

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ**

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

**OLEYİL OLEATIN SÜPERKRİTİK CO₂ ORTAMINDA
ENZİMATİK ÜRETİMİ**

Proje Yürütücüsü : Doç. Dr. Afife Güvenç

Proje Numarası : 2001-07-05-059

Başlama Tarihi: Ekim 2001

Bitiş Tarihi: Nisan 2004

Rapor Tarihi : Kasım 2004

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara , 2004

**OLEYİL OLEATIN
SÜPERKRİTİK CO₂
ORTAMINDA
ENZİMATİK ÜRETİMİ**

Proje Yürütücüsü
Doç. Dr. Afife Güvenç

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
SİMGELER DİZİNİ.....	iii
1.AMAÇ ve KAPSAM.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	7
2. 1. Süperkritik Akışkan (SKA).....	7
2.1.1. Süperkritik akışkanların çözme gücü.....	9
2.1.2. Süperkritik akışkanların uygulamaları.....	10
2.2. Süperkritik Akışkan Ortamında Tepkimeler.....	11
2.2.1. Enzimatik tepkimeler için süperkritik akışkanların avantajları.....	12
2.3. Süperkritik Akışkan Ortamında Enzimatik Tepkimeler.....	13
2.3.1. Lipaz dışındaki enzimler ile katalizlenen tepkimeler.....	13
2.3.2. Lipaz ile katalizlenen tepkimeler.....	15
2.3.2.1. Esterlerin düzenlenmesi.....	15
2.3.2.2. Optikçe aktif bileşenlerin üretilmesi.....	16
2.3.2.4. Tat esterleri ve akrilat üretimi.....	16
2.4. Süperkritik Akışkan Ortamında Enzimatik Tepkimeleri Etkileyen Parametreler.....	23
2.4.1. Reaktör türü (süperkritik akışkan biyoreaktörleri).....	23
2.4.1.1. Karıştırmalı biyoreaktörler.....	23
2.4.1.2. Sabit yataklı biyoreaktörler.....	23
2.4.2. Basınç Etkisi.....	26
2.4.2.1. Enzimlerin kararlılığına basınç etkisi.....	26
2.4.2.2. Tepkime kinetiğine basınç etkisi.....	27
2.4.2.3. Akışkanın fiziksel özelliklerine basınç etkisi.....	35
2.4.3. Çözücünün (süperkritik akışkan) etkisi.....	41
2.4.4. Sıcaklık Etkisi.....	44
2.4.5. Yardımcı Çözücü (Cosolvent) Etkisi.....	47
2.4.6. Kütle Aktarımının Etkisi.....	48
2.4.7. Suyun Etkisi.....	53
2.4.7.1. Tutuklama destek maddesinin optimum su miktarına etkisi.....	53
2.4.7.2. Tepkime türünün optimum su miktarına etkisi.....	55
2.4.7.3. Çözücü ortamının optimum su miktarı.....	55
2.5. Lipaz Katalizli Tepkimelerde Su Aktivitesi (a_w).....	60
2.5.1. Su aktivitesinin ölçülmesi.....	63
2.5.2. Su aktivitesi kullanımının avantajları.....	63
2.5.3. Su aktivitesinin (a_w) ayarlanması ya da kontrol edilmesi.....	64
2.5.4. Su aktivite kontrolünün pilot ölçek için dezavantajları.....	65
2.5.5. Doymuş tuz çözeltileri ile a_w 'nin başlangıç değerinin ayarlanması ya da kontrol edilmesi.....	66
2.5.6. Hidrate tuz çifti ile a_w 'nin sürekli kontrol edilmesi.....	67
2.5.7. Su aktivitesi ile ilgili araştırmalar.....	67
2.5.8. Su Aktivitesinin Kinetik Sabitlere Etkisi.....	73
2.6. Jojoba.....	76
2.6.1. Jojobanın Kullanım Alanları.....	77
2.6.2. Jojoba'nın Yetiştirilmesi.....	79
2.6.3. Jojoba için Verim ve Performans Sonuçları.....	80

2.6.4. Üretim Ekonomisi.....	80
2.7. Enzimler.....	81
2.7.1. Enzimlerin sınıflandırılmaları.....	85
2.7.1.1. Oksidoredüktazlar (E.C. 1)	85
2.7.1.2. Transferazlar (E.C. 2)	86
2.7.1.3. Hidrolazlar (E.C.3)	86
2.7.1.4. Liyazlar (E.C. 4)	89
2.7.1.5. İzomerazlar (E.C. 5)	89
2.7.1.6. Ligazlar (E.C. 6)	90
2.7.2. Lipazlar (triacilgliserol hidrolazlar)	90
2.7.2.1. Lipazların katalizlediği tepkimeler.....	92
2.7.2.2. Lipazların yapısı ve arayüzey aktivasyon mekanizması.....	95
2.7.2.3. Lipaz katalizli esterleşme mekanizması.....	99
2.7.2.3.1. Tersinir Ping Pong Bi Bi Mekanizması.....	100
2.7.2.3.2. Alkol İnhibisyonu Varlığında Tersinir Ping Pong Bi Bi Mekanizması.....	104
2.7.2.4. Lipazların Uygulama Alanları.....	106
2.7.2.4.1. Şıral bileşenlerin sentezi	106
2.7.2.4.2. Karbonhidrat ester sentezi.....	108
2.7.2.4.3. Poli doymamış yağ asitlerinin elde edilmesi/zenginleştirilmesi.....	109
2.7.2.4.4. Biyolojik aktif bileşenlerin sentezi.....	109
2.7.2.4.5. Parfümlerin ve tat esterlerinin üretimi.....	109
2.7.2.4.6. Yapısal lipidlerin sentezi	110
2.7.2.4.7. Organik karbonatların sentezi.....	110
2.8. İstatistiksel Deneysel Tasarım Yöntemi	111
2.8.1. Proses optimizasyonu.....	111
2.8.2. Cevap Yüzey Yöntemi (RSM).....	111
2.8.3. Cevap yüzey yönteminin kullanıldığı çalışmalar	117
2.9. Oleyil Oleat Üretimi ile İlgili Çalışmaları	120
2.9.1. Kimyasal Üretim.....	120
2.9.2. Atmosferik Koşulda Enzimatik Üretim.....	121
2.9.3. Süperkritik Koşulda Enzimatik Üretim.....	123
2.9.3.1. Süperkritik koşullarda enzim kararlılığı.....	123
2.9.3.2. Süperkritik koşullarda kesikli reaktörde oleyil oleat üretimi.....	126
2.9.3.3. Süperkritik koşullarda sürekli reaktörde oleyil oleat üretimi.....	130
2.10. Oleyik Asit ve Oleyil Alkolün Fiziksel Özellikleri.....	133
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	134
3.1. Materyal.....	134
3.2. Deneysel Yöntem.....	134
3.2.1. Atmosferik koşullarda oleyil oleat üretimi	134
3.2.2. Süperkritik koşullarda dolgu kolonda oleyil oleat üretimi.....	135
3.2.3. Süperkritik Akışkan Ortamında Enzim Kararlılığı.....	136
3.3. Analitik Yöntem.....	137
3.3.1. Oleyik asit derişiminin belirlenmesi.....	137
3.3.2. Oleyil alkol ve oleyil oleat derişimlerinin belirlenmesi.....	137
3.3.3. Su derişimini belirlenmesi.....	138
3.3.4. Su aktivitesinin belirlenmesi.....	139
3.4. Deneysel Tasarım ve RSM ile Optimizasyon.....	142
4. ANALİZ ve BULGULAR.....	144
4.1. Atmosferik Koşullarda Oleyil Oleat Üretimi	144
4.1.1. Kullanılan enzimlerin ve substratların su içerikleri.....	144

4.1.2. Çözücülü ve çözücsüz ortamın karşılaştırılması.....	145
4.1.3. Enzim miktarının etkisi.....	148
4.1.4. Asit/alkol mol oranı etkisi.....	152
4.1.5. Sıcaklık ve karıştırma hızı etkisi.....	157
4.1.6. Tepkime ortamında su uzaklaştırma işleminin etkisi	165
4.1.7. Enzim Türü Etkisi	166
4.1.8. Atmosferik koşullarda tuz çifti kullanımının etkisi	168
4.1.8.1. Yüksek sulu form//Düşük sulu formda tuzlar ya da Yüksek sulu form/susuz formda tuzların etkisi.....	168
4.1.8.2. Yüksek sulu formdaki tuz kullanımının etkisi.....	169
4.1.8.3. Tuz miktarının etkisi.....	173
4.1.9. Oleyil oleat üretiminin RSM ile optimizasyonu.....	179
4.1.10. İç kütle aktarım kısıtlamalarının etkisi.....	189
4.2. Süperkritik Koşullarda Dolgulu Kolonda Oleyil Oleat Üretimi.....	191
4.2.1. Dolgulu Kolonda Kesikli Üretim.....	191
4.2.2. Süperkritik Koşullarda Dolgulu Kolonda Sürekli Üretim.....	192
4.2.2.1. İşletim kararlılığının etkisi	192
4.2.2.2. Sıcaklığın etkisi.....	193
4.2.2.3. Basıncın etkisi	195
4.2.2.4. Substratlar - CO ₂ karışımı oranı (% , v/v) etkisi	199
4.2.2.5. Kalma süresinin etkisi.....	202
4.2.2.6. Enzim miktarının etkisi	208
4.2.2.7. Süperkritik koşulda enzim kararlılığı.....	213
5. SONUÇLAR.....	217
5.1. Atmosferik Koşullarda Oleyil Oleat Üretimi	217
5.2. Süperkritik Koşullarda Dolgulu Kolonda Oleyil Oleat Üretimi.....	219
5.2.1. Dolgulu kolonda kesikli üretim.....	219
5.2.2. Dolgulu kolonda sürekli üretim.....	220
KAYNAKLAR.....	222
EKLER.....	234
EK-1.....	235
EK-2.....	236
EK-3.....	237
EK-4.....	238
EK-5.....	241
EK-6.....	242
EK-7.....	243
EK-8.....	244

ÖZET

Jojoba yağı, kozmetikte cilt koruyucu ürünlerde ve şampuanlarda yumuşatıcı, gıda sanayiinde katkı maddesi ve yüksek hızda çalışan makinelerde ise yağlayıcı olarak kullanılan bir vaks ester karışımıdır. Oleyik asitin oleyil alkol ile esterleşme ürünü olan oleyil oleat, jojoba yağının sentetik analogudur. Bu çalışmada oleyil oleat, hem atmosferik koşullarda hem de süperkritik (SC) CO₂ ortamında, tutuklanmış lipazlar kullanılarak üretilmiştir. Lipozyme RM IM (*Mucor miehei*, anyon değiştirici reçineye tutuklanmış) ve Novozym 435 (*Candida antarctica*, akrilik reçineye tutuklanmış) projede kullanılan enzimlerdir.

Projenin ilk aşamasında, atmosferik koşullarda, sıcaklık ve karıştırma hızı kontrollu reaktörlerde, çözücüsüz ortam kullanılarak kesikli sistemde her iki enzim ile oleyil oleatın üretimine, asit/alkol mol oranı (1/7.5 – 6.65/1), enzim miktarı (%2-10 w/w substrat karışımı), sıcaklık (30-60 °C), karıştırma hızı (100-250 rpm) ve tepkime süresinin (0-24 saat) etkileri incelenmiştir. Titrasyon ile belirlenen oleyik asit derişiminin GC analizi ile de doğrulanması, oleyil alkol ve oleyil oleat derişimlerinin de GC ile belirlenmesi için yöntem geliştirilmiştir. Her iki enzim için de enzim/substrat kütle oranının %5 olması yeterli olmuş; başlangıç tepkime hızı, oleyil oleat derişimi ve dönüşüm değerleri, Mol asit/Mol alkol = 1.33/1 değerinin üzerinde azalmış, 31.5 mmol ester /g enzim değerinde maksimum derişim (%87 dönüşüm ile) elde edilmiştir. Sıcaklık ile başlangıç tepkime hızı artmış; Lipozyme RM IM için 150 rpm, Novozym 435 için ise 200 rpm karıştırma hızı yeterli olmuştur. Lipozyme RM IM kullanılarak yapılan deneylerde tepkime ile oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılması ile dönüşüm %87'den %97'ye yükselmiştir. Novozyme 435 ile elde edilen başlangıç tepkime hızlarının daha yüksek olması nedeniyle çalışmanın ileri aşamalarında bu enzim kullanılmıştır. Atmosferik koşullardaki oleyil oleat üretimine, asit/alkol mol oranı (0.67-2.00), enzim miktarı (%2-10 w/w substratlar), tepkime sıcaklığı (40-60 °C), tepkime süresinin (30-90 dak) etkisi Cevap Yüzey Yöntemi ile incelenmiştir. Optimum koşullar, asit / alkol mol oranı 1.37, enzim miktarı % 7 w/w substratlar, tepkime sıcaklığı 51 °C ve tepkime süresi 75 dak olarak belirlenmiştir. Model eşitliğinden tahmin edilen oleyil oleat derişimi (737 g/L) optimum koşullarda yapılan deney ile elde edilen değer ile (734 g/L) oldukça uyumludur.

Projenin son aşamasında, süperkritik koşullarda (CO₂ için T>32 °C, P>73 atm) işletilen, sıcaklık ve substrat+CO₂ akış hızının kontrol edildiği dolgulu kolonda yapılan deneylerde, oleyil oleat üretiminde, ürün oluşumu ve dönüşüm üzerine sıcaklık, basınç, substrat / CO₂ (% , v/v) oranı, toplam akış hızı (CO₂ akış hızı+substrat akış hızı) ya da kalma süresi (substratın kolonda kalma süresi), enzim miktarı ve yatışkın koşula ulaşmak için işletim kararlılığının etkileri incelenmiştir. 50 °C sıcaklık ve 100 atm uygun işletim koşulları olarak belirlenmiş; CO₂ akımı içinde hacimce %10 ve daha düşük miktarda substrat karışımı olması durumunda işletim daha kararlı olmuş ve %90'ın üzerinde dönüşüm elde edilmiş; substrat miktarının %10'un üzerinde olması durumunda ise dönüşüm ve ürün derişimi işletim süresinin artmasıyla düşmüştür Kalma süresinin iki kat artmasıyla verimlilik iki kat azalmıştır. Enzim miktarının 4 kat azaltılması ile verimlilik değeri (21 mmol / g enzim / h) 3.8 kat artmıştır. Ayrıca farklı koşullarda SC-CO₂ ortamında bekletilen her iki enzimin aktivitesi atmosferik koşullarda incelenmiş; başlangıç hızında biraz düşme olmasına karşın enzimin kararlı ve aktif olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : oleyil oleat, vaks ester, jojoba yağı analogu, lipaz, çözücüsüz ortam, süperkritik CO₂ , esterleşme, Cevap Yüzey Yöntemi, su aktivitesi.

ENZYMATIC PRODUCTION of OLEYL OLEATE in SUPERCRITICAL CO₂

ABSTRACT

Jojoba oil, which is a wax ester mixture, is used as emollient for skin protecting products and shampoos in the cosmetic industries; as additives for the food industries; and as lubricants for high-precision machinery. Oleyl oleate, which is an esterification product of oleic acid and oleyl alcohol, is a synthetic analogue of jojoba oil. In this study, oleyl oleate was produced by immobilized lipases in both atmospheric and supercritical CO₂ condition. Used enzymes in this study were Lipozyme RM IM (*Mucor miehei*, immobilized on anionic resin) and Novozym 435 (*Candida antarctica*, immobilized on acrylic resin)

In the first step of the study, the method was developed for the determination of oleyl alcohol and oleyl oleate concentrations by GC and oleic acid concentration determined by titration was verified by GC.

In the second step of the study, within atmospheric conditions, in the temperature and mixing rate controlled batch reactors, using solvent-free media, the effects of acid/alcohol molar ratio (1/7.5-6.65/1), amount of enzyme (2%-10 w/w substrate mixture), temperature (30-60 °C), mixing rate (100-250 rpm) and reaction time on the production of oleyl oleate with both enzymes are investigated. It is sufficient that ratio of enzyme/substrate for each enzyme is 5 %; initial reaction rate, oleyl oleate concentration and yield have decreased under the values of acid/alcohol molar ratio of 1.33/1, and obtained maximum ester concentration is 31.5 mmol ester / g enzyme (with the conversion of 87%). Initial reaction rate has increased with temperature, mixing rate for Lipozyme RM IM 150 rpm, for Novozym 435 200rpm is sufficient. The yield has increased from 87% to 97% by removing the water from media. Because of the initial reaction rate are higher that obtained with Novozym 435, this enzyme is used in the forward part of study. The effects of acid/alcohol molar ratio (0.67-2.00), amount of the enzyme (2%-10 w/w substrate mixture), reaction temperature (40-60 °C), reaction time (30-90 min) on the production of oleyl oleate at the atmospheric conditions were examined using Response Surface Methodology. Optimum conditions were found to be as acid / alcohol molar ratio of 1.37, enzyme quantity of 7 % (w/w), reaction temperature of 51 °C and reaction time of 75 min. The maximum oleyl oleate concentration predicted by the equation (737 g/L), agrees well with the experimental value (734 g/L) obtained from the experimental verification at the optimum values.

At the end of the study, the effects of stability of operation to reach steady state condition, temperature, pressure, substrate/CO₂ (% v/v) ratio, total flow rate (CO₂ flow rate + substrates flow rate) or residence time (residence time of substrates in the column), amount of enzyme on the production of oleyl oleate was investigated in the fixed column controlled temperature and substrate+CO₂ flow rate at the supercritical conditions (for CO₂ T>32 °C, P>73 atm). The suitable process conditions were determined as 50°C and 100atm; process was the more stable with CO₂ flow consist of the smaller than 10%(v/v) substrate mixture, the yield was achieved more than 90%, conversion and product concentration were decreased with time using the amount of substrate was more than 10%(v/v). Productivity decreased two fold with increasing residence time two fold. Productivity (21 mmol /g enzyme/h) increased 3.8 fold with decreased amount of enzyme 4 fold. In addition, the activity of enzyme kepted at the different condition in SC-CO₂ media was investigated, although the initial reaction rate decreased a little, it was observed that the enzyme is active and stable.

Key Words : Oleyl oleate, wax ester, jojoba oil analogue, lipase, solvent-free system, supercritical CO₂, esterification, Response Surface Methodology, water activity

SİMGELER DİZİNİ

A_0	Eşitlik 2.2 ile verilen katsayı
A_p	Katalizör yüzey alanı
a_w	Su aktivitesi
C_{alkol}	Oleyil alkol derişimi (M)
C_{asit}	Oleyik asit derişimi (M)
C_0	Substratın yığın derişimi
C_s	Substrat derişimi
C_{su}	Su derişimi (mg/g)
$C_{ü}$	Oleyil oleat derişimi (mmol/g enzim)
D_a	Damköhler sayısı
D_e	Etkin difüzyon katsayısı
d_p	Katalizör tanecik çapı
E_0	Toplam enzim derişim
F	Fisher değişim oran testi ($F=MSM/MSE$)
f_1	Toplam serbestlik derecesi
f_2	Hata serbestlik derecesi
f_3	Model serbestlik derecesi
h	Plank sabiti
K	Eşitlik 2.58'de bağımsız değişken sayısı
K^*	Denge sabiti
k_{-1}	Eşitlik 2.8. ile tanımlanan geri yöndeki hız sabiti
k_1, k_2, k_3	Eşitlik 2.8. ile tanımlanan ileri yöndeki hız sabitleri
k_1, k_2, k_3, k_4, k_5	Eşitlik 2.27-2.30 ve 2.42 ile tanımlanan ileri yöndeki hız sabitleri
$k_{-1}, k_{-2}, k_{-3}, k_{-4}, k_{-5}$	Eşitlik 2.27-2.30 ve 2.42 ile tanımlanan geri yöndeki hız sabitleri
$k_{3(0)}$	Eşitlik 2.16'da yer alan ve atmosfer basıncındaki hız sabiti
$k_{3(P)}$	Eşitlik 2.16'da ile tanımlanan P basıncındaki hız sabiti
K_{ac}	Asit için kinetik sabit
K_{al}	Alkol için kinetik sabit
k_B	Boltzman sabiti
k_C	derişim biriminde hız sabiti
K_I	Eşitlik 2.44 ile verilen alkol substrat için inhibisyon sabiti
K_m	Michaelis-Menten hız sabiti
K_{mS1}	Birinci substrat olan asit için kinetik sabit
$K_{mS1göz}$	Eşitlik 2.38 ile ve eşitlik 2.49 ile verilen birinci substrat için gözlenen kinetik sabit
K_{mS2}	İkinci substrat olan alkol için kinetik sabit
k_s	Kütle aktarım katsayısı
k_t	Eşitlik 2.12 ile tanımlanan hız sabiti
k_X	Mol fraksiyonu ya da molalitenin fonksiyonu olarak basınçtan bağımsız birimde hız sabiti
M^*	Denklemler 2.1 ile verilen geçiş hal kompleksi
N	Karıştırma hızı
n_0	Merkezi noktada yapılan deney sayısı
P	Basınç
P_c	Kritik basınç
P_i	Suyun kısmi basıncı

P_i^0	Saf haldeki suyun istenen sıcaklıktaki doymuş buhar basıncı
Q_{CO_2}	Sıvı CO_2 akış hızı, mL/dak
$Q_{substrat}$	Substrat karışımının akış hızı (mL/dak)
Q_T	Eşmolar substrat karışımı+sıvı CO_2 akış hızı (mL/dak)
R	Korelasyon katsayısı
r_0	Başlangıç tepkime hızı (mmol/ g enzim/h)
T	Sıcaklık
t	süre
T_c	Kritik sıcaklık
u	Molar enerji
u_i	i bileşeni için stokiyometrik katsayı
x	Sistemi tanımlayan cevap fonksiyonunun bağımsız değişkeni
X_i	Bağımsız değişkenlerin gerçek değeri
x_i	Kodlanmış bağımsız değişkenler
X_i^*	Bağımsız değişkenlerin merkez noktadaki gerçek değeri
x_i^0	Eşitlik 2.34 ile tanımlanmış olan, merkezi noktadaki boyutsuz bağımsız değişken
x_k	Eşitlik 2.52 ile verilen ve sistemi tanımlayan bağımsız değişken
x_S	Durgunluk noktası
X_w	Çözücü içinde suyun mol kesri
v	Molar hacim
V	Reaksiyon hacmi
ΔV^*	Aktivasyon hacmi
ΔV_2	Eşitlik 2.14 ile tanımlanan 2. basamak tepkimesi aktivasyon hacmi
ΔV_3	Eşitlik 2.14 ile tanımlanan 3. basamak tepkimesi aktivasyon hacmi
V_A	A tepkiyeninin kısmi molar hacmi
V_B	B tepkiyeninin kısmi molar hacmi
V_{CO_2}	Sıvı CO_2 için çizgisel hız, cm/s
V_m	Aktif kompleksin kısmi molar hacmi
$V_{maks}(V_m)$	Maksimum tepkime hızı
$V_{mgöz}$	Gözlenen maksimum tepkime hızı
V_p	Katalizör hacmi
ΔV_T	Toplam aktivasyon hacim değişimi
ΔX	Bağımsız değişkendeki basamak değişim
\hat{y}	Sistemi tanımlayan cevap fonksiyonunun bağımlı değişkeni
\bar{y}	Tekrarlanan deneylerin ortalaması
y	Eşitlik 2.52 ile verilen ve sistemi tanımlayan cevap fonksiyonu

Kısaltmalar

A	Tepkimeye giren substratlardan biri
ATP	Adenozin trifosfat
B	Tepkimeye giren substratlardan ikincisi
DKA	Dış kütle aktarım kısıtlaması
E	Enzim
EA	Açıl enzim kompleksi
EP	Enzim-Ürün kompleksi
EP ₂	ikinci tetrahedral kompleks

ES	Enzim-substrat kompleksi
ES ₁	Enzim- asit arasındaki birinci tetrahedral kompleks
İKA	İç kütle aktarım kısıtlaması
LCFA	Orta zincirli yağ asidi
LCFA	Uzun zincirli yağ asidi
MSE	Hatanın karelerinin ortalaması (MSE=SSE/f ₂)
MSM	Modelin karelerinin ortalaması (MSM=SSM/f ₃)
NAD(P)	Nikotin amid adenin dinükleotid (2' fosfat)
NCL	Kritik yakını sıvı
p	Ürün
P ₁	Birinci ürün (su)
P ₂	İkinci ürün (ester)
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi
R	Oleyik asit / oleyil alkol molar oranı
S	Substrat
S ₁	Denklem 2.27'de birinci substrat (asit)
S ₂	Denklem 2.27'de ikinci substrat (alkol)
SAM	(-)-(S)-Adenosil-(metiyonin)
SC-CO ₂	Süperkritik CO ₂
SCF (SKA)	Süperkritik akışkan
SCFA	Kısa zincirli yağ asidi
SSE	Hatanın karelerinin toplamı
SSM	Modelin karelerinin toplamı
SST	Model ve hatanın kareleri toplamı

Grek Alfabeti

ξ_i^{0*}	Eşitlik 2.55 ile tanımlanan ve boyutsuz koordinat sisteminde merkezi noktadaki bağımsız değişken
ξ_i^*	Eşitlik 2.55 ile tanımlanan ve boyutsuz koordinat sistemindeki bağımsız değişken
β	Çözücü sıkışabilirlik katsayısı
δ	Eşitlik 2.18 ile tanımlanan Hildebrand çözünürlük parametresi
ε	Eşitlik 2.21 ile tanımlanan dielektrik sabiti
ψ	Eşitlik 2.52'de tanımlanan gözlem hatası
α	Eşitlik 2.59 ile tanımlanan yıldız noktası (star point)
ϕ	Thiele modülü
β_0	Eşitlik 2.54 ile tanımlanan regresyon eşitliğinde sabit katsayı
ρ_{CE}	Eşitlik 2.19 ile tanımlanan kohesiv (yapışık) enerji yoğunluğu
β_i	Eşitlik 2.54 ile tanımlanan regresyon eşitliğinde doğrusal terimlerin katsayıları
β_{ii}	Eşitlik 2.54.ile tanımlanan regresyon eşitliğinde doğrusal olmayan terimlerin katsayıları
β_{ij}	Eşitlik 2.54.ile tanımlanan regresyon eşitliğinde iç etkileşim katsayıları
τ_{substrat}	Substrat karışımının dolgu kolonda kalma süresi
γ_w	Çözücü içinde suyun mol kesri

1. AMAÇ ve KAPSAM

Kısa zincirli alkollerin ve asitlerin esterleşme ürünleri gıda, içki, kozmetik ve farmasötik sanayiinde tat ve aroma bileşeni olarak kullanılmaktadırlar. Uzun zincirli asitlerin kısa zincirli alkollerle esterleşme ürünleri gıda, deterjan, kozmetik ve farmasötik endüstrisinde katkı maddesi (emulsifier) olarak önemlidirler. Uzun zincirli yağ asitlerinin metil ve etil esterleri dizel yakıt olarak kullanılabilen değerli oleokimyasal bileşenlerdir. Uzun zincirli yağ asitlerinin yağ alkollerini ile esterleşme ürünü olan yüksek molekül ağırlıklı esterlerin (vaks esterleri) ise, kozmetikte yumuşatıcı, gıda ve farmasötik sanayiinde katkı maddesi, yüksek hızda çalışan ve basınç sistemlerde yağlayıcı ve plastikleştirici olarak endüstriyel kullanımları son yıllarda büyük bir artış göstermektedir. (Miwa 1971, Langrand et al. 1988, Zaidi et al. 1995). Vaks ester kullanımlarının sürekli artması, kadirga balığı yağı, karnoba (carnauba) vaksı, jojoba yağı gibi doğal vaks ester analoglarının kimyasal ya da biyoteknolojik üretimlerini gündeme getirmiştir.

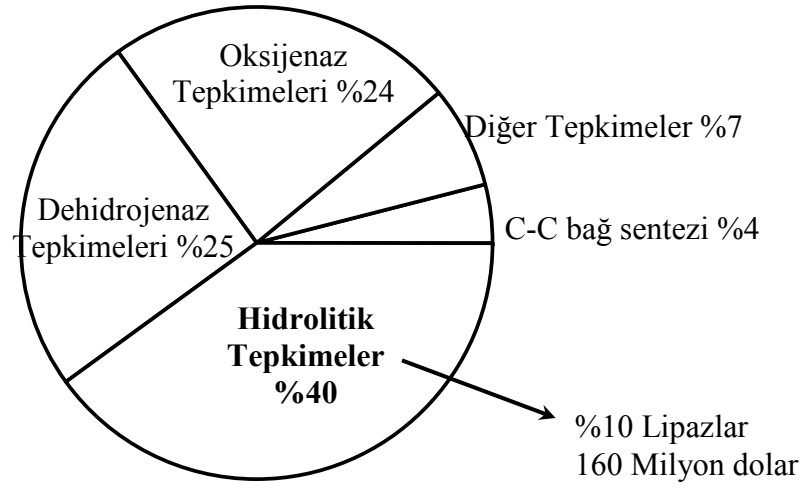
Ülkemizde oleyik, linoleik, linolenik asit ve esterlerinin 1996 yılında 170 bin \$ olan ithalat değeri, 1998 yılında 586 bin \$'a yükselmiştir. Jojoba yağı için bu değer, 1996 ve 1998 yılları için sırasıyla 1933 ve 3758 \$ olarak gerçekleşmiştir. Bu değerler yüksek molekül ağırlıklı vaks esterlerin kullanımının giderek artmasının bir göstergesidir.

Organik bileşiklerin en önemli sınıfını oluşturan esterler, açıl gruplarının 1) alkoller ve karboksilik asitler arasında (esterleşme), 2) esterler ve asitler arasında (asidoliziz), 3) esterler ve alkoller arasında (alkoliziz), 4) ester ve gliserol arasında (gliseroliziz) ve 5) iki ester arasındaki (transesterleşme) değişimi ile üretilebilirler. Günümüzde esterlerin çoğu kimyasal yöntemlerle sentezlenirler ya da bitkilerden ekstrakte edilirler (Langrand et al. 1988). Bitkilerden ekstraksiyon düşük miktarlarda gerçekleşir ve elde edilen ürün pahalıdır (Gillies 1987)). Endüstriyel kullanım için kimyasal olarak üretilirler. Yüksek molekül ağırlıklı esterlerin kimyasal üretimi genellikle, $ZnCl_2$, $SnCl_2$ ve $FeCl_3$ gibi orta derecede asitliğe sahip katalizör varlığında, yüksek sıcaklıkta ve çok sayıda basamak

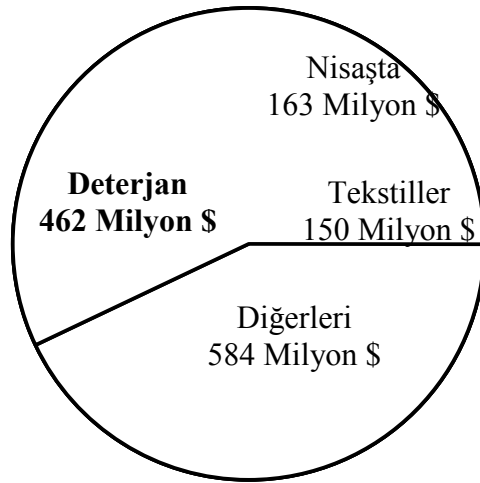
üzerinden gerçekleşir. Tepkime sonunda çok miktarda yan ürün oluşur, dönüşüm düşüktür, katalizörün ortamdan ayrılması güçtür, istenen ürün metal kirliliği içerir (Sanchez et al. 1992, Aracil et al. 1992). Kimyasal olarak üretilen ürün, bitkilerden ekstrakte edilen ürüne kıyasla daha ucuzdur, ancak doğal değildir. Bu ürünlerin kimyasal yapılarının istenen kalite ve saflıkta olması için gerekli olan ek ayırma işlemleri de maliyeti arttırmaktadır. Bu nedenle, proses çevre açısından da uygun olmamaktadır. Doğal ya da doğala özdeş esterlere olan talebin sürekli olarak artması bu ürünlerin biyoteknolojik proseslerle üretilmelerini gündeme getirmiştir (Welsh et al. 1989). Bu nedenle bu esterlerin üretiminde katalizör olarak enzimlerin kullanılması, hızlı bir gelişme göstermektedir (Zaidi et al. 1995, Carta et al. 1991, Hari Krishna 2002, Hari Krishna and Karanth 2002).

Doğada var olan enzim sayısı 25000'dir (Hari Krishna 2002, Adlercreutz et al. 1994, Schrier, P. 1997). Günümüzde bunlardan sadece 4000 tanesi tanımlanmıştır (Hari Krishna 2002). Deterjan ve gıda endüstrilerinde ise yaklaşık olarak 50 enzim kullanılmaktadır (Schrier, P. 1997). Hidrolazlar, endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin %80'ini oluşturmaktadırlar (Hari Krishna 2002). 1993 yılında 1 milyar \$ (Schrier, P. 1997) olan dünya enzim pazar değeri, 2001 yılında 1.63 milyar dolar'a (NOVO NORDISK) yükselmiştir. Enzimlerin sentetik organik kimyada kullanımları şekil 1.1.'de verilmiştir. %40 'lık pay ile hidrolitik tepkimeler birinci sırayı almaktadır. Hidrolitik tepkimeleri katalizleyen hidrolazlar grubu arasında yer alan lipazlar, enzim pazarının %10'unu (Vallikivi, I.) oluşturmaktadır (160 Milyon \$) ve bu pay giderek artış göstermektedir .

Enzimlerin endüstride kullanımları incelendiğinde (şekil 1.2), 1.4 Milyar \$ olan dünya enzim pazarında 462 Milyon \$ ile deterjan endüstrisi birinci sırada yer almakta, bunu nişasta (163 Milyon \$) ve tekstil sanayi (150 Milyon\$) izlemektedir (NOVO NORDISK).

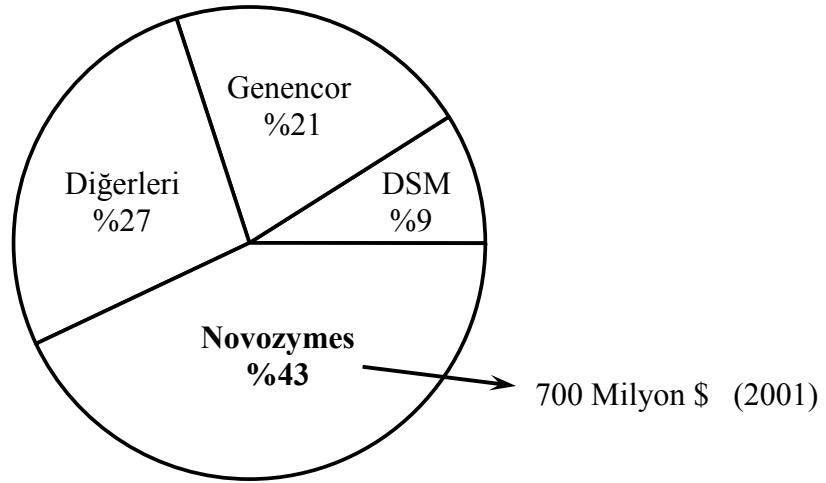


Şekil 1.1. Enzimlerin sentetik organik kimyada kullanım payı



Şekil 1.2. Enzimlerin dünya pazarındaki payları

Novozymes, %43 pay ile enzim ve mikroorganizmalarda dünya lideridir (şekil 1.3) ve 1.63 Milyar \$ olan dünya pazarında 700 Milyon \$'lık bölüme sahiptir (NOVO NORDISK).



Şekil 1.3. Dünyada ticari enzim üreticilerinin payları

Enzimler arasında yaygın kullanım alanına sahip olan lipazlar, sulu ortamlarda hidroliz tepkimelerini katalizlerler; susuz ortamlarda ise tepkimeyi terse döndererek esterleşme ya da transesterleşme tepkimelerini katalizlerler. Lipazlar, çok sayıda esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, susuz ortamlarda (çözücülü ortam, çözücüsüz ortam ve süperkritik akışkan ortamı) kararlı ve ucuz olmaları, kimyasal olarak üretilmeyen özel bileşenlerin üretimini stereo ve bölgesel spesifik özellikleri ile kolaylaştırmaları, ester bağına spesifik olmaları, yüksek substrat seçicilikleri ve yan ürün oluşumunu önlemeleri nedeniyle kimyasal katalizörlerin seçeneğidirler (Langrand et al. 1988, Santaniello et al. 1993, Goddard et al. 1999, Bornscheuer et al. 1996). Ayrıca bu enzimler toksik olmamaları ve biyolojik olarak bozunabilmeleri nedeniyle çevre dostudur. Bununla birlikte, her bir sentez spesifik bir problemdir; uygun lipaz ve deney koşulları, yüksek dönüşüm verimleri elde etmek için optimize edilmelidir.

Lipaz katalizli ester üretimlerinin çoğu çözücülü ortamlarda gerçekleştirilmektedir. Enzimatik tepkimelerde, hidrofobik substratları çözmek amacıyla organik çözücü kullanılması durumunda, maliyet yükselmekte, elde edilen ürün ek ayırma işlemlerinden geçirilse bile az miktarda çözücü içermesi nedeniyle gıda ve farmasötik sanayii için

uygun özellikte olmamakta, kullanılan organik çözücüler çevre kirliliğine de neden olmaktadır. Çözücülü ortamda elde edilen yüksek dönüşüme karşın, çözücü toksikliği ve çözücünün uzaklaştırılması için ek ayırma işlemine gerek duyulması ve kullanılan çözücülerin pahalı olması nedenleriyle ester üretiminin çözücsüz ortamda gerçekleştirilmesi çalışmaları son on yılda önem kazanmıştır (Yahya et al. 1998, Pepin ve Lortie 1999). Bu ortamda yüksek substrat derişimlerinde çalışılabilir ve yüksek derişimlerde ürün elde edilebilir; tepkime sonundaki dönüşüm yeterince yüksek ise ürün ayırma ve saflaştırma prosesleri azalır; çevresel kirlilikler minimize edilir ve çözücünün olmaması ayırma işlemini kolaylaştırır ve proses maliyetini düşürür.

Süperkritik akışkanlar lipaz katalizli tepkimeler için susuz ortamların eşsiz bir sınıfını oluştururlar (Knez and Habulin 2002, Mesiano et al. 1999, Kamat et al. 1995, Vermue and Tramper 1995, Ballesteros et al. 1995, Perrut 1994). Kritik sıcaklığı ve kritik basıncının üzerinde olan akışkan olarak tanımlanan süperkritik bir akışkanın en önemli özeliğı, yoğunluğunun yani çözme gücünün basınç ve sıcaklık ile ayarlanabilmesidir. Organik çözücü yerine tepkime ortamı olarak süperkritik CO₂ kullanılması ile, enzimler bölgesel ve stereo seçimli özellikleriyle, kimyasal olarak katalizlenemeyen ya da güçlükle katalizlenen tepkimeleri kolaylıkla katalizleyerek esterlerin modifiye edilmesini ya da fonksiyonel ve fizikokimyasal özellikleri farklı olan yeni ve değerli esterlerin üretimini sağlarlar. Süperkritik akışkan ortamının yüksek yayınlılık, düşük viskozite, düşük yüzey gerilimi gibi özellikleri nedeniyle, kütle aktarım kısıtlamaları azaltılarak tepkime hızı artırılmakta, pompalama masrafları azaltılmaktadır. Düşük su aktivitesi nedeniyle istenmeyen hidroliz tepkimesi önlenebilir, yan ürün oluşumu azaltılarak üretim ve eşanlı olarak ürünün ayrılması ile elde edilen ürün maliyeti daha düşük olur. Ürün ayırma ve saflaştırma işlemleri, başka bir çözücü kullanılmaksızın basıncın kademeli olarak düşürülmesi ile süperkritik akışkan tepkime ortamından kolaylıkla ve direkt olarak yapılabilir. Süperkritik akışkanların atmosferik koşullarda gaz olması nedeniyle elde edilen ürün çözücü içermez. Enzimlerin süperkritik akışkanlarda çözünmemeleri nedeni ile ortamdaki ayrılmaları kolaydır, tutuklanmaları gerekmez. Kritik sıcaklığı (31°C) ısıya duyarlı maddeler için yeterince düşük olan süperkritik CO₂, toksik olmaması, alevlenmemesi, atık giderme problemi olmayan ucuz,

inert bir çözücü olması nedeniyle bu ortamda gerçekleştirilen enzimatik üretim, özellikle gıda ve farmasötik endüstrisi için önemli olmaktadır.

Bu projede, endüstriyel açıdan önemli bir vaks ester olan oleyil oleatın, hem atmosferik koşullarda çözücüsüz ortamda, hem de süperkritik CO₂ ortamında, anyon değiştirici reçineye tutuklanmış olan *Rhizomucor miehei* lipazı (Lipozyme IM) ve akrilik reçineye tutuklanmış olan *Candida antarctica* lipazı (Novozym 435) kullanılarak oleyik asitin oleyil alkol ile esterleşmesi sonunda üretilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla atmosferik koşullarda oleyil oleat üretimine, reaksiyon ve işletme parametrelerinin etkisi ile su aktivitesinin etkisi incelenmiş ve Cevap Yüzey yöntemi kullanılarak üretimin optimizasyonu yapılmıştır. Süperkritik koşullarda işletilen dolgulu yatak reaktör kullanılarak reaksiyon ve işletme parametrelerinin etkileri incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

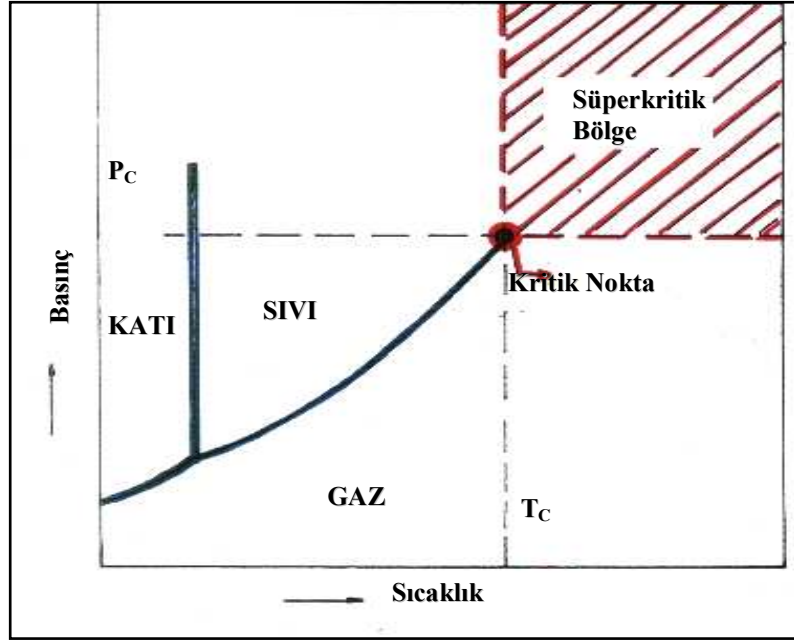
2. 1. Süperkritik Akışkan (SKA)

Sıcaklık ve basıncı, kendi kritik sıcaklığının ve kritik basıncının üzerinde olan akışkan olarak tanımlanan süperkritik bir akışkanın (SKA) en önemli özeliği, fiziksel özelliklerinin (yoğunluk, viskozite, dielektrik sabiti vb) sıcaklık ve basınca kuvvetle bağlı olmasıdır. Bu özellik kritik bölge yakınında akışkanın oldukça sıkıştırılabilir olmasından dolayıdır. Kritik noktadan uzaklaştıkça yoğunluktaki bu değişim azalır. Saf bir madde için basınç-sıcaklık diyagramı şekil 2.1’de verilmiştir (Rizvi et al. 1994, Mesiano et al. 1999).

Akışkanların fiziksel özellikleri çizelge 2.1.’de verilmiştir. Süperkritik akışkanların özellikleri gazlarla sıvıların arasındadır; viskoziteleri gazlarınkine, yoğunlukları sıvılarınkine yakındır, yayınlıkları ise gazlarla sıvıların arasındadır. Düşük viskozite ve yüksek yayınlık, gaza benzeyen kütle aktarım özellikleri sağlar. Yüzey gerilimlerinin çok düşük olması bir matriks içine gaza benzeyen penetrasyona olanak sağlar. Bu nedenle, süperkritik akışkan ortamında gerçekleşen enzimatik bir tepkimede, ortam içinde dağılmış olan enzimlerin aktif konumlarına substratların kütle aktarım hızı artar, kütle aktarım kısıtlayıcı tepkimeler, süperkritik akışkan içinde sıvılardakinden daha hızlı gerçekleşebilir (Kirk and Othmer 1991, Savage et al. 1995, Russel et al. 1994, Nakamura 1989).

Biyokataliz ve sıcaklığa duyarlı olan biyolojik maddeler için uygun olan süperkritik akışkanlar ve kritik özellikleri çizelge 2.2.’de verilmiştir. Bunlar arasında süperkritik CO₂, alevlenmemesi, yanıcı ve patlayıcı olamaması, toksik olmaması, çevre için uygun, kullanımını kolay, emniyet gereksinimi düşük, atık giderme problemi olmayan, ucuz, inert bir çözücü ve gıda maddeleri için zararsız olması nedeniyle yaygın olarak

kullanılır. Bu ortamda gerçekleştirilen enzimatik üretim, özellikle gıda ve farmasötik endüstrisi için önemli olmaktadır (Mesiano et al. 1999, Kamat et al. 1995).



Şekil 2.1. Saf bir madde için basınç-sıcaklık diyagramı (Rizvi et al. 1994, Mesiano et al. 1999).

Çizelge 2.1. Akışkanların fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması (Kirk ve Othmer 1991).

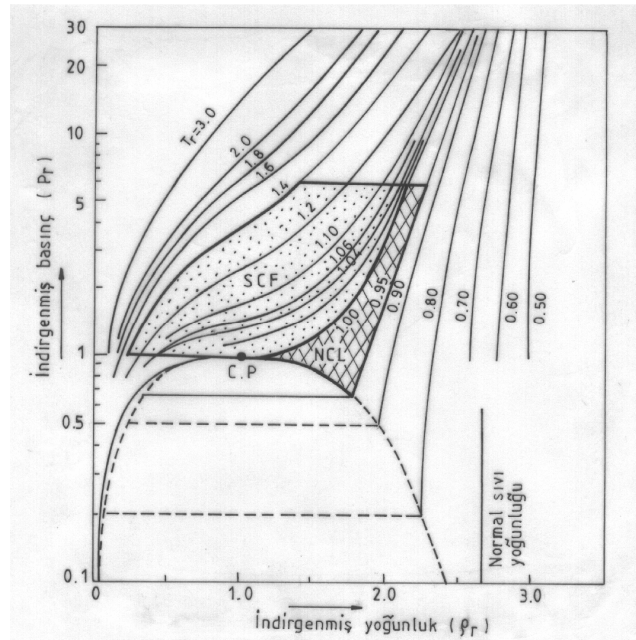
ÖZELİK	SIVI	SÜPERKRİTİK AKIŞKAN	GAZ
Yoğunluk (g/cm ³)	0.6-1.6	0.2-1.0	0.001
Viskozite (g/(cm.s))	0.01	0.001	0.0001
Yayırlık (cm ² /s)	0.00001	0.001	0.1

Çizelge 2.2. Süperkritik akışkanların kritik özellikleri (Kamat et al. 1995, Vermue and Tramper 1995, Mesiano et al 1999)

Çözücü	T _c , °C	P _c , MPa	ρ _c , g/cm ³
Etilen	9.3	5.04	0.218
Floroform	25.9	4.84	0.526
Karbondiyoksit	31.1	7.38	0.468
Etan	32.2	4.88	0.210
Azot oksit (NO)	36.5	7.28	0.460
Sülfür hekzaflorür	45.6	3.76	0.734

2.1.1. Süperkritik akışkanların çözme gücü

Süperkritik bir akışkanın yoğunluğu, sıcaklık ve basınca oldukça duyarlıdır. Basıncın artırılması ile yoğunluk artırılabilir. Sıcaklık ve basıncın uygun bir şekilde düzenlenmesi ile akışkanın çözme gücü artırılabilir. Süperkritik bir akışkan için indirgenmiş basınç-sıcaklık diyagramı şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2. Süperkritik akışkan için indirgenmiş basınç-sıcaklık diyagramı. Süperkritik akışkan (SCF) ve kritik yakını sıvı (NCL) bölgeleri görülmektedir.

2.1.2. Süperkritik akışkanların uygulamaları

Süperkritik akışkanların ticari uygulama alanları aşağıda verilmiştir (Kirk and Othmer 1991).

1. Ham yağlardan ağır bileşenlerin uzaklaştırılması (ROSE Prosesi)
2. Yağ geri kazanımı
3. Yüksek basınç polietilen üretimi
4. Antibadilerden asetonun uzaklaştırılması
5. Atık sulardan organik kirliliklerin uzaklaştırılması (SC Su Oksidasyonu)
6. Sprey Boyama Prosesi (UNICARB)
7. Süperkritik Akışkan Kromatografisi
8. Kahveden kafeinin uzaklaştırılması
9. Çay, şerbetçiotu, şifalı bitkiler, tütün yaprakları ve famasötiklerin ekstraksiyonu
10. Tepkime + Ayırma (kimyasal)
 - Klorobenzen \longrightarrow Fenol + Difenil oksit
 - İsobüten \longrightarrow sec-bütül alkol
 - Aminasyon (etilen ve trietil alüminyum)

Süperkritik akışkanların gelişmekte olan uygulama alanları ise çöktürme prosesleri (RESS, GAS, PCA), ters misel ayırmaları, adsorbentlerin rejenerasyonu, yarı iletkenlerin ve toprağın temizlenmesi, şelat oluşumu ile ağır metallerin uzaklaştırılması, gıdalardan yağ ve kolesterolün uzaklaştırılması, sudan etanol ve diğer organiklerin uzaklaştırılması, yağların fraksiyonlarına ayrılması olarak sıralanabilir (Kirk and Othmer, 1991).

2.2. Süperkritik akışkan ortamında tepkimeler

Süperkritik akışkan ortamında gerçekleştirilen tepkimeler aşağıdaki gibi sıralanabilir (Savage et al. 1995):

1. Katı yakıttan sıvı yakıt üretimi
2. Homojen ve heterojen kataliz (Kimyasal ve Biyokimyasal)
3. Çevresel atıkların değerlendirilmesi
4. Polimerizasyon
5. Materyal sentezi
6. Kimyasal sentez
7. Elektrokimya

Bu tepkimeler arasında yer alan heterojen kataliz ve heterojen tepkimeleri de kendi içinde

- İzomerizasyon
- Fischer-Tropsch sentezi
- **Enzim katalizli tepkimeler**
- Diğer katalitik tepkimeler

olmak üzere dört gruba ayrılabilir.

2.2.1. Enzimatik tepkimeler için süperkritik akışkanların avantajları

Süperkritik Akışkanların enzimatik tepkimeler için avantajları aşağıda verilmiştir:

1. SKA'ların çözücü gücünün sıcaklık ve basınca kuvvetle bağlı olması nedeniyle, SKA basıncının düşürülmesi ile tepkime ve ürünün ayrılması aynı anda olmaktadır.
2. SKA'ların viskozite ve yüzey gerilimlerinin düşük olması nedeniyle bileşenlerin bu ortamlarda yayınlıkları daha yüksek olmakta ve kütle aktarım kısıtlamaları düşmektedir
3. Sulu ortamlarda hidroliz tepkimelerini katalizleyen lipazlar, bu ortamlarda su aktivitesinin düşük olması nedeniyle tepkimeyi terse döndererek esterleşme tepkimelerini de katalizleyebilirler.
4. Hidrofobik substrat ve ürün çözünürlüğü bu ortamlarda yüksektir.
5. Polar bileşen çözünürlükleri basıncın artırılması ve/veya polar katkı maddeleri eklenerek artırılabilir.
6. Ürün ayırma, saflaştırma ve kristalizasyon, başka bir çözücü kullanımına gerek olmadan basıncın düşürülmesi ile yapılabilir.
7. Süperkritik bir akışkanın ortamdan ayrılması kolaydır.
8. Mikrobiyal kirlilik olmaz.
9. Enzimler çözünmez, ayrılmaları kolaydır, tutuklanmaları gerekmez.
10. Süperkritik koşul için gerekli olan sıcaklık ve basınç ($T_c=10-50^{\circ}\text{C}$ ve $P_c<200\text{atm}$), biyolojik maddeler için uygundur.
11. Gaz substratlar (O_2 ve H_2) süperkritik akışkan ortamında tamamen karışır, bu nedenle tepkime hızı, çözünürlüğe bağlı değildir (Savage et al. 1995, Perrut 1994, Mesiano et al. 1999, Kamat et al. 1995).

2.3.Süperkritik Akışkan Ortamında Enzimatik Tepkimeler

Bu tepkimeler, lipaz dışındaki enzimler ile katalizlenen tepkimeler ve lipaz ile katalizlenen tepkimeler olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Lipazların aşağıda sıralanan özellikleri nedeniyle süperkritik akışkan ortamında kullanımları yaygındır.

- Bu ortamlarda aktif ve kararlıdırlar
- Ticari olarak yaygın kullanım alanına sahiptirler
- Yüksek substrat seçimlilikleri vardır
- Bu ortamda hidrofobik substrat çözünürlüğü yüksektir
- Hidroliz tepkimesi terse döner ve sentez (esterleşme).gerçekleşir
- İyi aktarım özellikleri vardır
- Çözücü ve üründen kolaylıkla uzaklaştırılırlar

2.3.1. Lipaz dışındaki enzimler ile katalizlenen tepkimeler

Lipaz dışındaki enzimler ile katalizlenen tepkimeler ve kullanılan substratlar çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Lipaz dışındaki enzimler ile katalizlenen tepkimeler

Proses	Substrat(lar)	Enzim	Kaynak
Defosfatasyon	Disodyum p-nitrofenil fosfat	Alkalın fosfataz	Randolph et al 1985
Oksidasyon	Kolesterol	Kolesterol oksidaz	Randolph et al 1988a ve b
Oksidasyon	p-krezol ve p klorofenol	Polifenol oksidaz	Hammond et al 1985
Transesterleşme	Aspartik asit-L-fenil alanin ester	Termolizin	Kamihira et al 1987
Transesterleşme	N-asetil-L-fenil alanin kloro etil ester + etanol	Subtilisin carlsberg	Pasta et al 1989
Hidroliz	N-asetil-L-trozin-etil ester + amino asit amidleri	α -chymotrypsin	Noritomi et al. 1995
Hidroliz	Nişasta + su	α -amilaz ve glukoamilaz	Lee et al 1993
Hidroliz	Selüloz + su	Selülaz	Zheng and Tsao, 1996

2.3.2. Lipaz ile katalizlenen tepkimeler

Bu tepkimeler esterlerin düzenlenmesi, optikçe aktif bileşenlerin üretilmesi ve tat esterleri ile akrilat üretimi olarak sınıflandırılabilir.

2.3.2.1. Esterlerin düzenlenmesi

Süperkritik CO₂ içinde gerçekleştirilmiş olan lipaz katalizli ester düzenlemelerine bazı örnekler çizelge 2.5.'de verilmiştir. Oleyik asit-etanol esterleşmesi (Marty et al 1992) ve miristik asit-etanol esterleşmesi (Dumont et al 1992), süperkritik CO₂ içinde tepkime mekanizmasını belirlemek ve tepkime kinetiğini açıklamak için yapılmış; her iki çalışmada da etanol substrat kısıtlamalı ping-pong bi-bi mekanizması kullanılmıştır. Oleyik asidin gliserol, fruktoz, sukroz gibi polar substratlarla esterleştirilmesinde substratlar, ya süperkritik CO₂ içinde çözünmesi için fenil boronik asit ile kompleksleri oluşturulmakta ya da silika jel üzerine adsorplanmaktadır. İlk metotta 72 saat sonunda %50, ikinci metotta ise %83 dönüşüm elde edilmiştir (Gunnlaugsdottir 1997).

Çizelge 2.5.'de verilmiş olan tepkimeler arasında, ticari potansiyele sahip olabilen ester düzenlemeleri şunlardır: Oleyil alkol ile oleyik asitin esterleşme ürünü olan oleyil oleat, jojoba yağının sentetik analogu olan bir esterdir; kozmetik ve farmasötik sanayiinde ve yüksek basınç yağlayıcı madde olarak kullanılır. Lisofosfatidilkolin ile polidoymamış yağ asitlerinin (PUFA) esterleşmesi ile oluşan fosfatidil kolin, gıda ve farmasötik uygulamalarda kullanılır. İsopropiliden gliserol ve yağ asitleri arasındaki esterleşme ürünü, asitik katalizörlerle monogliseritlere dönüşebilen, isopropiliden gliserol açıl esteridir; kozmetikte ve değişik gıdalarda, örneğin margarinlerde emülsifier olarak kullanılır. Sebze yağlarının metanol ile alkoliziz ürünü olan metil esterler, dizel yakıt katkı maddesi ve sübstitütleri olarak potansiyele sahiptir. Triolein ve etilbehenat esterleşme ürünü, çikolata yapımında kullanılan 1,3-dibehenil-2-oleyil gliseroldür.

Triolein ve stearik asit asidolizisinde oluşan ürünlerden biri olan 1,3-distearil-2-oleyil gliserol, kakao yağının iki temel bileşeninden biridir (Nakamura 1994, 1986). Orta zincirli trigliseritlerin, hem oleyik asit hem de eikosa pentaenoik asit (EPA) ile asidolizisinde oluşan, orta ve uzun zincirli yağ asitlerini içeren trigliseritler, yağ-adsorpsiyon düzensizlikleri tedavisinde önemli terapetik özelliklere sahiptir (Gunnlaugsdottir 1997).

2.3.2.2. Optikçe aktif bileşenlerin üretilmesi

Enantiyomerler, molekül formülleri aynı, ancak atomlarının uzayda yöneldikleri yol farklı olan bileşenlerdir ve farklı fiziksel ve farmasötik aktivitelere sahip olabilirler. Örneğin, S-fenilalanin acı, R-izomeri tatlıdır. R-talidomit iyi bir yatıştırıcı ilaç, S-izomeri karmaşıktır. Enantiyomerlerin bu farklı ve bazen tamamen zıt etkileri nedeniyle eğilim, özellikle farmasötik endüstrisinde, rasemik karışımlar yerine optik olarak saf ürünlerin üretimi yönünde olmaktadır. Çizelge 2.6'da verilen enantiyo seçimli tepkimeler, bütirik asitin (R/S) glisidol ile esterleşmesi dışında, kesikli reaktör kullanılarak gerçekleştirilmiş; farklı gruplarla elde edilen ürünlerin enantiyomerik saflıkları, incelenen lipaz tepkimesine bağlı olarak değişmiş, bu saflıkların aynı zamanda kullanılan rasemik substrat bileşene göre de değiştiği bulunmuştur (Gunnlaugsdottir 1997).

2.3.2.4. Tat esterleri ve akrilat üretimi

Çizelge 2.7.'de verilen tepkimelerden metil metakrilat ve 2-etilhekzanol alkolizisinde oluşan monomerik akrilatlar, değişik polimerler, kontrollu ilaç salınım matrisleri ve kontakt lensler için yapı bloklarıdır (Kamat et al 1992). Diğer tepkimelerle üretilen tat esterleri gıda ve parfüm endüstrilerinde ticari potansiyele sahiptirler.

Çizelge 2.5. Lipidlerin Düzenlenmesi

Tepkime	Substrat	Lipaz	Destek	Tepkime koşulları	Reaktör	Kaynak
Esterleşme	Oleik asit + etanol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40 °C 13 MPa	Kesikli	Marty et al. 1992
Esterleşme	Oleik asit + etanol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40 °C 13-15 MPa	Sürekli	Marty et al. 1994
Esterleşme	Oleik asit + etanol	<i>Candida rugosa</i>	Celite 545	40 °C 13.5 Mpa	Kesikli	Yu et al. 1992
Esterleşme	Miristik asit + etanol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40 °C 12.5 MPa	Kesikli	Dumont et al. 1992
Esterleşme	Miristik asit + etanol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	50 °C 12.5 MPa	Sürekli	Dumont et al. 1993
Esterleşme	Laurik asit + bütanol	<i>Candida lipase B</i>	Cam boncuklar	40 °C 15-50 Mpa	Kesikli	Steytler et al. 1991
Esterleşme	Oleik asit + oleyil alkol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	31-40 °C 8.5-17 MPa	Kesikli	Knez et al. 1994
Esterleşme	Oleik asit + oleyil alkol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40 °C 15 MPa	Yarı sürekli	Knez et al. 1995
Esterleşme	Oleik asit + gliserol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	50 °C 18 MPa	Kesikli	Bernard et al. 1994
Esterleşme	Oleik asit + gliserol / Fruktoz	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40 °C 15 MPa	Kesikli	Castillo et al. 1994

Çizelge 2.5. (devam)

Tepkime	Substrat	Lipaz	Destek	Tepkime koşulları	Reaktör	Kaynak
Esterleşme	Oleik asit + gliserol ya da Fruktoseboronat	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40 °C 15 MPa	Kesikli	Castillo et al. 1994
Esterleşme	Oleik asit + sukroz/fruktoz	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40 °C 15 MPa	Kesikli	Castillo et al. 1996
Esterleşme	Lizofosfatidilkolin + PUFA	<i>phospho-lipase A₂</i>	Polimer taşıyıcı	45 °C 18 MPa	Kesikli	Harrod et al. 1994
Esterleşme	İsopropiliden-gliserol + yağ asitleri	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40 °C 7.9-22 MPa	Sürekli	Saito et al. 1994
Alkoliziz	Balık yağı + etanol	<i>Candida antarctica</i>	Akrilik reçine	40 °C 9-24 MPa	kesikli + ekstraksiyon	Gunnlaugsdottir and Sivik 1994
Alkoliziz	Balık yağı + etanol	<i>Candida antarctica</i>	Akrilik reçine	40 °C 9 MPa	Sürekli	Gunnlaugsdottir and Sivik 1997
Alkoliziz	Balık yağı + etanol	<i>Candida antarctica</i>	Metillenmiş cam boncuk	40 °C 9 MPa	Kesikli	Gunnlaugsdottir and Sivik 1997
Alkoliziz	Balık yağı + etanol	<i>Humico lalanuginosa</i>	Metillenmiş cam boncuk	40 °C 9 MPa	Kesikli	Gunnlaugsdottir and Sivik 1997

Çizelge 2.5. (devam)

Tepkime	Substrat	Lipaz	Destek	Tepkime koşulları	Reaktör	Kaynak
Alkoliziz	Palmitik etil ester+gliserol	<i>Humicola lanuginosa</i>	Metillenmiş cam boncuk	40 °C 9 MPa	Kesikli	Gunnlaugsdottir and Sivik 1997
Alkoliziz	Sebze yağları + etanol	<i>Candida antarctica</i>	Akrilik reçine	50 °C 24.1 MPa	Sürekli	Jackson and King 1996
Alkoliziz	Sebze yağları + gliserol /1,2-propane-diyol	<i>Candida antarctica</i>	Akrilik reçine	40 - 70 °C 21-35MPa	Sürekli	Jackson and King 1997
Alkoliziz	Trigliseritler + bütanol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	50 °C 15 MPa	Kesikli	Berg et al. 1993
İnteresterleşme	Trikaprilin + metiloleat	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	50 °C 15 MPa	Kesikli + ekstraksiyon	Adschiri et al. 1992
İnteresterleşme	Triolein + etilbehenat	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40-70 °C 10-30 MPa	Kesikli	Yoon et al. 1996
İnteresterleşme	Kanola yağı + süt yağı	<i>Candida rugosa</i>	Celite 545	40 °C 30 MPa	Kesikli	Yu et al. 1992
İnteresterleşme	Trigliseritler	<i>Candida antarctica</i>	Akrilik reçine	70 °C 27.5 MPa	Yarı Sürekli	King et al. 1996
Asidoliziz	Trilaurin + palmitik asit	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Diatoma toprağı	40 °C 10-30 MPa	Kesikli	Erickson et al. 1990

Çizelge 2.5. (devam)

Tepkime	Substrat	Lipaz	Destek	Tepkime koşulları	Reaktör	Kaynak
Asidoliziz	Trilaurin + miristik asit	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Amino-propil cam boncuk	35 °C 8.3-11MPa	Yarı Sürekli	Miller et al. 1991
Asidoliziz	Triolein + stearik asit	<i>Rhizopus delemar</i>	—	35 °C 13.7 MPa	Kesikli	Nakamura et al. 1986
Asidoliziz	Triolein + stearik asit	<i>Rhizopus delemar</i>	Celite 503	50 °C 29.4 MPa	Kesikli	Chi et al. 1988
Asidoliziz	Triolein + stearik asit	<i>Rhizopus japonicus</i>	Celite 503	50 °C 29.4 MPa	Kesikli	Chi et al. 1988
Asidoliziz	Triolein + stearik asit	<i>Mucor miehei</i>	Duolit A-568	50 °C 29.4 MPa	Kesikli	Chi et al. 1988
Asidoliziz	Triolein + stearik asit	<i>Alcaligenes sp.</i>	—	50 °C 29.4 MPa	Kesikli	Chi et al. 1988
Asidoliziz	Triolein + stearik asit	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40-70 °C 20-30 MPa	Sürekli	Nakamura et al. 1994
Asidoliziz	Orta zincirli trigliserit + EPA/oleik asit	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40-60 °C 10 MPa	Kesikli + ekstraksiyon	Shishikura et al. 1994
Hidroliz	Balık yağı + Tampon	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	35 °C 15 MPa	Kesikli + ekstraksiyon	Jenssen et al. 1991

EPA, cis-5,8,11,14,17-eikosapentanoik asit

Çizelge 2.6. Optikçe aktif bileşenlerin üretilmesi

Tepkime	Substrat	Lipaz	Destek	Tepkime koşulları	Safılık	Kaynak
Esterleşme	Bütirik asit + (R/S)glisidol	Domuz pankreas	Sephadeks G-25/Bio-gel P6	35 °C 14 MPa	83	Martins et al. 1994
Esterleşme	Bütirik asit + (R/S)glisidol	<i>Pseudomonas cepatia</i>	Celite	40 °C 10 MPa		Shen et al. 1994
Esterleşme	(R/S) ibuprofen + n-propanol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	35-65 °C 10-24MPa	70	Rantakyla et al. 1994
Esterleşme	Oleik asit + (R/S) sitronellol	<i>Candida rugosa</i>	Amino-propil cam boncuk	31-40 °C 7.6-19MPa	98	Ikushima et al. 1993
Alkoliziz	Asetik anhidrit + (R/S) alkoller	<i>Pseudomonas sp.</i>	ARC-silika jel	40 °C 20 MPa	90	Cernia et al. 1994
Alkoliziz	Triasetin + (R/S) mentol	<i>Candida rugosa</i>	—	verilmemiş		Moshammer et al. 1994
Alkoliziz	Değişik açıl vericiler + (R/S) terpen alkoller	<i>Candida rugosa</i>	—	50 °C 10 MPa	70	Michor et al. 1996
Alkoliziz	Bütirik anhidrit + (R/S)-1,3-bütanediol	Domuz pankreas	—	40 °C 3.5-21MPa		Hrnjez et al. 1994
İnteresterleşme	Enol esterleri + (R/S)-3-hidroksi esterler	<i>Pseudomonas cepatia</i>	—	40 °C 13 MPa	99	Capawell et al. 1996
İnteresterleşme	Vinil asetat + (R/S)-3-hidroksi esterler	<i>Pseudomonas cepatia</i>	—	40 °C 13 MPa	99	Bornscheuer et al. 1996
Hidroliz	Triolein + su	Domuz pankreas	Celite 545	40 °C 15MPa		Glowacz vd 1996
Hidroliz	(2S,3R)-3-(4-Metoksi-fenil)-glisidik asit + su	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40 °C 10 MPa	87	Rantakyla et al. 1996

Çizelge 2.7 Tat esterleri ve akrilat üretimi

Tepkime	Substrat	Lipaz	Destek	Tepkime koşulları	Reaktör	Kaynak
Alkoliziz	Etil asetat + izoamil alkol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	60 °C 10 MPa	Sürekli	van Eijs et al. 1988a, 1988b
Alkoliziz	Etil asetat + nonanol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	60 °C 12.5-20 MPa	Kesikli	Vermue et al. 1992
Alkoliziz	Etil asetat + nonanol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	60 °C 20 MPa	Sürekli	Doddema et al. 1990
Alkoliziz	Propil asetat + geraniol	<i>Mucor miehei</i>	Anyonik reçine	40-100 °C 14 MPa	Kesikli	Chulalaksananukul et al. 1993
Alkoliziz	Metil metakrilat + 2-etilhekzanol	<i>Candida rugosa</i>	—	45 °C 11 MPa	Kesikli	Kamat et al.1992
Esterleşme	İzoamil alkol + Amonyum asetat	<i>Candida rugosa</i> <i>Mucor miehei</i>	Akrilik reçine Anyonik reçine	40-60 °C 15-20 MPa	Kesikli	Vija et al. 1997

2.4. Süperkritik Akışkan Ortamında Enzimatik Tepkimeleri Etkileyen Parametreler

Bu ortamlarda enzimlerin kararlılığı ve enzimlere çözücünün etkisi önemlidir. Tepkime sistemindeki pek çok faktör enzim performansını etkileyebilir. Bunlar,

- reaktör türü (kesikli, ekstraktif kesikli, yarı kesikli, sürekli)
- işletme parametreleri (basınç, sıcaklık, substrat derişimi, karıştırma hızı/akış hızı)
- çözücü (süperkritik akışkan)
- su miktarı
- tutuklama desteği
- faz davranışı
- kütle aktarımı

gibi tepkime parametreleridir.

2.4.1. Reaktör türü (süperkritik akışkan biyoreaktörleri)

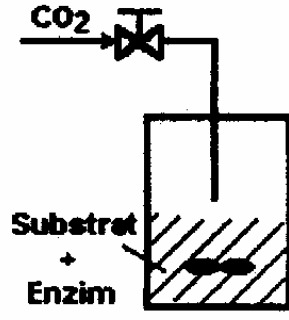
Süperkritik akışkan biyoreaktörleri karıştırmalı ve sabit yataklı biyoreaktörler olmak üzere ikiye ayrılırlar (Gunnlaugsdottir 1997, Ballesteros et al. 1995).

2.4.1.1. Karıştırmalı biyoreaktörler

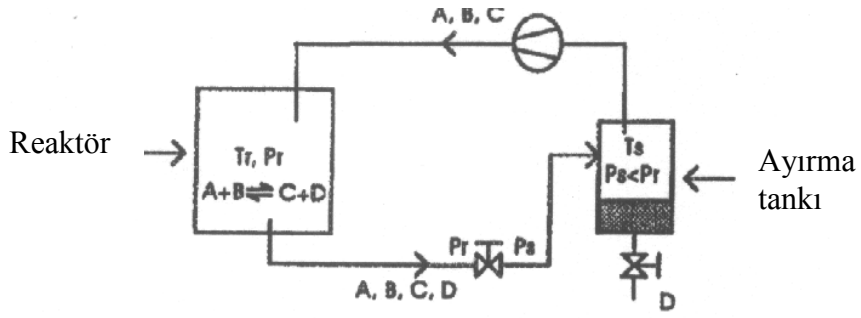
Bu reaktörler kesikli, ekstraktif kesikli ve sürekli reaktörler olmak üzere üç gruba ayrılırlar (şekil 2.4.)

2.4.1.2. Sabit yataklı biyoreaktörler

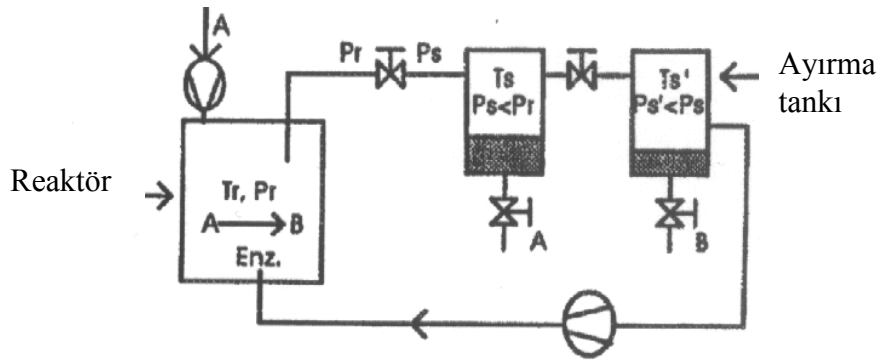
Sabit yataklı biyoreaktörler dolaşımli kesikli, yarı kesikli ve sürekli reaktörler olmak üzere üç gruba ayrılırlar (şekil 2.5.).



a) Kesikli reaktör

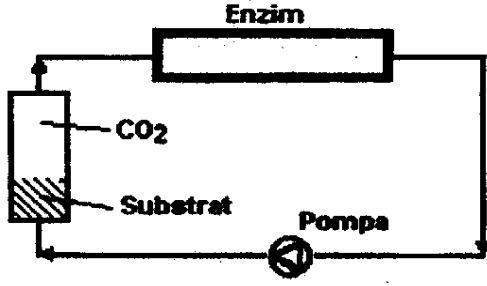


b) Ekstraktif kesikli reaktör

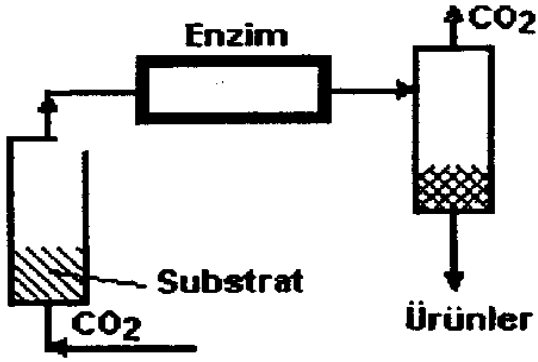


c) Sürekli reaktör (ayırma ve çözücü geri döngüsü)

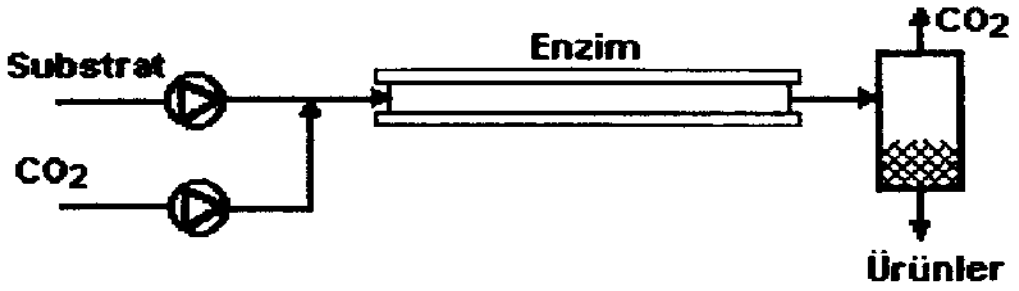
Şekil 2.4. Karıştırmalı biyoreaktörler



a) Dolaşimli kesikli reaktör



b) Yarı kesikli reaktör



c) Sürekli reaktör

Şekil 2.5. Sabit yataklı biyoreaktörler

2.4.2. Basınç etkisi

Süperkritik akışkan ortamında, basıncın enzimatik tepkimelere etkisi üç türdür.

