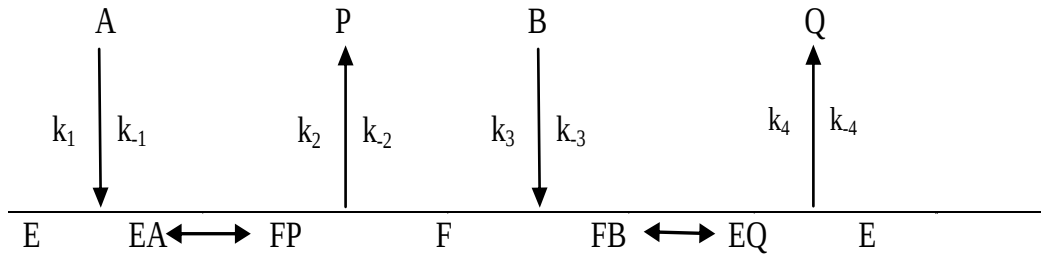
$$r = \frac{r_{\max}[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + K_{mA}[B] + K_{mB}[A] + [A][B]} \quad (2.32)$$

İkili kompleks, yani Ping Pong bi bi mekanizmasında ise öncelikle birinci substrat enzime bağlanır ve birinci ürün oluşur. Birinci ürün oluştuğundan sonra ikinci substrat, enzime bağlanır ve ikinci ürün oluşur (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 Ping Pong bi bi mekanizması

Asit ve alkolün enzim biyakatalizörlüğünde esterleşme tepkimesi için E enzimi, A asidi (substrat 1), B alkolü (substrat 2), EA enzim-substrat 1 kompleksini, FP enzim-ürün 1 kompleksini, F açillenmiş enzimi, P 1.ürünü, FB enzim-substrat 2 kompleksini, EQ enzim-ürün 2 kompleksini ve Q 2.ürünü göstermek üzere tersinir Ping Pong bi bi mekanizmasının Cleland notasyonuna göre ifadesi (Segel 1975) Şekil 2.18'de gösterilmiştir. Şekil 2.19'da ise şekil 2.18'de gösterilen mekanizma için tepkime basamakları ve denge durumu için hız bağıntıları yer almaktadır (Bakış 2007).



Şekil 2.18 Ping Pong bi bi mekanizması Cleland notasyonu (Segel 1975)

Ping Pong bi bi Mekanizması	
Hız Basamağı	Denge Durumunda Hız Bağıntısı
$E + A \leftrightarrow EA$ k_{-1} k_1 $EA \leftrightarrow FP$	$k_1[E][A] = k_{-1}[FP]$
$FP \leftrightarrow F + P$ k_{-2} k_2	$k_2[FP] = k_{-2}[F][P]$
$F + B \leftrightarrow FB$ k_{-3} k_3 $FB \leftrightarrow EQ$	$k_3[F][B] = k_{-3}[EQ]$
$EQ \leftrightarrow E + Q$ k_{-4} k_4	$k_4[EQ] = k_{-4}[E][Q]$

Şekil 2.19 Ping Pong bi bi mekanizması basamakları ve hız bağıntıları (Bakış 2007)

Enzim için kütle korunum denkliği kurulursa, başlangıç enzim miktarı E_0 , serbest ve substrata bağlı enzim miktarının toplamı olarak eşitlik 2.33 ile gösterilebilir.

$$E_0 = [E] + [FP] + [F] + [EQ] \quad (2.33)$$

Tepkime hız denklemi (Eşitlik 2.34), E_0 ve denge durumundaki hız bağıntıları kullanılarak türetilir. Türetilmiş tepkime hız denklemi eşitlik 2.35’de yer almaktadır.

$$r = k_1[E][A] - k_{-1}[FP] \quad (2.34)$$

$$r = \frac{k_1 k_2 k_3 k_4 [E_0][A][B] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} [E_0][P][Q]}{[E_0]} \quad (2.35)$$

Eşitlik 2.36, 2.37 ve 2.38, eşitlik 2.35’de yerine konulursa, inhibisyonuz durum için Ping Pong bi bi hız denklemleri (inhibisyonuz Ping Pong bi bi mekanizması için kinetik model) elde edilir (Eşitlik 2.39).

$$r_m = \frac{k_2 k_4}{k_2 + k_4} E_0 \quad (2.36)$$

$$K_{mA} = \frac{k_4(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_4)} \quad (2.37)$$

$$K_{mB} = \frac{k_2(k_{-3} + k_4)}{k_3(k_2 + k_4)} \quad (2.38)$$

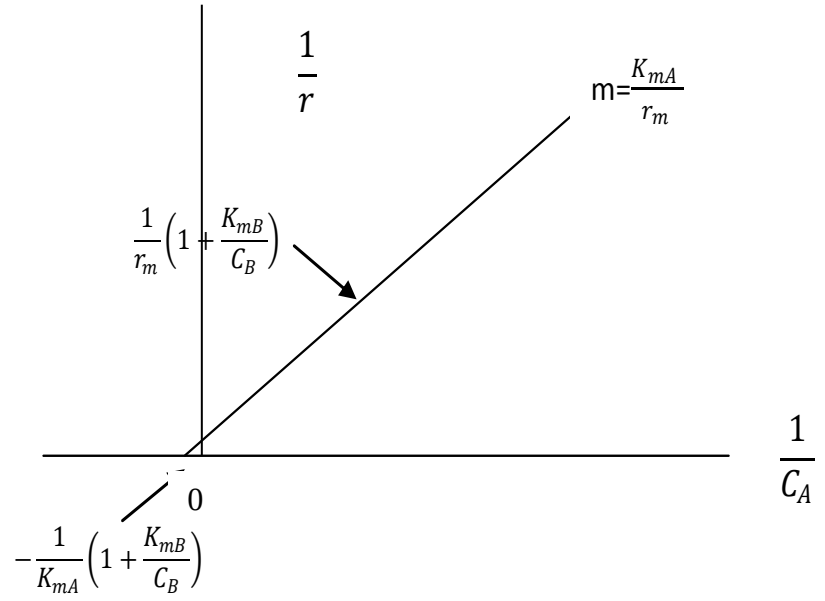
$$r = \frac{r_m C_A C_B}{K_A C_B + K_B C_A + C_A C_B} \quad (2.39)$$

Hız denklemindeki r_m , maksimum hızı; K_{mA} , A substratı için, K_{mB} B substratı için Michaelis-Menten sabitlerini göstermektedir. Bu kinetik sabitler eşitlik 2.39’un lineerleştirilmesi (Eşitlik 2.40, 2.41) ile bulunabilir.

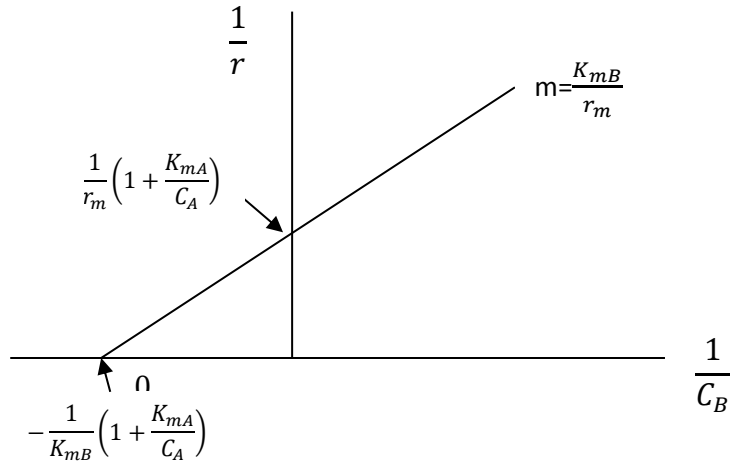
$$\frac{1}{r} = \frac{K_{mA}}{r_m} \frac{1}{C_A} + \frac{1}{r_m} \left(1 + \frac{K_{mB}}{C_B} \right) \quad (2.40)$$

$$\frac{1}{r} = \frac{K_{mB}}{r_m} \frac{1}{C_B} + \frac{1}{r_m} \left(1 + \frac{K_{mA}}{C_A} \right) \quad (2.41)$$

Farklı A derişimlerinde, B derişimi sabit tutularak yapılan çalışmalar için eşitlik 2.39 dikkate alınarak, C_A ’ya karşı $1/r$ ’ye grafiğe geçirildiğinde (Şekil 2.20), grafiğin eğimi K_{mA}/r_m değerini, y-eksenini kestiği nokta $\frac{1}{r_m} \left(1 + \frac{K_{mB}}{C_B} \right)$ değerini, x-eksenini kestiği nokta ise $-\frac{1}{K_{mA}} \left(1 + \frac{K_{mB}}{C_B} \right)$ değerini göstermektedir (Segel 1975). Aynı yaklaşım farklı B derişimlerinde, A derişimi sabit tutularak yapılabilir ve C_B ’ye karşı $1/r$ grafiğe geçirilebilir (Şekil 2.21).

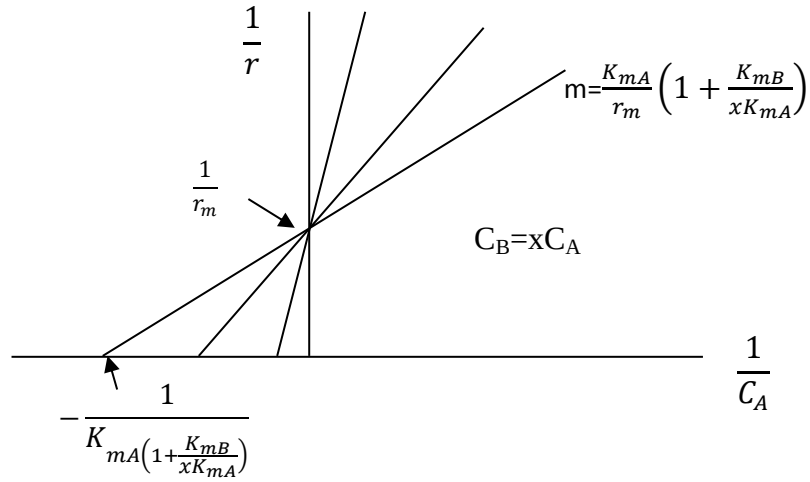


Şekil 2.20 Ping Pong bi bi mekanizması için C_A 'ya karşı $1/r$ (Segel 1975)



Şekil 2.21 Ping Pong bi bi mekanizması için C_B 'ye karşı $1/r$ (Segel 1975)

Bununla birlikte eşitlik 2.39, farklı B ve A derişimleri için $C_B = xC_A$ olduğu durumda, şekil 2.22'de gösterildiği şekilde lineerleştirilerek kinetik parametreler bulunabilir.



Şekil 2.22 Farklı substrat derişimleri için C_A 'ya karşı $1/r$ (Segel 1975)

Substrat inhibisyonlu Ping Pong bi bi mekanizması için kinetik model ise eşitlik 2.42'de gösterilmiştir.

$$r = \frac{r_{\max}[A][B]}{K_{mA}[B]\left(1 + \frac{[B]}{K_{iA}}\right) + K_{mB}[A] + [A][B]} \quad (2.42)$$

2.11 Kaynak Araştırması

Enzim katalizli kinetik rezolüsyon tepkimeleri hem kesikli, hem de sürekli olarak işletilebilmektedir ve bu konuda yapılan çalışmaların çoğunluğu kesikli üretim üzerinedir (Csajagi vd. 2008).

Kesikli işletimde tepkimenin girdiler yönüne kayması, substrat veya ürün inhibisyonu gibi durumlarla karşılaşılabilir (Jeong vd. 2000). Bu nedenle yüksek substrat derişiminde çalışılması için ürünün tepkime ortamından sürekli olarak uzaklaştırılması gerekebilir. Yapılan araştırmalarda kinetik rezolüsyon için optimum şartların belirlenmesi amacıyla öncelikle kesikli sistemde çalışılmaktadır. Kesikli işletimde kinetik rezolüsyon için çözücü, açıl verici, enzim türü ve miktarı, sıcaklık gibi

parametreler belirlenmektedir. Optimum koşullar ortaya konulduktan sonra sürekli işletim şartlarında çalışılmaktadır.

Büyük ölçekli üretimlerde düşük maliyet, basit tasarım ve işletme açısından dolgu kolonlar daha uygundur ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Jeong vd. 2000).

Kiral ara bileşenlerin rasemik karışımdan kinetik rezolüsyon ile elde edilmesinde substrat (rasemik alkol, açıl verici), çözücü türü ve derişimi, lipaz kaynağı, sıcaklık gibi parametreler, enantiyoseçimliliği etkileyen önemli parametrelerdir. Bu parametrelerin kinetik rezolüsyona olan etkisi araştırılarak, enantiyoseçimlilik artırılabilir.

Kinetik rezolüsyonda enantiyoseçimliliğin artırılabilmesi için herhangi bir kural getirilememektedir. Örneğin bir rasemik bileşik için yüksek sıcaklıkta iyi sonuçlar elde edilirken, başka bir bileşik için düşük sıcaklıklarda daha iyi sonuç elde edilebilmektedir. Benzer durum kullanılan farklı açıl verici, enzim kaynağı, çözücü ile de görülebilmektedir.

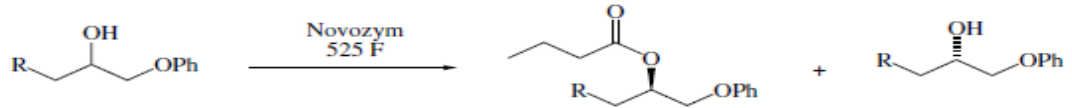
Bu nedenle rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyonu için yapılan çalışmaların büyük bir kısmı öncelikle kesikli işletim şartlarında gerçekleştirilerek, tepkime için optimum koşullar belirlenmekte, kinetik parametreler (maksimum tepkime hızı, hız sabitleri) hesaplanmaktadır.

Bu kapsamda kaynak araştırması, kesikli işletim ve sürekli işletim çalışmaları için iki ayrı bölüm olarak verilmiştir.

2.11.1 Rasemik alkollerin kesikli işletim ile kinetik rezolüsyonu

Jacobsen vd. (2005) tutuklanmamış enzim kullanımının kinetik rezolüsyona etkisini araştırdıkları çalışmalarında, dört farklı sekonder alkolün (1-fenoksi-2-butanol, 3-brom-1-fenoksi-2-propanol, 1-fenoksi-2-pentanol, 3-klor-1-fenoksi-2-propanol) Novozyme 525 F (saf protein halindeki *Candida antarctica* lipaz B) ile transesterleşmesini

incelemişler (Şekil 2.23), dönüşüm arttıkça enantiyomerik oranın (E) düştüğünü belirtmişlerdir (Şekil 2.24). Aynı çalışmayı, substrat olarak 3-klor-1-fenoksi-2-propanol kullanarak Novozyme 435 (reçineye tutuklanmış) ile de yapmışlar ve birbirine yakın E değerleri bulmuşlardır (Şekil 2.25). Sonuç olarak, tutuklanmış enzim kullanımının kinetik rezolüsyonu etkilemediğini belirtmişlerdir.



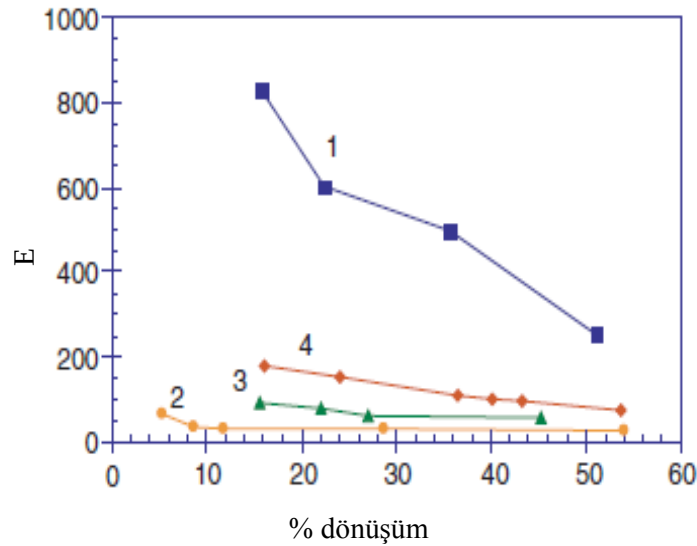
Rasemik substrat:

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1 R=CH ₃ | 1-fenoksi-2-bütanol |
| 2 R=CH ₂ CH ₃ | 1-fenoksi-2-pentanol |
| 3 R=Br | 3-brom-1-fenoksi-2-propanol |
| 4 R=Cl | 3-klor-1-fenoksi-2-propanol |

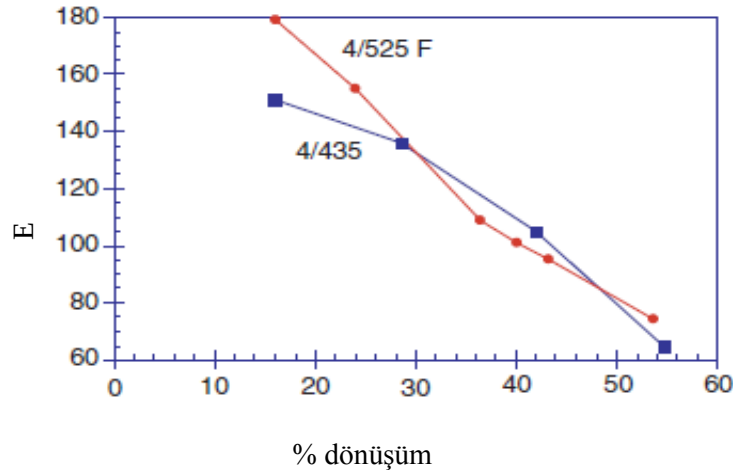
Kalan enantiyomer:

- | | |
|---|-------------------------------|
| 1 | S-1-fenoksi-2-bütanol |
| 2 | S-1-fenoksi-2-pentanol |
| 3 | R-3-brom-1-fenoksi-2-propanol |
| 4 | R-3-klor-1-fenoksi-2-propanol |

Şekil 2.23 Rasemik alkollerin vinil bütirat ile hekzan ortamında serbest CALB ile transesterleşmesi (Jacobsen vd. 2005)



Şekil 2.24 Rasemik alkollerin vinil bütirat ile hekzan ortamında serbest CALB ile transesterleşmesinde enantiyomerik oranın değişimi (Jacobsen vd. 2005)

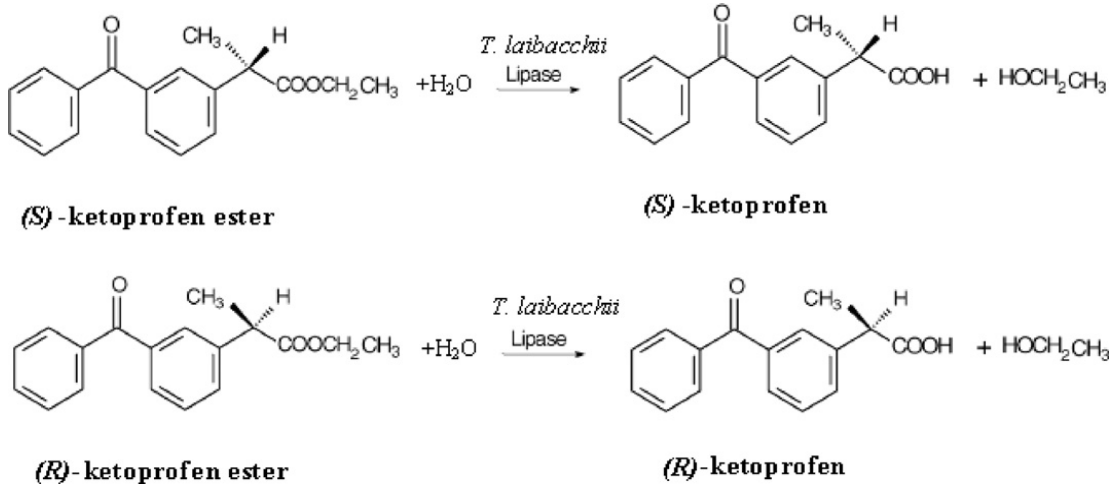


Şekil 2.25 3-klor-1-fenoksi-2-propanol için Tutuklanmış ve serbest CALB kullanımının enantiyomerik orana etkisi (Jacobsen vd. 2005)

Soyer vd. (2010) kanser tedavisi başta olmak üzere ilaç sanayide geniş kullanım alanına sahip olan enantiyomerik saflıktaki 1-fenil-1-propanolün, rasemik 1-fenil-1-propanolden kinetik rezolüsyon yöntemi ile elde edilmesini, RSM ile sistematik olarak inceledikleri çalışmalarında öncelikle üretim parametrelerini belirlemişlerdir. *Mucor meihei* (liyofilize toz), *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas floresans*, Lipozyme RM IM (reçineye tutuklanmış *Mucor meihei*) ve *C. antarctica* lipaz B (Novozyme 435) olmak üzere 6 farklı lipaz kaynağı kullanılmış, en iyi enantiyomerik aşırılık (ee_s) %71 ile Novozyme 435 biyokatalizörlüğünde elde edilmiştir. Bu durumun tutuklama ile enzimin kararlılığının artmasından, tutuklama sayesinde lipaz kapağının tutuklama yüzeyi ile hidrofobik etkileşime geçerek, aktif konumun substrat ile daha kolay tepkimeye girmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Çözücü olarak THF, toluen, hekzan, heptan ve izooktan kullanılmış, en iyi enantiyomerik aşırılığın %71 ile (30 dakikada) izooktanla elde edildiğini, izooktanın bu farklılığının kullanılan diğer çözücülere göre daha apolar olmasından, bunun da enzimin aktivite gösterebilmesi için belli bir miktar suya ihtiyaç duymasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Açıl verici etkisini incelemek amacıyla farklı karbon uzunluğuna sahip etil asetat (C4), vinil asetat (C4), izopropenil asetat (C5), vinil bütirat (C6), vinil benzoat (C9) ve vinil laurat (C14) kullanmışlardır. En iyi enantiyomerik aşırılığı en uzun karbon zincirine sahip vinil laurat ile elde etmişler, bu durumun literatürle uyuşmadığı, bu nedenle açıl verici, enzim, çözücü gibi üretim parametrelerinin her tepkime için ayrı ayrı incelenmesi

gerektiğini belirtmişlerdir. Üretim parametrelerini belirledikten sonra alkol derişimi, açıl verici/alkol mol oranı, enzim miktarı, sıcaklık ve karıştırma hızı olmak üzere beş bağımsız değişkenin enantiyomerik aşırılığa (cevap değişkeni) etkisini RSM ile sistematik olarak incelemişler, RSM sonucunda %99 ee_s'ye ulaşılabilmesi için 323 mM alkol derişiminde, 0.8 ester/alkol mol oranında, 156 mg enzim ile, 47⁰C ve 166 rpm karıştırma hızında çalışılması gerektiğini belirlemişler, bu koşullarda deneysel olarak 3 saat sonunda %91 enantiyomerik aşırılığa ulaştıklarını bildirmişlerdir.

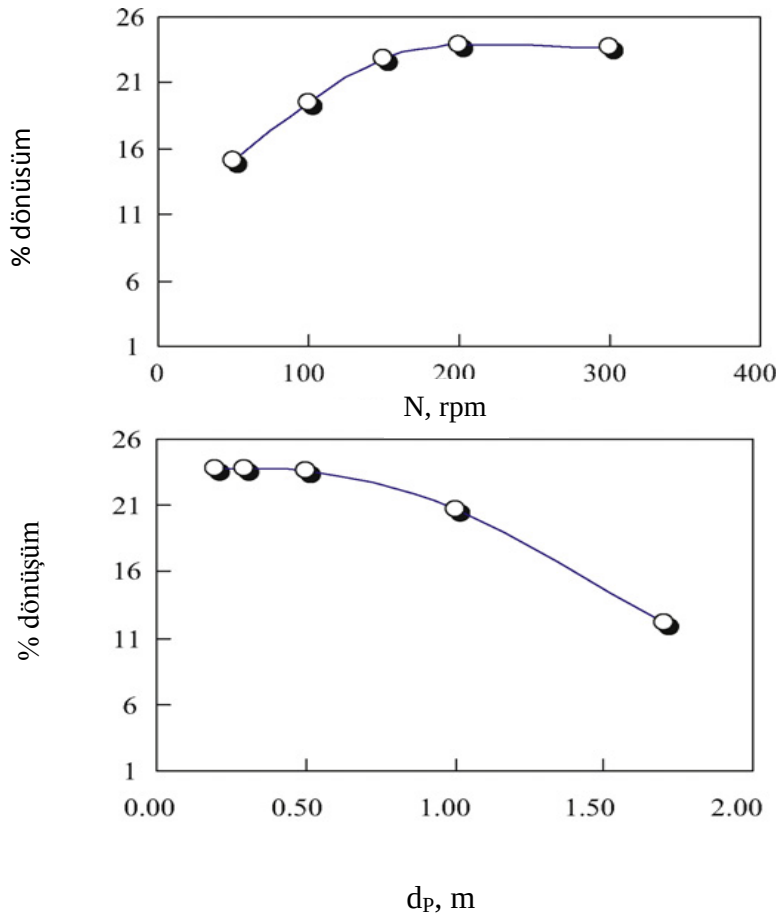
Ketoprofen (2-(3-benzoilfenil)-propiyonik asit) steroid olmayan ağrı kesici ilaç olarak yaygın olarak kullanılan bir bileşiktir. Sadece S-enantiyomerinin iyileştirici etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Zhang ve Lui (2011) bu önemli bileşiğin rasemik ketoprofen etil esterden hidroliz tepkimesi ile elde edilmesinde tepkime mekanizmasını ve kinetiğini araştırmışlardır (Şekil 2.26).



Şekil 2.26 Rasemik-ketoprofen etil esterinin tutuklanmış *T. laibacchii* lipazı ile hidrolizi (Zhang ve Lui 2011)

Çalışmalarında tutuklanmış enzim kullanımının iç ve dış kütle aktarım kısıtlamasına etkisini incelemişlerdir. Dış kütle aktarım kısıtlamasının belirlenebilmesi için farklı karıştırma hızlarında çalışmışlardır. Karıştırma hızı arttıkça dönüşümün arttığını, 150 rpm üstündeki karıştırma hızlarında dönüşümün karıştırma hızında etkilenmediğini, 150 rpm üstündeki karıştırma hızları için dış kütle aktarım kısıtlamasının ihmal edilebileceğini belirtmişlerdir. İç kütle aktarım kısıtlaması için (Şekil 2.27) enzim parçacık boyutunun

artması ile dönüşümün keskin bir şekilde düştüğünü, bununla birlikte belli bir parçacık çapına kadar dönüşümün arttığını, bu aralıktaki enzim boyutunda çalışarak iç kütle aktarım kısıtlamasının ihmal edilebileceğini belirtmişlerdir. Bu kapsamda 200 rpm karıştırma hızında, 0.6 mm tanecik çapına sahip enzimle çalışarak, dış ve iç kütle aktarım kısıtlamalarının ihmal edilebileceğini, bu nedenle kinetik hesaplamalarda yığın faz derişiminin kullanılabileceğini belirtmişlerdir.



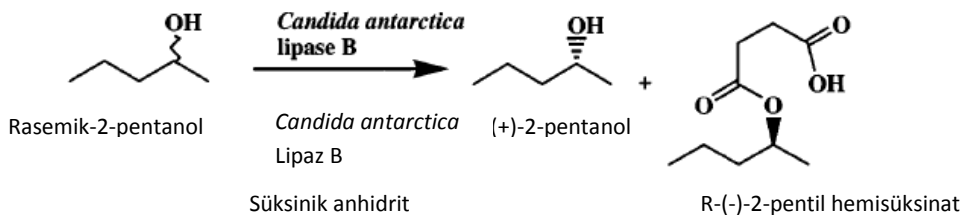
Şekil 2.27 Rasemik-ketoprofen etil esterinin tutuklanmış *T.laibacchii* lipazı ile hidrolizi için karıştırma hızı ve enzim molekül çapının dönüşüme etkisi (Zhang ve Lui 2011)

Tepkimenin çift substratlı olması nedeniyle, kinetik model için Ping Pong bi bi modelini önermişlerdir. Tepkimenin hidroliz tepkimesi olması nedeniyle, açığa çıkan etanolün tepkime ortamından kolayca ayrılması nedeniyle tepkimenin tersinmez olarak kabul edilebileceğini, tersinir Ping Pong bi bi mekanizmasının, tersinmez Michaelis-Menten

mekanizmasına basitleştirilebileceğini belirterek, tepkime için ürün inhibisyonlu tersinmez Ping Pong bi bi mekanizmasını önermişlerdir.

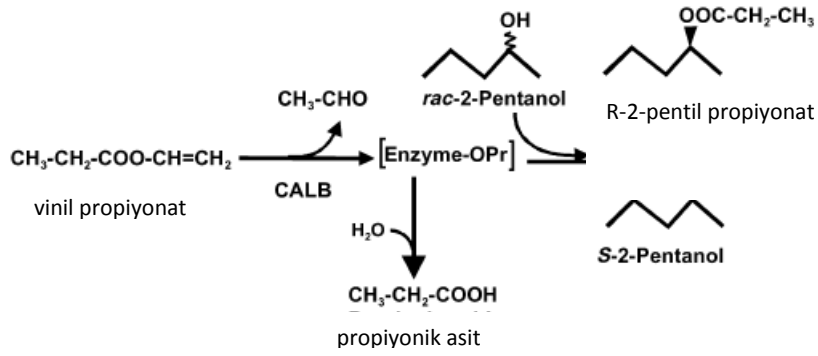
Anti alzheimer ilaçlarının üretiminde kiral ara bileşen olarak kullanılan S-2-pentanolün, rasemik-2-pentanol'den transesterleşme ile kinetik rezolüsyonunun incelendiği başka bir çalışmada, öncelikle kinetik rezolüsyon için en etkili olan lipaz kaynağı araştırılmıştır (Patel vd. 2000). Açıl verici olarak vinil aseat, çözücü olarak hekzan kullanılarak, *Candida antarctica* lipaz B, *C.rugosa*, BM lipaz L-7, BM lipaz L-8, PPL (porcine pancreatic lipase), lipomod 200 I, *Pseudomonas cepacia* (lipaz PS-30), lipaz FAP-15, *Pseudomonas sp.* (lipaz AK) ve *Mucor sp.* (lipaz MAP-10) ile 72 saat süresince tepkimeler gerçekleştirilmiştir. *Candida antarctica* lipaz B ile %99, *C.rugosa* lipazı ile % 92 ee_s değerine ulaşıldığını; BM lipaz L-8, PPL, lipaz FAP-15 ile tepkimenin hiç katalizlenmediğini, lipaz AK ile de yok sayılabilecek kadar az bir dönüşüm ve %0 ee_s elde edildiğini belirtmişlerdir.

Bununla birlikte rasemik-2-pentanolün hem substrat hem de çözücü olarak kullanıldığı durumu açıl verici olarak süksinik anhidrit kullanarak incelemişlerdir (Şekil 2.28). Sonuç olarak %50 dönüşüme, %99 seviyede ee_s değerine ulaşmış ve S-(+)-2-pentanolü tepkime ortamından %36 verimle (teorik olarak en fazla %50) ayırabilmişlerdir.



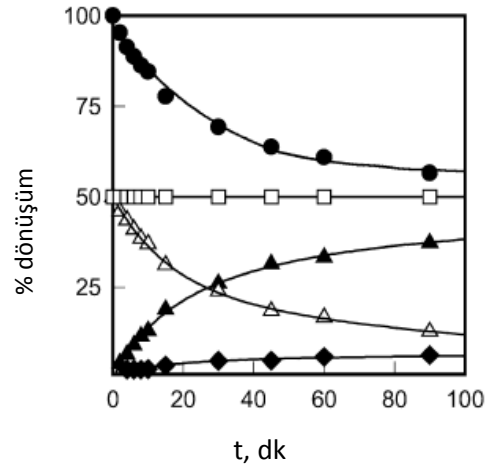
Şekil 2.28 Rasemik-2-pentanolün süksinik anhidritle transesterleşmesi (Patel vd. 2000)

Diğer bir çalışmada (Noel vd. 2004), rasemik-2-pentanolün vinil propiyonat ile kinetik rezolüsyonunu (Şekil 2.29) serbest CALB (Novozyme 525) kullanarak hem hekzan, hem de iyonik sıvı ([Bmim][NTf₂]) ortamında incelenerek çözücü, sıcaklık, pH ve su aktivitesinin etkisinin kinetik rezolüsyona olan etkisi araştırılmıştır.



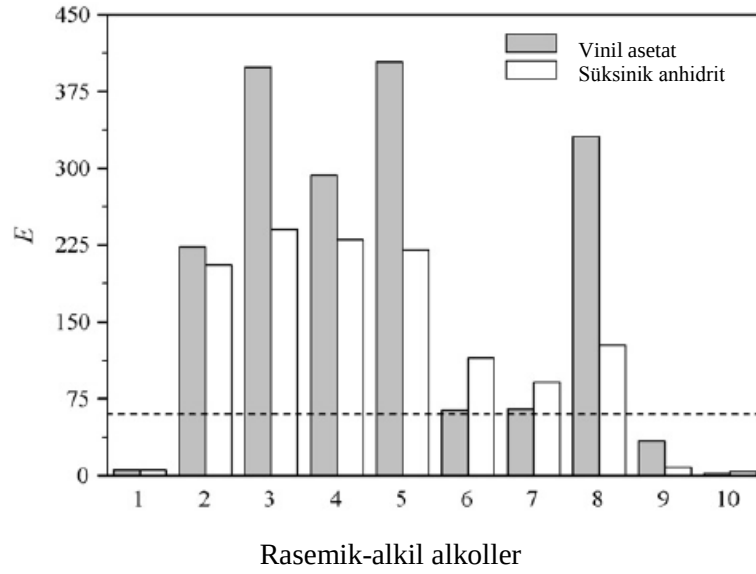
Şekil 2.29 Rasemik-2-pentanolün vinil propiyonat ve serbest CALB ile kinetik rezolüsyonu (Noel vd. 2004)

Eş molar (1,03 M) rasemik-2-pentanol ve açıl verici ile 60⁰C’da, hacimce %2 su ortamında iyonik sıvı ile 1 saat boyunca yaptıkları çalışma sonucunda (Şekil 2.30) açıl verici tüketimi ile hem transesterleşme ürünü olan 2-pentil propiyonat derişiminin, hem de hidroliz ürünü olan propiyonik asit derişiminin arttığını görmüşlerdir. 90 dakikada yaklaşık %45 dönüşüme ve %99’un üstünde ee değerine ulaşmışlardır. Sıcaklık etkisini incelemek için hem iyonik sıvı hem de hekzan ortamında 40-80⁰C aralığında deneyler yapmışlardır. Deney sonuçlarını verimlilik (katalitik etkinlik, Umg^{-1} ürün) ve seçimlilik (sentetik tepkime hızı/açıl verici tüketim hızı) olarak ifade etmişlerdir. Her iki çözücü ortamında da en yüksek verimlilik 60⁰C’da elde edilmiştir. Bu sıcaklığın üstünde sentetik etkinlik değerleri düşmüştür. Enzimin yüksek sıcaklıktaki aktivite kaybından kaynaklandığı düşünülen bu durum, hekzan ortamında daha belirgin olarak görülmüştür. pH’nin kinetik rezolüsyona etkisine baktıklarında, iyonik sıvı kullanımının hekzan kullanımına göre pH’den daha çok etkilendiğini, ancak her iki ortam için de en yüksek sentetik etkinlik ve seçimlilik değerini pH=7 değerinde elde edildiğini belirtmişlerdir. Su aktivitesinin verimlilik ve tepkime seçimliliği (transesterleşme ve hidroliz) için önemli olduğunu, ancak enzimin enantiyoseçimliliği üzerine etkisi olmadığını belirtmişlerdir.



Şekil 2.30 Rasemik-2-pentanolün ([Bmim][NTf₂] ortamında vinil propiyonat (●) ile transesterleşmesi. (Δ) R-2-pentanol, (□) S-2-pentanol, (▲) R-2-pentil propiyonat, (◆) propiyonik asit (Noel vd. 2004)

Wang vd. (2009a) rasemik alkil alkollerin kinetik rezolüsyonuna enzim ve açıl verici türünün etkisini incelemek amacıyla 2-bütanol, 2-pentanol, 2-hekzanol, 2-heptanol, 2-oktanol, 3-hekzanol, 3-metil-2-bütanol, 5-metil-5-hepten-2ol, 3-metil-2-sikloheksan-2-ol ve 2-metil-1-pentanol olmak üzere 10 farklı rasemik alkil alkolle çalışmışlardır. Öncelikle açıl verici olarak süksinik anhidrit kullanarak; CALB, *Pseudomonas cepacia* (PCL), *Pseudomonas fluorescens* (PFL) olmak üzere 3 farklı lipazın dönüşüme, enantiyomerik aşırılığa ve enantiyomerik orana etkisini araştırmışlardır. Bu enzimler arasında CALB'nin etkinliğinin daha fazla olduğunu, ancak 2-bütanol, 3-metil-2-sikloheksan-2-ol ve 2-metil-1-pentanol için CALB ile bile gerekli enantiyomerik orana ulaşamadığını, bunun da bu alkollerin kimyasal yapısına bağlı olarak stereomerkezlerinde yer alan grupların birbirine yakın büyüklükte olmasından kaynaklandığı belirtmişlerdir. 2-pentanol, 2-hekzanol, 2-heptanol, 2-oktanol gibi stereomerkezlerinde orta ve büyük gruplara sahip alkollerde yüksek enantiyomerik oran elde edilmesinin bu sebepten kaynaklandığını ve sonuç olarak lipaz-enantiyomer kompleksinin, stereomerkezdeki substituentlerin büyüklüğüne bağlı olarak enantiyoseçimliliği etkilediğini bildirmişlerdir. Bu durumun literatürde belirtildiği üzere lipazların primer alkollere karşı enantiyoseçimliliklerinin, sekonder alkollerin enantiyoseçimliliklerine göre çok daha düşük olması ile uyumlu olduğunu da ifade etmişlerdir. Açıl vericinin kinetik rezolüsyona etkisini görmek için CALB kullanarak aynı çalışmayı vinil asetat ile de yapmışlardır (Şekil 2.31).



Şekil 2.31 CALB biyokatalizörlüğünde vinil asetat ve süksinik anhidritle rasemik-alkil alkollerin (1: 2-bütanol, 2: 2-pentanol, 3: 2-heksanol, 4: 2-heptanol, 5: 2-oktanol, 6: 3-heksanol, 7: 3-metil-2-bütanol, 8: 5-metil-5-hepten-2-ol, 9: 3-metil-2-sikloheksan-2-ol ve 10: 2-metil-1-pentanol) kinetik rezolüsyonu (Wang vd. 2009 a)

2-bütanol, 3-metil-2-sikloheksan-2-ol ve 2-metil-1-pentanolün kinetik rezolüsyonu için enantiyomerik oranın, diğer alkil alkollerden farklı olarak daha az elde edildiği, bu rasemik alkoller için açıl verici türünün değiştirilmesi ile enantiyomerik oranın artırılmadığını ifade etmişlerdir. Bununla birlikte süksinik anhidrit kullanımının, tepkime sonrası istenmeyen enantiyomerin sıvı-sıvı ekstraksiyon ile tepkime ortamından daha kolay şekilde ayrılabilirdiği belirtilmiştir.

Wang vd. (2009b) başka bir çalışmalarında, ikincil alkol olan rasemik 2-oktanol ve 2-pentanolün lipase QLM (termofilik lipaz) biyokatalizörlüğünde kinetik rezolüsyonunu araştırmışlardır. Öncelikle uygun çözücü ve sıcaklığın belirlenmesi için açıl verici olarak vinil asetat kullanılarak, çözücüsüz ortam dahil olmak üzere 8 farklı ortamda (decaline, n-heksan, siklo heksan, dioxane, THF, aseton, diklorometan) sıcaklığın E'ye olan etkisini belirlemişlerdir. 25-70°C sıcaklık aralığında yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek E'yi, 25°C'de, çözücü olarak diklorometan kullanarak elde etmiş, çözücü büyüklüğünün küçülmesi ile E'nin arttığını tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada *Candida antarctica* lipaz B ile (R,S)-3-metil-2-bütanolün viniloktanoat ile kinetik rezolüsyonunda, çözücü büyüklüğünün artması ile E'nin arttığının tespit

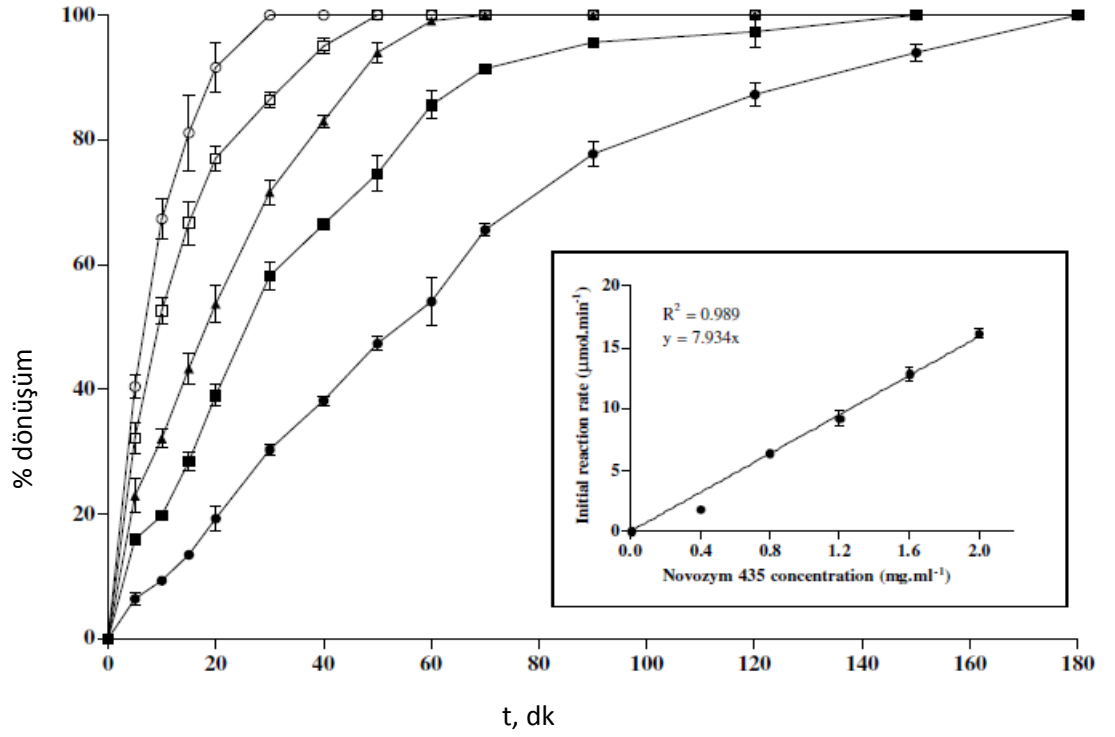
edildiğini belirterek, çözücü büyüklüğü ile E arasındaki ilişkinin her iki enantiyomerin geçiş hali komplekslerinin kararlılığına, yani enzimin aktif konumu ile substratın molekül yapısına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın çözücü polaritesi ile dielektrik sabitinin E üzerine anlamlı bir etkisi olmadığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak, lipaz QLM için çözücü türü büyüklüğünün azalması ile E'nin arttığını ortaya koymuşlardır.

Goujard vd. (2009) açıl verici olarak vinil stereat kullanarak, rasemik-2-pentanolün tranesterleşmesini çalışmışlardır. Çalışmalarında öncelikle farklı enzimler (tutuklanmış, saf ve ham enzim) kullanarak uygun biyokatalizörü belirlemişlerdir. Tepkime sonucunu hem spektrofotometrik (UV) hem de GC yöntemi ile ölçmüşlerdir. Ayrıca bu çalışmayı p-nitrofenil palmitat ile de yapmışlardır. Çizelge 2.5'de yer alan sonuçlara göre *Candida antarctica* lipaz B (Nov.435) en etkin biyokatalizör olmuştur. Bununla birlikte her iki analiz yöntemi ile elde ettikleri sonuçların birbirine benzer olduğunu ifade etmişlerdir.

Çizelge 2.5 Farklı lipaz kaynakları ve ölçüm yönteminin tranesterleşmeye etkisi (Goujard vd. 2009)

Lipaz	Tranesterleşme etkinliği ($\mu\text{mol dk}^{-1} \text{g}^{-1}$)		
	<u>Vinil stereat</u>		<u>p-nitrofenil palmitat</u>
	Spektrofotometri	GC	Spektrofotometri
<i>Candida antarctica</i> lipaz B (tut.)	3060±350	2330±290	560±80
<i>Mucor miehei</i> (tut.)	660±40	980±240	360±50
<i>Candida rugosa</i> (toz)	22±5	23±1	18±3
<i>Rhizopus arrhizus</i> (toz)	17±3	16±1	12±1
<i>Carica papaya</i> (ham ekstrakt)	0.1±0.04	0.09±0,07	0.5±0.01
<i>Anana comossus</i> (ham ekstrakt)	<0.001	<0.001	<0.001

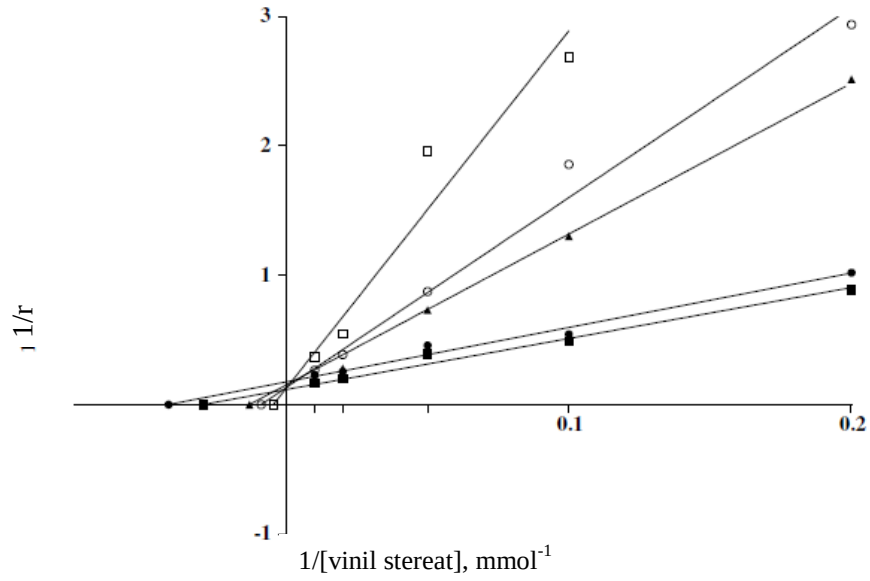
Çözücü olarak hekzan kullanarak Novozyme 435 ile çalışmalarına devam etmiş ve enzim miktarının dönüşüm üzerine etkisini incelemişlerdir. Enzim miktarının artması ile tepkime hızının oransal olarak arttığını belirtmişler ve aralarındaki matematiksel ilişkiyi hesaplamışlardır. 1mg enzimle 1 dakikada $7.93 \pm 0.16 \mu\text{mo}$ vinil stereatın, pentil stereata dönüştüğünü bulmuşlardır (Şekil 2.32).



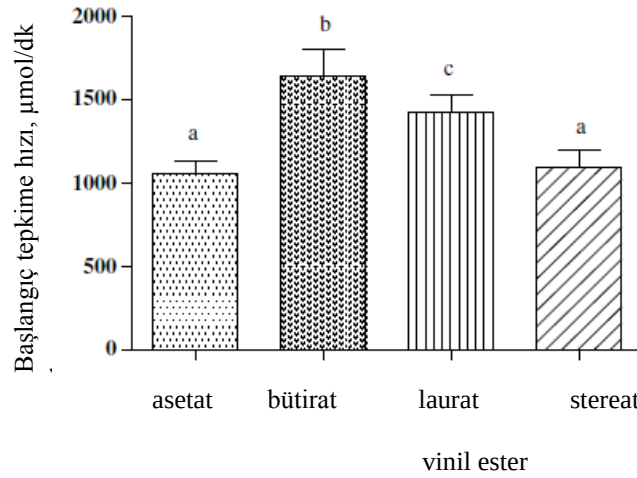
Şekil 2.32 Vinil stearat ve 2-pentanolün transesterleşme tepkimesine enzim miktarının etkisi (Goujard vd. 2009)

Araştırmalarında, kinetik parametrelerinin belirlenmesi için de çalışmalar yapmışlardır. Farklı açıl verici (5-100 mM) ve substrat (10-300 mM) derişimlerinde çalışmışlardır. Tepkime kinetiğinin substrat inhibisyonlu Ping Pong bi-bi mekanizmasına uyduğunu (Elde ettikleri Lineweaver-Burk grafiğı Şekil 2.33’de gösterilmiştir.) belirtmekle beraber, substrat inhibisyonlu durum için $r_m=8.04 \mu\text{mol/dk}$, $K_M=33.9 \text{ mM}$ olarak bulduklarını ifade etmişlerdir.

Ayrıca çalışmalarında, açıl verici türünün etkinliğini de incelemişlerdir. Vinil asetat, vinil bütirat, vinil laurat ve vinil stearat olmak üzere dört farklı alifatik vinil esterle çalışmışlardır. Vinil bütiratın diğer açıl vericilere göre daha etkin olduğunu, bununla birlikte diğer vinil esterlerin de transesterleşmeyi başarı ile sağladığını belirtmişlerdir (Şekil 2.34).



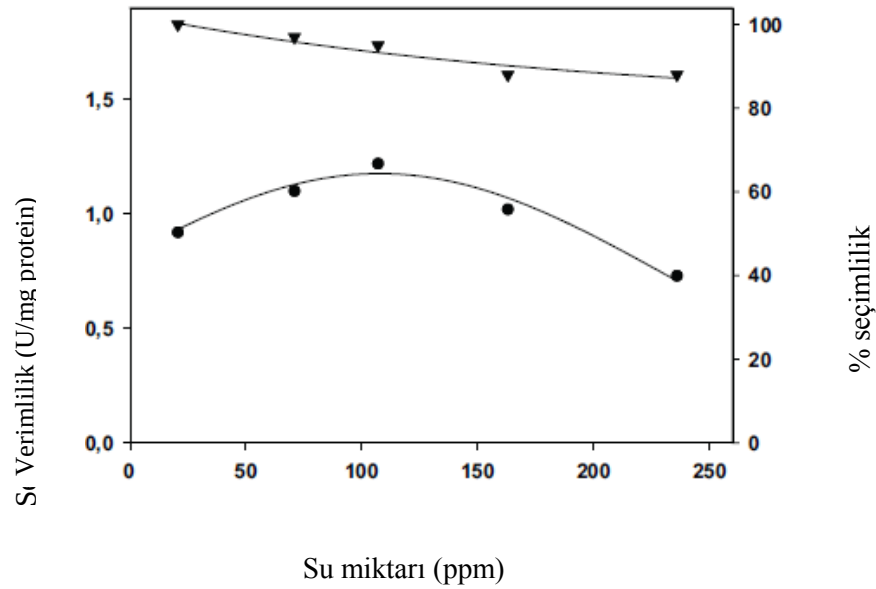
Şekil 2.33 Vinil stereat ile pentanolün tranesterleşme tepkimesi için elde edilen Lineweaver-Burk grafiği (Goujard vd. 2009)



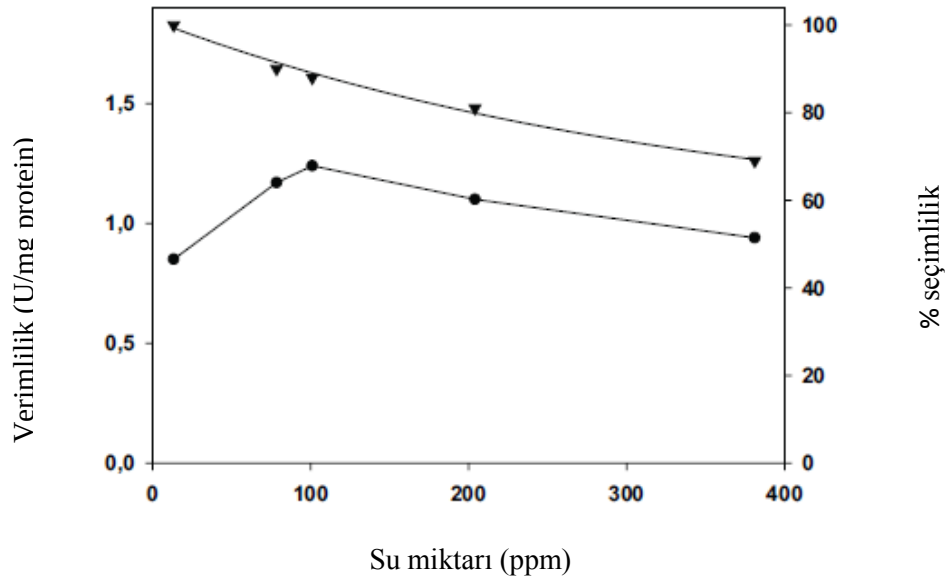
Şekil 2.34 Rasemik-2-pentanolün tranesterleşme tepkimesine açıl verici etkisi (Goujard vd. 2009)

de los Rios vd. (2010) ras-1-feniletanol ve ras-2-pentanolün farklı miktarlardaki su ortamında (5-380 ppm), çözücü olarak hekzan kullanarak, iki farklı açıl verici (vinil propionat ve vinil bütirat) ile kinetik rezolüsyonunu araştırmışlardır. Tepkimelerini eş molar substrat derişiminde (100 mM), 30°C sıcaklıkta ve 26.6 mg Novozyme 435 kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Verimlilik ve seçimlilik değerlerine bakarak su varlığının kinetik rezolüsyona etkisini incelemişlerdir (Şekil 2.35, 2.36).

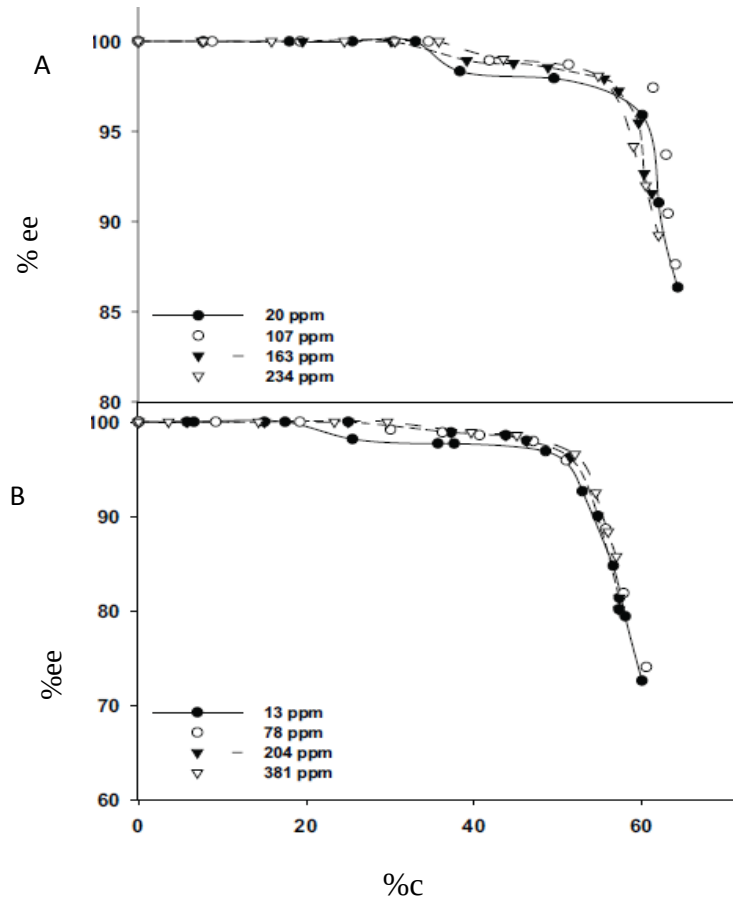
Her iki açıl verici için de verimliliğin 100 ppm'e kadar arttığı görülmüş, 100 ppm'in üstünde azalmaya başlamıştır. Açıl verici olarak vinil bütirat kullanıldığında verimliliğin vinil propiyonata göre biraz arttığı, buna karşın seçimliliğin biraz düştüğünü gözlemlemişlerdir. Tepkime ortamında S-2-pentil ester oluşması nedeniyle, bu tepkime koşullarında R-2-pentil ester sentezinin tam olarak enantiyoseçimli bir tepkime olmadığını (Şekil 2.37) belirtmişlerdir. Sonuç olarak, Novozyme 435'in her iki enantiyomer için de yüksek enantiyoseçimlilik gösterdiğini, 100 ppm su varlığında optimum sentetik etkinlik ve seçimlilik değerine ulaşıldığını, enantiyoseçimliliğin su miktarından bağımsız olduğunu ifade etmişlerdir.



Şekil 2.35 Açıl verici olarak vinil propiyonat kullanılması durumunda su miktarına bağlı sentetik etkinlik (●) ve seçimlilik (▼) grafiği (de los Rios vd. 2010)

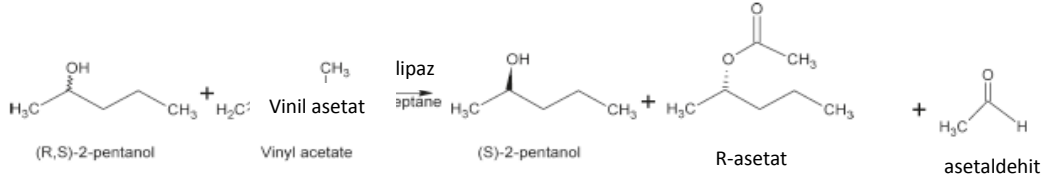


Şekil 2.36 Açıl verici olarak vinil bütirat kullanılması durumunda su miktarına bağlı sentetik etkinlik (●) ve seçimlilik (▼) grafiği (de los Rios vd. 2010)



Şekil 2.37 Rasemik-2-pentanolün kinetik rezolüsyonuna su miktarının etkisi (A, açıl verici olarak vinil propiyonat; B, vinil bütirat kullanıldığı durum) (de los Rios vd. 2010)

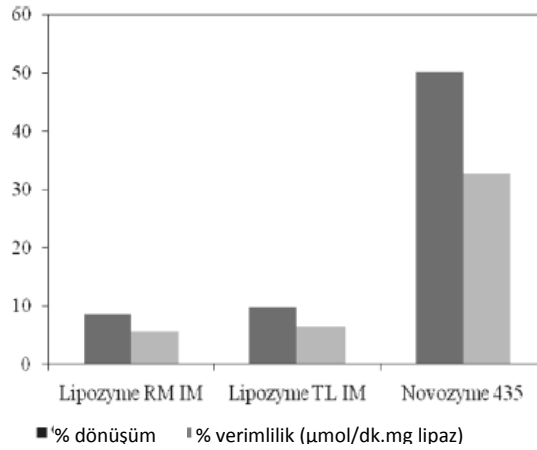
Sontakke ve Yadav (2011), rasemik-2-pentanolün vinil asetatla heptan ortamında kinetik rezolüsyonunu (Şekil 2.38) bir sistematik dâhilinde RSM kullanarak incelemiş ve tepkime için kinetik model belirlemişlerdir.