1. Enzim molekül yapısına (kararlılığına)
2. Tepkime kinetiğine
3. Akışkanın fiziksel özelliklerine

2.4.2.1. Enzimlerin kararlılığına basınç etkisi

Penniston (1971), 100 MPa'ın üzerindeki basınçların enzim aktivitesinde önemli etkiler yapmadığını belirtmiştir. Multimerik enzim aktivitesi, basıncın artmasıyla azalırken, monomerik enzimlerin aktivitesi basıncın artmasıyla artmıştır (Kamat et al. 1995). Randolph et al. (1988a), 35 °C'de 1-113 bar basınç aralığında süperkritik CO₂ - yardımcı çözücü karışımında, kolesterol oksidaz (*Gloecocysticum chrysocreas*) yapısında önemli değişimler olmadığını, yüksek basınç elektron paramagnetik rezonans spektrofotometresi (EPR) ile belirlemişlerdir. Affleck et al. (1993), n-hekzan içerisinde 700 bar basınca kadar, subtilisin'in yapısında önemli bir değişim olmadığını; Zagrobelny et al. (1993), floresans spektroskopiyi kullanarak, tripsinin süperkritik CO₂'de yapısal değişim gösterdiğini belirlemişler; ancak bu tür yapısal değişimlerin enzim fonksiyonuna etkilerini belirleyen aktivite verisini bildirmemişlerdir (Kamat et al. 1995). Süperkritik akışkan ortamında enzimlerin aktivite ve kararlılıkları Çizelge 2.8'de verilmiştir. Kasche et al. (1988), monomerik ve oligomerik enzimlerin süperkritik CO₂'de kararlılıklarını incelemişler; kimotripsin, tripsin ve penisilin amidaz, süperkritik CO₂'de kısmen denatüre olmuşlardır. Süperkritik CO₂'de basınç düşürme hızının ve çözücü su içeriğinin, denatürasyon hızı üzerinde direkt etkiye sahip olduğunu ve disülfid köprüleri içeren enzimlerin daha az denatüre olduklarını belirtmişlerdir. Taniguchi et al (1987), dokuz farklı ticari enzime süperkritik CO₂'in etkilerini, 35° ve 20.3 MPa koşullarında incelemişlerdir. 1 saat sonunda aktivitede kayıp gözlememişlerdir. Süperkritik CO₂'e %0.1 su ve % 3 etanol eklendikten sonra

kararlılıkta önemli bir değişme olmamış; %0.1 su ve % 6 etanol eklendiğinde ise lipaz aktivitesi %20 düşmüştür. %50 (kütlece) su içeren lipaz kullandıkları zaman, süperkritik CO₂'e maruz kaldıktan sonra lipaz başlangıç aktivitesinin 2/3'ünü kaybetmiştir (çizelge 2.8).

Süperkritik koşullarda, substratlar ve katkıları (cosolvent) da enzim kararlılığını etkileyebilirler. Dumont et al (1992) ve Marty et al (1990, 1992) süperkritik CO₂'de lipaz aktivitesine etanol inhibisyonu olduğunu bildirmişlerdir. Benzer aktivite kaybı Kamat et al (1995) tarafından da 2-etil hekzanol ve metil metakrilat arasındaki transesterleşme tepkimesi için de süperkritik etanda gözlenmiştir. Sonuç olarak, enzim kararlılığına süperkritik akışkanların spesifik etkilerini tahmin etmek güç iken, süperkritik koşul için gerekli olan sıcaklık ve basınç genellikle enzimleri inaktive etmez.

2.4.2.2. Tepkime kinetiğine basınç etkisi

Morild (1981), süperkritik koşullarda tepkime hız sabitine basıncın etkisini, Eyring geçiş-hal teorisi ile tanımlamıştır (Kamat et al 1995). Bu teoriye göre kimyasal tepkime, tepkiyenlerle dengede olan geçiş-hal kompleksinin oluşumu üzerinden gerçekleşmektedir.



Tepkime hız sabiti, (2.2) denklemi ile verilir.

$$k=A_0(k_B T / h)K^* \quad (2.2)$$

Burada, K* denge sabiti, k_B Boltzman sabiti, T, sıcaklık, h Plank sabiti, A₀ ise sıcaklık ve basınçtan bağımsız bir katsayıdır. K* tepkiyen serbest enerjileri ve geçiş-hal kompleksi arasındaki serbest enerjideki farkla ilişkili olarak (2.3) denklemi yazılabilir.

$$\Delta G^*=-RT\ln K^* \quad (2.3)$$

Çizelge 2.8. Süperkritik akışkan ortamında enzimlerin aktivite ve kararlılıkları (Ballesteros et al. 1995)

Kaynak	Enzim	Deneysel Parametreler	Kararlılık ve verimliliğe etki
Taniguchi et al. 1987	Alkol dehidrojenaz α -amilaz, lipaz glukoamilaz, β -galaktozidaz glukoz oksidaz termolizin	SC-CO ₂ T=35 °C P=200 bar Enzimler %5-7 (w) su 1. katkı yok 2. % 3 EtOH 3. % 6 EtOH 4. %0.1 H ₂ O	Bağıl aktivite (1. saat) %94-102 % 87-98 %82-101 %92-106
	lipaz α -amilaz, glukoz oksidaz	%50 (enzimdeki su) %50 (enzimdeki su)	%33 %100
Kasche et al. 1988	α -chymotrypsin/tyrpsin penisilin amidaz	T=37 °C P=100 bar % 3 (w/v) H ₂ O < % 1 (w/v) H ₂ O	ardışık 3 kez basınç artırma sonra azaltma Aktivite (24.saat) % 32 / 11 / 0 % 94 / 109 / 0
Chi et al. 1988	Lipaz <i>Rhizopus japonicus</i> <i>Rhizopus delemar</i> <i>Alcaligenes sp.</i> <i>Rhizomucor miehei</i>	T=50 °C P=294 bar Tutuklama (Celite) Tutuklama (Celite) Serbest Tutuklama (Duolite)	Maksimum interesterleşme için su %20-45 (g çöz./g destek) % 7-40 % 3-9 % 0.1-50

Çizelge 2.8. (devam)

Kaynak	Enzim	Deneysel Parametreler	Kararlılık ve verimliliğe etki
Randolph et al 1988a	Kolesterol oksidaz <i>Gloecysticum chrysocreas</i>	T=35 °C P=101 bar Tutuklama (cam boncuk) 1. katkı yok 2. % 2 (v/v) MeOH 3. % 2 EtOH 4. % 2 n-bütanol 5. %2 sec- ve ter-bütanol 6. katkı yok, ve su uzaklaştırılıyor	<u>Turnover sayısı</u> (substrat çözünürlüğünden bağımsız) 75 s ⁻¹ (3 günde kararlılık) 62 s ⁻¹ 165 s ⁻¹ 100 s ⁻¹ 238, 274 s ⁻¹ 60 dk içinde tersinir inaktivasyon
	<i>Streptomyces sp.</i>	Katkı yok	Aktivite kaybı %80 (1.5 saat)
Pasta et al. 1989	Subtilisin carlsberg	T=45 °C P=150 bar % 2 / 5 (v/v) EtOH 45 °C ve 80 °C	Etanol ile transesterleşme Yüksek derişimlerde düşer Yüksek sıcaklıklarda artar
Nakamura 1989	Lipaz (serbest) <i>Rhizomucor delemar</i>	P=1/150/300 bar T=35°C T=50°C	Aktivite kaybı (%50) t ≥ 12/8.6/7 saat (iki basamak) t=1.6/1/0.6 saat (süre ile lineer)

Turnover sayısı = Tepkimeye giren substrat molekül sayısı / (katalizör aktif konumu x h)

Çizelge 2.8. (devam)

Kaynak	Enzim	Deneysel Parametreler	Kararlılık ve verimliliğe etki
Erickson et al 1990	Lipaz (<i>Rhizomucor arrhizus</i>) sulu Hyflo supercel'e tutuklama	T=40°C, kuru SC-CO ₂ P=86 bar'dan 300 bar'a arttığında	Trilaurin transesterleşme hızında %70 düşme
Miller et al 1991	cam boncuklara tutuklama	1. T=35°C ve P=96.5 bar 2. Su artırılıyor 1.7 g su/kg CO ₂ 3. P ↗ 86 ve 114 bar suyla doymun CO ₂ kuru CO ₂	Kalan aktivite (t=80 st) %100 Aktivite değişmiyor, hidroliz artıyor Hidroliz ve interesterleşme artıyor Hidroliz düşer, interesterleşme sabit
Marty et al 1990	Lipaz (<i>Rhizomucor miehei</i>) (Lipozyme)	P=130 ya da 180 bar 1. T=30-40 °C 2. T=60°C 3. P=130 bar T=40°C ve %0.4-1 (v/v) su ekleme	Kalan aktivite (6 gün) basınçtan bağımsız % 90 % 80 1 gün sonunda kalan aktivite %80den %20'ye düşüyor. Bağıl başlangıç hızının (\geq %80) _{maksimum} %2-11 (g çöz/g destek) su miktarı aralığında bir optimumu var.
van Eijs et al 1988b		P=100 bar T=60 °C %0.08'den %0.3'e(v/v) su	Esterleşmede % 50 düşme

Termodinamik olarak aktivasyon serbest enerjisi ve aktivasyon hacmi arasında (2.4) denklemi yazılabilir.

$$(d \Delta G^*/dp)_T = \Delta V^* \quad (2.4)$$

ve

$$\Delta V^* = V_M - V_A - V_B \quad (2.5)$$

Burada, ΔV^* aktivasyon hacmi (aktif kompleks ve tepkiyenlerin kısmi molar hacimleri arasındaki fark), V_m aktif kompleksin kısmi molar hacmi, V_A ve V_B ise tepkiyenlerin kısmi molar hacimleridir.

Hız sabiti k_X , mol fraksiyonu ya da molalitenin fonksiyonu olarak basınçtan bağımsız birimde, basınç ve aktivasyon hacmine bağlı olarak (2.6) denklemi ile verilir.

$$(d \ln k_X / dp)_T = - \Delta V^* / RT \quad (2.6)$$

Hız sabiti derişim biriminde ifade edilirse, (2.6) denkleme çözücünün izotermal sıkışabilirliği eklenmelidir.

$$(d \ln k_C / dp)_T = - \Delta V^* / RT + \sum \beta u_i \quad (2.7)$$

Burada, k_C derişim biriminde hız sabiti, β çözücü sıkışabilirlik katsayısı, u_i i bileşeni için stokiometrik katsayıdır.

Süperkritik akışkanlardaki aktivasyon hacmi, aynı tepkime için, sıvı çözücülerdekenden en az iki merteye daha yüksektir ($\pm 50 \text{cm}^3/\text{mol}$).

Benzer yaklaşım, enzimatik tepkime hız sabitine basıncın etkisi tahmin etmek için kullanılabilir. Süperkritik akışkanlardaki çok sayıda enzimatik tepkime için mekanizma

ve kinetik yeterince araştırılmamıştır. Morild (1981), bir substrat ve bir ürün dikkate alındığında aşağıdaki tepkimenin yazılabileceğini belirtmiştir (Kamat et al 1995);



Burada E, S, P, ES, EP sırasıyla enzim, substrat, ürün, enzim-substrat kompleksi ve enzim-ürün kompleksidir. Yatışkın koşul varsayımı yapılarak, genel hız eşitliği aşağıdaki gibi yazılır:

$$r = \frac{k_2[E_0][S]}{\frac{k_{-1} + k_1}{k_1} + \frac{k_2 + k_3}{k_3}[S]} \quad (2.9)$$

Burada k_1 , k_2 , k_3 , ileri yöndeki tepkime hız sabitleri, k_{-1} geri yöndeki hız sabiti, $[E_0]$ toplam enzim derişimidir. İki durum olabilir.

1. Yüksek substrat derişimi
2. Düşük substrat derişimi

Yüksek substrat derişiminde ($[S] \gg K_m$) (2.9) denklemi aşağıdaki gibi basitleştirilir.

$$r = (k_2 k_3) / (k_2 + k_3) [E_0] \quad (2.10)$$

ya da

$$r = (k_t) [E_0] \quad (2.11)$$

$$k_t = (k_2 k_3) / (k_2 + k_3) \quad (2.12)$$

(2.12) denkleminin logaritması alınarak (2.13) denklemi elde edilir.

$$\ln k_t = \ln k_2 + \ln k_3 - \ln(k_2 + k_3) \quad (2.13)$$

(2.13) denkleminin basınca göre türevi tepkimede toplam aktivasyon hacim değişimini verir.

$$\Delta V_T = (k_3 \Delta V_2 + k_2 \Delta V_3) / (k_2 + k_3) \quad (2.14)$$

ΔV_2 ve ΔV_3 2. ve 3. basamaklardaki aktivasyon hacimleridir. Gözlenen hacim değişimi, tepkime sistemindeki her bir basamak için hacim değişimlerinin ortalamasıdır. (2.14) denklemini hız kısıtlayıcı basamaklara bağlı olarak farklı şekillerde olur. 3. basamak hız kısıtlayıcı varsayılarak ($k_3 \ll k_2$) (2.10) denklemini aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$r = k_3 [E_0] \quad (2.15)$$

$$k_3(p) = k_3(0) \exp[-p^* \Delta V_3 / RT] \quad (2.16)$$

Burada, $k_3(0)$ atmosfer basıncındaki, $k_3(p)$ p basıncındaki hız sabitleridir.

(2.16) denklemini basınç ve aktivasyon hacmi parametre alınarak hız sabitlerinin integrale formudur. $k_3 \ll k_2$ için (2.14) denklemini (2.17) denklemine indirgenir.

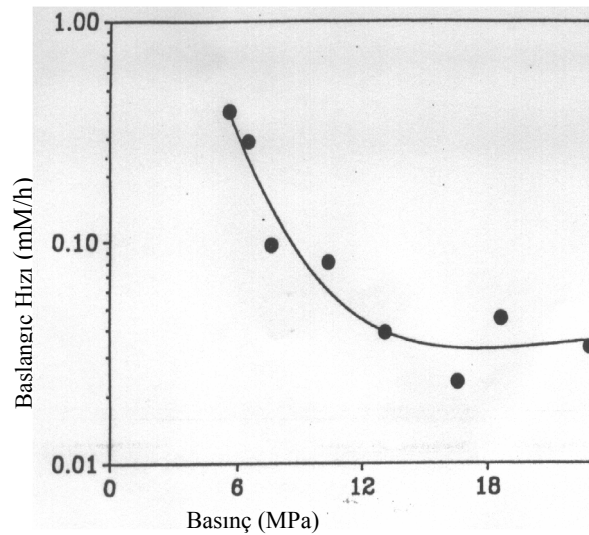
$$\Delta V_T \cong \Delta V_3 \quad (2.17)$$

Böylece yüksek substrat derişimlerinde gözlenen toplam hacim değişimi, hız kısıtlayıcı basamağın hacim değişimine biraz fazla ya da eksik olarak eşittir.

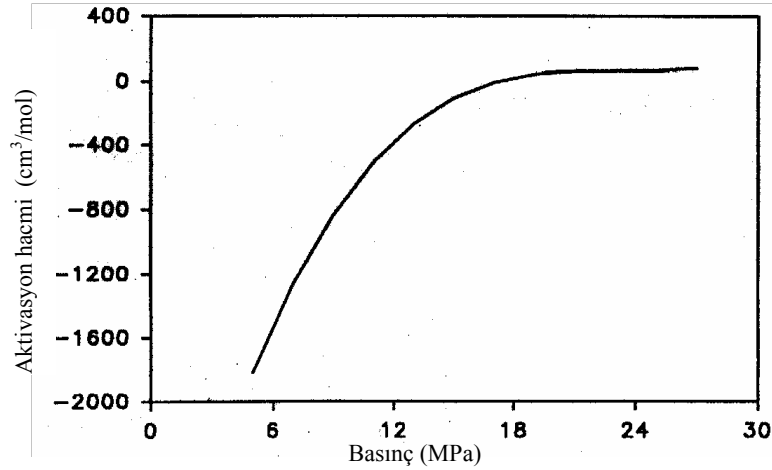
Hız kısıtlayıcı basamak ve aktivasyon hacimlerine bağlı olarak basınç uygulaması, gözlenen tepkime hızını artırabilir ya da azaltabilir. $k_3 \ll k_2$ ve 3. basamağın toplam tepkime hızını kontrol ettiği varsayıldığında, $\Delta V_3 > 0$ ya da $\Delta V_3 < 0$ olur. (2.16) denklemine göre 1. durumda toplam tepkime hızı, basınçla düşer ve bu basamağın toplam tepkime hızını kontrol etmesi devam eder. Oysa $\Delta V_3 < 0$ olması durumunda tepkime hızı basınçla artar ve hızı kontrol eden basamak eğer $\Delta V_2 > 0$ ise 3.

basamaktan ikinci basamağa değişebilir. Bu durumda ikinci basamaktaki hız sabiti, basıncın artmasıyla azalır ve basıncın bazı spesifik değerlerinde, 2. ve 3. basamaklarındaki tepkime hızları eşit olabilir ve 2. basamak hız kısıtlayıcı basamak olur.

Enzimatik tepkimeler için aktivasyon hacminin kullanımı bazı nedenlerle gereklidir. Süperkritik akışkan fiziksel özelliklerinin basınçla değişmesi nedeniyle, verilen bir tepkimeyi katalizlemek için, enzimin gerçek kabiliyeti değişecektir. Böylece belirlenen gözlenen aktivasyon hacmi, varolan pek çok değişkenin sonucu olarak değiştirilecektir. Bu tür veriler, enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerin aktivasyon hacimlerine basıncın etkisini karşılaştırmak için kullanılmamalıdır. Enzimatik olmayan bir tepkime için veriler, direkt olarak basınç etkilerine bağlıdır. Oysa, enzimatik bir tepkime için, çözücünün basınca bağlı olan fiziksel özellik değişimlerinin bir sonucu olarak, enzim aracılığı ile iletilen basıncın indirekt etkileri de olacaktır. Şekil 2.6, floroformda, 2-etilhekzanol ve metil metakrilat (MMA) arasındaki lipaz katalizli transesterleşme tepkime hızına gözlenen basınç etkilerini göstermektedir. Şekil 2.6 kullanılarak, farklı basınçlardaki bir tepkime için, gözlenen aktivasyon hacmi belirlenmiş ve şekil 2.7’de verilmiştir. Beklendiği gibi gözlenen aktivasyon hacminin büyüklüğü, floroformun kritik noktası yakınında maksimumdur ve basıncın artmasıyla sıfıra doğru yaklaşır.



Şekil 2.6. Süperkritik floroformda MMA (20mM) ve 2-etil hekzanol (20mM) arasında lipaz (*C. cylindracea*) katalizli transesterleşme hızına basınç etkisi (Kamat et al.1995)



Şekil 2.7. Süperkritik floroforonda MMA (20mM) ve 2-etil hekzanol (20mM) arasında lipaz (*C. cylindracea*) katalizli transesterleşme tepkimesinde aktivasyon hacmine basınç etkisi (Kamat et al.1995)

2.4.2.3. Akışkanın fiziksel özelliklerine basınç etkisi

Süperkritik bir akışkanın fiziksel özellikleri yoğunluğa bağlıdır. Düşük basınçlarda, süperkritik akışkan yoğunluğu, gazlarınkine benzer, basıncın artmasıyla sıvılarınkine yaklaşır. Süperkritik akışkan yoğunluğunun özellikle kritik nokta yakınında basınca bağımlılığı çok önemlidir.

Süperkritik akışkan yoğunluğunda, basınç ve sıcaklıkla meydana gelen değişim, basınç, sıcaklık ve hacime bağlı olan bir hal eşitliği kullanılarak tahmin edilebilir. Yoğunluk verisi kullanılarak süperkritik akışkanın diğer özellikleri kuramsal olarak ya da basit temellerden belirlenebilir. Örneğin, Younglove vd (1987) ve Perry vd (1987) tarafından verilen basınç içeren bir hal eşitliği kullanılarak, CO₂, etan, florofor, sülfür hekzaflorür ve kritik yakını propanın basınca bağlı olan fiziksel özellikleri tahmin edilmiştir (Kamat et al. 1995). Etan ve propan durumunda çok parametrelili eşitlik uygulanmış; sülfür hekzaflorür için ise modifiye Benedict-Webb-Rubin eşitliği kullanılmıştır.

Hildebrand çözünürlük parametresi (δ), süperkritik bir akışkanın çözme gücü için ilk yaklaşımdır ve kohesiv enerji yoğunluğundan bulunabilir.

$$\delta = (\rho_{CE} / V)^{0.5} \quad (2.18)$$

Burada ρ_{CE} kohesiv (yapışık) enerji yoğunluğunu, V ise süperkritik akışkan molar hacmini gösterir.

Kohesiv enerji yoğunluğunu belirlemek için, buharlaşma ısısını bilmek gerekir. Kritik noktanın üzerinde olan materyaller için bu bilgi oldukça azdır. Bu nedenle, kohesiv enerji yoğunluğu, bir maddedeki iki molekülü ayırmak için gerekli olan enerji olarak tanımlanır ve termodinamik olarak aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$\rho_{CE} = \int_{\nu}^{\infty} (\partial u / \partial \nu)_T d\nu \quad (2.19)$$

Burada, u molar iç enerjidir. Maxwell eşitliği kullanılarak (2.19) denklemi şu şekilde yazılır.

$$\rho_{CE} = \int_{\nu}^{\infty} [(\partial P / \partial T)_{\nu} d\nu - P] d\nu \quad (2.20)$$

Basıncı içeren bu hal denklemi kullanılarak, farklı süperkritik akışkanlar için Hildebrand çözünürlük parametresi belirlenebilir.

Artı ve eksi yüklerin bulunduğu bir alana elektrik alan uygulanırsa kutuplanma meydana gelir. Dielektrik sabiti (ϵ), kutuplanmanın oluşturduğu elektrik yükünün daha önceki elektrik yüküne oranı olarak tanımlanır ve (2.21) denklemi ile ifade edilir.

$$\epsilon = \frac{1 + 4\pi N q X}{\text{elektrik alanı}} \quad (2.21)$$

Burada, N birim hacimdeki yükü, q yük miktarını, X ise elektrik yükleri arasındaki uzaklığı gösterir.

Dielektrik sabiti (2.22) denklemi ile de verilebilir.

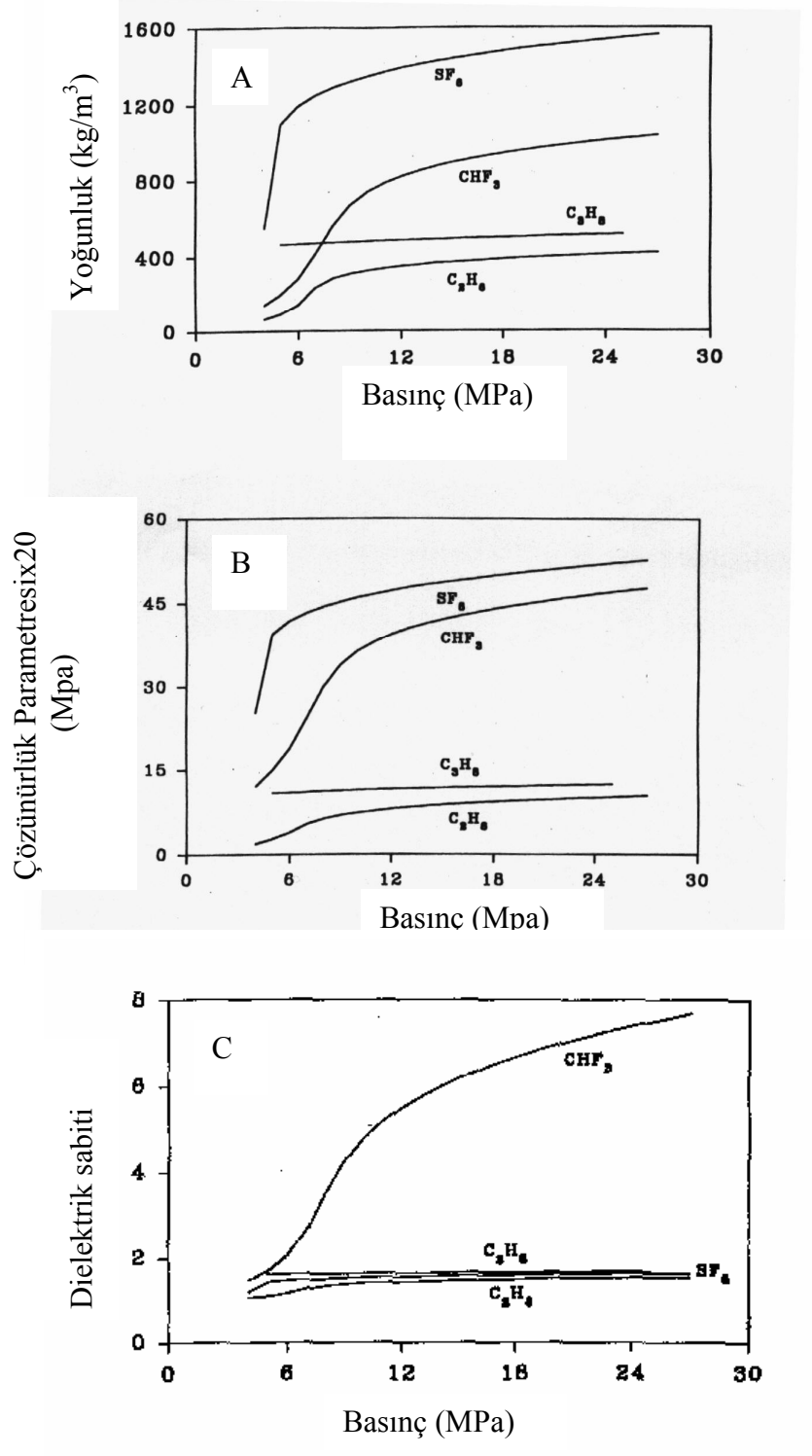
$$\varepsilon = (\text{Kırılma indisi})^2 \quad (2.22)$$

Süperkritik bir akışkanın dielektrik sabitini tahmin etmek için, Clausius-Mossotti türü bir eşitlik kullanılabilir. Kamat et al (1993b), farklı katsayıları bulmak için literatürde yer alan dielektrik sabiti ve yoğunluk verilerini kullanarak (2.23) denklemindeki katsayıları belirlemişlerdir. Daha sonra dielektrik sabitini, sıcaklık ve basıncın fonksiyonu olarak bulmuşlardır.

$$\left(\frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2}\right)\left(\frac{1}{\rho}\right) = C_1 + C_2(\rho) + C_3(\rho)^2 + C_4[\ln(1 + T/T_c)] \quad (2.23)$$

Burada, ρ yoğunluk, ε dielektrik sabiti, T sıcaklık, T_c çözücünün kritik sıcaklığı, C_1 - C_4 sabitleri gösterir.

Kamat et al (1995), her akışkanın yoğunluğunu, hal denklemini kullanarak hesaplamışlar, daha sonra dielektrik sabitleri ve çözünürlük parametrelerini belirtilen şekilde bulmuşlardır. Şekil 2.8 A, B ve C süperkritik etan, floroform, sülfür hekzaflorür ve kritik yakını propan için yoğunluk, Hildebrand çözünürlük parametresi ve dielektrik sabitine basıncın etkisini göstermektedir. Görüldüğü gibi fiziksel özellikler basınçla yumuşak bir şekilde değişiyor. Örneğin floroform için dielektrik sabiti, basıncın 5.51 MPa'dan 27.6 MPa'a çıkmasıyla 1.5 değerinden (gaza benzer) 8 değerine (sıvı metilen klorürün dielektrik sabitine eşdeğer) değişir. Affleck vd (1989), konvansiyonel çözücülerin dielektrik sabitlerindeki değişimlerin, protein esnekliği üzerine önemli etkilere sahip olduğunu belirtmiştir (Kamat et al. 1995). Sıvıların fiziksel özelliklerinin basınca bağımlılıkları hafiftir. Örneğin şekil 2.8. C'den propanın fiziksel özelliklerinin incelenen basınç aralığında neredeyse sabit kaldığı görülmektedir. Süperkritik akışkanlarda çözücünün kimyasal yapısını değiştirmeksizin fiziksel özellikler, basınç ve

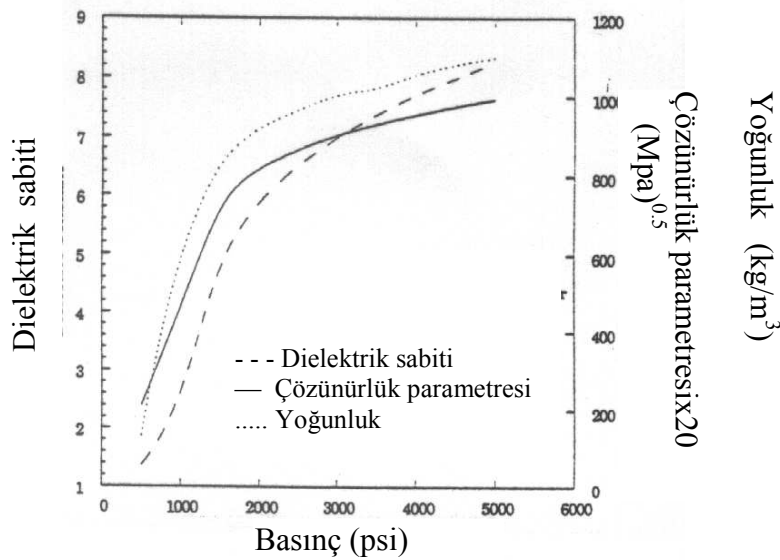


Şekil 2.8. Etan, florofrom, sülfür hekzaflorür ve propan için fiziksel özelliklere basınç etkisi (Kamat et al. 1995)
 A) yoğunluk
 B) çözünürlük parametresi,
 C) dielektrik sabiti

sıcaklık biraz değiştirilerek değiştirilebilir. Şekil 2.9’da süperkritik floroforumun fiziksel özelliklerine basıncın etkisi görülmektedir. Dielektrik sabitinde basınca bağlı olarak meydana gelen artma, metanol (1M) ile N-asetil-(L ya da D)-fenilalanin etil ester (25 mM) arasında 50°C’deki transesterleşme için subtilisin ve *Aspergillus* proteazlarında önemli değişime neden olmuştur. Çizelge 2.9’dan görüldüğü gibi, basıncın artmasıyla, her iki enzim daha stereoseçimli olmuşlardır. Başka bir deyişle, floroforumun artan basınçla daha hidrofilik olması nedeniyle, enantiyoseçimlilikler artmıştır (Mesiano et al 1999).

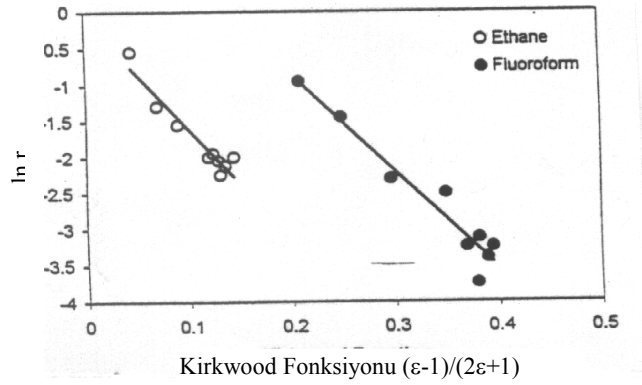
Çizelge 2.9. Süperkritik floroforumda enantiyoseçimliliğe basınç etkisi

Basınç (MPa)	$(k_{kat}/K_m)_L/(k_{kat}/K_m)_D$ subtilisin <i>Carlsberg</i> proteaz	<i>Aspergillus</i>
6.5	109	5.73
10.3	100	5.81
12.4	186	5.68
16.5	214	6.67
20.7	229	8.00
28.9	217	9.17



Şekil 2.9. Floroforumun fiziksel özelliklerine basınç etkisi (Kamat vd 1993a).

Kamat et al (1993b), lipaz aktivitesine, çözücü özelliklerinde basınçla meydana gelen değişimlerin etkilerini incelemiştir. Basıncın artmasıyla tepkime hızının azaldığını gözlemişlerdir. Yoğunluk, çözünürlük parametresi ve dielektrik sabitinin tepkime hızına etkileri araştırılmış ve dielektrik sabitinin gözlenen etkiyi gösteren en uygun parametre olduğunu bulmuşlardır. Homojen tepkimeler için, çözücünün tepkime hız sabitine etkisi Kirkwood fonksiyonu $[\ln r \propto (\epsilon - 1) / (2\epsilon + 1)]$ ile tahmin edilebilir. Başlangıç hızının logaritmasının Kirkwood fonksiyonu ile değişimi şekil 2.10'da verilmiştir. Görüldüğü gibi süperkritik florofromda ve süperkritik etanda tepkime hızı ve çözücü dielektrik sabiti arasında lineer bir ilişki vardır.

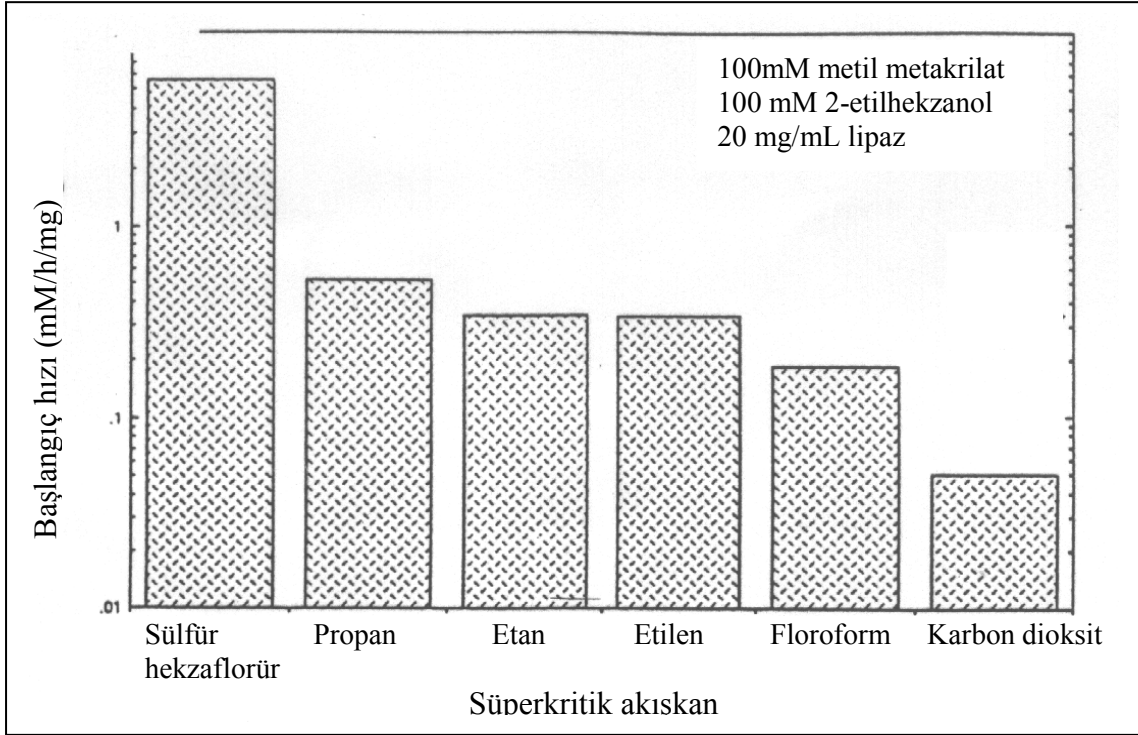


Şekil 2.10. Süperkritik florofrom ve etan ortamında lipaz aktivitesi ve çözücü dielektrik sabiti arasındaki ilişki (Kamat et al.1993b)

Biyotepkime süperkritik akışkan fazda ya da enzimi saran sulu tabakada gerçekleşebilir. Bu durumda Hildebrand çözünürlük parametresine bakılır. Bu parametre, çözünen bileşenler için çözücü gücünü ve çözücünün polaritesini gösterir. Çözücü ve apolar bileşen çözünürlük parametreleri arasındaki fark $< 9 \text{ (MPa)}^{0.5}$ ise çözünürlük yüksektir ve tepkime süperkritik proses koşullarında gerçekleşir (Kamat et al 1995).

2.4.3. Çözücünün (süperkritik akışkan) etkisi

Şekil 2.11, lipaz (*C. cylindracea*) aktivitesinin (MMA ve 2-etil hekzanol transesterleşmesi için) kullanılan süperkritik akışkan türüne bağlı olduğunu göstermektedir. Bu tür bağımlılık, protein-çözücü iç etkileşimlerindeki farklılığın bir sonucu olabilir.



Şekil 2.11. MMA ve 2-etil hekzanolün lipaz (*C.Cylindracea*) katalizli reaksiyon başlangıç hızlarına çözücü etkisi (45°C, 10.9MPa) (Kamat et al 1992)

Süperkritik akışkan-protein iç etkileşim farklılığı

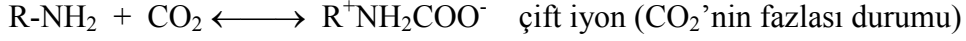
- enzim ve çözücü arasında, substrat, ürün ve suyun dağılımlarına bağlı olan enzim aktivitelerini,
- hidrojen bağı, iyonik ve hidrofobik iç etkileşimlerin bozulması ile inhibe olan ya da inaktif olabilen enzim ile akışkan direkt iç etkileşimlerini

etkileyebilir. Aktif konum ve çözücü arasında substratın dağılması, çözücünün hidrofobikliğine ve enzime bağlıdır. Örneğin korunmuş trozin ve fenilalanin esterleri gibi hidrofobik substratlar, suda subtilisin ve kimotripsin enzimlerinin aktif konumlarına dağılırlar, organik çözücülerde ise çözücünün içine dağılarak tepkime hızını azaltırlar (Kamat et al. 1995).

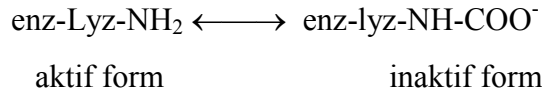
Süperkritik CO₂'nin bazı enzimleri değiştirmesi ya da inaktive edip etmemesi belirgin değildir. Bazı lipazların süperkritik CO₂'de hekszandakinden daha düşük aktivite gösterdikleri bildirilmektedir. Örneğin, test edilen süperkritik akışkanlar (etan, sülfür hekzaflorür, etilen, floroform, CO₂ ve kritik yakını propan) arasında süperkritik CO₂'de, lipaz (*C. cylindracea*) MMA ve 2-etil hekzanol arasındaki transesterleşme hızında en düşük aktiviteyi göstermiştir (şekil 2.15) (Kamat et al 1992). CO₂ normal çevre koşullarında da enzimi inhibe etmiştir. CO₂, lipaz için potansiyel inhibitör görevi yapmaktadır; ancak süperkritik CO₂'den dolayı gerçekleşen gözlenen inhibisyon tamamen tersinirdir. Süperkritik CO₂'de beklenen enzim, daha sonra konvansiyonel bir çözücüye konduğu zaman doğal enzimdeki aynı aktiviteyi gösterir. Benzer gözlemler Chulalaksananukul et al (1993), Marty et al (1992) ve Vermue et al (1992) tarafından da yapılmış; farklı bir lipaz (*M. Miehei*) hekszanda süperkritik CO₂'dekinden daha yüksek hızlar göstermiştir.

Enzim aktivitesi pH'a duyarlıdır. Tepkimenin pH bağımlılığı, katalizde önemli rol oynayan değişik amino asit kalıntılarının iyonlaşmasını gösterir. Susuz ortamlarda, mikroçevrelerdeki pH değiştirilirse, enzimler aktivitelerini değiştirirler. CO₂ enzimi saran sulu tabakada çözünebilir ve lokal pH'ı değiştirerek enzim aktivitesini etkileyebilir; ancak tampon tuzlar varlığında, çözülmüş CO₂'in mikrosulu fazdaki pH değişimi ihmal edilebilir. *M. Miehei* ve *C. cylindracea* lipazları ile yapılan deneyler, akışkanın lokal pH'ı değiştirmediğini göstermiştir. Bu lipazlar süperkritik CO₂'de daha düşük aktivite göstermişlerdir; ancak sulu çözeltide geniş bir pH aralığında (2-10) pH'a duyarlı olmamışlardır. CO₂'nin protein yapısına başka bir etkisi de, CO₂ moleküllerinin enzim yüzeyindeki amino grupları ile karbamat kompleksleri oluşturmasıdır. Wring vd

(1948) ve Werner (1920), asitik bir molekül olan CO₂'in aşağıda gösterildiği gibi karbamatları oluşturmak üzere temel amino grupları ile tepkimeye girebildiğini göstermişlerdir (Kamat et al 1995). Oluşan kompleks, CO₂ derişimine, temel amino gruplarına ve kullanılan aminlerin bazikliğine bağılı olacaktır.



Enzimlerdeki lizin kalıntıları, karbamat komplekslerinin oluşumunu sağlayabilir.



Lorimer et al (1976, 1980, 1981, 1989) ribuloz 1,5-bifosfat karboksilaz üzerindeki lizin (ϵ -NH₂) grubunun sulu çözeltideki CO₂ ile tersinir karbamat kompleksi oluşturduğunu belirlemiştir(Kamat et al 1995). Karbamat kompleks oluşum mertebesi, CO₂ moleküllerinin göstergesi olan pH artmasıyla artmıştır; ancak HCO₃⁻ kompleks oluşumuna katılmamıştır. Karbamat kompleksleri düşük sıcaklıklarda kararlıdır, sıcaklığın artmasıyla denge sola kayar. Kamat et al (1992), MMA ve 2-etil hekzanol arasındaki transesterleşme tepkimesinde, lipaz kararlılığının sıcaklığın artmasıyla arttığını belirtmişlerdir. Bu sonuç, sıcaklığın artmasıyla inhibitör karbamat oluşumunun terse dönmesi gerekliliği ile açıklanabilir.

Her bir enzimin yüzey modifikasyonuna farklı cevap vermeleri nedeniyle, CO₂'nin inhibitör etkisinin tüm enzim sistemleri için uygulanması beklenmez. Dumont et al (1992), etanol ve miristik asit arasındaki *M. Miehei* katalizli esterleşme tepkimesi için süperkritik CO₂'de hekzana kıyasla 1.5 kat daha yüksek aktivite gözlemişlerdir. Benzer bir gözlem, Chi et al (1988) tarafından, stearik asit ve triolein arasındaki interesterleşme

tepkimesini katalizleyen aynı enzim için yapılmıştır. Etanol ve N-asetil -L-fenilalanin kloro etil ester arasındaki subtilisin katalizli tepkimede, çözücünün amil alkol yerine süperkritik CO₂ kullanılması durumunda, tepkime hızı 4 kat artmıştır (Pasta et al 1989).

Artan su derişimi varlığında önerilen karbamatlar zarar görürler ve çok sayıda enzime CO₂ etkilerinin bağlı olduğu su derişimi sürekli kontrol edilmelidir.

2.4.4. Sıcaklık etkisi

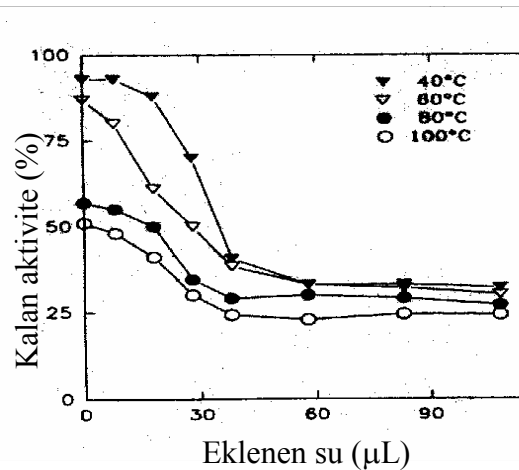
Susuz ortamlarda süspanse edilen enzimlerin en önemli özelliklerinden biri, sulu ortama kıyasla ısıl kararlılıklarının artmasıdır. Su, yüksek sıcaklıkta enzimin inaktive olmasında önemli rol oynar. Tanford (1968) ve Zaks ve Klivanov (1986), suyun, yüksek sıcaklıklarda protein molekülünün katlanmasını artırdığını ve bunun da hızı azalttığını bildirmişlerdir (Kamat et al. 1995). Su, ayrıca disülfid iç etkileşimlerinde, glutamin ve asparajin deaminasyonunda ve peptid bağ hidrolizinde substrat olarak görev yapar. Aslında pek çok enzim, depolama ömürlerini uzatmak için, bağlı olan su içerikleri ile birlikte depolanırlar. Bu nedenle enzimin susuz ortamlarda daha yüksek ısıl kararlılık göstermeleri doğaldır (Kamat et al. 1995).

Zaks vd (1984) lipazların, Garza-Romes vd (1989) mitokondriyal F₁-ATPaz enziminin, Ayala vd (1986) cytochrome oksidaz enziminin susuz ortamlarda 100°C'a kadar kararlı ve aktif olduklarını bildirmişlerdir (Kamat et al. 1995). Örneğin lipazın yarılanma ömrü, %0.015 (v/v) su + tribütirin içinde 100°C'de 12 saat iken, sulu ortamda bir kaç saniyedir.

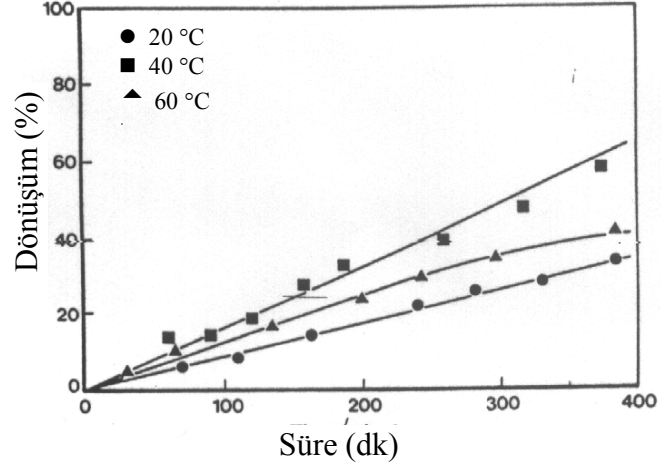
Süperkritik akışkanlarda enzimlerin kararlılıkları 35-60 °C aralığında çalışılmıştır (Kamat et al 1995). Pek çok çalışma, süperkritik CO₂ içinde akışkanın oldukça sıkıştırılabilir olduğu kritik nokta yakınında (1.2-2T_c) gerçekleştirilmektedir. Enzimlerin süperkritik CO₂'de yüksek sıcaklıkta kararlı olmalarına karşın, aktivitelerindeki kayıp, basınç düşürme hızına ve sistemin su içeriğine bağlıdır. Daha yüksek su içeriğinde

aktivitedeki kayıp daha önemlidir. Örneğin, Chulalaksananukul et al (1993), 40, 60, 80 ve 100°C’de farklı su içeriklerinde *M. Miehei* lipazının ısıl kararlılığını incelemiştir. Optimum enzim aktivite ve kararlılığı için, su içeriği ve sıcaklığın uygun bir şekilde dengelenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Enzim aktivitesi, bütün sıcaklıklarda su içeriğinin artmasıyla düşmüştür (şekil 2.12.). 100°C’de kuru enzimin yarılanma ömrü 24 saat olmuştur. Benzer sıcaklık bağımlılığı, süperkritik CO₂’de bütanol ile laurik asit esterleşmesi için *C. cylindracea* B aktivitesini, 20, 40, 60°C’de çalışan Steytler et al (1991) tarafından belirlenmiştir. Enzim 40 °C’de optimum aktivite göstermiştir (şekil 2.13.). Metil metakrilat ve 2-etil hekzanol arasındaki lipaz (*C. cylindracea*) katalizli transesterleşme tepkime hızına sıcaklığın etkisi, süperkritik etan, CO₂ ve hekzan ortamlarında incelenmiştir. Etan ve hekzan kullanımında, sıcaklıkla başlangıç tepkime hızı artmış, CO₂ ortamında ise düşük olan başlangıç hızı, sıcaklıkla değişmemiştir (şekil 2.14.).

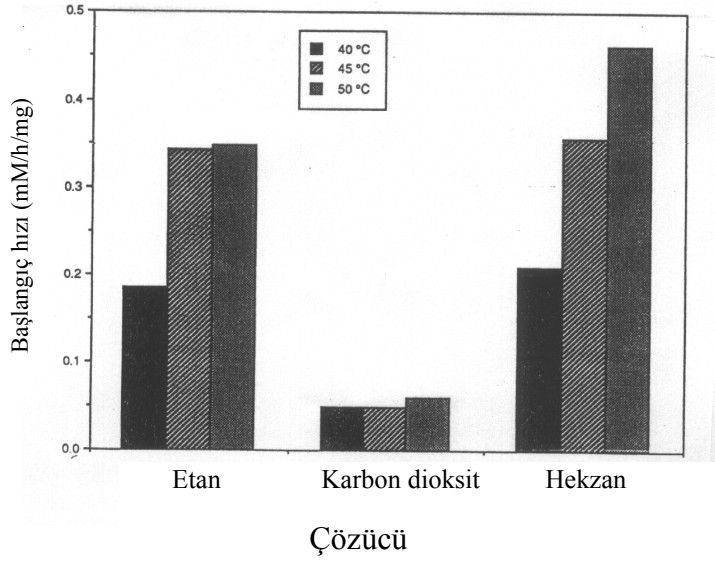
Aspergillus ve *subtilisin* proteazları da süperkritik akışkanlarda 50°C’de aktif olmuşlardır (Kamat et al 1993a). Aslında *subtilisin* 80°C gibi yüksek sıcaklıklarda hala aktivite gösterir. Genellikle süperkritik akışkanlarda enzimler kararlıdır ve 45°C civarında optimum aktivite gösterirler.



Şekil 2.12. Süperkritik CO₂’de lipaz (*Mucor miehei*) katalizli jerenil asetat üretiminde enzim kararlılığına sıcaklık ve su miktarının etkisi (Chulalaksananukul et al. 1993).



Şekil 2.13. Bütanol ve laurik asitin lipaz (*Candida Lipaz B*) katalizli reaksiyonunda dönüşüme sıcaklığın etkisi (Stetytler et al. 1991)



Şekil 2.14. MMA ve 2-etil hekzanolün lipaz (*C. cylindracea*) katalizli transesterleşme reaksiyon hızına sıcaklık etkisi (Kamat et al. 1992)

2.4.5. Yardımcı çözücü (cosolvent) etkisi

Süperkritik CO₂'de genellikle apolar ya da az polar bileşenlerin çözünürlükleri yüksektir. Polar bileşenlerin çözünürlüklerini artırmak için akışkana polar katkı maddeleri (metanol, etanol, bütanol, aseton gibi bir yardımcı çözücü) eklenir. Yardımcı çözücü ve bileşen arasında hidrojen bağı kurulur ve yük aktarım kompleksi oluşur. Sonuçta çözünürlük artar, akışkanın fiziksel özellikleri değişir (Mesiano et al. 1999, Ballesteros et al. 1995).

Randolph et al (1988b), süperkritik CO₂'de kolesterolün oksidasyon hızına farklı alkollerin ve asetonun etkisini incelemiştir. Yüksek polariteli düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin (metanol, etanol ve aseton) kullanılması durumunda, sadece etanolün %2 (v/v) eklenmesi ile tepkime hızı 2.2 kat artmıştır. Bunun aksine bütanolün üç farklı formu ve özellikle t-bütanol tepkime hızını 3.6 kat artırmıştır. Ancak bu üç bileşen diğerlerine kıyasla daha az polardır ve kolesterol çözünürlüğünde daha az artma yapmaları beklenir. Bu nedenle tepkime hızındaki artma kolesterol çözünürlüğünün artmasından dolayı değildir. Proteine elektron paramagnetik rezonans (EPR) spektroskopisi uygulanmış ve yapısal değişim gözlenmemiştir. Yardımcı çözücü varlığında kolesterolün topaklaşması (aggregate) EPR ile incelenmiş ve topaklaşma durumunun kullanılan katkı maddesine bağlı olduğu belirlenmiştir. Topaklaşmanın olması, kolesterol derişiminin süperkritik CO₂ içinde her yerde aynı olmadığını, ancak yüksek lokal derişim bölgelerinin olduğunu göstermiştir. Kolesterolün topaklaşması, metanol, bütanol ve aseton kullanımında az, etanol varlığında artmış ve t-bütanol kullanımında ise en yüksek olmuştur. Kolesterol topaklaşmasındaki artışın reaktiviteyi önemli ölçüde etkilemesi nedeniyle, substrat topaklaşması çözünürlükten daha önemli olmuştur.

2.4.6. Kütle aktarımının etkisi

Sulu ve susuz ortamlardaki enzimoloji arasındaki temel farklılık, susuz ortamlarda enzimatik tepkimeler çözücüyle ilişkili olarak heterojendir.

Süperkritik bir akışkan içinde süspansiyon edilen enzimler kullanılarak gerçekleştirilen bir tepkime için, substrat molekülünün içinden geçmesi gereken iki yayınma engeli vardır. İlki, substrat çözücü yığınının enzim yüzeyine/desteğine yayılmak zorundadır (dış kütle aktarımı, DKA). İkincisi, substrat enzim molekülündeki aktif konumlara ulaşmak için partikül içinde yayıncıdır (iç kütle aktarımı, İKA). Doğal olarak, ürünler de çözücü yığınının ulaşmadan önce benzer yayınma kısıtlamalarına sahip olacaklardır. Kütle aktarım hızı, çözücü fiziksel özelliklerine (T, P), enzim yapısına ve hidrodinamiğe (karıştırma hızı, akış hızı) bağlıdır. Kullanılan çözücü, enzim partiküllerinin birleşmesini sağlayarak (aggregate) boyutunu etkiler. Kütle aktarım hızı, çözücünün fiziksel özellikleri ve enzim yapısının da değişimi nedeniyle, çözücünden çözücüye değişecektir. Bu nedenle farklı sistemlerdeki enzim aktivitesini karşılaştırmadan önce, süperkritik akışkanlardaki yayınma etkilerini anlamak gerekir. Bir tepkime yayınma kısıtlamalı ise süperkritik akışkanlar, bu ortamlardaki kütle aktarım hızlarının sıcaklık ve basınca bağlı olması nedeniyle, gözlenen hızı artırmak için kullanılabilirler (Kamat et al 1995).

Kamat et al (1992a ve b), enzimatik tepkime hızını kısıtlayan iç ve dış kütle aktarımının etkisini, hem organik çözücülerde hem de süperkritik akışkanlarda incelemiştir. Süperkritik akışkan kullanımı ile iç yayınma kısıtlamaları organik çözücülerdekinden daha az olmaktadır (Kamat et al 1992b, Russell and Beckman 1991). Yayınma kısıtlamalı olan enzim aktivitesi, süperkritik akışkanların kullanılması ile yüksek yayınma nedeniyle artırılabilir. Süperkritik akışkan proseslerindeki dış kütle aktarım kısıtlamalarını ortadan kaldırmak için gerekli olan karıştırma hızı, yüksek yayınma nedeniyle konvansiyonel organik çözücülerdeki karıştırma hızından iki merteye daha düşüktür (Kamat et al 1992b, 1995).

Dış kütle aktarım hızı, sürekli bir sistemde akış hızına ve türbülense bağlı iken kesikli bir sistemde karıştırma hızı ya da çalkalayıcı hızına bağlıdır. İç kütle aktarım hızı, ne akış hızına ne de karıştırmaya bağlıdır; sadece enzim yapısına ve akışkanın doğasına bağlıdır. Enzim tanecikleri, süperkritik bir akışkan içinde dağıldıkları zaman yapısal değişimlere uğrarlar. Enzimin bu yapısı, enzimin türüne, çözücüye, sistemdeki sıcaklık ve basınca bağlıdır. Kamat et al (1995), özellikle yüksek basınçlı görünür hücre kullandıkları zaman farklı süperkritik akışkanlarda, lipazın (*C. cylindracea*) topaklaşması (aggregate) ile boyutunda değişimler gözlemişlerdir. Düşük yoğunluk ve yüksek yayınma nedeniyle süperkritik akışkanların pek çok polimeri şişirdikleri bilinmektedir. Süperkritik akışkanlarda yapısal değişimler gözlenirken, süperkritik akışkanlar içinde bu tür etkilerin kantitatif sonuçları bulunmamaktadır.

Roziewski ve Russel (1992), konvansiyonel organik çözücülerde, toz haldeki enzim yapısına su içeriğinin etkisini incelemişlerdir. Elektron mikroskobu kullanılarak, liyofilize toz haldeki subtilisin Carlsberg için (yaklaşık 0.2 µm kalınlıkta) 9.2 torr buhar basıncında 100 µmden daha büyük boyutlarda ince tabaka olduğunu açıklamışlardır. Analiz bölümündeki nemin %50'nin üzerine artmasıyla, tabakaların şiştiği gözlenmiş ve %95 nemde, enzim partikülleri dallanmış bir yapı oluşturmak üzere birleşmişlerdir. Partikül yapısına toluenin etkisi de çalışılmış ve görünür değişimler gözlenmemiştir (Kamat et al 1995).

Çok sayıda araştırma grubu, süperkritik akışkanlarda enzim katalizli tepkimelere dış kütle aktarımının (DKA) etkilerini incelemişlerdir; sonuçlar çizelge 2.10'da verilmiştir. Kolesterolün, kolesterol oksidaz katalizli oksidasyonu, süperkritik CO₂ akış hızına lineer olarak bağımlı olmuş; incelenen akış hızlarında (0.5-3 cm/s), DKA kısıtlaması önemli olmamıştır (Randolph et al 1988b). Van Eijs et al (1988a), izoamil asetatın lipaz katalizli üretim hızında, akış hızının artmasıyla (0.3cm/s'den 1.3cm/s'ye) artış gözlemişler ve dış kütle aktarımının önemli olduğunu belirlemişlerdir. Randolph et al (1988b)'nin sonuçlarına ters olan bu gözlem, yalnızca enzim aktivite değişimleri ve böylece enzimdeki yayınma etkisini gösterir. Aslında tüm enzimlerin farklı olması nedeniyle, enzimlerin bütünü için optimum akış hızı kullanılamaz.

Çizelge 2.10. Sürekli süperkritik akışkan sistemlerinde dış kütle aktarım (DKA) kısıtlaması

Kaynak	Enzim	Substratlar	Sistem	Bulgular	DKA
Randolph et al. 1988b	<i>Gloeocysticum chrysocreas</i> Lipaz (cam boncuklara tutuklama)	kolesterol + O ₂	sürekli	Q _{CO2} =100-460 mL/h Verimlilik (μmol/s) artmış	önemsiz
Van Eijs et al 1988	<i>(M.miehei)</i> Lipaz	izoamil alkol + etil asetat	sürekli	V _{CO2} =0.3-1.3 cm/s Tepkime hızı artmış	önemli
Miller et al 1991	<i>R. arrhizus</i> Lipaz (cam boncuklara tutuklama)	trilaurin + miristik asit	sürekli dolgulu yatak	V _{CO2} =0.06-0.24 cm/s Tepkime hızı değişmemiş	önemsiz

Süperkritik CO₂'de enzim aktivitesine DKA'nın etkisi kesikli sistemde de çalışılmıştır. Chulalaksananukul et al (1993), lipaz katalizli jeranil asetat sentezinde, esterleşme hızına karıştırma hızının etkisini araştırmışlardır. 200-500 rpm karıştırma hızı aralığında tepkime hızında önemli bir değişme gözlenmemiştir. Benzer gözlemler, karıştırmanın çok iyi olduğu bir reaktörde, etanol ile oleyik asitin lipaz katalizli esterleşmesi çalışmasında da gözlenmiştir (Marty et al 1992). Dumont et al (1992), heksanda ve süperkritik CO₂'de etanol ile miristik asitin esterleşmesinde, karıştırıcı hızını 200rpm'den 500 rpm'e değiştirmişler ve hızda bu değişime bağlı olan bir etki gözlememişlerdir. Bu deneyler süperkritik akışkanlarda pek çok enzim için dış kütle aktarım etkilerinin önemli olmadığını göstermektedir.

Farklı gözenek boyutları olan tutuklanmış enzimler ya da farkedilir gözeneklilikleri olan serbest enzimlerin kullanıldığı çalışmalar, iç difüzyon kısıtlamaları (İDK) hakkında bilgi sağlayabilir. Steytler et al (1991), süperkritik CO₂'de bütülaurat sentez hızına, enzim (lipaz) tutuklama desteği için kullanılan cam boncukların boyutlarının etkisini incelemişlerdir. İki farklı cam boncuk boyutunda, tepkime hızında değişim olmamıştır (çizelge 2.11.). Dumont et al (1992), iç difüzyonda kinetik ve difüzyon terimlerinin her ikisinin de etkisini içeren, Thiele modülünü ($\phi < 1$ ise tepkime difüzyon kontrollü değildir) kullanarak, iç difüzyonun etkisini araştırmışlardır. Çözücü yığınının enzime olan kütle aktarımı, süperkritik CO₂'de heksandakinden daha hızlı olmuştur. Erickson et al (1990), süperkritik CO₂'de palmitik asit ile trilaurin esterleşme tepkimesi için, Thiele modülünü ve Damköhler sayısını (Da, tepkime hızının dış difüzyon hızına oranı) belirlemişler ve iç difüzyon kısıtlamasının olmadığını göstermişlerdir (çizelge 2.11.).

Çizelge 2.11. Farklı süperkritik akışkan sistemlerinde iç kütle aktarım (İKA) kısıtlaması

Kaynak	Enzim	Substratlar	Sistem	Bulgular	İKA
Erickson et al. 1990	<i>R. arrhizus</i> (diatome)	laurin+palmitik asit	kesikli	$\phi=10^{-2}$ $Da=10^{-5}$	önemsiz
Steytler et al 1991	Candida LipazB (cam boncuk)	bütanol+laurik asit	kesikli dolgulu yatak	$d_p=1$ ve 3mm (boncuk) tepkime hızı sabit	önemsiz
Miller et al 1991	<i>R. arrhizus</i> (cam boncuk)	trilaurin+miristik asit	sürekli dolgulu yatak	$\phi=10^{-4}$	önemsiz
Dumont et al 1992	<i>M. miehei</i> (Lipozyme TM) Duolit	etanol+miristik asit	kesikli	$\phi_{\text{hekzan}}=5.4$ $\phi_{\text{SCCO}_2}=1.8$	önemli
Bernard et al 1996	<i>M. miehei</i> (Lipozyme TM) Duolit	etanol+miristik asit	kesikli	$d_p=181-464\mu\text{m}$ hekzan ve SCCO ₂ $d_p>310$ için $\phi > 1$	$d_p > 310$ önemli

$$Da = \frac{\text{Maksimum tepkime hızı}}{\text{Maksimum kütle aktarım hızı}} = \frac{V_{\text{maks}}}{k_s C_0} \quad \phi = \frac{\text{Tepkime hızı}}{\text{İç kütle aktarım hızı}} = \frac{r_0}{D_e C_0} \left(\frac{V_p}{A_p} \right)^2$$

2.4.7. Suyun etkisi

Enzimler ortamda hiç su olmaması durumunda aktivite gösteremezler. Oysa katalitik olarak aktif olması için, bir enzimin gereksinim duyduğu su miktarı oldukça düşüktür (Zaks ve Klivanov 1984, 1985). Susuz sistemlerde, enzimin katalitik olarak aktif formunu koruması için gereken su miktarı, enzim molekülü başına tek tabaka suya eşit ya da daha azdır. Bu temel su molekülleri, proteinin doğal yapısını koruyan, kovalent olmayan çok sayıda iç etkileşimlerde görev yapar. Enzim çevresindeki temel su molekülleri sıyırılırsa, enzim sıklıkla aktivitesini kaybeder.

Susuz ortam, enzim molekülüne bağlı olan suyu sıyrabilir ve bu olay çözücünün türüne bağlıdır (Zaks ve Klivanov 1988). Hidrofilik çözücüler, enzim molekülünden temel suyu daha fazla sıyırma eğilimindedir. Bu olay, değişik organik çözücülerde metil metakrilat (MMA) ve 2-etil hekzanolün lipaz (*Candida cylindracea*) katalizli transesterleşme tepkimesi ile açıklanabilir (çizelge 2.12.). Lipaz, hidrofobik bir çözücü olan hekzanda, hidrofilik bir çözücü olan bütil eterdekenden daha yüksek aktivite göstermiştir. Tepkime tamamlandıktan sonra, her bir çözücüdeki su derişimindeki artma, hekzanda 0, bütil eterde 1.5 μ L/mL çözücüdür. Her iki durumda da tepkimeden önce enzimdeki su derişimi, 60 μ g/mL toz enzimdir. Bu nedenle bütil eter kullanımında suyun tümü enzimden çözücü faza dağılmıştır (Kamat et al. 1992, 1995).

Yukarıda anlatılan temeller, süperkritik akışkan sistemlerine uygulanabilir. Pek çok lipaz, süperkritik CO₂'e su eklenmesine bağlı olarak aktivitelerini artırır. Optimum aktivite için gerekli olan su miktarı, destek türüne, tepkimeye ve çözücüye bağlıdır.

2.4.7.1. Tutuklama destek maddesinin optimum su miktarına etkisi

Enzimin tutuklaması için kullanılan desteğin yapısı, suyun, enzim, çözücü ve destek arasında dağılımını belirleyen önemli bir parametredir. Farklı gözenek büyüklüğü ve yüzey alanları nedeniyle adsorpsiyon izotermi her destek için farklı olmaktadır. Örneğin Duolit ve Celit

farklı yüzey alanı ve gözenek büyüklüklerine sahiptirler (çizelge 2.13.) ve destek olarak kullanıldıklarında, aynı aktiviteyi sağlamak için gerekli olan su miktarı farklı olacaktır (Chi et al 1988). Farklı desteklere tutuklanmış olan enzimlerin kullanıldığı çalışmalar, çok değişik optimum su derişimlerini göstermektedir (çizelge 2.14.).

Çizelge 2.12. Farklı organik çözücülerde lipaz (*Candida cylindracea*) aktivitesi (Kamat et al 1992).

Çözücü	Dielektrik sabiti	Başlangıç hızı mM/h.mg
Dodekan	2.01	0.234
Dekan	1.99	0.078
Nonan	1.97	0.078
Oktan	1.95	0.240
Heptan	1.93	0.081
Hekzan	1.89	0.193
Sikloheksan	2.02	0.051
Pentan	0.84	0.223
Bütil eter	3.12	0.170
Toluen	2.38	0.081
Bütil asetat	5.01	0.044
Propil asetat	5.50	0.009
Metilen klorür	9.08	0.008
Metil asetat	6.68	0.001

Çizelge 2.13. Tutuklama desteklerinin özellikleri(Chi et al 1988).

Destek	Yüzey alanı, m ² /g	Gözenek boyutu, Å
Duolit	200	100-600
Celit	1.5	18 300

Enzim aktivitesi, genellikle süperkritik akışkanlardaki su içeriğinin artmasıyla maksimum aktiviteye ulaşmaya kadar artar. Transesterleşme tepkimelerinde, su içeriği optimum miktarı aşarsa, hidroliz tepkimesi baskın olur ve istenen tepkime hızı düşer. Ayrıca optimum su içeriğinin üzerinde, enzim süspansiyonları birleşirler (aggregate) ve enzimle çözücü arasındaki temas azalır ve böylece enzimin etkinliği düşer (Kamat et al. 1995).

2.4.7.2. Tepkime türünün optimum su miktarına etkisi

Tepkime türü ve tepkime ortamı da enzim aktivitesinin su içeriğine bağlılığını belirlemede önemlidir. Örneğin süperkritik floroforunda MMA ve 2-etil hekzanolün lipaz katalizli transesterleşme tepkimesinde, %0.25 su eklenmesiyle, enzim aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir (Kamat et al 1993b). Ayrıca Miller et al (1991) gözenekli aminopropil cam boncuklara (50µm çap, 75 Å gözenek büyüklüğü) tutuklanmış olan lipazın (*Rhizopus arrhizus*), trilaurin ile miristik asit esterleşmesi için, süperkritik CO₂'de, (T=308 K P=9.5 MPa) suyla doygun süperkritik CO₂'dekinden daha yüksek aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Benzer gözlemler, süperkritik CO₂'de nonanol ve etil asetat arasındaki lipaz (*Mucor miehei*) katalizli transesterleşme tepkimesi için de belirtilmiştir (Vermue et al 1992). Anyonik reçineye tutuklanmış olan lipaz (*Mucor miehei*) katalizli etanol ve miristik asit esterleşmesi için maksimum tepkime hızı, süperkritik CO₂ ortamında (T=323K ve P=12.5MPa) önemli miktarda su (25-55 mM) olduğu zaman elde edilmiştir (Dumont et al. 1992).

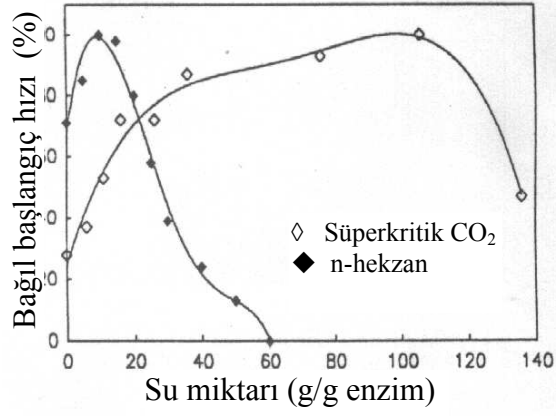
2.4.7.3. Çözücü ortamının optimum su miktarı

Süperkritik akışkan ortamında gerçekleşen enzimatik tepkimeler için ortam su içeriği önemli bir değişkendir ve tepkime hızını etkileyebilir. Başlangıçta suyun az miktar eklenmesi, enzimin aktif olması için, mikrosulu bir çevreye gereksinim duyması nedeniyle tepkimeyi hızlandırır (şekil 2.15.). Mikrosulu çevrenin oluşması için, gerekli olandan daha fazla su eklenmesi, şekil 2.15'den görüldüğü gibi, hızda azalmaya neden olur. Fazla su, enzim etrafında, girdi ve ürünlerin akışkan fazından enzim yüzeyine aktarımını engelleyen sulu bir tabakanın oluşmasını sağlayabilir. Su miktarı fazla olduğunda, hidroliz meydana gelebilir; enzim partikülleri birleşerek çözücü-enzim teması azalır ve enzimin etkinliği düşer (Mesiano et al. 1999, Marty et al. 1990).

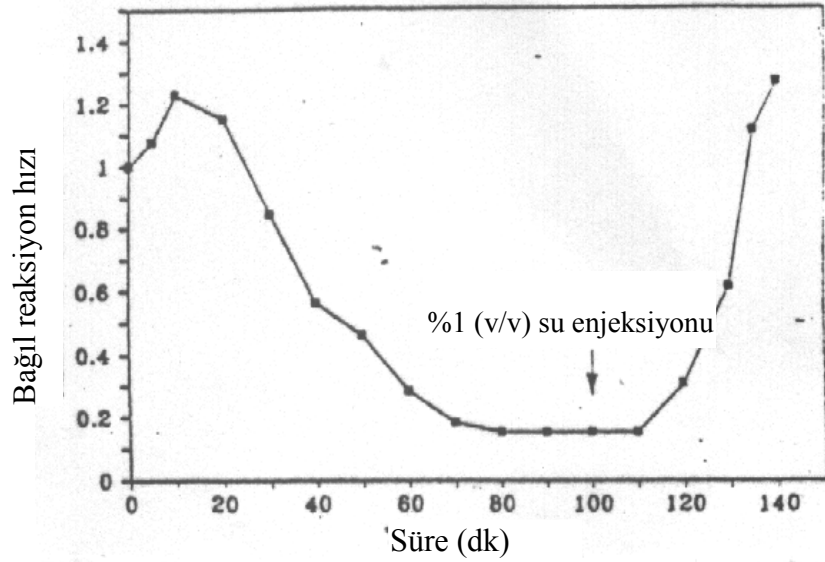
Randolph et al (1988b), sürekli reaktörde kolesterolün oksidasyonunu, kuru CO₂ kullanarak incelemişlerdir. 1 saat sonunda aktivite %20'ye düşmüştür (şekil 2.16). Ortama %1 (v/v) su eklenmesi ile enzim, başlangıç aktivitesini kazanmıştır. Bu nedenle gözlenen aktivite kaybı tersinir olmuştur.

Çizelge 2.14. Farklı tutuklama destekleri ve tepkimeler için gerekli olan su miktarı

Kaynak	Enzim	Destek	Tepkime	Su miktarı
Randolph et al. 1988b	(<i>G. chrysocreas</i>) kolesterol oksidaz	cam boncuk	kolesterol oksidasyonu	%1 (v/v)
Yu et al. 1992	(<i>C. cylindracea</i>) lipaz	Celit 545	etanol+oleik asit	1mLsu/g enzim
Marty et al. 1990, 1992	(<i>Mucor miehei</i>) Lipaz	makrogözenekli anyonik reçine	etanol+oleik asit jeraniol+ etil asetat	%10, (77mM) (0.1 g su/g destek)
Chi et al 1988	(<i>Mucor miehei</i>) Lipaz	Duolit	triolein+stearik asit etanol+oleik asit	%1 (0.01 g su/g destek) %10 (0.1 g su/g destek)
Dumont et al. 1992	(<i>Mucor miehei</i>) Lipaz	anyonik reçine	etanol+miristik asit	25-55 mM (%0.11-0.242 g su/g süperkritik CO ₂)



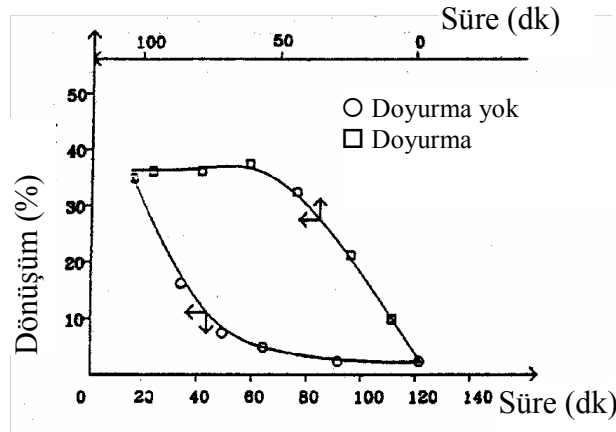
Şekil 2.15. Süperkritik CO₂ ve hekzan ortamında, etanol ve oleyik asit arasında lipaz (*Mucor miehei*, Lipozyme™) katalizli esterleşme tepkimesi başlangıç hızına su miktarının etkisi (Marty et al 1990)



Şekil 2.16. Süperkritik CO₂ ortamında kolesterol oksidaz ile kolesterolün sabit yatak reaktörde oksidasyon hızına suyun etkisi (Randolph et al. 1988b)

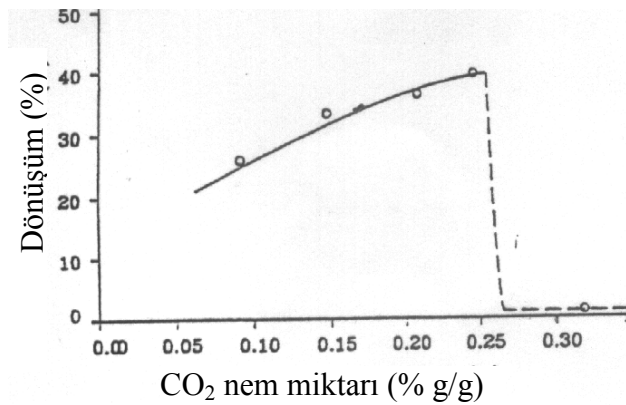
Dumont et al (1993), etil miristatın lipaz katalizli sürekli üretiminde, kuru ve suyla doygun CO₂ kullanımının, dönüşüme etkilerini incelemişlerdir. Kuru CO₂ kullanımında, 2 saat sonunda aktivite tamamen kaybedilmiş (şekil 2.17.), ortama suyla doygun CO₂ gönderildiğinde, dönüşüm başlangıç değerine ulaşmıştır. Tersinir aktivite kaybı olmuştur. Aynı tepkime için, süperkritik CO₂'deki nem miktarının, dönüşüme etkisi incelenmiştir. Bunun için suyun akış hızı değiştirilerek deneyler yapılmıştır. Dönüşüm sıfıra yaklaşınca (şekil 2.18.), kuru CO₂ gönderilerek yataktaki su uzaklaştırılmış ve sonra substratlar ile %0.15 su içeren CO₂ gönderilmiş, dönüşümde hiç artma gözlenmemiş, tersinmez aktivite kaybı olmuştur.