Şekil 2.38 Rasemik-2-pentanolün vinil asetatla transesterleşmesi (Sontakke ve Yadav 2011)

Yaptıkları çalışmada, öncelikle tepkime için en uygun biyokatalizörü belirlemek amacıyla Novozyme 435 (makrogözenekli akrilik reçineye tutuklanmış *Candida antarctica* lipaz B), Lipozyme RM IM (anyonik reçineye tutuklanmış *Mucor miehei* lipazı) ve Lipozyme TL IM (silikaya tutuklanmış *Thermomyces lanuginosus* lipazı) ile çalışmışlar ve diğer araştırmalarla benzer şekilde en yüksek dönüşüm ve verimliliği Novozyme 435 ile elde etmişlerdir (Şekil 2.39). Bu durumun, Novozyme 435'in destek yüzeyine kovalent bağlarla tutuklanması nedeniyle, tepkime ortamında oluşan bileşenlerden (asetaldehit) etkilenmemesinden ve katalitik etkinliğini korunmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Novozyme 435'in özelliklerinin iyi bilinmesi, ticari olarak kolay bulunabilmesi gibi avantajlarından dolayı biyokatalizör olarak Novozyme 435 kullanmaya karar verdiklerini belirtmişlerdir.



Şekil 2.39 Farklı enzimler için dönüşüm ve verimlilik (Sontakke ve Yadav 2011)

RSM çalışmalarında bağımsız değişken olarak karıştırma hızı, enzim miktarı, tepkime sıcaklığı ve açıl verici/alkol mol oranı; cevap değişkeni olarak, dönüşüm, substrat için enantiyomerik aşırılık, enantiyoseçimlilik (enantiyomerik oran) ve başlangıç tepkime hızını seçmişlerdir (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6 RSM deney matrisi (Sontakke ve Yadav 2011)

		-1	0	1
Sıcaklık, °C	A	30	45	60
Enzim miktarı, g	B	0.03	0.06	0.09
Karıştırma Hızı, rpm	C	200	400	600
Ester/Alkol	D	1	3	5

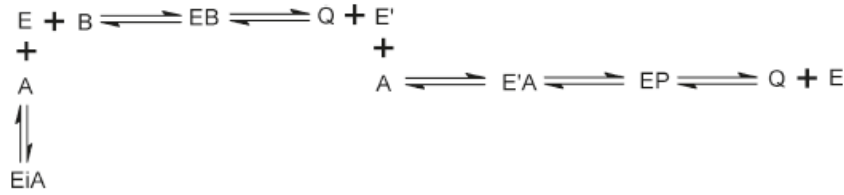
4 faktörlü, 3 seviyeli Box-Behnken yöntemi ile optimum koşulu 55.24⁰C sıcaklık, 0.09 g enzim, 451 rpm karıştırma hızı ve 4:1 açıl verici/alkol mol oranında 6 saatlik tepkime süresi ve 600 mM alkol derişiminde, %50 dönüşüm ve %72.91 ee olarak bulmuşlardır.

Tepkime kinetik modelini belirlemek için çift substratlı kinetik modellerini (üçlü kompleks, Ping Pong bi bi ve substrat inhibisyonu Ping Pong bi bi) incelemişler ve bu modellere ait kinetik sabitleri hesaplamışlardır (Çizelge 2.7). Üçlü kompleks modelindeki tepkime sabitlerinden birinin negatif olması nedeniyle tepkimenin üçlü

kompleks olamayacağına ve bu nedenle substrat inhibisyonlu Ping Pong bi bi mekanizmasına (Şekil 2.40) sahip olduğuna karar vermişlerdir.

Çizelge 2.7 Sontakke ve Yadav çalışmasındaki kinetik parametreler

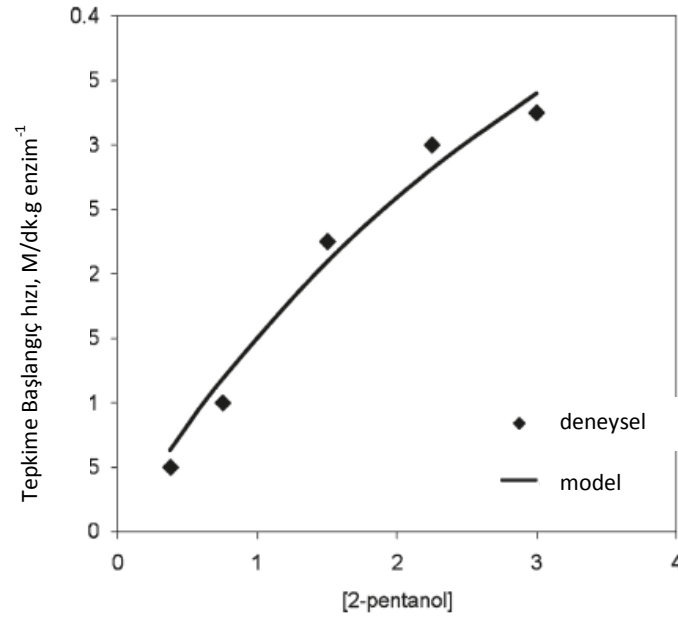
Kinetik parametre	Birim	Üçlü Kompleks	Substrat inhibisyonlu Ping Pong bi bi
r_m , Maksimum tepkime hızı,	$M.dk^{-1}.g\text{ enzim}^{-1}$	0,2629	0,9398
K_{MA} , Alkol için Michaelis sabiti	M	0,0353	$6,772 \times 10^{-2}$
K_{MB} , Açıl verici için Michaelis sabiti	M^{-1}	-1,065	$5,412 \times 10^{-2}$
K_{iA} , Alkol için inhibisyon sabiti	M^{-1}	-1,988	$1,99 \times 10^{-2}$



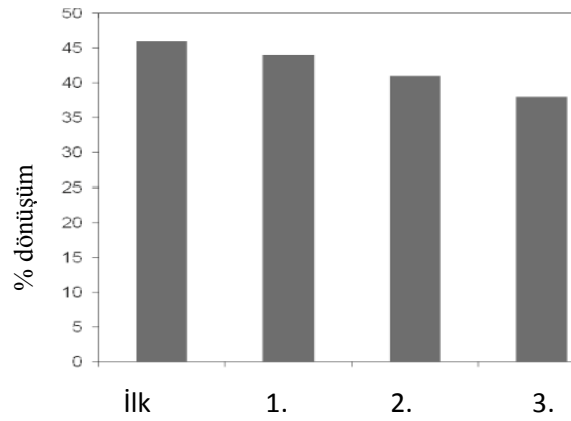
Şekil 2.40 Substrat inhibisyonlu Ping Pong bi bi mekanizması (A: alkol (2-pentanol), B: açıl verici (vinil asetat), Q: aset aldehit (vinil alkol), P: 2-pentil asetat) (Sontakke ve Yadav 2011)

2-pentanol derişiminin artmasıyla, tepkime başlangıç hızında düşüş gözlemlendiklerini belirtmişlerdir (Şekil 2.41).

Bununla birlikte, enzimin tekrar kullanılabilirliğini de araştırmışlardır. Her işletim sonrası enzimi süzüp, kurutup, tekrar kullandıklarını ve 3. tekrar kullanım sonunda ilk kullanıma göre dönüşümün %46'dan %38'e düştüğünü belirtmişlerdir (Şekil 2.42). Bu düşüşün enzimin süzülmesi sırasında oluşan kayıplardan dolayı meydana geldiğini ve kabul edilebilir bir durum olduğunu ifade etmişlerdir.



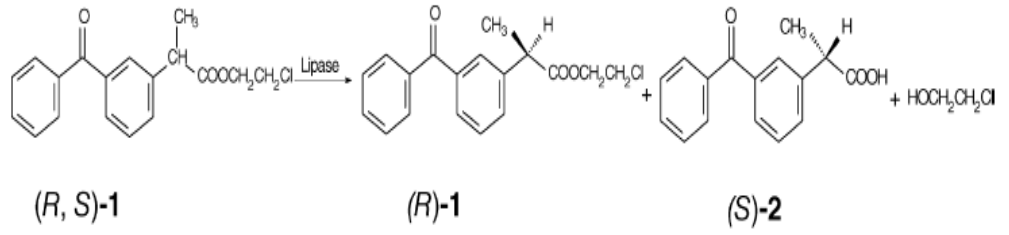
Şekil 2.41 Substrat derişiminin başlangıç hızına etkisi (Sontakke ve Yadav 2011)



Şekil 2.42 Enzimin kullanım tekrarına bağlı olarak dönüşüm değerleri (Sontakke ve Yadav 2011)

2.11.2 Rasemik alkollerin sürekli işletim ile kinetik rezolüsyonu

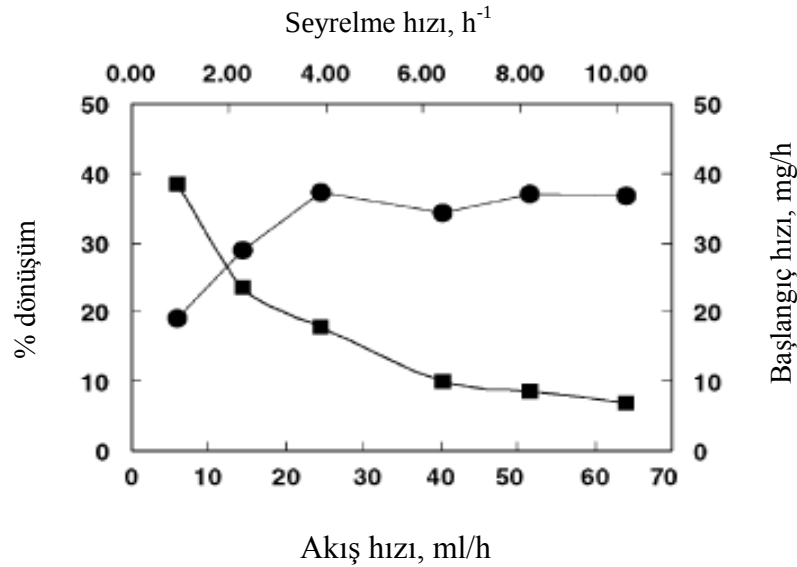
Xi vd. (2005) kiral ara bileşenlerin enzimatik üretimine işletme koşullarının etkisini araştırmışlardır. Steroid içermeyen ağrı kesici üretiminde kiral ara bileşen olarak kullanılan (S)-ketoprofeninin, ketoprofenin-2-kloroetil estersinden hidroliz tepkimesiyle (Şekil 2.43) elde edilmesini, sürekli işletim koşullarında incelemiştir.



Şekil 2.43 Ketoprofenin-2-kloroetil esterinin hidrolizi (Xi vd. 2005)

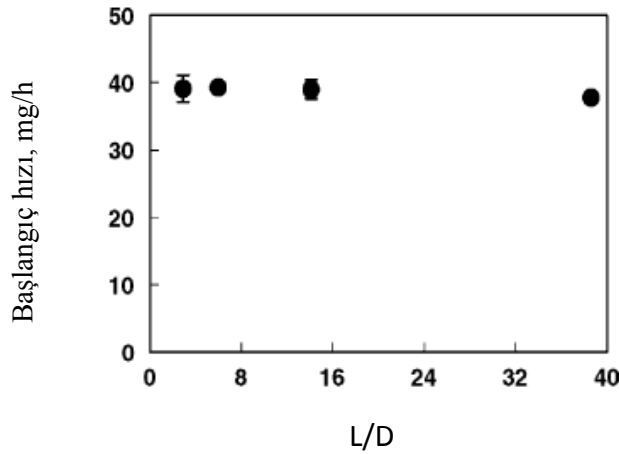
Kesikli işletimde en uygun katalizörü belirledikten sonra (*Candida rugosa* lipazı) sürekli işletim şartlarında çalışmışlardır. Sürekli işletimde akış hızı, kolon yüksekliği/kolon çapı (L/D) ile substrat derişiminin hidroliz tepkimesine etkisini araştırmışlardır.

Yaptıkları çalışmada, akış hızı artıka dönüşümün azaldığını gözlemlemişlerdir. Ancak bütün akış hızlarında enantiyomerik aşırılığı %99'un üstünde olduğunu bulmuş, akış hızının artması ile başlangıç hızının önce lineer bir artış gösterdiğini, seyrelme hızının 3.9 h^{-1} olduğu durumdan sonra sabit kaldığını belirtmişlerdir (Şekil 2.44)



Şekil 2.44 S-ketoprofenin eldesinde akış hızı ile dönüşüm ve başlangıç hızının değişimi Xi vd. (2005)

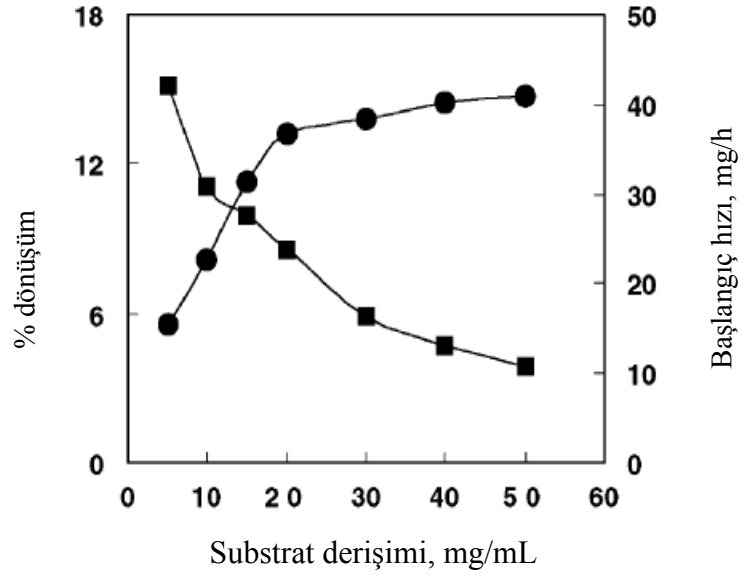
L/D'nin başlangıç hızı üzerinde belirgin bir değişiklik yapmadığını (Şekil 2.45), bu durumun enzim yatağının sabit olması nedeniyle her L/D için enzim ile substratın eşit sürede reaktörde kalmasından kaynaklandığını değerlendirmişlerdir. Bununla birlikte, yüksek L/D değerlerinde pompalama güclüğü, enzimin kolondan taşması gibi sorunlarla karşılaşılabilirdi, bu nedenle düşük L/D'de çalışılmasının daha uygun olacağını belirtmişlerdir.



Şekil 2.45 S-ketapfon üretiminde L/D oranının başlangıç hızına etkisi (Xi vd. 2005)

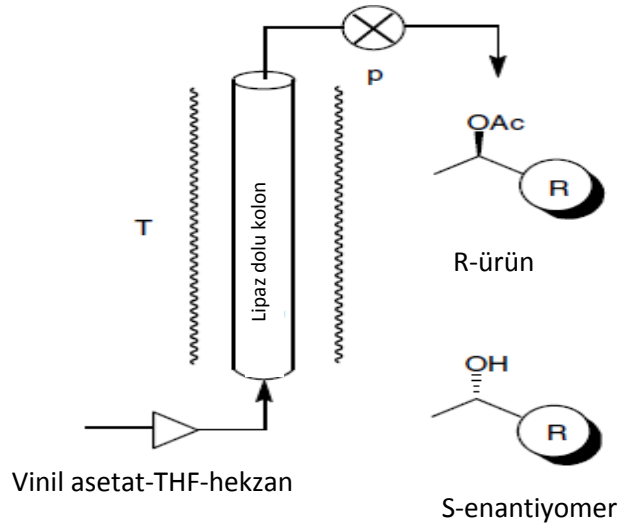
5-50 mg/mL aralığında substrat derişiminde çalışıp, dönüşüm ve başlangıç hızının L/D ile değişimini incelemişlerdir (Şekil 2.46).

Dönüşümün substrat derişiminin artmasıyla azaldığını, 20 mg/mL substrat derişimine kadar başlangıç hızının substrat derişimi artışıyla arttığını ve sonrasında sabit kaldığını gözlemlemişlerdir. Bu durumun yüksek substrat derişiminde enzimin zarar görmüş olabileceğinden kaynaklandığını, bu nedenle düşük substrat derişimlerinde çalışılmasının daha uygun olacağını belirtmişlerdir.



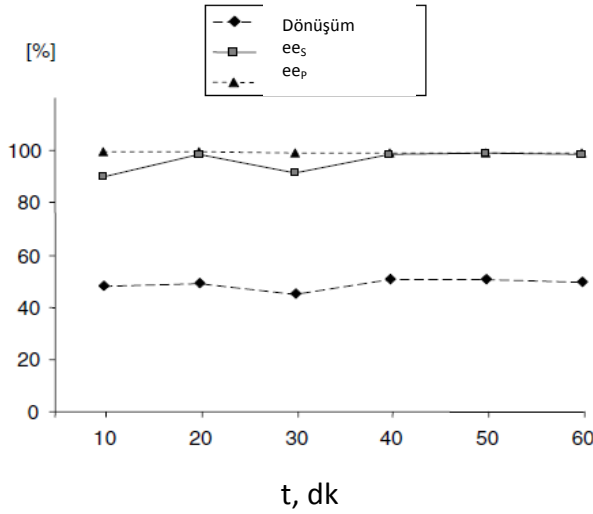
Şekil 2.46 S-ketoprofen üretiminde yüksek substrat derişiminin dönüşüm ve başlangıç hızına etkisi (Xi vd. 2005)

Csajagi vd (2008) sürekli sistemde sekonder rasemik alkollerin kinetik rezolüsyonunu araştırmıştır. Substrat olarak rasemik-1-feniletanol, 1-siklo hekzil etanol ve 1-fenilpropan-2-ol, açıl verici olarak vinil asetat kullandıkları çalışmalarını, paslanmaz çelik dolgulu kolon biyoreaktörde (Şekil 2.47) yapmışlardır.



Şekil 2.47 Rasemik-1-feniletanol, 1-siklo hekzil etanol ve 1-fenilpropan-2-ol sürekli sistemde kinetik rezolüsyonu (Csajagi vd 2008)

Öncelikle 0.82 mL hacimli dolgulu kolon biyoreaktörde, 0.4 g tutuklanmış *Candida antarctica* lipaz B (CALB) ile 1-fenil-1-propanolün kinetik rezolüsyonunu farklı substrat derişimleri (5-50 mg/mL) ve farklı akış hızlarında (0.1-1 mL/dk) 25⁰C sıcaklıkta incelemişlerdir. 30 dakika gibi kısa bir süre sonunda kararlı hale ulaştıklarını (%50 dönüşüm), substrat için enantiyomerik aşırılığı %98.8, ürün için enantiyomerik aşırılığı %99.2 bulduklarını (Şekil 2.48) belirtmişlerdir.



Şekil 2.48 Rasemik-1-fenil etanolün sürekli sistemde kinetik rezolüsyonunda zamana karşı dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık (Csajagi vd 2008)

Karşılaştırma yapabilmek için benzer koşulları kesikli sistemde de uygulamışlar (10 mg/mL substrat derişimi, 20 mg CALB, 25⁰C sıcaklık ve 1000 rpm karıştırma hızı) ve ancak 24 h tepkime süresi sonunda sürekli sistemle kıyaslama yapılabilecek düzeyde enantiyomerik aşırılık değerlerine ulaşabildiğini, bu durumun sürekli sistemle çok daha kısa sürede yüksek enantiyo saflığa sahip ürün elde edilebilmesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Enzim türünün kinetik rezolüsyona etkisinin belirlenmesi amacıyla aynı sürekli ve kesikli işletim şartlarında farklı ticari lipazlar kullanmışlardır. Bunun için her iki işletim için de enantiyomerik oran (E) ve verimlilik değerlerini hesaplamışlardır (Çizelge 2.8). CALB ile yapılan çalışmada aynı dönüşüm değerinde sürekli sistem için verimliliği kesikli sistemin iki katı bulmuşlardır. Bu durumun yatak boşluk kesrinin tam karışmalı tepkime kabı için %90'ın üzerindeyken dolgulu kolon biyoreaktör için %34 gibi düşük

seviyede olmasında kaynaklandığı belirtmişlerdir. Bununla beraber genel olarak enantiyomerik oranın (E) kesikli veya sürekli sistem için çok keskin bir farklılık göstermediğini belirtmişlerdir. Ancak; sürekli sistemde tutuklanmış *P.cepacia* lipazı ile lipaz AK için enantiyomerik oranın sırasıyla 200 ve 100'ün üzerindeyken, kesikli sistemde aynı enzimlerle enantiyomerik oranı sırasıyla 53 ve 13 olarak elde etmişlerdir. Aynı çalışmayı diğer rasemik alkoller için de yapmışlar ve benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

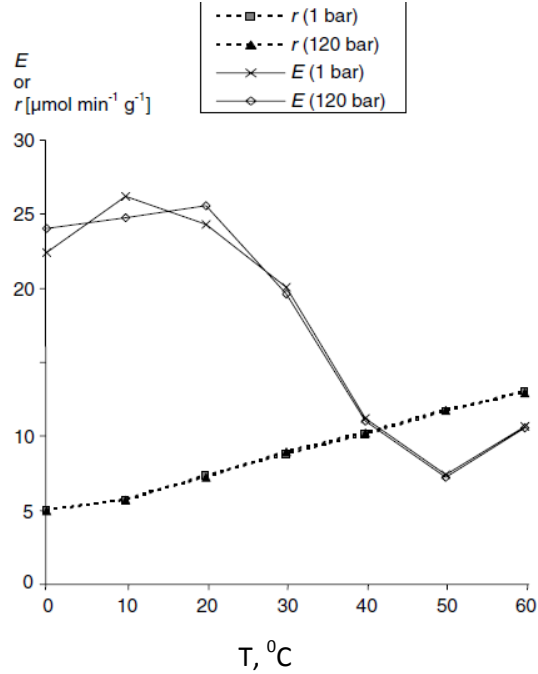
Çizelge 2.8 Kesikli ve sürekli işletimin kinetik rezolüsyona etkisi (Csajagi vd. 2008)

No.	Enzyme (in packed-bed column)	c^a (%)	$ee_{(S)-1a}^a$ (%)	$ee_{(R)-2a}^a$ (%)	E^v	r^e ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)
<i>Panel A</i>						
1	CaLB	50	98.8	99.2	$\gg 200$	10.2
2	Lipase, <i>Pseudomonas cepacia</i> , IM	50	96.8	97.4	> 200	10.2
3	Lipozyme TM <i>Mucor miehei</i> , IM	19	31.1	99.1	> 200	4.0
4	Lipozyme TL IM	18	28.9	98.9	> 100	3.7
5	Amano lipase AK	52	99.8	94.6	> 100	10.6
6	Amano lipase PS	24	39.6	99.6	$\gg 200$	5.0
7	Lipase, <i>Candida rugosa</i>	15	21.7	53.2	4.0	3.1
8	Lipase, porcine pancreas	6	13.6	97.2	81	1.2
No.	Enzyme (in shake flask)	c^d (%)	$ee_{(S)-1a}^d$ (%)	$ee_{(R)-2a}^d$ (%)	E^b	r^e ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)
<i>Panel B</i>						
9	CaLB	51	99.6	98.3	$\gg 200$	5.7
10	Lipase, <i>Pseudomonas cepacia</i> , IM	57	99.5	80.6	53	7.5
11	Lipozyme TM <i>Mucor miehei</i> , IM	42	78.3	98.7	> 200	4.1
12	Lipozyme TL IM	31	55.4	97.7	> 100	2.5
13	Amano lipase AK	75	99.0	47.0	13	17.3
14	Amano lipase PS	44	84.4	99.4	$\gg 200$	4.4
15	Lipase, <i>Candida rugosa</i>	16	22.4	53.7	4.1	1.1
16	Lipase, porcine pancreas	16	32.1	98.5	> 100	1.0

Sıcaklık ve basıncın etkisini görmek amacıyla 1-fenilpropan-2-ol ile CALB biyokatalizörlüğünde, 0-60°C sıcaklık, 1-120 bar basınç aralığında çalışmışlar, enantiyomerik oran ve verimlilik değerlerini hesaplamışlardır (Şekil 2.49). Enantiyomerik oranının 10-10°C aralığında maksimum değere ulaştığını, 50°C'da da minimum değerini aldığını, bu eğilim hem 1 bar hem de 120 bar için aynı olduğunu gözlemlemişlerdir. Sıcaklık değişiminin enantiyomerik oranı (enantiyoseçimlilik) etkilemesini tepkiminin entalpi, entropi, yayınlılık gibi parametrelerin sıcaklıkla değişiminden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Genel anlamda yaptıkları çalışmada liyofilize toz haldeki lipazların, tutuklanmış lipazlar gibi sürekli sistemde etkin olduğunu, sürekli sistemdeki verimliliğin kesikli

sistemdekinden yüksek olduğunu, bununla birlikte enantiyomerik oranının her iki işletim için çok farklı olmadığını belirtmişlerdir.



Şekil 2.49 Rasemik 1-fenilpropan-2-ol için enantiyomerik seçimliliğin ve enantiyomerik oranın sıcaklıkla ve basınçla değişimi (Csajagi vd 2008)

Literatürden de görüldüğü gibi sekonder alkollerin kinetik rezolüsyonu üzerine çalışmalarda genellikle sekonder alkol olarak 1-fenil etanol kullanılmıştır. Enantiyoseçimliliğe etkileyen parametrelerin genellikle sıcaklık, açıl verici türü, enzim kaynağı, açıl verici/substrat mol oranı, enzim derişimi olduğu görülmektedir. Rasemik-2-pentanolün kinetik rezolüsyonu üzerine yapılan çalışmalar, kesikli sistemde üretim parametrelerinin incelenmesi ve kinetik modelin belirlenmesi üzerinedir. Ayrıca bu çalışmaların bazılarında çelişkili sonuçlar görülmektedir.

Bu doktora çalışmasında literatürden farklı olarak, endüstriyel S-2-pentanol üretimine temel oluşturması amacıyla kinetik rezolüsyon tepkimesinde dış kütle aktarım, gözenek içi difüzyon kısıtlamaları kimya mühendisliği prensipleriyle incelenmiştir. Kinetik model belirlenerek sürekli işleme geçilip üretim parametreleri belirlenmiştir. Eksenel dağılımlı dolgulu kolon biyoreaktör ve piston akışlı biyoreaktör modelleri kurularak çözümleri gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu araştırmada substrat olarak bir sekonder alkol olan 2-pentanol kullanılmıştır. 2-pentanol rasemik halde Aldrich'den tedarik edilmiş olup, özellikleri EK 1'de yer almaktadır.

Transesterleşme tepkimesi için EK 2'de özellikleri yer alan vinil asetat, vinil laurat, vinil benzoat ve vinil bütirat kullanılmış olup, Fluka'dan temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan Novozyme 435 (Nov.435, akrilik reçineye tutuklanmış *Candida antarctica* lipase B), Lipozyme RM IM (*Rhizomucor meihei* lipazı) Novozymes'dan, Amona lipase AK (*Pseudomonas fluorescens* lipazı) ise Aldrich'den tedarik edilmiştir.

Çözücü olarak kullanılan ve özellikleri EK 3'de yer alan HPLC saflığındaki hekzan ile iç standart olarak kullanılan etil propiyonat Merck'den tedarik edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Enzim aktivitesi

Enzim aktivitesinin belirlenmesi için 200 µl tribütirin, 10 ml tris-HCl tampon çözeltisinde (5 mM, pH=7.2) çözüldükten sonra 10 mg enzim eklenmiş ve 150 rpm karıştırma hızında, 40°C sıcaklıktaki 2-10 dk boyunca orbital çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Enzim süzülerek tepkime sonlandırılmış ve birkaç damla fenolftaleyn damlatılarak, 0.1 M NaOH ile titre edilmiştir.

3.2.2 Rasemik 2-pentanolün kesikli sistemde kinetik rezolüsyonu

Çalışmalar ağzı kapaklı, 50 ml'lik biyoreaktörlerde, 30 ml çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktöre önce rasemik 2-pentanol, açıl verici ve çözücü konulmuş, başlangıç örneği ($t=0$) alındıktan sonra enzim eklenmiştir. Tepkimeler orbital çalkalayıcıda, 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Belli zaman aralıklarıyla tepkime ortamından örnek alınmış, alınan örnekler hekzanla seyreltilip, buz banyosunda soğutulmuştur. Analiz yapılabilmesi için 200 µl 30 mM etil propiyonat (iç standart) eklenmiş, toplam analiz hacmi 1 ml olacak şekilde hekzan ile seyreltilmiştir. Bu çözeltiler analiz cihazına konulmadan önce “vortex”de karıştırılmıştır.



Şekil 3.1 Rasemik-2-pentanolün kesikli sistemde kinetik rezolüsyonu

3.2.3. Rasemik 2-pentanolün sürekli sistemde kinetik rezolüsyonu

Sürekli sistem çalışmaları Novozyme 435 biyokatalizörlüğünde, $L/D=10$ ve $L/D=12.5$ olmak üzere iki farklı kolonda, 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Kullanılan borusal biyoreaktörlerin özellikleri ile bu biyoreaktörlere doldurulan enzim miktarı çizelge 3.1’de yer almaktadır.