Tersinir denatürasyon



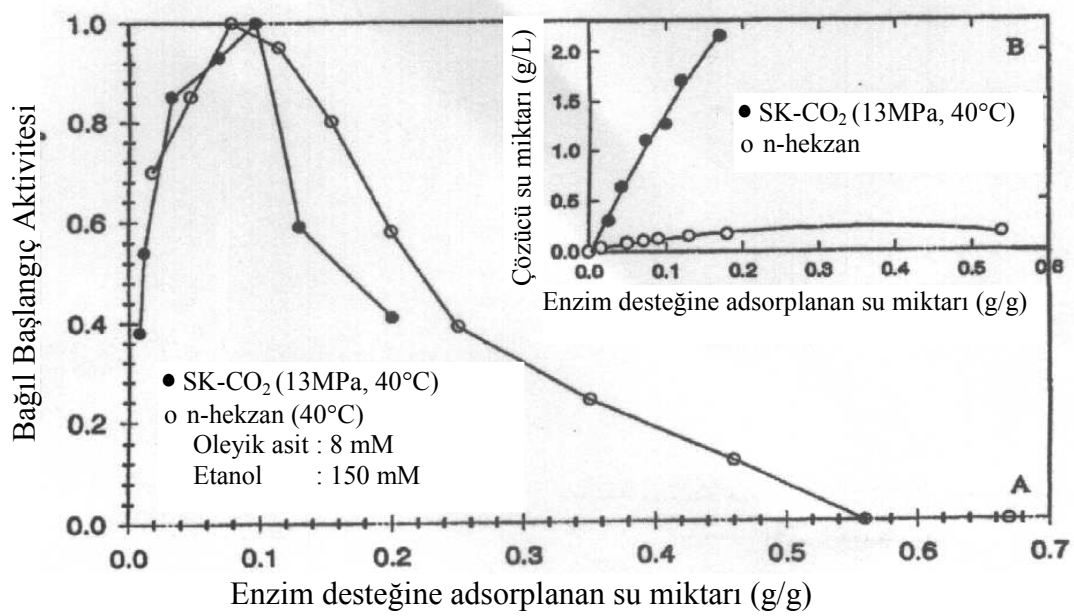
Şekil 2.17. Lipaz katalizli sürekli etil miristat üretiminde, kuru ve su ile doygun CO₂ kullanımında dönüşümün süre ile değişimi (Dumont et al 1993)

Tersinmez denaturasyon



Şekil 2.18. Lipaz katalizli sürekli etil miristat üretiminde, CO₂'deki nem miktarının dönüşüme etkisi (Dumont et al 1993)

Marty et al (1992), hızı etkileyen su miktarının, katı enzim fazındaki su miktarı olduğunu, süperkritik akışkan fazındaki su miktarının tepkime hızını etkilemediğini belirtmişlerdir. Su için adsorpsiyon izotemlerini ölçmüşler; sonra enzim fazındaki ve süperkritik akışkan fazındaki su miktarını grafiğe geçirmişlerdir (şekil 2.19. A). Tutuklama desteğinin optimum su içeriği, n-hekzan ve süperkritik CO₂'deki tepkime için aynı olmuştur. Tutuklama desteğinin optimum su içeriğine ulaşmak için gerekli olan çözücü su yüklemesi, bu iki çözücü için çok farklıdır. Enzimin mikrosulu çevresinde, istenen optimum su miktarını elde etmek için, su çözünürlüğünün yüksek olduğu süperkritik akışkanlara, hidrofobik olan süperkritik akışkanlardan daha fazla su gerekmektedir. (şekil 2.19. B)



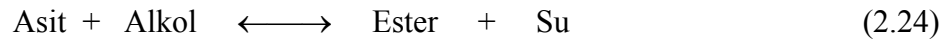
Şekil 2.19. A) Hekzan ve süperkritik CO₂ (13 MPa, 40°C) ortamında *Mucor miehei* (LipozymeTM) tutuklanmış lipaz hızı, B) Enzimatik destek ve çözücü (Hekzan (40°C) ve süperkritik CO₂ (13 MPa, 40°C)) arasında suyun adsorpsiyon izotemleri (Marty et al 1992)

Biyokataliz için gerekli olan su miktarı, enzim partiküllerine bağlı olan su miktarı olarak ifade edilirse, optimum su aktivitesi, kullanılan çözücünden bağımsız olarak bulunur (Zaks ve Klibanov 1988). Hidrofobik ve hidrofilik çözücülerde gerekli olan su miktarındaki farklılığı açıklamak için alternatif bir yol, sabit su aktivitesinin (a_w) kullanılmasıdır. Enzim partikülleri tarafından bağlanan su, a_w 'nin fonksiyonudur (Halling 1990) ve reaksiyon hızı a_w ile tahmin edilir. Hidrofilik çözücüler, aynı su aktivitesine ulaşmak için daha fazla suya gereksinim duyarlar (Rao et al. 1992). Sabit su aktivitesini sağlamak için su, ya direkt olarak tepkime ortamına eklenir ya da indirekt bir kaynak olarak tuz hidratları eklenebilir. Steytler et al (1991), süperkritik CO₂'de lipaz katalizli bütül laurat üretimini incelemişlerdir. Enzim aktivitesine suyun etkisini incelemek için, 1) suyu direkt olarak enzime eklemişler, 2) reaktöre substrat ve enzim konduktan sonra yatağın üzerine su eklemişlerdir. Enzim ile suyun direkt olarak temas etmemesi durumunda daha yüksek aktivite gözlemişlerdir.

Rao et al (1992), konvansiyonel çözücülerde, dodekanol ve dekanolik asit esterleşme tepkimesinde lipaz aktivitesinin $a_w=0.5$ değerinde optimum olduğunu göstermiştir. Enzim aktivitesinin su aktivitesine bağımlılığı, enzim ve desteğin özellikleriyle ilişkilidir.

2.5. Lipaz Katalizli Tepkimelerde Su Aktivitesi (a_w)

Hidrolitik enzimler, reaksiyon dengesi yüksek verimle ürün oluşumu yönüne kayıyor ise sentez reaksiyonlarını gerçekleştirmek için kullanılabilirler. Reaksiyonun susuz ortamda gerçekleştirilmesi ile denge ürün oluşum yönüne kayar.



Esterleşme reaksiyonları sırasında oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılması ile verim artırılabilir. Literatürde suyun uzaklaştırılması ile ilgili olarak, üst boşluktan boşaltma (headspace), "pervaporation", tuz hidratları, doygun tuz çözeltileri, adsorpsiyon, reaksiyon ortamından inert gaz geçirilmesi gibi çeşitli yöntemler yer almaktadır. Bu

yöntemler hidroliz reaksiyonlarını tersine döndürmek için kullanılmaktadırlar. Bunun yanı sıra, sistemin su aktivitesi ortamdan suyun uzaklaştırılmasına gerek kalmadan belli bir seviyede de tutulabilir (Rosell et al. 1996).

Susuz ortamda bulunan az miktarda su, enzimin dinamik ve katalitik özelliklerini etkileyen en önemli parametredir. Çok sayıda organik reaksiyon karışımında biyokatalizörler kullanılırken sistemde sabit kalan su miktarı önemlidir. Genelde, ortam kurutulduktan sonra, reaksiyon hızı düşüktür ya da sıfırdır; bir miktar su varlığında ise hız artar. Reaksiyon karışımının su içeriğinin artırılmasıyla reaksiyon hızı bir maksimuma ulaşır, daha sonra düşer. Başlangıçtaki yükselme enzim aktivitesi için gerekli olan temel suyun az miktarını gösterir; daha sonraki düşme ise, katalizör partiküllerinin birbirine kenetlenmeleri, azalan arayüzey alanı ve kısıtlanan kütle aktarımından dolayıdır (Valivety et al. 1992a).

Biyokatalizör aktivitesindeki değişim genellikle tüm reaksiyon karışımının su içeriğinin fonksiyonu olarak verilir. Bu durumda su içeriği sabit, diğer parametreler değiştirilmektedir. Reaksiyon sistemlerinde iki ya da daha fazla fazların olması, bu fazların her birinin bir miktar su içermesi ve bu fazlar arasında suyun dağılması nedeniyle parametre olarak toplam su içeriği bilgi verici değildir. Bir miktar su biyokatalizör etrafında daha polar bir fazda bulunurken (seyreltik sulu çözelti oluşturabilir), bir miktar su da organik fazda tek tek moleküller ya da küçük oligomerler olarak çözünür. Fazların bileşimini değiştirmeksizin bağlı (relatif) hacimlerindeki değişimler, toplam su içeriğini etkileyecek, biyokatalizörün mikroçevresini ya da biyokatalizör davranışını etkilemeyecektir. Bu durumda optimum aktivite (ya da diğer özellikler) için kritik su içeriğinin, enzim, destek ya da çözücü değiştirildiğinde değişmesi beklenir (Valivety et al. 1992a, 1992b, Halling 1994).

Zaks ve Klibanov (1988), sistemdeki toplam su içeriğinden çok enzime bağlı olan suyun katalitik aktiviteyi belirlediğini açıklamışlardır. Değişik organik çözücüleri (kritik

toplam su içerikleri oldukça farklı olan), içeren sistemlere aynı miktarda su eklendiği zaman enzimle birleşen su miktarı değişmiştir. Daha polar çözücüler daha fazla su çözünürlüğüne ve daha yüksek kritik su içeriklerine sahiptirler. Bu çözücüler enzimden “temel suyu sıyırma” için daha fazla eğilime sahiptirler. Genellikle daha polar çözücü daha fazla suyu çözeltide tutacak ve böylece su enzime bağlanmak için kararsız olacaktır. Enzim tarafından bağlanan su sistemdeki a_w 'nin fonksiyonudur (Valivety et al. 1992a, 1992b, Halling 1994).

Susuz ortamdaki su ilişkileri derişimle değil, termodinamik su aktivitesi (a_w) ile daha iyi açıklanabilir. Saf su için $a_w=1$ dir. a_w değeri 0-1 aralığında değişir, su derişiminin sayısal değerine genellikle yakın değildir. Bir reaksiyon karışımında, fazların su derişimlerinin genellikle farklı olmasına karşın tüm fazların a_w değerleri dengede aynı olacaktır.

İçerisinde çözülmüş su, organik çözücü, çözücü içerisinde dağılmış olan enzim tozları ve buhar bulunan kapalı bir kaptaki, su tüm sistem boyunca kendiliğinden dağılacaktır. Bir süre sonra, sistem dengeye ulaşacaktır. Her bir fazda (hidrate olmuş olan enzim, çözücü ve buhar) su derişimleri farklı olmasına karşın a_w değerleri aynı olacaktır. Böylece hidroliz ve sentez reaksiyonları arasındaki enzim hidrasyonu ve kütle gibi denge etkileri a_w 'ye bağlı olacaktır. Daha basit olarak, a_w bir çevre için ‘su tercihinin ölçümü’ olarak dikkate alınabilir. Yüksek a_w değerine sahip olan bir ortamda su molekülleri, daha düşük a_w değerindeki ortama hareket eder. Bunun sonucunda ortamdaki a_w değerleri arasındaki fark dengeye ulaşınca kadar düşer (Halling 1994, Bell et al.1995).

Su aktivitesi aşağıdaki eşitlik ile verilir.

$$a_w = \gamma_w X_w \quad (2.25)$$

Burada γ_w , çözücü içinde suyun aktivite katsayısını, X_w ise çözücü içinde suyun mol kesrini gösterir.

2.5.1. Su aktivitesinin ölçülmesi

Reaksiyon ortamındaki a_w 'nin ölçümü

1. Nem sensörleri ($a_w = P_i / P_i^0$, P_i suyun kısmi basıncını, P_i^0 ise saf suyun aynı sıcaklıktaki doymuş buhar basıncını gösterir).
2. Su derişimi - a_w arasındaki kalibrasyon grafiğı
3. Buhar-sıvı denge verileri

kullanılarak gerçekleştirilebilir.

2.5.2. Su aktivitesi kullanımının avantajları

Su aktivitesi kullanımının avantajları aşağıda sıralanmıştır (Halling 1994, Halling and Valivety 1992).

1. Tüm fazlarda (katı, sıvı ve gaz) a_w değerinin aynı olması nedeniyle tüm sistemin su aktivitesi, en uygun olan fazda belirlenebilir. Gaz faz için su sensörleri kullanılabilir.
2. Çözücü ve enzim arasındaki su dağılmasının indirekt etkileri ortadan kaldırılır.
3. Hidrolitik dengeye suyun kütle hareketi etkilerini belirler.
4. Çözücü, substrat, destek ve enzim derişiminin değıştirilmesi ile, bağlanan su miktarı ile enzim aktivitesi ve tepkime hızı tahmin edilebilir.
5. Deney düzeneğı, su aktivitesini ya da derişimini ölçmek için uygun olmadığında, kullanılan a_w değerini sabit tutan yöntemler (doymuş tuz çözeltisi ya da hidrate tuz çifti) kullanılabilir.
6. Seyreltik sulu fazın olup olmadığını gösterir
7. Dengedeki gaz fazın bağıl nemi ile ölçülebilir ve kontrol edilebilir.

2.5.3. Su aktivitesinin (a_w) ayarlanması ya da kontrol edilmesi

Aşağıda belirtilen yöntemler kullanılarak a_w değeri ayarlanmakta ya da kontrol edilmektedir (Halling 1994):

- Membran reaktör kullanılması ve "pervaporation"
- Reaksiyon ortamına ön dengeye getirilmiş olan silika jel eklenmesi
- Kuru gaz (azot) geçirme (sparging)
- Su tamponu olarak görev yapan tuz hidratları kullanılması (a_w 'nin sürekli kontrolü).
- Doymuş tuz çözeltileri ile her iki fazın ön dengeye getirilmesi (başlangıç a_w değerinin ayarlanması) ya da reaksiyon ortamına daldırılan bir silikon tüp içinden doymuş tuz çözeltilerinin geçirilmesi ile (a_w 'nin sürekli kontrolü).
- a_w sensörlerini kullanılması ile reaktörün üst boşluğundan kontrollü kurutma

Gaz faz için su sensörleri kullanımı uzun süre alır ve su aktivitesi sürekli gözlenemez. Daha basit ve daha uygun bir yöntem, su derişimini ölçerek su aktivitesini belirlemek ve su aktivitesine karşı su içeriği kalibrasyon eğrisini kullanmaktır. Su aktivitesi aynı zamanda buhar-sıvı denge verilerinden de belirlenebilir. Bir sistemde a_w değerini ölçmek, sabit bir değerde tutmak ya da kontrol etmek için kullanılan yöntemler Halling (1994) tarafından özetlenmiştir. Bu yöntemler arasında sabit hidrasyonu olan doymuş tuz çözeltileri (çizelge 2.15.) ve hidrate tuz çiftleri (çizelge 2.16.) kullanımı yaygındır. Doymuş tuz çözeltileri ile ya başlangıç su içeriği belli bir değere ayarlanabilir (Rosell et al. 1996, Halling 1990, 1994, Valivety et al. 1992b,c, Rosel and Vaidya 1995, Goderis et al. 1987, Dossat et al. 1999, Svensson et al.1994, Wehtje et al. 1997a, Hallberg et al.1999) ya da sabit bir değerde tutulabilir (Svensson et al.1994, Ljunger et al. 1994, Wehtje et al. 1997b, Ujang and Vaidya 1998). Hidrate tuz çiftlerinin reaksiyon ortamında kullanımı ile, tepkime süresince su oluşmasına karşın ortamın su aktivitesi aynı değerde sabit kalır (Halling 1994, Valivety et al. 1992b, Khul and Halling 1991, Khul et al. 1992, Sjernnes et al. 1992, Yang et al. 1992, Kivittingen et al. 1992, Zacharis et al. 1997, Kim et al.1998, Wu and Liu 2000).

2.5.4. Su aktivite kontrolünün pilot ölçek için dezavantajları

Pilot ölçekte üretim için a_w kontrolünün bazı olumsuzlukları vardır. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

1. "Pervaporation" yöntemi, sistemde vakum uygulanması ve suyun yoğuşması için yoğuşturucuya gerek duyulması nedeniyle pahalıdır.
2. Tuz hidratlarının tamponlama kapasitesi düşüktür ve sıklıkla rejenerasyonları gerekir.
3. Doygun tuz çözeltileri kullanımında, silikon tüpün çözücü için direnci düşüktür ve geçirgenliği zayıftır.

Çizelge 2.15. Doygun tuz çözeltilerinin su aktiviteleri. (Condoret et al. 1997, Rossell et al. 1996, Ujang ve Vaidya 1998, Wehtje et al. 1997).

Dogun Tuz Çözeltisi	Su aktivitesi (a_w)
LiCl	0.11
LiBr	0.15
CH ₃ COOK	0.23
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.33
KCO ₃	0.43
Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.53
NaBr	0.57
CuCl ₂	0.67
NaCl	0.75
KCl	0.85
K ₂ SO ₄	0.97
K ₂ Cr ₂ O ₇	0.98

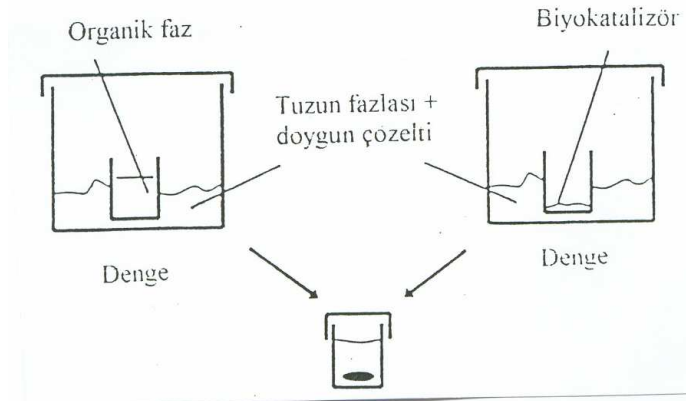
Çizelge 2.16. Hidrate tuz çifti çözeltilerinin su aktiviteleri. (Almedia et al. 1998, Halling 1992, 1994, Kwittingen et al. 1992, Zacharis et al. 1997).

HidrateTuz Çifti	Su aktivitesi (a_w)
NaI (2 / 0)	0.07
NaBr (2 / 0)	0.37
Na ₂ S ₂ O ₃ (5 / 2)	0.35
CuSO ₄ (3 / 1)	0.31
Li ₂ SO ₄ (1 / 0)	0.31
CH ₃ COONa (3 / 0)	0.34
Ba(OH) ₂ (8 / 1)	0.44
Na ₂ HPO ₄ . (2 / 0)	0.19
Na ₄ P ₂ O ₇ . (10 / 0)	0.56
Na ₂ HPO ₄ . (7 / 2)	0.69
Na ₂ HPO ₄ . (12 / 7)	0.90
Na ₂ SO ₄ . (10 / 0)	0.76

Parantez içindeki değerler tuzun her bir hidrate formundaki su molekül sayısını gösterir.

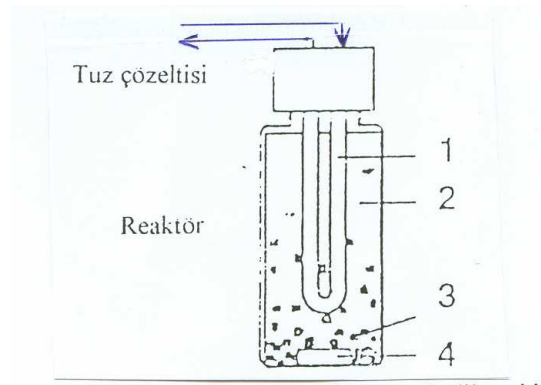
2.5.5. Doygun tuz çözeltileri ile a_w 'nin başlangıç değerinin ayarlanması ya da kontrol edilmesi

Bunun için enzim, çözücü ve substratlar ayrı ayrı ağzı açık kaplara konarak içinde a_w değerleri belli olan doygun tuz çözeltileri bulunan kapalı kaplar içinde buhar fazdan ön dengeye getirilirler (şekil 2.20). Bu yöntem ile sadece başlangıç a_w değeri ayarlanır. Bu yöntem başlangıç reaksiyon hızlarına a_w 'nin etkisinin incelenmesi için uygundur. Reaksiyon süresince su oluşması ile a_w değeri değişir.



Şekil 2.20. Doygun tuz çözeltileri ile organik faz ve biyokatalizörün sabit a_w değerinde ön dengeye getirilmesi

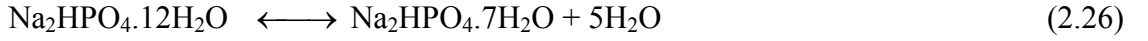
a_w 'nin sürekli olarak kontrolü için ayrı bir yöntem, doygun tuz çözeltisinin reaksiyon ortamına daldırılmış olan silikon tüp yardımıyla reaksiyon kabı boyunda sirküle ettirilmesidir (Wehtje et al 1997b). Reaksiyonda oluşan su, tüp duvarı boyunca difüzyonla uzaklaşır ve böylece kullanılan tuz çözeltisinin a_w değerinde denge sağlanır (şekil 2.21.).



Şekil 2.21. Doygun tuz çözeltileri ile a_w 'nin sürekli kontrol edilmesi için düzenek
1. Silikon tüp, 2. Reaksiyon ortamı, 3. Enzim, 4. Magnetik bar

2.5.6. Hidrate tuz çifti ile a_w 'nin sürekli kontrol edilmesi

Çizelge 2.16.'da verilmiş olan hidrate tuz çiftleri reaksiyon ortamına her bir hidrate formundan eşit miktarda alınarak direkt olarak katı formda eklenirler. Su tamponu gibi görev yapan tuz hidratlarının eklenmesiyle, enzimatik kataliz sırasında organik bir çözücü içinde sabit su aktivitesi sağlanabilir. Bir tuz hidratı susuz ortama konduğu zaman tuz, su aktivitesini koruyarak, hidrate formları arasında bir denge kurar. Örneğin $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ için aşağıdaki denge yazılabilir.

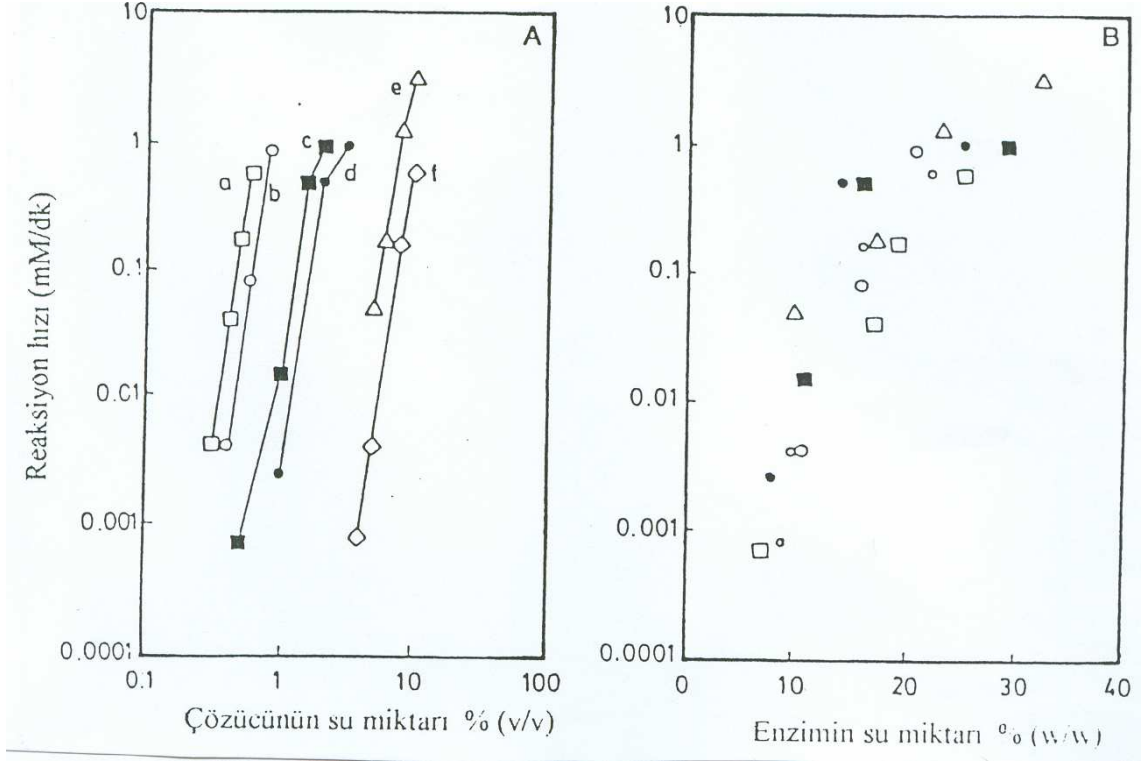


Hidrate tuz çiftinin fazla su içeren formu suyu salıverme, düşük su içeren formu ise suyu tutma eğilimindedir. Su aktivitesi tuzun türüne ve sıcaklığa bağlı olarak kontrol edilebilir, ancak çözücüden bağımsızdır.

2.5.7. Su aktivitesi ile ilgili araştırmalar

Enzimler için optimum aktivite farklılık gösterir. Örneğin, Trozinaz için $a_w = 0.7-1.0$, Lipaz için $a_w = 0.13-0.89$, Termolizin için ise $a_w = 0.3-1.0$ aralığındadır.

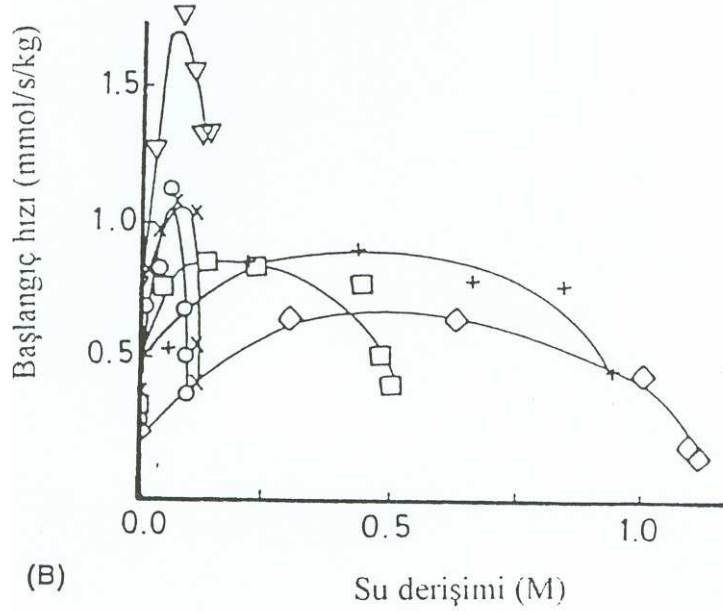
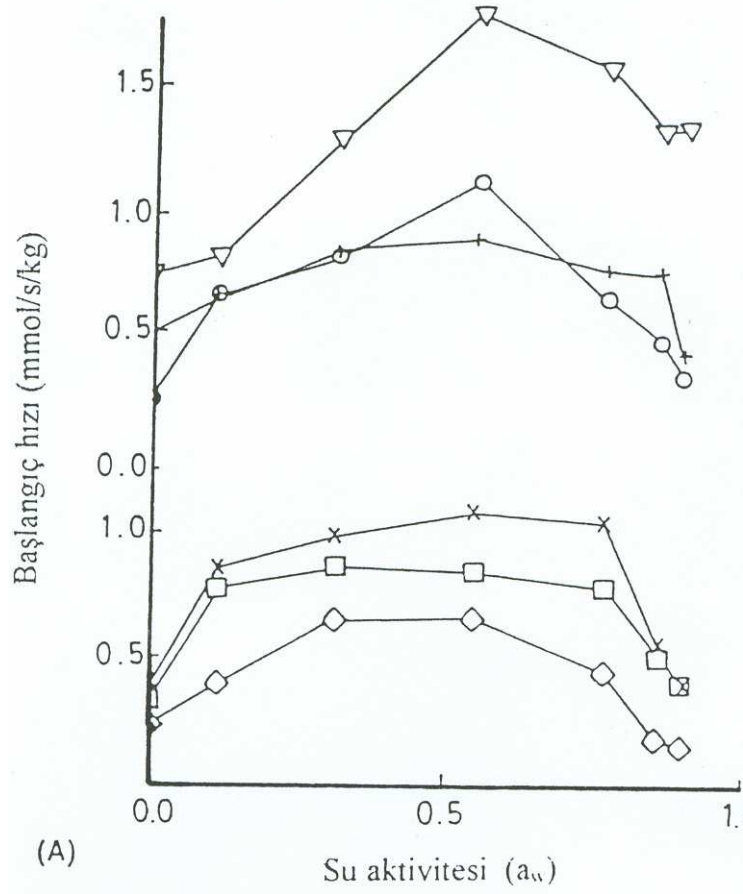
Maya alkol oksidaz enzim aktivitesine su içeriğinin etkisi, farklı çözücüler kullanılarak incelenmiş ve reaksiyon hızının değişimi şekil 2.22.(A, B)'de verilmiştir (Halling 1994). Çözücünün su içeriği dikkate alınırsa her çözücü için enzim aktivitesi farklılık göstermiştir (şekil 2.22.A). Enzime adsorplanan su grafiğe geçirildiğinde ise enzim aktivitesi incelenen çözücülerde benzer olmuştur (şekil 2.22.B).



Şekil 2.22. Maya alkol oksidaz enzim aktivitesine su içeriğinin etkisi
 A). Çözücü: a)etil eter, b)bütül asetat, c)etil asetat, d)n-oktanol,
 e)ter-amilalkol, f)2-bütanol. B) enzime bağlı olan suyun enzim aktivitesine etkisi

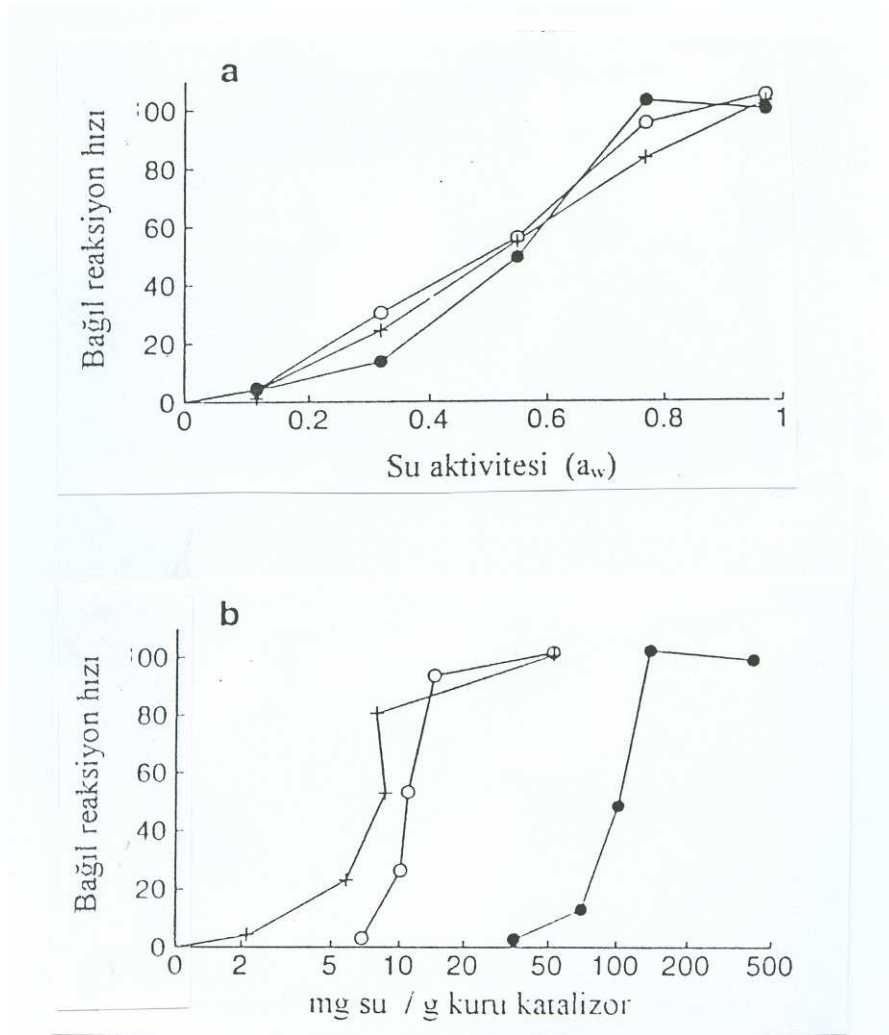
Dodekanol ve dekanolik asitin Lipozyme katalizli esterleşme reaksiyon hızının su aktivitesi ile değişimi şekil 2.23. A'da, organik fazda çözülmüş olan su derişimi ile değişimi ise şekil 2.23.B'de verilmiştir (Valivety et al. 1992b). Çözücü polariteleri çok farklı olmasına karşın, bütün çözücüler için 0.5 a_w değerinde maksimum hızlar elde edilmiştir. Şekil 2.23.B incelendiğinde, reaksiyon hızının su derişimi ile değişimi bütün çözücüler için benzer eğilimdedir; ancak elde edilen maksimum hız değerleri çözücünün hidrofobikliğine göre farklı su miktarlarına karşı gelmektedir. Reaksiyon hızını tahmin etmek ve düzenlemek için a_w oldukça kullanışlıdır.

Apolar çözücüler için enzim aktivitesi a_w ile korele edilir, polar çözücüler için ise kritik hidrasyon miktarını tahmin etmek hatalıdır.



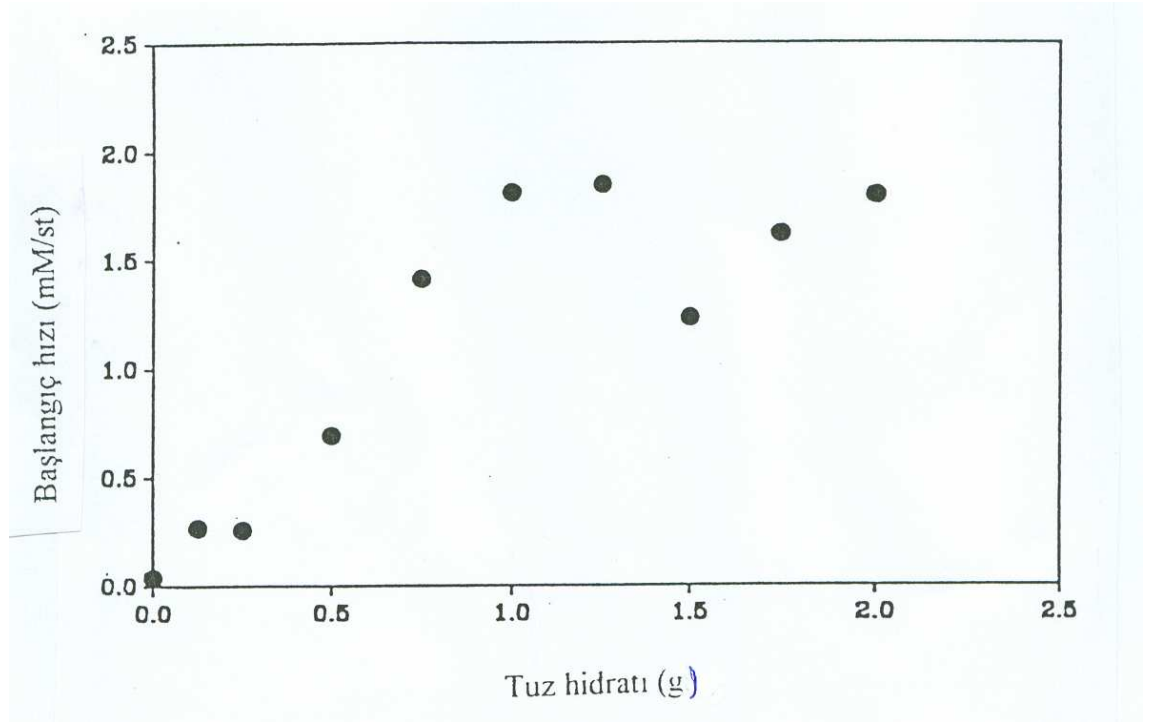
Şekil 2.23. Dodekanol ve dekanolik asitin Lipozyme katalizli esterleşme reaksiyon hızına farklı çözücülerin ve suyun etkisi A)Su aktivitesinin etkisi B) Organik fazda çözülmüş olan su derişiminin etkisi (∇ -hekzan, x-toluen, o-trikloroetilen, \square - isopropil eter, \diamond -pentanon, +-çözücüsüz ortam)

Optimum enzim aktivitesi kullanılan desteğe de bağlıdır. Destek ve enzimin su için yarışması durumunda, yorumların kolaylıkla yapılabilmesi için a_w kullanılır. Tutuklanmış *C. rugosa* lipazının katalitik aktivitesine destek türü ve suyun etkisi şekil 2.24.'de verilmiştir. Görüldüğü gibi su içeriği cinsinden ifade edilirse kullanılan desteğe göre enzim aktivitesi farklılık göstermektedir; su aktivitesi cinsinden ifade edilirse destek değiştirilse de enzim aktivitesinin a_w ile değişimi aynı olmaktadır (Valivety et al. 1992b).



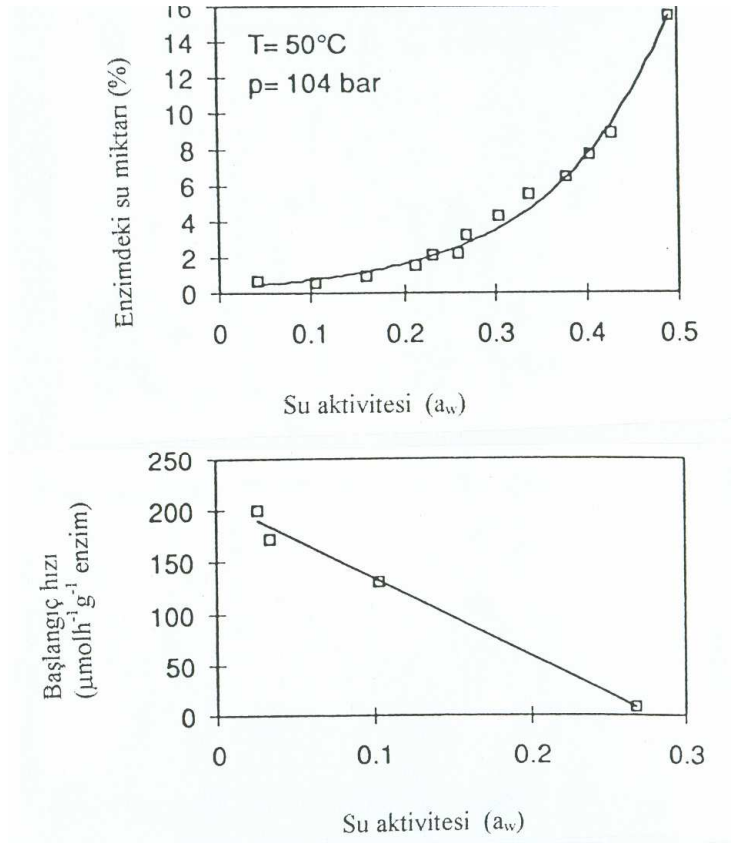
Şekil 2.24. Tutuklanmış *C. rugosa* lipazının katalitik aktivitesine destek türü ve suyun etkisi a) Su aktivitesi, b) Su içeriği, (+) poliamid, (o) polpropilen, (●) anyon değiştirici reçine (Valivety et al 1992b)

Süperkritik akışkan ortamında su aktivitesinin etkisinin incelendiği çalışmalar az sayıdadır. Kamat et al (1995), N-asetil-L-fenilalanin etil esterinin metanol ile süperkritik floroformda subtilisin katalizli transesterleşme hızına, tuz hidratının etkisini incelemişlerdir. Tepkime ortamına 35.17 MPa basınçta farklı miktarlarda $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ eklenmiştir. Şekil 2.25. subtilisin aktivitesinin, tuz hidratı derişiminin 1 g'a kadar artmasıyla arttığını, daha yüksek tuz derişimlerinde değişmediğini göstermektedir. 1 g'ın altındaki tuz derişimlerinde, sistem dengesi boyunca salınan su, süperkritik floroformu doyumak için yeterli olmayabilir. Floroformdaki optimum su aktivitesine, 1g tuz/40mL derişimin üzerinde ulaşılmıştır.



Şekil 2.25. Süperkritik floroformda N-asetil-L-fenilalanin etil ester ve metanolün subtilisin carlsberg (0.25 g/mL) katalizli transesterleşme başlangıç hızına hidrate tuz ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) eklemesi etkisi ($T=50\text{ }^\circ\text{C}$, $P=35.17\text{ MPa}$) (Kamat et al 1995).

Michor et al (1996), SC-CO₂'de suyun aktivitesinin belirlenmesi için Peng Robinson hal eşitliğini kullanmışlardır. Suyun buhar basıncını, süperkritik CO₂ su içeriğinin fonksiyonu olarak belirlemişlerdir. Ayarlanabilen içetkileşim parametresi (k_{ij}) ve karışma kuralları kullanmışlardır. 104 bar ve 50 °C için adsorpsiyon izotermi şekil 2.26.A'da verilmiştir. Önceleri toz halde bulunan enzim tanecikleri, 0.1 a_w değerinde birleşmeye başlamış ve a_w 'nin artan değerleri için de enzim taneciklerinin birleşmesi devam etmiştir. Su aktivitesinin reaksiyon başlangıç hızına etkisi şekil 2.26.B.'de verilmiştir. a_w 'nin artmasıyla reaksiyon hızı azalmıştır. Düşük su aktivitesinde aktivitede düşme olmaması nedeniyle süperkritik CO₂ enzimden temel suyu sıyırmamıştır. Maksimum aktivite için süperkritik CO₂ su içeriğinin çok düşük değerde tutulması gerekir.



Şekil 2.26. SC-CO₂'de izopropenil asetat ve mentolün esterase EP10 (*Pseudomonas marginata*) katalizli transesterleşmesi ($T=50^\circ\text{C}$, $P=100 \text{ bar}$)
A)Enzim su içeriği ve a_w arasındaki ilişki, B)Başlangıç hızına a_w 'nin etkisi

Almedia et al (1998), Kritik yakını CO₂, kritik yakını etan ve basınçlandırılmış propan ortamında n-bütil asetatın 1-hekzanol ile Novozym 435 katalizli reaksiyonunu incelemişlerdir. Kullanılan hidrate tuz çiftleri ve 35 °C'deki a_w değerleri şunlardır: Na₂HPO₄. 2/0 (0.19), Na₄P₂O₇. 10/0 (0.56), Na₂HPO₄. 7/2 (0.69) ve Na₂HPO₄. 12/7 (0.9). Ortama katılan tuzlar karışma problemlerine neden olmuş, tekrarlanabilen reaksiyon başlangıç hızları elde edilememiş ve suyun direkt olarak ortama eklenmesine karar verilmiştir. Başlangıç hızları a_w'den etkilenmemiştir.

2.5.8. Su aktivitesinin kinetik sabitlere etkisi

Valivety et al (1993), hekzan ortamında dodekanol ve dekanolik asitin esterleşmesi için kinetik parametrelere su aktivitesinin etkisini incelemişlerdir. Ping-Pong kinetik modelinin özeliği, ikinci substrat (dodekanol) ile ilk ürünün (su) yarışmalı inhibisyonudur. a_w'nin kinetik parametrelere etkisi çizelge 2.17.'de verilmiştir. Her iki enzim için su aktivitesinin artmasıyla K_{al} değeri artmıştır. Su, Ping-pong modelde normal ürün inhibitör olarak davranmaktadır. a_w'nin artmasıyla her iki enzim için V_m de artmıştır. V_m'nin artması, hidrasyonla enzim aktivitesinin artmasından dolayıdır. Suyun genel rolü, turnover sayısını (birim zamanda katalizör aktif konumu başına tepkimeye giren substrat molekül sayısı) artırarak enzim yapısını daha esnek ve hareketli yapmaktır. a_w'nin artmasıyla her iki enzim için K_{ac} değerleri de artmıştır. Asit, enzimin aktif konumlarına bağlanmada yarışmalı inhibitör gibi davranmıştır.

Çizelge 2.17. Dodekanol ve dekanolik asitin lipaz katalizli esterleşmesi için kinetik sabitler Valivety et al. (1993)

Enzim Kaynağı	a _w	V _m mmol/s/kg	K _{ac} (M)	K _{al} (M)
<i>Rh. miehei</i>	0.12	3.0	0.37	0.089
<i>Rh. miehei</i>	0.76	5.5	0.55	0.31
<i>C. rugosa</i>	0.32	0.59	0.13	0.027
<i>C. rugosa</i>	0.76	5.9	0.57	0.28

Bovare et al. (1993), serbest, celite tutuklanmış ve polietilen glikole (PEG) tutuklanmış lipaz ile farklı organik çözücülerde (n-oktan, benzen, toluen, karbon tetraklorür ve etilbenzen), n-oktanol ve vinil bütirat arasındaki transesterleşme tepkimesine su aktivitesinin etkisini incelemişlerdir. Michaelis Menten mekanizması için kinetik sabitler belirlenmiştir. Sonuçlar çizelge 2.18. ve çizelge 2.19.'da verilmiştir. a_w 'nin artmasıyla alkol için K_m değerleri artmıştır. Su açıl-enzim araürünü için bütirik asiti vermek üzere alkol ile yarışmaktadır. V_m ise a_w 'nin artmasıyla bir maksimumdan geçtikten sonra azalmıştır. Düşük a_w 'de aktivitenin düşük olması enzim hidrasyonunun düşük olmasından dolayıdır. Yüksek a_w değerinde V_m 'deki düşme, substrat doygunluk derişiminde V_m elde edilmesi nedeniyle, alkol ile suyun yarışmadığını gösterir. Bu davranış, su aktivitesinin fonksiyonu olarak fazların ara yüzeylerinin değişmesi ya da süspansen olan serbest ve tutuklanmış enzimin fiziksel olarak birleşmesinden dolayı olabilir (çizelge 2.18). PEG lipazı için farklı organik çözücülerde a_w 'nin etkisi çizelge 2.19'da verilmiştir. Bütün çözücülerde a_w 'nin artmasıyla hem alkol için K_m hem de V_m artmıştır. Sabit bir a_w değerinde çözücü hidrofobikliğinin artması ile K_m ve V_m azalmıştır. Bu durum organik faz ve enzim arasında substratın farklı dağılması (K_m değerleri için) ya da çözücünün yapısının bir fonksiyonu olarak PEG-lipazındaki birleşmenin farklı mertebelerde gerçekleşmesinden (V_m değerleri) dolayıdır.

Çizelge 2.18. Serbest ve Celite tutuklanmış lipaz ile toluen ortamında n-oktanol için V_m ve K_m 'e su aktivitesinin etkisi (Bovare et al. 1993).

a_w	Serbest Lipaz		Celite tutuklanmış lipaz	
	V_m (μmoldak^{-1})	K_m (mM)	V_m (μmoldak^{-1})	K_m (mM)
<0.1	0.013	18	0.153	15
0.11	0.036	29	0.295	30
0.38	0.036	32	0.280	32
0.53	0.025	39	0.104	38
0.84	0.023	64	0.085	59

Çizelge 2.19. Farklı organik çözücülerde PEG-lipazı ile n-oktanol için V_m ve K_m 'e su aktivitesinin etkisi (Bovare et al. 1993).

aw	Benzen		Toluen		Karbon tetraklorür		Etil benzen	
	V_m^a	K_m^b	V_m^a	K_m^b	V_m^a	K_m^b	V_m^a	K_m^b
<0.1	0.080	24	0.042	16	0.036	15	0.023	14
0.11	0.085	36	0.047	17	0.040	16	0.027	15
0.38	0.106	45	0.097	29	0.053	21	0.033	19
0.53	0.212	53	0.170	43	0.136	42	0.093	37
0.84	0.933	159	0.602	91	0.265	71	0.153	40

^a($\mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$), ^b mM

Matsumoto et al (2001), farklı organik çözücülerde benzil alkol ve oktanoik asit arasında serbest lipaz katalizli esterleşmeyi incelemişlerdir. Sikloheksan ortamında su aktivitesinin kinetik sabitlere etkisi Ping Pong Bi Bi mekanizması kullanılarak araştırılmış sonuçlar çizelge 2.20.'de verilmiştir. aw'nin artmasıyla V_m artarak maksimumdan geçmiş daha sonra azalmıştır. Asit ve alkol için K_m sabitleri ($K_{m_{ac}}$, $K_{m_{al}}$) aw'den etkilenmemiştir.

Çizelge 2.20. Sikloheksan ortamında benzil oktanoat üretiminde kinetik sabitlere aw'nin etkisi (Matsumoto et al. 2001).

aw	$K_{m_{ac}}$ ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$)	$K_{m_{al}}$ ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$)	$10^4 \times V_m$ ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$)
0.634	4.45	0.74	5.6
0.7528	3.62	2.04	8.09
0.8426	2.86	1.59	7.94
0.924	4.71	1.07	7.77
1.000	3.1	1.10	3.53

2.6. Jojoba

Jojoba (*Simmondsia chinensis* Scneider), kuzeybatı Meksika, güney Kaliforniya ve Güney Arizona'nın yarı kurak bölgelerine özgü uzun süre (en az 100 yıl, bazen 200 yıldan bile fazla) canlı kalabilen ağaç cinsinden bir çalıdır. Jojoba (hohoba olarak okunur), eşsiz özelliklere sahip olan jojoba yağı için yenilenebilir bir kaynak sağlamak üzere yetiştirilir.

Yerli Amerikalılar yüzyıllarca önce yaralarını ve vücutlarının ağrıyan bölgelerini tedavi etmek için jojoba tohumlarından yağı ekstrakte etmişlerdir. Doğal olarak meydana gelen ağaçların tohumlarının toplanması ve işlenmesi jojoba ehlileşmesinin başlangıcı olarak 1970'lerin başlarında göze çarpar. Buna ek olarak, 1971 yılında kadirga balığı (ispermeçet balinası, sperm whale) ürünlerinin önemini vurgulayan bildirimler, jojobanın keşfedilmesine olanak sağlamıştır. Jojoba yağı kozmetik ve diğer endüstrilerdeki uygulamalar için, balina yağından pek çok açıdan üstündür.

Günümüzde güneybatı Amerika'da 40,000 acre (1 acre =0.404 dönüm) jojoba ekilmektedir. Bütün dünyada jojoba üzerine olan ilginin artması, bu ağacın sert çöl koşullarında yaşayabilmesinden dolayıdır. Daha yaygın olan zirai ürünlerin yetişmeyeceği verimsiz alanların kullanımı, küresel (global) zirai ekonomiye büyük katkı sağlayacaktır.

En eski ticari jojoba işletmesi 1970'lerin sonlarında Amerika'da kurulmuştur. Günümüzde jojobanın üretimi yılda birkaç bin tondur. Dünyadaki başlıca üreticileri Amerika ve Meksikadır ve yağın önemli bir bölümü Japonya ve Avrupa'ya ihraç edilir Arjantin, Avustralya, Mısır, İsrail ve Peru'da da ticari olarak yetiştirilmektedir. Jojoba doğal ortamına benzeyen toprak ve iklim koşullarında dünyanın her yerinde bir ürün olarak incelenmektedir (Benzioni and Forti 1989, Foster et all 1983, Naqvi et all. 1988).

2.6.1. Jojobanın kullanım alanları

Jojoba tohumları, bitkinin temel depolama yağı (lipid) olan açık sarı renkli sıvı vaks ester içerir. Jojoba yağı, temel depolama lipidi olarak yağ üreten soya, mısır, zeytin ya da yer fıstığı gibi yaygın olan ve tirgliserit içeren yağlı tohum ürünlerine benzemez. Yetişkin bir jojoba tohumu (şekil 2.27) %3 nem, %15 protein, %50 sıvı vaks ester (yağ olarak bilinir), %5 simmondsin (jojoba kalıntıları hayvan yemlerinde kullanıldığında yapıda bulunan simmondsinden dolayı iştah kesiyor) ve karbonhidrat içerir. Jojoba yağının fiziksel özellikleri, yüksek viskoziye, yüksek parlama ve alevlenme noktası, yüksek dielektrik sabiti, yüksek kararlılık ve düşük uçuculuktur. Bileşimi 300 °C (570 °F) sıcaklığa kadar az etkilenir; bileşiminde 34 karbon atomlu düz zincirli esterden 48 karbon atomlu estere değişim olmakla birlikte baskın olarak düz zincirli C₂₀ ve C₂₂ yağ asiti ile yağ alkollerini ve iki doymamış bağı içerir; trans izomer içermez. Jojoba yağı bu özellikler sayesinde çok sayıda farklı kimyasal uygulamada için kullanılmaktadır. Ekstrakte edilen yağ, saf, toksik değil, biyolojik olarak bozonabilir ve küflenmeye karşı dirençlidir (Benzioni and Forti 1989, Foster et all 1983, Naqvi et all. 1988). Arizona çöllerinden elde edilen jojoba yağının temel bileşimi GLC analizi ile belirlenmiş; etanoliziz ürünleri, izole edilen yağ alkollerini ve izole edilen yağ asitlerinin metil esterleri analizlenerek, %30 C₄₀ vaks ester, eikosenil eikosenoat), %50 C₄₂ vaks ester (dokosenil eikosenoat ve eikosenil dokosenoat), %10 C₄₄ vaks ester (dokosenil dokosenoat); %6 oleyik asit (oktadekenoik asit, C_{18:1}), %35 eikosenoik asit (C_{20:1}), %7 dokosenoik asit (C_{22:1}), %22 eikosenol (C_{20:1}), %21 dokosenol (C_{22:1}) ve %4 tetrakosenol (C_{24:1}) içerdiği bulunmuştur (Miwa et all. 1971).



Şekil 2.27. Jojoba (*Simmondsia chinensis* Schneider) ve meyveleri

Günümüzde Amerika'da üretilen jojoba yağının çoğu kozmetik ürünlerde ve saç koruma ürünlerinde kullanılmak üzere yüksek fiyatta satılır. Amerika'da son yıllarda jojoba içeren 300 kadar ürün bulunmaktadır. Yağ kaynağı arttıkça ve fiyatlar düştükçe, ekonomik açıdan daha fazla kullanım mümkün olacaktır. Örneğin, jojoba yağının viskozite indeksi petrol yağından daha büyüktür; bu nedenle yüksek sıcaklık, yüksek basınç yağlayıcısı olarak kullanılabilir. Jojoba yağının kararlılığı elektronik ve bilgisayar endüstrisi için bu yağı çekici yapar. Jojoba yağı kolesterol ya da trigliserit içermemesi (oksidasyona karşı dirençli olması) ve normal metabolik yollar ile parçalanmaması nedeniyle, insanların tüketimi için düşük kalorili önemli bir yağ olabilir. Bu yağ antibiyotiklerin üretiminde köpük giderici madde olarak ve deri hastalıkları (çatlakları) için bir tedavi edici olarak kullanılabilir. Diğer önerilen kullanım alanları, mumlar, plastikleştiriciler, deterjanlar, ateş söndürücüler, dönüşüm yağı ve deri endüstrisidir (Benzioni and Forti 1989, Foster et all 1983, Naqvi et all. 1988).

2.6.2. Jojoba'nın yetiştirilmesi

Jojoba sürekli yeşil kalan kısa bir ağaç fundası ya da tipik olarak 3 - 4.5 m (10-15 ft) yüksekliğe kadar büyüyen küçük çok gövdeli bir ağaçtır (şekil 2.27). Yaprakları karşılıklı, oval ya da mızrak biçiminde gri yeşil renkte ve nem kaybını azaltan vaksli bir üst deriye (epiderm) sahiptir. Bitkinin toprak yüzeyinin derinlerinden mineralleri ve suyu sağlayan bir ya da birkaç uzun kökü (12 m'ye kadar) vardır. Jojobanın genellikle erkek ve dişi çiçekleri ayrı ağaçlar üzerindedir. Dişi çiçekler küçük, açık yeşil ve genellikle tek başlarına ya da düğümlerde (nod) birleşmiş haldedirler. Erkek çiçekler sarı, daha büyük ve birarada bulunurlar. Döllenme rüzgarla ya da böceklerle olur. Meyve üç adet tohumu saran yeşil bir kapsüldür. Olgunlaştığında (aşılardan 3 - 6 ay sonra) kapsüller ayrılır ve zeytinden biraz daha küçük olan, buruşuk, kahverengi tohumlar (300-1000 tohum/lb) ayrılır.

2.6.3. Jojoba için verim ve performans sonuçları

Jojoba genellikle ekilmesinden başlayarak 4-5 yıla kadar ekonomik olarak yararlı bir verim elde edilemez. Jojobanın doğal alanlardaki tohum verimleri, bitki başına birkaç tohumdan 30 lb kuru temiz tohuma kadar değişim gösterir. Tohumların üretimi bir alan içinde bir bitkiden diğerine ve tek bir bitki için yıldan yıla oldukça değişir.

Günümüzde ticari jojoba tarlalarının (fidanlıklarının) ortalama verimi, 300 lb/acre'den daha azdır. Seçilen yüksek verimli klonlar ile gerçekleştirilen fidanlıklar 800 lb/acre 'ye kadar üretim kapasiteleri vardır. California-Riverside Üniversitesi ve Arizona-Tucson Üniversitesi ortaklaşa yaptıkları çalışmalarında, ekin iyileştirme programları ile verimliliği aktif olarak araştırmaktadır.

2.6.4. Üretim ekonomisi

1978'de güneybatı Amerika'da jojoba çiftliği kurma maliyetinin (ilk üç yıl) 1.157 \$/acre olduğu belirtilmiştir. Düşük verimler ve donma kayıpları, çiftçi ve araştırmacılar için mali kayıplara neden olmaktadır. Jojobanın başarılı uzun süre alan üretimi iyileştirilen verime ve kuvvetli bir pazara bağlıdır. Endüstri, zirai olarak yapılan bir araştırmanın olduğu yeni teknolojiye, o araştırmanın ihtiyacı karşılaması devam ettiği sürece yatırım yapmaya duyarlıdır. Pek çok uygulama ile alternatif endüstriyel bir yağ olarak ve yenilenemeyen fosil petrolünün yerine geçen bir ürün olarak jojoba yağının değeri ispatlanmaktadır.

2.7. Enzimler

Enzimler proteinlerdir; hücre içindeki hidrolitik reaksiyonları katalizlerler ve hücre dışında hem doğal hem de doğal olmayan substratlar ile tepkimeleri katalizlerler. Katalizör olarak enzimler aşağıdaki özellikleri gösterirler: (i) dar sıcaklık (genellikle 20 °C-40 °C) ve pH aralıklarında ılımlı koşullar altında kullanılırlar; (ii) seçimlilikleri az ya da çok olarak değişebilmesine karşın, katalizlenen tepkimelerde stereoseçimli olabilirler ve substrat için yüksek seçimli olabilirler; (iii) katalitik aktiviteleri, varolan substratlar, ürünler ve diğer bileşenlerin derişimleri ile önemli ölçüde etkilenebilir; (iv) genellikle kararsızdırlar; (v) kofaktör gerektiren tepkimelerde, bazı kofaktörler katalitik döngü sırasında değişebilirler, aktif formlarına tekrar döndürülmeleri gerekir. Üretim süresinin uzaması, kararsız olmaları, yüksek fiyat, dar substrat seçimlilikleri, enzimlerin sentetik kimyada katalizör olarak kullanılmalarında en önemli sorunlardır. Bununla birlikte, yeni endüstriyel gereksinimler, ve kimya ve biyolojideki yeni gelişmeler ile bu anlayış değişmektedir. Bunun farklı nedenleri vardır: (i) çeşitli enzimatik tepkimeler, doğal ya da doğal olmayan substratların stereoseçimli olarak kullanışlı sentetik ürünlere dönüştüğünü göstermektedir. Çizelge 2.20.'de sentetik kimyada yaygın olarak kullanılan enzimler verilmiştir. (ii) Hem enzim tutuklanması ve kararlılığı için hemde proseslerin ölçek büyütmesi için yeni teknikler geliştirilmektedir. (iii) Moleküler ve hücre biyolojisi, hesaplama ve analitik kimyadaki son gelişme, istenen proteinlerin elde edilmesinde (expression) gen oluşturmak için genetik materyallerin işlenmesinde yeni yararlar oluşturmaktadır. (iv) Rekombinant DNA teknolojisi, enzimleri içeren proteinlerin düşük maliyetle üretilmesi ve bu proteinlerin özelliklerinin makul (rasyonel) değiştirilmesi için bir yol açmaktadır. (v) Katalitik olarak aktif antikorların ("abzymes") keşfedilmesi, enzim katalizini harekete geçirmektedir (Schreier 1997).

Böylece enzimlerin kullanılmasıyla çok sayıda organik reaksiyon, örneğin, şıral araürünlerin, şekerlerin, nükleotidlerin ve ilgili bileşenlerin dönüşümü; amino asitler, şekerler ve şeker fosfatları gibi fizyolojik aktif bileşenlerin sentezi; peptidlerin ve proteinlerin dönüşümü; ve içinde klasik kimyasal yöntemlerin de kullanılmak zorunda kalındığı diğer dönüşümler gerçekleştirilebilir. Sentetik organik kimyada enzimlerin

kullanımı üzerine yapılan araştırmalar, bütün kayıtlı olan uygulamaların %65'inin hidrolitik tepkimeler (%40) ve dehidrojenaz tepkimeleri (%25) üzerine olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte dehidrojenaz uygulamaları çoğunlukla mikroorganizmaların, az sayıda izole enzimlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Enzimlerin kullanıldığı bir diğer önemli tepkime, oksijenazın kullanıldığı tepkimelerdir (%24); enzimatik karbon-karbon sentezi ile ilgili az sayıda kayıt vardır (%4). Enzim katalizli bütün diğer tepkimeler toplamın %7'sini oluşturur (Schreirer 1997).

Çizelge 2.20*. Organik sentezde yaygın olarak kullanılan enzimler

Kofaktör gerektirmeyenler	Kofaktör eklenmesine Gerek duymayanlar	Kofaktör gerektirenler ^a
1. Hidrolitik enzimler	1. Flavoenzimler	1. Kinazlar-ATP 2. Oksidoredüktazlar-NAD(P) 3. Metil-transferazlar-SAM
Esterazlar Lipazlar Amidazlar Fosfolipazlar	Glukoz oksidaz Amino asit oksidaz Diaforaz Pridoksal fosfat	
Epoksit hidrolazlar Nükleosid fosforilazlar	2. Enzimler	
2. İzomerazlar ve Liyazlar	Transaminazlar Trozinaz	
Glukoz izomeraz Fenil alanin amonya liyaz Fumaraz Siyanohidrin sentetaz	3. Metaloz enzimler	
3. Aldolazlar	Galaktoz oksidaz Monooksijenazlar Dioksijenazlar Peroksidazlar Hidrojenazlar	
4. Glikozil transferazlar	Enoat redüktazlar Aldolazlar	
5. Glikozidazlar	Nitril hidraz	
6. Oksinitrilaz	4. Tiyamin profosfat gerektiren enzimler Transketolazlar Dekarboksilazlar	

^a ATP, adenozin trifosfat ; NAD(P), nikotinamid edenin dinükleotid (2' fosfat); SAM, (-)-(S)-adenosil-L-metiyonin

Günümüzde var olduğu tahmin edilen 25000 enzimden yaklaşık olarak 4000 tanesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından kabul edilmiş ve sınıflandırılmıştır (Krishna et al. 2000). Çoğunluğu hidrolazlar, transferazlar ve oksidoredüktazlar olmak üzere yaklaşık 400 tanesi (çizelge 2.21) araştırmalar için ticari olarak elde edilmektedir (Adlercreutz et al. 1994, Schreirer 1997). Büyük endüstriyel ölçekte deterjan ve gıda proseslerinde yaklaşık olarak sadece 50 enzim kullanılır. 1993'de enzimler için dünya pazar payı 1 milyar US \$ (Schreirer 1997) iken bu değer 2001 yılında 1.63 milyar \$'a (NOVO NORDISK) yükselmiştir. Enzim fiyatları önemli ölçüde talep ile düzenlenir. Uygun reaksiyon koşulları ve reaksiyon mühendisliğinin uygulanması ile yeterli enzim kararlılığı ve yüksek verimler elde edilebilir. Farklı kaynaklardan çeşitli enzimler ticari olarak elde edilebilirler (çizelge 2.22) az sayıda satıcı enzim koruma kitini (enzyme screening sets) sunarlar (çizelge 2.23).

Enzimler arasında hidrolazlar, endüstriyel biyotransformasyonlarda en çok kullanılan enzimlerdir. Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin %80'i hidrolazlardır.

Çizelge 2.21. Bilinen ve elde edilebilen enzimler

E.C. sınıf	Enzim türü	Tanımlanan	Ticari elde edilebilen
1	Oksidoredüktazlar	650	90
2	Transferazlar	720	90
3	Hidrolazlar	636	125
4	Liyazlar	255	35
5	İzomerazlar	120	6
6	Ligazlar	80	5

Çizelge 2.22. Ticari enzim kaynakları

Kaynak	Websitesi URL
Altus Biologics, Cambridge, MA, USA	http://www.altus.com
Amano Pharmaceutical, Nagoya, Japan	http://www.amano-enzyme.co.jp
Asahi Chemical Industry, Tokyo, Japan	http://www.asahi-kasei.co.jp
Biocatalysts, Pontypridd, UK	http://www.biocatalysts.com
BioCatalytics, Pasadena, CA, USA	http://www.biocatalytics.com
Biocon India, Bangalore, India	http://www.biocon.com
Biozyme Laboratories, South Wales, UK	http://www.biozyme.com
Boehringer Mannheim (now merged with Roche)	http://www.roche.com/diagnostics
Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, USA	http://www.calbiochem.com
	http://www.cnbi.com
Diversa, San Diego, CA, USA	http://www.diversa.com
(Innovase LLC, a joint venture of Diversa with Dow Chemical)	http://www.dow.com
DSM Food Specialties, Delft, The Netherlands	http://www.dsm.nl/dfs
Fluka Chemical LLC, Buchs, Switzerland	http://www.sigma-aldrich.com
Genencor International, Rochester, NY, USA	http://www.genencor.com
Genzyme Biochemicals, UK	http://www.genzyme.com
Gist-Brocades, The Netherlands (now DSM group)	http://www.gist-brocades.nl
Hoechst, Germany (now Aventis, merged with Rhone-Poulenc)	http://www.aventis.com
Ju"lich Enzyme Products, Ju"lich, Germany	http://www.juelich-enzyme.com
Lee Scientific, St. Louis, MO, USA	http://www.leescientific.com
Meito Sangyo, Tokyo, Japan	http://www.mediagalaxy.co.jp/meito
Merck, Germany	http://www.merck.com
Nagase and Co., Japan	http://www.nagase.co.jp
New England Biolabs, Beverly, MA, USA	http://www.neb.com
Novozymes, Bagsvaerd, Denmark	http://www.novozymes.com
Promega, Madison, WI, USA	http://www.promega.com
Recordati, Milan, Italy	http://www.recordati.it
Roche Diagnostics, Mannheim, Germany	http://indbio.roche.com
Ro"hm, Germany	http://www.roehm.de
Seppim, France	http://www.sfrl.fr
Serva, Germany (Invitrogen group)	http://www.serva.de
Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA	http://www.sigma-aldrich.com
ThermoGen, Woodridge, IL, USA	http://www.thermogen.com
Toyobo, Tokyo, Japan	http://www.toyobo.co.jp
Unitica, Osaka, Japan	http://www.unitica.co.jp
Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, Japan	http://search.wako-chem.co.jp
Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA	http://www.worthington-biochem.com

Çizelge 2.23. Ticari olarak elde edilen enzim koruma (screening) kitleri

Enzim koruma tarama kitinin türü	Kaynak
Alcohol dehydrogenase	ThermoGen, BioCatalytics
Esterases and lipases	Altus, Fluka, Roche, ThermoGen
Nitrilases	BioCatalytics
Proteases	Altus
Transaminases (aminotransferases)	BioCatalytics

2.7.1. Enzimlerin sınıflandırılmaları

Enzimler katalizledikleri tepkimeye göre (EC numara sırasında) altı temel gruba ayrılırlar: Oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar.

2.7.1.1. Oksidoredüktazlar (E.C. 1)

Bu enzimler yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini katalizlerler. Substrat üzerinde bir uçtan diğer uca elektron aktarımını sağlarlar. Sistematik adlandırma, verici/alıcı oksidoredüktaza göre yapılır. Oksitlenen substrat hidrojen verici olarak kabul edilir ve enzim dehidrojenaz olarak adlandırılır. Moleküler oksijen (O_2) alıcı ise enzim oksidaz olarak adlandırılır. Bütün oksidoredüktazlar kofaktör gerektirir. En yaygın kullanılan kofaktörler $NADH/NAD^+$, $NADPH/NADP^+$, $FADH/FAD^+$, ATP/ADP ve PQQ'dur. Çoğunun pahalı olması nedeniyle endüstriyel bir prosesin maliyeti için kofaktör rejenerasyon sistemi gerektirir. Endüstride benzoat dioksijenaz kullanılarak benzen türevlerinden (R)-1,2-dihidroksi katekol üretimi ICI (İngiltere) tarafından yapılmakta; elde edilen ürün, antiviral madde olarak etkin olan β -laktam sentezinde şiralar ürün olarak kullanılır, bunun yanında polimerizasyon monomeri olarak kullanımı da vardır.

2.7.1.2. Transferazlar (E.C. 2)

Bu enzimler bir bileşikten (verici) diğerine (alıcı) kimyasal grup aktarırlar. Sistematik adlandırma, verici/alıcı grup transferaz sınıflandırmasını izler. Pek çok durumda verici, sıklıkla aktarılan aktif kimyasal grubu taşıyan kofaktör ya da koenzimdir. Endüstriden çok doğada büyük rolleri vardır. Bazı nedenlerden dolayı az sayıda transferaz endüstride kullanılır: Denge tepkimeleri sıklıkla yüksek dönüşümler vermez, grup aktaran substratlar ve tepkimelerin gerçekleştirilmesi pahalıdır, ya da elde edilen ürünler ortamdaki kolaylıkla ayrılmazlar. Endüstride Monsanto (Amerika) tarafından D-aspartat transaminaz ile D-aspartattan 2-oxo-aspartat üretilmekte, bu ürün ilaçlarda ve gıda katkılarında amino asit olarak kullanılmaktadır.

2.7.1.3. Hidrolazlar (E.C.3)

Bu enzimler, C-O, C-N, C-C ve fosfatlarda P-O bağlarını içeren bazı diğer bağların hidrolitik parçalanmasını katalizlerler. Uygulamaları yağ asitlerinin esterleşmesi ve polisakkaritlerin, nitrillerin, proteinlerin, lipidlerin hidrolizini kapsar. Bu enzimlerin çoğu deterjan endüstrisinde ve gıda endüstrisinde, proteinleri, karbonhidratları ve yağları parçalamak için tepkimelerde kullanılır (çizelge 2.5). Hidrolaz ifadesi, substratın ismi ve -ase ekini kapsayan sistematik isimdir.

Hidrolazlar endüstriyel proseslerde en çok kullanılan enzimlerdir. Değerli kimyasalları üretmek için selülazlar (hidrolazların bir grubu) ile de biyokütlenin kullanımı farklı laboratuvarlarda araştırmanın temel bir alanıdır. Endüstride DSM Adeno (Hollanda) tarafından domuz pankreas lipazı ile (s)-betabloker sentezinde kullanılan intermediate üretilmektedir (şekil 2.28).

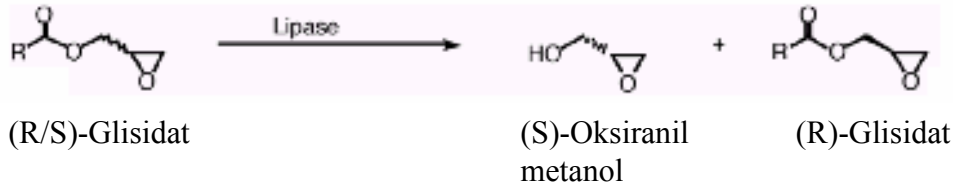
Çizelge 2.24. Hidrolazların kullanıldığı önemli endüstriyel proseslerin bazıları
(Hari Krishna 2002)

Endüstri	Ürünler (Uygulama)	Enzim ve proses	Ortam	Bulgu ^b
BASF	Şiral aminler ve alkoller (farmasötik ve pestisitler için ara ürünler, asimetrik sentezde şiral sintonlar)	<i>Burkholderia plantarii</i> Lipazı (tutuklanmış); hidroliz	MTBE-etil metoksi asetat	E > 500 (>100 ton)
Bristol-Myers-Squibb (BMS)	(3R,4S)-Azetidion asetat (Taksol ve paklitaksel, üretiminde kullanılır)	<i>P. cepacia</i> lipaz (tutuklanmış); hidroliz	Sulu	ee>99% (birkaç kg)
Bristol-Myers-Squibb	Hidroksi metil glutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaz inhibitör (cholesterol ilacı)	<i>P. cepacia</i> lipazı (tutuklanmış); asetilasyon	Toluen	ee = 98% (bir kaç kg)
Chiroscience	anti-HIV maddesi carbovir, hipoklosteremik maddeler ve antifungal madde brefeldin A için ara ürün	<i>P. fluorescens</i> lipazı (çözünür); hidroliz	Sulu	ee>92% (bir kaç kg)
DSM; Tanabe Seiyaku Generation of intermediate for synthesis of Diltiazem	Diltiazem (yüksek tansiyon ilacı) sentezi için ara ürün sentezi	<i>Serratia marescens</i> lipazı (tutuklanmış); hidroliz	Sulu/ Toluen	ee = 99% (bir kaç kg)
Sepracor (nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID, candidate) Multiphase	S-Ibuprofen (steroidal olmayan ateş düşürücü ilaç)	<i>C. cylindracea</i> lipazı (hollow fiber membran); hidroliz	Çok fazlı	ee = 96% (birkaç kg)
Uniquema	İzopropil palmitat ve miristat (sabun, krem ve yağlayıcıların üretiminde kullanılır)	<i>C. antarctica</i> lipazı (Novo); esterleşme	2-Propanol	%99 verim
Central del Latte; Sumitomo; others	Galaktoz ve glukoz sütteki laktozunun hidrolizi (laktoz alımının uygun olmadığı insanlar için daha tatlı olan süt eldesi)	β -Galactosidaz (SNAMprogetti ve diğerleri, tutuklanmış); hidroliz	Süt	%70-80 verim
Toyo Jozo-Asahi Chemical; Hoechst	7-aminosefalosporonik asit (penisilinlerin ve sefalosporinlerin sentezi için ara ürün)	<i>Pseudomonas/ E. coli</i> glutaril amidaz (tutuklanmış); hidroliz	Sulu	%95 verim

Çizelge 2.24. (devam)

Endüstri	Ürünler (Uygulama)	Enzim ve proses	Ortam	Bulgu ^a
Değişik	Niştastanın hidrolizi ile glukoz (yüksek fruktoz mısır şurubu için beslem stoğu)	<i>B. licheniformis</i> / <i>A.niger</i> α -amylase (çözünür)	Sulu	>%95 verim
Yamasa	Ribavirin (antiviral ilaç)	<i>Erwinia carotovora</i> Fosforilaz/ nukleosidaz (çözünür); hidroliz/ grup transfer	Sulu	---
Coca-Cola	(S)-Fenilalanin (aspartame sentezinde araürün)	Subtilisin carlsberg (Sigma, çözünür); peptid hidroliz	Sulu iki faz	ee = 95%
Hoffmann La-Roche	Değişik şiral araürünler	Subtilisin carlsberg; hidroliz	Sulu	ee>99%
Lonza	Silastatin sentezinde araürün (dehidropeptidaze inhibitör)	<i>E.Coli</i> 'ye (tüm hücre) transfer edilen <i>Comamonas acidovorans</i> amidaz; amid hidrolizi	Sulu tampon	ee>98%
Lonza Aqueous	Piperazin-2-karboksilik asit (farmasötik araürün, örneğin, oral olarak aktif HIV proteaz inhibitör crixivan (Merck'den) ya da çeşitli biyoaktif bileşenler için önbaşılatıcı (precursor))	<i>Klebsiella terrigena</i> amidaz (tüm hücre); amid hidrolizi	Sulu	ee>99%

^a : E , E-değeri (enantioseçimlilik), ee, enantiyomerik fazlalık.



Şekil 2.28. Hidrolaz ile katalizlenen enzimatik dönüşüm

2.7.1.4. Liyazlar (E.C. 4)

Bu enzimler C-C, C-O, C-N ve hidrolizden farklı düzendeki az sayıda diğer bağların ayrılmasını katalizlerler. Sıklıkla, başka tepkimelere maruz bırakılan çift bağların ayrılmasıyla bu olay gerçekleşir. Sistemik adlandırma, substrat grubu-liyaz şeklindedir. Ayırma çizgisi (-) herhangi bir karışıklığı önlemek için önemlidir.. Örneğin, hidrolaza çok benzemesi nedeniyle, hidroliyaz yerine hidro-liyaz terimi kullanılmalıdır.

Liyazlar, bakın olan doğal bağ bozma tepkimelerini, doğal olmayan koşullar altında (örneğin yüksek substrat derişimleri) ticari açıdan önemli olan yeni bağların oluşmasına izin vererek, terse çevirebilirler (bağ oluşması, liyaz sentetaz olarak görev yapar). Sıklıkla şiral merkezler, bağ oluşması sırasında üretilir. Endüstriyel olarak fenil alanin amonyaliyaz kullanılarak, Japonya'da Ajinomoyo Co. Tarafından, Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan L-dihidroksi-L-fenil alanin (L-DOPA) üretilmektedir.

2.7.1.5. İzomerazlar (E.C. 5)

İzomerazlar enzimlerin küçük bir bölümünü oluştururlar ve tek bir molekül içinde geometrik ya da yapısal değişimleri katalizlerler. Değerli ürünleri elde etmek için daha

ucuz substratlara uygulanırlar. İzomerizasyonun türüne bağlı olarak, bu enzimler, epimerazlar, rasemazlar, cis-trans izomerazlar, tautomerazlar ya da mutazlar olarak adlandırılırlar. Rasemazlar özellikle kinetik ayırmalarda (resolution) önemlidirler. Glukoz izomeraz, bu grup içinde yaygın olarak kullanılan enzimdi ve endüstride glukozun fruktoza dönüşümünü katalizler; elde edilen fruktoz gıda ve içki endüstrilerinde tatlandırıcı ya da invert şeker olarak kullanılır.

2.7.1.6. Ligazlar (E.C. 6)

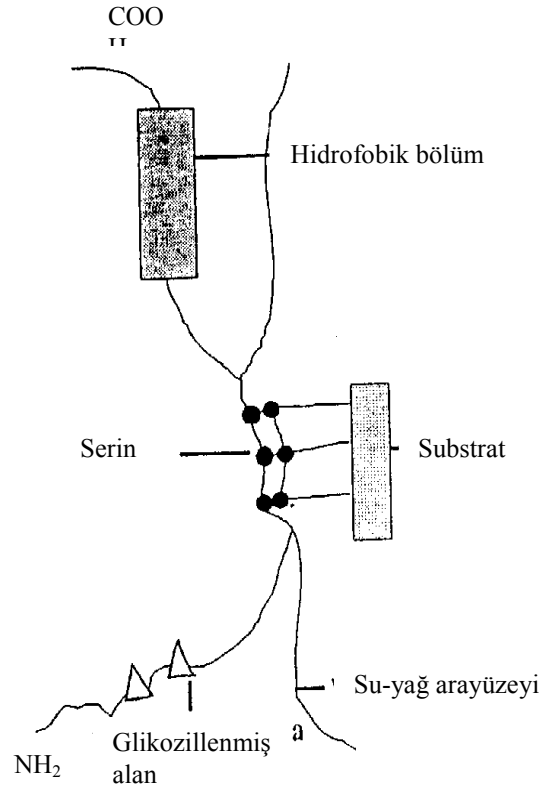
Bu enzimler, ATP ya da benzer trifosfat içinde pirofosfat bağının hidrolizi ile birlikte iki molekül arasında bağ oluşmasını katalizlerler. Oluşan bağlar C-O, C-S ve C-N bağlarıdır. Endüstride ligazlar kullanılarak kg ölçekte üretim yoktur, ancak doğada (ribosomal peptid sentezi), DNA sarmalının tamirinde ve genetik mühendisliğinde (örneğin, DNA ligazlar DNA sentezi sırasında C-O bağ oluşumunu katalizler) önemli rolleri vardır.

2.7.2. Lipazlar (triacilgliserol hidrolazlar)

Karboksilik ester hidrolaz (Gliserol Ester Hidrolaz E.C.3.1.1.3) olan lipazların, memeli, bitki ve mikroorganizmaların yağ metabolizmasında önemli görevleri vardır (Ghosh et al. 1996, Gandhi et al 2000).

. Lipaz molekülü şekil 2.29'da görülmektedir. Substrat herhangi bir trigliserid olabilir (Ghosh et al. 1996).

Proteaz ve karbohidrazlar gibi enzimler yıllardan beri endüstriyel olarak kullanılmakta ve dünyadaki enzim pazarının büyük bir bölümünü oluşturmaktadırlar. Günümüzde lipazlar, bu pazarın %10'ununda daha azını oluşturmaktadır ve bu pazar oldukça geniş uygulamalar ile giderek artan bir potansiyele sahiptir.



Şekil 2.29. Lipaz molekülü (Ghosh et al. 1996)

Lipazlar çok farklı memeli, bitki ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Memeli lipazları, karaciğer, dil, mide ve pankreas lipazları olmak üzere dört gruba, mikrobiyal lipazlar ise bakteriyal ve fungal (mantar) olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, susuz ortamlarda kararlı ve aktif olmaları, kofaktör gerektirmemeleri, yüksek katalitik güçleri, ucuz olmaları, seçimli ve pozisyonel olarak spesifik yağ asidi değiştirmeleri, ester bağına spesifik olmaları, yüksek substrat seçimlilikleri ve yan ürün oluşumunu önlemeleri nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar (Langrand et al. 1988, Zaidi et al. 1995, Santaniello et al. 1993).

Lipazlar, stereo ve bölgesel spesifik olmaları nedeniyle kimyasal olarak katalizlenemeyen tepkimeleri katalizleyebilirler. Böylece varolan bir ester modifikasyonu ya da fonksiyonel ve fizikokimyasal özellikleri farklı yeni bir ester üretimi yapılabilen ve bunun sonucunda değerli yeni kimyasal maddeler ya da daha kullanışlı gliserit karışımları elde etmek mümkün olmaktadır (Gunnglaugsdottir 1997).

Lipazlar (triacilgliserid lipaz), su-yağ arayüzeyinde lipidlerin (trigliseritlerin) digliseritlere, monogliseritlere, yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen serin hidrolazlardır (E.C. 3.1.1.3). Michaelis -Menten kinetiği gösteren esterazların aksine çözünen substratlar ile sulu çözeltide düşük aktivite gösterirler. Su-yağ arayüzeyinde aktivitedeki artma, su-yağ fazında substrat bağlanmasından önce enzimin yapısal değişime uğradığını göstermiştir. Yapıdaki bu değişim, insanda bulunan lipaz ve *Mucor miehei* lipazının inhibitörlerle yaptıkları komplekslerin X-ray yapıları ile desteklenmiştir. *Mucor miehei* ve *Candida antactica* lipazları aktif merkezlerinde Asp-His-Ser katalitik üçlüsünü içerirler, oysa *Geotrichum candidum* lipazı Glu-His-Ser katalitik üçlüsüne sahiptir. *Humicola Lanuginosa* enzimi ise aktivite için Asp-His-Tyr'i gerektirir (Schreier 1997, Vallikivi, I).

Lipazların oldukça farklı seçimlilik ve kararlılıkları kayıtlarda yer almaktadır. Organik sentezde domuz pankreas lipazı ve çeşitli mikrobiyal lipazlar (çizelge 2.25) önemli rol oynarlar. Bu enzimler ester hidrolizi, esterleşme, transesterleşme, interesterleşme ve esterlerden diğer nükleofillere (örneğin, aminler tiyoller ve hidroperoksitler) açıl grup transferi için kullanılırlar. Bütün bu tepkimelerde, seçimliliğin çeşitli kriterleri katalizi etkiler. Örneğin (i)substrat seçimliliği; (ii)bölgesel seçimlilik; (iii)endo-/ekzo-seçimlilik ve Z-/E-farkı ile seçimlilik; (iv)enantiyoseçimlilik; (v)meso fark; ve (vi)proşiral tanıma (Schreier 1997).

2.7.2.1. Lipazların katalizlediği tepkimeler

Lipazlar hidroliz, esterleşme ve transesterleşme tepkimelerini katalizlerler. Transesterleşme tepkimeleri, esterdeki açıl grup değişimi, bir asit ile yapıyorsa

asidoliziz, bir alkol kullanılıyorsa alkoliziz, bir başka ester durumunda interesterleşme ve bir amin kullanılıyorsa aminoliziz adını alır. (Gunnlaugsdottir 1997).

Çizelge 2.25. Organik sentezde yaygın olarak kullanılan mikrobiyal lipazlar

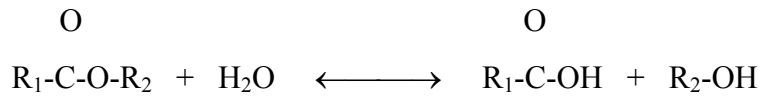
Kaynak	Ticari adı	Üretici
<i>Alcaligenes sp.</i>	Amano Lipazı PL	Amano
<i>Achromobacter sp.</i>	-	Meito Sangyo
<i>Aspergillus niger</i>	Amano A	Amano
<i>Bacillus subtilis</i>	-	Towa Koso
<i>Candida cylindracea^a</i>	Lipaz OF Amano lipazı AY	Sigma; Boehringer Mannheim; Amano; Meito Sangyo
<i>Candida lipolytica</i>	-	Amano;Fluka
<i>Candida antarctica</i>	SP-435 ^b	Novo
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Amano Lipaz LP	Sigma;Toyo Jozo
<i>Geotricum candidum</i>	Amano Lipaz GC	Sigma; Amano
<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano Lipaz R-10	Amano
<i>Mucor miehei</i>	Amano MAP-10 Lipozyme	Amano;Novo;Fluka
<i>Penicillium camemberti</i>	-	Rhone-Poulenc
<i>Penicillium roqueforti</i>	-	Fluka
<i>Phycomyces nitens</i>	-	Takeda Yakuhin
<i>Porcine pancreas</i>	-	Sigma; Amano;Fluka Boehringer Mannheim
<i>Pseudomonas cepacia^c</i>	Amano P, PS, PS30 LP80, SAM-I	Amano;Fluka
<i>Pseudomonas sp.</i>	Amano AK, K-10, SAM-II	Amano
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LPL, PAL	Amano
<i>Rhizopus arrhizus</i>	-	Sigma; Boehringer Mannheim; Fluka
<i>Rhizopus delemar</i>	-	Sigma; Amano; Tanabe;Fluka
<i>Rhizopus japonicus</i>	Amano Lipaz FAP	Amano;Nagase Sangyo;osaka Saiken;Fluka
<i>Rhizopus niveus</i>	Amano lipaz N	Amano;Fluka
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	Amano
Buğday tohumu	-	Sigma ;Fluka

^a : Şimdiki adı *Candida rugosa* :

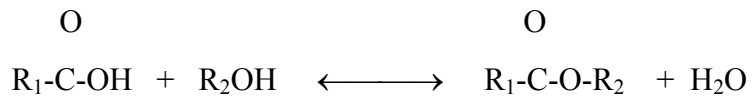
^b : *Candida antarctica*dan lipaz B için gen transferinden sonra, *Aspergillus oryzae*'ye ile üretilen akrilik reçine destekli lipaz

^c : Önceleri *Pseudomonas fluorescens* olarak bilinirdi.

A. Hidroliz

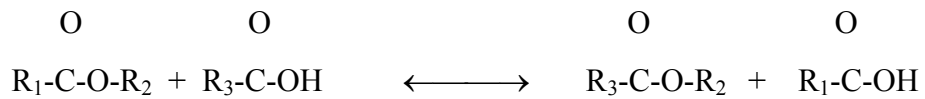


B. Esterleşme

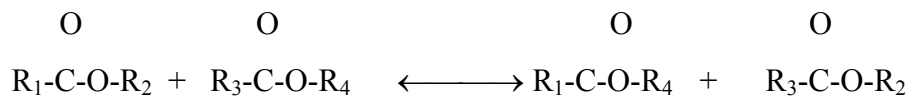


C. Transesterleşme

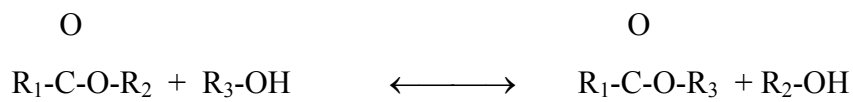
1. Asidoliziz



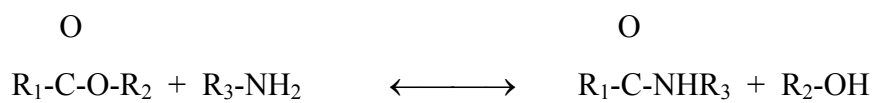
2. İnteresterleşme



3. Alkoliziz



4. Aminoliziz

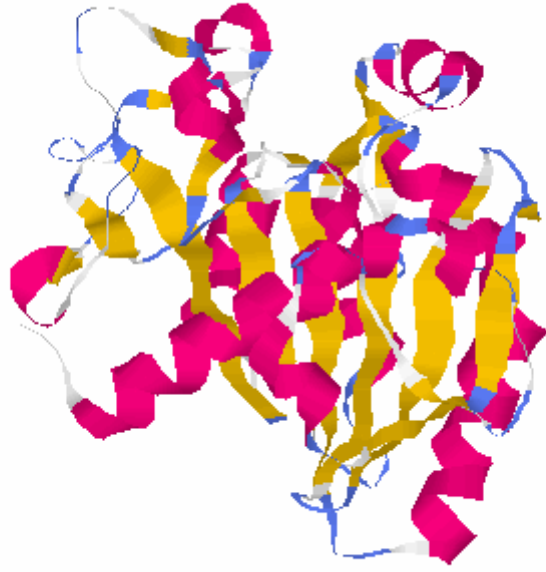


2.7.2.2. Lipazların yapısı ve arayüzey aktivasyon mekanizması

Lipazların üç boyutlu yapıları ilk olarak Brandy et all (1990) ve Winkler et all.(1990) tarafından sırasıyla *Mucor mihei* lipazı için ve insan pankreas lipazı için X-Ray kristalografi kullanılarak belirlenmiştir (Gandhi et all 2000). O zamandan beri farklı kaynaklardan lipazların (*Geotrichum candidum*, *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum* vb) yapıları incelenmiştir. *Mucor mihei* lipazı ve *Humicola lanuginosa* lipazı için üç boyutlu yapı şekil 2.30'da verilmiştir. Bu yapıların temel özellikleri, α/β -hidrolaz katlanması (merkezde her iki taraftan α -heliksler ile kaplanan hidrofobik β -düzlemi), Ser-His-Asp/Glu katalitik üçlüsünden oluşan bir aktif konum, bir oksianyon boşluğu, ve pek çok durumda aktif konumu kapatan α -heliksten oluşan bir kapak (lid) içermeleridir. Lipazların aktif konumları, serin proteazların aktif konumlarına kimyasal olarak benzer ancak yapısal olarak farklıdır; karşılaştırıldıklarında aktif Serin kalıntısını destekleyen an zincirin polaritesi lipazlarda terstir. Dodson et all (1996) lipazlarda seril hidroksil gruplarının, serin proteazlardakilerden daha farklı dağıldıklarını ve böylece mekanizmaya özgü önemli açıklamalara sahip olabilen katalitik üçlünün stereokimyasını terse çevirdiklerini bildirmişlerdir (Gandhi et all.2000, Vallikivi, I) .

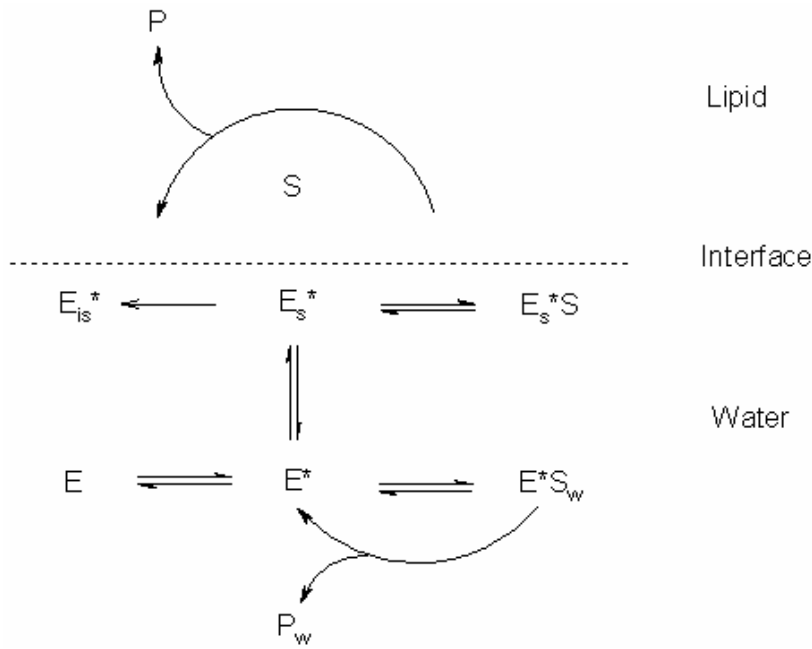
Günümüze kadar lipaz üzerine yapılan çalışmalarda, katalitik serinin merkezi β -düzlemi üzerinde tam olarak aynı yerde olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, aktif konumdaki Asp/Glu farklı lipazlarda farklı yerlerde olmaktadır. Katalitik üçlüdeki His ise, tüm lipazlarda benzer şekilde diğer iki kalıntıya (Ser-Asp ya da Ser-Glu) bağlıdır.

Lipazların en önemli özelliklerinden biri arayüzey aktivasyon (interfacial activation) olayıdır. Çok düşük substrat (lipid) derişimlerinde ve sulu çözeltide enzimler aktif değildir. Arayüzeyde lipazların aktiviteleri ilk olarak Sarda ve Desnuelle (1958) tarafından belirlenmiştir (Ganghi et all.2000). Substrat derişimi lipid miselleri oluşturmak için yeterince büyük olduğunda enzim katalitik olarak aktive olur. Bu aktivasyonun oluşma mekanizması bugün kuvvetle üzerinde çalışılmakta ve henüz tam

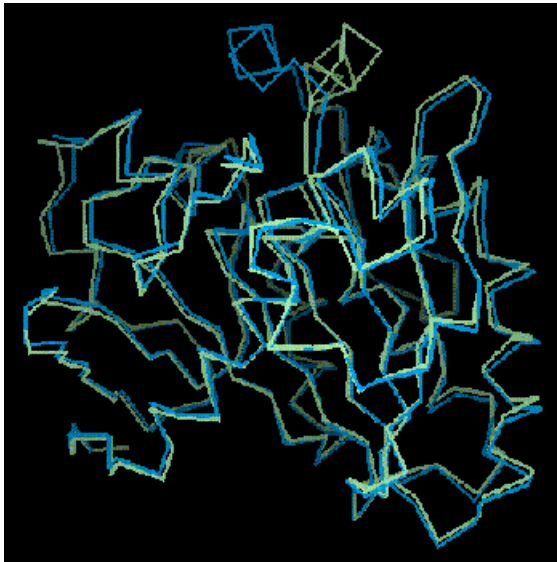


Şekil 2.30. *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei*.lipazları için üç boyutlu yapı
(Vallikivi, I)

olarak anlaşılammamıştır. Arayüzey aktivasyonunun, hidrofobik arayüze lipazın adsorpsiyonu sonunda oluşan yapısal değişim nedeniyle olduğu varsayılır (şekil 2.31). Çeşitli lipazların X-Ray kristalografik yapı çalışmaları bu varsayımı desteklemektedir. Arayüzey aktivasyonuna uğrayan lipazlarda olan olay şudur: Lipazın iki ya da daha fazla yapıda olduğu görülür. Bunlardan biri, aktif konumdaki katalitik üçlüyü kapatan yapısal elementlerin (α -heliks) olduğu yapı (inaktif form), diğeri ise arayüzey aktivasyonu sırasında bu kapağın açılması ile arayüzey alanının artması ve böylece aktif konumun daha fazla substrat almak için subtrata izin verdiği yapıdır (aktif form). Su-yağ arayüzeyinin aktif konuma doğru bu α -heliks hareketini başlattığına inanılır. Yani kapağın hareketi ile sadece aktif konum ortaya çıkmıyor, aynı zamanda hidrofobik polar olmayan yüzeyde artış da oluyor (Gandhi et all. 2000, Vallikivi, I). Az sayıda durumda, enzimin açık ve kapalı formda kristal yapıları üretilir, Örneğin *Rhizomucor miehei* lipazı için bu yapılar şekil 2.32'de verilmiştir. Mavi yapı inaktif yapı olan kapalı alfa karbon atomlarını, yeşil ise lipazın aktif formdaki alfa karbon atomlarını gösterir. En büyük yapı değişim alanı "lid" proteinin tepesinde açıkça görülebilir. Pek çok durumda, ya lipaz için bilinen bir yapı ile ya da bir model olarak başka bir lipaz kullanılarak yapının bilgisayar modellemesi ile, aktif konumları kapatan bazı "lid" (kapak) ya da "flap" (aşağı sarkan kapak) türlerinin var olup olmadığını tahmin edilebilmektedir. Arayüzey aktivasyonuna uğrayan hemen hemen tüm lipazlar, aktif konumlarını kapayan moleküler kapağa benzeyen bir şeye sahiptirler, ancak kapak yapısı büyük ölçüde değişir, yaygın olarak tekrarlanan bir yapısı yoktur.



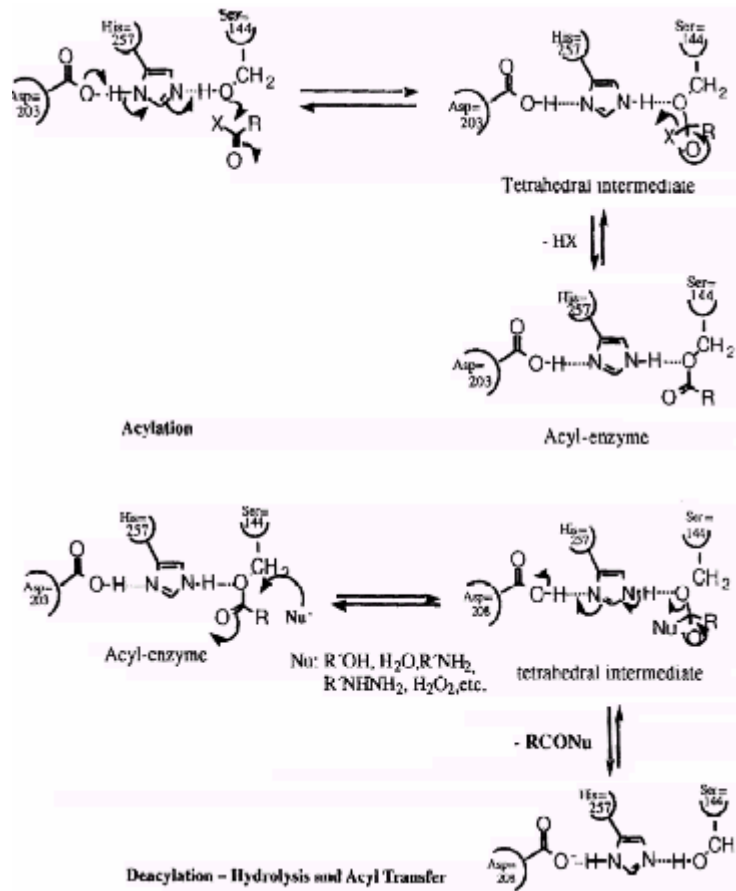
Şekil 2.31. Çözünen ve çözünmeyen substratlar üzerine lipazın etkimesi
 E inaktifçözünen lipaz; E* aktifçözünen lipase; E_s* adsorplanan aktif lipaz;
 E_{is}* adsorplanan inaktif lipaz; S_w suda çözünen substrat; S suda çözünmeyen
 substrat; E*S_w ve E_s*S lipaz substrat kompleksleri; P_w and P sırasıyla, suda ve
 lipid fazındaki ürün. (Muralidhar et al.2002).



Şekil 2.32. *Rhizomucor miehei* lipazı için aktif ve inaktif formlar. Mavi yapı inaktif yapı olan kapalı alfa karbon atomlarını, yeşil ise lipazın aktif formdaki alfa karbon atomlarını gösterir (Vallikivi, I)

2.7.2.3. Lipaz katalizli esterleşme mekanizması

Lipaz katalizli esterleşme mekanizması, serin proteazlarınkine benzer ve iki tetrahedral araürün içerir. (şekil 2.33). İlk tetrahedral arabileşik katalitik üçlü üzerindeki serin kalıntılarının asit üzerine nükleofilik bombardımanı ile oluşur ve bu araüründen açıl-enzim kompleksi vermek üzere bir su molekülü ayrılır. İlk substrat ($R_1\text{-CO-OR}_2$) enzim (HO-Enzim) ile açılasyon basamağında açıl enzim kompleksi ($R_1\text{-CO-O-Enzim}$) ve ilk ürünü (HOR_2) oluşturur. İkinci substart (alkol ya da genellikle su, (HOR_2)) açıl-enzim kompleksi ile deaçılasyon basamağında başka bir ürün tetrahedral araürün vermek üzere etkileşir (nükleofilik bobbardıman). Sonuç olarak bu tetrahedral kompleksten doğal formdaki enzim oluşur ve bir molekül ester ($R_1\text{-CO-OR}_3$) ayrılır. Tetrahedral arabileşiklerin her ikisi de oksianyon boşluğundaki protein atomları için hidrojen bağları ile kararlı olan bir oksianyona sahiptirler (Muralidhar et al. 2002).



Şekil 2.33. Lipaz katalizli esterleşme mekanizması (Muralidhar et al. 2002).

Enzimlerin çoğu iki ya da daha çok substrat arasındaki reaksiyonları katalizlerler, örneğin koenzim kullanılır. Her ne kadar belirli, sabit bir kosubstrat derişiminde çalışılarak sistem tek substratlı sisteme uygun hale getirilebilse de bu durumda bulunan kinetik sabitler her zaman gerçek K_m ve V_m değillerdir, gözlenen değerlerdir. Gerçek K_m ancak doygunluk kosubstrat derişiminde ve gerçek V_m doygunluk substrat ve kosubstrat derişiminde elde edilebilir. İki substratlı reaksiyonlar ya enzim ve bir substratla ikili ya da enzim ve iki substratla üçlü ara kompleksler üzerinden yürütülür. Ayrıca üçlü kompleksler de ya gelişigüzel ya da düzenli bir sırada oluşur (Sagel 1975). Bu mekanizmalar şunlardır.

1. Hızlı denge düzensiz üçlü kompleks sistemi (Random Order Mekanizm)
2. Düzenli üçlü kompleks sistemi (Ordered Bi Bi Mekanizm)
3. İkili kompleks sistemleri (Ping Pong Bi Bi Mekanizm)

Burada bir asit ve bir alkol arasında lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen bir esterleşme tepkimesi için Ping Pong Bi Bi Mekanizması inhibisyon olmadığı durum ve alkol inhibisyonu durumu için verilerek kinetik sabitlerin belirlenmesi anlatılmıştır.

2.7.2.3.1. Tersinir Ping Pong Bi Bi mekanizması

Asit ve alkolün lipaz katalizörlüğünde esterleşmesi için kullanılabilen Tersinir Ping Pong Bi Bi Mekanizması aşağıdaki dört basamağı kapsar.



Burada E lipaz, S₁ asit, P₁ su, S₂ alkol, P₂ ester, ES₁ lipaz ve asit arasındaki birinci tetrahedral kompleks, EA açıl-lipaz kompleksi ve EP₂ ikinci tetrahedral kompleksi göstermektedir (Gandhi et al. 2000). Bu mekanizmada enzim iki kararlı şekil arasında değişmektedir. S₁'in bağlanması ile oluşan ve kovalent olmayan ES₁ kompleksi, enzimin ya da genellikle asidin değişime uğraması (unimoleküler izomerizasyon reaksiyonu) ile enzim başka bir forma (açıl-enzim araürününe), S₁ de P₁ formuna değişir. Ürünün ayrışması ile değişen formdaki enzim (EA) ikinci substrat olan S₂ ile reaksiyona girer ve EP₂ kompleksini oluşturur. Bu kompleks unimoleküler reaksiyon ile izomerize olarak P₂ ürünü oluşur ve enzim de tekrar ilk formuna döner (Sagel 1975, Gandhi et al. 2000, Telefoncu 1998).

Reaksiyon hızı yukarıdaki eşitliklerden aşağıdaki gibi türetilir.

$$v = \frac{k_1 k_2 k_3 k_4 E_0 S_1 S_2 - k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} E_0 P_1 P_2}{\Sigma} \quad (2.31)$$

$$\begin{aligned} \Sigma = & k_1 k_2 (k_{-3} + k_4) S_1 + k_3 k_4 (k_{-1} + k_2) S_2 + k_{-1} k_{-2} (k_{-3} + k_4) P_1 + k_{-3} k_{-4} (k_{-1} + k_2) P_2 + \\ & k_1 k_{-2} (k_{-3} + k_4) S_1 P_1 + k_3 k_{-4} (k_{-1} + k_2) S_2 P_2 + k_1 k_3 (k_2 + k_4) S_1 S_2 + k_{-2} k_{-4} (k_{-1} + k_{-3}) P_1 P_2 \end{aligned} \quad (2.32)$$

$$V_m = \frac{k_2 k_4}{k_2 + k_4} E_0, \quad K_{mS_1} = \frac{k_4}{k_1} \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_2 + k_4} \right), \quad K_{mS_2} = \frac{k_2}{k_3} \left(\frac{k_{-3} + k_4}{k_2 + k_4} \right) \quad (2.33)$$

(2.32) ve (2.33) denklemleri (2.31) denkleminde yazılırsa (2.34) denklemi elde edilir.

$$v = \frac{V_m S_1 S_2}{K_{mS_2} S_1 + K_{mS_1} S_2 + S_1 S_2} \quad (2.34)$$

(2.34) denklemi S₂ ile bölünerek S₁ yalnız kalacak şekilde düzenleme yapılırsa (2.35) denklemi elde edilir.

$$V = \frac{\frac{V_m}{\left(1 + \frac{K_{mS_2}}{S_2}\right)} S_1}{\frac{K_{mS_1}}{\left(1 + \frac{K_{mS_2}}{S_2}\right)} + S_1} \quad (2.35)$$

(2.35) denklemi gözlenen değişkenler cinsinden aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$v = \frac{V_{m\text{göz}} S_1}{K_{mS_1\text{göz}} + S_1} \quad (2.36)$$

$$V_{m\text{göz}} = \frac{V_m}{1 + \frac{K_{mS_2}}{S_2}} \quad (2.37)$$

$$K_{mS_1\text{göz}} = \frac{K_{mS_1}}{1 + \frac{K_{mS_2}}{S_2}} \quad (2.38)$$

(2.36) denklemi lineerleştirilirse (2.39) denklemi elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_{mS_1\text{göz}}}{V_{m\text{göz}}} \frac{1}{S_1} + \frac{1}{V_{m\text{göz}}} \quad (2.39)$$

$1/V \rightarrow 1/S_1$ grafiği her bir S_2 değeri için çizilirse birbirine paralel doğrular elde edilir (şekil 2.34). Bu doğruların $1/V$ eksenini kestiği noktalar $1/V_{m\text{göz}}$ değerleridir ve her S_2 değeri için ayrı ayrı bellidir. (2.37) nolu denklem doğrusallaştırılır ise (2.40) denklemi elde edilir.

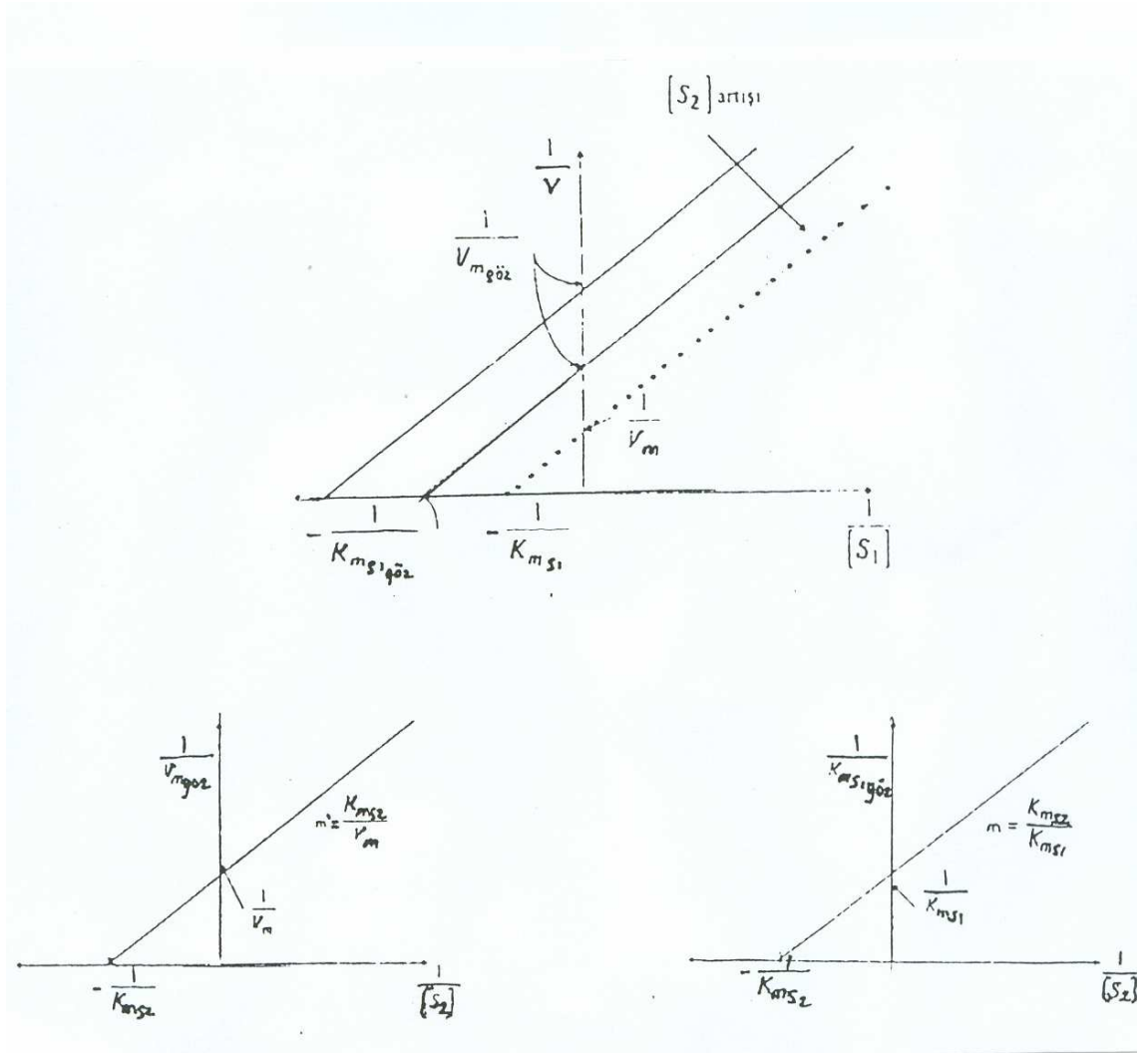
$$\frac{1}{V_{m\text{göz}}} = \frac{K_{mS_2}}{V_m} \frac{1}{S_2} + \frac{1}{V_m} \quad (2.40)$$

$1/V_{m\text{göz}} \rightarrow 1/S_2$ grafiğinin (şekil 2.34) kaymasından V_m , eğiminden de K_{mS_2} değeri belirlenir. (2.38) denklemi lineerleştirilirse (2.41) denklemi elde edilir.

$$\frac{1}{K_{mS_1} \text{ göz}} = \frac{K_{mS_2}}{K_{mS_1}} \frac{1}{S_2} + \frac{1}{K_{mS_1}} \quad (2.41)$$

$1/K_{m\text{ göz}} \rightarrow 1/S_2$ grafiğinin (şekil 2.34) kaymasından K_{mS_1} değeri belirlenir.

Bu çözümler son zamanlarda non linear çözüm yöntemleri kullanılarak linerleştirme yapılmadan da çözülebilmektedir.



Şekil 2.34. Tersinir Ping Pong Bi Bi Mekanizmasında kinetik sabitlerin belirlenmesi

2.7.2.3.2. Alkol inhibisyonu varlığında tersinir Ping Pong Bi Bi mekanizması

Tersinir Ping Pong Bi Bi Mekanizmasına (2.42) denklemi ile verilen ve alkol ile lipazın yarışmalı inhibisyonunu içeren basamak eklenir. Alkol ve su açıl-enzim ara ürünü ile reaksiyon için sırasıyla ester ürünü ya da asidi vererek yarışır.



Alkol inhibisyon durumunda (2.32) denklemi (2.43) denklemine dönüşür.

$$\begin{aligned} \Sigma = & k_1 k_2 (k_{-3} + k_4) S_1 + k_3 k_4 (k_{-1} + k_2) S_2 + k_{-1} k_{-2} (k_{-3} + k_4) P_1 + k_{-3} k_{-4} (k_{-1} + k_2) P_2 + \\ & k_1 k_{-2} (k_{-3} + k_4) S_1 P_1 + k_3 k_{-4} (k_{-1} + k_2) S_2 P_2 + k_1 k_3 (k_2 + k_4) S_1 S_2 + k_{-2} k_{-4} (k_{-1} + k_{-3}) P_1 P_2 \\ & + k_{-1} k_{-2} (k_{-3} + k_4) \left(\frac{k_5}{k_{-5}} \right) S_2 P_1 + k_3 k_4 (k_{-1} + k_2) \left(\frac{k_5}{k_{-5}} \right) S_2^2 \end{aligned} \quad (2.43)$$

$$K_I = \frac{k_{-5}}{k_5} \quad (2.44)$$

(2.43) ve (2.44) denklemleri (2.31) denkleminde yazılırsa (2.45) denklemi elde edilir.

$$v = \frac{V_m S_1 S_2}{K_{mS_2} S_1 + K_{mS_1} S_2 \left(1 + \frac{S_2}{K_I} \right) + S_1 S_2} \quad (2.45)$$

(2.45) denklemi S_2 ile bölünerek S_1 yalnız kalacak şekilde düzenleme yapılırsa (2.46) denklemi elde edilir.

$$v = \frac{\frac{V_m}{\left(1 + \frac{K_{mS_2}}{S_2}\right)} S_1}{\frac{K_{mS_1} \left(1 + \frac{S_2}{K_I}\right)}{\left(1 + \frac{K_{mS_2}}{S_2}\right)} + S_1} \quad (2.46)$$

(2.46) denklemi gözlenen değişkenler cinsinden aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$v = \frac{V_{mgöz} S_1}{K_{mS_1göz} + S_1} \quad (2.47)$$

$$V_{mgöz} = \frac{V_m}{1 + \frac{K_{mS_2}}{S_2}} \quad (2.48) \quad K_{mS_1göz} = \frac{K_{mS_1} \left(1 + \frac{S_2}{K_I}\right)}{1 + \frac{K_{mS_2}}{S_2}} \quad (2.49)$$

Alkol inhibisyonsuz durumda olduğu gibi (2.47) denklemi lineerleştirilir ve $1/v \rightarrow 1/S_1$ grafiği çizildiğinde her S_2 değeri için paralel olmayan eğriler elde edilir. Her S_2 değerine karşı gelen $1/V_{mgöz}$ değerleri bellidir. (2.48) denkleme göre $1/V_{mgöz} \rightarrow 1/S_2$ grafiği çizildiğinde doğrunun kaymasından V_m , eğiminden ise K_{mS_2} değeri belirlenir. $1/v \rightarrow 1/S_1$ grafiğinde her S_2 değerine karşı gelen eğim değerleri belirlenir.

$$m = \frac{K_{mS_1göz}}{V_{mgöz}} = \frac{K_{mS_1} \left(1 + \frac{S_2}{K_I}\right)}{V_m} \quad (2.50)$$

(2.50) denklemi aşağıdaki gibi de yazılabilir.

$$m = \frac{K_{mS_1}}{V_m} + \frac{K_{mS_1}}{V_m K_I} S_2 \quad (2.51)$$

(2.51) denklemine göre, $m \rightarrow S_2$ grafiğı geçirilirse grafiğın kayması $\frac{K_{mS_1}}{V_m}$ değerini, eğimi ise $\frac{K_{mS_1}}{V_m K_I}$ değerini verir. Bilinen V_m değeri kullanılarak K_{mS_1} ve K_I değerleri belirlenir.

Bu çözümler son zamanlarda lineer olmayan (non linear) çözüm yöntemleri kullanılarak linerleştirme yapılmadan da çözülebilmektedir.

2.7.2.4. Lipazların uygulama alanları

Lipazların uygulama alanları, şiral bileşenlerin sentezi, karbonhidrat ester sentezi, poli doymamış yağ asitlerinin elde edilmesi, biyolojik aktif bileşenlerin sentezi, parfümlerin ve tat esterlerinin üretimi, yapısal lipidlerin sentezi ve organik karbonatların sentezi olarak sınıflandırılabilir (Gandhi et al.2000). Lipazların endüstrideki uygulama alanları çizelge 2.26'da verilmiştir.

2.7.2.4.1. Şiral bileşenlerin sentezi

Enzimler stereoseçimlilikleri nedeniyle şiral sentezinde büyük potansiyele sahiptirler. Lipazlar ile gerçekleştirilen optik ayırma prosesleri tipik olarak, ya bir esterın rasemik karışımının enantiyoseçimli hidrolizi (örneğin iki izomerden sadece bir tanesinin hidrolizinin tercih edilmesi) ya da bir asit/ester rasemik enantiyoseçimli

esterleşmesi/transesterleşmesi ile esterden asitin ayrılması şeklinde gerçekleşir. Bu tür çeşitli lipaz katalizli şıral sentez yöntemleri endüstride kullanılır. Optikçe saf (R)- α -fenoksipropiyonik asit herbisitlerin sentezi için ara ürün vermek üzere α -bromopropiyonik asitten ayrılması Avusturya'da Chemie Linz tarafından ticari olarak gerçekleştirilmektedir. Glisidil bütüratın ve p-metoksifenil glisidatın optik olarak ayrılması prosesleri DSM Adeno tarafından ticari olarak yapılmaktadır. Bu bileşenler, optikçe aktif β -blokerların ve tansiyon düşürücü ilaç diltiazem'in hazırlanmasında önemli arürünlerdir. p-metoksi fenil glisidat sentezi için hollow-fiber gözenekli membran kullanılarak enzimatik bir proses Tanabe seiyaku (Japonya) ve Sepracor Inc. (USA) tarafından da geliştirilmektedir.

Çizelge 2.26. Lipazların endüstrideki uygulama alanları (Gunnlaugsdottir 1997).

Endüstri	Kullanımı
Süt Ürünleri Endüstrisi	Peynir lezzetini artırmak Peynir oluşumunu hızlandırmak Tereyağ ve krema lipolizizi
Serbest Yağ Asitleri Üretimi	Sabun üretimi Yüksek değerli polidoymamış yağ asitleri üretimi
Yapısal Lipid Üretimi	Ucuz girdi ile kakao yağı üretimi Değerli terapeitik ve besinsel özellikte lipidlerin üretimi (polidoymamış yağ asitlerince zengin trigliserit) (orta ve uzun zincirli yağ asidi içeren trigliserit)
Yağ Asidi Esterleri Üretimi	Tat esterleri üretimi (gıda endüstrisi) Vaks esterleri üretimi (özel yağlama yağı ve kozmetik)
Pahalı Kimyasal ve Farmasötik Endüstrileri	Optik olarak saf madde üretimi

2.7.2.4.2. Karbonhidrat ester sentezi

Düşük toksiklik ve biyolojik olarak bozunabilen yüzey aktif maddeler (sörfaktantlar) olan karbonhidrat monoesterleri , deterjanlarda ve gıda ürünlerinde (gıda emülsifiye edici olarak) uygulamalara sahiptir. Şekerlerin bölgeselseçimli monoaçilasyonu, kimyasal olarak gerçekleştirilirse, çeşitli korunma ve korunmama basmaklarını içerir. Oysa lipaz katalizli esterleşme tek bir basamakta bölgeselseçimli monoaçilasyonu verir. Örneğin, etil glukozidin 6- konumunun lipaz katalizli seçimli açilasyonu deterjan uygulamalarında kullanılan bir ürün verir. Şekerlerin monosubstituted akrilik asit türevleri (şeker akrilatları) lipazlar ve proteazlar kullanılarak, şekerler ve akrilik asit arasındaki transesterleşme tepkimeleri ile hazırlanırlar. Bunlar hem hidrojellerin hem de yüksek hidrofilik lineer polimerlerin sentezi için kullanılmaktadırlar. Bu polimerler, hem enzim tutuklama hem de materyallerin kontrollu salınımı, biyomateryaller, süper absorplayıcı polimerleri içeren çeşitli potansiyel uygulamalara sahiptirler. Şekerlerin disubstituted akrilik asit türevleri de hazırlanabilir; bunlar hidrojeller için çapraz bağlama maddesi olarak kullanılırlar. Şekerlerin hidrofilik yapısı nedeniyle, çapraz bağlama maddeleri hidrojeller ile uyumludur. Ayrıca, şeker diakrilatları hem kimyasal hem de biyolojik olarak bozunabilmeleri nedeniyle elde edilen hidrojeller de kimyasal ve biyolojik yolla bozunurlar.

Lipaz katalizli şeker ester sentezi üzerine yapılan araştırmalarda, şekerlerin karboksilik asit ile esterleşen alkol bileşeni gibi görev yaptıkları belirlenmiştir. Bununla birlikte şeker asitlerinin alkollerle esterleşmeleri de mümkündür. Örneğin, glukronik asit ve askorbik asitten (C vitamini) *Candida antarctica* lipazı ile ester üretilmektedir.

2.7.2.4.3. Poli doymamış yağ asitlerinin elde edilmesi/zenginleştirilmesi

Eikosepentaenoik asit, dokosaheksanoik asit ve gama-linolenik asit gibi poli doymamış yağ asitleri (PUFA), temel diyet bileşenleri olarak bilinirler. PUFA'lar, çuhaçiçeği, hoda 8borage, Borago officinalis), balık vb gibi yağlarda diğer yağ asitleri ile birlikte bulunurlar. Temel yağ asitlerinin medikal uygulamalarda ve gıda katkılarında kullanılmaları için bu kaynaklardan seçimli olarak ayrılmaları /zenginleştirilmeleri gerekir. Substrat seçimli lipazlar kullanılarak biyolojik kaynaklarından PUFA'ların saflaştırılması için prosesler geliştirilmektedir. Tipik bir proses, ya yağın seçimli lipaz katalizli hidrolizini ya da sabunlaştırılan yağdan yağ asitleri karışımının seçimli esterleşmesini kapsar

2.7.2.4.4. Biyolojik aktif bileşenlerin sentezi

Alkoloidler, terpenoidler, antibiyotikler, feromonlar vb gibi farklı biyolojik aktif bileşenlerin lipazlar ile sentezlenmeleri bildirilmiştir (Theil 1995). Tipik olarak, bu sentezlerde asimerizasyonu içeren anahtar basamaklardan biri lipaz ile katalizasyondur. Örneğin, mezo-konfigürasyonlu siklopentenediol türevleri, lipaz katalizli hidroliz ile ya da esterleşme ile farklı ürünleri üretmek üzere asimetrize olabilirler. Bu enantiyomerik monoasetatların her ikisi de prostaglandinlerin sentezinde farklı şekillerde kullanılabilirler.

2.7.2.4.5. Parfümlerin ve tat esterlerinin üretimi

Tatlar için dünya pazarı, toplam gıda katkıları pazarının 1/4'ünü oluşturur. Doğal kaynaklarından tatların ekstraksiyonunun pahalı ve güç olması nedeniyle, tatların lipaz katalizli sentezi giderek önem kazanmaktadır (Welsh et al. 1989, Schreier 1997,

Cheetnam 1997). Lipazlar kullanılarak sentezlenen kısa zincirli yağ asitlerinin esterleri meyve tatları oluşturmada kullanılırlar. 2-fenil asetat, etil kaproat ve izoamil asetat gibi parfüm esterlerinin susuz organik ortamda lipaz katalizli sentezi yüksek verimlerle gerçekleştirilmektedir.

2.7.2.4.6. Yapısal lipidlerin sentezi

Yapısal lipidler, ya kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA) ya da orta zincirli yağ asitlerinin (MCFA) veya bunların her ikisinin uzun zincirli yağ asitleri (LCFA) ile karışımını içeren triaçilgliserollerdir; ve aynı gliserol molekülü üzerinde esterleştirilmeleri tercih edilir. Yapısal lipidler, metabolik koşullar ve hedeflenen spesifik hastalıklar için incelikte hazırlanabilmeleri nedeniyle insan beslenmesinde büyük potansiyele sahiptirler. SCFA'ların MCFA'ya ya da LCFA'lardan birim ağırlık başına daha az kalori sağlamaları nedeniyle, düşük ya da az kalorili yağlar olarak görev yapabilirler. SCFA ve LCFA'nın kombinasyonu, düşük kalorili bir yağ olan Salatrim'in kimyasal sentezinde Nabisco Foods group (East Hanover, NJ) tarafından kullanılmaktadır; Salatrim, propiyonik asit, bütirik asit ve stearik asitten oluşur ve gıda endüstrilerinde kullanılır. Yapısal lipidlerin lipaz katalizli sentezi, trigliserid molekülü üzerindeki spesifik yağ asitlerinin girmesiyle hızla gelişmektedir.

2.7.2.4.7. Organik karbonatların sentezi

Organik karbonatlar ($R_1OC(O)OR_2$), suyun çok az olduğu ortamlarda karbonatlar ve alkollerden lipaz katalizli transesterleşme ile sentezlenebilirler. Esterlerin tepkimelerine benzer olarak karbonatların kullanıldığı transesterleşme tepkimelerinin yüksek stereoseçimli oldukları bildirilmektedir.

2.8. İstatistiksel Deney Tasarım Yöntemi

2.8.1. Proses optimizasyonu

Proses optimizasyonu, incelenen proses için en uygun koşulları ya da fonksiyonu belirlemek için optimum değerin bulunması işlemidir. Optimizasyon için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır, bu yöntemler çizelge 2.27'de verilmiştir. Optimizasyon yönteminin seçiminde en önemli adım planlamanın zorluğudur.

2.8.2. Cevap yüzey yöntemi (RSM)

Bilimsel çalışmalar ve mühendislik prosesleriyle ilgili problemin çözümü için araştırmacılar tarafından kullanılan matematiksel ve istatistiksel bir yöntemdir. Endüstriyel araştırmalarda geniş bir kullanıma sahiptir. RSM yöntemi deneysel strateji, matematiksel model ve istatistiksel sonucu bir araya toplamaktadır. Bu tekniğin kullanımı Box ve Wilson (1951) tarafından geliştirilmiştir. RSM tekniğinin kimya, mühendislik, biyoloji, ergonomi, tekstil, gıda endüstrisi, eğitim, psikoloji ve diğer bilim dallarında başarılı uygulamaları bulunmaktadır.

Herhangi bir reaktörde önemli ilk adım deneydir. Deneyler ekonomik işletim koşullarını belirlemek, reaksiyon mekanizmasını anlamak ve büyük ölçek için hız verilerini sağlamak için gereklidir. Bilindiği gibi biyokimyasal reaktörler genel olmayan bağımsız değişkenlerin bulunduğu kompleks sistemlerdir.

Gerçekleştirilen deneylerde bazı noktalar dikkate alınmalıdır. Bunlar; 1. Farklı deneyler için deneysel hata değeri kullanılmalıdır, 2.Sistemde zamanla bazı değişik durumlar

ortaya çıkabilir, örneğin biyokatalizör aktivitesinin zamanla azalması gibi, 3. Farklı besin ortamları ya da farklı deneysel teknikler değişimlere sebep olabilir.

Çizelge 2.27. Kimya Mühendisliğinde Kullanılan Optimizasyon Yöntemleri

Yöntem	Uygulama
Analitik Yöntem	
Uç değerler için direk araştırma ile optimizasyon	Fonksiyonların diferansiyelleştirilmesi ile gerçekçi proses tanımlanması
Lagrange çarpanları yöntemi	Değişebilir sınırlamalar ile fonksiyonların diferansiyelleştirilmesiyle gerçekçi proses tanımlanması
Değişkenlerin hesaplanması	Euler eşitliğinin çözümü, kimyasal reaktörler için optimum sıcaklık koşullarının belirlenmesi vs.
Pontryagin'in maksimum prensipleri	Geniş aralıktaki problemlerin otomatik kontrolünde
Matematiksel Programlama	
Geometrik programlama	Cebirsel eşitliklerin optimizasyonu
Doğrusal programlama	Farklı hammaddelerden maksimum ürün geri kazanımı ve ekipmanların optimum kullanımı
Dinamik programlama	Distilasyon, ekstraksiyon, ardışık reaktörler ve zincir reaksiyonları vs.
Gradyen Yöntemler	
Tüm formlar	Doğrusal ya da doğrusal olmayan sınırlamalar olmadan, doğrusal ve doğrusal olmayan fonksiyonların optimizasyonu
Model Uyumlu ve Bilgisayar Kontrollü Optimizasyon	
Tüm formlar	Kompleks kimya mühendisliği sistemleri için
İstatistiksel Optimizasyon	
Regresyon analizi	Gerçekçi olmayan sistemler
Cevap Yüzey Yöntemi (Box-Wilson)	Deneysel optimizasyon ve tasarım

RSM, deneysel tasarım tekniklerindeki bu problemlerin etkisini azaltmak için sistematik bir yöntemdir ve en çok bilgiye ulaşılacak noktalarda deney yapılmasını sağlamaktadır. Deneysel tasarım yöntemleri için sırası ile gözönünde bulundurulması gereken aşamalar aşağıda sıralanmıştır (Montgomery 1997).

1. Problemin durumu ve tanımlanması yapılır
2. Faktörler, seviye ve aralık seçilir
3. Cevap değişkeni seçilir
4. Deneysel tasarım matrisi oluşturulur
5. Deneysel çalışmalar gerçekleştirilir
6. Verilerin istatistiksel analizi yapılır
7. Sonuçlar değerlendirilir

İstatistiksel analizin pek çok kullanımı ve avantajlarına rağmen bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar aşağıda sıralanmıştır.

1. Elde edilen analitik yaklaşım büyük ölçekteki sistemler için uygulanamaz.
2. Deneysel çalışmalar için set değerlerinin dışında ekstrapolasyon gereklidir.
3. Korelasyon katsayıları ve elde edilen tanımlar doğrusal olmayan regresyon ile tatmin edici sonuçları verir; ancak deneysel plan oldukça karmaşıktır.

Prosesleri matematiksel olarak tanımlayabilmek için en önemli nokta, deneysel tasarım ve minimum deney ile maksimum bilgiye ulaşabilmektir. Deneysel çalışmalar aktif ve pasif olmak üzere iki farklı formda gerçekleştirilir. Pasif deney sisteminde bulunan bağımsız değişkenler sıra ile değiştirilir ve sisteme olan etkileri gözlenir. Değişimlerden regresyon analizi ile sistemin matematiksel modeli geliştirilir. Bu yöntemde çok sayıda deney yapmak gereklidir. Daha önceden belirlenmiş olan bir seri deney gerçekleştirilir ve değişkenlerin birbirlerini etkilemesi (iç etkileşimler) ve daha az sayıda gözlem yaparak istatistiksel tasarım gerçekleştirilir. Regresyon ve korelasyon analizi, proses değişkenleri ve optimum koşulları doğru bir şekilde vermektedir. Matematiksel fonksiyon optimum parametreleri içeren cevap fonksiyonudur ve eşitlik (2.52) ile verilmektedir.

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \Psi \quad (2.52)$$

Burada x_1, x_2, \dots, x_k bağımsız değişkenlerdir ve faktör olarak adlandırılırlar. Faktöriyel boyutlarda cevap fonksiyonunun geometrik gösterimi cevap yüzeyi olarak adlandırılır. Sistemi tanımlayan bağımsız değişkenlerin cevabı doğrusal ise fonksiyon birinci dereceden verilir.

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \Psi \quad (2.53)$$

Sistemde bir kavislenme var ise tanımlanma yüksek dereceli polinomlar kullanılarak yapılır.

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \Psi \quad (2.54)$$

Burada; β_0 regresyon eşitliğinin bağımsız terimini, β_i doğrusal terimi, β_{ii} ikinci derece terimi, β_{ij} iç etkileşim terimini ve ψ ise gözlem hatasını ya da gürültüyü ifade etmektedir.

Bu deneysel tasarım yönteminde boyutsuz koordinat sisteminde çalışılır ve bağımsız değişkenler (2.55)-(2.57) eşitlikleri ile ifade edilir.

$$x_1 = \frac{\xi_i - \xi_i^0}{\Delta \xi_i} \quad (2.55)$$

$$\Delta \xi_i = \xi_i^{\text{maks}} - \xi_i^{\text{min}} \quad (2.56)$$

$$\xi_i^0 = \frac{\xi_i^{\text{max}} + \xi_i^{\text{min}}}{2} \quad (2.57)$$

Boyutsuz koordinat sisteminde en yüksek seviye +1, en düşük seviye -1 ve merkez nokta 0 ile gösterilmektedir.

Tasarımdaki deney sayısı aşağıdaki eşitlikle belirlenir,

$$\begin{aligned} N &= 2^k + 2k + n_0 \quad k < 5 \\ N &= 2^{k-1} + 2k + n_0 \quad k \geq 5 \end{aligned} \quad (2.58)$$

k parametre sayısını, n_0 ise merkezi noktada yapılan deney sayısını göstermektedir ve n_0 sayısında bir sınırlama yoktur. $n_0=1$ ve $k=2$ için tasarım matrisi çizelge 2.28'de verilmiştir.

Çizelge 2.28. Deneysel tasarım matrisi ($n_0=1$ ve $k=2$)

N	x_0	x_1	x_2	x_1x_2	x_1^2	x_2^2
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1	-1	+1	+1
3	+1	-1	-1	+1	+1	+1
4	+1	-1	+1	-1	+1	+1
5	+1	$+\alpha$	0	0	α^2	0
6	+1	$-\alpha$	0	0	α^2	0
7	+1	0	$+\alpha$	0	0	α^2
8	+1	0	$-\alpha$	0	0	α^2
9	+1	0	0	0	0	0

İkinci derece eksen üzerinde α değeri eşitlik (2.59) ile ifade edilmektedir. Farklı sayıdaki değişkenler için n_0 ve α 'nın değerleri çizelge 2.29'de verilmiştir.

$$\alpha = 2^{\frac{k}{4}} \quad (2.59)$$

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

Çizelge 2.29. Farklı sayıdaki değişkenler için n_0 ve α 'nın değerleri

Değişken sayısı, 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	14

Model katsayılarının belirlenmesi için Eşitlik (2.60) ile verilen Taylor serisi kullanılır.

$$\beta_i = \left. \frac{\partial f}{\partial x_i} \right|_{x_i=0} ; \beta_{ij} = \left. \frac{\partial^2 f}{\partial x_i \partial x_j} \right|_{x=0} ; \beta_{ii} = \left. \frac{\partial^2 f}{\partial x_i^2} \right|_{x=0} \quad (2.60)$$

Eşitlik (2.54)'deki katsayıların bulunması için en küçük kareler yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemle göre gözlenen fonsiyon değerleri ile hesaplanan fonsiyon değeri arasındaki farkın minimum olması gerekir.

Gerçekleştirilen bu deneysel tasarım yönteminde kullanılan modelin ANOVA (Analysis of Variance) testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi çizelge 2.30'da verilmiştir. Burada SSM modelin kareler toplamını, SSE hatanın kareler toplamını, SST model ve hatanın kareler toplamını, MSM model karelerinin oranını (SSM/f₃), MSE ise hata karelerinin oranını (SSE/f₂) göstermektedir. F değeri hesaplandıktan sonra belirlenen büyüklük seviyesinde ve f₁, f₂ serbestlik derecesi için Biometrika tablolarından verilen Fp(f₂, f₃) değeri okunur ve karşılaştırma yapılır. Hesaplanan F değerinin tablodan okunan değerden büyük olması durumunda, kullanılan regresyon modelinin sistemi matematiksel olarak ifade ettiği kabul edilebilir.

Çizelge 2.30. Deneysel tasarım yönteminde kullanılan modelin ANOVA (Analysis of Variance) testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	Serbestlik derecesi	Karelerin toplamı	Karelerin oranı	F
Model	f ₃	$\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	SSM/f ₃	MSM/MSE
Hata	f ₂	$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	SSE/f ₂	
Toplam	f ₁		SST/f ₁	

Cevabın önceden bilindiği optimizasyonda X₁, X₂,..., X_k'nin optimum değerlerinin bulunması amaçlanmaktadır. Yapılan optimizasyon doğru ise, X₁, X₂,..., X_k'nin kısmi türevleri olacaktır. Bu noktalar X_{1S}, X_{2S},..., X_{kS} durgunluk noktası (stationary point) olarak adlandırılmaktadır. Durgunluk noktası, 1. maksimum cevabın, 2. minimum cevap noktasının ya da 3. Yükleme noktasının (saddle point) bulunmasında yardımcı olabilir.

Öngörülen regresyon modelinin kabul edilebilir (canonical) analizinin yapılması gereklidir. Elde edilen modelin daha açık bir şekilde değerlendirilmesi için çizim (eş derişim eğrileri "countour plot") gerçekleştirilir. Modelde ikiden fazla bağımsız değişken var ise, bu harita çizimi ile iç etkileşimi yorumlamak daha kolaydır. Birkaç değişkenin bulunduğu biçimsel analize kabul edilebilir (canonical) analiz adı verilir ve çok kullanışlıdır. X_S doyunluk noktasının orjini olmak üzere yeni koordinat sistemine geçiş gerçekleştirilir. Daha sonra da bu sistemin eksenleri döndürülerek iç etkileşimlerin belirlenmesi gerçekleştirilir.

2.8.3. Cevap yüzey yönteminin kullanıldığı çalışmalar

Laboratuvar ölçekte geliştirilen bir sentezin, pilot ölçekli bir prosese aktarılması için optimizasyon yapılması gerekir. Böylece deney sayısı azaltılarak maliyet düşürülür. En uygun koşullarda çalışılarak yüksek verimde ürün elde edilebilir. RSM yöntemi Kimya Mühendisleri için çok sayıda araştırmanın optimizasyonu için kullanılabilir. Bunlardan bazıları, HDTMA-Bentonitine fenol adsorpsiyonu (Yıldız et al. 2000) ve benzoik asit adsorpsiyonu (Kapucu et al. 2003a), süperkritik akışkanlarda katıların çözünürlüğünün modellenmesi (Garcia et al. 2000), patates cipslerinin hazırlanması sırasında hurma oleini'nin rafinasyonu, ağartılması ve kokun giderilmesinde doğal antioksidanların kullanılması (Jaswir and Che Man 1999) vb.

Biyoteknolojide RSM yönteminin kullanımı da giderek artmaktadır. Bunlardan bazıları, DL-triptofan'ın ayrılması (Bayraktar 2001); sitrik asitin ekstraktif fermentasyonu (Kılıç et al 2002); kolesterol oksidaz üretimi (Lee et al. 1999); *Candida cylindracea* lipazı üretimi (Muralidhar et al. 2001); *Aspergillus niger* pektinolitik aktivite üretimi (Taragano and Pilosof 1999); fenil etanolden fenil asetaldehit üretimi (Kapucu 2000); fındık kalıntılarının enzimatik parçalanması ile fındık sütü elde edilmesidir (Rastogi et al. 1998).

Enzim katalizli esterleşme ve taransesterleşme tepkimelerinin çoğu lipazlar kullanılarak RSM yöntemi ile optimize edilmektedir. Örnek olarak, biyodizel üretimi (Wu et al. 1999, Uosukainen et al. 1999); vaks ester sentezi (Halberg et al. 1999); oleyil oleat (vaks ester) üretimi (Kapucu et al. 2003b); laktik asit ve palmitik asitten palmitoyl laktik asit üretimi (Kiran et al. 2000); stearoyl laktik asit esterinin üretimi (Kiran et al. 1999); metiloleatın hidrolizi (Murthy et al. 2000); izopropil palmitat sentezi (Garcia et al. 1999); jeranil bütirat (Shieh et al. 1996), sitronelil bütirat (Shieh and Lou, 2000), heksil asetat (Shieh and Chang 2001) izoamil bütirat (Hari Krishna et al. 1999), izoamil asetat (Hari Krishna et al. 2000, Güvenç et al. 2003), izoamil izovalerat (Chowdary et al. 2000) gibi tat ve koku esterlerinin sentezi; enzimatik interesterleşme ile yapısal lipidlerin çözücüsüz ortamda (Xu et al. 1998) ve sürekli işletilen dolgulu kolonda (Xu et al. 1999) üretimi; beta glukozidaz ile bütiril glukozit üretimi (İsmail et al. 1998) verilebilir.

Literatürde oleyil oleatın kimyasal ve atmosferik koşullarda enzimatik üretiminin Cevap Yüzey Yönteminin (Response Surface Methodology, RSM) uygulanarak optimizasyonu ile ilgili birkaç çalışma bulunmakla beraber, SC koşullarda enzimatik oleyil oleat üretiminin deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimizasyonu ile ilgili bilgi yer almamaktadır.

Martinez vd (1988), jojoba yağının sentetik analogu olan oleyil oleatın, kobalt klorür katalizör ile oleyik asitin oleyil alkol ile esterleşmesi ile üretimini incelemişler; proses değişkenlerinin etkisini incelemek amacıyla iki seviyeli, 2^3 faktöriyel tasarımı kullanmışlardır. Sıcaklık, başlangıç katalizör derişimi, başlangıç alkol-asit molar oranını değişkenler olarak seçildiği deneylerde reaksiyon süresi ve basınç sabit tutulmuş; oluşan ester miktarı sıcaklıkla artmıştır.

Coteron vd (1993), kobalt klorür ile jojoba yağ analogunun sentezlenmesini geliştirmek ve optimize etmek amacıyla merkezi kompozit tasarımı kullanmışlardır. Seçilen

değişkenler, reaksiyon sıcaklığı, başlangıç katalizör derişimi ve çalışma basıncıdır. Sıcaklık esterleşme prosesinde en önemli faktördür ve etkisi pozitiftir. Basıncın etkisi negatif, katalizör derişiminin etkisi pozitif olmuştur. Optimum koşullarda verim %82 olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel bir analiz yöntemi kullanılarak, tutuklanmış *Mucor miehei* lipase (Lipozyme) ile oleyil oleatın çözücüsüz ortamda üretiminin optimize edildiği tek bir çalışma (Garcia et al. 1993) yer almaktadır. Üretim vakum basıncında gerçekleştirilmiş, iki seviyeli 2³ faktöriyel tasarım kullanılmış; 10 g başlangıç katalizör derişimi, 60 mmHg basınç, 70 °C sıcaklıkta başlangıç asit/alkol molar oranı 1 alınarak 3 saat tepkime süresi sonunda %73 maksimum verim elde edilmiştir.

Cevap yüzey yönteminin SC koşullardaki enzimatik üretim için uygulamaları az sayıdadır.

Oliveira et al. (1999), Lipozyme IM ve Novozyme 435 katalizörleri ile, hurma yağının etanol ile enzimatik transesterleşmesini (alkoliziz) hekzan ve SC-CO₂ ortamında gerçekleştirerek kıyaslamışlardır. Proses değişkenlerinin dönüşüm üzerine etkisini incelemek ve optimum işletme koşullarını belirlemek amacıyla, 2 seviyeli ve dört değişkenli (hekzan ortamında sıcaklık, su derişimi, enzim derişimi ve yağ/etanol molar oranı etkisi, SC-CO₂ ortamında ise sıcaklık, basınç, su derişimi ve yağ/etanol molar oranı etkisi) Taniguchi deneysel tasarımını kullanmışlardır. En yüksek verim, hekzan ortamında Lipozyme IM ile %77.5 olarak SC-CO₂ ortamında ise Novozyme 435 ile %63.2 olarak belirlenmiştir. Her iki ortamda benzer sonuçlar elde edilmesine karşın SC-CO₂ ortamında elde edilen ürün çözücü içermemesi nedeniyle üstündür.

2.9. Oleyil Oleat Üretimi ile İlgili Çalışmalar

Literatürde oleyil oleatın kimyasal, enzimatik ve SC akışkan ortamında enzimatik üretimi ile ilgili olarak yer alan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

2.9.1. Kimyasal üretim

Sanchez vd. (1992), kobalt klorür katalizör ile jojoba yağ analogunun homojen sıvı faz üretim kinetiğini karıştırmalı tank reaktörde incelemişler; 16mmHg basınç ve 700rpm karıştırma hızında, farklı sıcaklık, katalizör derişimi ve asit/alkol molar oranında yapılan araştırma sonunda, deneysel sonuçlarla uyum gösteren matematik model geliştirmişlerdir.

Aracil vd. (1992) jojoba yağ analogunu, ultra kararlı Y Zeolit katalizör kullanarak oleyik asit ve oleyil alkolün esterleşmesiyle elde etmişlerdir. 1 atm, 150°C ve 2000 rpm'de kesikli reaktörde yapılan deneyler sonunda, katalizörün 38 ve daha fazla karbon atomlu ester oluşumunu katalizlemediği, 32-34 ve 36 karbon atomlu esterler için oldukça aktif ve seçimli olduğu belirlenmiştir. Reaksiyon katalizörün dış kabuğunda gerçekleşmiş, kristal büyüklüğü ve yüzey bileşimi, aktivite ve seçimliliği kontrol eden önemli parametreler olmuş; SnCl₂ katalizör ile %80 , Zeolit katalizör ile %60 verim elde edilmiştir.

2.9.2. Atmosferik koşulda enzimatik üretim

Jojoba yağının 1933 yılında ilk olarak bulunmasından sonra, bu yağın sentetik analogu olan oleyil oleatın lipaz katalizörlüğünde üretimi ile ilgili birkaç çalışma vardır. Oleyiloleatın lipaz katalizli sentezi genel olarak çözücüsüz ortamda gerçekleştirilir. Bununla birlikte sulu ortamda (Ishii et al. 1990), bifazik ortamda (Antzac et al. 2001), organik çözücü ortamlarında (Bloomer et al. 1992, Hadzir et al. 2001) ve mikroorganizmalar kullanılarak (Kaneshiro et al. 1996) da üretilmektedir.

Okumura vd., (1979), *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* ve *Penicillium cyclopium* lipazları ile oleyik asitin farklı alkollerle ve oleyil oleatın farklı asitlerle esterleşmesinin incelemiştir. 30°C'de 200rpm koşullarında 16 saat süren deneyler sonunda, *R. delemar* lipazı ile %94 verim elde edilmiştir.

Miller et al. (1988), tutuklanmış lipaz (lipozyme) katalizli oleyil oleat sentezini vakum altında gerçekleştirerek tepkime ile oluşan suyu sürekli olarak uzaklaştırmışlar; 1/1 oleyik asit- oleyil alkol mol oranı ve 1.0 g Lipozyme/0.05 mol asit katalizör miktarı ile 70 °C sıcaklıkta yaptıkları deneylerde 2 saat sonunda %100 dönüşüm elde etmişlerdir.

Çözücüsüz ortamda Lipozyme kullanılarak stokiometrik miktarda oleyik asit ve oleyil alkol (1mmol) esterleşmesinin incelendiği diğer bir çalışmada (Mukherjee and Kiewitt 1988), tepkime sırasında ortamdan su uzaklaştırılmamış ve 2 saat sonunda ester derişimi, 15µmol/mg enzim olarak belirlenmiştir.

Garcia vd (1996), katalizör olarak ticari *Candida antarctica* lipazını kullanarak farklı zincir uzunluğunda ve fiziksel özellikte çeşitli esterlerin (oleyl oleat, izopropil oleat, izopropil palmitat, miristol miristat, setil oleat, oleyil 2-metil bütirat) üretimini 250 ml

hacımlı kesikli karıştırılmalı reaktörde, farklı sıcaklıklarda ve 600rpm karıştırma hızında gerçekleştirerek reaksiyon kinetiğini incelemişlerdir. Mekanizma açıl-enzim araürünün oluşması ve sonra alkol molekülünün katılması ile ester ve suyun oluşumuna dayanan kinetik modelde reaktant ve ürünlerin inhibisyon terimlerini içeren bir mekanizma kullanılarak genel bir eşitlik türetilmiş ve her bir esterleşme tepkimesi için farklı terimlerin büyüklüğüne bağlı olarak farklı kinetikler elde edilmiştir. 80°C’de oleyil oleata dönüşüm %75 olmuştur.

Poisson vd.(1999), süt yağında bulunan yağ asitlerinin (miristik, palmitik, stearik ve oleyik asit) oleyil alkol ile transesterleşmesiyle, beş farklı lipaz kullanarak vaks esterlerin oluşumunu incelemişlerdir. Asit/alkol mol oranı 1:1 alınarak, 60°C ve 1000 rpm karıştırma hızında 166 saat süre ile yapılan deneylerde; ester sentez verimi *Alcaligenes sp.* ile 2 saatte %56; *Chromobacterium viscosum* ile 48 saatte %64; derişik Enzeco lipazı (*Candida rugosa*) ile 2 saatte %31; ve Enzeco lipaz XX ile 166 saat sonunda %18 olarak belirlenmiştir.

Habulin et al. (1996), *Rhizomucor miehei*’den tutuklanmış lipazı (Lipozyme) kullanarak oleyik asit ile farklı primer alkoller arasındaki esterleşme tepkimelerini inceledikleri çalışmalarında, eşmolar substrat karışımı (47 mmol) ve enzim/substrat kütle oranını 0.05 kullanılarak 60 °C sıcaklıkta ve 7 saat sonunda 1.4 mmol oleyil oleat / (g reaksiyon karışımı) derişimine ulaşmışlar; maksimum tepkime hızını da 1.429mmol/g.st olarak belirlenmiştir.

Isono et al (1998), membran reaktör ve lipaz-surfaktant kompleksini kullanarak oleyil alkol ve oleyik asitin çözücüsüz ortamda esterleşmesini incelemişlerdir. 10 mmol oleyik asit, 10 mmol oleyil akol, 1000mg su, 300 mg enzim kullanılarak 500 rpm ve 50 °C sıcaklıkta yapılan deneylerde 24 saat sonunda %70 dönüşüm elde edilmiştir.

Oleyil oleat sentezinin çözücüsüz substrat köpüğünde (substrate foam) gerçekleştirildiği bir diğer çalışmada (Rao and Shanmugam 2000), ester oluşumunun 2 saat içinde tamamlandığı belirtilmiştir.

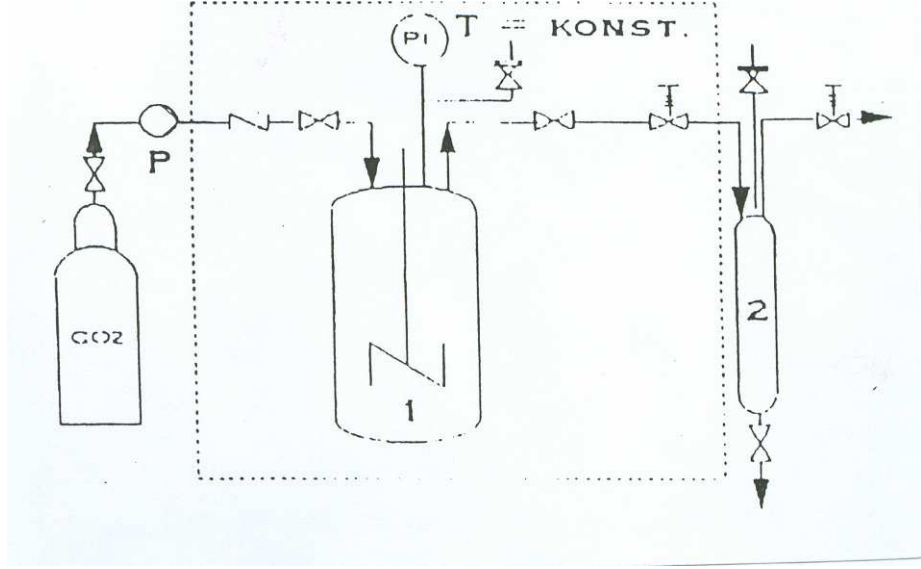
2.9.3. Süperkritik koşulda enzimatik üretim

Oleyil oleatın SC-CO₂ ortamında enzimatik üretimi ile ilgili olarak 1992 yılında başlayan ve tek bir araştırma grubu tarafından yürütülen çalışmada (Knez and Habulin 1994, Knez et al. 1995, Habulin et al. 1996a, 1996b, Knez et al. 1998, Habulin et al. 1999, Krmelj et al. 1999, Knez and Habulin 2002) Lipozyme IM kullanılarak hem atmosferik koşullarda hem de kesikli ve sürekli SC koşullarda üretim gerçekleştirilmiş; süperkritik ve kritik yakını koşullarda enzim aktivite ve kararlılıkları incelenmiştir (Habulin and Knez 2001a,b).