Çizelge 3.1 Sürekli sistem için kullanılan borusal biyoreaktörlerin özellikleri

Borusal biyoreaktör	D, cm	L, cm	V, cm ³	Enzim, mg
L/D=10	1	10	7.85	2240
L/D=12.5	0.4	5	0.628	270

L/D=10 olan biyoreaktördeki sıcaklık kontrolü ceket ile sağlanmıştır (Şekil 3.2). L/D=12.5 olan biyoreaktör ile yapılan çalışmalarda sıcaklık kontrolünün sağlanabilmesi için biyoreaktör orbital çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. Her iki biyoreaktör için akış hızı pompa ile sağlanmıştır. Substrat, biyoreaktöre alt akımla beslenmiştir. Başlangıç derişimlerinin belirlenmesi için substrat biyoreaktöre beslenmeden önce örnek alınmıştır (t=0). Biyoreaktör enzimle doldurulduktan sonra substrat beslenmiştir. Belli zaman aralıklarıyla (beşer dakika arayla) üst akımdan örnek alınmıştır. Alınan örnekler hekzanla seyreltilmiş, buz banyosunda soğutulmuştur. Analiz yapılabilmesi için 200 µl 30 mM etil propiyonat (iç standart) eklenmiş, toplam analiz hacmi 1 ml olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiler analiz cihazına konulmadan önce “vortex”de karıştırılmıştır.



Şekil 3.2 L/D=10 olan dolgu kolon biyoreaktörde sürekli sistem çalışması

Dolgulu kolon biyoreaktörde kalma süresinin (τ) belirlenmesi için öncelikle kolon boşluk kesri (ε) belirlenmiştir. V , reaktör hacmini; V_k , katı hacmini göstermek üzere ε , eşitlik 3.1 ile hesaplanmıştır. Katı hacminin belirlenmesi için enzim, hekzanla yıkandıktan sonra hekzan dolu mezüre boşaltılmış ve hacim farkı ölçülmüştür.

$$\varepsilon = \frac{V - V_k}{V} \quad (3.1)$$

Dolgulu kolonda kalma süresi (τ); hacimsel akış hızı (Q), kolon hacmi (V), kolon boşluk hacmi ($V_{boş}$) ve boşluk kesri (ε) kullanılarak aşağıdaki eşitlikler ile hesaplanmıştır. Sürekli sistem çalışmaları dolgulu kolonda farklı akış hızlarında ve farklı substrat derişimlerinde çalışılarak yürütülmüştür.

$$\tau = \frac{V \times \varepsilon}{Q} \quad (3.2)$$

$$\tau = \frac{V_{boş}}{Q} \quad (3.3)$$

3.2.4 Analiz Yöntemi

Örnekler BetaDex-120 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ l) Supelco kolonda, alev iyonizasyon dedektöre sahip Shimadzu marka GC-2010 gaz kromatografi (GC) ile analizlenmiştir. Analiz hacmi 1 μ l olup, her analiz öncesinde ve sonrasında enjektör, çözücü ile 3 defa, örnekle 10 defa yıkanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 30 ml/dk akış hızıyla helyum kullanılmıştır. Detektör ve enjeksiyon sıcaklığı 250°C, split oranı 70 olarak uygulanmıştır. Fırın sıcaklığı 50°C’da 10 dakika tutulmuş, 5°C/dk artış hızı ile 75°C’ye çıkarılmış, 2 dakika bu sıcaklıkta tutulmuş, 5°C/dk artış hızı ile 100°C’ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 10 dakika tutulmuştur. Örnek kromatogram EK 4’de gösterilmiştir.

3.2.5 Deneysel Tasarım/Cevap Yüzey Yöntemi (RSM)

Substrat (rasemik-2-pentanol ve vinil bütirat) ve enzim derişimin aynı anda kinetik rezolüsyona etkisinin belirlenmesi amacıyla Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology, RSM) uygulanmıştır.

Bağımsız değişken olarak substrat derişimi (C_{S0} , mM) ve enzim derişimi (C_E , mg/ml), bağımlı değişken olarak başlangıç tepkime hızı (mM/dk) seçilmiş, 2 faktörlü 5 seviyeli deneysel tasarım (Çizelge 3.2) uygulanmıştır. Merkez noktada 5 deney olmak üzere toplam 13 deneylik set (Çizelge 3.3) elde edilmiştir.

Çizelge 3.2 RSM ile iki bağımsız değişken için elde edilen kodlu ve gerçek değerler

Bağımsız Değişken	Kodlu Değer					
	Simge	-1.41	-1	0	1	1.41
C_{S0} , mM	A	293	500	750	1500	1707
C_E ,mg/ml	B	0.03	1.5	2.75	4	4.5

Deneyler 30 ml tepkime hacminde; çözücü olarak hekzan, açıl verici olarak vinil bütirat kullanılarak, 30°C sıcaklıkta, 150 rpm karıştırma hızında eşmolar substrat derişiminde (rasemik-2-pentanol ve vinil bütirat), çizelge 3.3’de belirtilen substrat ve enzim derişiminde kesikli sistemde gerçekleştirilmiş.

Çizelge 3.3 RSM ile elde edilen kodlu ve gerçek deney koşullar

Deney No	A (Substrat derişimi)		B (Enzim derişimi)	
	Kodlu değer	Gerçek değer, mM	Kodlu değer	Gerçek değer, mg/ml
1	-1	500	-1	1.5
2	1	1500	-1	1.5
3	-1	500	1	4
4	1	1500	1	4
5	-1.41421	292.89	0	2.75
6	1.414214	1707.11	0	2.75
7	0	1000	-1.41421	0.982233
8	0	1000	1.414214	4.517767
9	0	1000	0	2.75
10	0	1000	0	2.75
11	0	1000	0	2.75
12	0	1000	0	2.75
13	0	1000	0	2.75

3.2.6 Farklı tanecik boyutunda Novozyme 435 elde edilmesi

Farklı tanecik boyutuna sahip enzim elde edilebilmesi için Novozyme 435; 300, 425 ve 600 mikronluk 3 farklı boyuttaki elekten geçirilmiştir. Öncelikle 600 mikronluk elekten geçirilmiş, elek altında kalan enzim 425 mikronluk elekten geçirilmiştir. 425 mikronluk elekten geçen Novozyme 435 de 300 mikronluk elekten geçirilmiştir. Böylece 300 mikrondan küçük, 300-425 mikron arası, 425-600 mikron arası ve 600 mikrondan büyük olmak üzere dört farklı tanecik boyutuna sahip Novozyme 435 elde edilmiştir. Deneyler çözücü olarak hekzan kullanılarak 30 ml tepkime hacminde, 30⁰C sıcaklıkta, 150 rpm karıştırma hızında, 150 mM eş molar substrat (rasemik-2-pentanol ve vinil bütirat) derişiminde ve 150 mg enzim ile gerçekleştirilmiştir. Enantiyomerik aşırılık, dönüşüm ve başlangıç tepkime hızı değerleri ölçülmüştür.

3.2.7 Enantiyomerik aşırılığın hesaplanması

Bu çalışmada substrat için enantiyomerik aşırılık (ee_S) değerleri, t anındaki S ve R enantiyomer pik alanı kullanılarak, eşitlik 3.4 ile hesaplanmıştır. Eşitlikteki C_S ve C_R sırası ile S ve R enantiyomerin pik alanlarını göstermektedir.

$$\%ee_S = \frac{C_S - C_R}{C_S + C_R} \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.8 Dönüşümün hesaplanması

Tepkime dönüşümü, S ve R enantiyomer pik alanları ile iç standart pik alanı kullanılarak, eşitlik 3.5 ile hesaplanmıştır. Bu eşitlikteki C_{S0} , t=0 anındaki S enantiyomer pik alanının, iç standart pik alanına bölümünü; C_{R0} , t=0 anındaki R enantiyomer pik alanının, iç standart pik alanına bölümünü; C_S , t=t anındaki S enantiyomer pik alanının, iç standart pik alanına bölümünü; C_R , t=t anındaki R enantiyomer pik alanının, iç standart pik alanına bölümünü ifade etmektedir.

$$\%c = \left(1 - \frac{C_S + C_R}{C_{S0} + C_{R0}}\right) \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.9 Enantiyomerik oranın hesaplanması

Dönüşüm ve substrat için enantiyomerik aşırılık değerleri kullanılarak enantiyomerik oran (E), eşitlik 3.6 ile hesaplanmıştır.

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_S)]}{\ln[(1-c)(1+ee_S)]} \quad (3.6)$$

3.2.10 Başlangıç tepkime hızının hesaplanması

Başlangıç tepkime hızının (r_0) belirlenmesi için zamana karşı R-2-pentanol derişimi grafiğı çizilmiştir. Grafiğın eğimi eşitlik 3.7 ile belirlenerek, başlangıç tepkime hızları hesaplanmıştır. Eşitlikteki C_{A0} , R-2-pentanolün başlangıç ($t=0$) derişimini; C_A , t anındaki R-2-pentanol derişimini göstermektedir. Farklı substrat derişimlerinde çalışılarak, başlangıç tepkime hızları bulunmuştur.

$$r_0 = \frac{C_{A0}-C_A}{t}, \quad r_0 [=] \frac{mM}{dk} \quad (3.7)$$

Katalizör kütlesi başına tanımlanan başlangıç tepkime hızı (r_0'') eşitlik 3.8 ile hesaplanmıştır.

$$r_0'' = r_0 \frac{V}{m_e} \quad (3.8)$$

3.2.11 Kinetik parametrelerin hesaplanması

Michaelis-Menten (Eşitlik 2.31) ve Ping Pong bi bi (Eşitlik 2.39) hız denkleminde yer alan kinetik sabitler (r_m , K_m , K_{mA} , K_{mB}) hem r_0 hem de r_0'' için Polymath 6.1 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Programa Michaelis-Menten denkleminin çözümü için R-alkol derişimi ile başlangıç tepkime hızı, Ping Pong bi bi denkleminin çözümü için bunlara ilave olarak vinil bütirat derişimi girilmiştir. Her iki denklemin çözümünde de hem reaktör hacmi başına, hem de katalizör kütlesi başına tanımlanan başlangıç tepkime hızı (r_0 , r_0'') verileri kullanılarak, hem reaktör hacmi hem de katalizör kütlesi başına maksimum tepkime hızları (r_m , r_m'') elde edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Enzim Türünün Etkisi

Rasemik-2-pentanolün transesterleşme ile kinetik rezolüsyona enzim türünün etkisinin belirlenmesi amacıyla Lipozyme RM-IM (reçineye tutuklanmış *Mucor meihei* lipazı, Amona Lipaz AK (*Pseudomonas sp.*) ve Novozyme 435 (tutuklanmış *Candida antarctica* Lipaz B, 2083 U/g) olmak üzere 3 farklı ticari lipazla çalışılmıştır. Tepkimeler 150 mM eş substrat derişiminde (rasemik-2-pentanol ve vinil bütirat), 30°C sıcaklıkta ve 150 rpm karıştırma hızında, 150 mg enzim varlığında gerçekleştirilmiştir.

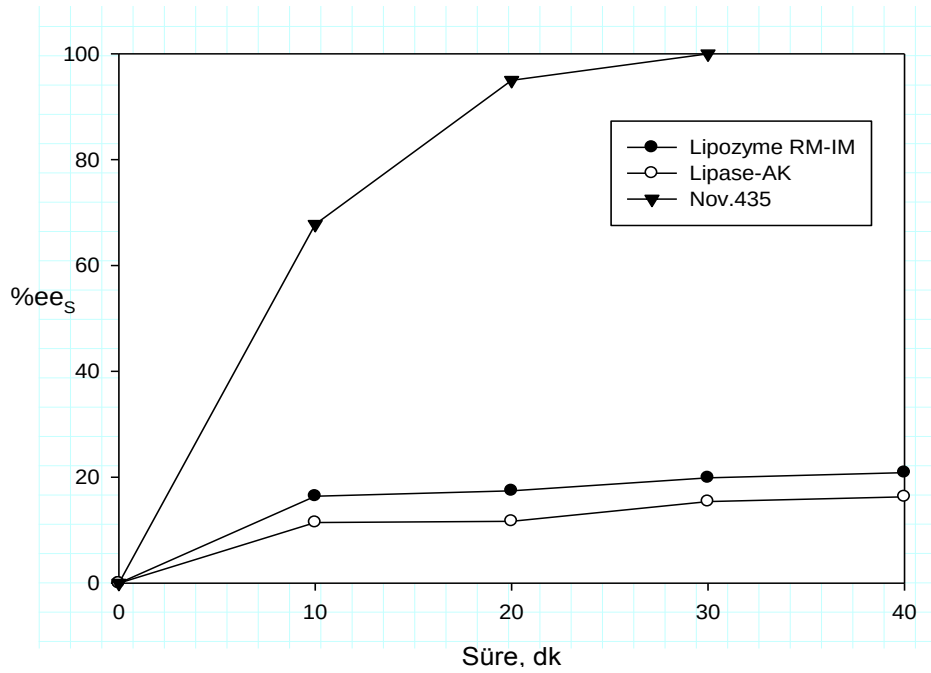
Novozyme 435 ile 30 dakika gibi kısa bir sürede %99 ee_s ve %50 dönüşüm değerine ulaşılmış (Şekil 4.1 ve 4.2), enantiyomerik oran 70 olarak elde edilmiştir. Lipozyme RM-IM ve Amona Lipaz AK ile daha da uzun süre çalışılmasına rağmen yeterli enantiyoseçimlilik değerine ulaşamamıştır. Lipozyme RM-IM ve Lipaz AK ile yaklaşık 40 dakikada %20 enantiyomerik aşırılığın ve %10 dönüşümün üstüne çıkılamamıştır.

Literatürle karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Patel vd. (2000) yaptıkları çalışmada rasemik-2-pentanolün hekzan ortamında vinil asetat ile kinetik rezolüsyonu için lipaz AK'nin etkin olmadığını ve tepkimeyi katalizlemediğini belirtmişlerdir.

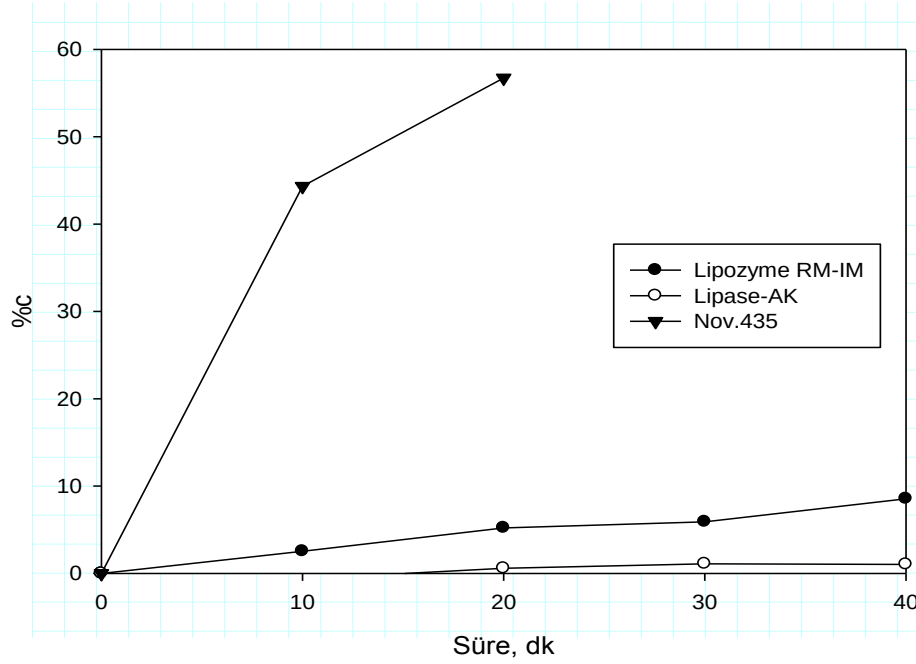
Literatürde ham enzimlerin tutuklanmış enzimlere göre daha düşük etkinliğe sahip olduğu belirtilmektedir (Goujard vd. 2009, Patel vd. 2000). Enzim türünün belirlenmesi için yapılan çalışmaların çoğunda en etkin lipaz kaynağının ve türünün tutuklanmış *Candida antarctica* lipaz B olduğu görülmektedir (Sontakke ve Yadav 2011, Goujard vd. 2009, Patel vd. 2000). Ayrıca literatürde tutuklanmış *Candida antarctica* Lipaz B'nin sekonder alkollerin kinetik rezolüsyonunda etkin olduğu belirtilmekle birlikte, enantiyoseçimliliğin substrat cinsinden etkilendiği bildirilmektedir (Raminelli vd. 2004).

Substrat olarak bir sekonder alkol olarak rasemik-2-pentanolün kullanıldığı bu çalışmada da en iyi enantiyomerik aşırılık, tutuklanmış *Candida antarctica* lipaz B ile elde edilmiştir. Bu durumun *Candida antarctica* lipaz B'nin, enzim aktif konumunu koruyan ve sarmayalan küçük ve basit bir kapağa sahip olmasından ve bu kapağın tepkime esnasında kolaylıkla açılmasından dolayı olduğu değerlendirilmektedir (Kapoor ve Gupta 2012).

Bununla birlikte bu durumun, tutuklanmış enzimlerin kararlılığın daha yüksek olmasından, lipaz kaynağının tutuklama yüzeyi ile hidrofobik etkileşime geçerek, etkinliğini daha da artırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Furukawa vd. 2002). Bu nedenle Novozyme 435, rasemik-2-pentanolün tranesterleşme ile kinetik rezolüsyonu için en etkin lipaz olarak belirlenmiştir.



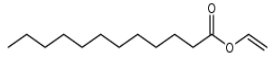
Şekil 4.1 Farklı enzim türleri için enantiyomerik aşırılığının zamanla değişimi (T=30°C, N=150 rpm, 150 mM rasemik-2-pentanol, 150 mM vinil bütirat, 150 mg enzim)



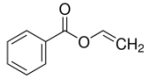
Şekil 4.2 Farklı enzim türleri için dönüşümün zamanla değişimi (T=30⁰C, N=150 rpm, 150 mM rasemik-2-pentanol, 150 mM vinil bütirat, 150 mg enzim)

4.2 Açıl Verici Türünün Etkisi

Tepkime için uygun açıl vericinin belirlenmesi amacıyla vinil laurat (C₁₄H₂₆O₂,

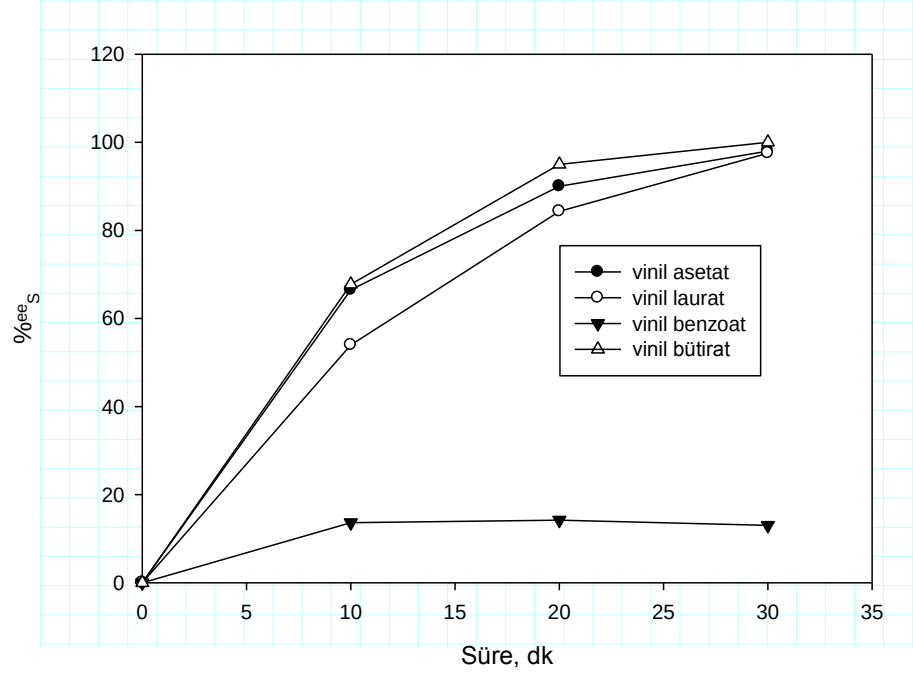


), vinil asetat (C₄H₆O₂, CC(=O)O=C), vinil benzoat (C₉H₈O₂,

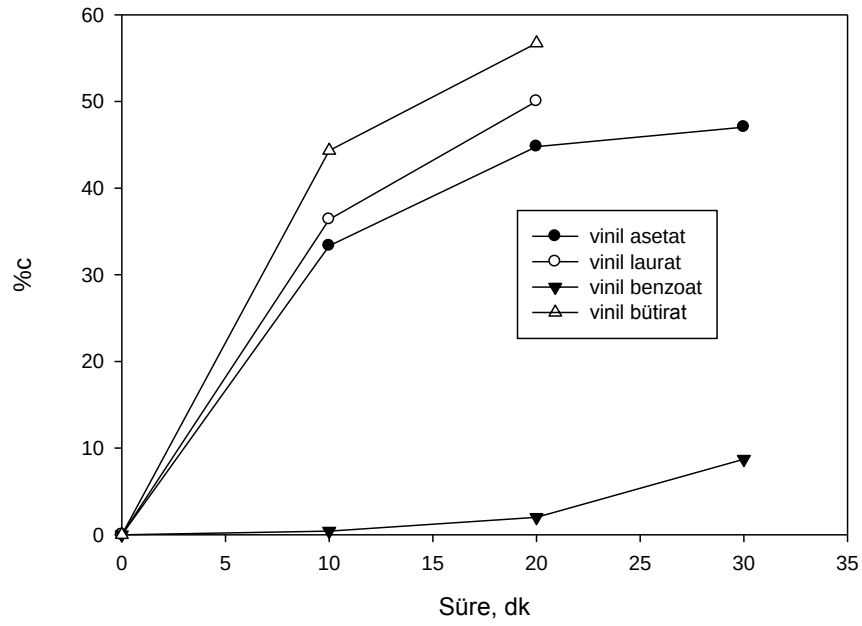


) ve vinil bütirat (C₆H₁₀O₂, CCC(=O)O=C) olmak üzere dört farklı

büyüklerdeki vinil esterle çalışılmıştır. Deneyler çözücü olarak hekzan kullanılarak 30 ml tepkime hacminde, 30⁰C sıcaklıkta, 150 rpm karıştırma hızında, 150 mM eş molar substrat (rasemik-2-pentanol ve açıl verici) derişiminde ve 150 mg Novozyme 435 ile gerçekleştirilmiştir. Vinil laurat, vinil asetat ve vinil bütirat için 20 dakika gibi kısa bir sürede %90'ın üzerinde enantiyomerik aşırılık ile %40'ın üzerinde dönüşüm elde edilmiştir (Şekil 4.3, 4.4). Buna karşın vinil benzoat ile 30 dakikada bile %20 enantiyomerik aşırılığa ulaşamamıştır. Vinil bütirat ve vinil laurat için enantiyomerik oran sırasıyla 40 ve 30 elde edilirken, diğer açıl vericiler için kayda değer E değerleri elde edilememiştir. Bu durumun diğer açıl vericilerden farklı olarak vinil benzoatta yer alan aromatik halkadan kaynaklandığı ve bunun da açıl verici-enzim kompleksi oluşumuna engel olduğundan kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 4.3 Farklı açıl vericiler için enantiyomerik aşırılığının zamanla değişimi (T=30⁰C, N=150 rpm, 150 mM rasemik-2-pentanol, 150 mM açıl verici, 150 mg Novozyme 435)



Şekil 4.4 Farklı açıl vericiler için dönüşümün zamanla değişimi (T=30⁰C, N=150 rpm, 150 mM rasemik-2-pentanol, 150 mM açıl verici, 150 mg Novozyme 435)

Goujard vd. (2009) açıl verici büyüklüğünün, rasemik-2-pentanolün kinetik rezolüsyonuna etkisini araştırdıkları çalışmalarında vinil asetat (C₄H₆O₂), vinil bütirat

(C₆H₁₀O₂), vinil laurat (C₁₄H₂₆O₂), vinil stearat (C₂₀H₃₈O₂) ile çalışmışlar ve açıl verici türüne karşı tepkime başlangıç hızı değerlerini belirlemişlerdir. *Candida antarctica* lipaz B biyokatalizörlüğünde yaptıkları çalışmada bu alifatik açıl vericiler ile kinetik rezolüsyonun başarı ile sağlandığını ancak; en yüksek başlangıç tepkime hızının vinil bütirat ile elde edildiği ve özellikle biyoteknolojik proseslerde esterleşme ve transesterleşme tepkimelerinde substratın alifatik zincir uzunluklarının önemli olabileceği belirtilmektedir.

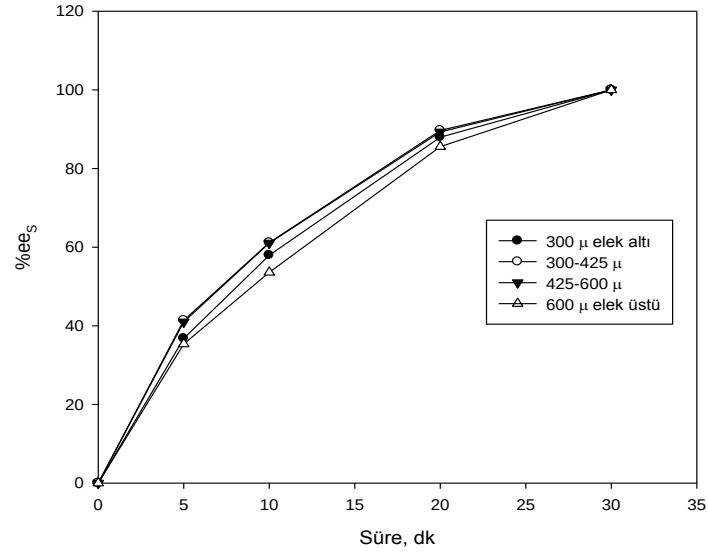
Bu çalışmada da uzun zincire sahip olmayan vinil bütirat ile en iyi enantiyomerik aşırılık değerine ulaşılmıştır. Rasemik-2-pentanolün transesterleşmesinde açıl verici olarak vinil bütirat kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3 Enzim Tanecik Boyutunun Etkisi

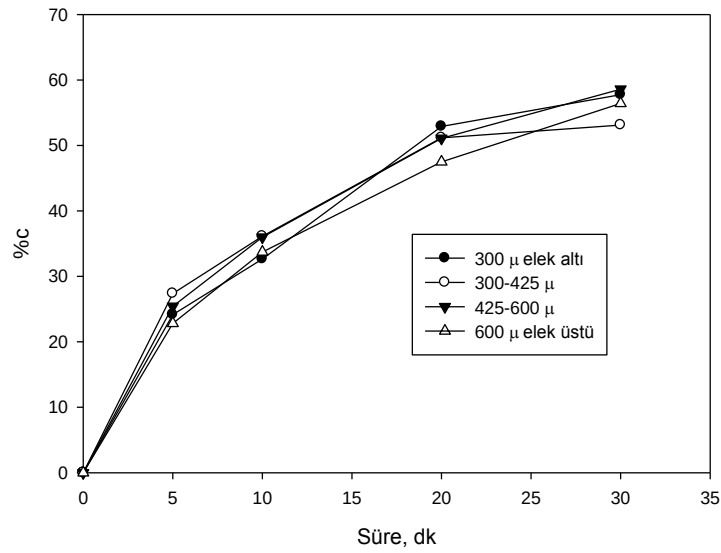
Tutuklanmış enzim katalizörlüğünde tepkime gerçekleştirildiğinden tanecik boyutunun büyüklüğü gözenek içi kütle aktarım dirençlerine neden olmaktadır. Bu amaçla gözenek içi difüzyon kısıtlamalarının etkisini belirlemek için 300, 425 ve 600 mikronluk elekler kullanılarak elde edilen dört farklı tanecik boyutundaki Novozyme 435 ile çalışılmış; enantiyomerik aşırılık, dönüşüm ve başlangıç tepkime hızı değerleri ölçülmüştür.