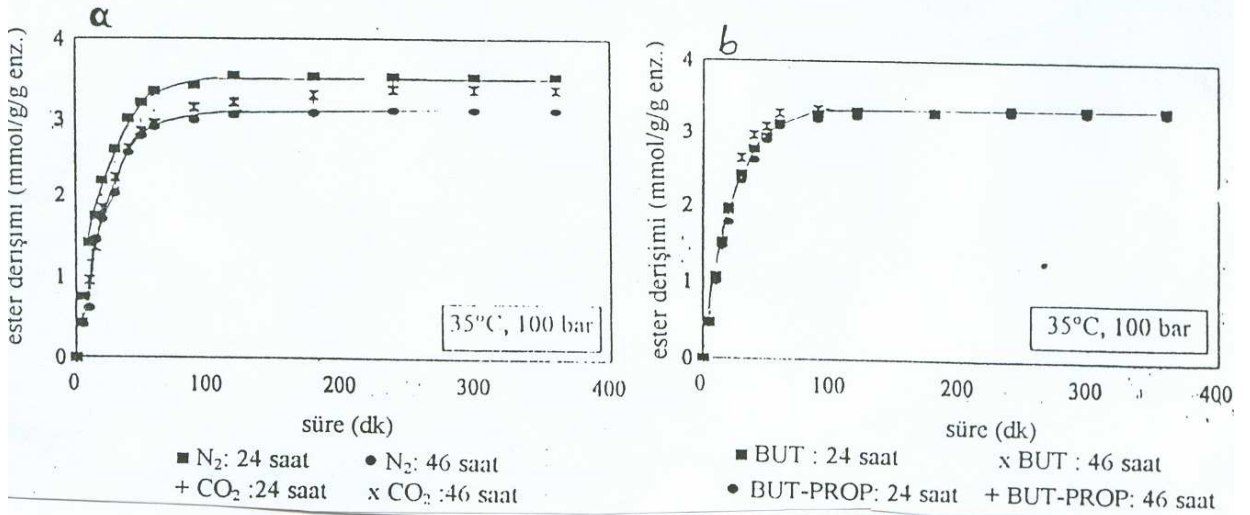
Atmosferik koşullarda eşmolar oleyik asit (47 mmol)-oleyl alkol (47 mmol) kullanılarak yapılan deneylerde en uygun sıcaklık 50°C, enzim/substrat kütle oranı 0.05 (1.04 g) ve 50°C'deki maksimum hız 1.429mmol/g reaksiyon karışımı/h olarak belirlenmiş, 6 saat sonunda 1.5 mmol/g/g enzim ester derişimi elde edilmiş (Knez et al 1995); 60 °C'de yapılan deneyde 7 saat sonundaki oleyil oleat derişimi 1.4 mmol/g reaksiyon karışımı olmuştur (Habulin et al. 1996).

2.9.3.1. Süperkritik koşullarda enzim kararlılığı

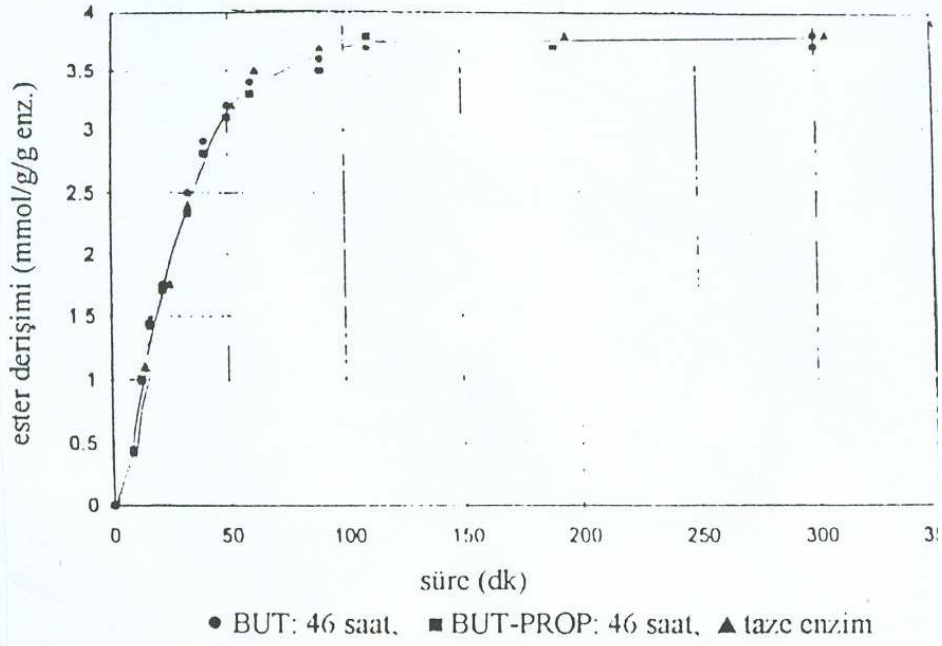
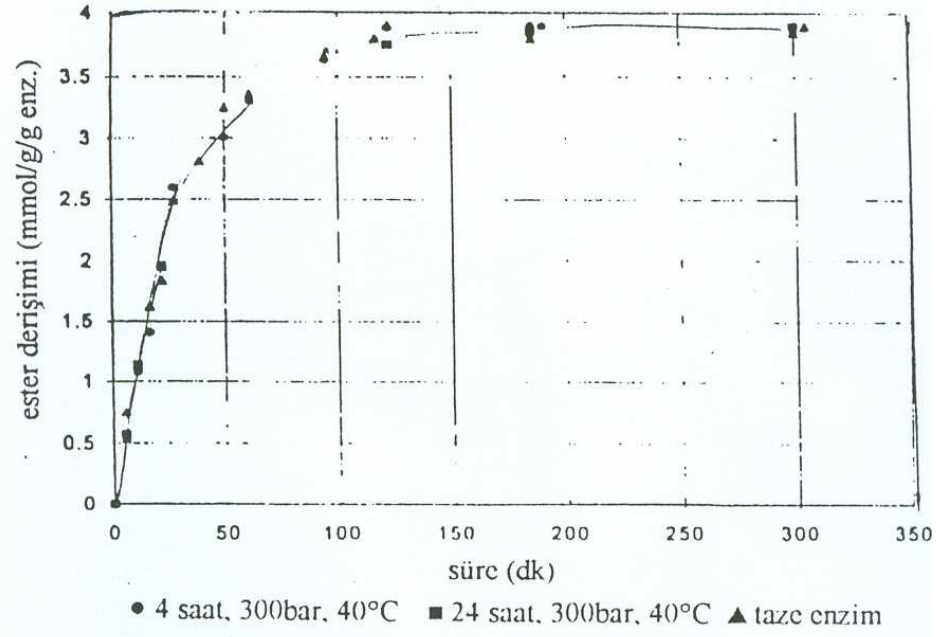
SC koşullardaki enzim (Lipozyme IM) kararlılığı ve oleyil oleat üretimi için kullanılan reaktör 0.5 L hacimli ve 500atm'ye dayanıklıdır (şekil 2.35). CO₂, n-bütan, n-bütan/n-propan, N₂ ortamında 300 bar ya da 100bar basınçta ve belli bir sıcaklıkta bekletilen enzimler bu ortamlarda kararlı olmuş, sadece azot ortamında sürenin artmasıyla aktivitede biraz düşme gözlenmiştir (şekil 2.36 ve şekil 2.37) (Knez et al. 1998, Krmelj et al 1999).



Şekil 2.35. Yüksek basınçta oleyil oleat sentezi için kesikli reaktör
1.reaktör, 2.seperator, P,yüksek basınç pompası, PI, basınç göstergesi
(Krmelj et al. 1999, Knez et al. 1998, Knez and Habulin 2002)



Şekil 2.36. Çözücüsüz ortamda oleyil oleat sentezi (50°C ve 1 atm)
a) N₂ ve SC-CO₂ atmosferinde tutulan enzim
b) Yüksek basınçlı hidrokarbon atmosferinde (100 bar ve 35°C) tutulan enzim
(Krmelj et al. 1999, Habulin et al 1999)



şekil 2.37. Çözücüsüz ortamda oleyil oleat sentezi (60°C ve 1 atm)

a) Taze enzim ve SC-CO₂ atmosferinde tutulan enzim

b) Taze enzim ve yüksek basınçlı hidrokarbon atmosferinde (100 bar ve 35°C) tutulan enzim (Habulin et al 1999, Knez et al. 1998)

2.9.3.2. Süperkritik koşullarda kesikli reaktörde oleyil oleat üretimi

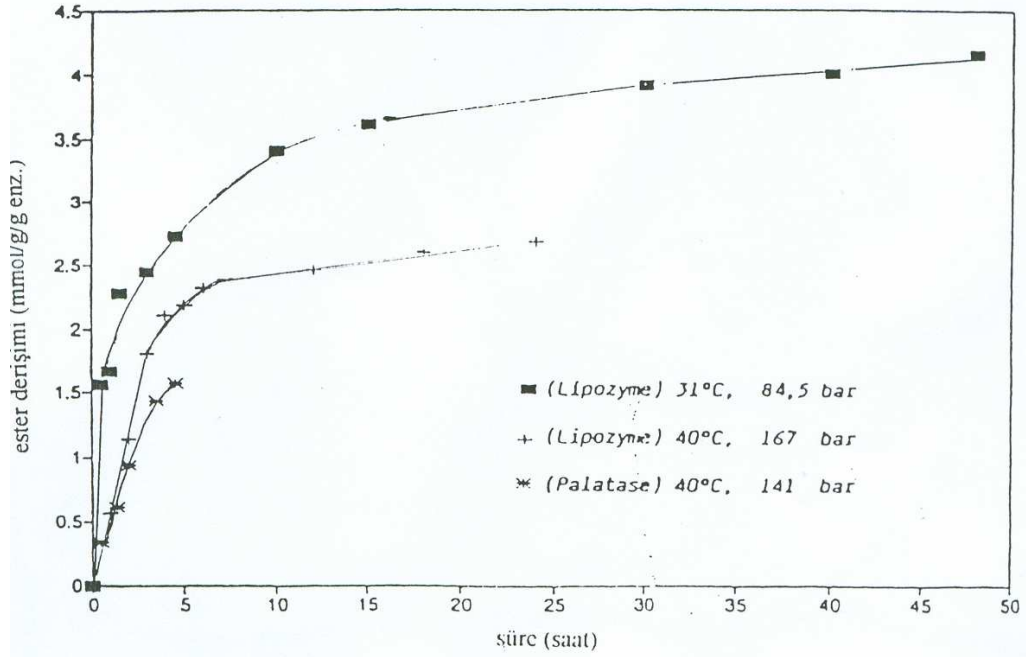
150 ml hacimli 500 atm'ye dayanıklı olan kesikli reaktörde (şekil 2.35) karıştırma osilasyonla (frekansı 60/dak) sağlanmış; tüm sistem sabit bir sıcaklık banyosuna yerleştirilmiştir. 25 mmol oleyik asit ve 25 mmol oleyil alkolden oluşan reaksiyon karışımı reaktöre pompalanmış ve 0.5 g enzim eklenmiştir. Sonra kuru CO₂ istenen basınca dek pompalanmıştır (Knez et al. 1995, Knez et al. 1998, Krmelj et al. 1999).

SC koşullarda kesikli reaktörde ester üretimi için SC-CO₂ ve basınçlandırılmış n-bütan, n-bütan/n-propan karışımı (70:30) kullanılmış, her üç ortamda da benzer verimler elde edilmiş; ancak dönüşüm, n-bütan ortamında 20 bar ve 20°C'de 5 saat sonunda %87 iken SC-CO₂ ortamında 100 bar ve 50°C'de sadece 1 saatte %86 olmuş; en yüksek dönüşüm 50°C ve 80 barda %90 olarak elde edilmiştir. Kütle aktarım kısıtlamalarının etkileri incelenmiş ve difüzyon kısıtlamalarının, SC koşullarda atmosferik koşuldakinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Lipozyme ve Palatase 1000L ile SC-CO₂'de oleyil oleat üretiminin zamanla değişimine sıcaklık ve basıncın etkisini veren şekil 2.38'den görüldüğü gibi 31°C ve 84.5 bar'da üretim en yüksektir. Bu deneylerde elde edilen başlangıç tepkime hızları çizelge 2.31.'de verilmiştir.

Çizelge 2.31. Oleyil oleat üretimine sıcaklık ve basıncın etkisi (Knez and Habulin 1994).

		r_i , mmol/g/h
Lipozyme	31°C ve 84.5 bar	1.428
	40°C ve 167 bar	0.615
Palatase 1000L	40°C ve 141 bar	0.454



Şekil 2.38. Oleyil oleat derişiminin zamanla değişimine sıcaklık ve basıncın etkisi (Knez and Habulin 1994, Knez et al. 1995, Habulin et al. 1996,

Farklı ortamlar kullanılarak oleyil oleat üretiminde basınç ve sıcaklığın başlangıç tepkime hızına etkisi çizelge 2.32’de, denge dönüşümüne etkisi ise çizelge 2.33.’de verilmiştir. 20°C’de üç ortam kıyaslandığında n-bütan ve n-propan/n-bütan ortamında elde edilen başlangıç hızları SC-CO₂’de elde edilen hızlardan daha yüksektir. Sıcaklığın artmasıyla beklendiği gibi her üç ortamda da tepkime hızı artmaktadır. 50°C’de sadece CO₂’in kritik basıncının altındaki basınçlarda (< 72atm) n-bütan ve n-propan/n-bütan ortamındaki hızlar daha yüksektir. Ancak CO₂’in kritik basıncın yukarısında (>72atm) basıncın artmasıyla CO₂ ortamında tepkime hızı artarken, n-bütan ortamında tepkime hızı azalmış, n-propan/n-bütan ortamında ise değişme olmamıştır. En yüksek tepkime hızı CO₂ ortamında 50°C ve 250bar’da elde edilmiştir (çizelge 2.32).

Üç farklı ortamdaki denge dönüşümleri incelendiğinde n-bütan ortamında basınç ve sıcaklığın denge dönüşümüne hiçbir etkisi olmamış; sabit bir basınç değerinde sıcaklığın artmasıyla CO₂ ortamında denge dönüşümü artarken, n-propan/n-bütan ortamında dönüşüm sıcaklıkla azalmıştır. CO₂ ortamında her iki sıcaklıkta da basıncın artmasıyla denge dönüşümünde biraz azalma olmuş, diğer ortamlarda sabit sıcaklıkta basıncın etkisi olmamıştır. n-bütan ortamında 20bar ve 20°C’de 5 saatte %87 dönüşüm

olurken, SC-CO₂ ortamında 100bar ve 50°C’de sadece 1saatte %86 dönüşüm elde edilmiştir (çizelge 2.33). Oleyik asit ve oleyil alkolün diğer iki ortamda çözünürlüklerinin daha yüksek olmasına rağmen, SC-CO₂ ortamı daha uygun bulunmuştur. Denge dönüşümüne SC-CO₂ ortamında basınç ve sıcaklık etkileri ayrıca çizelge 2.34’de verilmiştir. Sabit bir sıcaklıkta basıncın artmasıyla denge dönüşümü düşmektedir. Yüksek basınçta enzimden daha fazla su sıyrılmakta ve verim düşmektedir. Sabit bir basınçta sıcaklığın artmasıyla denge dönüşümü önce artmakta sonra azalmaktadır. En yüksek dönüşüm 50°C ve 80 bar’da %90 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 2.32. Yüksek basınçlı kesikli reaktörde 20°C ve 50°C’de farklı tepkime ortamlarında başlangıç tepkime hızları (mmol / g reaksiyon karışımı/h) (Krmelj et al. 1999, Knez and Habulin 2002, Habulin et al 1999)

Basınç (bar)	CO ₂		n-bütan		n-propan:n-bütan	
	20°C	50°C	20°C	50°C	20°C	50°C
20	-	-	4	9	6	8
35	1.7	5.7	4.4	9	6	8
100	1.4	7	4.8	8	5	7
150	1.4	9	5	6	5	8
250	1.5	13	5.3	5	-	8
350	-	12	4	-	-	-

Çizelge 2.33. Yüksek basınçlı kesikli reaktörde 20°C ve 50°C’de farklı tepkime ortamlarında denge dönüşümü (Krmelj et al. 1999, Knez and Habulin 2002)

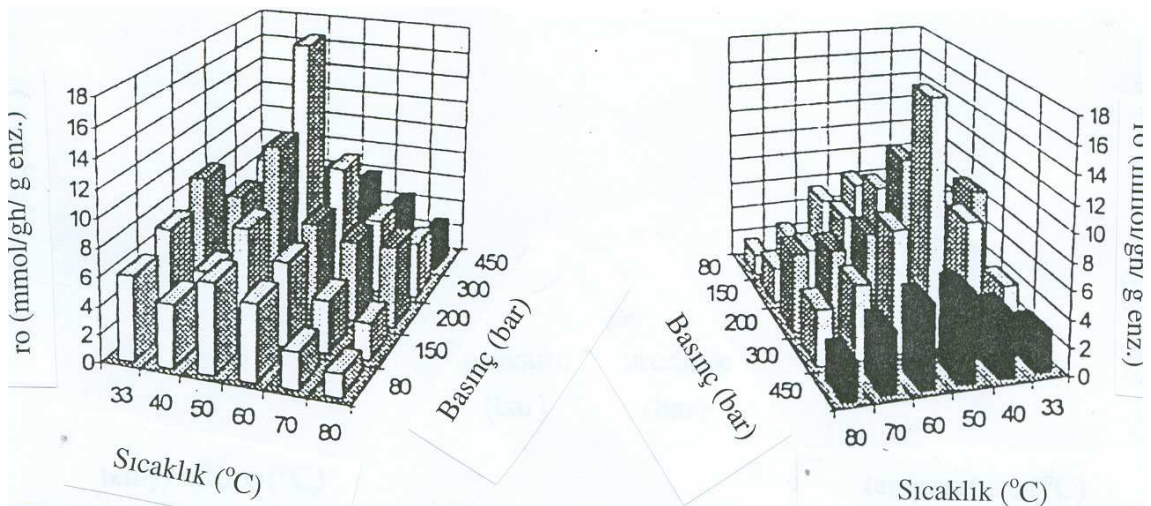
Basınç (bar)	CO ₂		n-bütan		n-propan:n-bütan	
	20°C	50°C	20°C	50°C	20°C	50°C
20	84.5	86.5	87.1	86.2	84.3	83.2
35	83.1	86.1	86.4	85.0	85.2	84.0
100	85.2	86.0	85.2	85.1	86.6	83.6
150	80.4	82.3	85.0	85.1	86.5	83.2
250	78.2	82.0	85.2	85.6	86.3	83.2
350	78.1	80.1	85.0	86.3	85.2	83.0

Çizelge 2.34.Yüksek basınçlı kesikli reaktörde sıcaklık ve basıncın denge dönüşümüne (kütle/kütle) etkisi (Knez et al. 1998, Knez and Habulin 2002)

Sıcaklık (°C)	Basıncı (bar)				
	80	150	200	300	450
40	84	83	83	80	80
50	90	86	84	83	81
60	87	88	84	83	82
70	86	84	76	77	77
80	86	76	76	75	71

Oleyil oleat üretiminde başlangıç tepkime hızlarına basınç ve sıcaklığın etkisi şekil 2.39'da verilmiştir. 40-60°C sıcaklık aralığında başlangıç tepkime hızları basıncın 80bar'dan 300bar'a artmasıyla artmış, daha yüksek basınçlarda azalmıştır. Daha yüksek sıcaklıklarda (70 ve 80°C) maksimum başlangıç hızları 200bar'da gözlenmiştir. 80-300bar basınç aralığında sıcaklığın etkisi atmosferik basıncıtakine benzer olmuştur. Esterleşme için optimum sıcaklık 50°C'dir. Bunun altındaki ve üzerindeki sıcaklıklarda enzim daha az aktiftir.

Kütle aktarım kısıtlamalarının etkileri incelenmiş ve difüzyon kısıtlamalarının, SC koşullarda atmosferik koşuldakinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir

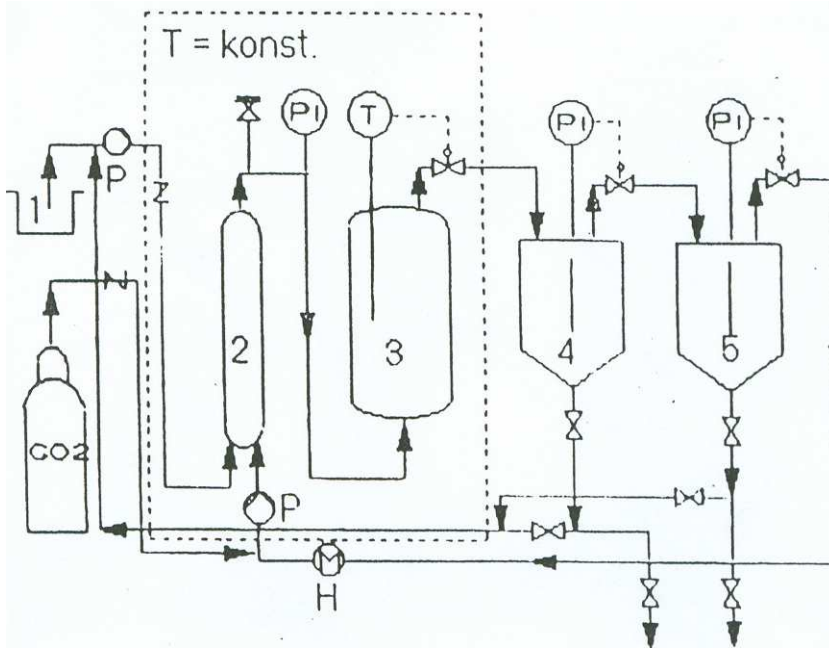


Şekil 2.39. Kesikli reaktörde basınç ve sıcaklığın başlangıç tepkime hızına etkisi (karıştırma hızı 600rpm, enzim/substrat=0.04) (Habulin et al 1996).

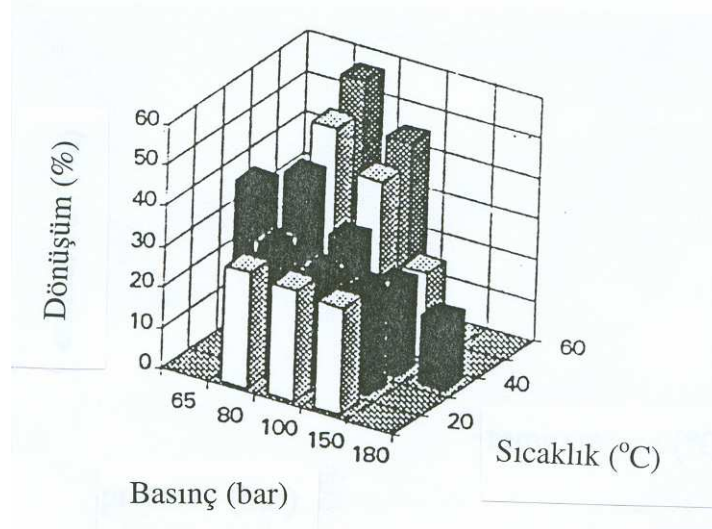
2.9.3.2. Süperkritik koşullarda sürekli reaktörde oleyil oleat üretimi

Oleyil oleatın sürekli reaktörde üretiminde kullanılan deney sistemi şekil 2.40'da verilmiştir. CO₂ moleküler elek dolu bir kolondan geçirilerek kurutulmuş ve hava ile çalışan bir yüksek basınç pompası ile sisteme verilmiştir. Substratlar HPLC pompası ile pompalanmıştır. CO₂ ve substratlar doyurma kolonunda (2) dengeye getirilmiştir. Reaksiyon sabit yatak reaktörde (50cm uzunluk, 0.45cm iç çap, 7.95 mL hacimde, 0.5g lipozyme ile doldurulmuş) (3) gerçekleştirilmiştir. Substrat beslemesi oleyik asit ve oleyil alkolün eşmolar (1.81mmol/g) çözeltileridir. Reaktör çıkışındaki basınç düşürme vanaları ile CO₂'nin basıncı düşürülerek her birinin hacmi 5.3 mL olan (30cm uzunluk, 1.6cm iç çap) iki ayırma kolonuna (4 ve 5) gitmesi sağlanır. İkinci ayırıcıda toplanan substratlar besleme akımına geri döndürülür. Gaz CO₂ akış hızı rotametrede ölçüldükten sonra atmosfere verilir (Knez et al. 1998, Knez et al.1995, Krmelj et al. 1999).

Sürekli sistemde oleyil oleat üretimine, sıcaklık, basınç, çözücü akış hızı, kütle aktarım (substrat akış hızı) ve suyun etkisi incelenmiş; denge dönüşümüne sıcaklık ve basıncın etkisi şekil 2.41'de verilmiştir. Yapılan deneyler, en yüksek aktivitenin CO₂'nin kritik yakını basınçlarında elde edildiğini göstermiştir. 60°C ve 80 bar'da %55 dönüşüm gözlenmiştir. Kritik noktanın üzerindeki sıcaklıklarda basıncın dönüşüme etkisi fazla olmuştur. Örneğin 50°C ve 80bar'da %45 olan dönüşüm, 150bar'da %15'e düşmüştür. Kritik sıcaklığın altındaki sıcaklıklarda basıncın dönüşüme etkisi fazla olmamıştır. Substrat-sıvı CO₂ karışımının yüksek viskozitesi ve daha düşük yayınma nedeniyle, CO₂'nin kritik sıcaklığının altında reaksiyon verimleri daha düşük olmuştur. En yüksek dönüşüm süperkritik CO₂ ile 40 °C ve 80 barda elde edilmiş; aynı enzim ile bir ay sürekli işletimde dönüşümde %2 düşme (%84'den %82'ye) olmuştur (Knez and Habulin 2002).



Şekil 2.40. Yüksek basınçta oleyil oleat sentezi için sürekli reaktör
 1.substratlar, 2.doyurma kolonu, 3.enzimatik reaktör, 4,5.ayırıcılar,
 P. yüksek basınç pompası; PI, basınç göstergesi; T, sıcaklık göstergesi;
 H ısı değiştirici (Knez et al. 1998).

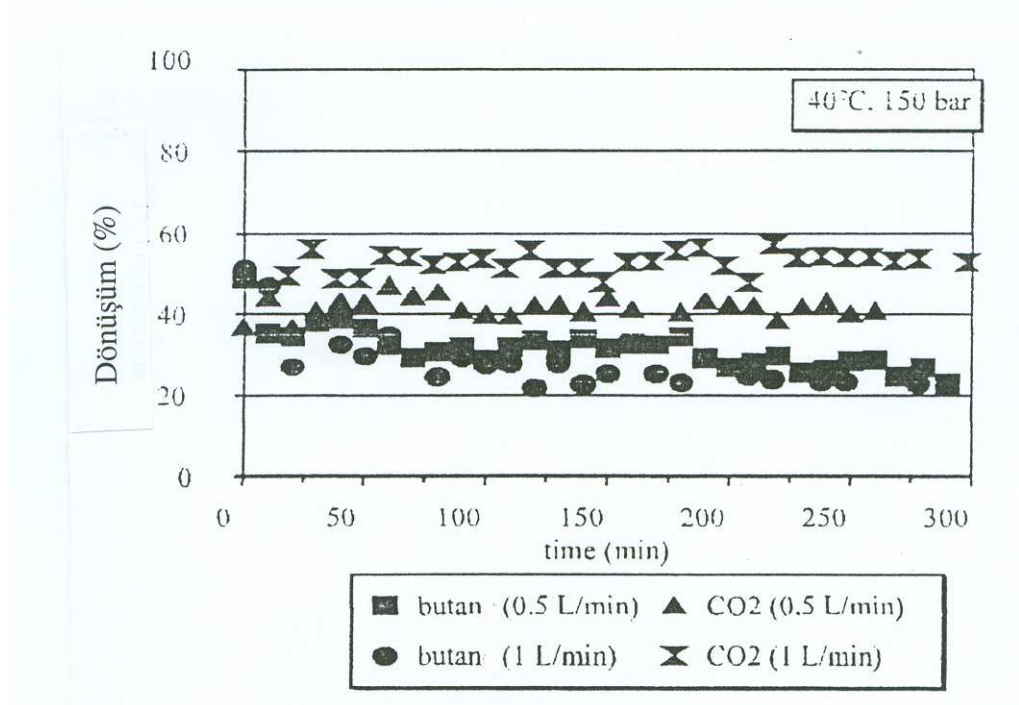


Şekil 2.41. Sürekli sistemde denge dönüşümüne sıcaklık ve basınç etkisi
 (CO₂, su içeriği %0.46 kütle/kütle)
 (Knez et al. 1998, Knez and Habulin 2002, Habulin et al. 1996)

150bar ve 40°C’de sürekli sistemde n-bütan ve SC-CO₂ kullanılarak 0.5 ve 1 L/dk akış hızlarında yapılan deneylerde dönüşümün zamanla değişimi şekil 2.42’de verilmiştir. CO₂ ortamında akış hızının artmasıyla dönüşüm artmış ve her iki akış hızında da dönüşüm sabit kalmıştır. Yağ asit bileşenlerinin çözünürlüğünün n-bütan ortamında SC-CO₂ ortamındakinden daha yüksek olması nedeniyle deneyler n-bütan ortamında da yapılmış, ancak bu ortamda enzimin deaktive olması nedeniyle aktivite düşmüştür. Başlangıçta %50 olan dönüşüm 300dk sonra %22’ye düşmüştür.

Suyun etkisinin incelendiği deneylerde, kuru CO₂ kullanılmış ve su ortama substratlarla eklenmiş, düşük nem içeriğinde yüksek olan dönüşüm, su miktarının artması ile azalmıştır.

Dönüşüme substrat akış hızı (kütle aktarımı) etkisi incelenmiş; 150bar ve 40°C’de CO₂ akış hızı 0.8L/dk değerinde sabit iken, substrat akış hızı 0.14-0.35mL/dk aralığında değiştirilerek yapılan deneyler sonunda, daha düşük substrat akış hızlarında sistemin daha fazla seyrelmesi nedeniyle daha yüksek verimler elde edilmiştir.



Şekil 2.42. Sürekli sistemde denge dönüşümünün zamanla değişimine akış hızının etkisi (P=150 bar, T=40°C, Q_{SUBS.}=0.143 L/dk, su içeriği %0.46) (Knez et al. 1995, Knez et al. 1998, Knez and Habulin 2002,

2.10. Oleyik Asit ve Oleyil Alkolün Fiziksel Özellikleri

Oleyil alkolün (cis-9-oktadeken-1-ol) fiziksel özellikleri çizelge 2.35'de, oleyik asitin fiziksel özellikleri ise çizelge 2.36'da verilmiştir.

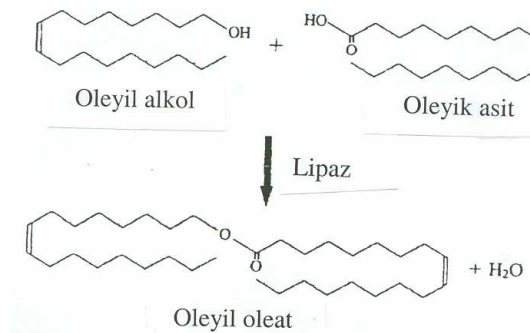
Çizelge 2.35. Oleyil alkolün fiziksel özellikleri

Kapalı formülü	C ₁₈ H ₃₆ O
Görünümü	Açık sarı ve viskoz
Molekül ağırlığı	268.49
Özgül ağırlığı	0.85 g/cm ³
Erime noktası	4 °C
Kaynama noktası	207 °C (17 mmHg)
Sudaki çözünürlüğü	çözünmez

Çizelge 2.36. Oleyik asitin fiziksel özellikleri

Kapalı formülü	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Görünümü	Açık sarı ve viskoz
Molekül ağırlığı	282.47
Yoğunluğu (°C)	0.89 g/cm ³ (25), 0.863 (60)
Erime noktası	16 °C
Kaynama noktası	260 °C (53 mmHg) 80°C'nin üzerinde bozunur
Viskozite mPa.s (°C)	27.64 (25), 4.85 (90)
Kırılma indisi n _D ^t (°C)	1.4449 (60)
Sudaki çözünürlüğü	çözünmez

Jojoba yağının yüksek miktarlarda ekonomik olarak elde edilmesinin güç olması nedeniyle daha ucuz girdiler kullanılarak, doğal vakslara özdeş sentetik ürünlerin sentezlenmeleri önem taşımaktadır. Jojoba yağının sentetik analogu olan ve oleyil alkol ile oleyik asitin esterleşme ürünü olan oleyil oleat oluşum tepkimesi lipazın katalizör olarak kullanımı ile aşağıda verilmiştir.



3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Biyokatalizör olarak anyon değiştirici reçineye tutuklanmış olan ticari *Mucor miehei* lipazı (Lipozyme IM) ve akrilik reçineye tutuklanmış olan ticari *Candida antarctica* lipazı (Novozyme 435) (NOVO Nordisk, Danimarka) kullanılmıştır. Oleyik asit (ekstra saflıkta) ve oleyil alkol (%75 saflıkta) Merck Firmasından sağlanmışır. Hydranal Solvent Oil, Hydranal Titrant-2 ve Hydranal Titrant-5 çözeltileri Riedel Firmasından temin edilmiştir. Moleküler elek (gözenek büyüklüğü, 3Å) Sigma'dan elde edilmiştir.

3.2. Deneysel Yöntem

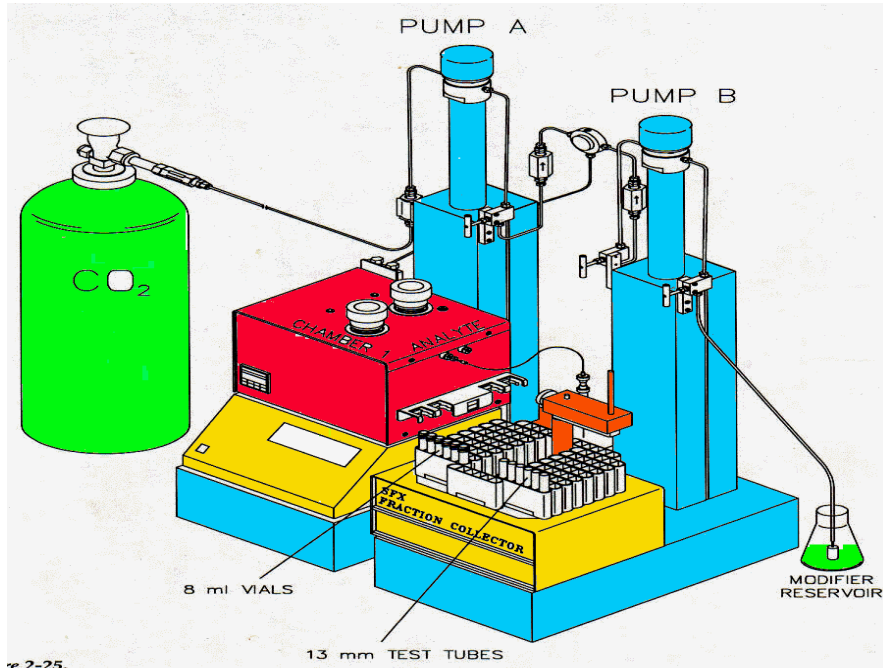
Oleyil oleatın lipaz katalizli üretimi, atmosferik koşullarda ve süperkritik CO₂ ortamında gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Atmosferik koşullarda oleyil oleat üretimi

Atmosferik koşullardaki deneyler, sıcaklık ve karıştırma hızı kontrollü orbital çalkalayıcıya (STUART SCIENTIFIC, SI 50) yerleştirilmiş olan 100 mL hacimli erlenlerde ya da yatay olarak yerleştirilmiş olan ağızları septa kapaklı 10 mL hacimli viyallerde yapılmıştır. Oleyil oleatın enzimatik üretimine enzim türü, asit/alkol mol oranı (1/7.5 - 6.67/1), enzim miktarı (%2-%10 w/w), sıcaklık (30-60 °C), karıştırma hızı (100-250rpm), suyun ortamdaki uzaklaştırılması ve çözücü (hekzan) kullanımının etkileri araştırılmıştır. Deneyler, genellikle enzim/substrat (E/S) kütle oranı %5 ve asit/alkol mol oranı 1.33/1 alınarak, 50 °C ve 250 rpm koşullarında gerçekleştirilmiştir. Belli miktarlarda oleyik asit ve oleyil alkol reaktöre konarak tepkime sıcaklığına gelmesi sağlandıktan sonra ortama belli miktarda enzim eklenerek tepkime başlatılmıştır. Belli zaman aralıklarında ortamdaki alınan örneklerdeki oleyik asit derişimleri belirlenmiş; daha sonra stokiyometrik olarak oleyil oleat derişimleri (mmol/g enzim), başlangıç hızları (mmol/g enzim/h) ve dönüşüm (oluşan oleyil oleat derişimi/başlangıç oleyik asit derişimi) değerleri hesaplanmıştır.

3.2.2. Süperkritik koşullarda dolgulu kolonda oleyl oleat üretimi

Süperkritik koşullarda dolgulu kolon reaktördeki üretim, ISCO SFX 220 süperkritik akışkan ekstraksiyon sisteminde (şekil 3.1.) gerçekleştirilmiştir. Sistemde yer alan ve bir kontrol edici ile kontrol edilebilen 100 mL hacimli iki adet şırınga pompa (ISCO, MODEL100DX) ile CO₂ ve substrat karışımı, enzim ile dolu olan ve tepkime sıcaklığına ısıtılmış olan dolgulu kolona (2.5 mL hacimli yüksek basınç hücresi) gönderilmektedir. Substratlar birbiri ile karıştırıldıktan sonra 1. pompaya doldurulmuş, 2. pompa ise dolgulu kolona CO₂ gönderilmesi için kullanılmıştır. Pompadan ayrılan iki akışkan çelik bir karışma bölümünde istenen oranda karıştırılarak tek akım halinde reaktöre girmektedir. Böylece süperkritik CO₂ dolgulu kolona girmeden önce, substratlar süperkritik CO₂ içinde çözünmektedir.



Şekil 3.1. Süperkritik koşullarda işletilen deney sistemi (ISCO SFX, 220)

Deneyleyler oleyik asit / oleyil alkol mol oranı 1 alınarak yapılmıştır. Substratlar - CO₂ karışımının farklı hacim oranlarında (substrat – CO₂, % v/v) ayarlanabilmesi, şırınga pompaların kontrol edicisi ile yapılmaktadır. Akışkanın basıncı ve akışkan akış hızı dolgulu kolon çıkışına yerleştirilmiş olan ve belli bir sıcaklığa ısıtılabilen restriktör büyüklüğünün değiştirilmesi (0.1 mL/dk - 5 mL/dk) ile otomatik olarak ayarlanabilmektedir. Restriktör çıkış ucu toplama tüpüne de daldırılmıştır. Enzim yatağı üzerinde gerçekleşen tepkimenin ardından, süperkritik CO₂'de çözülmüş olan reaksiyon ürünleri ve dönüşmeyen substratlar toplama kabına gelmeden önce ısıtılmış olan restriktörden geçerek basınç düşürülmekte ve gaz faza geçen CO₂ uzaklaşmaktadır. Farklı işletme sürelerinde toplama kabında biriken örnekler analizlenerek oleyik asit derişimleri belirlenmiştir. Dalgulu kolon enzim (1 g) ile tamamen doldurulmuştur.

3.2.3.Süperkritik akışkan ortamında enzim kararlılığı

Lipozyme RM IM aktivite ve kararlılığının incelenmesi amacıyla, SC-CO₂ ortamında, 100 mL hacimli sıcaklık kontrollu 400 atm basınca dayanıklı ekstraktör kullanılmıştır. SC koşullarda (P=200 atm ve T=50 °C) 8 saat bekletilen enzimin atmosferik koşullardaki esterleşme aktivitesi belirlenmiştir.

Novozym 435 aktivite ve kararlılığının incelenmesi amacıyla şekil 3.1'de verilen ve yukarıda sözü edilen reaktörde farklı koşullarda SC-CO₂ ortamında bekletilen enzim, atmosferik koşullarda oleyik asitin oleyil alkol ile esterleşme tepkimesinde kullanılmış ve zamanla alınan örneklerdeki oleyik asit derişimleri (ester derişimleri) belirlenerek taze enzim ile atmosferik koşullarda elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

3.3. Analitik Yöntem

3.3.1. Oleyik asit derişiminin belirlenmesi

Oleyik asit derişimleri titrasyon ile belirlenmiştir. Bunun için tepkime ortamından alınan 0.2-0.5 g örnek, 10 mL etanol (%96'lık etanol içinde kütlece %0.1fenolftalein çözeltisi) içinde çözülerek 0.1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Detaylı analiz yöntemi ve örnek hesaplama EK-1'de verilmiştir.

3.3.2. Oleyil alkol ve oleyil oleat derişimlerinin belirlenmesi

Oleyil alkol ve oleyil oleat derişimlerinin GC ile belirlenebilmesi için çizelge 3.1'de verilmiş olan koşullar kullanılarak analiz yöntemi geliştirilmiştir. Örnek kromatogram EK-2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. GC Analiz Koşulları

Kolon	DB-1'e özdeş SE-30 kolon (30 m, 0.25mmx0.25µm)
Dedektör (FID) sıcaklığı	300 °C
Enjektör sıcaklığı	280 °C
Sıcaklık programı	150 °C'de 1 dakika, 10°C/dak ile 300 °C'e çıkarma 300 °C'de 20 dakika bekletme
İç standart	Metil miristat
Taşıyıcı gaz (N ₂) akış hızı	10 mL/dak
Split oranı	1/15
Çözücü	Etil asetat
Enjeksiyon	0.2 µL

3.3.3.Su derişiminin belirlenmesi

Substratlardaki ve enzimdeki su miktarı ile tepkime sonunda ortam su derişimi, hacimsel Karl Fischer (KF) titratör (Titralab SIM550, Radiometer, Fransa) kullanılarak belirlenmiştir (şekil 3.2). Analizde kullanılan KF çözeltileri, Hydranal Solvent Oil çözücüsü ve Hydranal Titrant-2 (2 mgH₂O/mL, 1 mL'si 2 mg su ile reaksiyona girer) ya da Hydranal Titrant-5 (5 mg H₂O/mL) titrantlarıdır.

Karl Ficscher hücre sine 40 mL çözücü konur ve çözücü su içeriği titrant çözeltisi (2 mg H₂O/ml ya da 5 mg H₂O/mL) kullanılarak giderilir. Daha sonra bir enjektör kullanılarak belli miktarda saf su ya da örnek KF hücre sine eklenir. Enjeksiyon öncesi ve enjeksiyon sonrası tartım değerleri kullanılarak örnek miktarı belirlenir ve titrasyon sırasında cihaza girilir. Sonuçlar istenilen birimde (% , mg/g vb.) alınır. Çözücünün suyunu uzaklaştırmadan önce ve örneğin su içeriğini belirlemeden önce titrantın titre değeri belirlenmelidir. Titrantın titre değer i bir standart (örneğin saf su) kullanılarak belirlenir. Bir örneğin su içeriğinin belirlenmesi için 4-5 analiz yapılarak ortalaması alınır.



Şekil 3.2. Hacimsel Karl Fischer titratör (Titralab SIM550, Radiometer, Fransa)

3.3.4. Su aktivitesinin belirlenmesi

Doymun tuz çözeltilerinin ve hidrate tuz çiftlerinin su aktivitelerinin (a_w) ölçümü AQUALAB CX-2 (Decagon Devices, Inc. Puliman, Washington, USA) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Cihaz kalibrasyonu NaCl'ün doymun çözeltilisi kullanılarak ($a_w=0.76$, 23 °C) yapılmıştır.

Su aktivitesinin üretime etkisinin incelenmesi amacıyla doymun tuz çözeltileri hazırlanmıştır. Tuzların sudaki çözünürlük değerlerinin sıcaklık ile değişimi çizelge 3.2.'de verilmiştir. Doymun tuz çözeltileri, 30 °C'daki çözünürlükleri dikkate alınarak çözünürlüklerinin biraz üzerinde maddelerin suya katılması ile 24 saat oda sıcaklığında sürekli karıştırılarak hazırlanmışlardır. Hidrate tuz çiftlerinin eşit miktarları tartılarak bir viyale alınmış ve homojen karıştırılarak katı örneklerin a_w değerleri belirlenmiştir. Ayrıca tek başlarına hidrate tuzların su aktiviteleri belirlenmiştir. Su aktivite değerleri, hazırlanmış olan doymun tuz çözeltileri için çizelge 3.3'de, hidrate tuz çiftleri karışımları (katı örnek) için çizelge 3.4'de ve tek başlarına hidrate tuzlar için ise çizelge 3.5'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Su aktivitesi ölçüm cihazı (AQUALAB CX-2, Decagon Devices)

Çizelge 3.2. Tuzların sudaki çözünürlük değerlerinin (g / 100 g su) sıcaklık ile değişimi.

	Katı faz	0 °C	10 °C	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C	100 °C
LiBr		143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	266
CH ₃ COOK	1 1/2 H ₂ O	216.7	233.9	255.6	283.8	323.3	-	-	-	-	-	-
	1/2 H ₂ O	-	-	-	-	-	337.3	350	364.8	380.1	396.3	-
MgCl ₂	6H ₂ O	52.8	53.5	54.5	-	57.5	-	61	-	66	-	73
NaCl	-	35.7	35.8	36	36.3	36.6	37	37.3	37.8	38.4	39	39.8
KCl	-	27.6	31	34	37	40	42.6	45.5	48.3	51.1	54	56.7
K ₂ Cr ₂ O ₇	-	5	7	12	20	26	34	43	52	61	70	80

Çizelge 3.3. Doygun tuz çözeltilerinin su aktiviteleri

Çözelti	a_w	T (°C)
$K_2Cr_2O_7$	0.984	26.1
KCl	0.856	25.8
NaCl	0.764	25.9
$MgCl_2$	0.329	25.9
CH_3COOK	0.217	26.0
LiBr	0.068	26.2

Çizelge 3.4. Hidrate tuz çiftleri karışımlarının su aktiviteleri

Hidrate tuz çiftleri	a_w	T (°C)
Na_2HPO_4 . (2 / 0)	0.19	27.0
$Na_4P_2O_7$. (10 / 0)	0.47	27.0
Na_2HPO_4 . (7 / 2)	0.57	26.7
Na_2HPO_4 . (12 / 7)	0.80	26.6.
Na_2SO_4 . (10 / 0)	0.82	26.6

Not: Hidrate tuz çiftlerinin su aktivite analiz süreleri oldukça uzun sürmüştür.

Çizelge 3.5. Tek başına sulu formda tuzların su aktiviteleri.

Hidrate tuz	a_w (T=25 °C)
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.04
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.32
$Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$	0.49
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	0.55
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	0.61
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.80
$NaSO_4 \cdot 10H_2O$	0.82

3.4. Deneysel Tasarım ve RSM ile Optimizasyon

Cevap Yüzey Yöntemi, (RSM), problemlerin analiz edilmesi ve modellenmesi için yararlı olan matematiksel ve istatistik tekniklerden oluşur. Bu teknikler bir ya da daha fazla ölçülen cevap (bağımlı değişken) ve çok sayıda giriş değişkeni (bağımsız değişken) arasındaki ilişkinin ampirik olarak belirlenmesinde kullanılır. Amaç cevabı optimize etmektir (Box et al. 1978, Khuri and Cornell 1987, Myers 1971, Montgomery 1997).

Bu çalışmada dört bağımsız değişken için 2^4 faktöriyel merkezi bileşen tasarımı (CCD) uygulanmıştır. Faktöriyel tasarım, 16 faktöriyel nokta (2^k), 8 aksenal nokta ($2k$) ve merkez noktalarda 6 tekrar deneyden oluşmaktadır. İkinci mertebe polinomial eşitlikteki 14 adet katsayının belirlenmesi için toplam 30 deney ($N=2^k+2k+n_0$, $k=4$) gereklidir. İkinci mertebe polinomial (quadratic) model eşitliği aşağıda verilmiştir:

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_R + \beta_2 x_E + \beta_3 x_T + \beta_4 x_t + \beta_5 x_R^2 + \beta_6 x_E^2 + \beta_7 x_T^2 + \beta_8 x_t^2 + \beta_9 x_R x_E + \beta_{10} x_R x_T + \beta_{11} x_R x_t + \beta_{12} x_E x_T + \beta_{13} x_E x_t + \beta_{14} x_T x_t + \varepsilon \quad (3.1)$$

Burada \hat{y} , ölçülen cevap (oleylil oleat derişimi, g/L), x_R , x_E , x_T , x_t kodlanmış bağımsız değişkenler (x_R = mol oleyik asit / mol oleyil alkol, x_E = (g enzim / g substratlar)x100, %, x_T =tepkime sıcaklığı, °C, x_t = tepkime süresi, dk), β_0 kayma, β_1 , β_2 , β_3 ve β_4 lineer katsayılar, β_5 , β_6 , β_7 ve β_8 kuadratik katsayılar, β_9 , β_{10} , β_{11} ve β_{12} iç-etkileşim katsayıları, ε ise deneysel hatayı gösterir.

Bağımsız değişkenlerin kodlanmış formları x_i (x_R , x_E , x_T , x_t) aşağıdaki gibi tanımlanır:

$$x_i = \frac{X_i - X_i^*}{\Delta x} \quad (3.2)$$

Burada X_i gerçek değeri, X_i^* merkez noktadaki gerçek değeri, Δx değişkendeki basamak değeri gösterir.

Oleyil oleatın lipaz katalizli üretimi için, CCD’de yer alan bağımsız değişkenlerin doğal ve kodlanmış değerleri çizelge 3.6’da verilmiştir

Çizelge 3.6. Oleyil oleatın lipaz katalizli üretimi için, CCD’de yer alan bağımsız değişkenlerin doğal ve kodlanmış değerleri

Bağımsız değişkenler	Doğal ve kodlanmış değerler				
	-2	-1	0	+1	+2
X_1 : Asit/Alkol molar oran (R)	0.67	1.00	1.33	1.67	2.00
X_2 : Enzim miktarı (E), % (w/w substratlar)	2	4	6	8	10
X_3 : Sıcaklık (T), °C	40	45	50	55	60
X_4 : Süre (t), dak	30	45	60	75	90

Macanova yazılımı (versiyon 4.07, Minnesota, Mineapolis, USA) ve Matcad 5.0 Plus elde edilen verilerin grafiksel analizi ve regresyon için kullanılmıştır.

4. ANALİZ ve BULGULAR

Oleyil oleatın lipaz katalizörlüğünde üretimi üzerine yapılan araştırma bulguları, atmosferik koşullarda ve süperkritik CO₂ ortamında olmak üzere iki bölüme ayrılmıştır.

4.1. Atmosferik Koşullarda Oleyil Oleat Üretimi

Çalışmaya başlamadan önce kullanılan enzim ve substratların su içerikleri belirlenmiştir. Daha sonra oleyil oleatın atmosferik koşullarda enzimatik üretimine enzim türü ve miktarı, asit/alkol mol oranı, enzim miktarı, sıcaklık, karıştırma hızı, suyun ortamdan uzaklaştırılması ve çözücü kullanımının etkileri araştırılmıştır. Deneyle, aksi belirtilmedikçe enzim/substrat (E/S) kütle oranı %5 ve asit/alkol mol oranı 1.33/1 alınarak, 50 °C ve 250 rpm koşullarında gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. Kullanılan enzimlerin ve substratların su içerikleri

Bölüm 3.3.3.'de belirtilen yöntem ile enzimlerin ve substratların su derişimleri Karl Fisher titrasyon ile belirlenmiştir. Su derişimi Lipozyme RM IM için kütlece %3.99, Novozym 435 için ise %1.13 olarak belirlenmiştir. Lipozyme RM IM bir poşet içinde ezilerek toz hale getirildikten sonra ise su derişimi %4.296 olmuştur.

Oleyik asit ve oleyil alkolün içerdikleri suyun uzaklaştırılması amacıyla ayrı ayrı erlenlere 50 mL oleyik asit ve 50 mL oleyil alkol konarak 5'er g yeni rejenere edilmiş (350 °C'de 6 saat) moleküler elek eklenerek 1 gece 28 °C ve 200rpm koşullarında karıştırıldıktan sonra su içerikleri belirlenmiştir. Oleyik asit, oleyil alkol ve enzimin su içeriklerinin düşürülmesi için 105 °C'de birkaç saat rejenere edilen silika jel kullanılarak buhar fazdan vakum basıncı altında desikatörde 24 saat boyunca bekletilmişlerdir. Elde

edilen sonuçlar çizelge 4.1.'de verilmiştir. Görüldüğü gibi moleküler elek kullanımı ile su içerikleri önemli ölçüde düşürülmüş; silika jel ile buhar fazdan kurutma verimli olmamıştır.

Çizelge 4.1. Oleyik asit ve oleyil alkol su içerikleri ve su uzaklaştırma işlemi etkisi

	Su uzaklaştırma yok	Moleküler elek üzerinde kurutma	Silikajel ile buhar fazdan kurutma
Oleyik asit	%0.04639	% 0.00528	%0.040728
Oleyil alkol	%0.07846	%0.013035	%0.077524

Moleküler elek ile suyu uzaklaştırılan substratlar ortamdan moleküler elek ayrılmadan 10 gün süre ile oda sıcaklığında bekletilmiş ve su içerikleri tekrar belirlenmiştir. Sonuçlar çizelge 4.2.'de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi 10 gün bekleme süresi sırasında tekrar su adsorplanmıştır

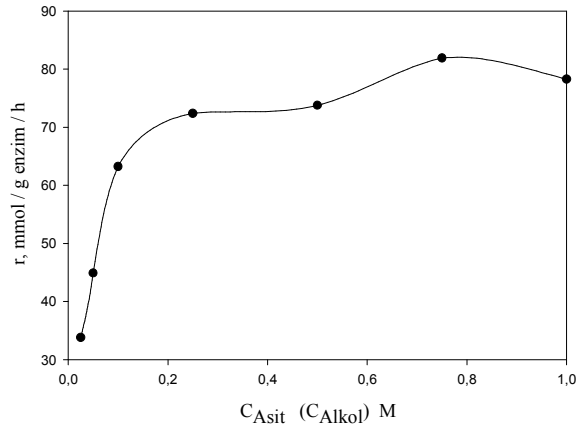
Çizelge 4.2. Oleyik asit ve oleyil alkol su içerikleri ve moleküler elek üzerinde 10 gün oda sıcaklığında bekletme sonunda elde edilen değerler

	Su uzaklaştırma yok	Moleküler elek üzerinde kurutmadan sonra 10 gün oda sıcaklığında bekletme
Oleyik asit	%0.04639	% 0.035916
Oleyil alkol	%0.07846	%0.063950

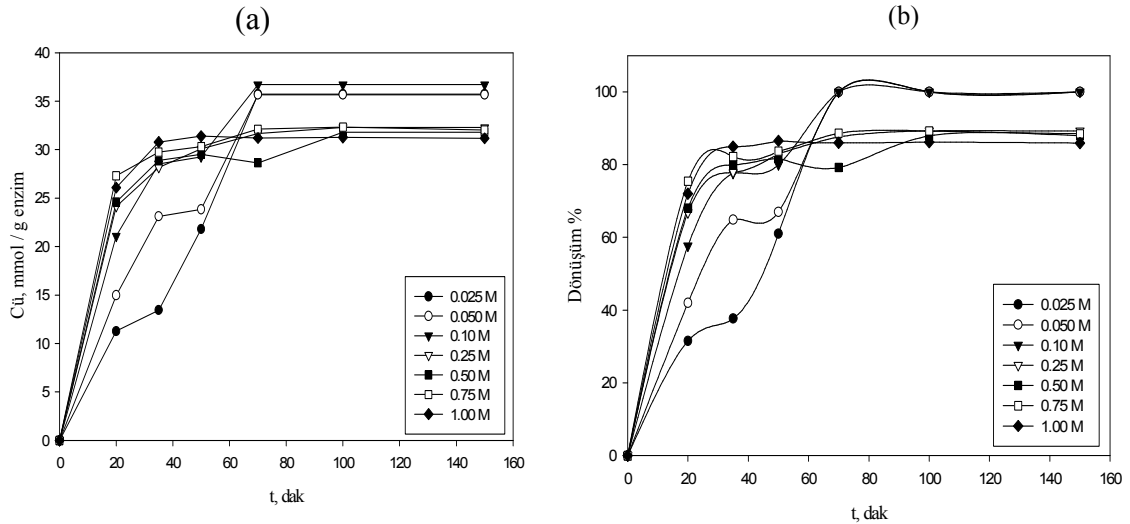
4.1.2. Çözücülü ve çözücsüz ortamın karşılaştırılması

Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretimine çözücü kullanımının etkisinin incelenmesi amacıyla, oleyik asit ve oleyil alkolün hekzan içerisinde eşmolar derişimleri (0.025-1.0 M) hazırlanarak, 30 mL hacimde 2.5 saat süre ile deneyler yapılmıştır. Başlangıç tepkime hızları, substrat derişimlerinin artmasıyla artmış, 0.1 M'in üzerindeki derişimlerde, yaklaşık 75 mmol/g enzim/h değerinde sabit kalmıştır. (şekil 4.1). Çözücü ortamında farklı substrat derişimlerinde elde edilen oleyil oleat derişimlerinin tepkime süresi ile değişimi şekil 4.2a'da verilmiştir. 0.1 M'a kadar olan oleyik asit ve oleyil alkol derişimleri ile 37 mmol/g enzim değerinde maksimum ester derişimine ulaşılmış, daha yüksek substrat derişimleri inhibisyona neden olmuştur. Farklı substrat

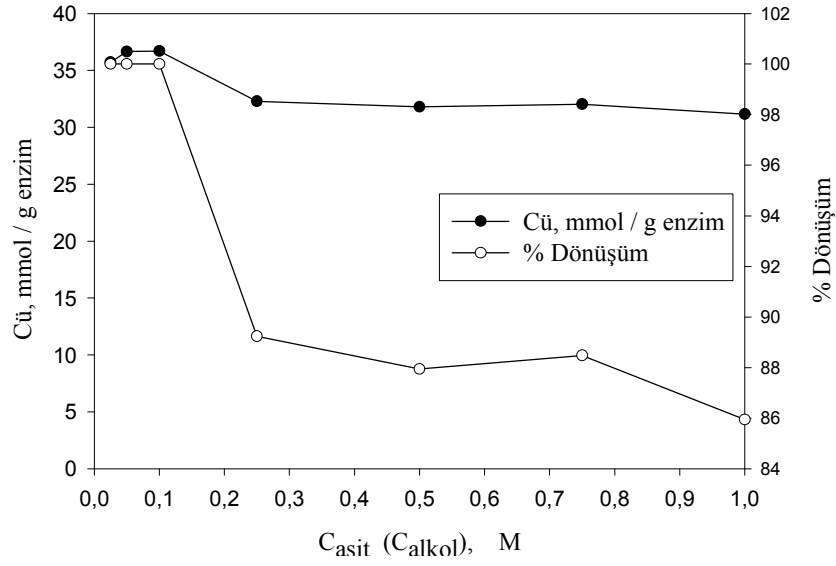
derişimlerinde elde edilen dönüşüm değerlerinin tepkime süresi ile değişimi şekil4.2b’de verilmiştir. 0.1 M’a kadar olan substrat derişimlerinde %100 olan dönüşüm değerleri, substrat derişiminin artmasıyla düşmüştür. 2.5 saat sonunda elde edilen ürün derişimi ve dönüşüm değerleri şekil 4.3’de verilmiştir. 0.1M asit ve alkol derişimlerinin üzerinde ürün derişimi ve dönüşümde düşme olduğu daha açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.1. Lipozyme RM IM ile çözücü ortamında enzimatik oleyil oleat üretiminde, substrat derişimlerinin başlangıç tepkime hızlarına etkisi $V=30 mL$, $T=50\text{ }^{\circ}C$, $N=250 rpm$, $E/S=\%5$

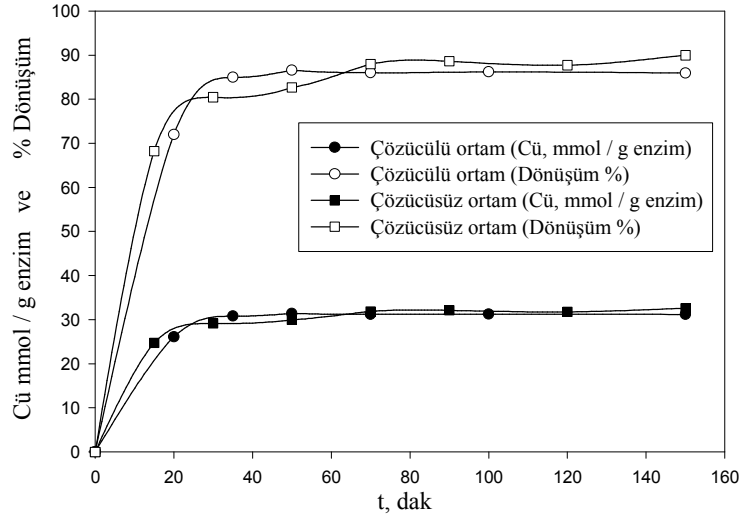


Şekil 4.2. Lipozyme RM IM ile çözücü ortamında oleyil oleat üretimine substrat derişimlerinin (eşmolar) etkisi a)Ester derişiminin tepkime süresi ile değişimi, b)Dönüşümün tepkime süresi ile değişimi, $V=30 mL$, $T=50\text{ }^{\circ}C$, $N=250 rpm$, $E/S=\%5$



Şekil 4.3. Lipozyme RM IM ile çözücü ortamında oleyil oleat üretiminde ürün derişimi ve dönüşüme substrat derişimlerinin (eşmolar) etkisi.
 $V=30 \text{ mL}$, $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$, $N=250 \text{ rpm}$, $E/S=\%5$, $t=2.5 \text{ saat}$

Çözücülü ve çözücsüz ortamın karşılaştırılması amacıyla yapılan deneyler sonunda elde edilen ürün derişimi ve dönüşüm değerleri her iki ortam için şekil 4.4'de görülmektedir. Çözücülü ortam kullanımında ($C_{sit}=C_{alkol}=1 \text{ M}$) 2.5 saat tepkime süresi sonunda $31.16 \text{ mmol / g enzim}$ ($1.107 \text{ mmol / g tepkime ortamı}$) maksimum ürün derişimine $\% 86$ dönüşüm ile ulaşılmıştır. Çözücsüz ortamda ise asit/alkol mol oranının $1.33/1$ değerinde ($C_{sit}=1.579\text{M}$, $C_{alkol}=1.185\text{M}$) aynı tepkime süresi sonunda elde edilen maksimum ürün derişimi ve dönüşüm değerleri sırasıyla $32.59 \text{ mmol / g enzim}$ ($1.63 \text{ mmol / g substrat karışımı}$) ve $\% 90$ olarak elde edilmiştir. Çözücülü ve çözücsüz sistemde 80 dakika sonunda dengeye ulaşılmaktadır; çözücsüz sistemde 0.1M 'ın altındaki derişimlerde (seyreltik durumda) çözücsüz sistemdeki ürün derişimine yakın değerler elde edilmiştir. Çözücülü sistemde enzimatik tepkime için düşük asit derişimlerinde (seyreltik) çalışılması ve üretim sonunda çözücü uzaklaştırma işlemleri nedeniyle çalışmanın ileri aşamalarında üretimin çözücsüz ortamda yapılmasına karar verilmiştir.

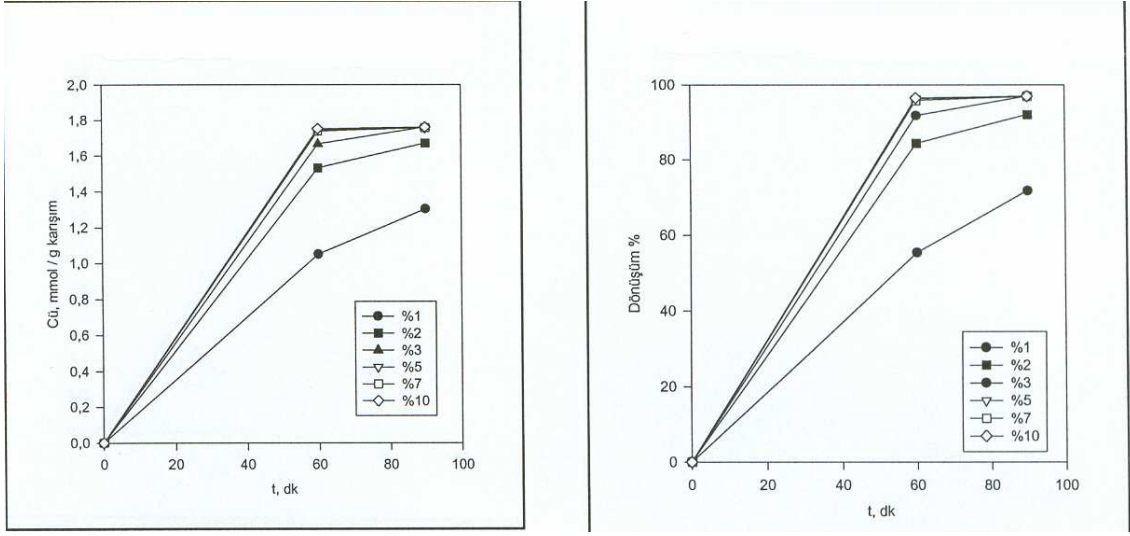


Şekil 4.4. Lipozyme RM IM ile da oleyil oleat üretiminde çözücülü ortam ve çözücüsüz ortamın karşılaştırılması V=30 mL, T=50 °C, N=250 rpm, E/S=%5 (Çözücü:hekzan, Casit=Calkol=1 M) (Çözücüsüz ortam : mol asit/mol alkol=1.33/1, Casit=1.579M, Calkol=1.185M)

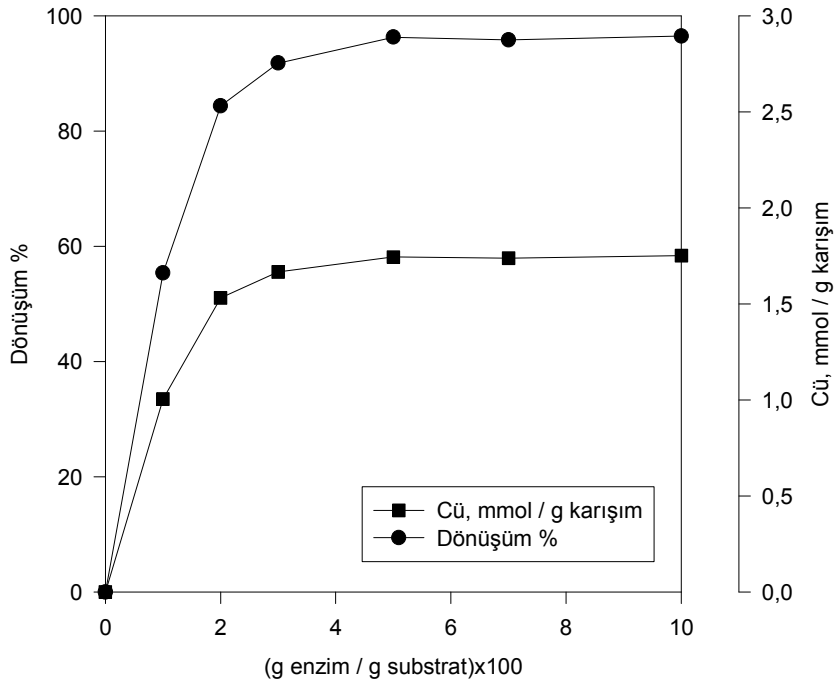
4.1.3. Enzim miktarının etkisi

Oleyil oleatın Lipozyme RM IM ile üretiminde enzim miktarının etkisinin incelenmesi amacıyla, 10 mL hacimde, 1 saat süre ile ağzı açık erlenlerde deneyler yapılmıştır. Bu deneylerde tepkime ile oluşan su ortamdan uzaklaşmaktadır.

Ester derişimi ve dönüşümün tepkime süresi ile değişimi şekil 4.5 a ve b'de verilmiştir. Enzim miktarının artmasıyla başlangıç tepkime hızı önce artmakta sonra sabit kalmaktadır. 1 saat sonunda elde edilen oleyil oleat derişimi ve dönüşümün enzim miktarı (E/S kütle oranı) ile değişimi, şekil 4.6.'da verilmiştir. E/S oranının artmasıyla derişim ve dönüşüm artmıştır. E/S % 5 ve üzeri olması durumunda derişim 1.74 mmol/g substrat karışımı (34.86 mmol/g enzim) ve dönüşüm %96 değerlerinde maksimum vererek sabit kalmıştır.



Şekil 4.5. Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretimine enzim miktarının etkisi a) Ester derişimin tepkime süresi ile değişimi, b) Dönüşümün tepkime süresi ile değişimi. V=10 mL, Asit/alkol=1.33/1, T=50°C, N=250rpm

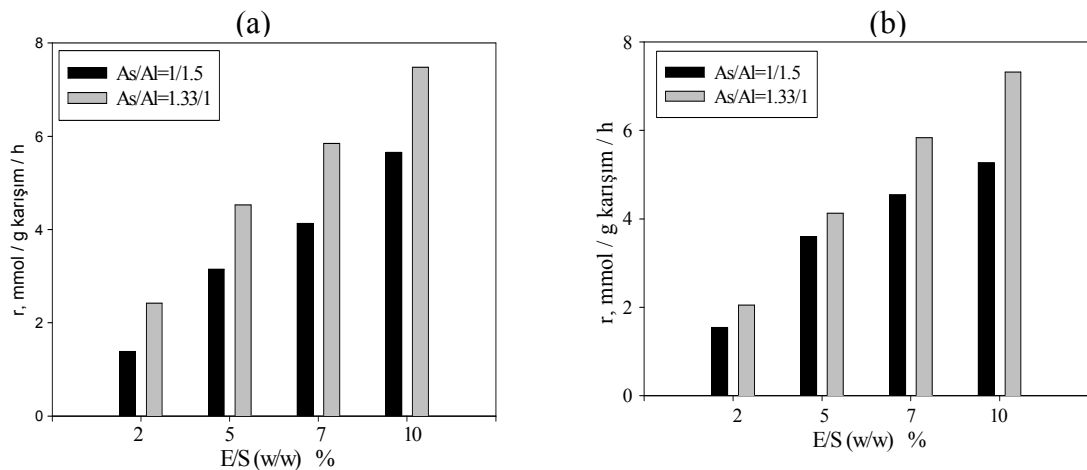


Şekil 4.6. Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretiminde, derişimin ve dönüşümün enzim miktarı ile değişimi V=10 mL, Asit/alkol=1.33/1, T=50°C, N=250rpm, t=1 saat.

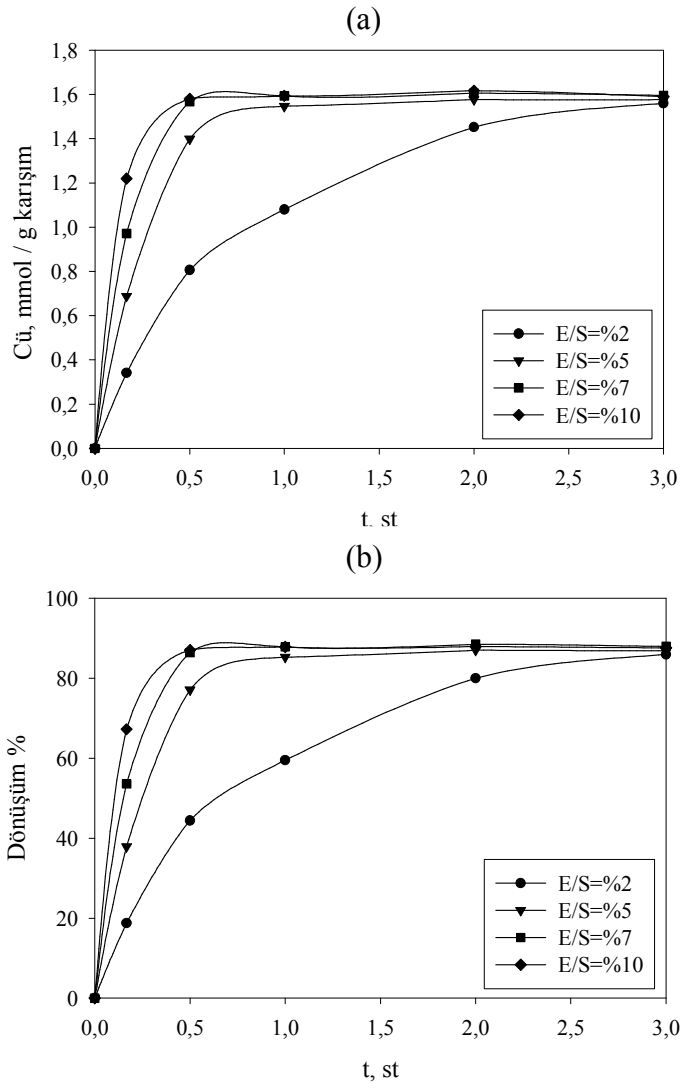
Oleyil oleat üretimine enzim miktarının etkisinin incelenmesi amacıyla, enzim/substrat (E/S) kütle oranının % 2 - % 10 aralığında Novozym 435 ile de deneyler ağız kapalı erlenlerde yapılmıştır. Bu deneylerde tepkime ile oluşan su ortamda bulunmaktadır.

Substrat mol oranının 1/1.5 ve 1.33/1 değerleri için başlangıç tepkime hızlarına enzim miktarının etkisi şekil 4.7 a (T=50 °C için) ve şekil 4.7 b'de (T=40 °C için) verilmiştir. Başlangıç tepkime hızları, her iki substrat mol oranında enzim miktarının artması ile artmıştır. 1.33/1 substrat mol oranında daha yüksek başlangıç tepkime hızları (E/S'nin % 10 değeri için maksimum 7.5 mmol/g substrat karışımı/h ya da 75 mmol / g enzim / h) elde edilmiştir.

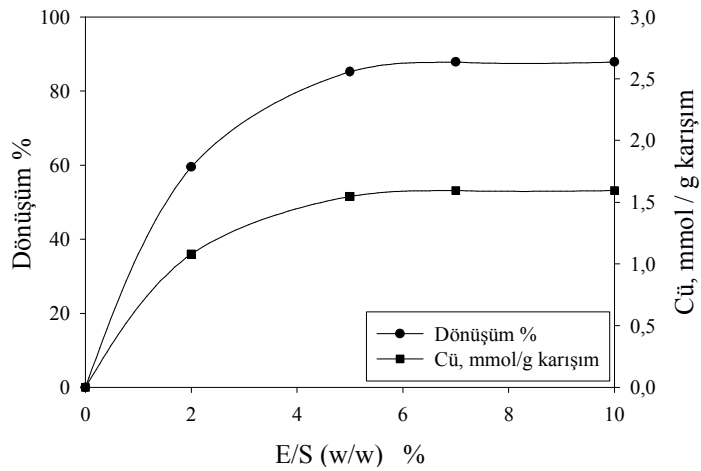
Substrat mol oranının 1.33/1 değeri için farklı Novozym 435 miktarlarında oleyil oleat derişimi ve dönüşümün tepkime süresi ile değişimi şekil 4.8 a ve b'de görölmektedir. Enzim miktarının artmasıyla beklendiği gibi başlangıç tepkime hızlarının artması dengeye gelme süresini kısaltmıştır. 1 saat sonunda elde edilen oleyil oleat derişimi ve dönüşümün enzim miktarı ile değişimi şekil 4.9'da verilmiştir. E/S oranının artmasıyla derişim ve dönüşüm artmış; E/S'nin % 5 ve üzeri olması durumunda oleyil oleat derişimi 1.6 mmol / g karışım (E/S % 5 için 32 mmol/g enzim) ve dönüşüm % 88 değerlerinde maksimum vererek sabit kalmıştır. Araştırmanın ileri aşamalarında % 5 enzim/substrat karışımı kütle oranı kullanılmıştır.



Şekil 4.7. Novozym 435 ile oleyil oleat üretiminde farklı substrat mol oranları için başlangıç tepkime hızlarına enzim miktarının etkisi a)T=50 °C, b)T=40 °C (V=30 mL, N=200 rpm)



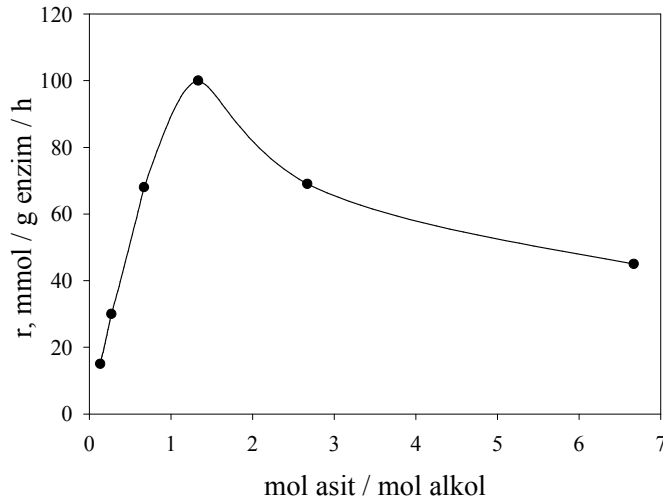
Şekil 4.8. Novozym 435 ile oleyil oleat üretimine enzim miktarının etkisi
a) Ester derişimin tepkime süresi ile değişimi, b) Dönüşümün tepkime süresi ile değişimi. $V=30$ mL, Asit/alkol=1.33/1, $T=40^{\circ}\text{C}$, $N=200\text{rpm}$



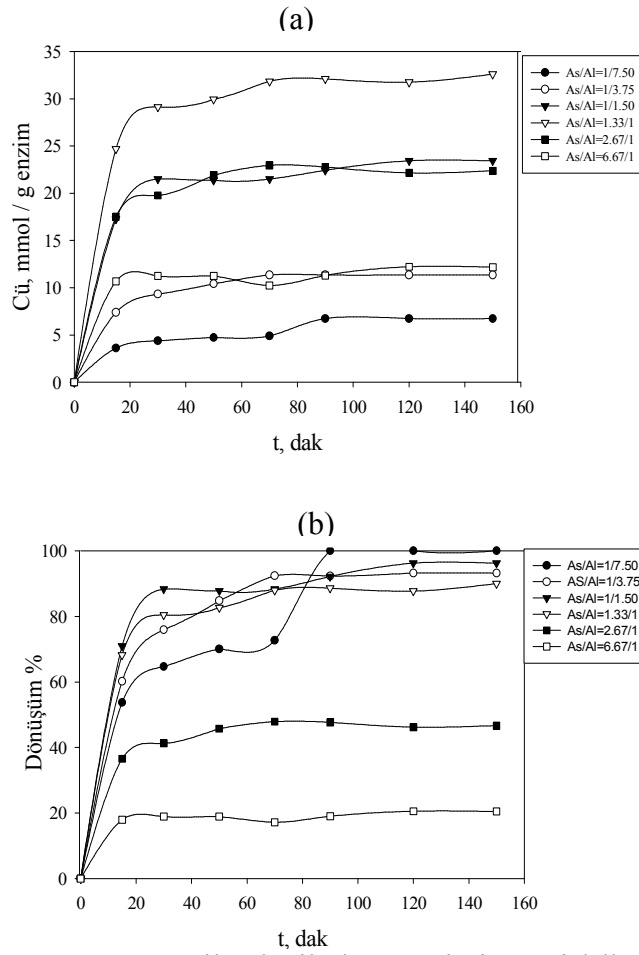
Şekil 4.9. Novozym 435 kullanımında enzim miktarının oleyil oleat derişimine ve dönüşüme etkisi $V=30$ mL, Asit/alkol=1.33/1, $T=40^{\circ}\text{C}$, $N=200\text{rpm}$, $t=1$ saat.

4.1.4. Asit/alkol mol oranı etkisi

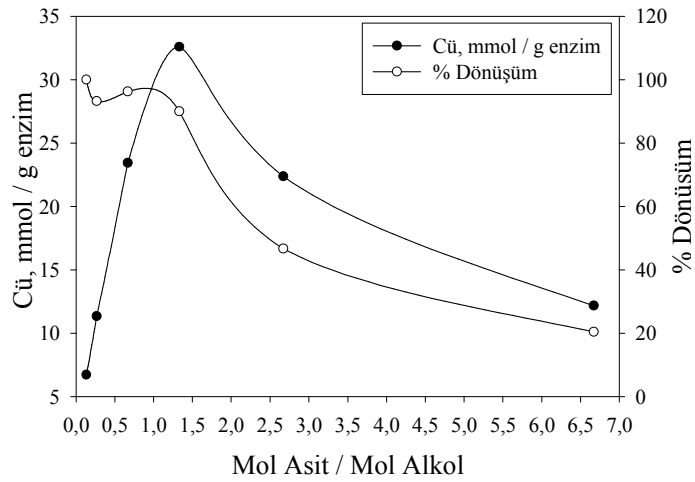
Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretimine oleyik asit / oleyil alkol mol oranının etkisinin incelenmesi amacıyla, deneyler 30 mL hacimde 2 saat süre ile yapılmıştır. Asit/alkol mol oranının artmasıyla başlangıç tepkime hızları önce artmış, 1.33/1 oranında maksimum (99 mmol/g.enzim/h) vererek azalma göstermiştir (şekil 4.10). Ester derişiminin tepkime süresi ile değişimine asit/alkol mol oranının etkisi şekil 4.11 a'da verilmiştir. Oleyik asit derişiminin artmasıyla oleyil oleat üretimi, önce artmış ve asit/alkol mol oranı 1.33/1 iken 32.6 mmol/g enzim (1.63 mmol/g substrat karışımı, % 90 dönüşüm) değerinde maksimuma ulaştıktan sonra oranın yüksek değerlerinde substrat inhibisyonu nedeniyle azalmıştır. 1.33/1'e kadar olan oran değerlerinde %90'ın üzerinde dönüşümler elde edilirken daha yüksek asit derişimlerinde beklendiği gibi dönüşüm değerleri azalmıştır (şekil 4.11 b). 2.5 saat tepkime süresi sonunda elde edilen oleyil oleat derişimi ve dönüşüme oleyik asit/oleyl alkol mol oranının etkisi şekil 4.12'de verilmiştir. Mol oranının 1.33/1 değerinin üzerinde hem ürün derişimi hem de dönüşümde düşüş olduğu daha açık bir şekilde görölmektedir.



Şekil 4.10. Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretiminde başlangıç tepkime hızlarına asit/alkol mol oranlarının etkisi. V=30 mL, T=50 °C, N=250 rpm, E/S=%5.

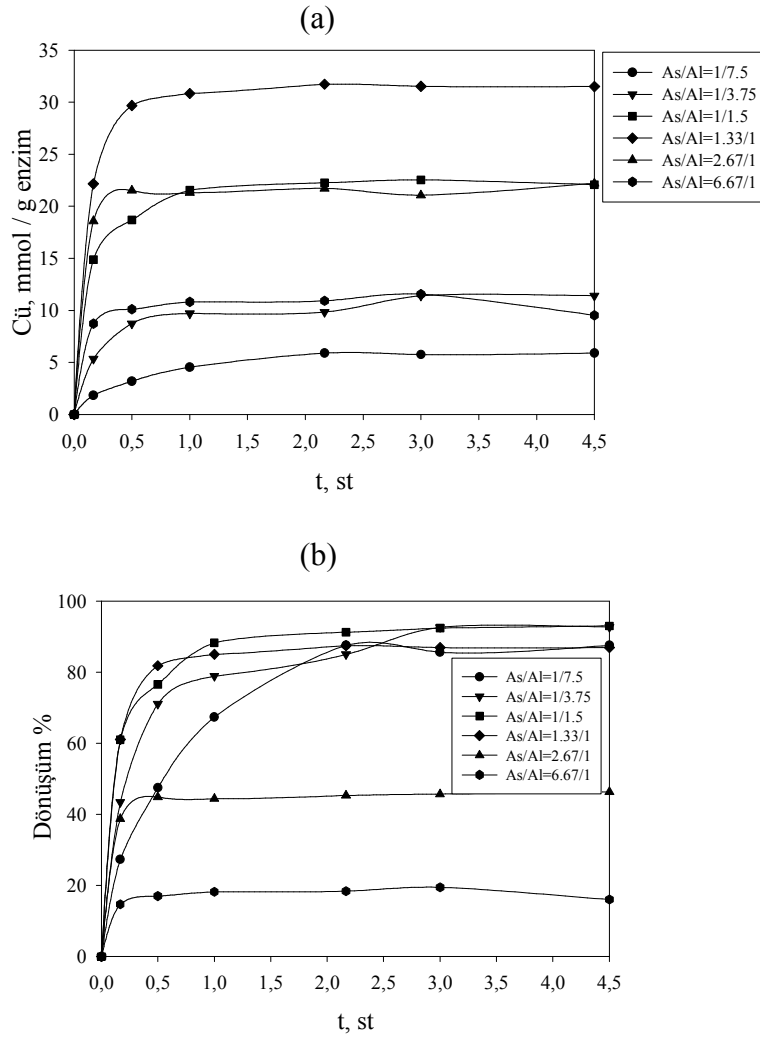


Şekil 4.11. Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretimine, asit/alkol mol oranlarının etkisi
a) Ester derişimlerin tepkime süresi ile değişimi, b) Dönüşümlerin tepkime süresi ile değişimi $V=30$ mL, $T=50$ °C, $N=250$ rpm, $E/S= \%5$

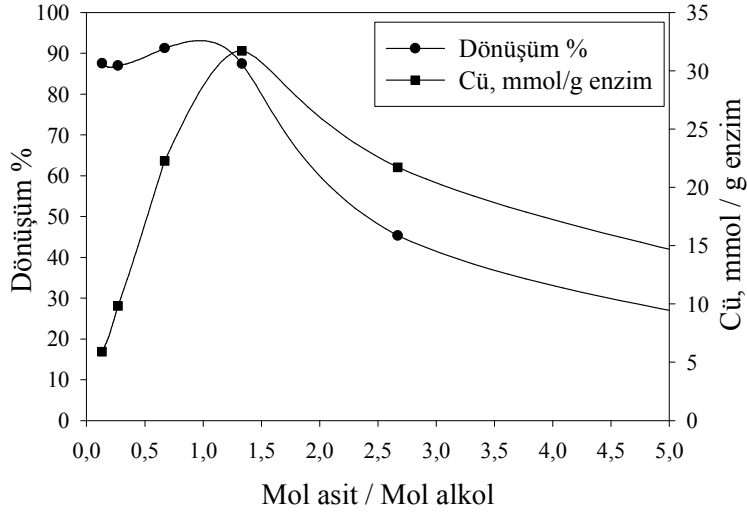


Şekil 4.12. Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretimine, asit/alkol mol oranlarının etkisi
a) Ester derişimlerin tepkime süresi ile değişimi, b) Dönüşümlerin tepkime süresi ile değişimi $V=30$ mL, $T=50$ °C, $N=250$ rpm, $E/S= \%5$, $t=2.5$ saat.

Oleyil oleat üretimine oleyik asit / oleyil alkol mol oranının etkisi, 1/7.5 – 6.67/1 oleyik asit/ oleyil alkol mol oranlarında Novozym 435 kullanılarak da incelenmiştir. Oleyil oleat derişimi ve dönüşümün tepkime süresi ile değişimi farklı substrat mol oranları için Şekil 4.13 a ve b’de verilmiştir. Oleyik asit derişiminin artmasıyla oleyil oleat üretimi önce artmış, substrat mol oranının 1.33/1’in üzerinde olması durumunda substrat inhibisyonu nedeniyle azalmıştır. 2 saat sonunda elde edilen ester derişimi ve dönüşüme substrat mol oranının etkisi Şekil 4.14’de verilmiştir.



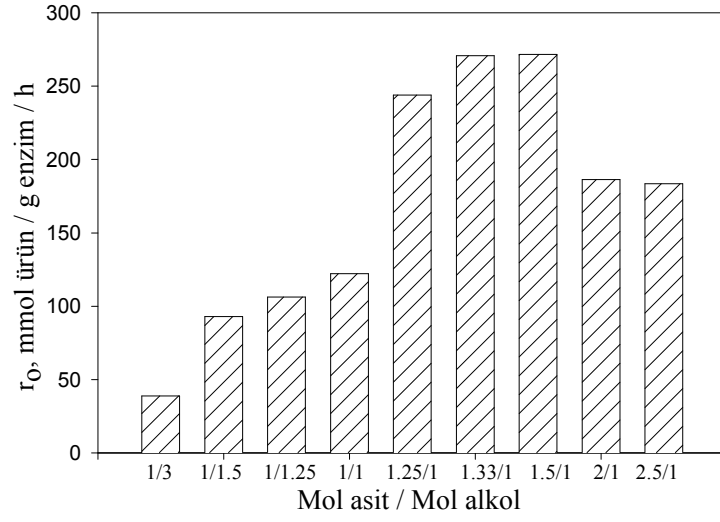
Şekil 4.13. Novozym 435 ile oleyil oleat üretimine asit/alkol mol oranının etkisi a) Ester derişimlerinin tepkime süresi ile değişimi, b) Dönüşümlerin tepkime süresi ile değişimi V=30 mL, T=50 °C, N=200 rpm, E/S= %5.



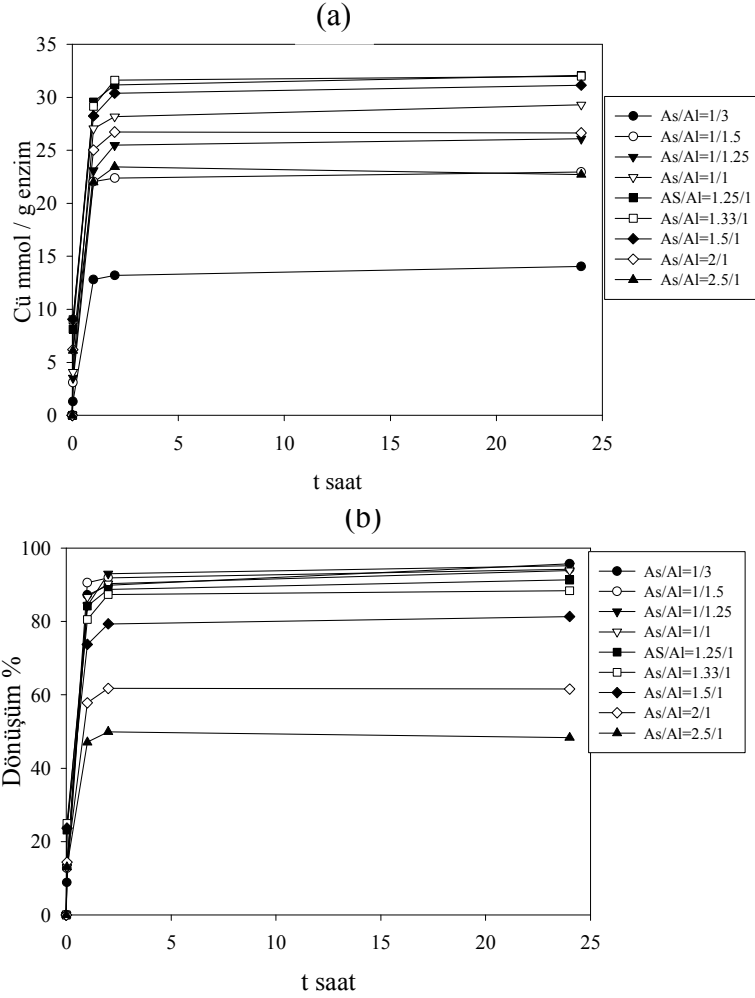
Şekil 4.14. Novozym 435 kullanımında substrat mol oranının oleyil oleat derişimine ve dönüşüm etkisi $V=30$ mL, $T=50^{\circ}\text{C}$, $N=200\text{rpm}$, $E/S= \%5$, $t=2$ saat.

Ester derişimi substrat mol oranının 1.33/1 değerinde 31.5 mmol / g enzim (1.58 mmol / g enzim, % 87 dönüşüm) değerinde maksimuma ulaşmış, yüksek asit derişimlerinde azalmıştır. 1.33/1 ve daha düşük substrat mol oranlarında % 87'nin üzerinde dönüşümler elde edilirken, 1.33/1'in üzerindeki substrat mol oranlarında beklendiği gibi dönüşüm değerleri de azalmıştır.

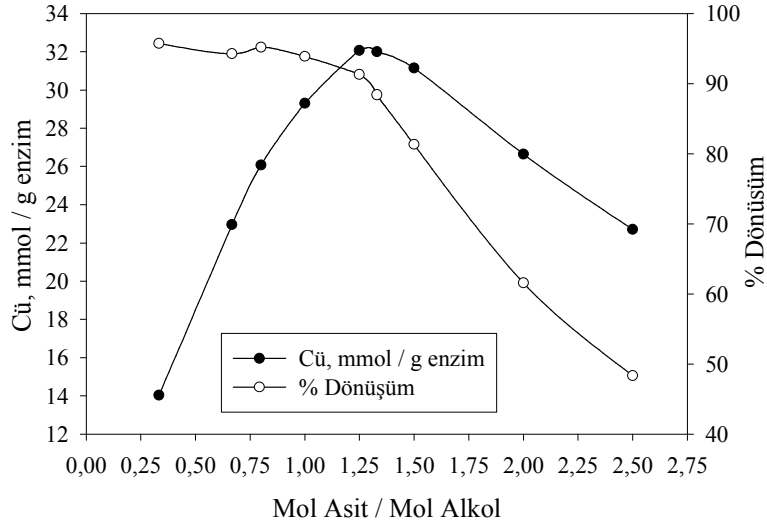
Şekil 4.13 ve 4.14 sonuçları değerlendirilerek incelenen oleyik asit / oleyil alkol mol oranı aralığının 1/3-2.5/1 aralığında daha da sıklaştırılması ile deneyler tekrar edilmiştir. Oleyik asit derişiminin artmasıyla başlangıç tepkime hızları artmakta ve 1.33/1 ve 1.5/1 değerlerinde maksimum (271 mmol ester/g enzim/h) verdikten sonra oleyik asit inhibisyonu nedeni ile azalmaktadır (şekil 4.15). Oleyil oleat derişimi ve dönüşümünün tepkime süresi ile değişimi şekil 4.16'da verilmiştir. Ürün derişimi ve dönüşüm değerleri 2 saat sonunda dengeye ulaşmaktadır. Asit/alkol mol oranının artmasıyla 24 saat sonunda elde edilen ürün derişimi artmış 1.25/1 ve 1.33/1 değerlerinde maksimum (32 mmol/g enzim ya da 1.6 mmol / g karışım) verdikten sonra azalmış; düşük asit derişimlerinde %90'ın üzerinde olan dönüşüm değerleri ise asit/alkol mol oranının 1/1 değerinin üzerinde düşme göstermiştir (şekil 4.17).



Şekil 4.15. Novozym 435 kullanımında substrat mol oranının başlangıç tepkime hızlarına etkisi. E/S=%5, T=50 °C, N=200 rpm, V=10 mL.



Şekil 4.16. Novozym 435 ile oleyil oleat üretimine, asit/alkol mol oranının etkisi
a) Ester derişimlerinin tepkime süresi ile değışimi,
b) Dönüşümlerin tepkime süresi ile değışimi

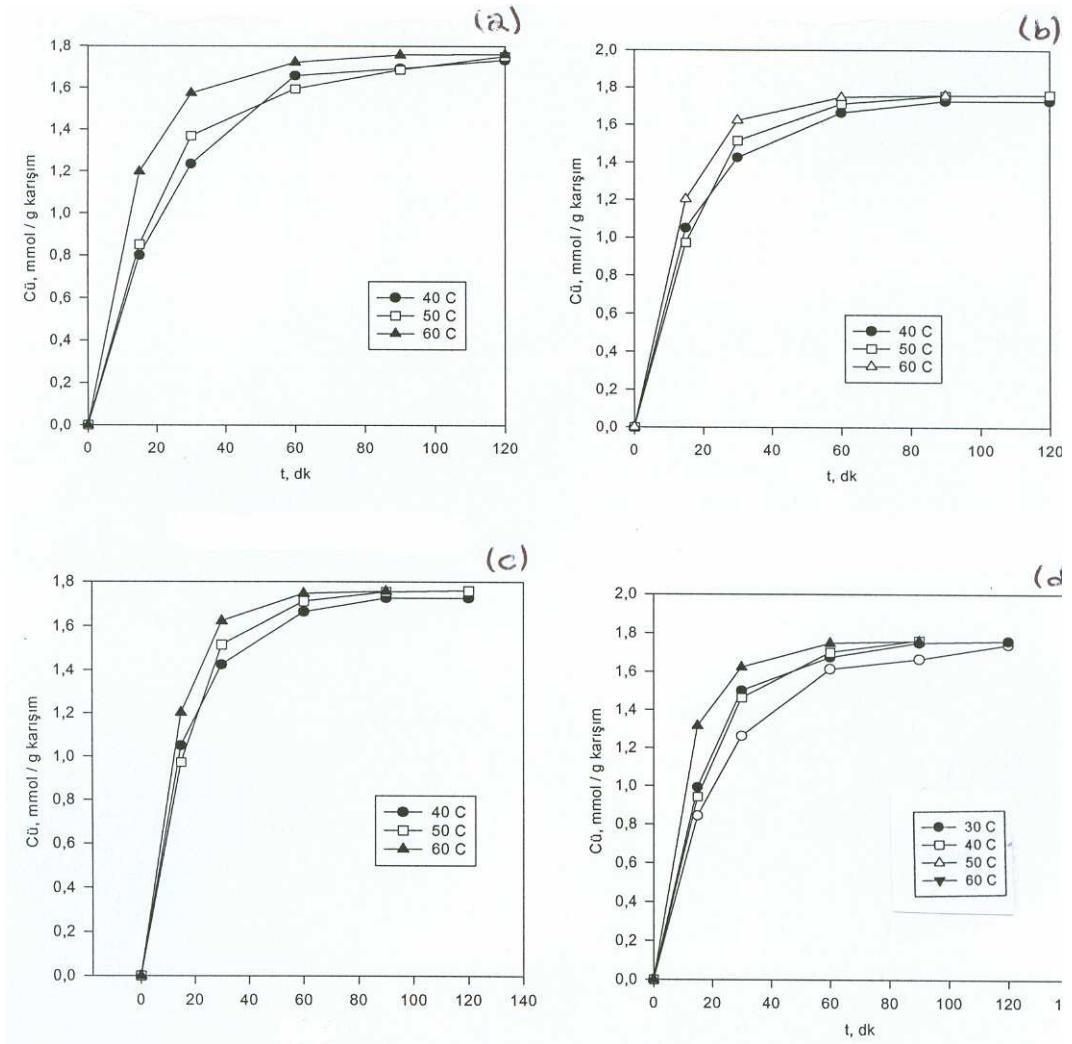


Şekil 4.17. Novozym 435 ile oleyil oleat üretimine, asit/alkol mol oranının etkisi
V=10 mL, T=50 °C, N=200 rpm, E/S= %5, t=24 saat

4.1.5. Sıcaklık ve karıştırma hızı etkisi

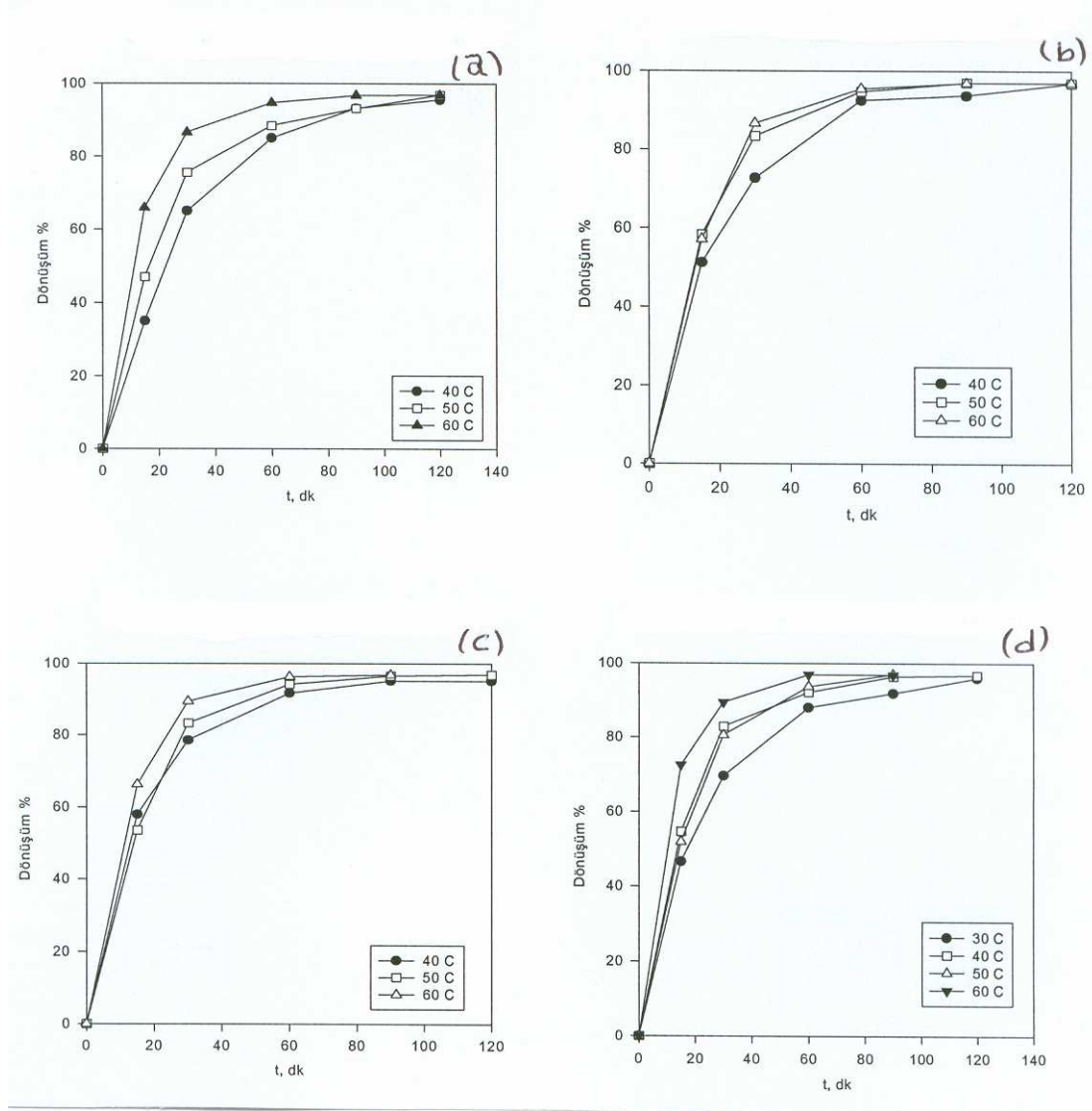
Çözücüsüz ortamda oleyil oleatın Lipozyme RM IM ile üretimine sıcaklık ve karıştırma hızı etkisinin incelenmesi amacıyla, 40-60 °C sıcaklık ve 100-250 rpm karıştırma hızı koşullarında, 10 mL hacimde 2 saat süre ile deneyler erlenlerin ağızları açık tutularak yapılmış; tepkime ile oluşan su ortamdan uzaklaştırılmıştır. Böylece ortamdan su uzaklaştırılması ile dengenin sağa kayması sağlanmış ve daha yüksek ürün derişimi ve dönüşümü değerlerine ulaşılabilmiştir.

Oleyil oleat üretiminde ürün derişimine sıcaklığın etkisi farklı karıştırma hızları için şekil 4.18 a, b, c ve d'de verilmiştir. Sıcaklığın artmasıyla beklendiği gibi tepkime hızı artmış ve 35 mmol/g enzim olan oleyil oleat denge derişimine ulaşma süresi azalmıştır.



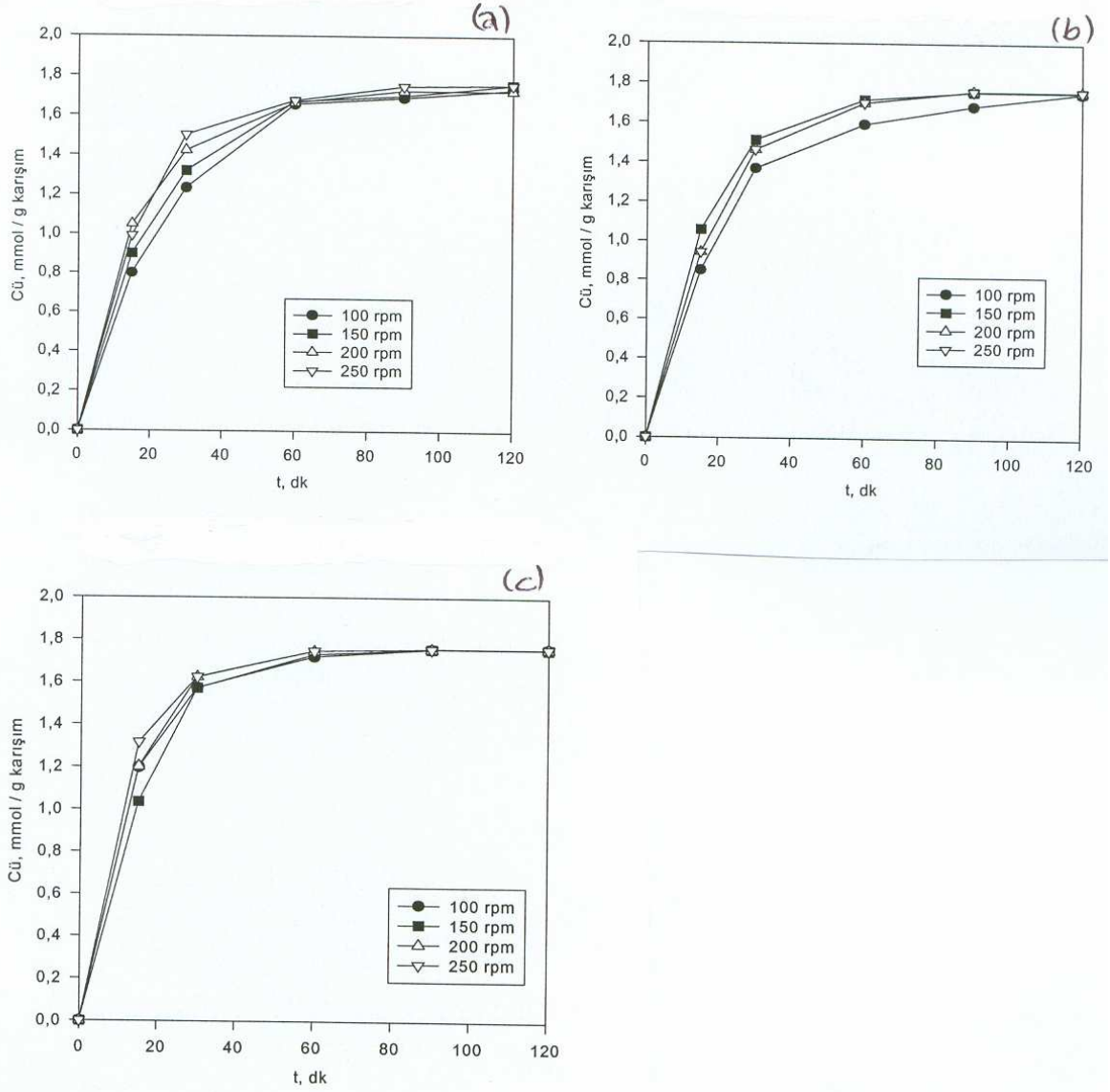
Şekil 4.18. Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretiminde sıcaklığın ürün derişimine etkisi a) 100 rpm, b) 150 rpm, c) 200 rpm ve d) 250 rpm
 $V=10$ mL, Asit/Alkol=1.33/1, E/S=%5,

Çözücüsüz ortamda oleyil oleatın Lipozyme RM IM ile üretiminde sıcaklığın dönüşüme etkisi farklı karıştırma hızları için şekil 4.19 a, b, c ve d’de verilmiş ve en yüksek dönüşüm %97 olarak bulunmuştur.

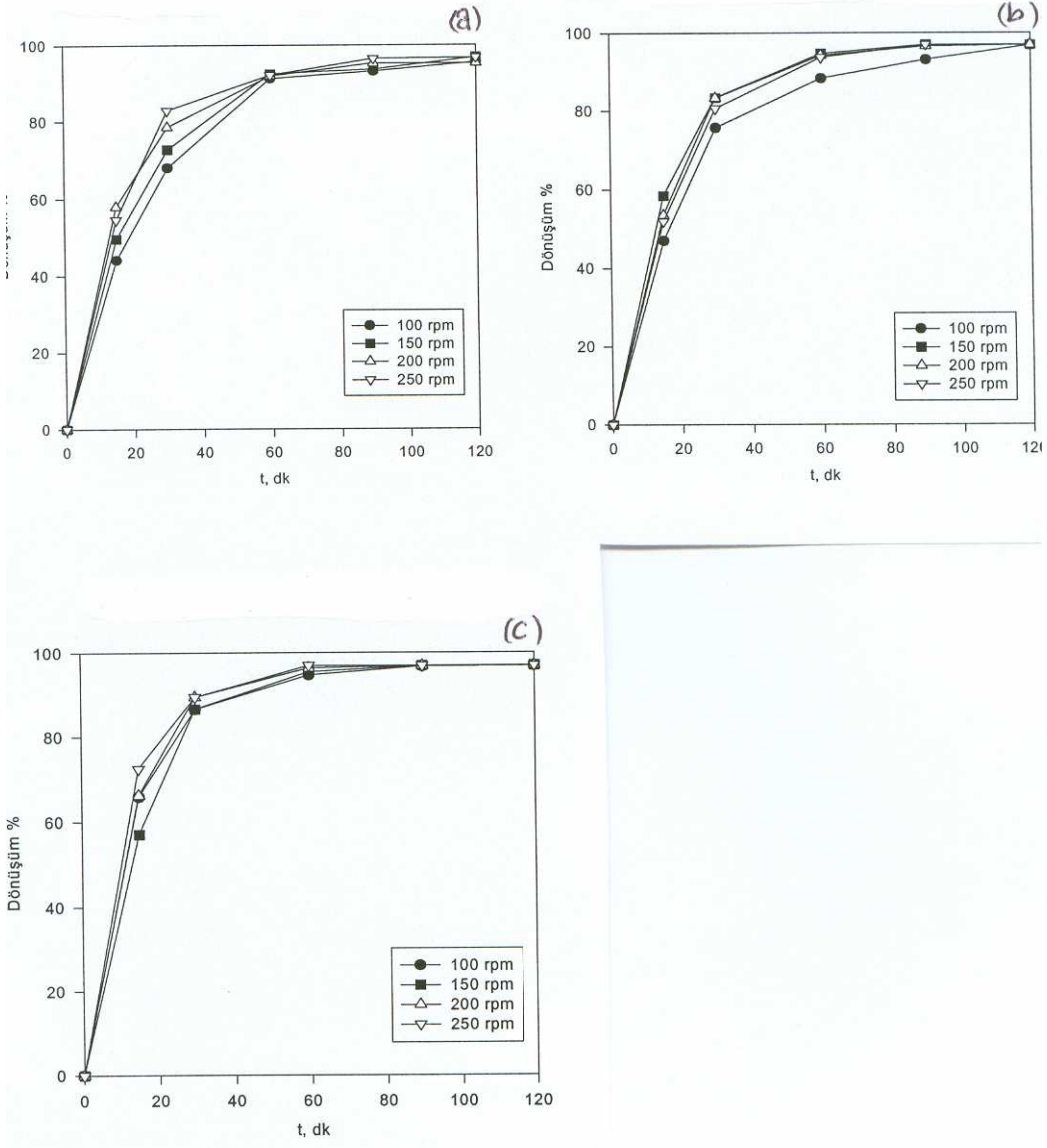


Şekil 4.19. Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretiminde sıcaklığın dönüşüme etkisi
a) 100 rpm, b) 150 rpm, c) 200 rpm ve d) 250 rpm
V=10 mL, Asit/Alkol=1.33/1, E/S=%5,

Lipozyme RM IM kullanımında, farklı tepkime sıcaklıkları için, karıştırma hızının oleyil oleat derişimine etkisi şekil 4.20 a, b ve c’de, dönüşüme etkisi ise şekil 4.21 a, b ve c’de verilmiştir. Karıştırma hızının 150 rpm olması üretim için yeterli olmuştur.



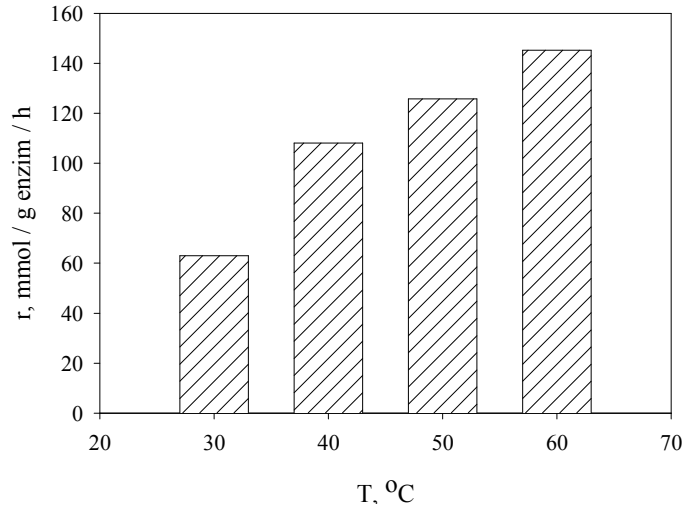
Şekil 4.20. Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretiminde karıştırma hızının ester derişimine etkisi a)40°C, b)50°C, c)60°C V=10 mL, Asit/Alkol=1.33/1, E/S=%5.



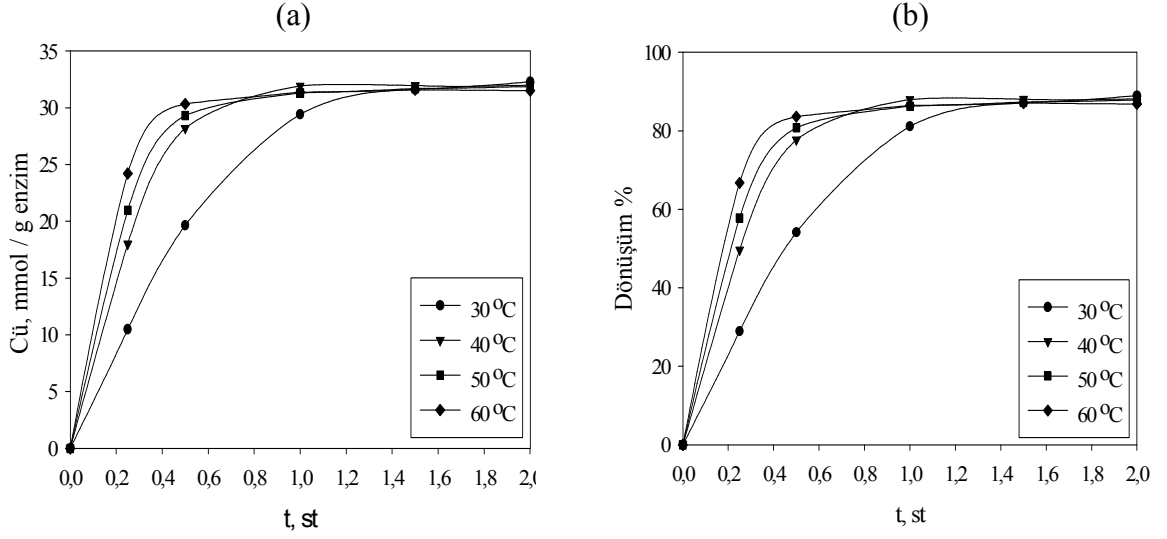
Şekil 4.21. Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretiminde, dönüşüme karıştırma hızının etkisi a)40°C, b)50°C, c)60°C. V=10 mL, Asit/Alkol=1.33/1, E/S=%5,

Oleyil oleat üretimine sıcaklığın etkisinin incelenmesi amacıyla, 30–60 °C sıcaklık aralığında Novozym 435 kullanılarak da deneyler erlenlerin ağızları kapalı tutularak gerçekleştirilmiş; tepkime ile oluşan su ortamda kalmıştır.

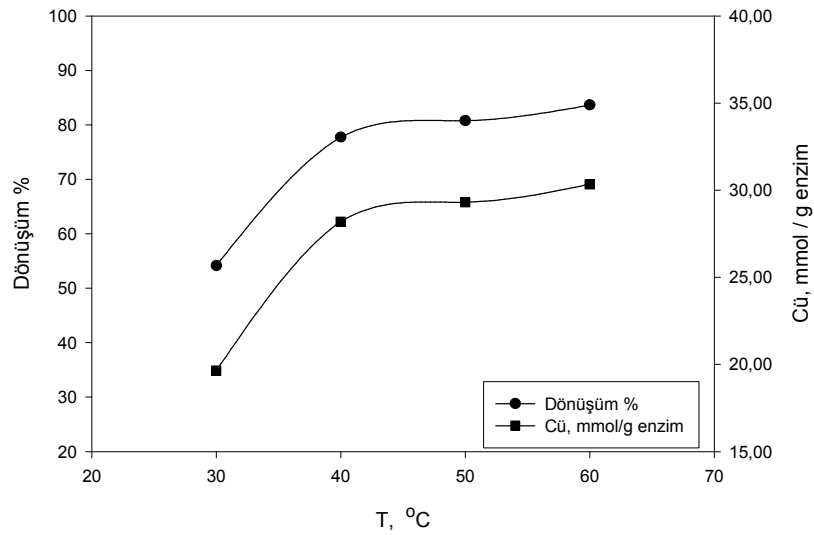
Başlangıç tepkime hızları beklendiği gibi sıcaklığın artmasıyla artmıştır (şekil 4.22). Maksimum başlangıç tepkime hızı, 60 °C için 145 mmol / g enzim /h olarak belirlenmiştir. Ester derişimi ve dönüşümün tepkime süresi ile değişimi farklı sıcaklıklar için şekil 4.23 a ve b’de görülmektedir. Sıcaklık arttıkça tepkime hızlarının artması dengeye ulaşma süresini kısaltmıştır. 40 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda 1 saat sonunda 31.9 mmol / g enzim (1.59 mmol / g karışım) olan maksimum oleyil oleat derişimi ve % 88 maksimum dönüşüm elde edilmiştir. 30 dakika sonunda elde edilen ester derişimi ve dönüşüm değerleri farklı sıcaklıklar için şekil 4.24’de verilmiştir.



Şekil 4.22. Novozym 435 ile oleyil oleat üretiminde sıcaklığın başlangıç tepkime hızlarına etkisi V=10 mL, Asit/alkol=1.33/1, E/S=%5, N=150rpm.



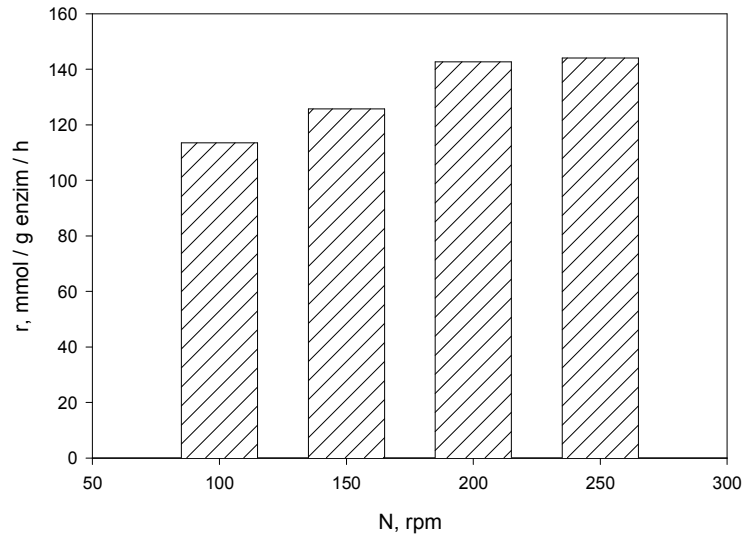
Şekil 4.23. Novozym 435 ile oleyil oleat üretimine sıcaklığın etkisi a) Ester derişimin tepkime süresi ile değişimi, b) Dönüşümün tepkime süresi ile değişimi. V=10 mL, Asit/alkol=1/1.33, E/S=%5, N=150rpm.



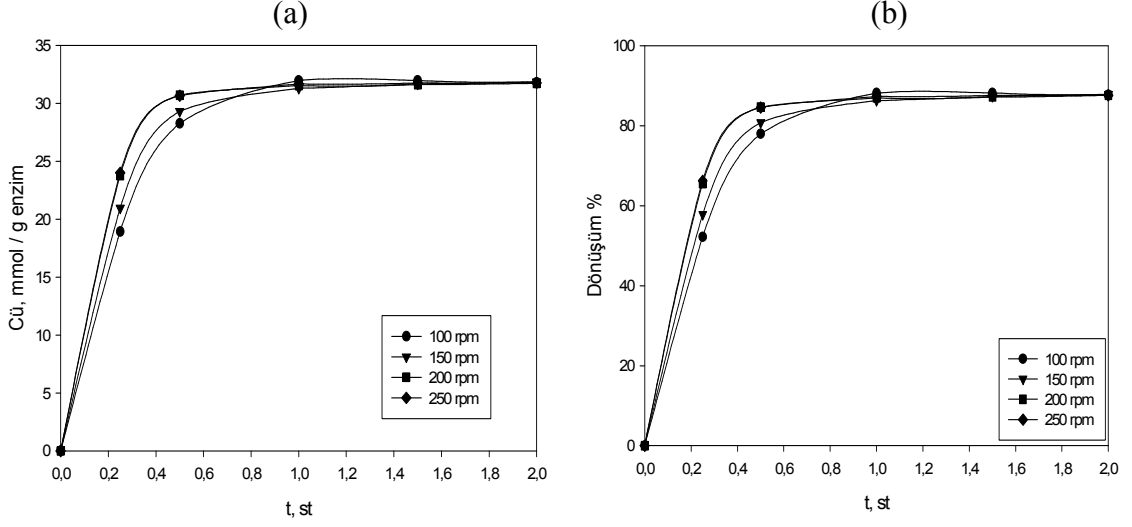
Şekil 4.24. Novozym 435 kullanımında sıcaklığın oleyil oleat derişimine ve dönüşüme etkisi V=10 mL, Asit/alkol=1/1.33, E/S=%5, N=150rpm, t=0.5 saat.

Novozym 435 ile oleyil oleat üretimine karıştırma hızının etkisinin incelenmesi amacıyla, 100–250 rpm karıştırma hızı aralığında deneyler kapalı erlenlerde gerçekleştirilmiştir.

Başlangıç tepkime hızları karıştırma hızının artması ile artmış; 200 rpm ve üzerinde 143 mmol / g enzim / h değerinde maksimum vererek sabit kalmıştır (şekil 4.25). Oleyil oleat derişimi ve dönüşümün tepkime süresi ile değişimi farklı karıştırma hızları için şekil 4.26 a ve b’de görülmektedir. Ester derişimi ve dönüşüm karıştırma hızının 100 rpm’den 200 rpm’e yükseltilmesi ile artmış, bu değerden sonra sabit kamıştır. Sonraki deneylerde 200 rpm karıştırma hızı kullanılmasına karar verilmiştir. 1 saat sonunda 31.8 mmol / g enzim (1.59 mmol / g karışım) olan maksimum ester derişimi % 87.5 dönüşüm ile elde edilmiştir.



Şekil 4.25. Novozym 435 ile oleyil oleat üretiminde karıştırma hızının başlangıç tepkime hızlarına etkisi V=10 mL, Asit/alkol=1.33/1, T=50°C, E/S=%5.

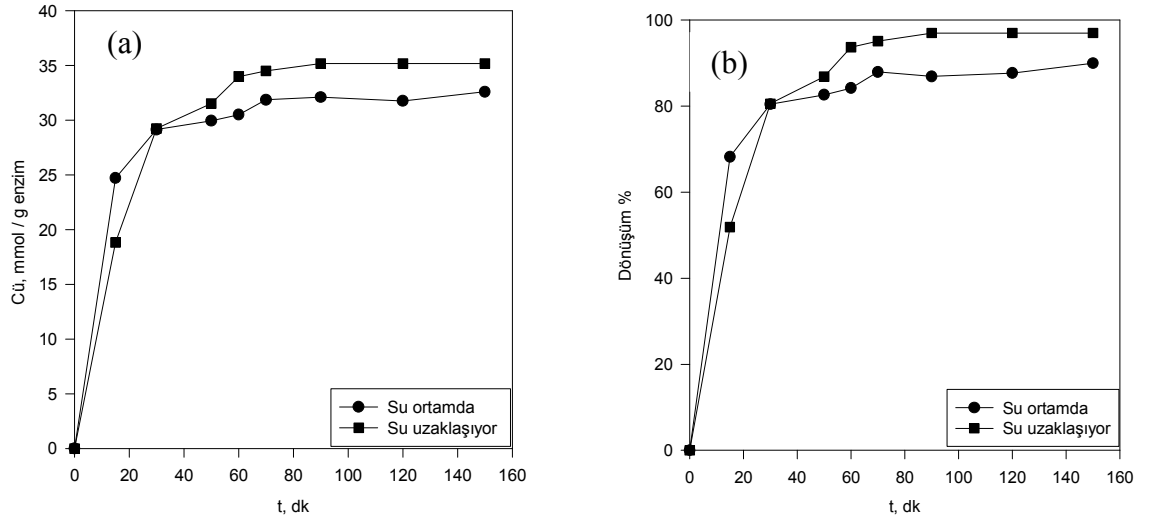


Şekil 4.26. Novozym 435 ile oleyil oleat üretimine karıştırma hızının etkisi a) Ester derişimin tepkime süresi ile değişimi, b) Dönüşümün tepkime süresi ile değişimi. V=10 mL, Asit/alkol=1.33/1, T=50°C, E/S=%5.

4.1.6. Tepkime ortamından su uzaklaştırma işleminin etkisi

Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretimine ortamdan su uzaklaştırılmasının etkisinin incelenmesi amacıyla, 2.5 saat süre ile deneyler ağız açık erlenlerde yapılmıştır.

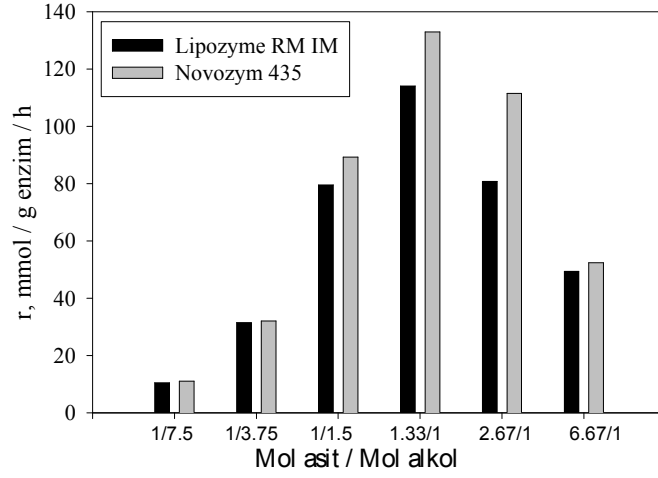
Oleyil oleatın enzimatik üretiminde elde edilen ester derişimine ve dönüşüme su uzaklaştırmasının etkisi şekil 4.27 (a ve b)'de verilmiştir. Suyun uzaklaştırılması ile 1.5 saat sonunda elde edilen dönüşüm %87'den %97'e yükselmiştir.



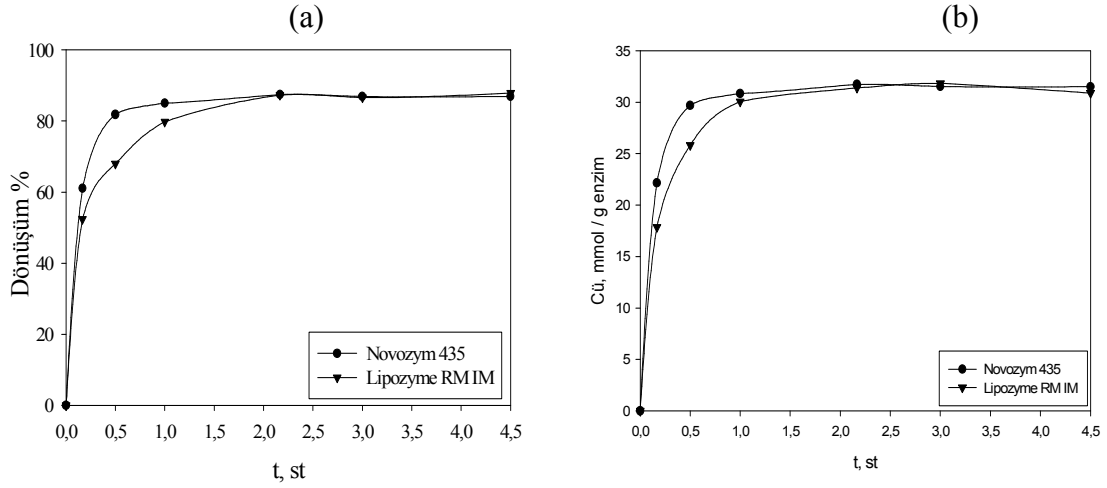
Şekil 4.27. Lipozyme RM IM ile oleyil oleat üretimine su uzaklaştırılmasının etkisi
a)Ester derişiminin tepkime süresi ile değişimi, b)Dönüşümün tepkime süresi ile değişimi, Asit/Alkol=1.33/1, T=50 °C, N=250 rpm, E/S=%5.

4.1.7. Enzim türü etkisi

Oleyil oleat üretimine enzim türünün etkisinin incelenmesi amacıyla, Lipozyme RM IM ve Novozym 435 kullanılarak deneyler yapılmıştır. Her iki enzim için farklı oleyik asit / oleyil alkol mol oranlarında (substrat mol oranları) elde edilen başlangıç hızları şekil 4.28’de verilmiştir. Görüldüğü gibi başlangıç hızları her iki enzim için substrat mol oranının artmasıyla artmakta, 1.33/1 mol oranında maksimumdan geçerek azalmaktadır. Substrat mol oranının 1.33/1 değerinde elde edilen en yüksek değerler, Lipozyme RM IM için 114 mmol / g enzim / h ve Novozym 435 için 133 mmol / g enzim / h olarak belirlenmiştir. Substrat mol oranının 1.33/1 değerinde her iki enzim kullanımında ester derişimi ve dönüşümün tepkime süresi ile değişimi şekil 4.29 a ve b’de verilmiştir. Novozyme 435 kullanımında elde edilen başlangıç tepkime hızları 1.17 kat daha yüksek olmuş, 2 saat sonunda her iki enzim ile denge değerleri olan maksimum 31.5 mmol / g enzim oleyil oleat derişimi ve % 87 dönüşüm elde edilmiştir. Daha yüksek tepkime başlangıç hızları elde edilmesi ve literatürde bu enzim ile ilgili süperkritik koşullarda bilgi bulunmaması nedeniyle çalışmanın ileri aşamalarında Novozym 435 kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.28. Lipozyme RM IM ve Novozym 435 kullanımında substrat mol oranının başlangıç tepkime hızlarına etkisi. E/S=%5, T=50 °C, N=200 rpm, V=30 mL.



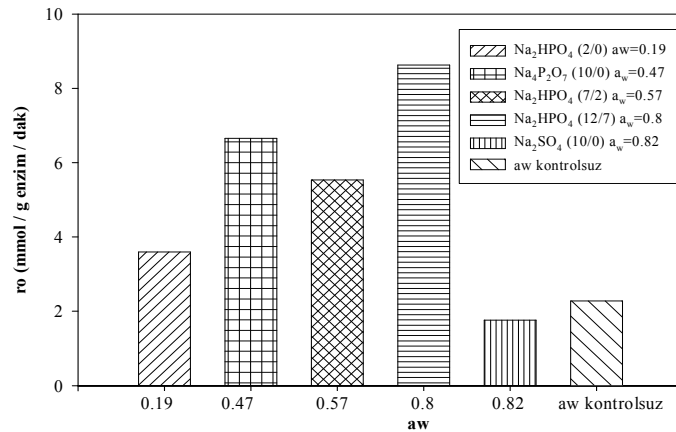
Şekil 4.29. Oleyil oleat üretimine enzim türünün etkisi a)Dönüşümün tepkime süresi ile değişimi b) Ester derişiminin tepkime süresi ile değişimi Asit/Alkol=1.33/1, E/S=%5, T=50 °C, N=200 rpm, V=30 mL

4.1.8. Atmosferik koşullarda tuz çifti kullanımının etkisi

Yapılan kaynak araştırması sırasında tuzların sadece yüksek sulu formlarının tepkime ortamına konması ile hidrate tuzun kendi düşük sulu formunu oluşturarak tampon görevi yapabileceği bildirildiği için deneyler üç kısımda (4.1.8.1.-4.1.8.3) yapılmıştır.

4.1.8.1. Yüksek sulu form/düşük sulu formda tuzlar ya da yüksek sulu form/susuz formda tuzların etkisi

Oleyil oleatın enzimatik üretimine hidrate tuz çifti kullanımının (ya da su aktivite kontrolunun) etkisinin incelenmesi amacıyla çizelge 3.4'de verilmiş olan yüksek sulu form/düşük sulu formda tuzlar ya da yüksek sulu form/susuz formda tuzların kullanılarak deneyler yapılmıştır. Hidrate tuz çiftlerinin başlangıç tepkime hızına etkisi şekil 4.30'da verilmiştir. Başlangıç tepkime hızı su aktivitesinin (a_w) artmasıyla önce artmış daha sonra azalmıştır. Su aktivitesinin kontrol edilmediği durumda daha düşük tepkime hızı (2.28 mmol / g enzim/dak) elde edilmiştir. Na_2HPO_4 tuzunun en yüksek sulu formlarının (Na_2HPO_4 (12/7) $a_w=0.8$) kullanılması ile 8.63 mmol / g enzim/dak değerinde en yüksek başlangıç tepkime hızı elde edilmiştir. Yaklaşık aynı su aktivitesine sahip olan iki farklı tuz çifti (Na_2HPO_4 (12/7) $a_w=0.8$, Na_2SO_4 (10/0) $a_w=0.82$) için başlangıç tepkime hızları karşılaştırıldığında birbirinden farklı değerler elde edilmesi kullanılan tuz türünün önemli olduğunu göstermektedir.



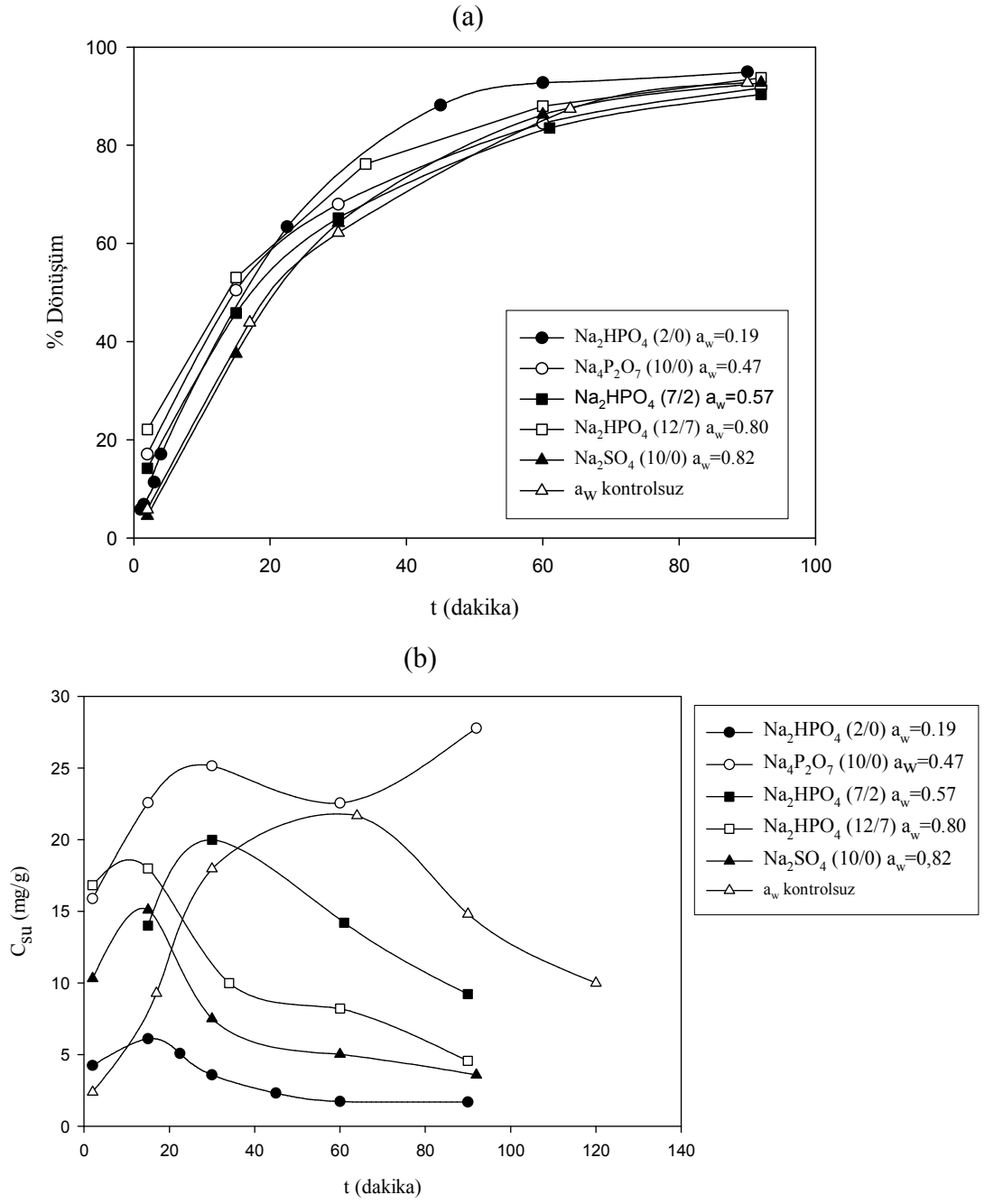
Şekil 4. 30. Yüksek sulu form/düşük sulu formda tuz ya da yüksek sulu form/susuz formda tuz (0.8 g) kullanımının başlangıç tepkime hızına etkisi. (T=50 °C, N=250 rpm, (mol oleyik asit/mol oleyil alkol =1/1, Enzim/Substratlar =%2, w/w, Tuzun her bir formundan eşit miktarda (0.4 g))

Hangi tuz çiftinin etkili olduğu sadece başlangıç hızlarına bakılarak değerlendirilmemelidir. Bunun yanında ortamda oleyil oleata dönüşüm (şekil 4.31.a) ve tepkime ortamı su miktarlarının (şekil 4.31.b) da tepkime süresi ile değişimleri incelenmelidir. Dönüşüme hidrate tuz çiftlerinin etkisini veren şekil 4.31.a incelendiğinde Na_2HPO_4 (2/0) kullanımında 60 dakika sonunda denge dönüşümüne (%93, $C_u=1.45$ mmol / g karışım ya da $C_u=72.5$ mmol / g enzim) ulaşıldığı; diğer tuzların kullanımında ve hidrate tuzun eklenmemesi (aw kontrolsuz) durumda 2 saat sonunda aynı dönüşüme ulaşıldığı görülmektedir. Tepkime süresince ortam su miktarının değişimi (şekil 4.31.b) incelendiğinde bütün eğrilerde su derişiminin tepkime süresinin artmasıyla önce arttığı sonra da azaldığı görülmektedir. Tepkimenin ilerlemesiyle önce su derişim artmakta, daha sonra ester oluştuğça ortam polaritesinin de azalması nedeniyle enzim üzerinde adsorplanmaya başlamaktadır. aw kontrolsuz durumda 60 dakika sonunda 21.7 mg/g değerinde maksimum su derişimine (60. dakikadaki ürün derişimi olan $C_u=1.364$ mmol/g karışım değeri kullanılarak hesaplanan su derişimi 24.5 mmol / g karışım) ulaştıktan sonra enzime adsorpsiyon nedeniyle düşmeye başlamış ve 2 saat sonunda 10 mg/g değerine ulaşmıştır (bkz EK3.). Su aktivitesinin kontrol edilmediği deney 24 saat süresince de gerçekleştirildiğinde dönüşüm ve su derişiminin değişmediği gözlenmiştir. İncelenen tuz çiftleri arasında Na_2HPO_4 (2/0) kullanımı daha kısa sürede dengeye ulaşılması ve tepkime ile oluşan su miktarının daha düşük seviyelerde tutulması (ortamın düşük su içeriğinde tamponlanabilmesi) nedeniyle uygundur.

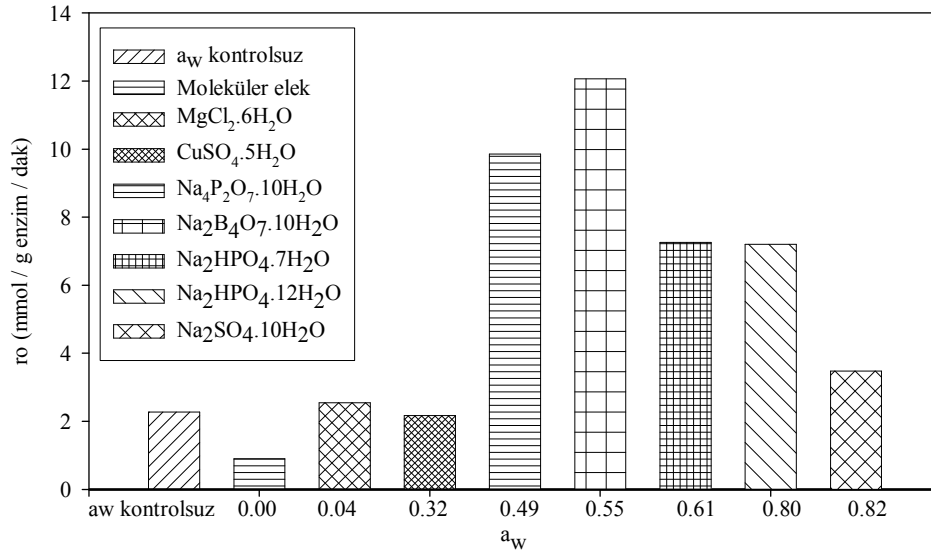
4.1.8.2. Yüksek sulu formdaki tuz kullanımının etkisi

Oleyil oleatın enzimatik üretimine yüksek sulu formda tuzun tek başına eklenmesi (0.8 g) ile su aktivitesinin etkisinin incelenmesi amacıyla, çizelge 3.5'de verilmiş olan yüksek sulu formdaki tuzlar kullanılarak deneyler yapılmıştır.

Hidrate tuzların başlangıç tepkime hızına etkisi şekil 4.32'de verilmiştir. Başlangıç tepkime hızı su aktivitesinin (aw) artmasıyla önce artmış; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ kullanımı

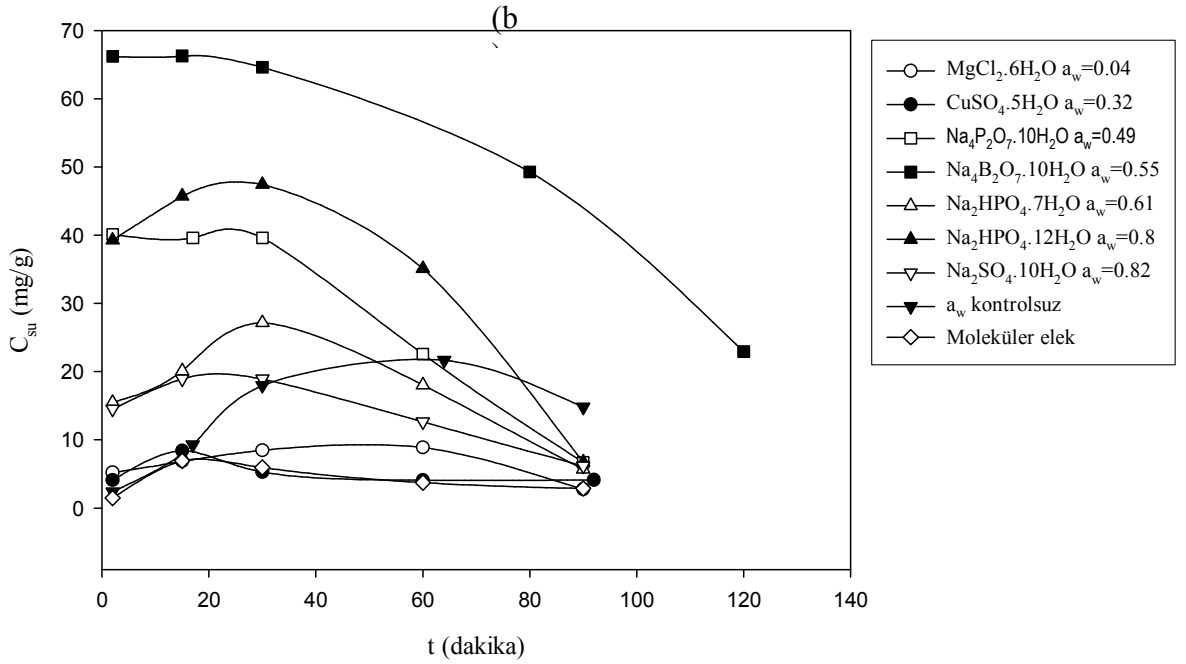
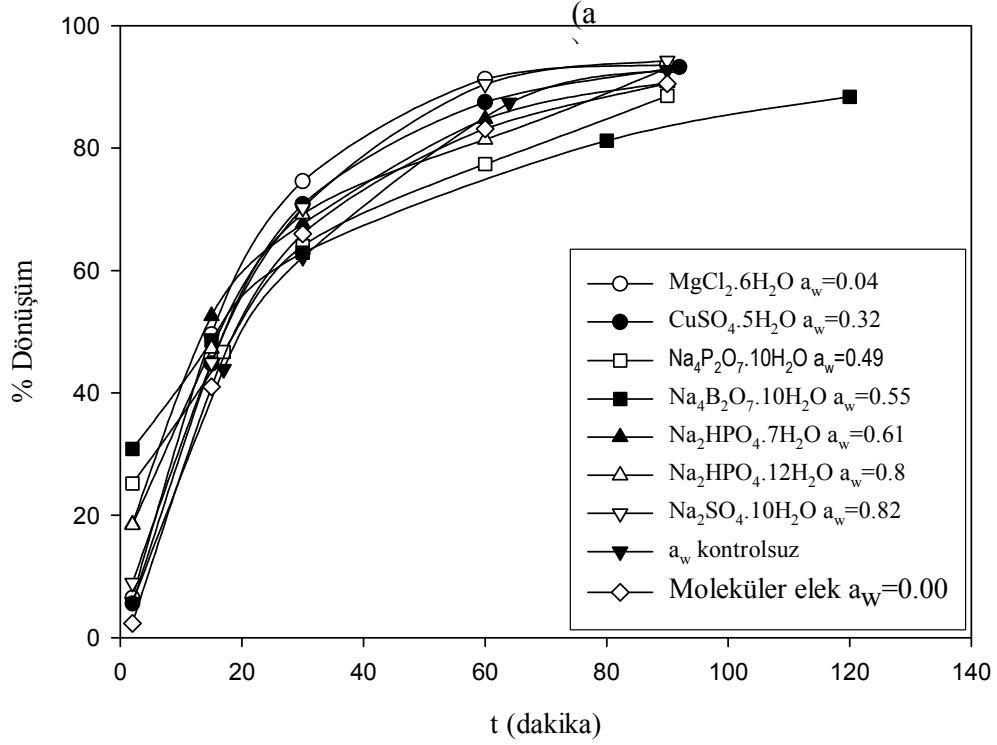


($a_w=0.55$) ile 12 mmol / g enzim / dak değerinde maksimum vererek daha sonra azalmıştır. Ortama moleküler elek eklenmesi ile 0.9 mmol / g enzim / dak değerinde en düşük başlangıç tepkime hızı elde edilmiştir. Farklı tuzların eklenmesi ile elde edilen başlangıç tepkime hızları, su aktivitesinin kontrol edilmediği durumda elde edilen hızdan (2.28 mmol / g enzim / dak) daha yüksek olmuştur.



Şekil 4.32 Sadece yüksek sulu formdaki tuz kullanımının başlangıç tepkime hızına etkisi. a)Dönüşüm, b)Su derişimi ($T=50\text{ }^\circ\text{C}$, $N=250\text{ rpm}$, Enzim/Substratlar =%2, w/w, mol oleyik asit/mol oleyil alkol =1/1, Moleküler elek ve tuz miktarları 0.8 g).

Elde edilen dönüşümün ve tepkime ortamındaki su derişiminin tepkime süresi ile derişimine kullanılan hidrate tuzların etkisi sırasıyla şekil 4.33.a ve 4.33.b'de verilmiştir. Görüldüğü gibi en yüksek başlangıç tepkime hızının elde edildiği $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ kullanımında, daha düşük dönüşüm (90. Dakikada %83) (şekil 4.33.a) elde edilmiş; ortamdaki organik faz su derişiminin de oldukça fazla olduğu görülmektedir (şekil 4.33.b). $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaSO_4 \cdot 10H_2O$ kullanılarak 90 dakika sonunda elde edilen dönüşüm (%93-94) değeri ile a_w kontrolsuz durumda elde edilen dönüşüm (%92.7) ile hemen hemen aynı olmuştur. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ kullanımında üretim ortamı, kullanılan bakırın çözünmesi ile hafif mavi renk almıştır.



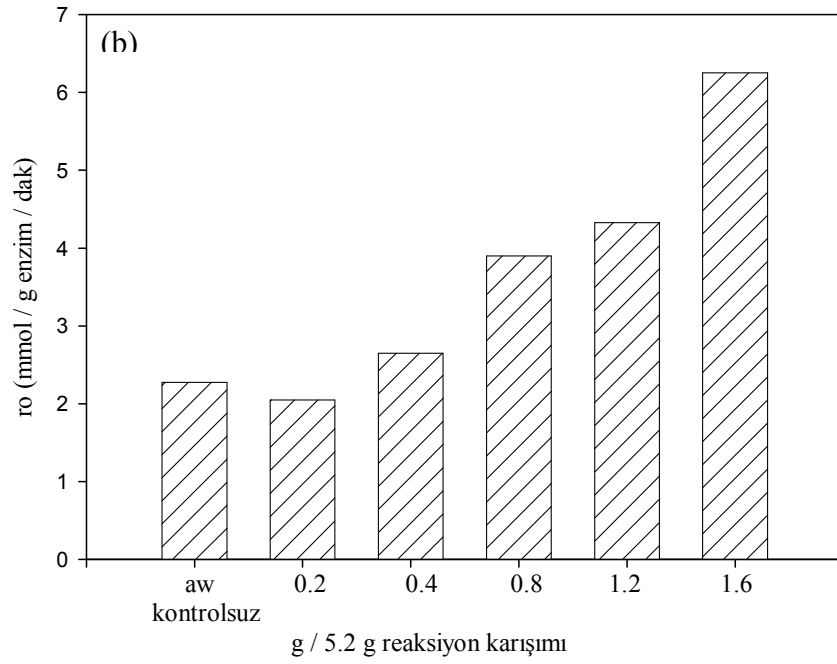
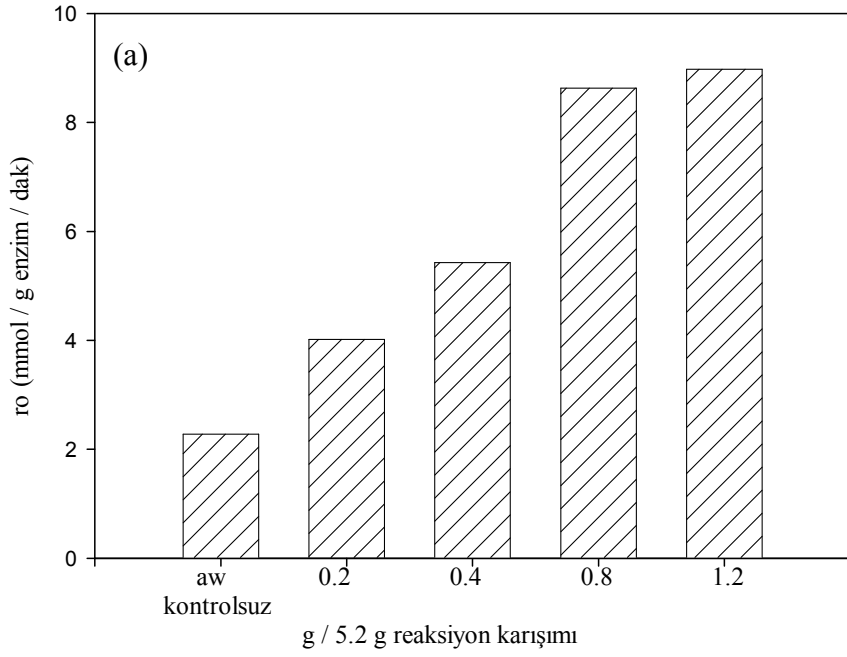
Şekil 4. 33. Yüksek sulu formdaki tuz kullanımının oleyil oleat üretimine etkisi. a)Dönüşüm, b)Su derişimi (T=50 °C, N=250 rpm, Enzim/Substratlar =%2, w/w, mol oleyik asit/mol oleyil alkol =1/1, Moleküler elek ve tuz miktarları 0.8 g)

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ tuzu dışında kullanılan bütün tuzlar ile 90 dakika sonunda elde edilen su derişimleri yaklaşık aynı değere (3-6 mg/g) düşmektedir. İncelenen tuzlar arasında 10 ve 12 molekül su içeren tuzlar kullanıldıklarında ortamda gözle görülür ikinci bir su fazı da oluşmakta ve organik fazdaki oleyik asitin titrasyon ile belirlenmesi sırasında titrasyon sonunun gözlenmesi de güç olmaktadır. Bütün bunlar dikkate alınarak sadece yüksek sulu formda $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ eklenebileceği düşünülebilir; ancak dönüşümde fazla değişim olmaması, prosesin ekonomik olarak işletilmesi ve ek ayırma işlemleri de dikkate alınarak ortama tuz eklenmesi gereksizdir.