Dört farklı tanecik boyutu için de yüksek enantiyomerik aşırılık (> %99) elde edilmiş (Şekil 4.5), hemen hemen aynı sürede %50 dönüşüme ulaşılmıştır (Şekil 4.6). Dört farklı tanecik boyutu için de E değeri 20'in üstünde elde edilmiştir. 300 mikron altı, 300-425 mikron arası, 425-600 mikron arası ve 600 mikron üstü olmak üzere sırasıyla E değerleri 23, 26, 38 ve 100 olarak bulunmuştur. Tanecik boyutunun (dp); başlangıç tepkime hızına olan etkisine bakıldığında (Şekil 4.7), tanecik boyutunun 300 µ'dan 600 µ'a değişiminin başlangıç tepkime hızında belirgin bir değişikliğe neden olmadığı, değerlerin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Enzimin tanecik boyutunun artmasıyla molekülün alacağı yolun artmasına rağmen başlangıç tepkime hızında belirgin bir artış gözlenmemiştir. Bu nedenle incelenen tanecik boyutu aralığında gözenek içi kütle aktarım direncinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu belirlenmiştir. Kinetik hesaplamalarda yığın faz derişimleri dikkate alınmıştır. Bununla birlikte çalışmada

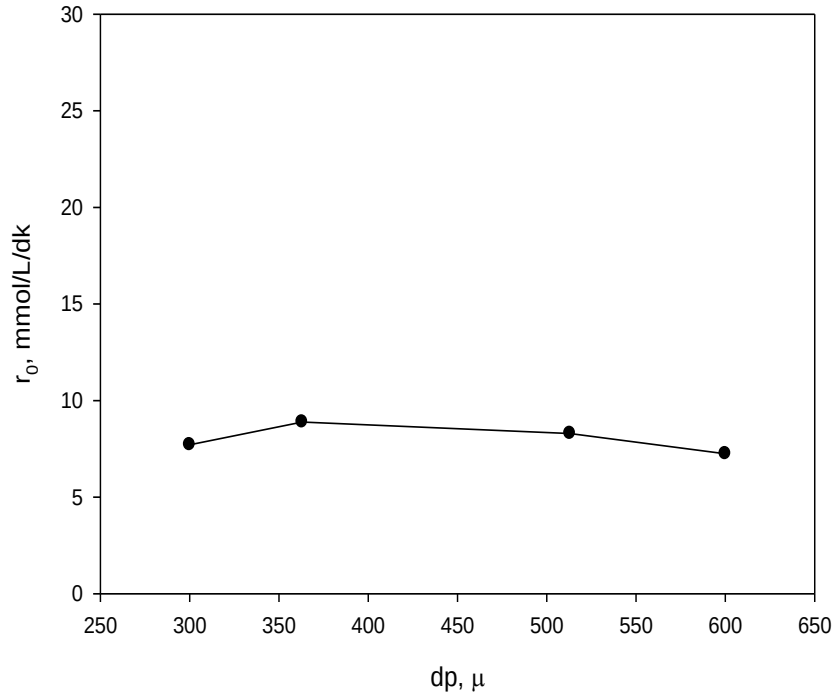
kullanılan Novozyme 435'in tanecik boyutunun çok büyük olmadığı da göz önünde bulundurulmalıdır.



Şekil 4.5 Farklı tanecik boyutundaki enzim için zamana karşı enantiyomerik aşırılık ($T=30^{\circ}\text{C}$, $N=150$ rpm, 150 mM rasemik-2-pentanol, 150 mM vinil bütirat, 150 mg Novozyme 435)



Şekil 4.6 Farklı tanecik boyutundaki enzim için zamana karşı dönüşüm ($T=30^{\circ}\text{C}$, $N=150$ rpm, 150 mM rasemik-2-pentanol, 150 mM vinil bütirat, 150 mg Novozyme 435)



Şekil 4.7 Enzim tanecik boyutuna karşı başlangıç tepkime hızları ($T=30^{\circ}\text{C}$, $N=150$ rpm, 150 mM rasemik-2-pentanol, 150 mM vinil bütirat, 150 mg Novozyme 435)

Zhang ve Lui (2011) rasemik ketoprofen etil esterden hidroliz tepkimesi ile S-ketoprofen elde ettikleri çalışmalarında tutuklanmış enzim (tutuklanmış *T.laibacchii* lipazı) kullanmaları nedeniyle iç ve dış kütle aktarım dirençlerinin kinetik rezolüsyona etkisini incelemişlerdir. İç kütle aktarım direncinin etkisini belirlemek için farklı tanecik boyutunda enzimlerle çalışarak, dönüşümün değişimine bakmışlardır. Belli bir tanecik boyutuna kadar (200 μ ile 500 μ aralığında) dönüşümün tanecik boyutundan etkilenmediğini ancak, tanecik boyutunun daha da artırılması (500 μ ile 1700 μ aralığında) ile dönüşümün keskin bir şekilde düştüğünü bildirmişlerdir. Bu nedenle düşük tanecik boyutundaki enzim (ortalama 500 μ) ile çalışılarak iç kütle aktarım kısıtlamasının etkisinin ihmal edilebileceğini belirtmişlerdir.

Bununla birlikte Wang vd. (2009c), lipaz biyokatalizörlüğünde sitalopramın kinetik rezolüsyonunun modellenmesini inceledikleri çalışmalarında, gözlenen tepkime hızının, ideal tepkime hızına (yayınma kısıtlamasız hız) oranı olarak ifade edilen Thiele modülünün (Φ), 0.3'den küçük olması durumunda kütle aktarımının, tepkime hızından daha hızlı olduğunu ve yığın derişimlerinin doğrudan olarak kinetik modelde

kullanılabileceğini, $\Phi > 3$ 'ün reaksiyonun kütle aktarım kısıtlayıcı olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir. 600 μ tanecik çapındaki Novozyme 435 ile yaptıkları çalışmada için Thiele modülünü 0.017 olarak hesapladıklarını, Thiele modülünün çok küçük olması nedeniyle iç kütle aktarım kısıtlamalarının ihmal edilebileceğini bildirmişler ve bu koşullarda etkin difüzyon katsayısını $1.95 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ olarak hesapladıklarını belirtmişlerdir.

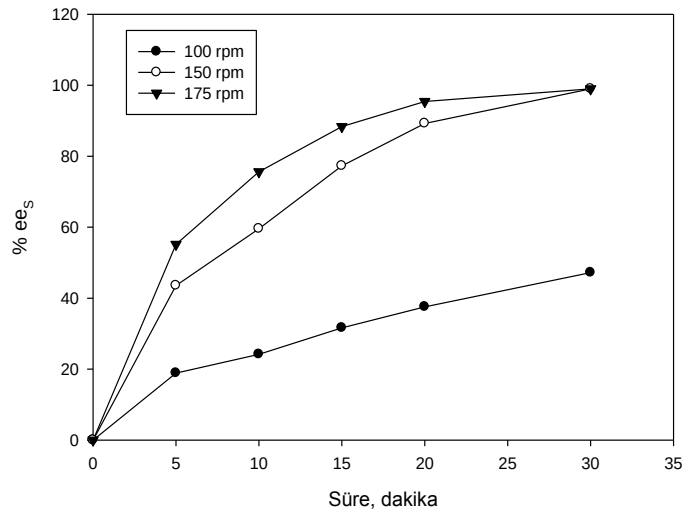
4.4 Karıştırma Hızının Etkisi

Tepkimenin tutuklanmış enzimle gerçekleştirilmesi nedeniyle sistemde dış kütle aktarım kısıtlamaları bulunmaktadır. Bu etkileri belirlemek amacıyla 100, 150, 175 ve 200 rpm olmak üzere dört farklı karıştırma hızında çalışılmıştır. 200 rpm karıştırma hızında orbital çalkalayıcının tepkime kabını fırlatması ve enzimin tepkime kabı cidarına yapışması nedeniyle bu karıştırma hızında çalışılamamıştır. Diğer karıştırma hızlarında yapılan çalışmalar için enantiyomerik aşırılık, dönüşüm ve başlangıç tepkime hızı değerleri hesaplanmıştır. 150 ve 175 rpm için birbirine yakın değerler elde edilirken, 100 rpm'de daha düşük değerler elde edilmiştir. 150 ve 175 rpm karıştırma hızlarında yaklaşık 30 dakikada %99 enantiyomerik aşırılığa ulaşılırken, 100 rpm karıştırma hızında 30 dakikada yaklaşık %50 enantiyomerik aşırılığa ulaşılabilmiştir (Şekil 4.8). E değerleri 100, 150 ve 175 rpm için sırasıyla 22, 182 ve 72 olarak elde edilmiştir.

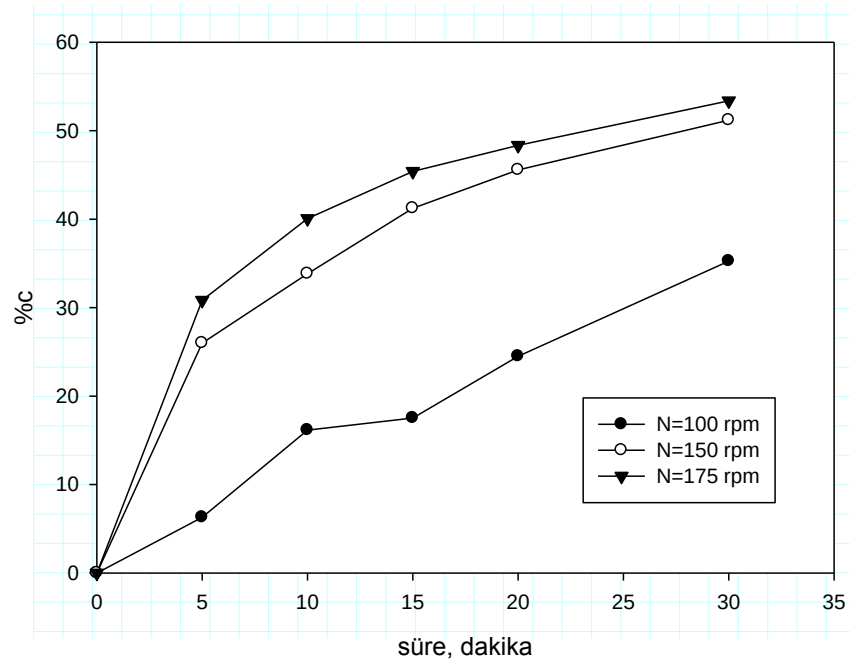
Dönüşüm için de benzer sonuçlar elde edilmiş (Şekil 4.9), 150 ve 175 rpm karıştırma hızlarında yüksek ve birbirine yakın dönüşüm değerleri elde edilirken, 100 rpm karıştırma hızında ancak %30 dönüşüm elde edilebilmiştir. Zhang ve Lui (2011) rasemik ketoprofen etil esterden hidroliz tepkimesi ile S-ketoprofen elde ettikleri çalışmalarında tutuklanmış enzim (tutuklanmış *T.laibacchii* lipazı) kullanmaları nedeniyle dış kütle aktarım kısıtlamasının kinetik rezolüsyona etkisini incelemek amacıyla farklı karıştırma hızlarında (50-300 rpm) çalışarak, karıştırma hızının dönüşüme etkisine bakmışlardır. 150 rpm karıştırma hızına kadar, karıştırma hızının artışı ile dönüşümün de arttığını, 150 rpm karıştırma hızından daha büyük hızlarda dönüşümün çok etkilenmediğini ve bu nedenle 200 rpm karıştırma hızında çalışılarak

dış kütle aktarım kısıtlamalarının ihmal edilebileceğini belirtmişlerdir. Bundan dolayı hem substrat hem de ürün için yığın faz derişim değerlerinin kinetik hesaplamalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş ve 150 ile 175 rpm karıştırma hızlarında keskin bir farklılık görülmemiştir.

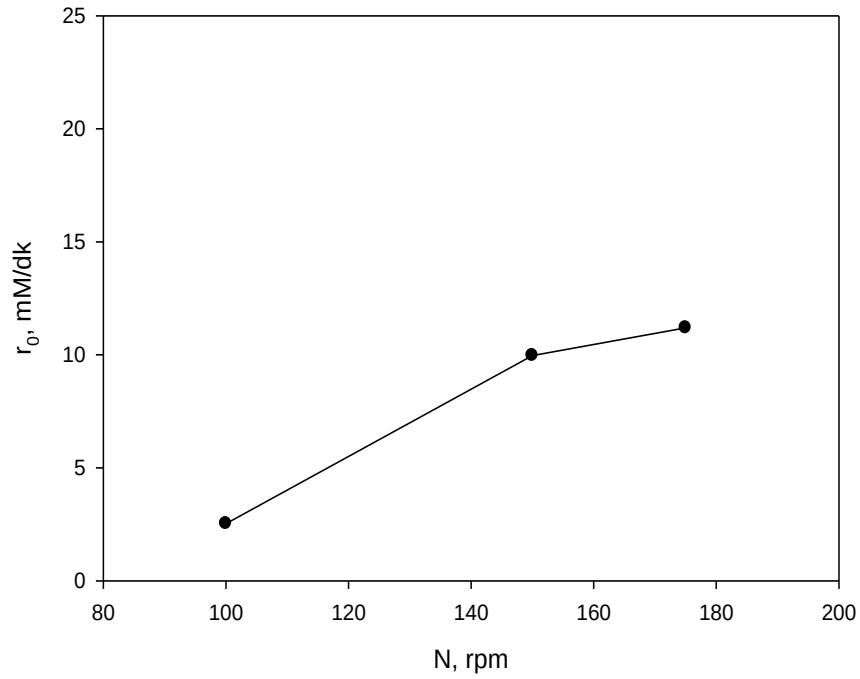
Karıştırma hızının başlangıç tepkime hızına etkisine bakıldığında da benzer sonuçlarla karşılaşılmış (Şekil 4.10), karıştırma hızının 100 rpm'den 150 rpm'e artırılması ile başlangıç tepkime hızında da artış görülmüştür. 150 rpm ve 175 rpm için birbirine yakın değerler elde edilmekle beraber, başlangıç tepkime hızında %10'luk hafif bir artış görülmüş ancak; yüksek karıştırma hızında çalışma güçlüğünden dolayı 150 rpm karıştırma hızında çalışılarak da kütle aktarım kısıtlamalarının ihmal edilebileceği kabul edilmiştir. Sonuç olarak, düşük karıştırma hızları için dış kütle aktarım kısıtlamasının var olduğu, 150 rpm ve üzerindeki karıştırma hızı için kütle aktarım kısıtlamasının etkisinin azaldığı belirlenmiştir. 150 rpm ve 175 rpm karıştırma hızları için birbirine yakın değerler elde edilmiştir. Enzim üzerinde kayma gerilimi yaratmamak amacıyla 150 rpm karıştırma hızında çalışılması tercih edilmiştir. 150 rpm karıştırma hızında dış kütle aktarım kısıtlamalarının ihmal edilebilir düzeyde olması nedeniyle kinetik hesaplamalarda yığın faz derişimleri dikkate alınmıştır.



Şekil 4.8 Farklı karıştırma hızları için enantiyomerik aşırılığın zamanla değişimi (T=30°C, 150 mM rasemik-2-pentanol, 150 mM vinil bütirat, 150 mg Novozyme 435)



Şekil 4.9 Farklı karıştırma hızları için dönüşümün zamanla değişimi ($T=30^{\circ}\text{C}$, 150 mM rasemik-2-pentanol, 150 mM vinil bütirat, 150 mg Novozyme 435)

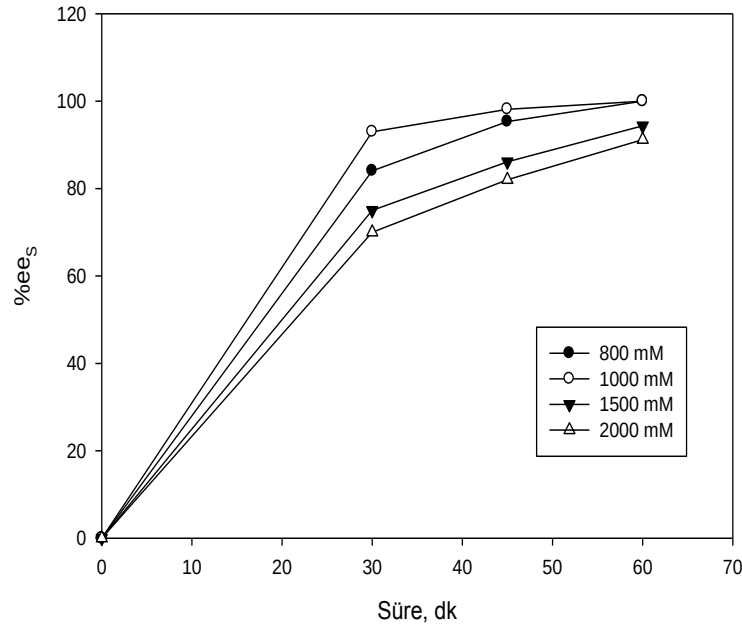


Şekil 4.10 Farklı karıştırma hızları için başlangıç tepkime hızları ($T=30^{\circ}\text{C}$, 150 mM rasemik-2-pentanol, 150 mM vinil bütirat, 150 mg Novozyme 435)

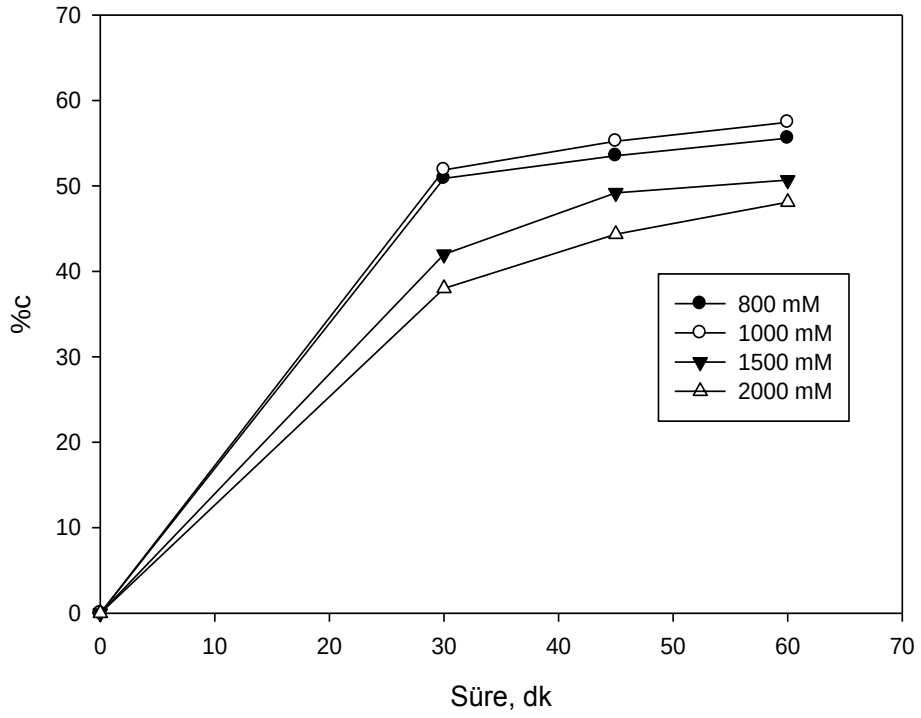
4.5 Substrat Derişiminin Etkisi

Büyük ölçekte üretim çalışmalarına temel oluşturma amacıyla yüksek substrat derişiminin kinetik rezolüsyona etkisi araştırılmıştır. Çalışmalar eş molar rasemik-2-pentanol ve vinil bütirat derişimlerinde, 30⁰C sıcaklıkta, 150 rpm karıştırma hızında ve 150 mg Novozyme 435 varlığında gerçekleştirilmiştir. Substrat derişimi 800-2000 mM aralığında tutulmuştur. Tepkimeler, %50 dönüşüme ulaştığında sonlandırılmıştır. İncelenen tüm derişimler için ortalama 45 dakikada %50 dönüşüme ve %90'ın üzerinde enantiyomerik aşırılığa (Şekil 4.11) ulaşılmıştır.

Sonuç olarak substrat derişiminin artmasına rağmen, birbirine yakın enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm değerleri (Şekil 4.12) elde edilmiştir. Substrat derişimine karşı başlangıç tepkime hızları ölçülmüş (Şekil 4.13) ve artan substrat derişimi ile başlangıç tepkime hızında artış olduğu gözlenmiştir. Buna bağlı olarak incelenen derişim aralığında substrat inhibisyonu olmadığı ve yüksek substrat derişiminde çalışılabileceği belirlenmiştir.



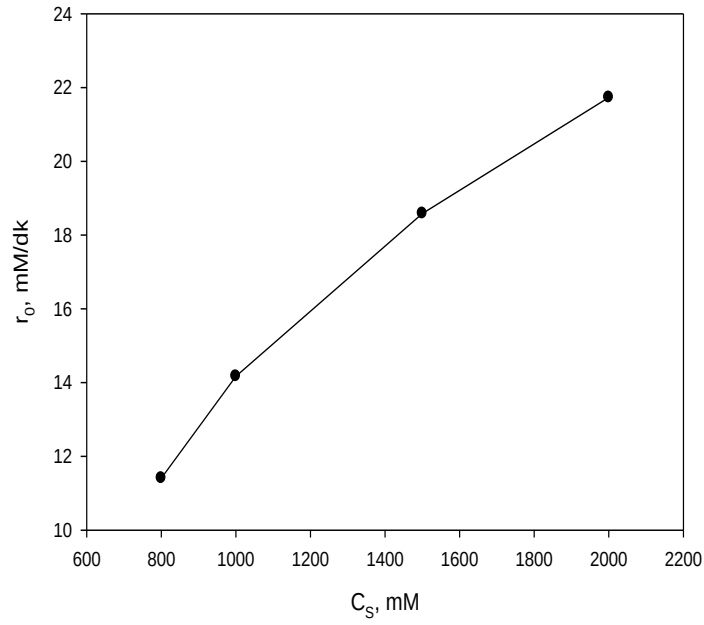
Şekil 4.11 Farklı substrat derişimleri için enantiyomerik aşırılığın zamanla değişimi (T=30⁰C, N=150 rpm, 150 mg Novozyme 435)



Şekil 4.12 Farklı substrat derişimleri için dönüşümün zamanla değişimi ($T=30^{\circ}\text{C}$, $N=150$ rpm, 150 mg Novozyme 435)

Sontakke ve Yadav (2011)'ın rasemik-2-pentanolün (375-3000 mM) heptan ortamında vinil asetat ile kinetik rezolüsyonunu inceledikleri çalışmada tepkimenin, substrat inhibisyonlu Ping Pong bi bi mekanizmasına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Goujard vd. (2009) ise rasemik-2-pentanolün vinil stereat ile kinetik rezolüsyonun inceledikleri çalışmada yarışmalı substrat (alkol) inhibisyonuna sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada başlangıç tepkime hızının substrat derişimin artması ile azalmaması ve bölüm 4.8'de belirtilen kinetik sabitlerin anlamı dikkate alınarak 800-2000 mM substrat derişimi aralığında, substrat inhibisyonu olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.13 Yüksek substrat derişiminin başlangıç tepkime hızına etkisi ($T=30^0C$, $N=150$ rpm, 150 mg Novozyme 435)

4.6 Açıl verici/rasemik-2-pentanol Mol Oranının Etkisi

Açıl verici/rasemik-2-pentanol mol oranının (n) transesterleşme üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda çizelge 4.1’de belirtilen mol oranlarında çalışılmıştır. Deneylerde rasemik-2-pentanol derişimi sabit tutularak, farklı derişimlerde açıl verici kullanılmıştır.

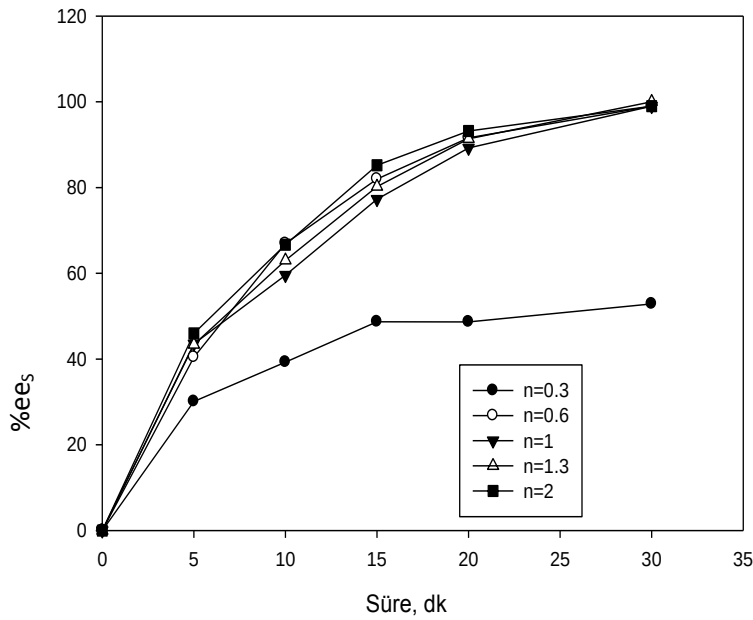
Çizelge 4.1 Çalışılan farklı açıl verici/rasemik-2-pentanol mol oranları (n)

Açıl verici derişimi, mM	Rasemik-2-pentanol derişimi, mM	n
50	150	0.3
100	150	0.6
150	150	1
200	150	1.3
300	150	2

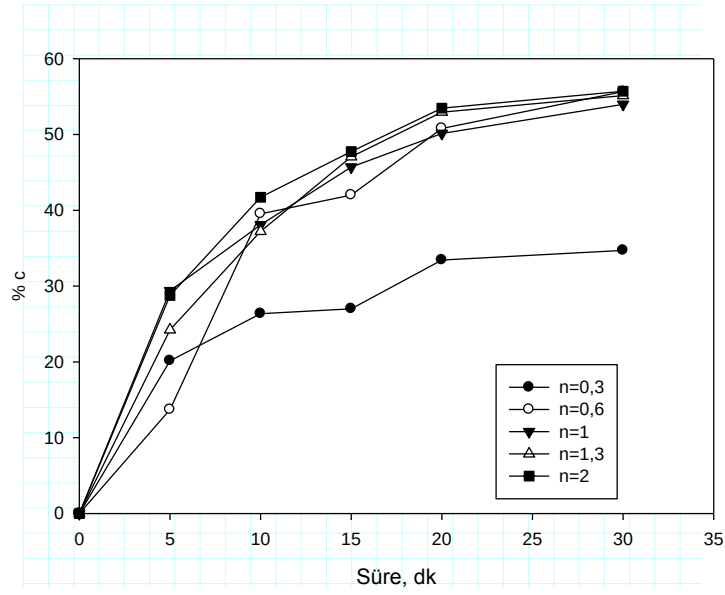
Sonuçlara bakıldığında (Şekil 4.14, 4.15) açıl verici derişiminin R-2-pentanol derişiminden küçük olduğu $n=0.3$ mol oranı için çok düşük enantiyomerik aşırılık (%53) ve dönüşüm (%30) elde edildiği, açıl verici derişiminin R-2-pentanol derişiminden daha büyük olduğu n değeri için sonuçların birbirine yakın olduğu, ortalama 20 dakika gibi kısa bir sürede %50 dönüşüme ve yüksek enantiyomerik aşırılığa ulaşıldığı görülmüştür.

Bu durumun transesterleşmenin gerçekleşmesi için R-2-pentanolün tepkimeye gireceği yeterli miktarda açıl verici-enzim kompleksi oluşabilmesi için, açıl verici derişiminin R-2-pentanol derişiminden daha fazla olması gerektiğinden kaynaklandığı düşünölmüştür.