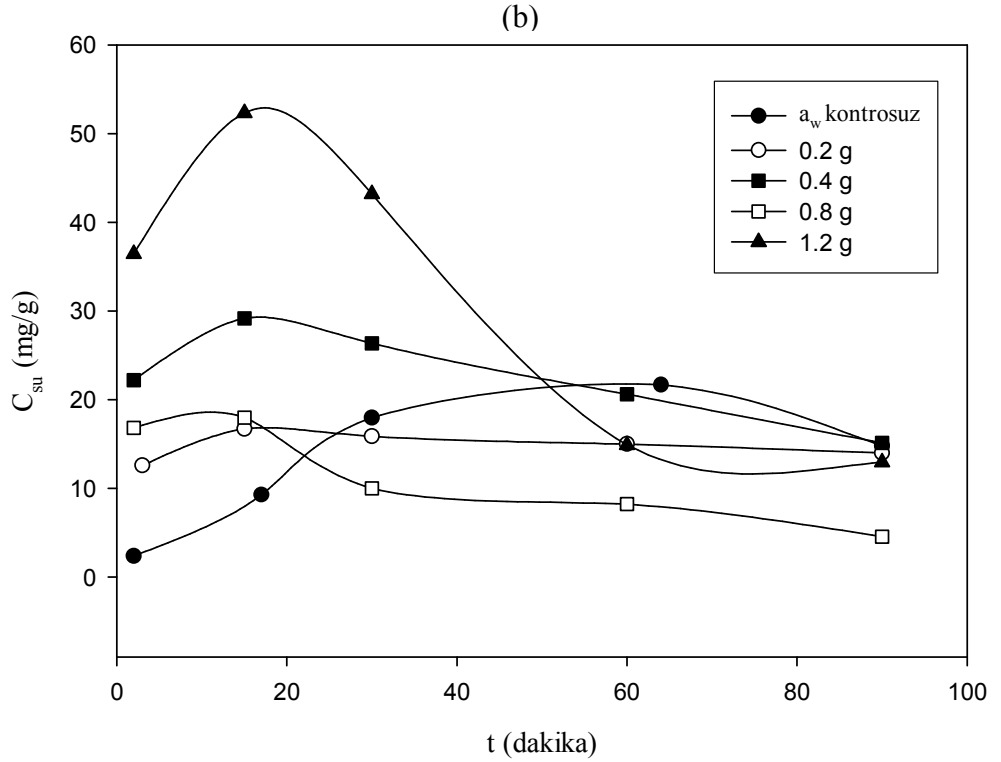
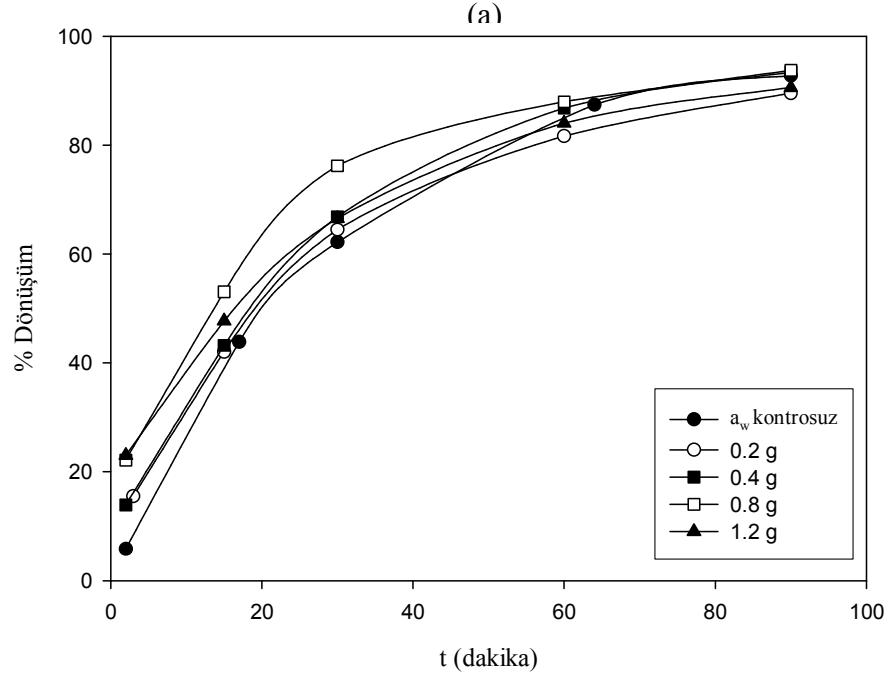
4.1.8.3. Tuz miktarının etkisi

Tuz miktarının oleyil oleatın enzimatik üretimine etkisinin incelenmesi amacıyla, Na_2HPO_4 tuzunun farklı hidrate formları farklı miktarlarda (0.2 g - 1.8 g) tepkime ortamına eklenerek deneyler yapılmıştır. Na_2HPO_4 tuzu, hem elde edilen dönüşüm değerlerinin yüksek olması hem de ucuz olması nedeniyle iki farklı formda [Na_2HPO_4 (12/7) ve Na_2HPO_4 (2/0)] hidrate tuzları şeklinde kullanılmıştır.

Başlangıç tepkime hızına tuz miktarının etkisi Na_2HPO_4 (12/7) için şekil 4.34.a'da, Na_2HPO_4 (2/0) için ise şekil 4.34.b'de verilmiştir. Tuz miktarının artmasıyla başlangıç tepkime hızı da artmaktadır. Tuz varlığında su aktivitesinin kontrol edilmediği durumdakinden daha yüksek tepkime hızları elde edilmiştir. Aynı miktar tuz kullanımında Na_2HPO_4 (12/7) ile elde edilen başlangıç tepkime hızları, Na_2HPO_4 (2/0) ile elde edilen hızlardan iki kat daha yüksek olmuştur. Na_2HPO_4 (12/7) tuz miktarının 0.2 g'dan 0.4 ve 0.8 g'a artırılmasıyla 90 dakika sonunda elde edilen dönüşüm değeri % 89.5'dan %93.5'a artmış; daha yüksek tuz miktarında (1.2 g) ise dönüşümde (%90.5) biraz düşme olmuştur (şekil 4.35.a). Tepkime ortamı organik faz su derişiminin tepkime süresi ile değişimi incelendiğinde (şekil 4.35.b) eğrilerin hepsinde önce biraz artış daha sonra da süre arttıkça azalma olduğu görülmektedir. Tuz miktarının artmasıyla başlangıçta tepkime ortamındaki su miktarı da fazla olmaktadır. 90 dakika



Şekil 4.34. Na_2HPO_4 tuz miktarının başlangıç tepkime hızına etkisi.
a) Na_2HPO_4 (12/7) b) Na_2HPO_4 (2/0). (T=50 °C, N=250 rpm, Enzim/Substratlar =%2, w/w, mol asit/mol alkol =1/1)



Şekil 4.35. Na_2HPO_4 (12/7) tuz miktarının oleyil oleat üretimine etkisi.

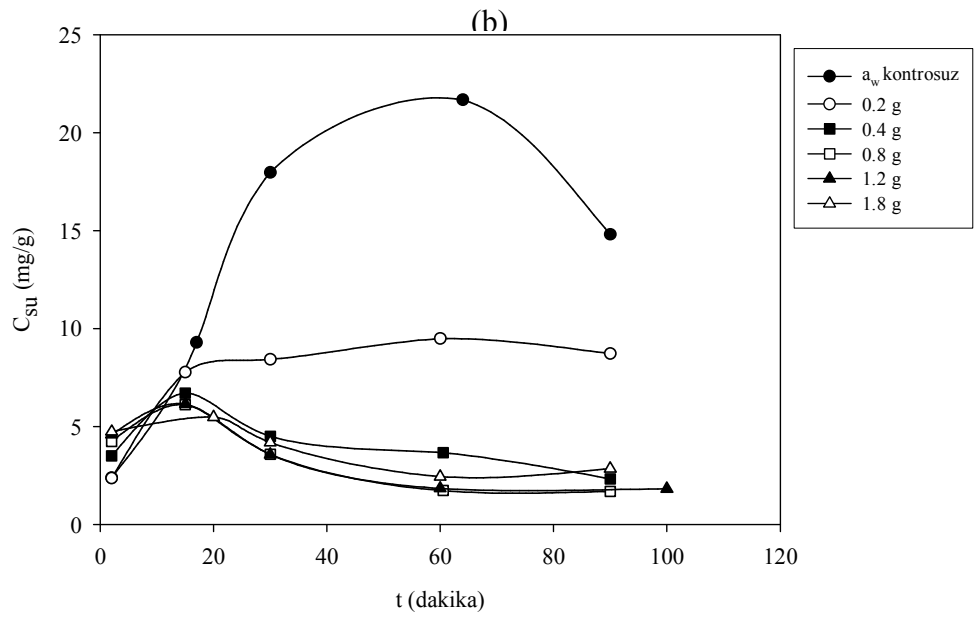
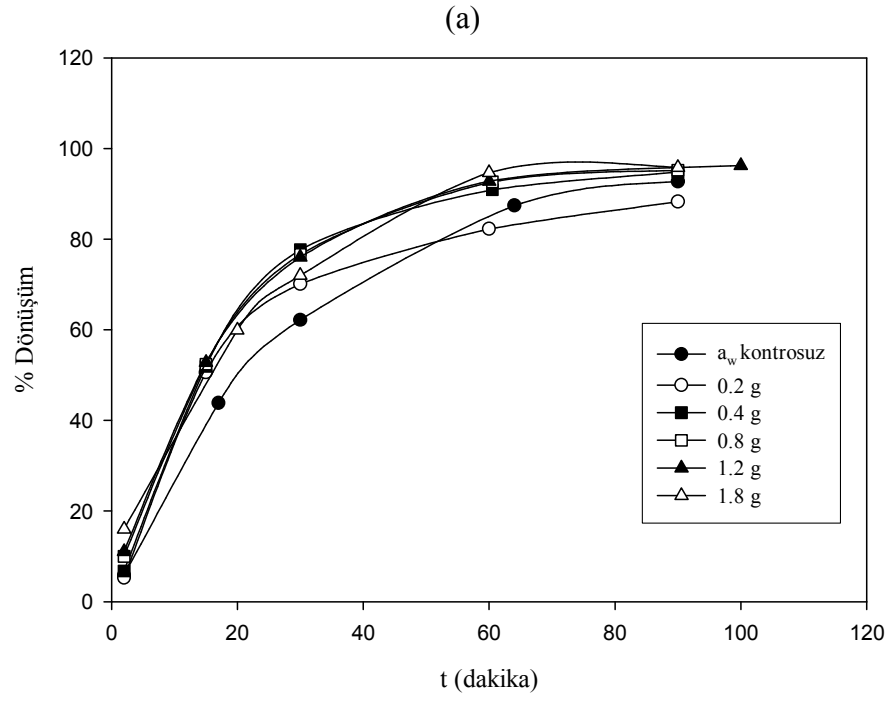
a) Dönüşüm b) Su derişimi

($T=50\text{ }^\circ\text{C}$, $N=250\text{ rpm}$, Enzim/Substratlar =%2, w/w, mol asit/mol alkol =1/1)

sonunda elde edilen su derişimi, 0.8 g tuz kullanımında 4.6 mg/g değerinde en düşük seviyede iken, diğer bütün ortamlarda su aktivitesinin kontrol edilmediği durumdaki su derişimi (15 mg/g) ile aynı olmuştur.

Na_2HPO_4 (2/0) tuz miktarının dönüşüme etkisini veren şekil 4.36.a incelendiğinde, tuz miktarının artmasıyla dönüşümün önce biraz arttığı; 0.4 g ve üzerindeki tuz miktarlarında ise değişmediği (%95, $\text{Cü}=74$ mmol / g enzim) görülmektedir. Su aktivitesinin kontrol edilmediği durumda 90 dakika sonunda elde edilen dönüşüm değeri %92.7 ($\text{Cü}=72.5$ mmo / g enzim) olarak belirlenmiştir. Tepkime ortamı su derişiminin tuz miktarı ve tepkime süresi ile değişimini veren şekil 4.36.b incelendiğinde, bütün tuz miktarlarında kontrolsüz durumda elde edilenden daha düşük miktarda su ortamda bulunmaktadır. İncelenen bütün tuz miktarları ile 30 dakika sonunda tepkime ortamındaki suyun iyi tamponlandığı görülmektedir. 0.2 g Na_2HPO_4 (2/0) tuzu kullanımında 90 dakika sonunda elde edilen dönüşüm değeri daha düşük (%88) olmuş (şekil 4.36.a); bununla bağlantılı olarak ortam su içeriği (8.5 mg/g) de diğer ortamlarda elde edilenden (1.7 mg/g - 2.8 mg/g) daha yüksek olmuştur. Bu durumda 0.4 g Na_2HPO_4 (2/0) tuzunun ortama eklenebileceği düşünülebilir; ancak dönüşümde fazla değişim olmaması, prosesin ekonomik olarak işletilmesi ve ek ayırma işlemleri de dikkate alınarak ortama tuz eklenmesinin gereksiz olduğu söylenebilir.

Atmosferik koşullarda çözücüsüz ortamda hidrate tuz çifti kullanılmadığı zaman elde edilen sonuçlar, literatürdeki bilgiler ile karşılaştırılmış elde edilen sonuçlar çizelge 4.3'de verilmiştir. Görüldüğü gibi bu çalışmada daha az enzim kullanılarak daha yüksek ürün derişimi ve dönüşüm değerleri elde edilmiştir. Hidrate tuz çifti kullanımı ile elde edilen bulgular, üretim ortamında tuz kullanılmaması durumunda elde edilen bulgular ile çizelge 4.4.'de karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.36. Na_2HPO_4 (2/0) tuz miktarının oleyi loleat üretimine etkisi.

a) Dönüşüm b) Su derişimi

($T=50^\circ\text{C}$, $N=250$ rpm, Enzim/Substratlar =%2, w/w, mol asit/mol alkol =1/1)

Çizelge 4.3. Atmosferik koşullarda oleyil oleatın çözücüsüz ortamda üretiminin literatür ile karşılaştırılması

Kaynak	Enzim	Koşullar	Sonuçlar
Mucherjee and Kiewitt (1988)	Lipozyme <i>Mucor miehei</i>	Eşmolar substrat (1 mmol) T=60 °C, t=2 saat	Cü=15 mmol / g enzim
Knez et al (1994-2000)	Lipozyme <i>Mucor miehei</i>	Eşmolar substrat (47 mmol) T=60°C, E/S=%3.6 t=2 saat	ro=74 mmol / g enzim / h Cü= 37 mmol / g enzim (1.3 mmol / g / g enzim) Dönüşüm %82
Bu çalışma	Novozym 435 <i>Candida antarctica</i>	Eşmolar substrat (8 mmol) T=50°C, E/S=%2 t=1.5 saat N=250 rpm	ro= 136 mmol / g enzim / h ro=(2.55 mmol/g enzim/dak) Cü= 72.5 mmol / g enzim Cü=1.45 mmol / g karışım Dönüşüm %92.7

Çizelge 4.4. Atmosferik koşullarda oleyil oleatın çözücüsüz ortamda üretimine hidrate tuz çiftinin etkisi.

Hidrate tuz çifti yok	Novozym 435 <i>Candida antarctica</i>	Eşmolar substrat (8 mmol) T=50°C, E/S=%2 t=1.5 saat N=250 rpm	ro=(2.55 mmol/g enzim/dak) Cü= 72.5 mmol / g enzim Cü=1.45 mmol / g karışım Dönüşüm %92.7
Hidrate tuz çifti Yüksek sulu/ düşük sulu form Yüksek sulu / susuz form	Novozym 435 <i>Candida antarctica</i>	Eşmolar substrat (8 mmol) T=50°C, E/S=%2 t=1.5 saat N=250 rpm	Na ₂ HPO ₄ . (12 / 7) aw=0.8 r_{omaks}= 8.63mmol / g enzim / dak En etkili tuz çifti Na₂HPO₄. (2 / 0) aw=0.19 ro=3.9 mmol/g enzim/dak Cü= 74 mmol / g enzim (1.486 mmol / g karışım) Dönüşüm %95.2
Yüksek sulu form Tek başına	Novozym 435 <i>Candida antarctica</i>	Eşmolar substrat (8 mmol) T=50°C, E/S=%2 t=1.5 saat N=250 rpm	Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O aw=0.55 r_{omaks}= 12 mmol / g enzim / dak En etkili tuz çifti MgCl₂.6H₂O ro=2.55 mmol/g enzim/dak Cü=73 mmol / g enzim (1.46 mmol / g karışım) Dönüşüm %93

4.1.9. Oleyil oleat üretiminin RSM ile optimizasyonu

Deneysel oleyil oleat derişimleri, ikinci merteye polinomial modele (Eşitlik 2.54) uydurulmuştur. Bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu ve elde edilen deneysel cevap çizelge 4.5’de verilmiştir. Model için varyans analizi (ANOVA) ise çizelge 4.6’da verilmiştir. Regresyon için olabirlik (probability) değeri oldukça düşüktür ($P=2.929 \times 10^{-9}$, $P < 0.05$ olduğunda önemli). Belirlenen F değeri (35.2), tablodan okunan $F_{0,01(14,15)}$ değerinden (3.66) büyüktür. ANOVA testi kullanılan modelin, cevap ve bağımsız değişkenler arasındaki gerçek ilişkiyi verdiğini göstermektedir. İyi bir model cevaptaki değişimin tümünü açıklar. Regresyon katsayısı bu kriter için bir ölçüdür ve model tarafından açıklanan değişimin toplam değişime bölünmesi ile hesaplanır (Khuri and Cornell 1987). R^2 1’e yaklaştıkça gözlenen ve tahmin edilen değerler arasındaki ilişki daha iyi olur. Bu çalışmada, model için regresyon katsayısı $R^2 = 0.97354$ ve ayarlanan regresyon katsayısı $R_{Adj}^2 = 0.97048$ olarak belirlenmiştir. R^2 ’nin bu değeri toplam değişimin sadece %2.65’inin regresyon modeli tarafından açıklanamadığını gösterir. Korelasyon katsayısının ($R = 0.98668$) büyük değeri bağımsız değişkenler arasında iyi bir ilişki olduğunu gösterir (Box et al. 1978).

Cevap değişkeni ve test değişkenleri arasındaki ampirik ilişki kodlanmış birimde aşağıdaki eşitlik ile verilmiştir.

$$\begin{aligned} \hat{y} = & 736.34 + 10.595 x_R + 13.907 x_E + 0.74138 x_T + 2.4553 x_t - 48.409 x_R^2 - 12.597 x_E^2 \\ & - 1.2065 x_T^2 - 1.294 x_t^2 - 3.0046 x_R x_E - 1.2983 x_R x_T - 0.89668 x_R x_t - 1.5154 x_E x_T \\ & - 5.3396 x_E x_t - 6.2455 x_T x_t \end{aligned} \quad (4.1)$$

Çizelge 4.5. Bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu ve deneysel cevap

Deneysel No	X _R	X _E	X _T	X _t	X _R	X _E (%)	X _T (°C)	X _t (dk)	C _p (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	1.00	4	45	45	622.58
2	1	-1	-1	-1	1.67	4	45	45	670.69
3	-1	1	-1	-1	1.00	8	45	45	671.67
4	1	1	-1	-1	1.67	8	45	45	687.34
5	-1	-1	1	-1	1.00	4	55	45	656.79
6	1	-1	1	-1	1.67	4	55	45	675.02
7	-1	1	1	-1	1.00	8	55	45	672.02
8	1	1	1	-1	1.67	8	55	45	689.73
9	-1	-1	-1	1	1.00	4	45	75	668.67
10	1	-1	-1	1	1.67	4	45	75	682.99
11	-1	1	-1	1	1.00	8	45	75	675.57
12	1	1	-1	1	1.67	8	45	75	687.92
13	-1	-1	1	1	1.00	4	55	75	654.52
14	1	-1	1	1	1.67	4	55	75	677.96
15	-1	1	1	1	1.00	8	55	75	660.30
16	1	1	1	1	1.67	8	55	75	683.08
17	-2	0	0	0	0.67	6	50	60	521.18
18	2	0	0	0	2.00	6	50	60	568.26
19	0	-2	0	0	1.33	2	50	60	637.25
20	0	2	0	0	1.33	10	50	60	738.69
21	0	0	-2	0	1.33	6	40	60	732.70
22	0	0	2	0	1.33	6	60	60	734.36
23	0	0	0	-2	1.33	6	50	30	726.62
24	0	0	0	2	1.33	6	50	90	739.74
25	0	0	0	0	1.33	6	50	60	736.88
26	0	0	0	0	1.33	6	50	60	736.55
27	0	0	0	0	1.33	6	50	60	735.75
28	0	0	0	0	1.33	6	50	60	736.43
29	0	0	0	0	1.33	6	50	60	736.18
30	0	0	0	0	1.33	6	50	60	736.28

Çizelge 4.6. Model için varyans analizi (ANOVA)

Değişimin Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kare	F-testi	Probability (P değeri)
Regression (Model)	76148	14	5439.1	35.2	2.929x10 ⁻⁹
Error	2318	15	154.5		
Toplam	78665	29			

Belirlenen katsayılar, Student-t dağılımı ve ilgili değerler çizelge 4.7’de verilmiştir. Her bir katsayının önemi, p değerleri ve Student-t testi ile belirlenmiştir. Student-t testi değerleri, herbir katsayının standart hatasına bölünmesi ile elde edilebilir ve büyük değerleri katsayının standart hatasından büyük olduğunu gösterir. p değerleri her bir katsayının önemini belirlemek için ve test değişkenleri arasında birbirleri ile iç-etkileşimleri anlamak için gereklidir. t’nin büyük değerleri ve p’nin küçük değerleri ilgili parametrelerin ve iç-etkileşimlerin önemli olduğunu gösterir.

Çizelge 4.7. Belirlenen katsayılar, Student-t dağılımı ve ilgili değerler

<u>Değişkenler</u>	Katsayılar	Standart Hata	t-testi	p-değeri
Kayma	736.34	4.7953	153.56	0
X _R	10.595	2.412	4.3928	0.0005
X _E	13.907	2.412	5.766	<0.0001
X _T	0.74138	2.412	0.30738	0.7628
X _t	2.4553	2.412	1.018	0.3248
X _R *X _R	-48.409	2.2437	-21.575	<0.0001
X _E *X _E	-12.595	2.2437	-5.6141	<0.0001
X _T *X _T	-1.2065	2.2437	-0.53773	0.59865
X _t *X _t	-1.294	2.2437	-0.57673	0.57268
X _R *X _E	-3.0046	2.9628	-1.0141	0.32661
X _R *X _T	-1.2983	2.9628	-0.43821	0.66748
X _R *X _t	-0.89668	2.9628	-0.30265	0.76631
X _E *X _T	-1.5154	2.9628	-0.51149	0.61645
X _E *X _t	-5.3396	2.9628	-1.8022	0.09164
X _T *X _t	-6.2415	3.1486	-1.9823	0.06607

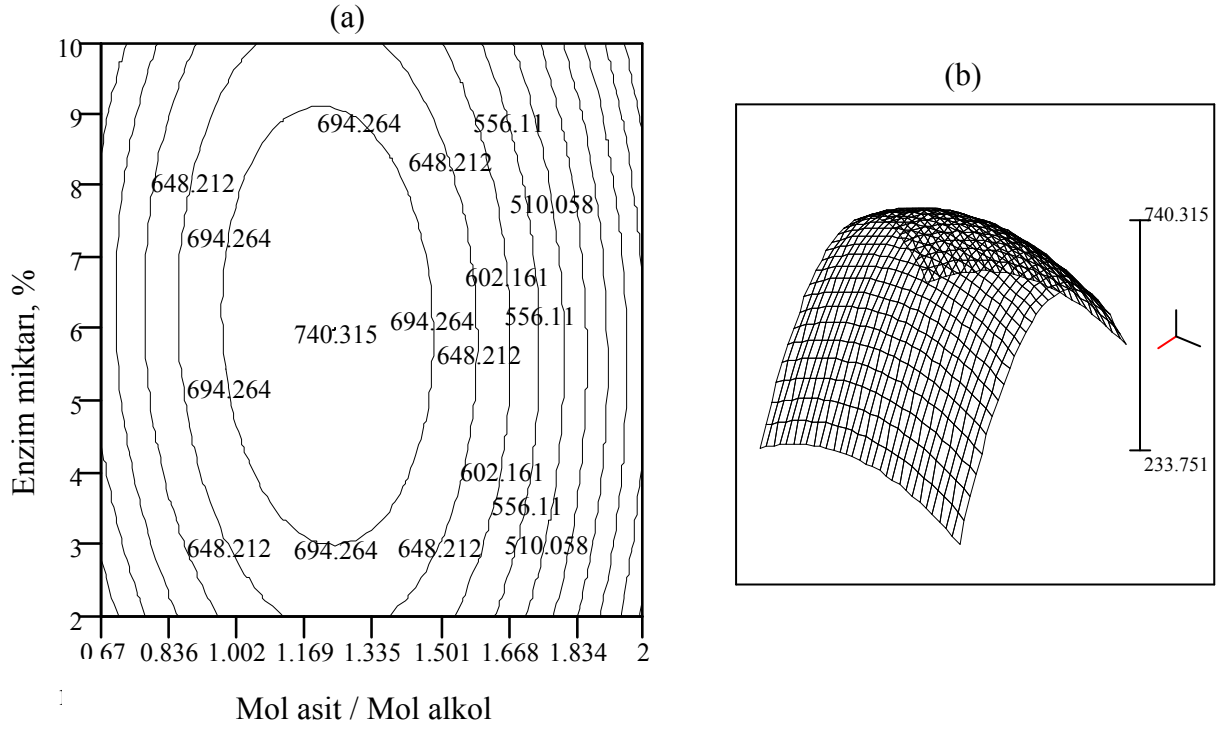
$$R^2 = 0.97354, \quad R_{Adj}^2 = 0.97048, \quad R = 0.98668$$

Asit/alkol mol oranı (x_R) ve enzim miktarı (x_E) ile bunların ikinci merteye etkileri (x_R^2 , x_E^2), kendi p değerlerinin çok düşük ($p<0,0005$) olması nedeniyle oldukça önemlidir. Bu ise asit/alkol mol oranı ve enzim miktarının oleyil oleat üretimi ile direkt ilişkili olduğunu gösterir. x_R ve x_E üretimi pozitif etkilerken x_R^2 ve x_E^2 'nin üretime etkileri negatif olmuştur. İç-etkileşimler arasında enzim miktarı ve reaksiyon süresi (x_E-x_t) ile süre ve sıcaklık (x_t-x_T) orta derecede öneme sahip olmuşlardır ($p<0,1$). Bu iç etkileşimler üretim üzerine negatif etkiye sahip olmuşlardır.

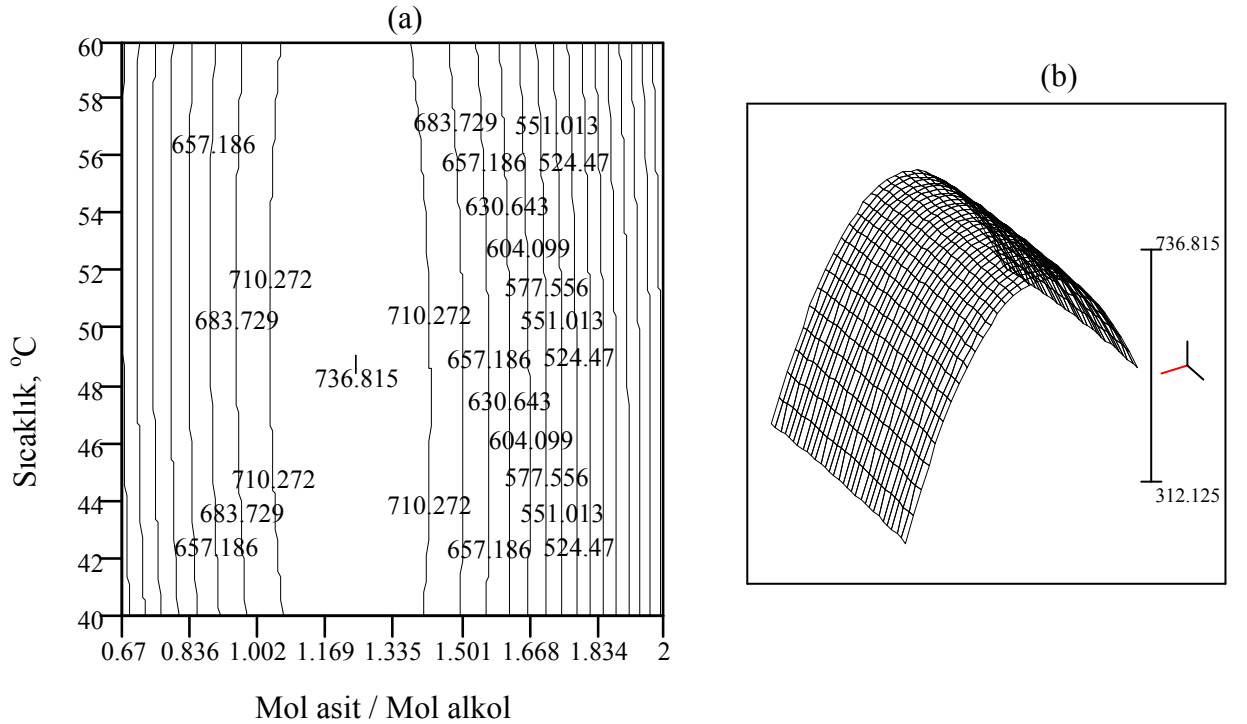
Eşderişim eğrileri ve üç boyutlu çizimler test değişkenlerinin farklı değerleri için cevabı tahmin etmede oldukça yararlıdır. Katsayılarla bağlı olarak regresyon eşitliği çok farklı şekillerde olabilir. Buna bağlı olarak eşderişim eğrileri, maksimum nokta yada minimum nokta (eliptik yada dairesel), eğer nokta (minimax), durgun tepe, yükselen/azalan tepe durumunda olabilir. Cevap yüzeyinin dairesel olması değişkenler arasındaki iç-etkileşimin ihmal edilebilir olduğunu gösterebilir. Elips ya da eğer şeklindeki yüzeyler iç-etkileşimlerin önemli olduğunu gösterir (Box et al. 1978, Khuri and Cornell 1987, Myers 1971, Montgomery 1997, Murthy et al.2000).

Bağımsız değişkenler ile oleyil oleat derişiminin değişimini veren eşderişim eğrileri şekil 4.37-4.42'de verilmiştir. Oleyil oleat için eşderişim eğrileri, asit/alkol mol oranı ve enzim miktarının fonksiyonu olarak sabit sıcaklık ($X_T=50^\circ\text{C}$) ve sabit süre için ($X_t=60$ dak) şekil 4.37'de verilmiştir. Çizimin eliptik yapısı, deneysel bölge içinde durgun bir noktaya (maksimum nokta) sahip olduğunu, asit/alkol mol oranı ve enzim miktarı arasındaki iç-etkileşimin önemli olduğunu gösterir. Görüldüğü gibi oleyil oleat derişimi durgun noktadan uzaklaştıkça azalır. Substrat molar oranının artması ile ester derişimi önce artmakta, 1.27 mol oranında ve % 6 enzim miktarında bir maksimumdan geçerek azalmaktadır. Bu değer üzerindeki molar oranlar Novozym 435 için inhibisyon etki yapmıştır.

Oleyil oleat için eşderişim eğrileri, asit/alkol mol oranı ve sıcaklığın fonksiyonu olarak ($X_E=\% 6$ ve $X_t=60$ dak) şekil 4.38'de, asit/alkol mol oranı ve tepkime süresinin fonksiyonu olarak ($X_E=\% 6$ ve $X_T=50^\circ\text{C}$) şekil 4.39'da verilmiştir. Ester derişimi, sıcaklık (şekil 4.38) ve süreden (şekil 4.39) neredeyse bağımsız, asit alkol mol oranına



Şekil 4.37. Oleyil oleat üretimine substrat mol oranı ve enzim miktarının etkisi.
Sıcaklık ve tepkime süresi merkez noktada ($X_T=50\text{ }^\circ\text{C}$, $X_t=60\text{ dak}$).
a) Eşderişim eğrileri, b) İç etkileşimin üç boyutlu çizimi.

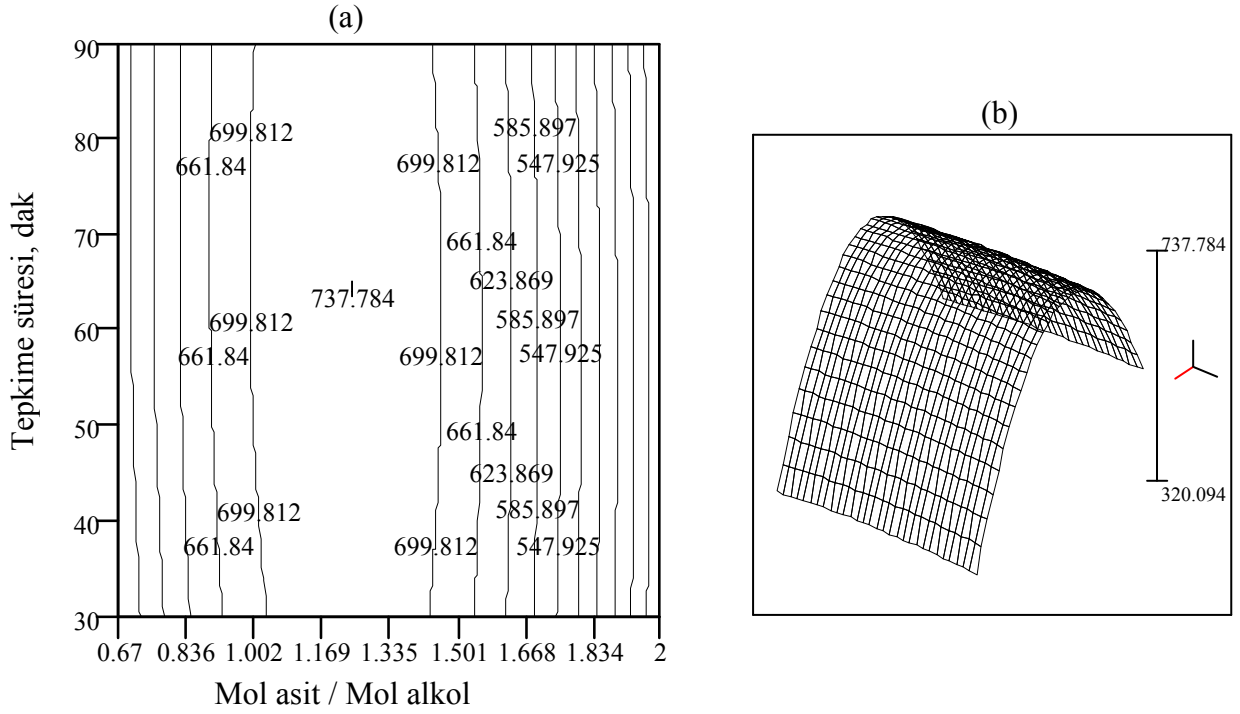


Şekil 4.38. Oleyil oleat üretimine substrat mol oranı ve sıcaklığın etkisi.
Enzim miktarı ve tepkime süresi merkez noktada ($X_E=6\%$, $X_t=60\text{ dak}$).
a) Eşderişim eğrileri, b) İç etkileşimin üç boyutlu çizimi.

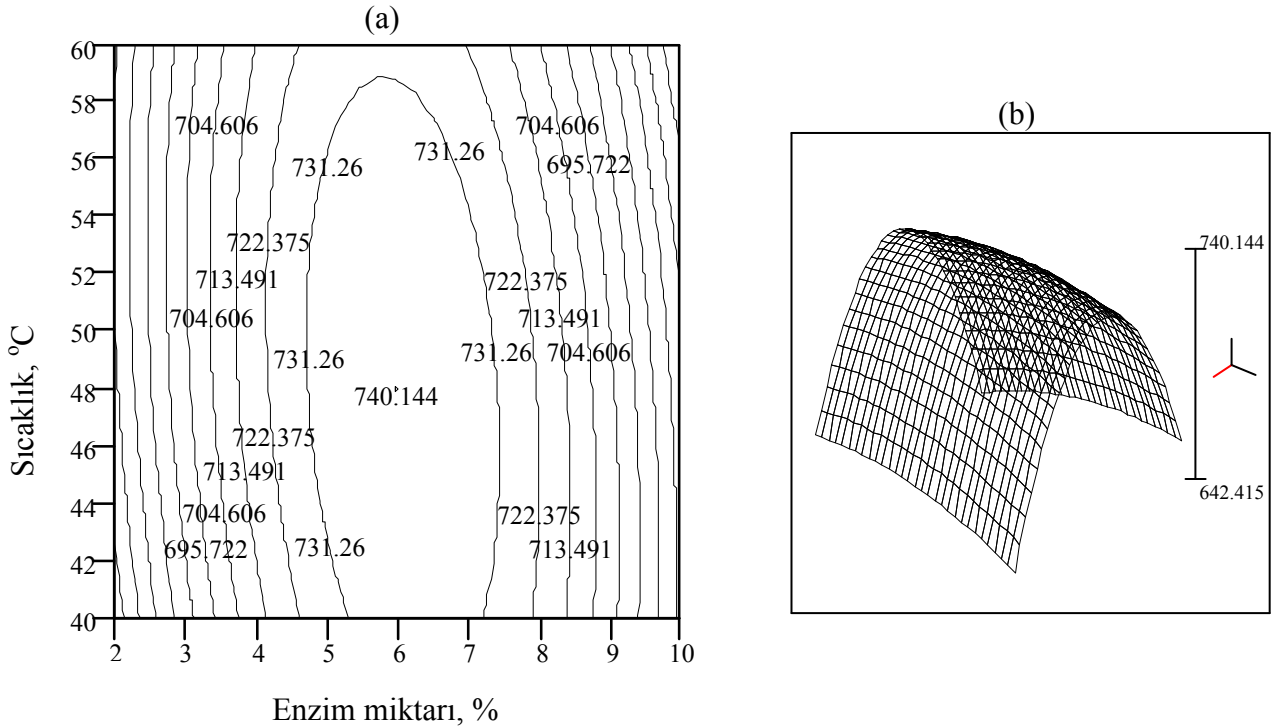
oldukça bağımlı olmuştur. 737 g/L olan maksimum ester derişimine, 1.27 substrat molar oranı kullanılarak 48°C sıcaklıkta (şekil 4.38) ya da 65 dak sonunda (şekil 4.39) ulaşılmıştır. Eşderişim eğrilerinin yapısı (şekil 4.37-şekil 4.39), asit/alkol mol oranı ve enzim miktarı arasındaki iç-etkileşimin asit/alkol mol oranı ve sıcaklık ya da asit/alkol mol oranı ve tepkime süresi arasındaki ilişkilerden daha önemli olduğunu göstermektedir.

Oleyil oleat için eşderişim eğrileri, enzim miktarı ve sıcaklığın fonksiyonu olarak ($X_R=1.333$ ve $X_t=60$ dak) şekil 4.40'da, enzim miktarı ve tepkime süresinin fonksiyonu olarak ($X_R=1.333$ ve $X_T=50^\circ\text{C}$) şekil 4.41'de verilmiştir. Eliptik çizimler değişkenler arasındaki iç-etkileşimlerin önemli olduğunu gösterir. Enzim miktarının % 6'ya kadar artmasıyla esterleşme artmış, bu noktanın üzerinde azalmıştır. 740 g/L olan maksimum ester derişimine % 6 enzim miktarı kullanılarak 48°C sıcaklıkta (şekil 4.40) ya da 52 dak sonunda (şekil 4.41) ulaşılmıştır.

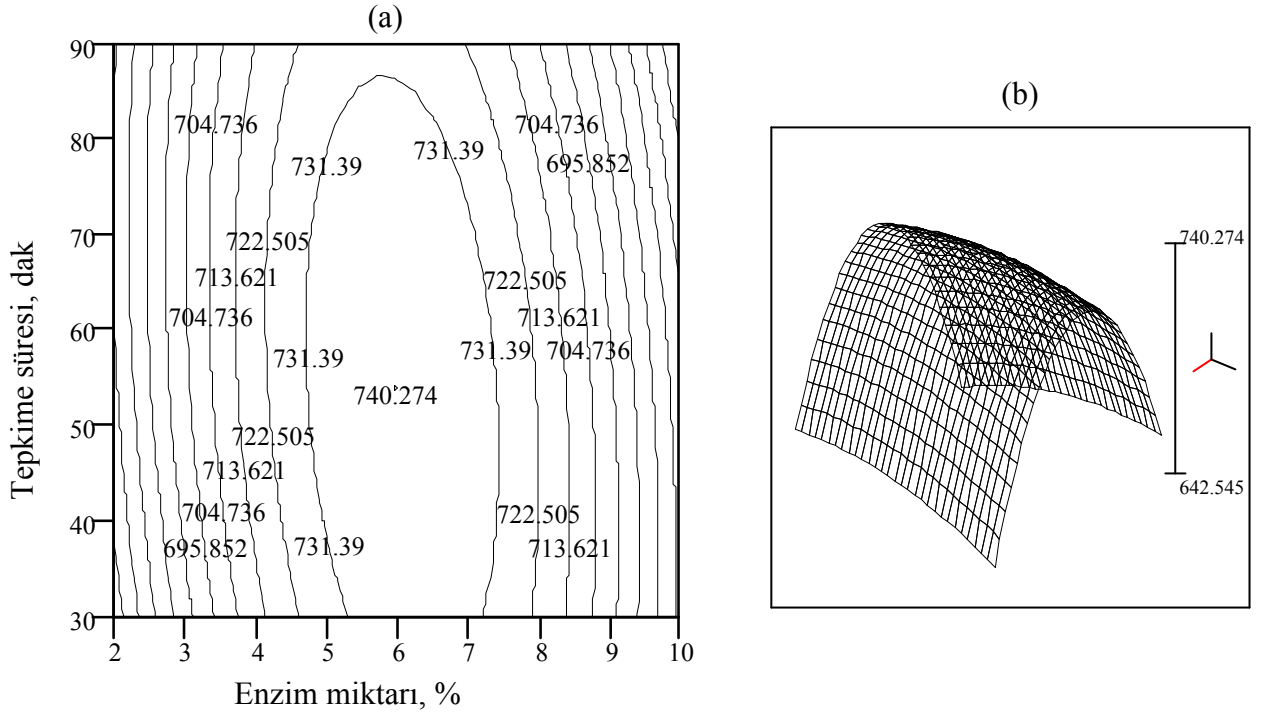
Oleyil oleat için eşderişim eğrileri, tepkime süresi ve sıcaklığın fonksiyonu olarak ($X_R=1.333$ ve $X_T=\% 6$) şekil 4.42'de verilmiştir. Çizimin eğer nokta yapısı durgun noktanın deneysel bölgenin içinde olduğunu ve sıcaklık-tepkime süresi arasındaki iç-etkileşimin esterleşmeyi etkilediğini göstermektedir. Durgun noktadan uzaklaştıkça gidilen yöne bağılı olarak ester derişiminde artma ya da azalma olduğu görülmektedir. Bu durumda düşük sıcaklık ve uzun süre yüksek ester derişimi verir. Benzer şekilde yüksek sıcaklık ve kısa süre aynı eğilimi verir.



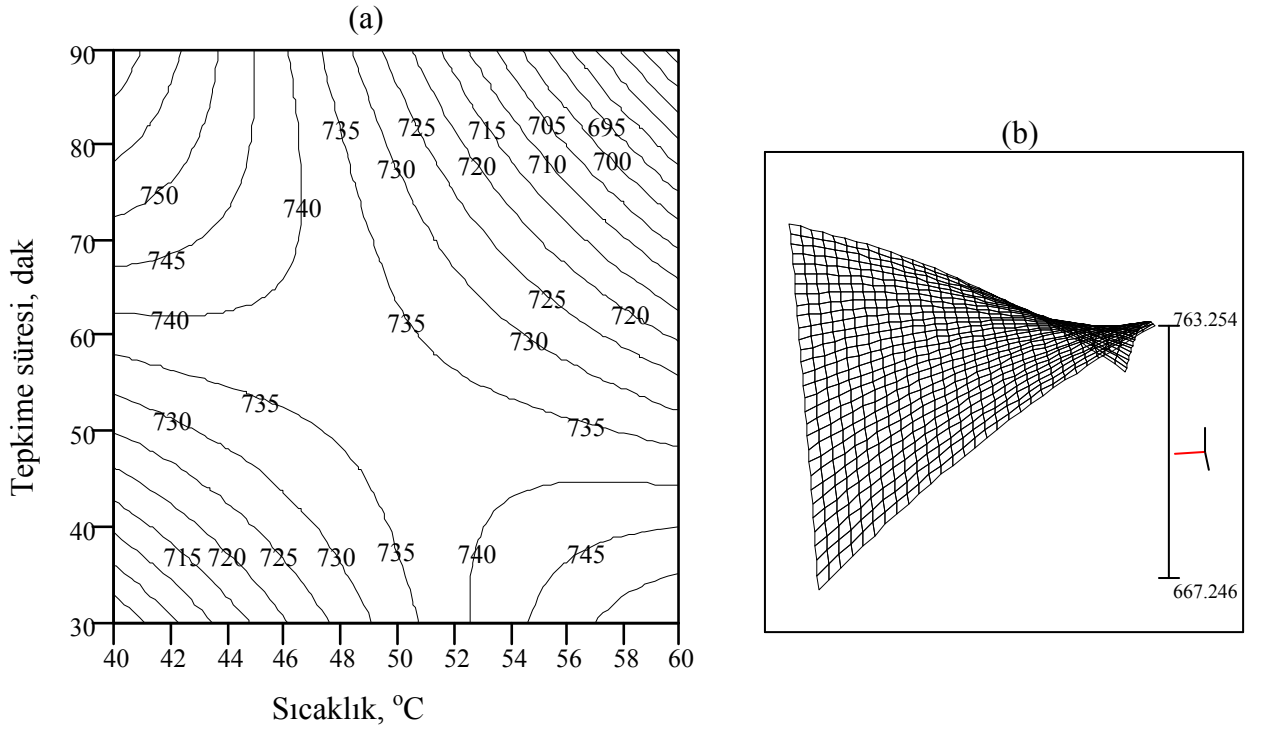
Şekil 4.39. Oleyil oleat üretimine substrat mol oranı ve tepkime süresinin etkisi. Enzim miktarı ve sıcaklık merkez noktada ($X_E=6\%$, $X_T=50\text{ }^\circ\text{C}$).
a) Eşderişim eğrileri, b) İç etkileşimin üç boyutlu çizimi.



Şekil 4.40. Oleyil oleat üretimine sıcaklık ve enzim miktarının etkisi. Substrat mol oranı ve tepkime süresi merkez noktada ($X_R=1.333$, $X_t=60$ dak).
a) Eşderişim eğrileri, b) İç etkileşimin üç boyutlu çizimi.



Şekil 4.41. Oleyil oleat üretimine tepkime süresi ve enzim miktarının etkisi.
 Substrat mol oranı ve sıcaklık merkez noktada ($X_R=1.333$, $X_T=50$ °C).
 a) Eşderişim eğrileri, b) İç etkileşimin üç boyutlu çizimi.



Şekil 4.42. Oleyil oleat üretimine tepkime süresi ve sıcaklığın etkisi.
 Substrat mol oranı ve enzim miktarı merkez noktada ($X_R=1.333$, $X_E=6$ %).
 a) Eşderişim eğrileri, b) İç etkileşimin üç boyutlu çizimi.

Regresyon eşitliğinin çözümü için çok basamaklı Monte Carlo optimizasyonu kullanılmıştır. Bağımsız değişkenlerin optimum değerleri kodlanmış ve doğal formda çizelge 4.8'de verilmiştir.

Gözlenen oleyil oleat derişim değerleri modelden tahmin edilen değerler ile karşılaştırılmış ve aralarındaki fark ile birlikte çizelge 4.9'da verilmiştir. Elde edilen fark değerlerine bakıldığında bu değerlerin, hata varyansının (154.5, çizelge 4.6) karekökünün iki katını geçmediği görülebilir. Bu veri, regresyon modelinin çok uygun olduğunu gösterir (Box et al. 1978, Khuri and Cornell 1987).

Literatürde oleyil oleat üretimi % 5 Lipozyme ve eş molar oleyik asit oleyil alkol (47 mmol) kullanılarak 60°C'de gerçekleştirilmiştir. 650 g/L (1,4 mmol/g substrat karışımı) oleyil oleat derişimi 7 saat sonunda elde edilmiştir (Habulin et al. 1996). Mucherjee and Kiewit (1988), 15 mmol oleyil oleat / enzim (695 g/L) ester derişimini % 10 Lipozyme ve eşmolar substrat karışımı (1 mmol) kullanarak aynı sıcaklıkta elde etmişlerdir. Garcia et al. (1993) Lipozyme kullanarak vakum basıncı altında gerçekleştirdikleri oleyil oleat üretimini optimize etmişler ve % 73 dönüşüm elde etmişlerdir. Bu çalışmada ise CCD ve RSM kullanılarak oleyik asitin oleyil oleata % 88 dönüşümü ile 734 g/L (1,58 mmol ester / g substrat karışımı) oleyil oleat derişimi elde edilmiştir. Modelden tahmin edilen maksimum oleyil oleat derişimi (737 g/L) optimum değerlerde gerçekleştirilen deneylerden elde edilen deneysel değer ile (734 g/L) oldukça uyumludur. Geliştirilen model ile oleyil oleat derişimi doğru olarak tahmin edilebilmektedir.

Çizelge 4.8. Bağımsız değişkenlerin optimum değerleri

	Asit/alkol mol oranı	% Enzim (w/w Substratlar)	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)
0 Kodlanmış değer	0.121	0.551	0.265	0.961
1 Doğal değer	1.373	7.10	51.30	75.00

Çizelge 4.9. Gözlenen oleyil oleat derişim değerleri ile modelden tahmin edilen değerler ve aralarındaki fark

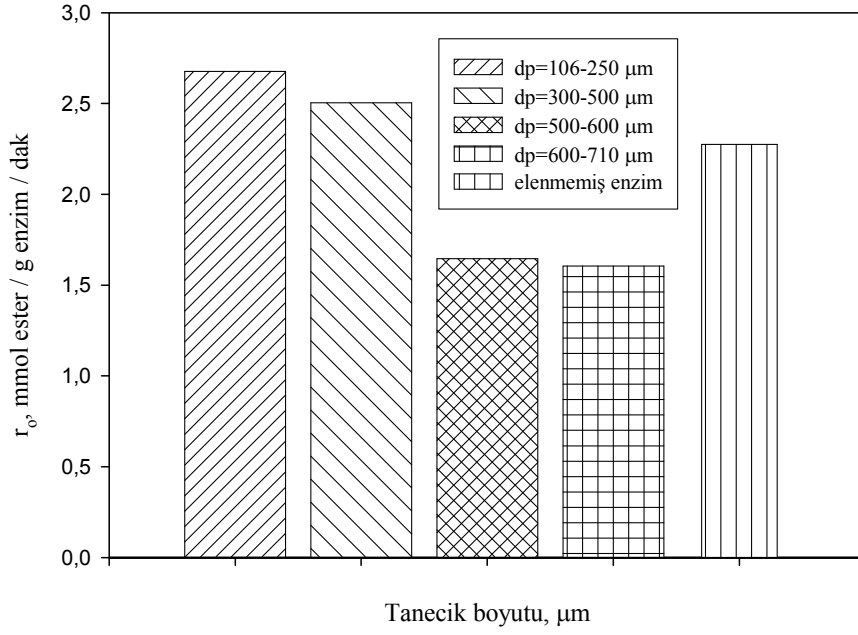
Deney No	Gözlenen C _p (g/L)	Tahmin edilen C _p (g/L)	Fark
1	622.58	627.34	-4.76
2	670.69	658.49	12.2
3	671.67	674.58	-2.91
4	687.34	693.84	-6.5
5	656.79	646.47	10.32
6	675.02	672.72	2.3
7	672.02	688.11	-16.09
8	689.73	702.47	-12.74
9	668.67	656.87	11.8
10	682.99	684.92	-1.93
11	675.57	682.72	-7.15
12	687.92	698.87	-10.95
13	654.52	650.84	3.68
14	677.96	673.99	3.97
15	660.30	671.08	-10.78
16	683.08	682.34	0.74
17	521.18	521.28	-0.1
18	568.26	563.68	4.58
19	637.25	658.18	-20.93
20	738.69	713.78	24.91
21	732.70	730.18	2.52
22	734.36	732.78	1.58
23	726.62	726.78	-0.16
24	739.74	736.00	3.74
25	736.88	736.37	0.51
26	736.55	736.37	0.18
27	735.75	736.37	-0.62
28	736.43	736.37	0.06
29	736.18	736.37	-0.19
30	736.28	736.37	-0.09

4.1.10. İç kütle aktarım kısıtlamalarının etkisi

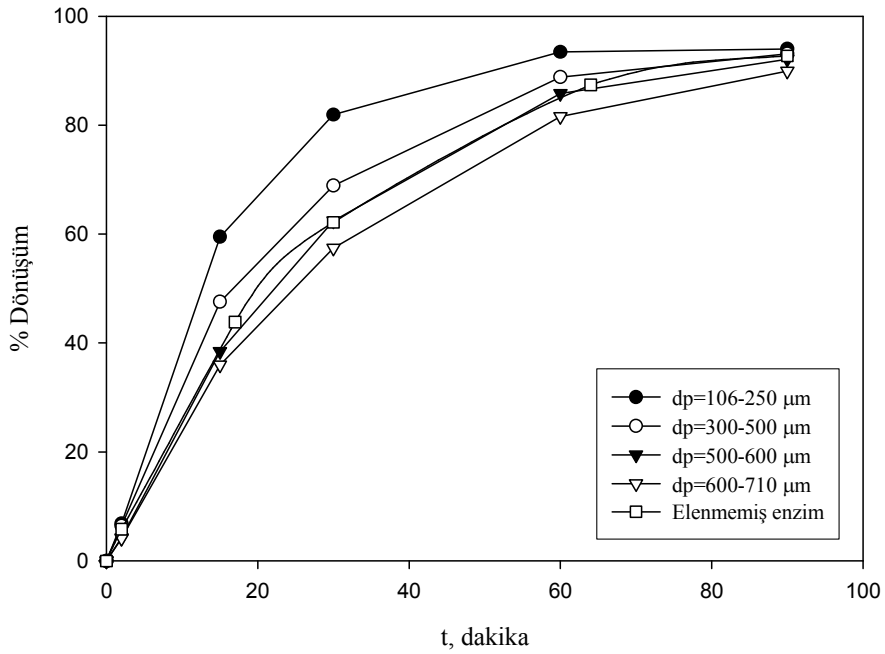
Katı/sıvı katalitik heterojen tepkimelerde substrat moleküllerinin enzim yüzeyine ulaşarak tepkimeye girmesi ve oluşan ürünlerin tekrar yığın faza ulaşmaları yedi basamak üzerinden gerçekleşir. İlk olarak substratlar derişim farkı nedeniyle film tabakası içinde aktararak enzim arayüzeyine gelirler (dış kütle aktarımı), daha sonra enzimin gözenekleri içinde aktif konumlara doğru yayınırlar (iç kütle aktarımı). Üçüncü basamakta substratlar enzimin aktif konumlarına adsorplanırlar. Tepkimenin gerçekleştiği dördüncü basamağın ardından meydana gelen ürünler ve dönüşmeyen substratlar enzim aktif konumlarından desorplanırlar (beşinci basamak), ve önce gözenek içinde yayınırlar (altıncı basamak) daha sonra da film içinde yayınarak yığın faza ulaşırlar. Karıştırma hızının yeterli büyüklükte ayarlanması ile (Novozym 435 için 250 rpm) dış kütle aktarım hızı ihmal edilebilir.

İç kütle aktarımının etkisinin incelenmesi amacıyla, Novozym 435, 106 µm-710 µm aralığında dört farklı tanecik boyutuna elenmiştir. Elde edilen bu dört farklı enzim ile ve elenmemiş olan enzim ile asit/alkol mol oranı 1/1 ve enzim miktarı %2 kullanılarak 50 °C'de ve 250 rpm karıştırma hızında deneyler yapılmış ve oleyil oleat üretimi incelenmiştir. Başlangıç tepkime hızının tanecik boyutu ile değişimi şekil 4.43'de verilmiştir. Tanecik boyutunun küçülmesi ile başlangıç tepkime hızı artmış; en küçük tanecik boyutu kullanımı ile 2.676 mmol / g enzim/ dak maksimum tepkime hızı elde edilmiş; gözenek içi yayınma önemli olmuştur. Hiç elenmemiş olan enzim ile yapılan deneyde ise elde edilen tepkime hızı 2.276 mmol / g enzim /dak olmuştur. Oleyik asitin oleyil oleata dönüşümüne tanecik boyutunun etkisi şekil 4.44'de verilmiştir. Beklendiği gibi tanecik boyutunun azalması ile dönüşüm değerleri artmış; 90 dakika sonunda 106-250 µm aralığındaki enzim ile %94 dönüşüm (73.44 mmol ester / g enzim) elde edilmiş; hiç elenmemiş enzim ile aynı süre sonunda %92.7 dönüşümüne (72.4 mmol ester / g enzim) ulaşılmıştır.

Araştırmada kullanılan her iki enzim için azot gazı kullanılarak gözenek boyut dağılım analizleri yapılmış; elde edilen sonuçlar Novozym 435 için EK-5'de Lipozyme RM IM için ise EK-6'da verilmiştir.



Şekil 4.43. Novozym 435 ile oleyil oleat üretiminde başlangıç tepkime hızına tanecik büyüklüğünün etkisi. (Asit/alkol=1/1, E/S=%2, T=50°C, N=250 rpm, V=6 mL)



Şekil 4.44. Novozym 435 ile oleyil oleat üretiminde dönüşüme tanecik büyüklüğünün etkisi. (Asit/alkol=1/1, E/S=%2, T=50°C, N=250 rpm, V=6 mL)

4.2. Süperkritik Koşullarda Dolgulu Kolonda Oleyil Oleat Üretimi

Oleyik asit ve oleyil alkol kullanılarak Novozym 435 katalizörlüğünde oleyil oleatın kesikli ve sürekli olarak üretimi gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Dolgulu kolonda kesikli üretim

Oleyil oleatın süperkritik koşullarda işletilen dolgulu kolon reaktörde kesikli olarak üretilmesi için 10 mL hacimli çelik kartuş kullanılmıştır. Kartuşun her iki ucunda 2µ gözeneğe sahip filtreler bulunmaktadır. Farklı düzenlerde enzim ve substratlar reaktöre konarak deneyler yapılmıştır. Bu farklı düzenleme ve elde edilen dönüşüm değerleri aşağıda verilmiştir. Deneyler 80 atm ve 40 °C koşullarında yapılmıştır.

1. Asit/Alkol =1/1 olacak şekilde hazırlanmış olan substrat karışımı tartılarak 3.5 g reaktöre konmuştur. Üzerine cam yünü eklenerek 0.5 g enzim konmuştur. Akış hızı 40 µL/dk'a ayarlanmıştır. Reaktör çıkışına yerleştirilmiş olan tüplere hiç ortam gelmemiştir. Enzim reaktörden alındığında ise kuru olarak çıkmıştır. Muhtemelen akış hızı çok düşük olmuştur.
2. Statik olarak tutma (reaktörü basınçlandırarak belli süre bekletme) süresinin (10 dakika) etkisinin incelenmesi amacıyla 4 g ortam reaktöre konmuş cam yünü substratlara emdirilerek enzim üst kısma konmuştur. Cam yünü kullanılmadığı durumda enzim dibe çökmektedir. Akış hızı 0.25 mL/dak'ya ayarlanmıştır. Farklı tüplere toplanan ortamların analiz edilmesi sonucu elde edilen dönüşüm %4-11 arasında değişim göstermiştir.
3. Statik tutma süresi 30 dakika yapılmıştır. 3.5 g ortam 3 g destek (sıvıları emdirmek için kullanılan wet support) ile karıştırılarak reaktöre konmuş; üzerine cam yünü ve 0.5 g enzim eklenmiştir. 20 dak sonunda dönüşüm %5.53 olmuştur.

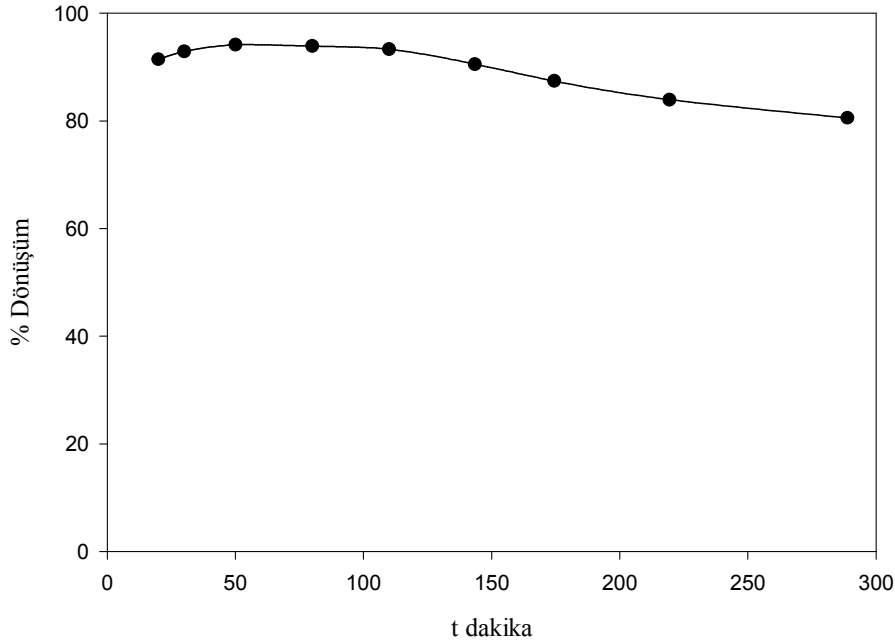
Elde edilen dönüşüm değerlerinin düşük olması ve endüstriyel açıdan uygunluğu nedeni ile sürekli dolgulu kolon kullanılarak üretim çalışmalarına başlanmıştır.

4.2.2. Süperkritik koşullarda dolgulu kolonda sürekli üretim

Sürekli olarak işletilen dolgulu yatak reaktörde, ürün oluşumu ve dönüşüm üzerine sıcaklık, basınç, substrat / CO₂ (% v/v) oranı, toplam akış hızı (CO₂ akış hızı+substrat akış hızı) ya da kalma süresi (residence time), enzim miktarı ve yatışkın koşula ulaşmak için işletme sürelerinin etkileri incelenmiştir. Deneyler oleyik asit / oleyil alkol mol oranı 1 alınarak yapılmış; substratlar birbiri ile karıştırıldıktan sonra 1. pompaya doldurulmuş, 2. Pompa ise dolgulu yatağa CO₂ gönderilmesi için kullanılmıştır. Aksi belirtilmedikçe dolgulu yatak enzim (1 g) ile tamamen doldurulmuştur. Ayrıca farklı koşullarda SC-CO₂ ortamında bekletilen enzimin aktivite ve kararlılığı incelenmiştir.

4.2.2.1. İşletim kararlılığının etkisi

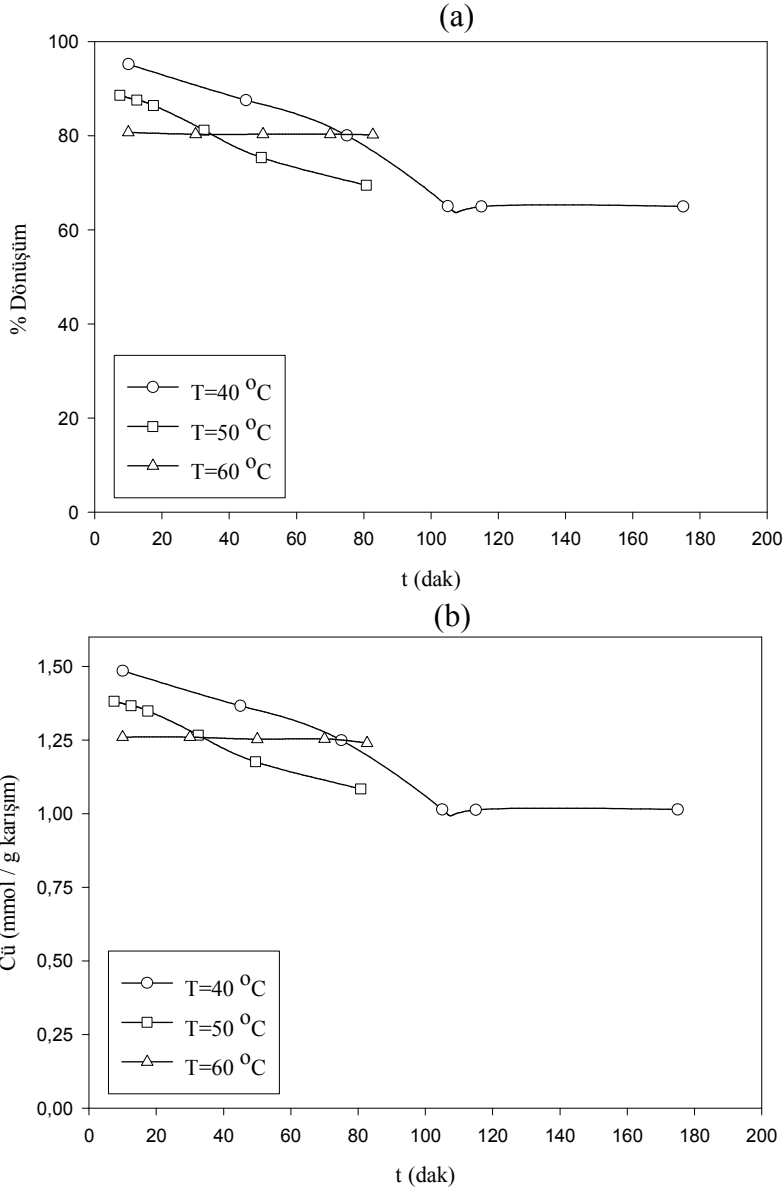
2.5 mL hacmindeki dolgulu kolon enzim (0.97 g) ile tamamen doldurulmuştur. %15 Substratlar- %85 CO₂ karışımı 0.5 mL/dak toplam akış hızında ($\tau=33$ dak) dolgulu yatağa gönderilmiş ve 80 atm, 50 °C koşullarında deney gerçekleştirilmiştir. Dönüşümün işletim kararlılığı ile değişimini veren şekil 4.45'den görüldüğü gibi başlangıçta %94 olan dönüşüm değeri, 100 dakika işletim süresi sonunda yavaşça azalarak 290 dakika sonunda %80 olmuştur.



Şekil 4.45. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretiminde işletim süresinin dönüşüme etkisi (%15 Substratlar- %85 CO₂ karışımı, P=80 atm, T=50 °C, Q_T= 0.5 mL/dak , $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak., Enzim miktarı= 1g)

4.2.2.2. Sıcaklığın etkisi

Sürekli işletilen dolgulu kolonda sıcaklığın etkisi iki farklı basınçta (80 atm ve 100 atm) incelenmiştir. %15 Substratlar- %85 CO₂ karışımı 1 mL/dak akış hızında ($\tau_{\text{substrat}}=17$ dak) dolgulu yatağa gönderilmiş, 80 atm'de 40, 50 ve 60 °C sıcaklıklarda deneyler gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta yüksek olan dönüşüm değeri 40 °C ve 50 °C'de yapılan deneylerde işletme süresi arttıkça sırasıyla %65 ve %70 değerlerine düşmüştür (şekil 4.46 a). 60 °C'de ise dönüşüm (%80) fazla değişmemiştir. Bu basınç için 60 °C daha uygun olmuştur. Ürün derişimine sıcaklığın etkisi şekil 4.46 b'de verilmiş; dönüşüm için elde edilen bulgulara benzer sonuçlar elde edilmiştir.

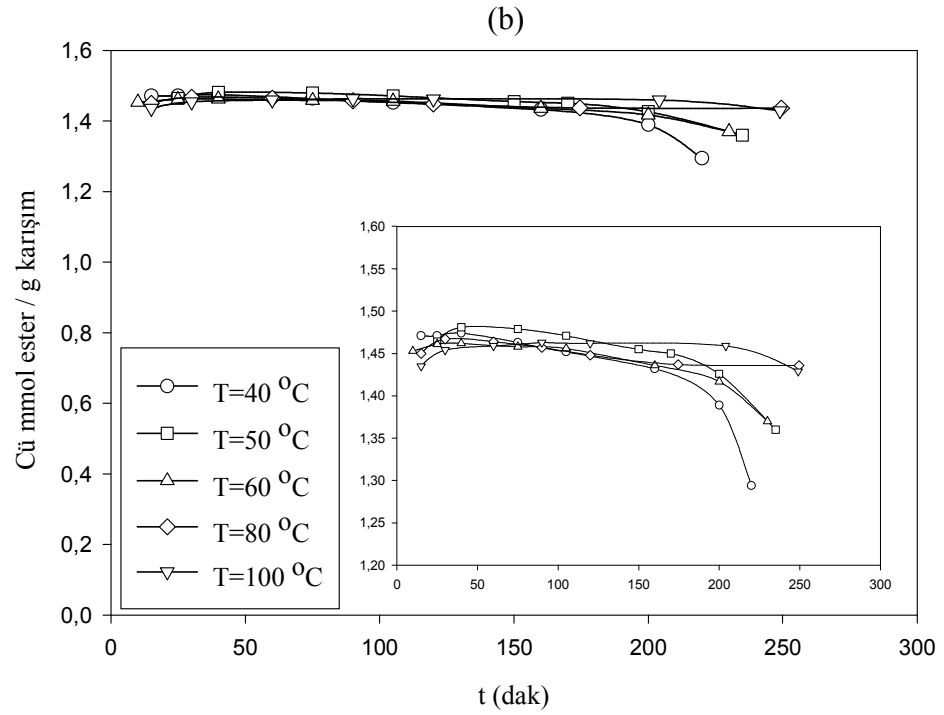
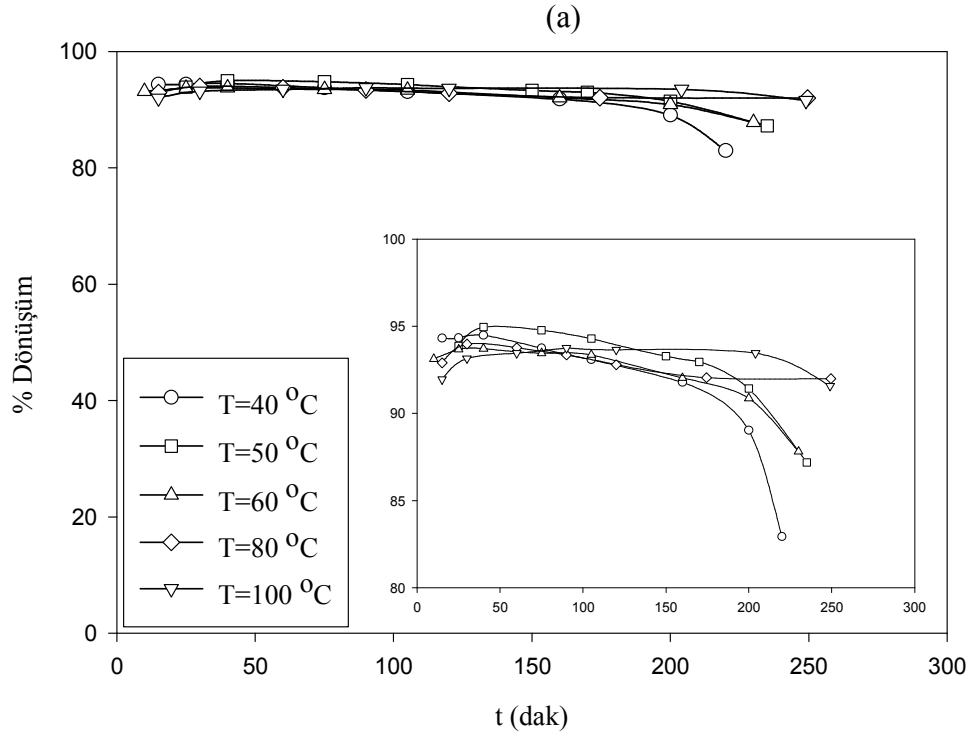


Şekil 4. 46. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretimine sıcaklığın etkisi a)Dönüşümün işletme süresi ile değişimi b)Ürün derişiminin işletme süresi ile değişimi (%15 Substratlar-%85 CO₂ karışımı, P=80 atm, Q_T= 1.0 mL/dak (τ_{substrat} =17 dak, Enzim miktarı= 1g)).

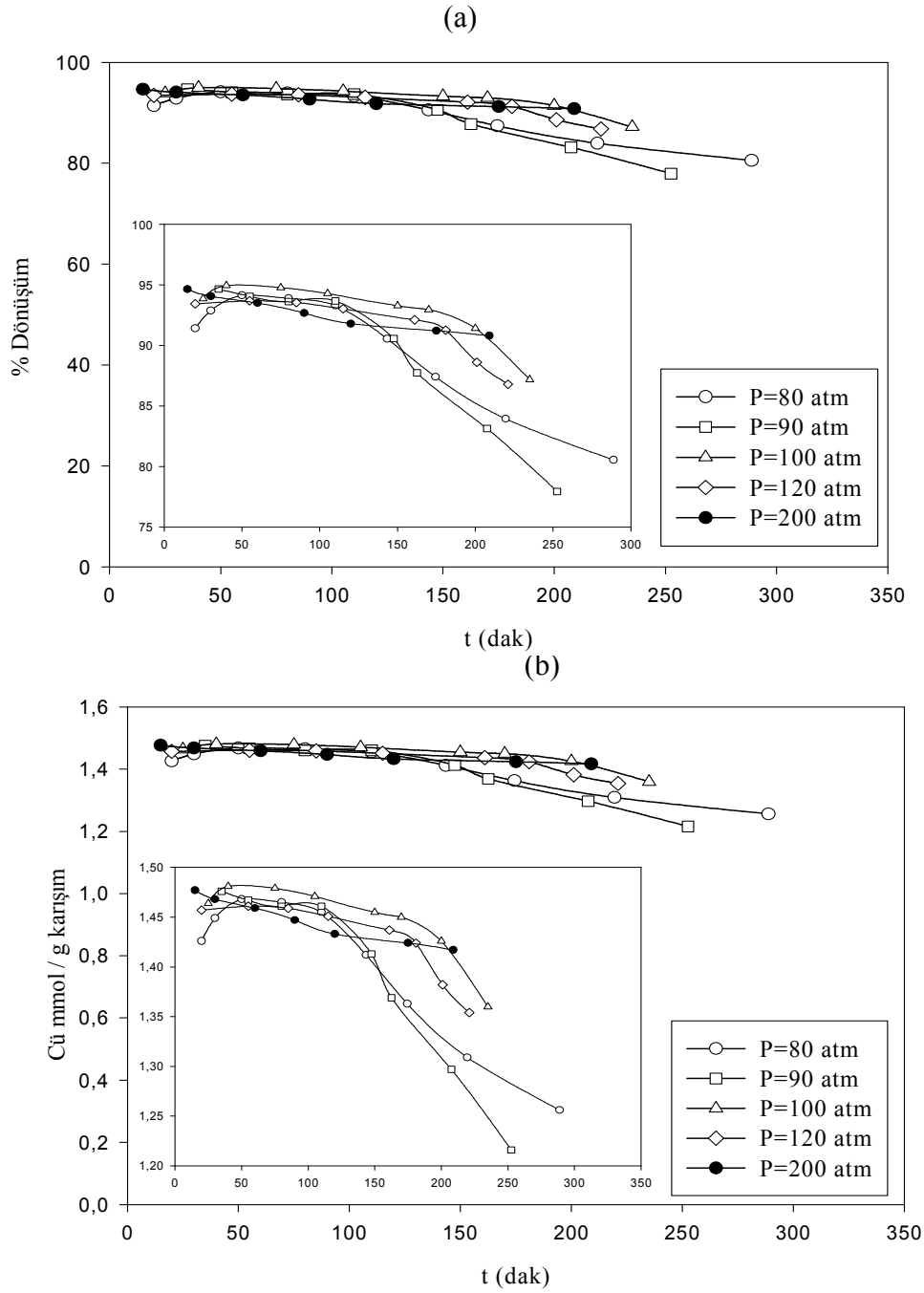
Şekil 4.45 ve şekil 4.46 karşılaştırıldığında 0.5 mL/dak ($\tau_{\text{substrat}}=33$ dak) akış hızı ile daha yüksek ve kararlı dönüşüm değerleri elde edildiği görülmektedir. Bu nedenle oleyl oleat üretimine sıcaklık etkisi, %15 Substratlar- %85 CO₂ karışımının 0.5 mL/dak akış hızında ($\tau_{\text{substrat}}=33$ dak) kullanılması ile, 100 atm basınçta, 40 °C, 50 °C ve 60 °C sıcaklıklarda da incelenmiştir. Dönüşümün işletme süresi ile değişimi şekil 4.47 a'da, ürün derişiminin değişimi ise şekil 4.47 b'de verilmiştir. Bu basınçta sıcaklığın etkisi açık bir şekilde görülememiştir. Bununla birlikte 50 °C'da daha yüksek dönüşüme (%95) ve ürün derişimine (1.48 mmol ester / g karışım) ulaşılmış; bütün sıcaklıklarda 100 dakika işletimden sonra hafif bir düşme gözlenmiştir. 40 °C'da dönüşümdeki düşme diğer sıcaklıklarla karşılaştırıldığında daha fazla olmuştur. Kullanılan enzimin süperkritik koşullarda 80 °C ve 100 °C sıcaklıklarda da aktif olduğu gözlenmiştir. İşletim bakımından 50 °C uygun sıcaklık olarak belirlenmiştir.