Bu nedenle optimum transesterleşme koşullarının oluşabilmesi için açillenme basamağı göz önünde tutularak, yüksek enantiyomerik aşırılık elde edilebilmesi için açıl verici miktarının tepkimeye giren substrat olan R-2-pentanol miktarından fazla olması gerektiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.14 Farklı açıl verici/rasemik-2-pentanol mol oranı için enantiyomerik aşırılığın zamanla değışimi ($T=30^{\circ}\text{C}$, $N=150$ rpm, 150 mg Novozyme 435)



Şekil 4.15 Farklı açıl verici/rasemik-2-pentanol mol oranı için dönüşümün zamanla değişimi ($T=30^{\circ}\text{C}$, $N=150\text{ rpm}$, 150 mg Novozyme 435)

4.7 Cevap Yüzey Yöntemi ile Substrat-Enzim Derişiminin Optimizasyonu

Substrat (rasemik-2-pentanol ve vinil bütirat) ve enzim derişimin aynı anda kinetik rezolüsyona etkisinin belirlenmesi amacıyla bağımsız değişken olarak başlangıç substrat (C_{S0} , mM) ve enzim (C_E , mg/ml) derişimi, bağımlı değişken olarak başlangıç tepkime hızı (mM/dk) seçilerek, 2 faktörlü 5 seviyeli deneysel tasarım (Çizelge 4.2) uygulanmış ve bu tasarım sonucu elde edilen modelsel ve gerçek (deneysel) veriler çizelge 4.3’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2 RSM ile iki bağımsız değişken için elde edilen kodlu ve gerçek değerler

Bağımsız Değişken	Kodlu Değer					
	Simge	-1.41	-1	0	1	1.41
C_{S0} , mM	A	293	500	750	1500	1707
C_E ,mg/ml	B	0.03	1.5	2.5	4	4.5

Çizelge 4.3 RSM sonucu elde edilen kodlu ve gerçek deneysel koşullar ile cevap değişkeninin deneysel sonucu

Deney No	Bağımsız Değişkenler				Cevap değişkeni, r_0 , mM/dk	
	Kodlu değer		Gerçek değer		Model	Deneysel
	A	B	C_{S0} , mM	C_E , mg/ml		
1	-1	-1	500	1.5	7.12	5.76
2	1	-1	1500	1.5	6.81	7.30
3	-1	1	500	4	12.94	14.68
4	1	1	1500	4	24.88	28.48
5	-1.41421	0	292.89	2.75	8.83	7.56
6	1.414214	0	1707.11	2.75	17.05	13.16
7	0	-1.41421	1000	0.982233	4.49	5.84
8	0	1.414214	1000	4.517767	21.38	18.34
9	0	0	1000	2.75	12.94	13.08
10	0	0	1000	2.75	12.94	13.42
11	0	0	1000	2.75	12.94	13.41
12	0	0	1000	2.75	12.94	13.81
13	0	0	1000	2.75	12.94	13.40

Cevap yüzey yöntemi ile elde edilen, başlangıç tepkime hızının substrat ve enzim derişimi ile değişimini ifade eden denklemin kodlu (Eşitlik 4.1) ve gerçek değeri (Eşitlik 4.2) aşağıda verilmiştir:

$$r_0 = 12.93846 + 2.907449A + 5.972209B + 3.065AB \quad (4.1)$$

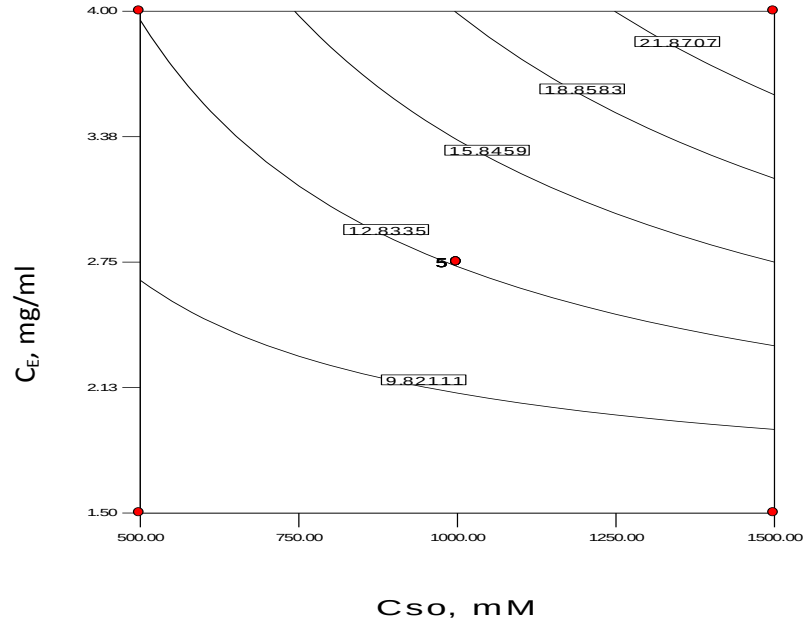
$$r_0 = 7.470703 - 0.00767C_{S0} - 0.12623C_E + 0.004904C_{S0}C_E \quad (4.2)$$

Design Expert 6.0 programına göre Prob>F değerinin<0.05 olması modelin hassaslığını, parametrenin model üzerine etkisinin önemli olduğunu göstermektedir. İki bağımsız değişken ve bunların çarpımı için Prob>F değeri 0.05’den küçük çıkmıştır. Bu da bu üç terimin (C_{SO} , C_E , $C_{SO}*C_E$) başlangıç tepkime hızı için önemli değişkenler olduğunu göstermektedir. Bu üç terim arasından C_E ’nin Prob>F değeri <0.0001 olduğundan model için en önemli terimin enzim derişimi olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Modele ilişkin istatistiki veriler (standart analysis of variance-ANOVA) çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

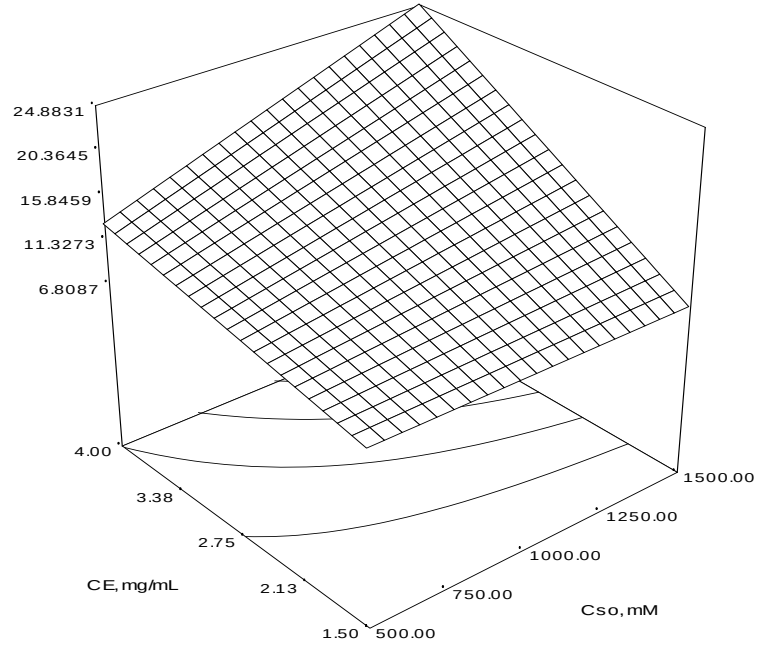
Çizelge 4.4 Model için ANOVA değerleri

Veri	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin oranı	F Value	Prob > F
Model	390.5412	3	130.1804	24.77176	0.0001
A	67.6261	1	67.6261	12.86843	0.0059
B	285.3382	1	285.3382	54.29641	< 0.0001
AB	37.5769	1	37.5769	7.150429	0.0255
Hata	0.26112	4	0.06528		
Toplam	437.838	12			
$R^2=0.891977$, $Adj.R^2=0.855969$					

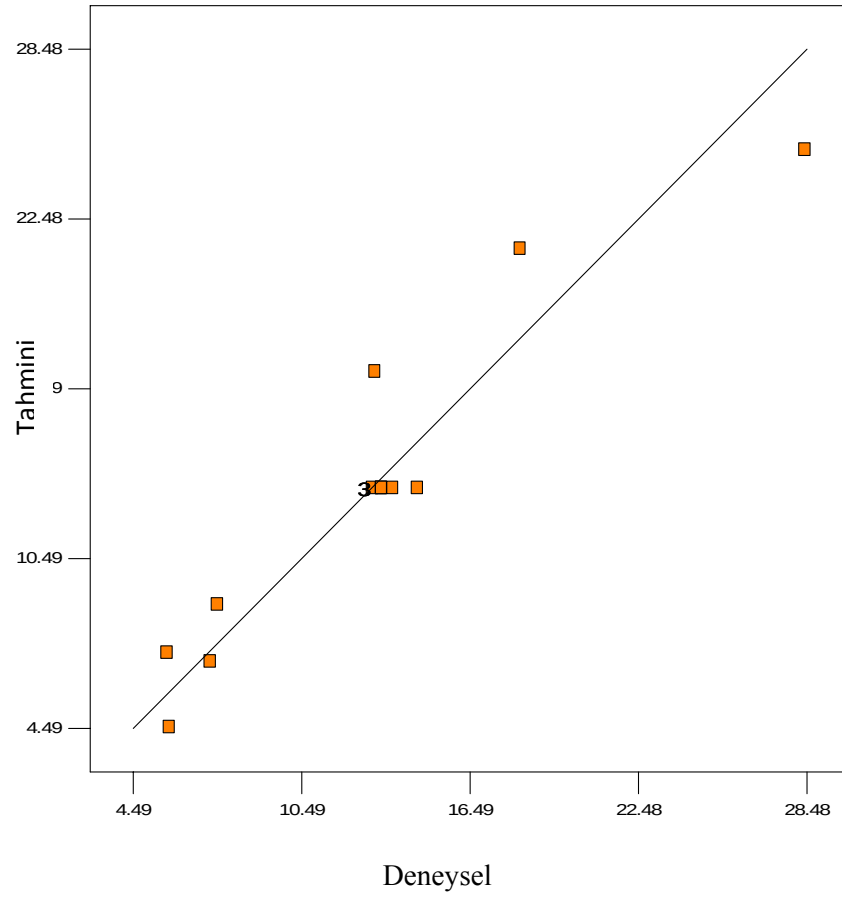
Substrat ve enzim derişimi artıkça başlangıç tepkime hızının artığı görülmüştür (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). RSM sonucuna göre 1500 mM substrat, 120 mg enzim kullanılması halinde başlangıç tepkime hızı 24.88 mM/dk olarak belirlenmiştir. Aynı koşullar için başlangıç tepkime hızı deneysel olarak 28.48 mM/dk olarak bulunmuştur. Birbirine yakın sonuçlar elde edilmesi, RSM sonucu ile elde edilen denklemin tepkime için uygun olduğunu göstermektedir (Şekil 4.18). Bu koşullarda ee_s , c ve E sırasıyla %99, %48 ve 70 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.16 Substrat ve enzim derişiminin başlangıç tepkime hızına ikili etkisi ($T=30^0C$, $N=150$ rpm, 150 mg Novozyme 435)



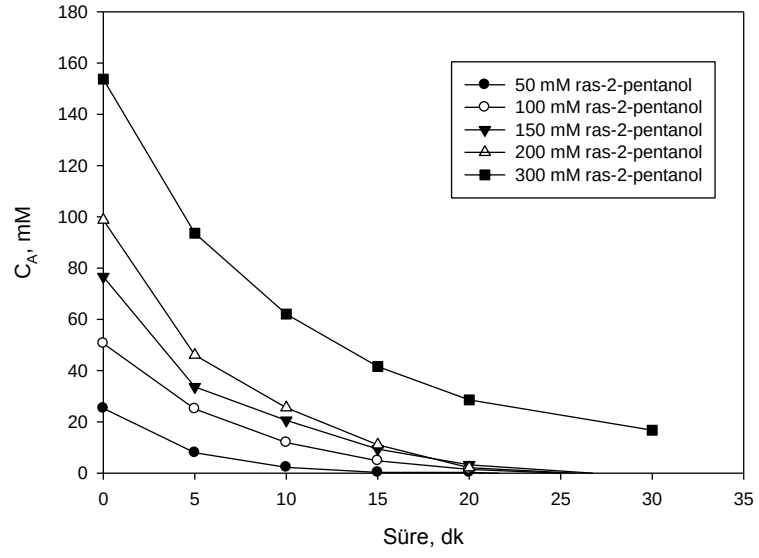
Şekil 4.17 Substrat ve enzim derişiminin başlangıç tepkime hızına ikili etkisi ($T=30^0C$, $N=150$ rpm, 150 mg Novozyme 435)



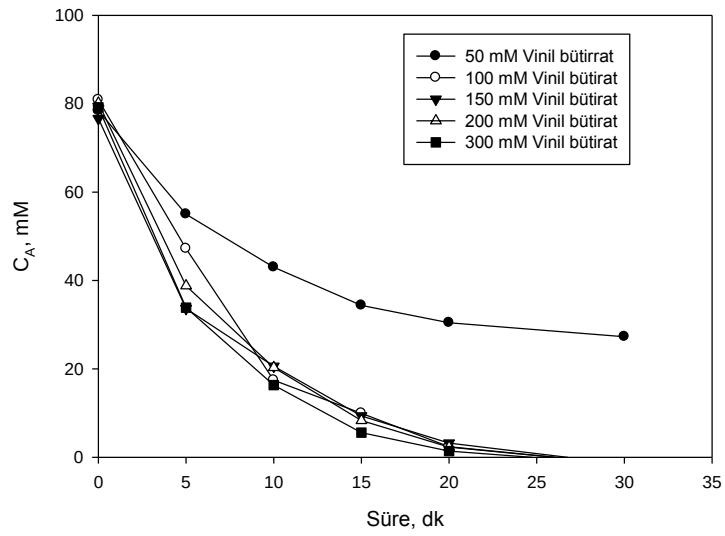
Şekil 4.18 Deneysel verilerin RSM ile elde edilen modellerle karşılaştırması

4.8 Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi

Kinetik sabitlerin belirlenmesi için farklı substrat değişimlerinde çalışılmıştır. Hesaplamalarda birinci substrat olarak R-alkol, 2. substrat olarak açıl verici kullanılmıştır. C_A , R-2-pentanol (mM); C_B , vinil bütirat (mM) değişimini göstermek üzere 150 mM sabit vinil bütirat değişimine karşı farklı değişimlerdeki rasemik-2-pentanol ile yapılan çalışmaların sonucu şekil 4.19'da; 150 mM sabit rasemik-2-pentanol değişimine karşı farklı değişimlerdeki vinil bütirati ile yapılan çalışmaların sonucu şekil 4.20'de verilmiştir. Değişimin zamanla değişim değerleri toplu olarak EK 5'de verilmiştir. Zamana karşı R-alkol grafiğinin eğiminden başlangıç tepkime hızları (r_0 , mM/dk) hesaplanmıştır.



Şekil 4.19 150 mM vinil bütirat derişimine karşı farklı derişimlerdeki rasemik-2-pentanol tepkimesi için süreye karşı R-2-pentanol derişimi ($T=30^{\circ}\text{C}$, $N=150$ rpm, 150 mg Novozyme 435)



Şekil 4.20 150 mM rasemik-2-pentanol derişimine karşı farklı derişimlerdeki vinil bütirat tepkimesi için süreye karşı R-2-pentanol derişimi ($T=30^{\circ}\text{C}$, $N=150$ rpm, 150 mg Novozyme 435)

Başlangıç tepkime hızları (Çizelge 4.5) kullanılarak, Polymath 6.1 yazılımı ile inhibisyonlu (Eşitlik 2.39) ve substrat inhibisyonlu (Eşitlik 2.42) durum için çözülmüştür.

Çizelge 4.5 Farklı başlangıç substrat derişimleri için başlangıç tepkime hızları

No.	C _A	C _B	r ₀ , mM/dk
1	25	150	3.4597
2	50	150	5.1153
3	75	150	8.5941
4	100	150	10.5352
5	150	150	12.0136
6	75	50	4.685
7	75	100	6.7339
8	75	200	8.2698
9	75	300	9.0647
10	1000	2000	21.7298
11	750	1500	18.5846
12	500	1000	14.17146
13	400	800	11.40977

Elde edilen kinetik parametrelerin değerlerine bakılarak, tepkimenin hız denklemine karar verilmiştir. Çizelge 4.6’da gösterilen hız sabitlerine bakıldığında substrat inhibisyonlu durum için hız sabitlerinden birinin negatif çıktığı görülmüştür. Bu değerin anlamsız olması nedeniyle tepkimenin substrat inhibisyonlu Ping Pong bi bi mekanizmasına sahip olduğu değerlendirilmiştir. Bu sonuç, yüksek substrat derişimlerinde çalışılmasına rağmen, substrat derişiminin artması ile başlangıç tepkime hızında düşüş gözlenmemesi (Şekil 4.13) ile örtüşmektedir. Buna karşın Sontakke ve Yadav’ın (2011) rasemik-2-pentanolün vinil asetatla kinetik rezolüsyonun inceledikleri çalışma ile uyuşmamaktadır. Sontakke ve Yadav (2011) tepkimenin substrat

inhibisyonlu Ping Pong bi bi mekanizmasına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bu farklılığın kullanılan rasemik alkollerin aynı olmasına rağmen, açıl vericilerin, çözücünün ve derişimlerin farklı olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.6 Ping Pong bi bi mekanizması için substrat inhibisyonlu ve inhibisyonsuz durum için belirlenen kinetik parametreler

Kinetik parametre	İnhibisyonlu durum	İnhibisyonsuz durum
r_m , mmol/L/dk	48.13	20.82
K_{mA} , mmol/L/dk	-39.58	103.73
K_{mB} , mmol/L/dk	2020.92	51.18
K_I , mmol/L/dk	1868.83	-

Ping Pong bi bi mekanizmasına göre elde edilen tepkime hız denklemi (hacim başına tanımlanan tepkime hızı için) aşağıda gösterilmiştir:

$$r = \frac{20.82C_A C_B}{103.73C_B + 51.18C_A + C_A C_B} \quad (4.3)$$

Tepkimenin inhibisyonsuz Ping Pong bi bi mekanizmasına sahip olduğu belirlendikten sonra, başlangıç tepkime hızı katalizör kütlesi başına tanımlanarak, kinetik sabitler hesaplanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Ping Pong bi bi mekanizması kinetik parametreler

Kinetik parametre	İnhibisyonsuz durum
r_m , mmol/dk/g enzim	4.16
K_{mA} , mmol/L/dk	103.73
K_{mB} , mmol/L/dk	51.18

Ping Pong bi bi mekanizmasına göre elde edilen tepkime hız denklemi (katalizör kütlesi başına tanımlanan tepkime hızı için):

$$r'' = \frac{4.16C_A C_B}{51.18C_A + 103.73C_B + C_A C_B} \quad (4.4)$$

Hesaplama kolaylığı ve her iki hız ifadesi arasındaki farkın görülebilmesi için tepkimenin Michaelis Menten kinetiğine (Eşitlik 2.28) sahip olduğu varsayılarak tepkime kinetik parametreleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 Michaelis Menten mekanizması için kinetik parametreler

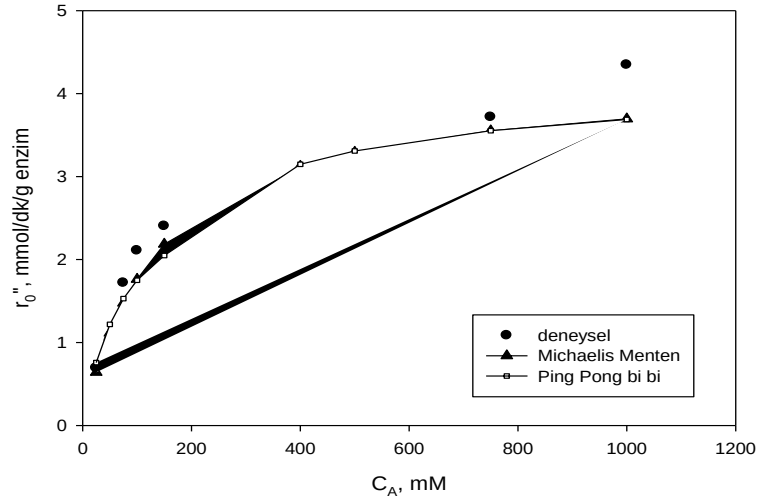
Kinetik parametre	İnhibisyonsuz durum
r_m , mmol/dk/g enzim	4.2
K_{mA} , mmol/L/dk	138

Michaelis-Menten mekanizmasına göre elde edilen tepkime hız denklemi (katalizör kütlesi başına tanımlanan tepkime hızı için):

$$r'' = \frac{4.2C_A}{138 + C_A} \quad (4.5)$$

Ping Pong bi bi ve Michaelis-Menten kinetikleri incelendiğinde maksimum tepkime hızının her iki model için birbirine çok yakın elde edildiği görülmüştür. Bu durum açıl verici derişiminin, R-alkol derişiminden fazla tutulması halinde tepkimenin tek substratlı tepkime gibi davrandığı göstermektedir.

Deneysel ve tahmini başlangıç tepkime hızı verileri şekil 4.21’de gösterilmiştir. Sonuçların birbirine yakın olduğu görülmektedir.



Şekil 4.21 Başlangıç R-2-pentanol derişimine karşılık deneyisel, Michaelis-Menten ve Ping Pong bi bi kinetiklerinin başlangıç tepkime hızı için karşılaştırması (150 mM vinil bütirat, $T=30^0C$, $N=150$ rpm, 150 mg Novozyme 435)

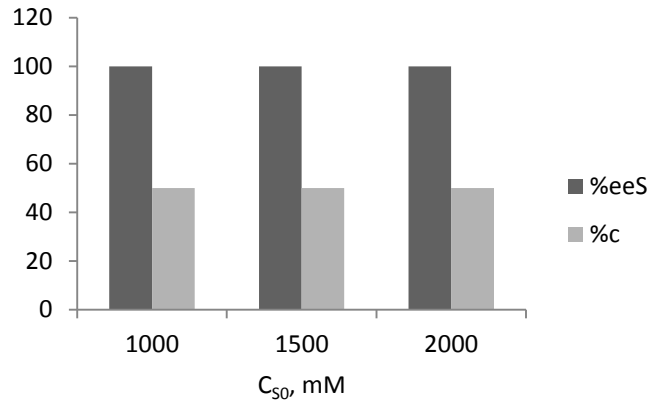
4.9 Sürekli İşletim Koşullarının Kinetik Rezolüsyona Etkisi

Sürekli sistemde rasemik-2-pentanolün kinetik rezolüsyonu, $L/D=10$, $L/D=12.5$ olmak üzere iki farklı yukarı akışlı dolgulu kolon biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Substrat derişimi ve kalma süresi (τ) etkisi incelenmiştir. Her iki dolgulu kolon biyoreaktörün kolon boyunun çok fazla olmaması nedeniyle, deneyisel olarak konumla örnek alınamamıştır. Kolon çıkışından örnekler alınmıştır.

4.9.1 $L/D=10$ için yapılan sürekli işletim çalışmaları

Özellikleri çizelge 3.1’de yer alan, $L/D=10$ olan dolgulu kolon biyoreaktörde 4 ml/dk hacimsel akış hızında ($\tau=0.6$ dk) 1000, 1500 ve 2000 mM eşmolar substrat (rasemik-2-pentanol, vinil bütirat) derişiminde çalışılmış, enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm değerleri ölçülmüştür.

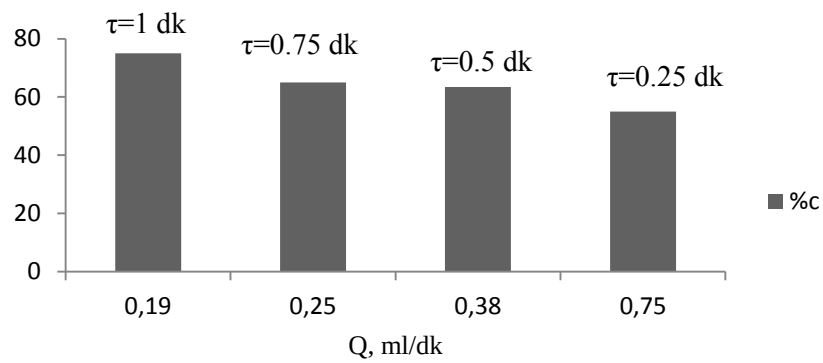
Her üç yüksek substrat derişimi için de %50 dönüşüm ve %99 ee_s değerine ulaşılmıştır (Şekil 4.22). Kalma süresinin etkisinin incelenebilmesi için sonraki çalışmalarda daha yüksek akış hızlarında çalışılmasına karar verilmiştir.



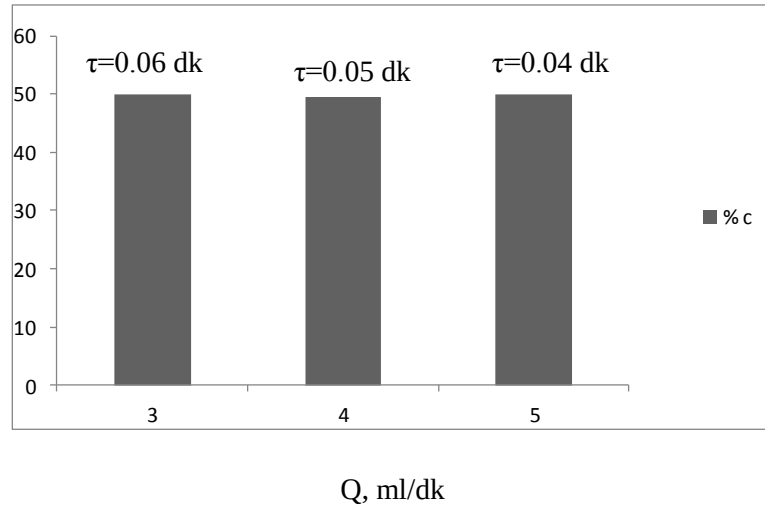
Şekil 4.22 L/D=10 biyoreaktör için 0.6 dk kalma süresi için yüksek substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüme etkisi (T=30⁰C, Q=4 ml/dk, 2240 mg Novozyme 435)

4.9.2 L/D=12.5 için yapılan sürekli işletim çalışmaları

Özellikleri çizelge 3.1’de yer alan, L/D=12.5 olan dolgulu kolon biyoreaktörde farklı kalma sürelerinde ve farklı substrat derişimlerinde çalışılmıştır. Öncelikle kalma süresi azaltılarak kinetik rezolüsyona etkisi incelenmiştir (EK 6). Yapılan ön çalışmalarda kalma süresinin yüksek olmasının dönüşümün %50’nin üzerinde elde edilmesine neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.23). Akış hızı artırılarak, daha düşük kalma süresinde yapılan çalışmalarda %50 dönüşüme ulaşılabilmiştir (Şekil 4.24).

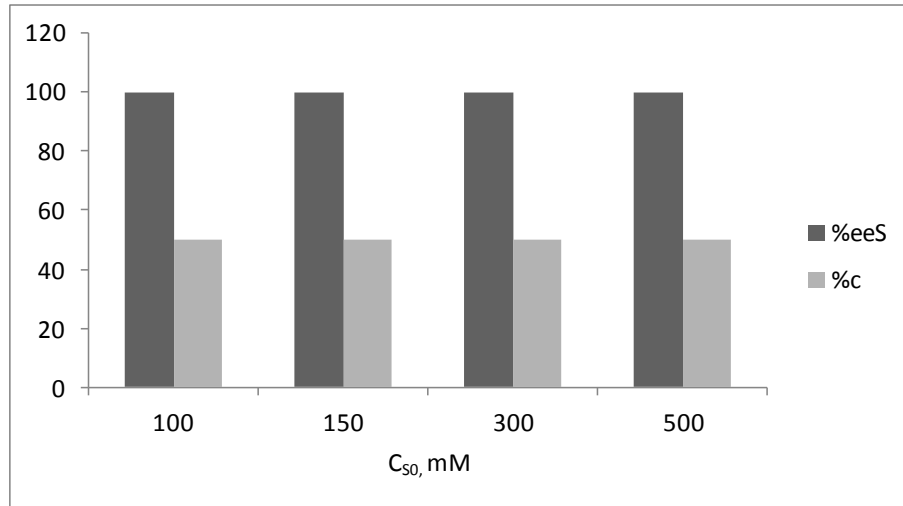


Şekil 4.23 L/D=12.5 biyoreaktör için farklı kalma sürelerinin dönüşüme etkisi (200 mM rasemik-2-pentanol, 400 mM vinil bütirat, T=30⁰C, 270 mg Novozyme 435)

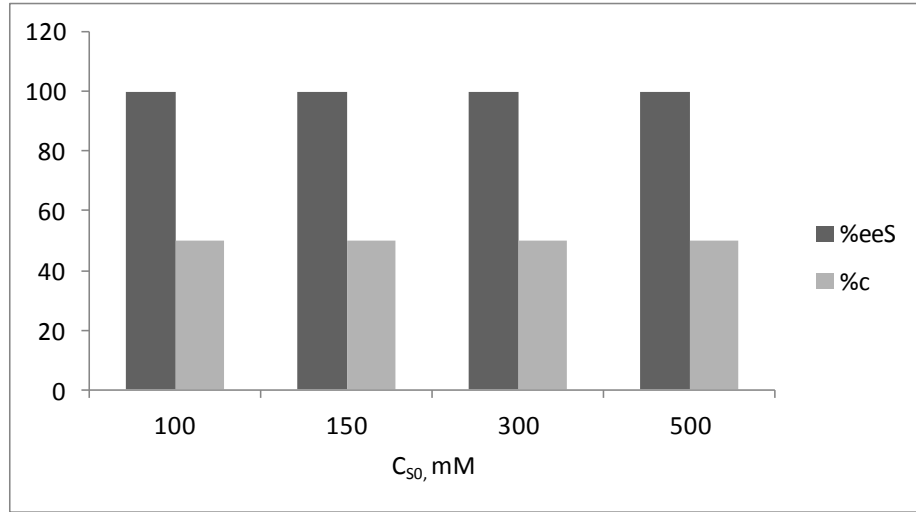


Şekil 4.24 L/D=12.5 biyoreaktör için farklı kalma sürelerinin dönüşüme etkisi (300 mM rasemik-2-pentanol, 300 mM vinil bütirat, T=30°C, 270 mg Novozyme 435)

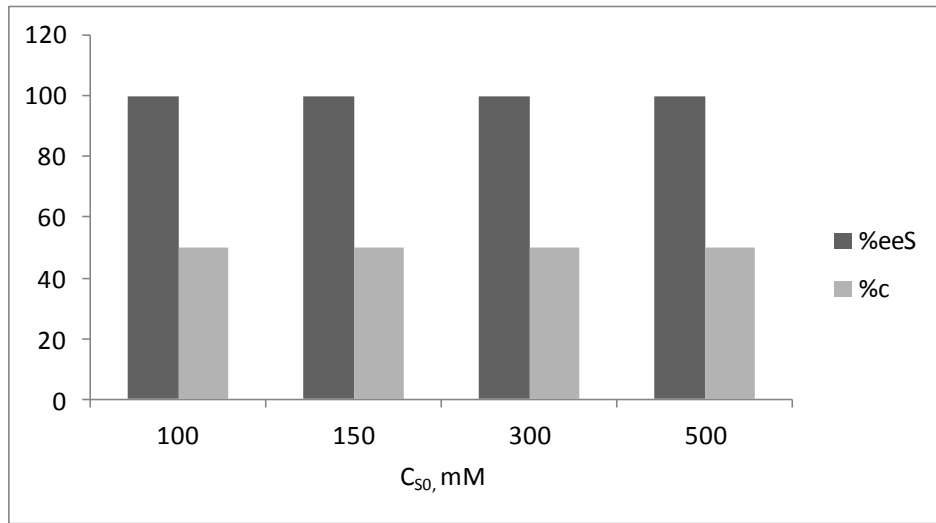
100, 150, 300 ve 500 mM substrat derişimleri için daha düşük kalma süresinde (daha yüksek akış hızında) çalışılarak elde edilen dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerleri şekil 4.25-4.27'de gösterilmiştir. Bu şekillere bakıldığında her bir kalma süresi ve incelenen substrat derişimleri için %50 dönüşüme ve %99 ee_S değerine ulaşıldığı görülmektedir. %50 dönüşüme ulaşılan bu çalışma koşulları için kinetik modelin çözümü yapılmıştır.



Şekil 4.25 L/D=12.5 biyoreaktör için τ=0.04 dk kalma süresinde substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüme etkisi (T=30°C, Q=5 ml/dk, 270 mg Novozyme 435)



Şekil 4.26 $L/D=12.5$ biyoreaktör için $\tau=0.05$ dk kalma süresinde substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüme etkisi ($T=30^0C$, $Q=4$ ml/dk, 270 mg Novozyme 435)



Şekil 4.27 $L/D=12.5$ biyoreaktör için $\tau=0.06$ dk kalma süresinde substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüme etkisi ($T=30^0C$, $Q=3$ ml/dk, 270 mg Novozyme 435)

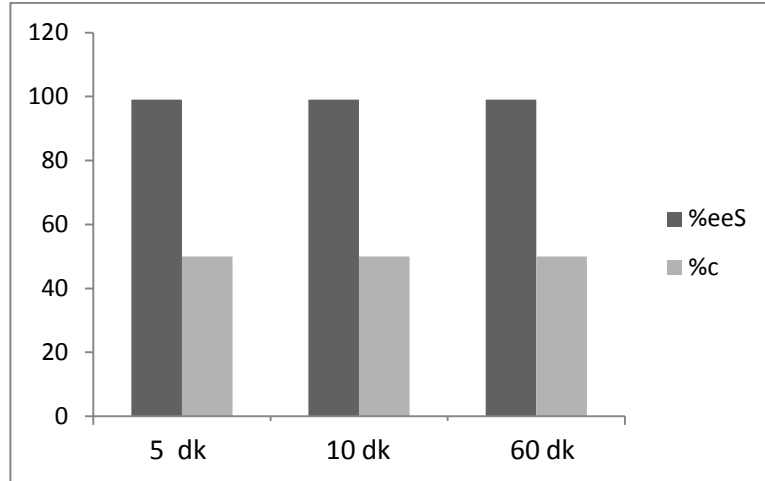
$L/D=12.5$ olan dolgulu kolon biyoreaktörde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen %ee_S ve %c değerleri çizelge 4.9'da özetlenmiştir.

Çizelge 4.9 L/D=12.5 olan dolgulu kolon biyoreaktörde farklı akış hızları ve derişimlerde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen %ee_s ve %c

C _{S0} , mM	Q, ml/dk	%ee _s	%c
200	0.19	>>99	75
	0.25	>>99	65
	0.38	>>99	65
	0.75	>>99	55
100	3	>>99	50
	4	>>99	50
	5	>>99	50
150	3	>>99	50
	4	>>99	50
	5	>>99	50
300	3	>>99	50
	4	>>99	50
	5	>>99	50
500	3	>>99	50
	4	>>99	50
	5	>>99	50

L/D'nin dolgulu kolon reaktörlerin çalışma performansının etkilediği, L/D'nin büyük olmasının biyoreaktörde eksenel dağılmanın daha az olmasına neden olmaktadır. Bu durumda reaktör modeli, piston akış hidrodinamiğine yaklaşmaktadır. Bu çalışmada birbirinden çok farklı L/D oranlarına sahip biyoreaktör kullanılmamış olmakla birlikte, her iki durum için de %99'un üstünde ee_s değerlerine ulaşılmıştır.

Enzimin tekrar kullanılabilirliğinin görülmesi ve varsa etkinlik kaybının belirlenebilmesi için 400 mM eş molar substrat derişiminde, 2 saat boyunca aynı biyoreaktörde çalışılmıştır. 2 saat sonunda %50 dönüşüm ve %99 enantiyomerik aşırılığa ulaşıldığı görülmüştür (Şekil 4.28). Enzimin tutuklanmış olması nedeniyle etkinliğini uzun süre koruduğu değerlendirilmiştir. Bununla birlikte uzun süre aynı enzimle çalışıldığında enzimin zamanla şişmesi nedeniyle işletmede zorluklar yaşanmıştır.



Şekil 4.28 Enzimin uzun süre kullanılmasının enantiyomerik aşırılığa ve dönüşüme etkisi (400 mM substrat, L/D=12.5, T=30°C, 270 mg Novozyme 435)

4.10 Kesikli ve Sürekli Sistemin Karşılaştırılması

Kesikli ve sürekli işletimin karşılaştırılmasının yapılabilmesi için tepkime ürünü olan R-2-pentil bütirat oluşumu dikkate alınarak, eşitlik 2.5 ve eşitlik 2.6 ile verimlilik hesaplanmıştır. Oluşan R-2-pentil bütirat miktarı, harcanan vinil bütirat derişimi ölçülerek belirlenmiştir. Sitokiyometrik olarak 1:1 olan bu transesterleşme tepkimesi için %50 dönüşüme kadar harcanan vinil bütiratın sadece R-2-pentanol ile tepkimeye girerek, R-2-pentil bütirat oluşturduğu kabul edilmiştir. 150 mM için verimlilik değerleri çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10 Kesikli ve sürekli sistemin karşılaştırması

Sürekli Sistem			Kesikli Sistem	
Q, ml/dk	C _{S0} , mM	P, mmol/dk/g	C _{S0} , mM	P, mmol/dk/g
3	150	0.789	150	0.363
4		1.064		
5		1.341		

Çizelge 4.10'a bakıldığında sürekli sistem için enzim verimliliğinin kesikli sisteme göre daha yüksek olduğu, yaklaşık 2-3.5 kat arttığı görülmektedir. Bu durumun sürekli

sistemdeki yatak boşluğunun, kesikli sistemdeki yatak boşluğuna göre daha düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Csajagi vd. 2008).

4.11 Dolgulu Kolon Biyoreaktörün Modellenmesi ve Modelin Çözümü

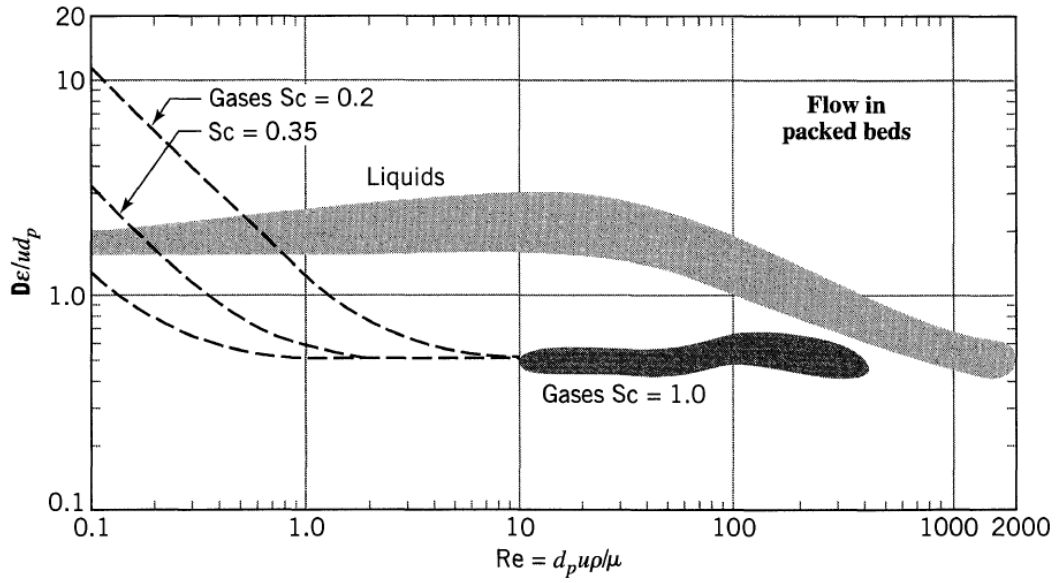
Kullanılan dolgulu kolon biyoreaktörün çok uzun olmaması nedeniyle, kolon çıkışında %50 dönüşümün sağlandığı akış hızında modelin çözümü gerçekleştirilmiştir. Dolgulu kolon biyoreaktörün modellenmesi bölüm 2.9’da anlatılmıştır. Bu bölümde $L/D=12.5$ olan biyoreaktör için modelin çözümü yapılmıştır. Model (Eşitlik 2.29), hem Ping Pong bi bi hem de Michaelis-Menten kinetiği için ayrı ayrı çözülmüştür.

Modelin çözümü için öncelikle eksenel dağılma katsayısı D_z hesaplanmıştır. Literatürde D_z , dağılma modeli (uyarı cevap yöntemi ile ortalama kalma süresinin hesaplanarak, Pe sayısının belirlenmesi) veya korelasyonlar yardımı ile belirlenmektedir. Her iki yöntem ile elde edilen sonuçların birbirine yakın olduğu bildirilmektedir (Aydoğan 2012). Bu çalışmada D_z , bu korelasyonlardan (Levenspiel 1999) yararlanılarak bulunmuştur.

Korelasyonlardan yararlanabilmek için öncelikle Re sayısı hesaplanmıştır (EK 7). Bu çalışmada kullanılan ve özellikleri Çizelge 3.1’de verilen $L/D=12.5$ olan dolgulu kolon biyoreaktör (kolon boşluk kesri, $\varepsilon=0.3$) için farklı akış hızlarına karşılık gelen Re sayıları kullanılarak (Çizelge 4.11), şekil 4.29’da yer alan korelasyon yardımı ile $1/Pe$ sayısı belirlenmiş ve Pe sayısından D_z hesaplanmıştır.

Çizelge 4.11 Farklı akış hızlarına karşılık gelen kalma süreleri (τ) ve Re sayıları

Q, ml/dk	τ , dk	Re
3	0.06	4.61
4	0.05	6.15
5	0.04	7.69



Şekil 4.29 Akışkanlar için dolgu kolon reaktörde Re ve Pe sayıları arasındaki ilişki (Levenspiel 1999)

Çizelge 4.11'deki Re sayıları için Şekil 4.19'daki korelasyonun sıvılar bölümüne bakılarak, $\frac{D_z \epsilon}{u d_p}$ ortalama 2 olarak okunmuştur ve her bir akış hızı için D_z hesaplanmıştır.

Ping Pong bi bi tepkime kinetiğine sahip eksenel dağılım modelini için oluşturulan kütle korunum denkleminde kullanılmak üzere hesaplanan D_z ve U_0/ϵ değerleri çizelge 4.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12 Farklı akış hızlarına karşılık gelen D_z ve U_0/ϵ değerleri

Q, ml/dk	D_z , m ² /s	U_0/ϵ , m/s
3	1.33×10^{-5}	0.01326
4	1.77×10^{-5}	0.01769
5	2.21×10^{-5}	0.02212

Bölüm 4.3 ve 4.4'de belirtilen çalışmalar kapsamında iç ve dış kütle aktarım kısıtlamalarının ihmal edilebileceği değerlendirildiğinden kütle korunum denkleminde yüzey derişimleri yerine yığın derişimleri alınarak çözüm gerçekleştirilmiş, kütle aktarım kısıtlaması olmadığı için denklemlerde kütle aktarım terimi yerine tepkime hızı

konulmuştur. EK 8’deki hesaplamalar ile katalizör kütlesi başına hesaplanan hız, hacim başına tanımlanarak (eşitlik 2.29) model oluşturulmuştur. Ping Pong bi bi mekanizması için elde edilen eksenel dağılımı içeren tepkime modelleri çizelge 4.13’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13 Ping Pong bi bi mekanizması için elde edilen eksenel dağılımı içeren tepkime modelleri

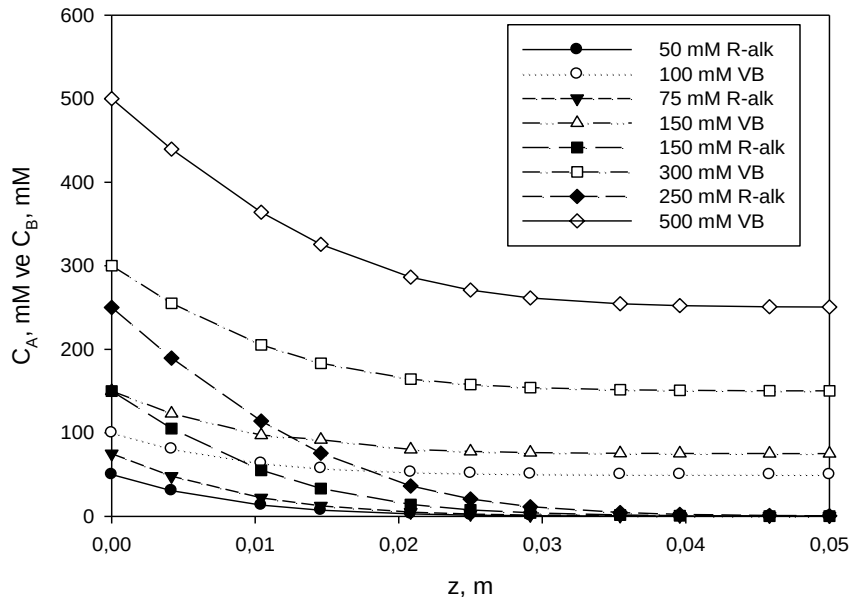
Q, ml/dk	Reaktör Modeli
3	$1.33 * 10^{-5} \frac{d^2 C_A}{dz^2} - 0.01326 \frac{dC_A}{dz} + \frac{100C_A C_B}{51.17C_A + 103.73C_B + C_A C_B} = 0$ $1.33 * 10^{-5} \frac{d^2 C_B}{dz^2} - 0.01326 \frac{dC_B}{dz} + \frac{100C_A C_B}{51.17C_A + 103.73C_B + C_A C_B} = 0$
4	$1.77 * 10^{-5} \frac{d^2 C_A}{dz^2} - 0.01769 \frac{dC_A}{dz} + \frac{100C_A C_B}{51.17C_A + 103.73C_B + C_A C_B} = 0$ $1.77 * 10^{-5} \frac{d^2 C_B}{dz^2} - 0.01769 \frac{dC_B}{dz} + \frac{100C_A C_B}{51.17C_A + 103.73C_B + C_A C_B} = 0$
5	$1.21 * 10^{-5} \frac{d^2 C_A}{dz^2} - 0.02212 \frac{dC_A}{dz} + \frac{100C_A C_B}{51.17C_A + 103.73C_B + C_A C_B} = 0$ $1.21 * 10^{-5} \frac{d^2 C_B}{dz^2} - 0.02212 \frac{dC_B}{dz} + \frac{100C_A C_B}{51.17C_A + 103.73C_B + C_A C_B} = 0$

Çizelge 4.13’deki modellerin çözümü, çizelge 4.14’deki sınır koşulları kullanılarak EK 9’da belirtilen yazılım ile MATLAB programı ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.14 Ping Pong bi bi mekanizmasına sahip model için kullanılan sınır koşulları

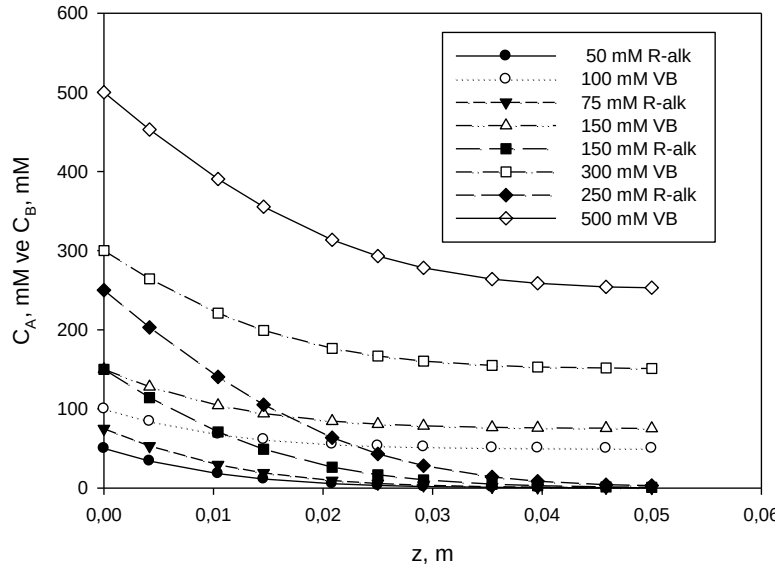
Başlangıç substrat derişimi, mM	Sınır koşulları	
	Konum	Derişim
100	$z=0$	$C_A = C_{A0} = 50 \text{ mM}, C_B = C_{B0} = 100 \text{ mM}$
	$z=L=0.05 \text{ m}$	$\frac{dC_A}{dz} = 0, \frac{dC_B}{dz} = 0$
150	$z=0$	$C_A = C_{A0} = 75 \text{ mM}, C_B = C_{B0} = 150 \text{ mM}$
	$z=L=0.05 \text{ m}$	$\frac{dC_A}{dz} = 0, \frac{dC_B}{dz} = 0$
300	$z=0$	$C_A = C_{A0} = 150 \text{ mM}, C_B = C_{B0} = 300 \text{ mM}$
	$z=L=0.05 \text{ m}$	$\frac{dC_A}{dz} = 0, \frac{dC_B}{dz} = 0$
500	$z=0$	$C_A = C_{A0} = 250 \text{ mM}, C_B = C_{B0} = 500 \text{ mM}$
	$z=L=0.05 \text{ m}$	$\frac{dC_A}{dz} = 0, \frac{dC_B}{dz} = 0$

Çizelge 4.14’de belirtilen sınır koşulları ile 3 ml/dk akış hızı için yapılan çözüm ile elde edilen konuma karşı substrat derişimleri şekil 4.30’da gösterilmiştir.



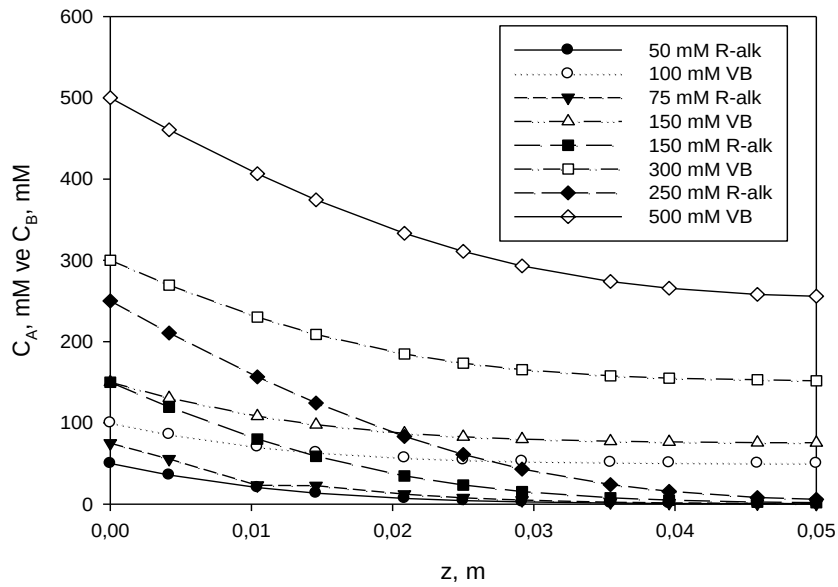
Şekil 4.30 3 ml/dk akış hızı için modelsel olarak derişimin konumla değişimi (100, 150, 300 ve 500 mM eş molar substrat derişimleri, $T=30^\circ\text{C}$)

Çizelge 4.14'deki sınır koşulları için 4 ml/dk akış hızında yapılan çözüm ile elde edilen konuma karşı substrat derişimleri Şekil 4.31'de gösterilmiştir.



Şekil 4.31 4 ml/dk akış hızı için model olarak derişimin konumla değişimi (100, 150, 300 ve 500 mM eş molar substrat derişimleri, T=30°C)

Çizelge 4.14'deki sınır koşulları için 5 ml/dk akış hızında yapılan çözüm ile elde edilen konuma karşı substrat derişimleri Şekil 4.32'de gösterilmiştir.



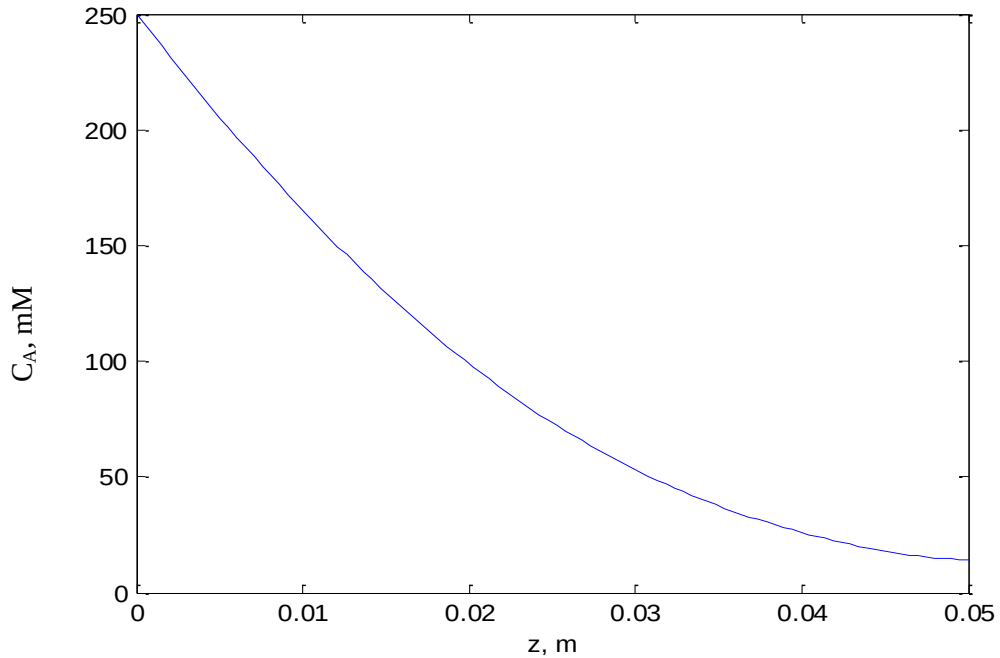
Şekil 4.32 5 ml/dk akış hızı için model olarak derişimin konumla değişimi (100, 150, 300 ve 500 mM eş molar substrat derişimleri, T=30°C)

Reaktör modeli Michaelis-Menten kinetik mekanizması için de oluşturulmuştur. 5 ml/dk hacimsel akış hızı için çizelge 4.12’de yer alan D_z değeri kullanılarak, 500 mM eş molar substrat derişimi için Michaelis-Menten tepkime kinetiğine sahip, eksenel dağılım modelini içeren kütle korunum denklemi elde edilmiştir. Eksenel dağılımı içeren bu denklem ve sınır koşulu çizelge 4.15’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.15 Michaelis-Menten mekanizmasına sahip model ve sınır koşulları

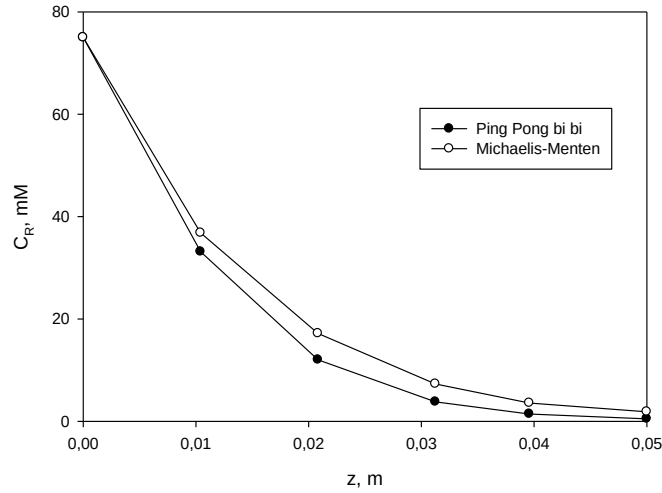
Eksenel dağılımı içeren model	Sınır koşulları	
$1.21 * 10^{-5} \frac{d^2 C_A}{dz^2} - 0.02212 \frac{dC_A}{dz} + \frac{100C_A}{138 + C_A} = 0$	$z=0$	$C_A = C_{A0} = 250 \text{ mM}$
	$z=L=0.05 \text{ m}$	$\frac{dC_A}{dz} = 0$

Çizelge 4.15’ün çözümü ile elde edilen konuma karşı substrat derişimi grafiğı şekil 4.33’de gösterilmiştir.



Şekil 4.33 5 ml/dk akış hızı için Michaelis Menten kinetik modeli için modelsel olarak derişimin konumla değışimi (500 mM eş molar substrat derişimi ,T=30°C)

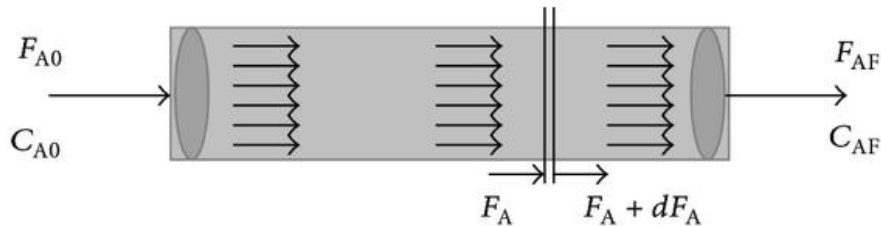
5 ml/dk akış hızı ve 150 mM eş molar substrat derişimi için hem Michaelis-Menten kinetik modeli hem de Ping Pong bi bi kinetik modeli için yapılan çözümler karşılaştırılmış ve benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.34).



Şekil 4.34 5 ml/dk akış hızı için 150 mM eş molar substrat derişimi için Ping Pong bi bi ile Michaelis-Menten kinetiğinin model üzerine etkisi

4.12 Dolgulu Kolon Biyoreaktörün Modellenmesi, Piston Akış Modeli

Eksenel yönde dağılma ile moleküler difüzyonun olmadığı ($D_z=0$) ideal bir akış şekli olan piston akış hidrodinamiği bu çalışma kapsamındaki sürekli sistem çalışmalarında incelenmiştir. C_{A0} , F_{A0} reaktör girişindeki, C_{AF} , F_{AF} reaktör çıkışındaki sırayla derişimi ve molar akış hızını ($F=Q \times C$), göstermek A bileşeni için PAT hidrodinamiği şekil 4.35’de gösterilmiştir.



Şekil 4.35 PAT hidrodinamiği (<http://www.hindawi.com/journals>)

$D_z=0$ olması nedeniyle eşitlik 2.29 , PAT hidrodinamiği için şu şekilde elde edilir:

$$-\frac{U_0}{\varepsilon} \frac{dC_A}{dz} + r = 0 \quad (4.6)$$

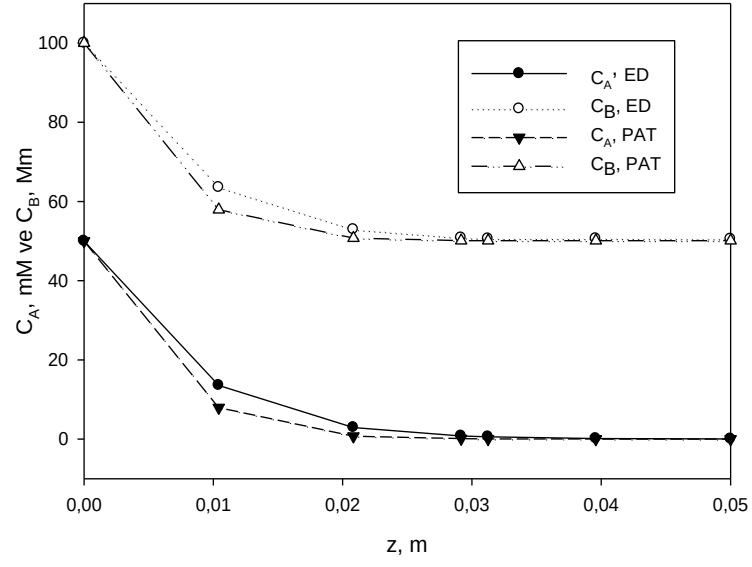
$Q= 3$ ml/dk için PAT’da reaktör modeli aşağıda gösterilmiştir.

$$-0.01326 \frac{dC_A}{dz} + \frac{100C_A C_B}{51.17C_A + 103.73C_B + C_A C_B} = 0 \quad (4.7)$$

$$-0.01326 \frac{dC_B}{dz} + \frac{100C_A C_B}{51.17C_A + 103.73C_B + C_A C_B} = 0 \quad (4.8)$$

Eşitlik 4.7 ve 4.8 MATLAB yazılımı ile çözülerek difüzyon aktarmalı model ve difüzyon aktarımsız model için konuma karşı derişim grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.36). Şekil 4.36’a bakıldığında eksenel dağılmanın mevcut olduğu durum ile ideal akış (PAT) arasında belirgin farklılık olmadığı, bununla birlikte PAT modelinde kolon boyunca dönüşümün daha fazla olduğu görülmüştür.

Dolgulu kolon biyoreaktörlerde $Re \gg 10$ için piston akış hidrodinamiğine sahip olunacağı bilinmesine rağmen, burada Re sayısının 10’dan küçük elde edilmesine karşın her iki durumda aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu durumun D_z ’nin çok küçük olmasından kaynaklandığı ve modeli matematiksel olarak çok fazla etkilememesinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Bununla birlikte $L/dp > 50$ için reaktörün piston akış hidrodinamiğine uyduğu belirtilmektedir (Carberry 2001). Bu çalışmada $L/D=12.5$ olan biyoreaktör için $L/dp=100$ ’dür. Sonuç olarak çalışılan koşullarda biyoreaktörün piston akış hidrodinamiğine sahip olduğu değerlendirilmiştir.



Şekil 4.36 Eksenel dağılıma sahip dolgu kolon biyoreaktör (ED) ile piston akış hidrodinamiğine sahip biyoreaktör (PAT) için konuma karşı substrat derişimi ($Q=3$ ml/dk, $C_{S0}=100$ mM, $T=30^0C$)

5. SONUÇLAR

Enantiyomerikçe saf S-2-pentanol elde edilmesi amacıyla rasemik-2-pentanolün transesterleşme ile kinetik rezolüsyonun araştırıldığı bu çalışmada öncelikle kesikli sistemde üretim parametreleri belirlenmiş, devamında sürekli sistemde dolgulu kolon biyoreaktörde üretim koşulları incelenmiş, biyoreaktör modelleri oluşturulmuş ve çözümü gerçekleştirilmiştir.

Kinetik rezolüsyona kullanılan enzimin kaynağının etkisi için Novozyme 435 (reçineye tutuklanmış *Candida antarctica* lipaz B), Lipozyme RM IM (*Rhizomucor meihei* lipazı) ve Amona lipase AK (*Pseudomonas fluorescens* lipazı) ile açıl verici türünün etkisi için vinil asetat, vinil laurat, vinil benzoat ve vinil bütirat ile yapılan çalışmalarda en kısa sürede (30 dakika) en iyi enantiyomerik aşırılık %99 ile Novozyme 435 biyokataizörlüğünde vinil bütirat ile elde edilmiştir.

Substrat ve enzim derişiminin başlangıç tepkime hızı ile ilişkisi Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) kullanılarak sistematik olarak incelenerek, belirlenmiştir. RSM ile elde edilen modeli maksimum yapan koşullar 1500 mM substrat derişimi ve 4 mg/ml enzim derişimi (120 mg) olarak elde edilmiştir. Bu şartlarda maksimum başlangıç tepkime hızı model ile 24.88 mM/dk, deneysel olarak 28.48 mM/dk olarak belirlenmiştir.

Tutuklanmış enzim kullanımında dış kütle aktarım kısıtlamasının belirlenmesi için kesikli sistemde farklı karıştırma hızlarında çalışılmış, 150 rpm ve daha yukarı karıştırma hızları için dış kütle aktarım kısıtlamasının ihmal edilebileceği belirlenmiştir. İç kütle aktarım kısıtlamasının etkisi için Novozyme 435 farklı gözenek boyutundaki eleklerden geçirilerek elde edilen dört farklı parçacık çapına sahip Novozyme 435 ile çalışılmış ve başlangıç tepkime hızının bu aralıkta enzim tanecik boyutundan etkilenmediği görülmüştür.

Tepkime kinetiğinin belirlenmesi farklı substrat derişimlerinde çalışılmış, tepkimenin inhibiyonsuz Ping Pong bi bi mekanizmasına uyduğu belirlenmiştir. Polymath 6.1 paket

programı ile kinetik sabitler olarak maksimum hız, 4.16 mmol/dk/g enzim, alkol için K_m 103.73 mM, vinil bütirat için K_m 51.18 mM bulunmuştur. Tepkimenin tek substratlı olarak kabul edilmesi durumu için (Michaelis-Menten kinetik modeli) kinetik sabitler maksimum hız, 4.2 mmol/dk/g enzim, alkol için K_m 138 mM olarak bulunmuştur. Kesikli sistemde elde edilen sonuçlar EK 10'da özetlenmiştir.

Sürekli sistemde $L/D=10$ ve $L/D=12.5$ olan iki farklı dolgulu kolon biyoreaktörde farklı akış hızlarında ve substrat derişimlerinde çalışılmıştır. Düşük hacimsel akış hızlarında (0.19-0.75 ml/dk) %50 dönüşümün aşıldığı görülmüş, daha yüksek akış hızlarında (3, 4 ve 5 ml/dk) çalışılarak, %50 dönüşüm ve %99 enantiyomerik aşırılığa ulaşılmıştır. Enzimin uzun süre kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla iki saat boyunca aynı enzimle, yüksek substrat derişimlerinde çalışılmış ve enzimin aktivitesini koruduğu görülmüştür.

$L/D=12.5$ olan biyoreaktör için eksenel dağılma katsayısı korelasyon yardımıyla belirlenerek, radyal ve açısal yönde tam karışmanın olduğu yatışkın koşul dolgulu kolon biyoreaktör sistemi için hem Ping Pong bi bi hem de Michaelis-Menten tepkime kinetikleri model oluşturulmuş ve modeller MATLAB'de yazılan program ile çözülmüştür. Modellerin sonuçlarla e uyum içinde olduğu görülmüştür.

Ping Pong bi bi tepkime kinetiği için elde edilen dolgulu kolon biyoreaktör modeli, piston akış hidrodinamiğine sahip model ile karşılaştırılmış ve sonuçların birbirine yakın olduğu görülmüştür. Sürekli sistemde elde edilen sonuçlar EK 11'de özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2011. Web sitesi. <http://turuz.com/post/farmakoloji-terimleri-sozlugu.aspx?lang=tr>, Erişim tarihi:05.07.2015
- Anonim. 2011. Web sitesi: <http://nabaci.blogspot.com/2011/06/farmakolojinin-temel-ilkelerine-giris.html>, Erişim Tarihi: 03.07.2015
- Anonim. 2015.Web sitesi: <http://www.mku.edu.tr/me.php?mid=zyonden8tab=belgeler#tab4>. Erişim Tarihi: 30.04.2015
- Anonim. 2015. Web sitesi: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/591546/fig3/>. Erişim Tarihi: 30.04.2015
- Aydoğan, Ö. 2012. Ketonların biokatalitik indirgenmesi ile enantiyomerik saflıkta kiral madde üretimi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 167, Ankara.
- Bakış, P. 2007. Enantiyomerik saflıkta 1-fenil-1-propanolün transesteleşme tepkimesiyle biyoreaktörde kinetik rezolüsyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 110, Ankara.
- Bayraktar, E. 2001. Response surface optimization of the separation of DL-tryptophan using an emulsion liquid membrane. *Process Biochemistry*, 37,169-175.
- Berglund, P. 2001. Conrolling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomolecular Engineering*,18,13-22.
- Canpulat Kapucu, N. 2003. Lipaz enziminin katalizlediği bir ester üretiminin süperkritik CO₂'de incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 195, Ankara.
- Carberry, J.J. 2001. *Chemical and Catalytic Reaction Engineering*. Dover Publications, Inc., New York.
- Cong, F., Wang, Y., Ma, C., Yu, C., Han, S., Tao, J. and Cao, S. 2005. Way for resolution of (R, S)-2-octanol by combining dynamic kinetic resolution with double kinetic resolution. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 595–599.
- Csajagi, C., Szatzker, G., Toke, E.R., Urge, L.S., Darvas, F. and Poppe, L. 2008. Enantiomer selective acylation of racemic alcohols by lipases in continuous-flow bioreactors. *Tetrahedron: Asymmetry* 19 237–246.
- de los Rios, A.P., Hernandez-Fernandez, F.I., Tomas-Alonso, F. and Gomez, D. 2010. Biocatalytic kinetic resolution of rac-1-phenylethanol and ras-2-pentanol in

- hexane medium: acyl donor and water content effects. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 88, 442-446.
- Elliel, E.L. 1962. Stereochemistry of carbon compounds. Tosho Printing CO. Ltd, 486, Tokyo
- Furukawa, S., Ono, T., Ijima, H., Kawakami, K. 2002. Effect of imprinting sol-gel immobilized lipase with chiral template substrates in esterification of (R)-(+)- and (S)-(-)-glycidol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17, 23-28.
- Faber, K. 1953. Biotransformations in organic chemistry. Springer, 453, Germany.
- Ghanem, A. and Aboul-Enein, H.Y. 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, 78 (15), 3331-3351.
- Goujard, L., Villeneuve, P., Barea, B., Lecomte, J., Pina, M., Claude, S., Petit, J. and Ferre, E. 2009. A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent. *Analytical Biochemistry*, 385, 161–167.
- Habulin, M. ve Knez, Z. 2001. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near- critical propane. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(2), 1260-1266.
- Jacobsen, E.E., van Hellemond, E., Moen, A.R., Prado, L.C.V. and Anthonsen, T. 2003. Enhanced selectivity in Novozym 435 catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols and butanoates caused by the (R) -alcohols. *Tetrahedron Letters*, 44, 8453-8455.
- Jacobsen, E.E., Andresen, L.S. and Anthonsen, T. 2005. Immobilization does not influence the enantioselectivity of CAL-B catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16; 847-850.
- Jeong, S., Hwang, B., Kim, J. and Kim, B. 2000. Lipase-catalyzed reaction in the packed-bed reactor with continuous extraction column to overcome a product inhibition. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10, 597–604.
- Kamal, A., Ameruddin Azhar, M., Krishnaji, T., Malik, M.S. and Azeeza, S. 2008. Approaches based on enzyme mediated kinetic to dynamic kinetic resolutions: A versatile route for chiral intermediates. *Coordination Chemistry Reviews*, 252, 569–592.
- Kapoor, M. ve Gupta, M.N. 2012. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47, 555–569.

- Kawasaki, M., Goto, M., Kawabata, S. and Kometani, T. 2001. The effect of vinyl esters on the enantioselectivity of the lipase-catalysed transesterification of alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*, 12, 585-596.
- Lefevre, L., Dochain, D., Feyo de Azevedo, S. and Magnus, A. 2000. Optimal selection of orthogonal polynomials applied to the integration of chemical reactor equations by collocation methods. *Computers and Chemical Engineering*, 24, 2571–2588.
- Leonard, V., Lamare, S., Legoy, M. and Graber, M. 2004. Enantioselective acylation of R-2-pentanol in a solid/gas reactor catalysed by lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32, 53–59.
- Levenspiel, O. 1999. *Chemical Reaction Engineering*. John Wiley and Sons, New York.
- Maier, M.N. Franco, P., Lindner, W. 2001. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *Journal of Chromatography A*(906), 3-33.
- Murthy, M.S.R.C., Swaminathan, T., Rakshit, S.K. and Kosugi, R. 2000. *Bioprocess Engineering* 22. 35-39.
- Noel, M., Lozano, P., Vaultier, M. and Iborra, J. 2004. Kinetic resolution of rac-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide. *Biotechnology Letters*, 26, 301–306.
- Patel, R.N., Banerjee, A., Nanduri, V., Goswami, A. and Comezoglu F.T. 2000. Enzymatic resolution of racemic secondary alcohols by lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of American Oil Chemists Society*, 77, 1015–1019.
- Patel, R.N. 2001. Enzymatic Synthesis of Chiral Intermediates for Drug Development. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 343, 527-546.
- Pellissier, H. 2011. Catalytic Non-Enzymatic Kinetic Resolution. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 353, 1613–1666.
- Raminelli, C., Comasseto, J.V., Andrade, L.H. and Porto, A.L.M. 2004. kinetic resolution of propargylic and allylic alcohols by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). *Tetrahedron: Asymmetry* 15. 3117-3122.
- Segel, I.H. 1975. *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons, Inc, 423, New York.
- Sheldon, R.A. 1993. *Chirotechnology: Industrial synthesis of optically active compounds*. Marcel Dekker Inc, New York.

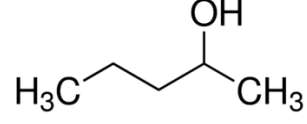
- Sontakke, J.B. and Yadav, G.D. 2011. Kinetic modeling and statistical optimization of lipase catalyzed enantioselective resolution of (R,S)-2-pentanol. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50, 12975–12983.
- Soyer, A. 2007. Lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde kinetik rezolüsyon ile enantiyomerik saflıkta 1-fenil-1-propanolün üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 80, Ankara.
- Soyer, A., Bayraktar, E. and Mehmetoglu, Ü. 2010. Optimization of lipase-catalyzed enantioselective production of 1-phenyl-1-propanol using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 40 (4), 389-404.
- Suan, C. and Sarmidi, M.R. 2004. Immobilized lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenyl ethanol in recirculated packed bed reactor, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 28, 111-119.
- Tüzün, C. 1997. *Biyokimya*. Palme Yayınları, Ankara.
- Wang, Y., Wang, R., Li, Q., Zhang, Z. and Feng, Y. 2009a. Kinetic resolution of rac-alkyl alcohols via lipase-catalyzed enantioselective acylation using succinic anhydride as acylating agent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 142–145.
- Wang, Y., Wang, R., Li, Q., Zhang, Z., Maa, J. and Feng, Y. 2009b. Solvent effects on the enantioselectivity of the thermophilic lipase QLM in the resolution of (R, S)-2-octanol and (R, S)-2-pentanol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 146–150.
- Wang, S., Wu, J., Gang Xu, G. and Yang, L. 2009c. Kinetic modelling of lipase-catalyzed remote resolution of citalopram intermediate in solvent-free system. *Biochemical Engineering Journal*, 45, 113–119.
- Xi, W.W. and Xu, J. 2005. Preparation of enantiopure (S)-ketoprofen by immobilized *Candida rugosa* lipase in packed bed reactor. *Process Biochemistry*, 40, 2161–2166.
- Zhang, Y. and Liu, J. 2011. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (R, S)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 54, 40–46.

EKLER

- EK 1 2-pentanolün Fiziksel Özellikleri
- EK 2 Kullanılan Açıl Vericiler ve Özellikleri
- EK 3 Hekzanın Fiziksel Özellikleri
- EK 4 Örnek kromotgram
- EK 5 Derişim Değerleri
- EK 6 $L/D=12.5$ Olan Biyoreaktör İçin Ön Çalışma Sonuçları
- EK 7 Re Sayısı Hesabı
- EK 8 $L/D=12.5$ Olan Dolgulu Kolon Biyoreaktör İçin Maksimum Hızın Hacim Başına Hesaplanması
- EK 9 Dolgulu Kolon Biyoreaktör Modelinin MATLAB Yazılımı ile Çözümü
- EK 10 Kesikli Sistemde Elde Edilen Sonuçların Özeti
- EK 11 Sürekli Sistemde Elde Edilen Sonuçların Özeti

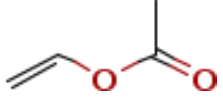
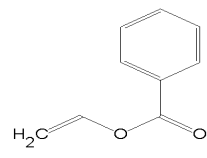
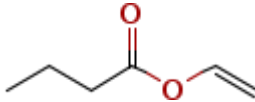
EK 1 2-pentanolün Fiziksel Özellikleri

Açık Formülü :



Kapalı Formül	:	C ₅ H ₁₂ O
Kimyasal Formülü	:	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH(OH)CH ₃
Diğer Adı	:	sec-pentil alkol, metil propil karbinol
CAS No	:	6032-29-7
Kaynama Noktası	:	119.3 ⁰ C
Molekül Ağırlığı	:	88.15 g/mol
Yoğunluğu	:	0.812 g/ml (25 ⁰ C)

EK 2 Kullanılan Açıl Vericiler ve zellikleri

Açıl verici	Formül	Molekül Ağırlığı, g/mol	Yoğunluğu, g/ml	Açık Formülü
Vinil asetat	$C_4H_6O_2$	86.09	0.934	
Vinil laurat	$C_{14}H_{26}O_2$	226.36	0.871	
Vinil benzoat	$C_9H_8O_2$	148.16	1.07	
Vinil bütirat	$C_6H_{10}O_2$	114.148	0.899	

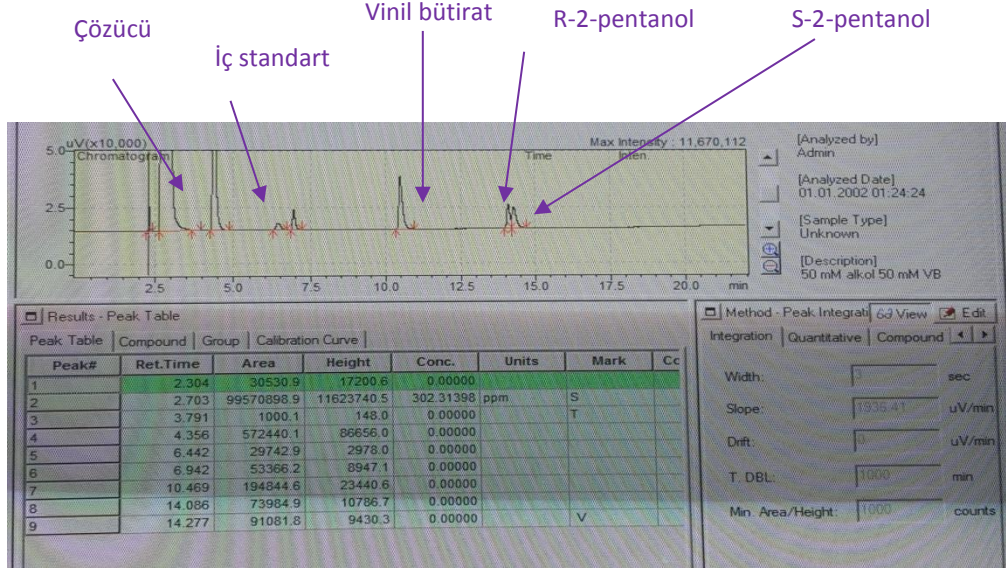
EK 3 Hekzanın Fiziksel Özellikleri

Açık Formülü :

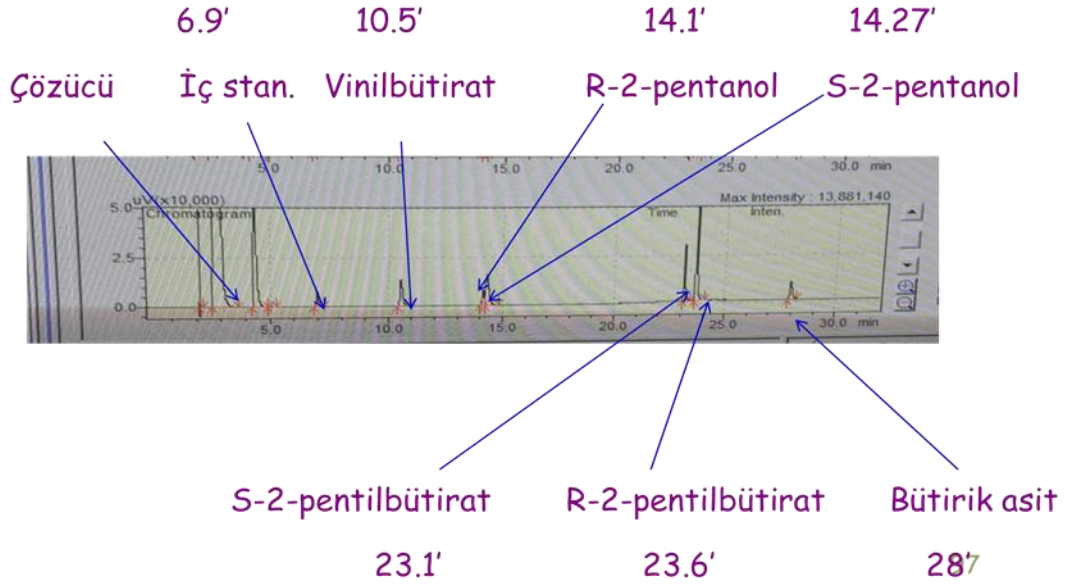


Kapalı Formülü	:	C_6H_{14}
CAS No	:	110-54-3
Kaynama Noktası	:	69^0C
Molekül Ağırlığı	:	86.1766 g/mol
Yoğunluğu	:	0.649 g/cm^3 (649 kg/m^3) (30^0C)
Dinamik viskozite	:	0.28 mPa.s (0.00028 Pa.s) (30^0C)

EK 4 Örnek Kromotogram



Tepkime sonrası:



EK 5 Derişimin Zamanla Değimi

Rasemik-2- pentanol derişimi	Vinil bütirat derişimi	R-2-pentanol derişimi, mM				
		t, dk				
		5	10	15	20	30
150	50	55	43	34	30	4
	100	47	17	10	2	-
	150	33	20	9	3	-
	200	38	20	8	2	-
	300	33	16	6	1	-
50	150	7	2	-	-	-
100		25	12	5	1	-
200		46	26	11	2	-
300		93	62	42	29	16

EK 6 L/D=12.5 Olan Biyoreaktör İçin Ön Çalışma Sonuçları

τ , dk	Q, ml/dk	Substrat derişimi, mM	%c
1	0.19	200	75
0.75	0.25	200	65
0.5	0.38	200	65
0.25	0.75	200	55
0.23	0.83	400	50
0.15	1.25	400	47
0.12	1.6	400	46

EK 7 Re Sayısı Hesabı

ρ , yoğunluk; μ , viskozite, d_p , pellet çapı ve U_0 boş kolon hızı olmak üzere dolgu kolon biyoreaktör için Re sayısı aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$Re = \frac{\rho U_0 d_p}{\mu}$$

Akışkanın viskozitesi ve yoğunluğu için 30°C'daki hekzanın özellikleri kullanılmıştır. Akışa dik kesit alanı A (m^2), aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$A = \pi r^2$$

$$\rho = 649 \text{ kg/m}^3$$

$$\mu = 0.00028 \text{ Pa.s}$$

$$d_p = 0.0005 \text{ m}$$

$$A = 0.00001256 \text{ m}^2 \text{ (} r = 0.2 \text{ cm (} L/D = 12.5 \text{ kolon için))}$$

$L/D = 12.5$ olan biyoreaktör için farklı hacimsel akış hızlarına (Q) karşı hesaplanan boş kolon hızı (U_0) ve Re sayıları aşağıda gösterilmiştir.

Q , ml/dk	Q , m^3/s	$U_0 = Q/A$, m/s	Re
0.19	3.16667E-09	0.000252123	0.29219
0.25	4.16667E-09	0.000331741	0.38446
0.38	6.33333E-09	0.000504246	0.58439
0.75	1.25E-08	0.000995223	1.15339
0.83	1.38333E-08	0.00110138	1.27642
1.25	2.08333E-08	0.001658705	1.92232
1.60	2.66667E-08	0.002123142	2.46057
3.00	0.00000005	0.003980892	4.61357
4.00	6.66667E-08	0.005307856	6.15143
5.00	8.33333E-08	0.00663482	7.68928

EK 8 L/D=12.5 Olan Dolgulu Kolon Biyoreaktör İçin Maksimum Hızın Hacim Başına Hesaplanması

$$V_{\text{boş}}=0.1884 \text{ mL}$$

$$m_e 270 \text{ mg}$$

$$\varepsilon = 0.3$$

$r_m, \text{ mmol/g.dk}$	$r_m, \text{ mmol/g.s}$	$r_m, \text{ mmol/L.s}$
4.2	$= 4.2 \frac{\text{mmol}}{\text{g.dk}} \times \frac{1 \text{ dk}}{60 \text{ s}}$ $= 0.07 \frac{\text{mmol}}{\text{g.s}}$	$= 0.07 \frac{\text{mmol}}{\text{g.s}} \times \frac{0.27 \text{ g}}{0.3 \times 0.1884 \text{ mL}} \times \frac{10^3 \text{ mL}}{1 \text{ L}}$ $= 100 \frac{\text{mmol}}{\text{L.s}}$

EK 9 Dolgulu Kolon Biyoreaktör Modelinin MATLAB Yazılımı ile Çözümü

```
function f = hocamfun(z,y)

rmax = 100.3154;
kmA = 103.73;
Dz = 1.32e-5;
Uo = 0.0039898;
kmB = 51.17;
f(1) = y(2);
f(2) = (Uo/Dz)*y(2) +
(1/Dz)*((rmax*y(1)*y(3))/(kmA*y(3)+kmB*y(1)+y(1)*y(3)));
f(3) = y(4);
f(4) = (Uo/Dz)*y(4) +
(1/Dz)*((rmax*y(1)*y(3))/(kmA*y(3)+kmB*y(1)+y(1)*y(3)));
f = f';

zi = 0;
zf = 0.05;
zp = 25;
baslangic = bvpinit(linspace(zi,zf,zp),[250 0 500 0]);
cevap = bvp4c(@hocamfun,@hocambcfun,baslangic);
disp(cevap)
z = linspace(zi,zf,zp);
y = deval(cevap,z);
y = y';
figure(1)
plot(z,y(:,1))
xlabel('z')
ylabel('C_A')
shg
figure(2)
plot(z,y(:,2))
xlabel('z')
ylabel('dC_A/dt')
shg
figure(3)
plot(z,y(:,3))
xlabel('z')
ylabel('C_B')
shg
figure(4)
plot(z,y(:,4))
xlabel('z')
ylabel('dC_B/dt')
shg
figure(5)
plot(z,y(:,1),z,y(:,3))
xlabel('z')
ylabel('C_A ve C_B')
legend('C_A', 'C_B')
shg

figure(6)
```

```

plot(z,y(:,2),'-', z,y(:,4),'*')
xlabel('z')
ylabel('dC_A/dt ve dC_B/dt')
legend('dC_A/dt', 'dC_B/dt')
shg

function kalan = hocambcfun(ya,yb)
kalan(1) = ya(1) - 250;
kalan(2) = yb(2);
kalan(3) = ya(3) - 500;
kalan(4) = yb(4);
kalan = kalan';

```

EK 10 Kesikli Sistemde Elde Edilen Sonuçların Özeti

T, °C	N, rpm	Açıl verici	Enzim	İncelenen Parametre	Sonuç
30	150	Vinil bütirat	CALB	Enzim türünün etkisi	CALB, $ee_s > \%99$ E=70
			Lipozyme RM-IM		
			Amona Lipaz AK		
30	150	Vinil bütirat	CALB	Açıl verici etkisi	Vinil bütirat, $ee_s > \%99$
		Vinil asetat			
		Vinil laurat			
		Vinil benzoat			
30	150	Vinil bütirat	CALB	Enzim tanecik boyutunun (dp) etkisi	r_0 'ın incelenen aralık için dp'den bağımsız İç yayılma direnci ihmal edilebilir
30	100	Vinil bütirat	CALB	Karıştırma hızı etkisi	150 rpm ve üstü için dış kütle aktarım direnci ihmal edilebilir
	150				
	175				
30	150	Vinil bütirat	CALB	Yüksek substrat derişimi	Substrat inhibisyonu yok, yüksek derişimlerde çalışılabilir
30	150	Vinil bütirat	CALB	Ester/alkol mol oranı	Açıl verici derişimi, R-alkol derişiminden fazla olmalı
30	150	Vinil bütirat	CALB	Substrat ve enzim derişiminin etkisi	RSM ile maksimum r_0 için, $C_{S0} = 1500$ mM, $C_E = 4$ mg/ml
30	150	Vinil bütirat	CALB	Tepkime kinetiği	Tepkime hız denklemleri bulunmuştur.

EK 11 Sürekli Sistemde Elde Edilen Sonuçların Özeti

C _{S0} , mM	L/D	Q, ml/dk	%ee _S	%c	Değerlendirme
1000	10	4	99	50	%50 dönüşüme ulaşılmıştır. Kalma süresinin etkisinin belirlenmesi için daha yüksek akış hızlarında ve malzeme sarfiyatını azaltmak için daha küçük hacimli kolonda çalışmalara devam edilmiştir.
1500					
2000					
200	12.5	0.19	99	75	%50 dönüşümün aşılması nedeniyle daha yüksek akış hızında çalışılmasına karar verilmiştir.
		0.25		65	
		0.38		65	
		0.75		55	
100	12.5	3	99	50	%50 dönüşüm ve %99 ee _S 'ye ulaşılmış, derişimin etkisi için farklı derişimlerde çalışılmaya devam edilmiştir.
		4			
		5			
150	12.5	3	99	50	3, 4 ve 5 ml/dk akış hızları için 4 farklı derişim için de %50 dönüşüme ulaşılmış ve %99ee _S elde edilmiştir. Üç farklı Q için, dolgulu kolon biyoreaktör modeli oluşturulmuş ve MATLAB'de modelin çözümü gerçekleştirilerek, hem R-alkol, hem de vinil bütirat derişiminin konumla değışimi elde edilmiştir.
		4			
		5			
300		3	99	50	
		4			
		5			
500		3	99	50	
		4			
		5			

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aslı SOYER MALYEMEZ
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 12.06.1980
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Orta :İSTEK Özel Acıbadem Lisesi, 1995
Lise :Ankara Özel Yüce Fen Lisesi, 1998
Lisans :Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi
Kimya Mühendisliği Bölümü, 2003
Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 2007

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Hava Kuvvetleri Komutanlığı, 2004-

Yayınlar (SCI)

Soyer, A., Bayraktar, E., Mehmetoglu, U. 2010, “Optimization of lipase-catalyzed enantioselective production of 1-phenyl 1-propanol using response surface methodology”, (2010) Preparative Biochemistry and Biotechnology, 40(4), pp.389-404.

Hakemli Dergiler

Ulusal Kongre Sunum

Soyer, A., Bayraktar, E. Mehmetoğlu,Ü., Rasemik 1-Fenil1-Propanolün Lipaz Katalizli Kinetik Rezolüsyonu. UKMK-VIII Sekizinci Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Malatya, (2008)

Dövyap Z, Soyer A, Bayraktar E ve Mehmetoğlu Ü. “Ters Misel Sistemler ile L-izolösin ekstraksiyonu”, XIII. Biyoteknoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı, 287, Çanakkale, (2003)

Uluslararası Kongre Sunum

Soyer, A., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü. “Statistical optimization of lipase catalyzed enantioselective production of 1-phenyl 1-propanol by response surface

methodology".European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6), 16-20 September, Copenhagen, Danimarka, 2007