4.2.2.3. Basıncın etkisi

Oleyl oleatın süperkritik koşullarda sürekli olarak işletilen dolgulu kolonda enzimatik üretimine basıncın etkisi incelenmiştir. Bunun için %15 Substratlar - %85 CO₂ karışımı 0.5 mL/dak akış hızında ($\tau_{\text{substrat}}=33$ dak) gönderilerek, 50 °C sıcaklıkta, 80, 90, 100, 120, 200 atm koşullarında deneyler yapılmıştır. Her deneyde taze enzim kullanılmıştır. Dönüşümün ve ürün derişiminin işletme süresi ile değişimine basıncın etkisi sırasıyla şekil 4.48 a ve b'de verilmiştir. Basıncın artmasıyla dönüşüm ve ürün derişimi biraz artmış, 100 atm'de en yüksek dönüşüm (%95) ve derişime (1.48 mmol / g karışım) ulaştıktan sonra biraz azalmıştır. 80 atm ve 90 atm'de 100 dakika işletimden sonra dönüşüm ve ürün derişimindeki düşme diğer basınçlar ile karşılaştırıldığında daha fazla olmuştur. Bunun üç nedeni olabilir: 1) CO₂ akışı ile enzime bağlı olan suyun sıyrılarak enzim aktivitesinde düşme olması, 2) Oluşan suyun enzim etrafında birikmesi ile substratlar için hidrofobik bir bariyer olması, 3) Tepkime ile oluşan su nedeniyle denge sola işleyerek hidroliz tepkimesine dönüşmesi.

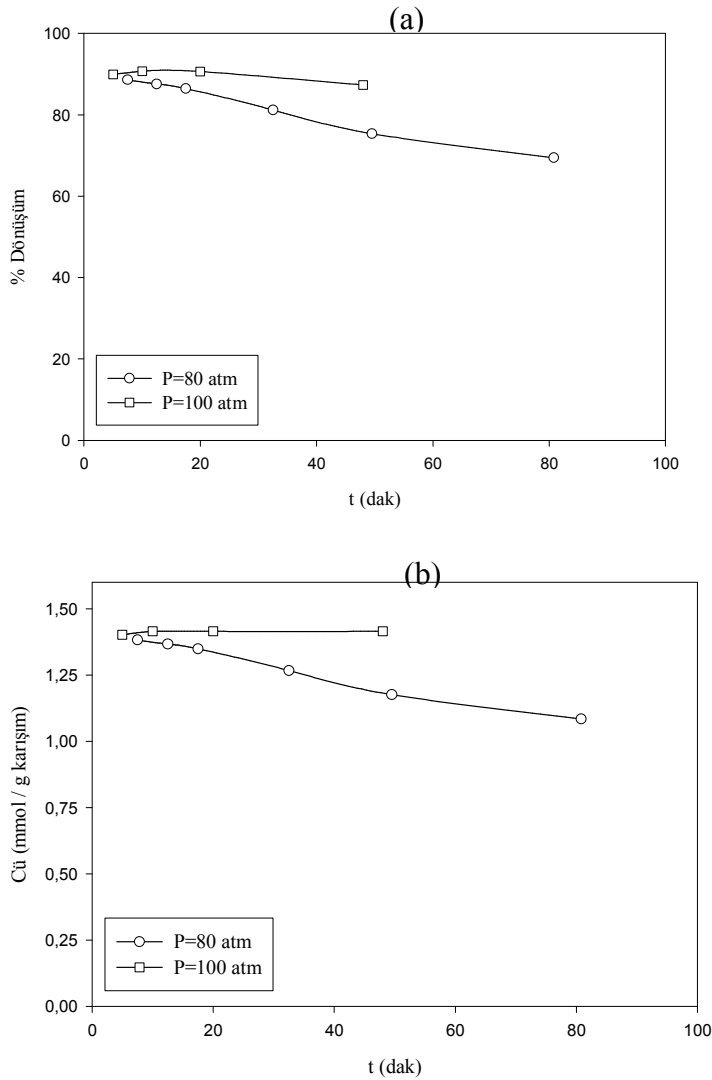


Şekil 4.47. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretimine sıcaklığın etkisi a) Dönüşümün işletme süresi ile değişimi b) Ürün derişiminin işletme süresi ile değişimi (%15 Substratlar-%85 CO₂ karışımı, P=100 atm, Q_T= 0.5 mL/dak ($\tau_{\text{substrat}}=33$ dak) Enzim miktarı= 1g



Şekil 4.48. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretimine basıncın etkisi a)Dönüşümün işletme süresi ile değişimi b)Ürün derişiminin işletme süresi ile değişimi, (%15 Substratlar-%85 CO₂ karışımı, T=50 °C, Q_T= 0.5 mL/dak τ_{substrat} =33 dak, Enzim miktarı= 1g).

Basıncın etkisi %15 Substratlar - %85 CO₂ karışımının 1.0 mL/dak akış hızında ($\tau_{\text{substrat}}=17$ dak) gönderilmesiyle, 50°C sıcaklıkta 80 ve 100 atm basınçlarda da incelenmiştir. Dönüşümün ve ürün derişimin işletme süresi ile değişimine basıncın etkisi sırasıyla şekil 4.49 a ve b'de verilmiştir. Görüldüğü gibi her iki basınç için dönüşüm ve ürün derişim değerleri işletim süresinin artması ile azalmaktadır. 50 dak sonunda, dönüşüm 80 atm'de % 88'den % 75'e, 100 atm'de ise % 90'dan % 87'ye düşmüştür.



Şekil 4.49. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretimine basıncın etkisi a)Dönüşümün işletme süresi ile değişimi b)Ürün derişiminin işletme süresi ile değişimi (%15 Substratlar-%85 CO₂ karışımı, T=50°C, Q_T= 1.0 mL/dak , $\tau_{\text{substrat}}=17$ dak, Enzim miktarı= 1g).

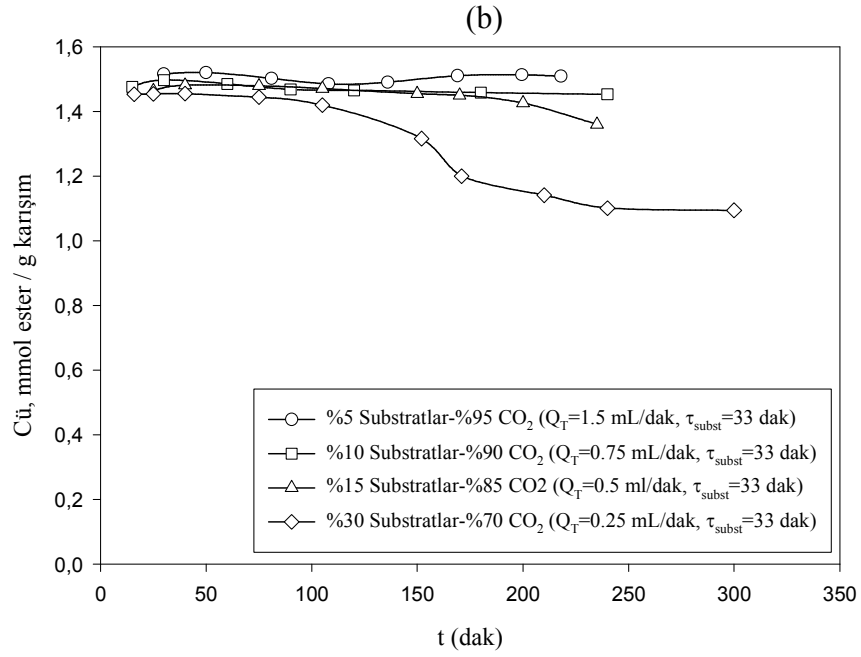
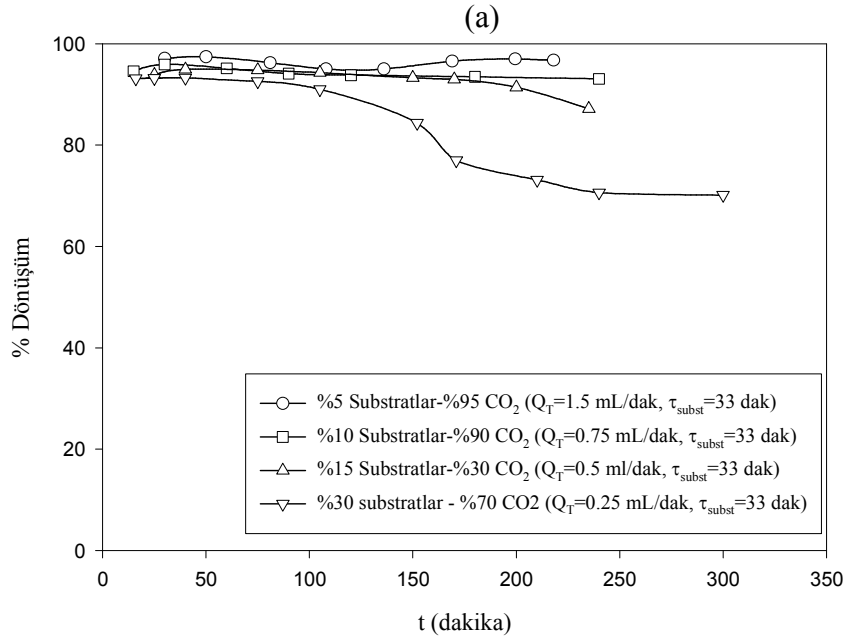
Sonuç olarak şekil 4.48 ve 4.49 karşılaştırıldığında ise düşük akış hızı (0.5 mL/dak ya da $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak) ve 100 atm basıncın işletim kararlılığı ve yüksek dönüşüm (derişim) açısından uygun olduğu görülmektedir.

4.2.2.4. Substratlar - CO₂ karışımı oranı (% , v/v) etkisi

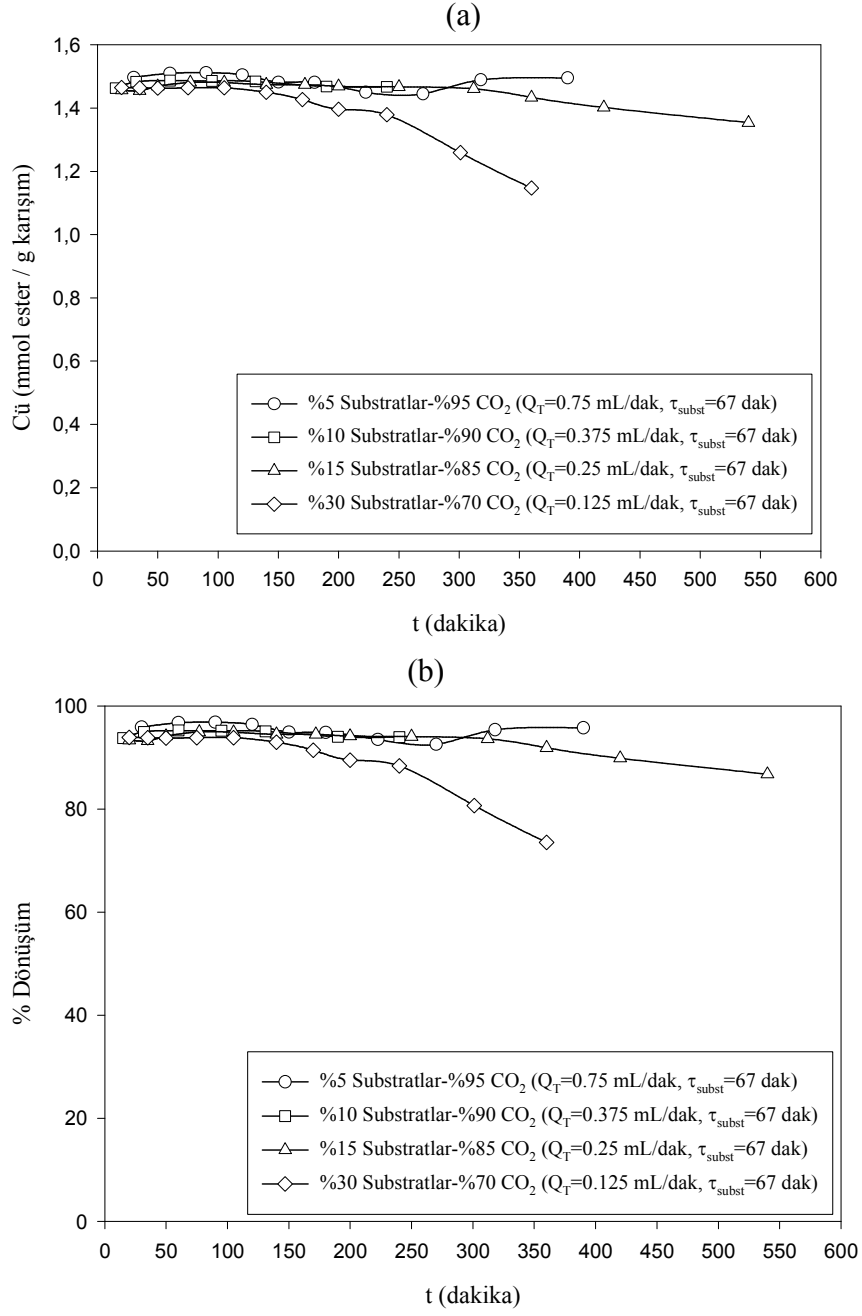
Sürekli olarak işletilen dolgulu kolonda oleyil oleatın enzimatik üretimine Substratlar - CO₂ karışımı oranının (% , v/v) etkisinin incelenmesi amacıyla iki farklı substrat kalma süresinde ($\tau_{\text{substrat}}=33$ dak ve $\tau_{\text{substrat}}=67$ dak) ve farklı oranlar kullanılarak deneyler yapılmıştır.

Farklı substratlar - CO₂ karışımı oranının dönüşüme ve ürün derişimine etkisi $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak kalma süresi için sırasıyla şekil 4.50 a ve b'de, $\tau_{\text{substrat}}=67$ dak kalma süresi için ise sırasıyla şekil 15 a ve b'de verilmiştir. Düşük kalma süresinde ($\tau_{\text{substrat}}=33$ dak), %5 Substratlar- %95 CO₂ karışımı ve %10 Substratlar- %90 CO₂ karışımı kullanımında, işletim süresinin artmasıyla dönüşüm (şekil 4.50a) ve ürün derişiminde (şekil 4.50b) değişme olmamış; daha yüksek hacim oranlarında ise dönüşüm ve ürün derişiminde düşme olmuştur. Örneğin, %30 Substratlar- %70 CO₂ karışımı kullanımında 100 dakika işletim süresi sonunda dönüşüm %92'den 300 dakika sonunda %70'e, ürün derişimi ise 1.44mmol/gkarışım değerinden 1.09 mmol/gkarışım değerine düşmüştür. En yüksek dönüşüm (%96) ve ürün derişimi (1.5 mmol/g karışım) değerleri %5 Substratlar- %95 CO₂ karışımı kullanılarak elde edilmiş; %10 Substratlar- %90 CO₂ karışımı kullanımında ise yakın değerler elde edilmiştir.

Benzer şekilde $\tau_{\text{substrat}}=67$ dak kalma süresinde farklı substrat- CO₂ hacim oranlarının etkisini gösteren şekil 4.51 a ve b incelendiğinde %10 Substratlar- %90 CO₂ hacim oranının üzerindeki değerlerde, özellikle %30 Substratlar- %70 CO₂karışımı kullanımında, başlangıçta %93.8 olan dönüşüm değeri 100 dakika işletim süresi



Şekil 4.50. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretimine substratlar - CO₂ karışımı oranının (% v/v) etkisi ($\tau_{\text{substrat}}=33$ dak), a) Dönüşümün işletme süresi ile değişimi, b) Ürün derişiminin işletme süresi ile değişimi ($T=50^{\circ}\text{C}$, $P=100$ atm, Enzim miktarı= 1g).



Şekil 4.51. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretimine substratlar - CO₂ karışımı oranının (% v/v) etkisi, ($\tau_{\text{substrat}}=67$ dak), a) Dönüşümün işletme süresi ile değişimi, b) Ürün derişiminin işletme süresi ile değişimi ($T=50^{\circ}\text{C}$, $P=100$ atm, Enzim miktarı= 1g).

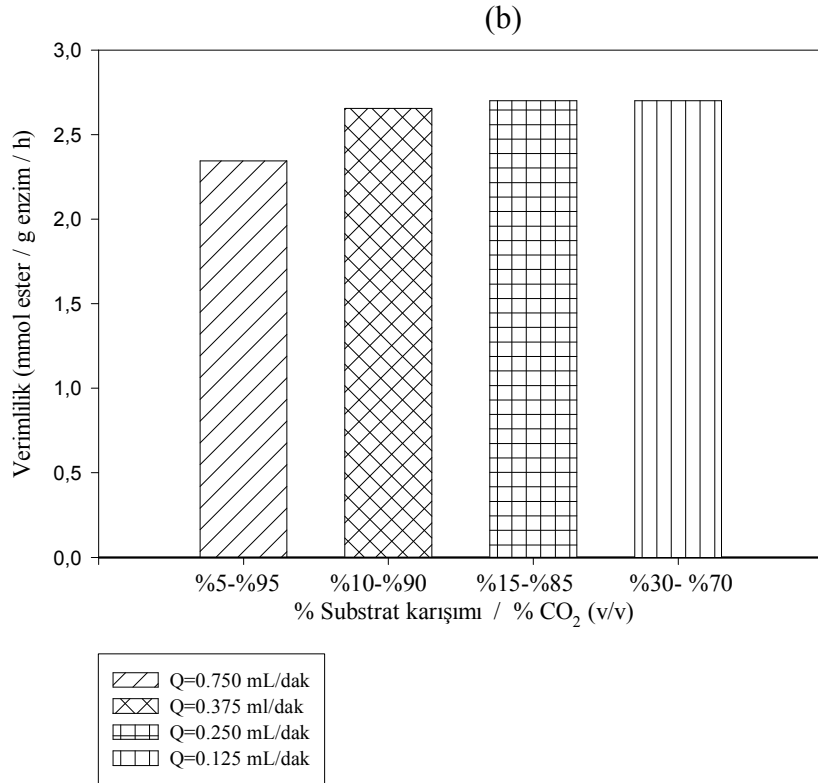
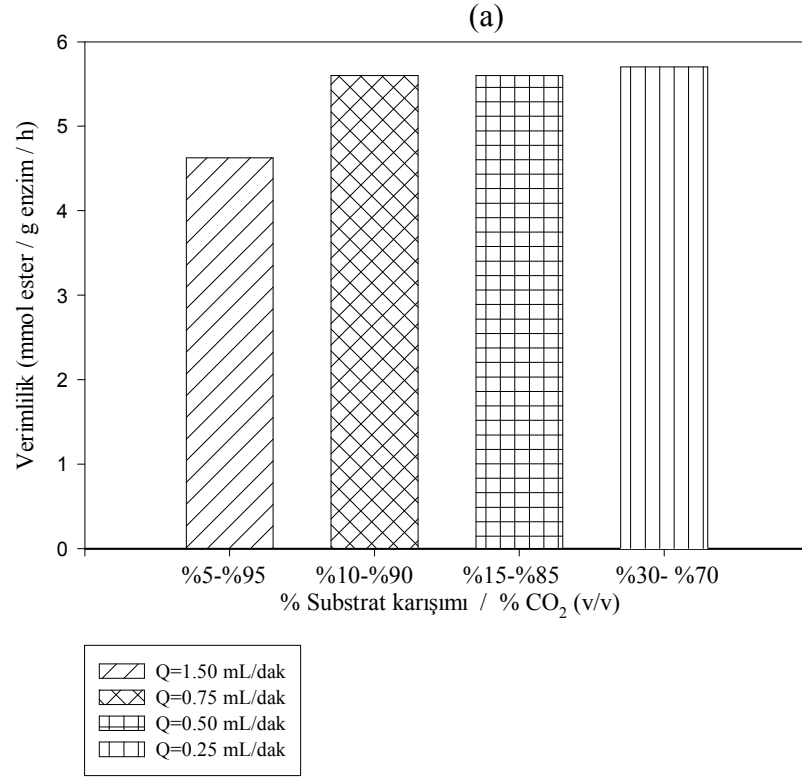
sonunda düşmekte ve 6 saatin sonunda %73,5 değerine ulaşmakta; ürün derişimi ise başlangıçta 1.46 mmol / g karışım değerinden 1.15 mmol / g karışım değerine düşmekte. En yüksek dönüşüm ve ürün derişimi değerleri $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak kalma süresi için elde edilen değerler ile aynı olmuştur.

Bu deneylerde elde edilen bulgular, verimlilik hesaplanarak da değerlendirilmiştir. Verimliliğe substratlar- CO₂ karışımı oranının (%v/v) etkisi $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak için şekil 4.52 a'da, $\tau_{\text{substrat}}=67$ dak için şekil 4.52 b'de verilmiştir. Görüldüğü gibi substrat miktarının artmasıyla verimlilik önce artmış; %10 ve daha üzerindeki substrat miktarlarında $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak için 5.6 mmol / g enzim /h olarak (şekil 4.52a), $\tau_{\text{substrat}}=67$ dak için ise 2.7 mmol / g enzim /h olarak (şekil 4.52b), belirlenmiştir. Kalma süresinin 2 kat artmasıyla verimlilik iki kat azalmıştır. Bu nedenle belirli bir substrat- CO₂ karışımı kullanılarak farklı kalma sürelerinin incelenmesi önemli olmaktadır.

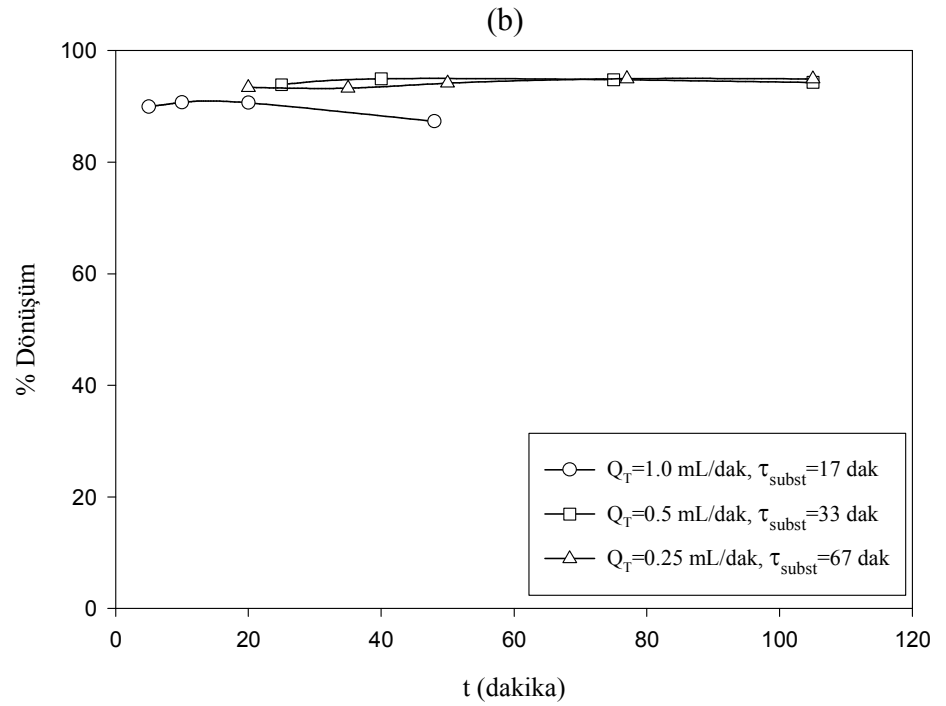
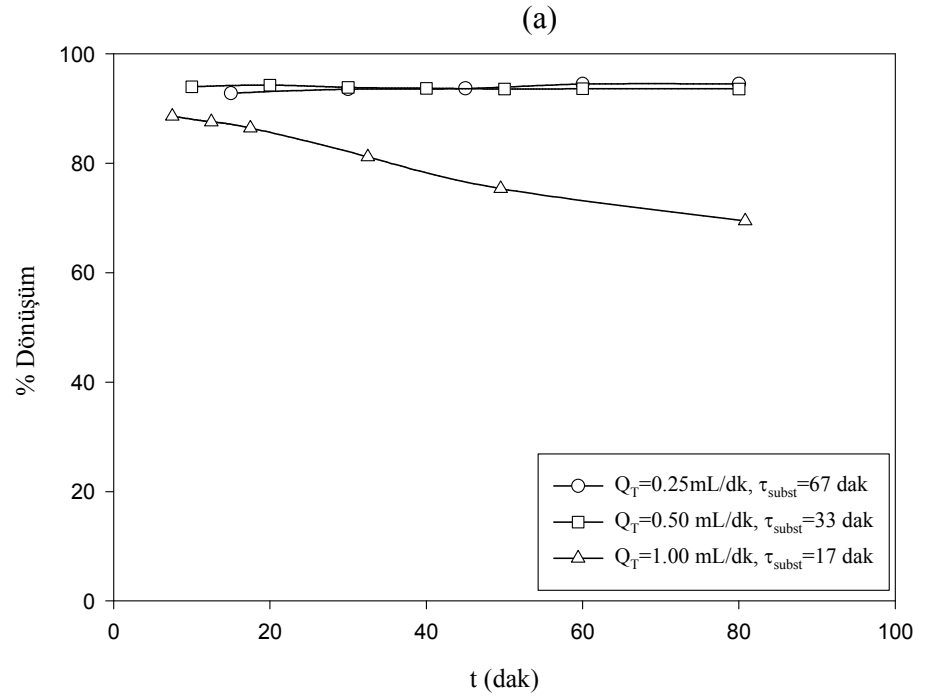
4.2.2.5. Kalma süresinin etkisi

Oleyil oleatın dolgulu kolonda süperkritik CO₂ ortamında üretimine kalma süresinin etkisinin incelenmesi amacıyla %15 Substratlar- %85 CO₂ karışımı kullanılarak 50 °C'da iki farklı basınçta (80 atm ve 100 atm); %10 Substratlar- %90 CO₂ karışımı kullanılarak 50 °C ve 100 atm koşullarında farklı kalma sürelerinde (farklı akış hızlarında) deneyler yapılmıştır.

%15 Substratlar- %85 CO₂ karışımı kullanımında dönüşümün işletim süresi ile derişimi 80 atm için şekil 4.53 a'da, 100 atm için ise şekil 4.53 b'de verilmiştir. Görüldüğü gibi her iki basınçta yapılan deneylerde, $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak (Q=0.5 mL/dak) ve $\tau_{\text{substrat}}=67$ dak (Q=0.25 mL/dak) kalma sürelerinde işletme süresinin artmasıyla dönüşümde (%95) derişme olmamış; $\tau_{\text{substrat}}=17$ dak (Q=1.0 mL/dak) kalma süresinde ise 80 atm'de daha



Şekil 4.52. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretiminde substratlar - CO₂ karışımı oranının (% v/v) verimliliğe etkisi a) ($\tau_{\text{substrat}}=33$ dak) b) ($\tau_{\text{substrat}}=67$ dak), ($T=50^{\circ}\text{C}$, $P=100$ atm, Enzim miktarı= 1g).

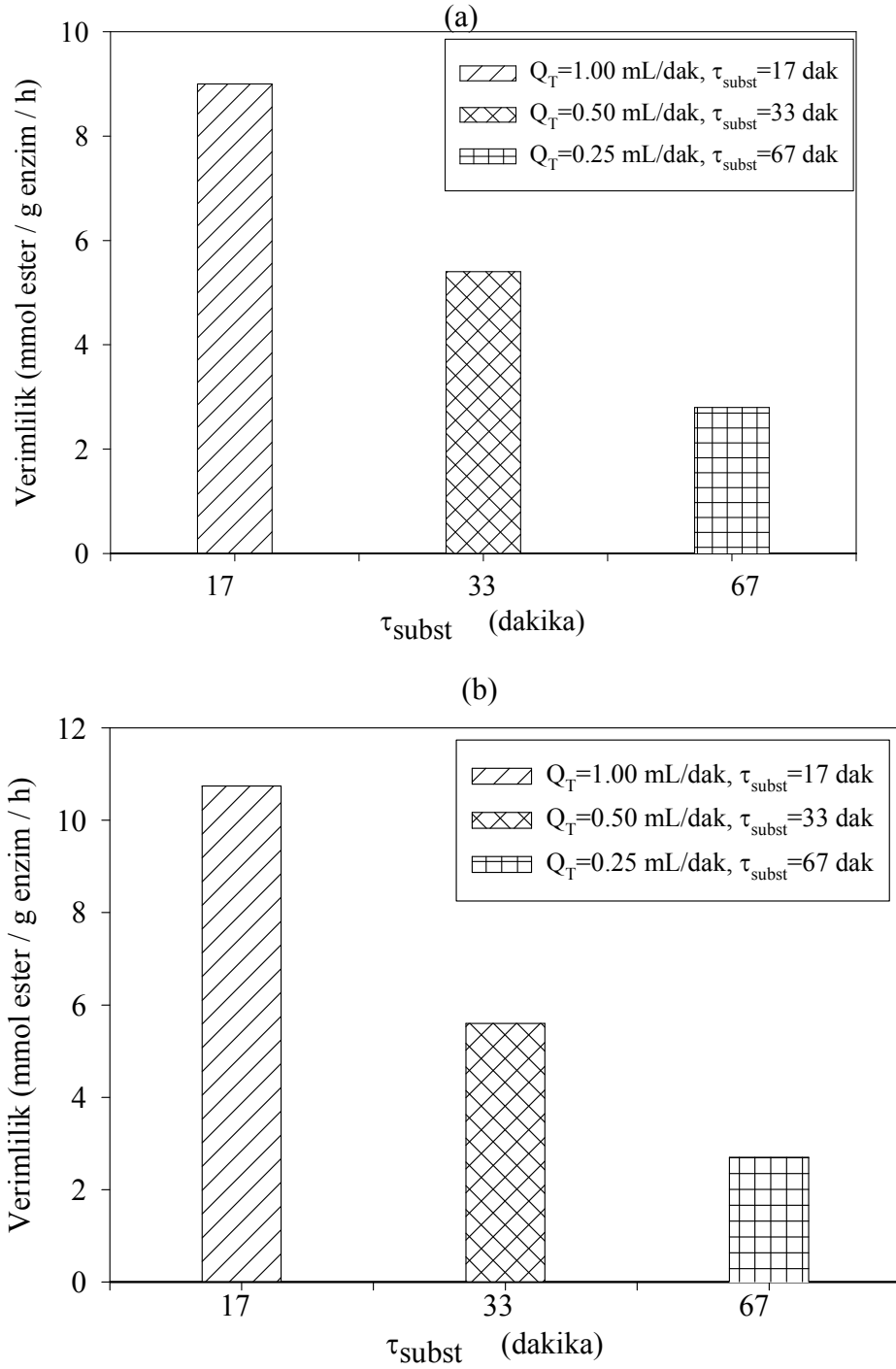


Şekil 4.53. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretimine kalma süresinin (akış hızının) etkisi a)80 atm, b)100 atm (%15 Substratlar- %85 CO₂ karışımı, T=50 °C, Enzim miktarı= 1g).

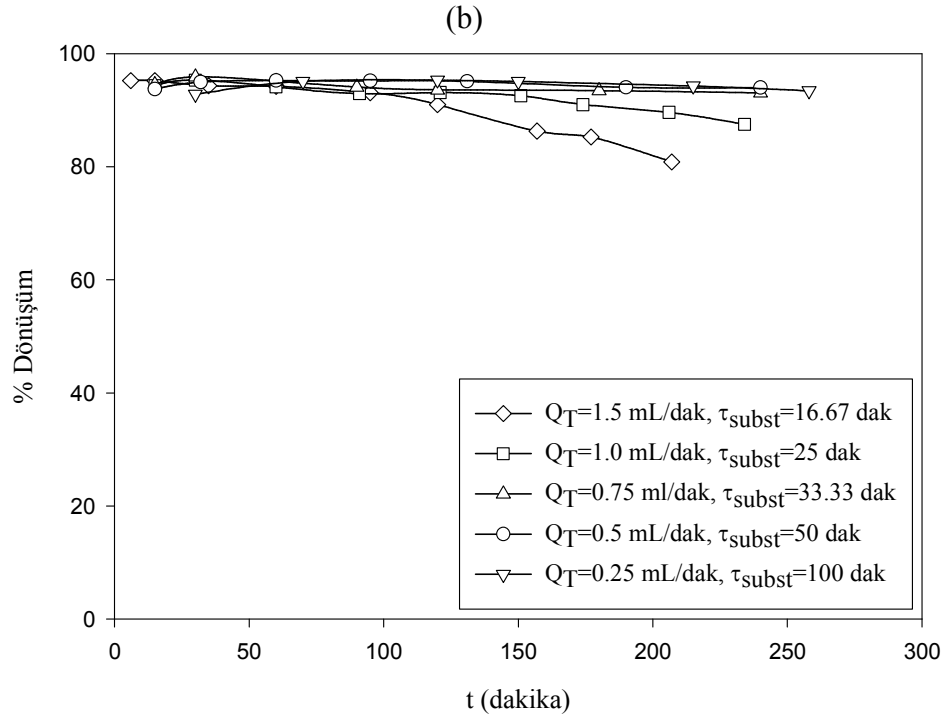
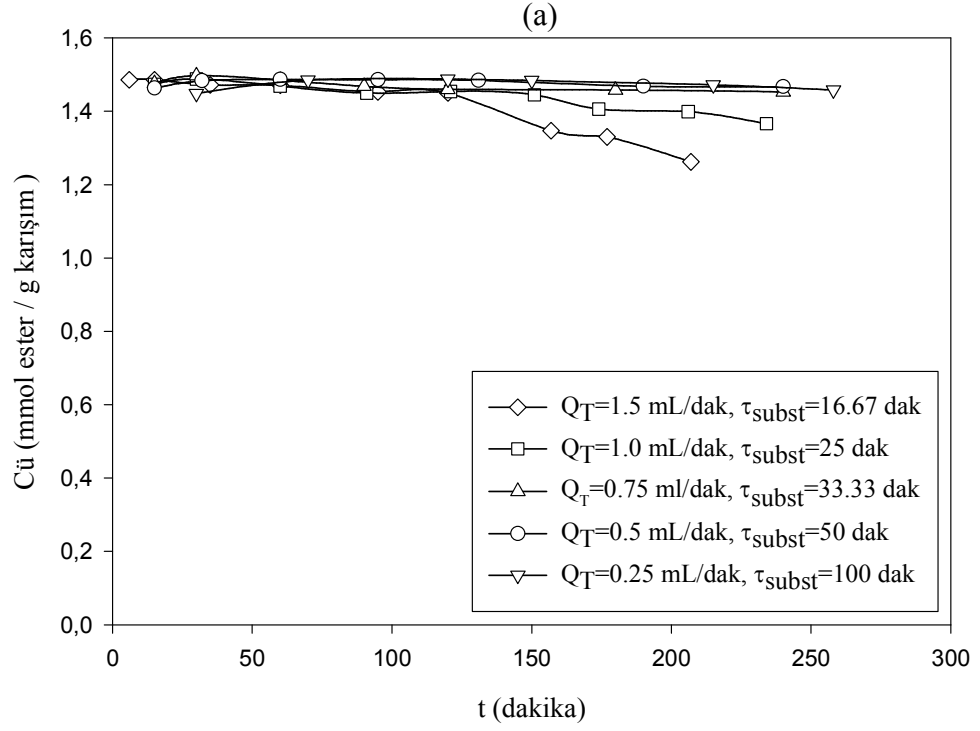
baskın olmak üzere dönüşüm her iki basınçta da düşmüştür. Dönüşüm 100 atm'de %90'dan %87'ye (şekil 4.53b), 80 atm koşullarında ise %88'den %70'e (şekil 4.53a) düşmüştür.

%15 Substratlar- %85 CO₂ karışımı kullanılarak verimliliğe kalma süresinin etkisi 80 atm için şekil 4.54a'da, 100 atm için ise şekil 4.54b'de verilmiştir. Şekil 4.54'den görüldüğü gibi işletme süresinin artmasıyla verimlilik değeri de şekil 4.52'ye benzer olarak her iki basınç için de düşmektedir. $\tau_{\text{substrat}}=17$ dak kalma süresi için en yüksek verimlilik (10 mmol / g enzim / h) değeri elde edilmesine karşın, işletim kararlılığı açısından inceleme yapıldığında (şekil 4.53), dönüşümün işletim süresinin artmasıyla düştüğü görülmektedir. Bu durumda, orta değerde verimliliğin (5.6 mmol / g enzim / h) elde edildiği $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak kalma süresi (Q=0.5 mL/dak) her iki basınçtaki işletim için de uygun olmuştur.

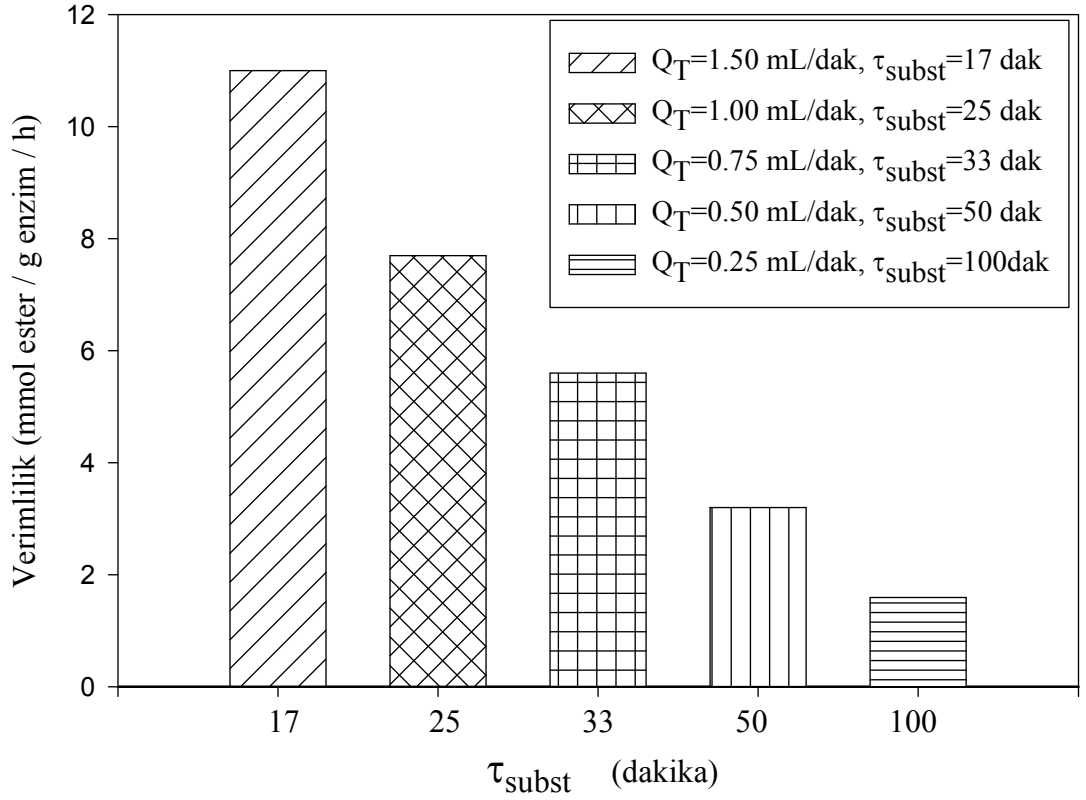
Kalma süresinin oleyil oleat üretimine etkisi %10 Substratlar- %90 CO₂ karışımı kullanılarak 100 atm ve 50 °C koşullarında da incelenmiştir. Dönüşümün ve ürün derişiminin işletim süresi ile değişimine kalma süresinin etkisi sırasıyla 4.55a ve b'de verilmiştir. Görüldüğü gibi $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak ve üzerindeki kalma sürelerinde en yüksek dönüşüm (%94-95) ve ürün derişimi (1.48 mmol / g karışım) değerleri elde edilmiş ve işletim süresi ile fazla değişmemiştir. Kalma süresinin azalmasıyla dönüşüm ve derişimdeki düşmeler de artmaktadır. Örneğin, $\tau_{\text{substrat}}=17$ dak (Q=1.5 mL/dak) için başlangıçta %95 olan dönüşüm değeri 3.5 saat sonunda %80'e, ürün derişim ise 1.48 mmol / g karışım değerinden 1.26 mmol / g karışım değerine düşmektedir. Verimliliğe kalma süresinin etkisini gösteren şekil 4.56 incelendiğinde şekil 4.54'de elde edilene benzer sonuçlar elde edilmiş; kalma süresinin artmasıyla verimlilik de azalmıştır. $\tau_{\text{substrat}}=17$ dak kalma süresi için 11 mmol / g enzim / h değerinde en yüksek verimlilik elde edilmiştir. Ancak şekil 4.55 incelendiğinde işletim kararlılığı açısından $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak ve üzerindeki kalma sürelerinin uygun olduğu belirlenmişti. Bu durumda orta değerde verimliliğin (5.6 mmol / g enzim / h) elde edildiği $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak kalma süresi (Q=0.75 mL/dak) uygun olmuştur.



Şekil 4.54. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretiminde kalma süresinin (akış hızının) verimliliğe etkisi a)80 atm, b)100 atm (%15 Substratlar- %85 CO₂ karışımı, T=50 °C, Enzim miktarı= 1g).



Şekil 4.55. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretimine kalma süresinin (akış hızının) etkisi a)Dönüşümün işletme süresi ile değişimi, b)Ürün derişiminin işletme süresi ile değişimi (%10 Substratlar- %90 CO₂ karışımı, P=100 atm T=50 °C, Enzim miktarı= 1g).



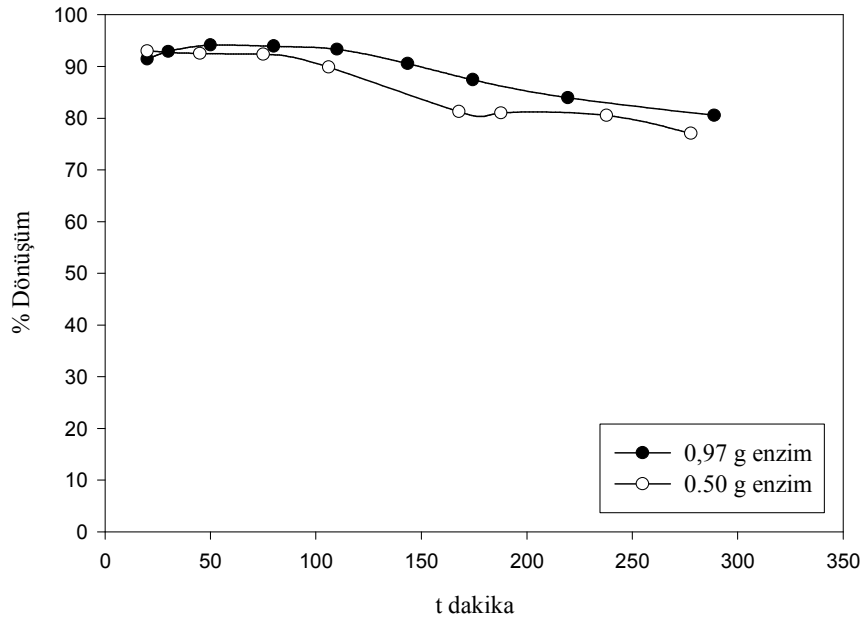
Şekil 4.56. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretiminde kalma süresinin (akış hızının) verimliliğe etkisi a)Dönüşümün işletme süresi ile değişimi, b)Ürün derişiminin işletme süresi ile değişimi (%10 Substratlar- %90 CO₂ karışımı, P=100 atm T=50 °C, Enzim miktarı= 1g).

4.2.2.6. Enzim miktarının etkisi

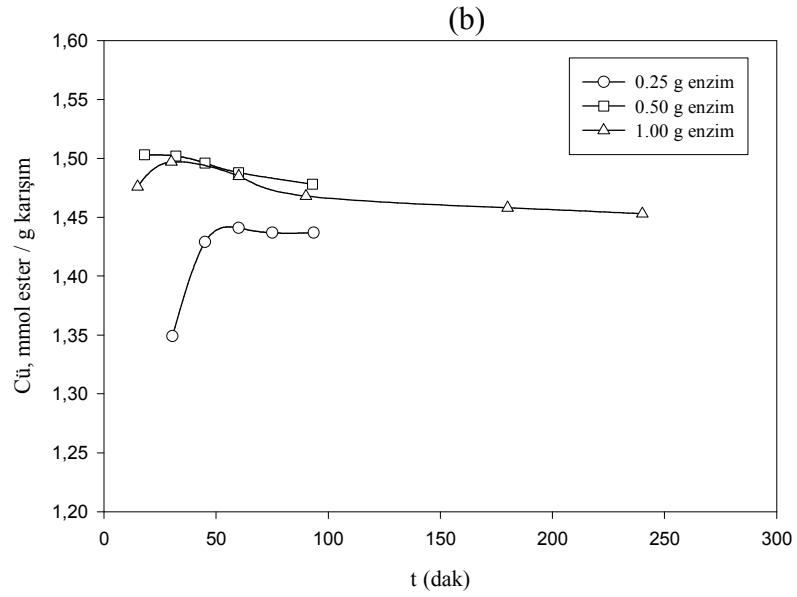
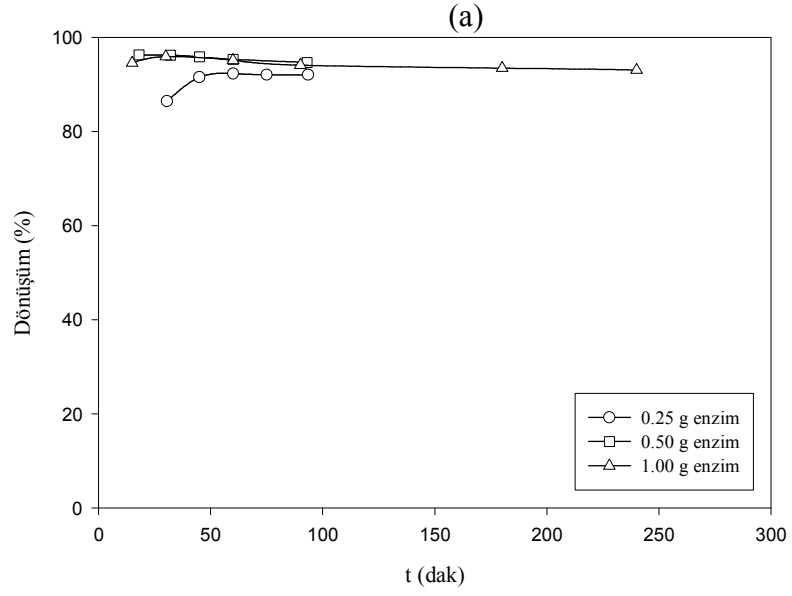
Süperkritik koşullarda işletilen dolgulu kolonda oleyil oleat üretimine enzim miktarının etkisinin incelenmesi amacıyla 50 °C'de, %15 Substratlar- %85 CO₂ karışımı kullanılarak 80 atm ve $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak ($Q=0.5$ mL/dak) kalma süresinde ve %10 Substratlar- %90 CO₂ karışımı kullanılarak 100 atm ve $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak ($Q=0.75$ mL/dak) kalma süresinde deneyler yapılmıştır.

%15 Substratlar- %85 CO₂ karışımı kullanımında dönüşümün işletim süresi ile değişimine enzim miktarının etkisini veren şekil 4.57 incelendiğinde enzim miktarının yarıya düşürülmesi ile dönüşümün fazla değişmediği görülmektedir; verimlilik ise 5.3 mmol / g enzim / h değerinden 10.3 mmol / g enzim / h değerine (2 kat) artmıştır.

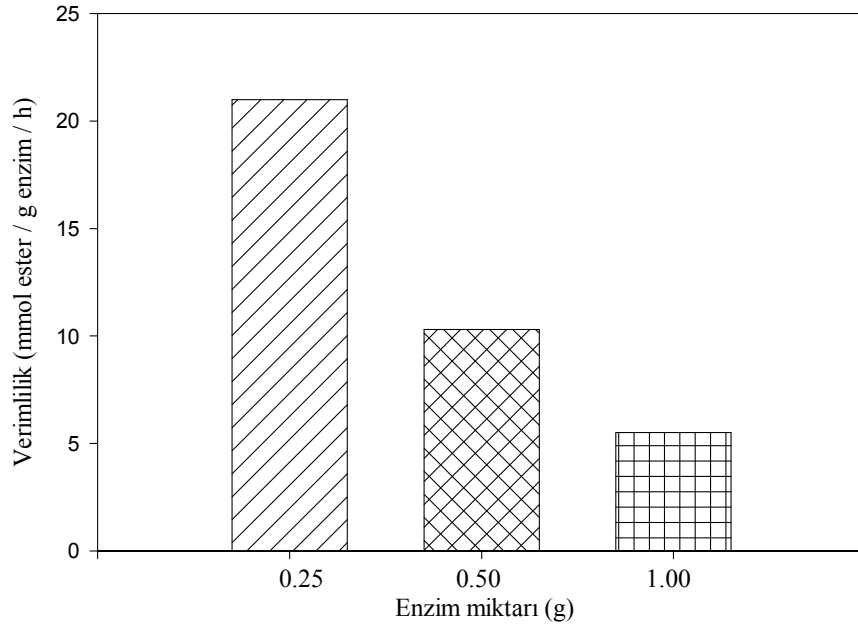
%10 Substratlar- %90 CO₂ karışımı kullanımında dönüşüm ve ürün derişimini işletme süresi ile değişimine enzim miktarının etkisi sırasıyla şekil 4.58a ve b'de verilmiştir. .0.5 g ve 1.0 g enzim kullanımında dönüşüm ve ürün derişimi değerleri aynı olmuş; 0.25 g enzim kullanımında ise bu değerler biraz düşmüştür. Verimliliğe enzim miktarının etkisini gösteren şekil 4.59 incelendiğinde enzim miktarının yarıya düşmesi ile verimlilik değerinin de iki kat arttığı; 0.25 g enzim kullanımında 21 mmol / g enzim / h değerinde en yüksek verimliliğe ulaşıldığı görülmektedir. Endüstriye uygulama açısından ucuz inert bir malzeme kullanılarak olası en düşük enzim miktarı ile çalışmak uygun olacaktır.



Şekil 4.57. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretiminde enzim miktarının etkisi (%15 Substratlar- %85 CO₂ karışımı, P=80 atm T=50 °C, $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak (Q=0.5 ml/dak)



Şekil 4.58. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretiminde enzim miktarının etkisi. a)Dönüşümün işletme süresi ile değişimi, b)Ürün derişiminin işletme süresi ile değişimi (%10 Substratlar- %90 CO₂ karışımı, P=100 atm T=50 °C, $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak (Q=0.75 mL/dak)



Şekil 4.59. Novozym 435 ile oleyil oleatın süperkritik koşullarda sürekli işletilen dolgulu kolonda üretiminde enzim miktarının verimliliğe etkisi (%10 Substratlar- %90 CO₂ karışımı, P=100 atm T=50 °C, $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak (Q=0.75 ml/dak)

Süperkritik CO₂ ile dolgulu kolonda sürekli işletim sonucunda elde edilen bulgular çizelge 4.10'da literatür ile karşılaştırılmıştır.

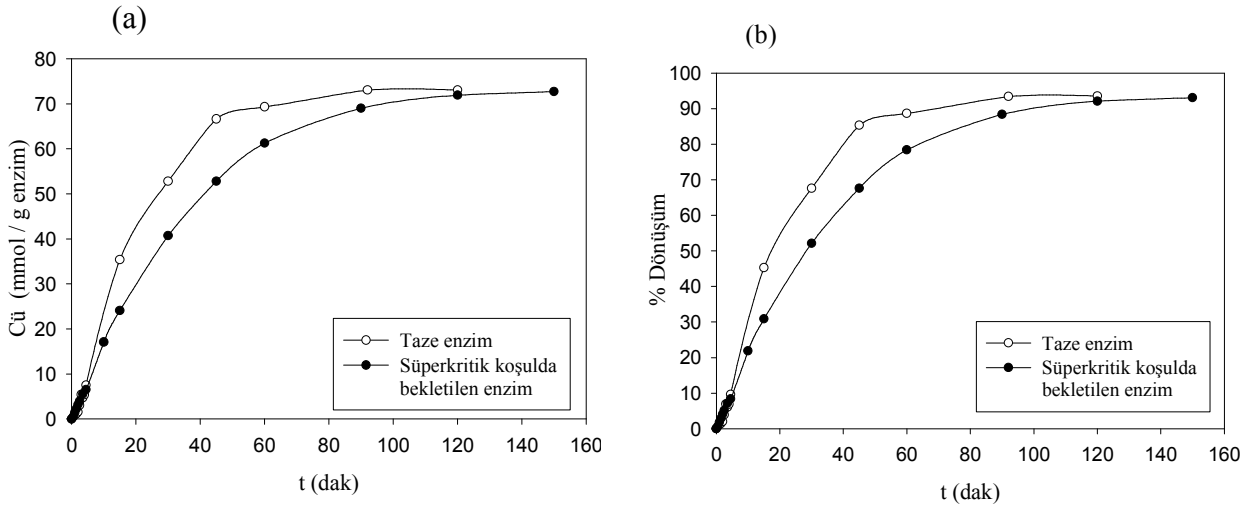
Çizelge 4.10. Süperkritik CO₂ kullanılarak sürekli işletilen dolgulu kolonda oleyil oleat üretiminin literatür ile karşılaştırması

Kaynak	Reaktör	Enzim	Substratlar ve CO ₂ akış hızı	Koşullar	Bulgular
Knez et al 1995, 1998,	7.95 mL	Lipozyme IM (0.5 g)	Eşmolar substrat karışımı	P=80 atm T=60 °C	%55 Dönüşüm
Habulin et al 1996,			Q _{subst} =0.14-0.35 mL/dak	P=80 atm T=50 °C	%45 Dönüşüm
Knez and Habulin 2002			Q _{CO2} =0.5-1L/dak	P=80 atm T=40 °C	%84 Dönüşüm
Bu çalışma	2.5 mL	Novozym 435	Eşmolar substrat karışımı (%10 Substratlar- %90 CO ₂ karışımı) Q _{subst} < 0.075 mL/dak τ _{subst} > 33 dak (Q _T <0.75 mL/dak)	P=100 atm T=50 °C	%94

(Q_T: Eşmolar substrat karışımı + CO₂ akış hızı)

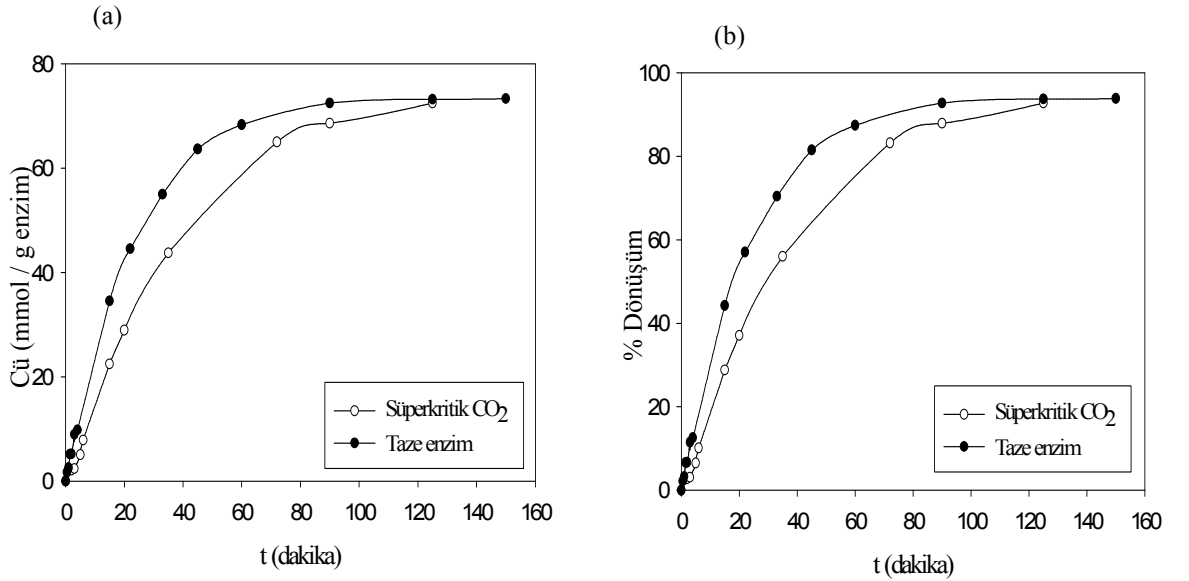
2.2.7. Süperkritik koşulda enzim kararlılığı

Novozyme 435 aktivite ve kararlılığına ani basınçlandırma / basınç düşürme işleminin etkisinin incelenmesi amacıyla, 300 bar 60 °C koşullarında enzim 30 dakika bekletildikten sonra basınç ani olarak atmosferik koşula düşürülmüş ve tekrar yüksek basınca çıkarılmıştır. Bu işlem 6 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra bu koşullarda bekletilen enzim ile ve taze enzim ile atmosferik koşullarda (Asit/alkol = 1/1, T = 50 °C, N=200 rpm, E/S = % 2) esterleşme tepkimesi gerçekleştirilerek iki enzimin sentez aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen ürün derişimi ve dönüşüm değerlerinin tepkime süresi ile değişimi sırasıyla şekil 4.60 a ve b'de verilmiştir. Başlangıç tepkime hızı süperkritik koşullarda bekletilen enzim ile 1.7 mmol ester/g enzim/dak, taze enzim ile 2.3 mmol ester/g enzim/dak olarak bulunmuştur. Taze enzim ile 1.5 saat sonunda ulaşılan denge dönüşümü % 93.7, ürün derişimi ise 73 mmol ester / g enzim olarak belirlenmiştir.



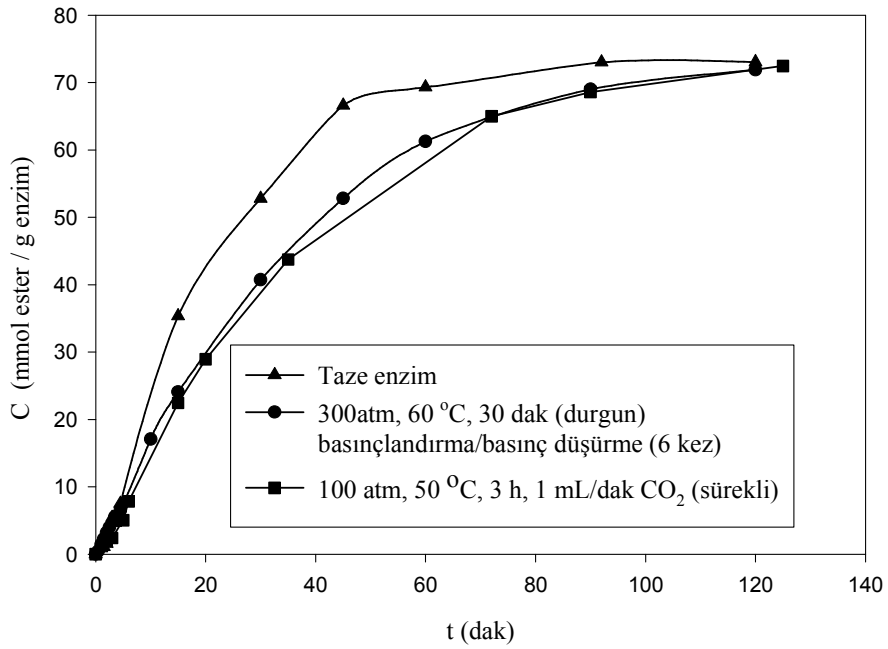
Şekil 4.60. Süperkritik koşullarda (300 bar, 60 °C'de 30 dakika bekletme, ani basınç düşürme ve tekrar basınç artırma, (6 kez) bekletilen enzim ve taze enzim atmosferik koşulda oleyil oleat sentez aktivitesi. a) Ürün derişimi, b) Dönüşüm (Novozym 435, Asit/Alkol=1/1, E/S=%2, T=50 °C, N=200rpm, V=6 mL).

Substatlar – CO₂ karışımının Q=1 mL/dak ($\tau=17$ dak) hızda akması ile yapılan deneylerde tepkime süresi ile dönüşümde düşme olduğu gözlenmiştir. Bu düşüşün nedeni CO₂ akımının enzimin aktivite gösterebilmesi için gerekli olan temel suyu sıyrabilmesi olabilir. Bu nedenle sadece SC-CO₂ akımı 1 mL/dak akış hızında enzim üzerinden 3 saat boyunca geçirildikten sonra atmosferik koşulda Novozym 435'in esterleşme aktivitesi incelenmiş ve taze enzim ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen ürün derişimi ve dönüşüm değerlerinin tepkime süresi ile değişimi sırasıyla şekil 4.61 a ve b'de verilmiştir. Başlangıç tepkime hızı süperkritik koşullarda bekletilen enzim ile 1.3 mmol ester/g enzim/dak, taze enzim ile 2.55 mmol ester/g enzim/dak olarak bulunmuştur. Taze enzim ile 1.5 saat sonunda ulaşılan denge dönüşümü % 93.7, ürün derişimi ise 73 mmol ester / g enzim olarak belirlenmiştir.



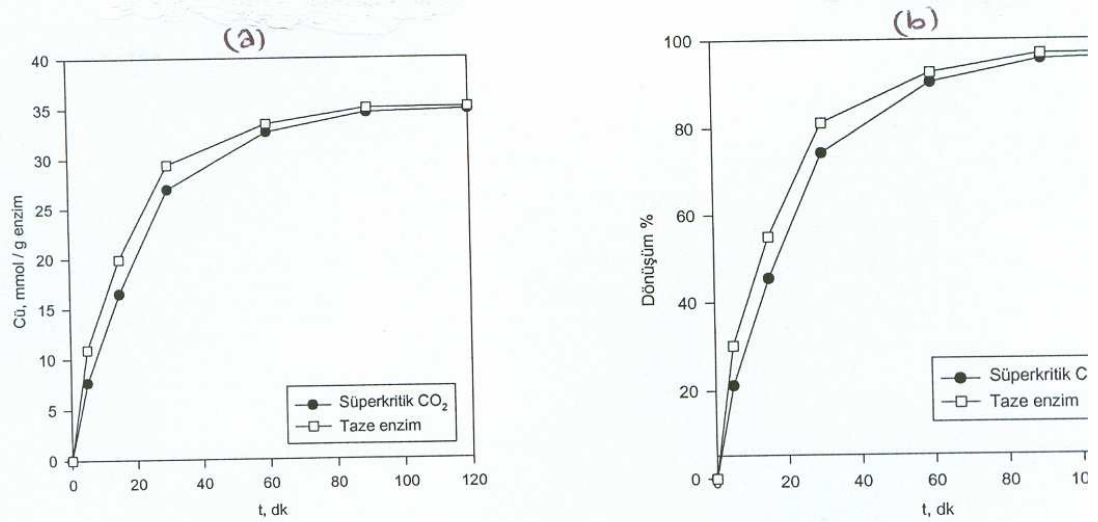
Şekil 4.61. Süperkritik koşullarda (enzim üzerinden 1 mL/dak akış hızında CO₂'in 100 atm, 50 °C koşullarında 3 saat boyunca geçirilmesi ile) bekletilen enzim ve taze enzim ile atmosferik koşulda oleyil oleat sentez aktivitesi. a)Ürün derişimi, b) Dönüşüm (Novozym 435, Asit/Alkol=1/1, E/S=%2, T=50 °C, N=250 rpm, V=6 mL).

Şekil 4.60 a ve 4.61 a birleştirilirse farklı süperkritik koşullarda bekletilen enzim ve taze enzim için atmosferik koşullardaki esterleşme aktivitesi şekil 4.62’de verilmiştir. Görüldüğü gibi süperkritik koşullarda bekletilen enzim için tepkime başlangıç hızı taze enzim ile karşılaştırıldığında yarıya düşmüştür. Dengede 73 mmol /g enzim olan ürün derişimine taze enzim ile 1.5 saat sonunda ulaşılırken süperkritik koşullarda bekletilen enzim ile iki saat sonunda ulaşılmıştır.



Şekil 4.62. Süperkritik CO₂ ortamında farklı koşullarda (I. 300 bar, 60 °C’da 30 dak bekletme, ani basınç düşürme ve yükseltme (6 kez) II. Süperkritik CO₂ akımının Q=1 mL/dak akış hızında enzim ile dolu olan kolon üzerinden 3 saat boyunca geçirilmesi) bekletilen enzim ve taze enzim ile atmosferik koşullarda oleyil oleat sentez aktivitesi. (Novozym 435, Asit/Alkol=1/1, E/S=%2, T=50 °C, N=200 rpm, V=6 mL).

Süperkritik CO₂ ortamının Lipozyme RM IM aktivite ve kararlılığına etkisinin incelenmesi amacıyla, enzim 50 °C sıcaklık ve 200 atm koşullarında 8 saat bekletilerek, atmosferik koşullarda esterleşme tepkimesi gerçekleştirilmiş ve taze enzim ile karşılaştırılmıştır. Oleyil oleat derişiminin ve dönüşümün tepkime süresi ile değişimini veren şekil 4.63 (a ve b) incelendiğinde, SC-CO₂ ortamında bekletilen enzimin aktivite ve kararlılığında değişme olmamıştır. Atmosferik koşullarda ağzı açık erlenlerde gerçekleştirilen tepkime sonunda %97 dönüşüm ile 35 mmol/g enzim değerinde maksimum oleyil oleat derişimi elde edilmiştir.



Şekil 4.63. SC-CO₂'de bekletilen enzim ve taze enzim ile atmosferik koşullarda enzimatik oleyil oleat üretimi a)Ester derişiminin reaksiyon süresi ile değişimi, b)Dönüşümün reaksiyon süresi ile değişimi,

V=10 mL, Asit/Alkol=1/1, T=50 °C, N=250 rpm, E/S=%5.

SC- CO₂'de Lipozyme RM IM bekletme koşulları : T=50 °C, P=200 atm, t=8 st

5. SONUÇLAR

5.1. Atmosferik Koşullarda Oleyil Oleat Üretimi

1. Enzim miktarının artırılmasıyla her iki enzim için de başlangıç hızı önce artmış sonra sabit kalmıştır. Her iki enzim için de E/S'nin %5 olması yeterli olmuştur.
2. Her iki enzim ile tepkime süresinin etkisinin incelendiği deneylerde % 5 enzim kullanılarak yaklaşık olarak 1.5 saat sonunda dengeye ulaşılmaktadır.
3. Her iki enzim için asit/alkol mol oranının artırılmasıyla başlangıç tepkime hızı ve oleyil oleat derişimi önce artmış, sonra azalmıştır. Her iki enzim için de Mol asit/Mol alkol = 1.33/1 uygun olmuş; oranın artmasıyla ester derişimi yaklaşık olarak 31.5 mmol/g enzim (1.58 mmol / g karışım) değerinde maksimum verdikten sonra azalmış; düşük asit derişimlerinde %87'nin üzerinde olan dönüşüm değerleri ise asit/alkol mol oranının 1/1 değerinin üzerinde düşme göstermiştir. Başlangıç tepkime hızı Novozym 435 için 270 mmol / g enzim / h olarak belirlenmiştir (E/S=%5, T=50 °C, N=200 rpm, V=10 mL).
4. Lipozyme RM IM kullanılarak çözücülü (Hekzan) ortamda substrat derişimlerinin artmasıyla tepkime hızı maksimuma ulaştıktan sonra düşmüştür. Çözücülü ortam kullanımında (Casit=Calkol=1 M) 31.16 mmol /g enzim (1.107 mmol / g tepkime ortamı) maksimum ürün derişimine % 86 dönüşüm ile ulaşılırken çözücüsüz ortamda asit/alkol mol oranının 1.33/1 değerinde (Casit=1.579M, Calkol=1.185M) elde edilen maksimum ürün derişimi ve dönüşüm değerleri sırasıyla 32.59 mmol /g enzim (1.63 mmol / g substrat karışımı) ve % 90 olarak elde edilmiştir. Çözücülü sistemde ve çözücüsüz sistemde 1.5 saat sonunda dengeye ulaşılmaktadır; çözücülü sistemde 0.1M'ın altındaki derişimlerde (seyreltik durumda) çözücüsüz sistemdeki ürün derişimine yakın değerler elde edilmiştir. Çözücülü sistemde enzimatik tepkime için düşük asit derişimlerinde (seyreltik) çalışılması ve üretim sonunda çözücü uzaklaştırma işlemleri nedeniyle üretimin çözücüsüz ortamda yapılması uygundur.
5. Her iki enzim kullanımında sıcaklığın artırılmasıyla başlangıç tepkime hızı artmış dengeye ulaşma süresi biraz kısalmıştır. 60 °C'da en yüksek başlangıç hızları elde edilmiştir.

6. Her iki enzim ile oleyil oleat üretimine karıştırma hızının etkisi incelenmiş; Lipozyme RM IM için 150 rpm, Novozym 435 için ise 200 rpm karıştırma hızının yeterli olduğu bulunmuştur.
7. Lipozyme RM IM kullanılarak yapılan deneylerde tepkime ile oluşan suyun ortamdaki uzaklaştırılması ile dönüşüm **%87**'den (1.58 mmol/g enzim ya da **32 mmol/g enzim**) **%97**'ye (1.74 mmol/g enzim ya da **35 mmol/g enzim**) yükselmiştir.
8. Oleyil oleat üretimine enzim türünün etkisinin incelenmesi amacıyla Lipozyme RM IM ve Novozym 435 kullanılarak ağzı kapalı erlenlerde yapılan deneyler (Asit/alkol=1.33/1, E/S=%5, T=50 °C) sonunda Novozyme 435 kullanımında elde edilen başlangıç tepkime hızları 1.17 kat daha yüksek olmuş, 2 saat sonunda her iki enzim ile denge değerleri olan maksimum 31.5 mmol / g enzim oleyil oleat derişimi ve % 87 dönüşüm elde edilmiştir. Çalışmanın ileri aşamalarında Novozym 435 kullanılmasına karar verilmiştir.
9. Novozym 435 kullanılarak eşmolar substrat karışımı (8 mmol oleyik asit, 8 mmol oleyil alkol) ile E/S=%2, T=50 °C, N=250 rpm koşullarında 1.5 saat sonunda elde edilen ürün derişimi maksimum 1.45 mmol ester /g karışım (72.5 mmol ester / g enzim), dönüşüm **%92.7** olmuş, başlangıç tepkime hızı ise 136 mmol / g enzim / h (2.55 mmol/g enzim/h) olarak belirlenmiştir.
10. Atmosferik koşullardaki oleyil oleat üretimine, asit/alkol mol oranı (0.67-2.00), enzim miktarı (%2-10 w/w substratlar), tepkime sıcaklığı (40-60 °C), tepkime süresinin (30-90 dak) etkisi Cevap Yüzey Yöntemi ile incelenmiştir. Optimum koşullar, asit / alkol mol oranı 1.37, enzim miktarı % 7 w/w substratlar, tepkime sıcaklığı 51 °C ve tepkime süresi 75 dak olarak belirlenmiştir. Model eşitliğinden tahmin edilen oleyil oleat derişimi optimum koşullarda yapılan deney ile elde edilen değer ile oldukça uyumludur.
11. Tepkime ortamını tamponlamak üzere eklenen hidrate tuz çiftleri, yüksek sulu/düşük sulu form, yüksek sulu /susuz form ve sadece yüksek sulu form şeklinde kullanılmıştır. a_w 'nin artmasıyla başlangıç tepkime hızı önce artmış sonra azalmıştır. 10 ve 12 molekül su içeren tuzların kullanılması, ortamda çift faz (su+organik) oluşturmuştur. Tepkime süresinin artmasıyla tepkime ortamında oluşan su derişimi önce artmış sonra enzime adsorpsiyon nedeniyle azalmıştır.

Hidrate tuz çifti kullanılması ile elde edilen dönüşüm değerleri (%93-94) ile aw kontrolsüz durumda elde edilen dönüşüm (%92.7) hemen hemen aynı olmuştur. En etkili ve ekonomik tuz çiftinin Na_2HPO_4 (2/0) olduğu belirlenmiştir. Hidrate tuz çifti miktarı arttıkça başlangıç tepkime hızları da artmış; tuzlu ortamda elde edilen başlangıç tepkime hızları, ortamda tuzun olmaması durumunda elde edilen hızlardan daha büyük olmuştur. Na_2HPO_4 (12/7) için 0.8 g yeterli olmuştur. $t=1.5$ saat sonunda %93.76 dönüşüm elde edilmiş, Karl Fischer titrasyon ile belirlenen su miktarı ise $C_{su}=4.57$ mg/g reaksiyon karışımı olmuştur. Bu tuz çifti ile her oranda çift faz (su+organik) oluşmuştur. Na_2HPO_4 (2/0) için ise 0.4 g kullanılması yeterli olmuştur. Bu tuz ile ortam iyi tamponlanmıştır. $t=1.5$ saat sonunda %95 dönüşüm elde edilmiştir. ($C_{su}=1.7$ mg/g reaksiyon karışımı). Na_2HPO_4 (2/0) ile çift faz oluşmamıştır.

5.2. Süperkritik Koşullarda Dolgulu Kolonda Oleyil Oleat Üretimi

Oleyil oleatın dolgulu kolondaki üretimi kesikli ve sürekli olmak üzere iki kısımda incelenmiştir.

5.2.1. Dolgulu kolonda kesikli üretim

Farklı düzenlerde enzim ve substrat karışımı reaktöre konarak, 80 atm ve 40 °C koşullarında yapılan deneyler sonunda elde edilen dönüşümler %4-11 olmuştur. Elde edilen dönüşümlerin düşük olması ve endüstriyel açıdan uygunluk nedeniyle süreli dolgulu kolon kullanılarak üretim gerçekleştirilmiştir.

5.2.2. Dolgulu kolonda sürekli üretim

1. İşletim süresinin etkisi incelendiğinde 100 dak. işletimin ardından dönüşümde bir düşme (\cong 5 saat sonunda % 94'den % 80'e) olmuştur. Bu düşüşün üç nedeni olabilir:
 - a) CO₂ akışı ile enzime bağlı olan suyun sıyrılarak enzim aktivitesinde düşme olması,
 - b) Oluşan suyun enzim etrafında birikmesi ile substratlar için hidrofobik bir bariyer olması, c) Tepkime ile oluşan su nedeniyle tepkime dengesinin sola kayarak hidroliz gerçekleşmesi.
2. Sıcaklığın etkisi 80 atm, $\tau_{\text{substrat}}=17$ dak. kalma süresinde ve 100 atm, $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak. kalma süresinde incelenmiş; ilk işletim koşulu için 60°C (% 80 dönüşüm), ikinci işletim koşulu için 50°C (% 94 dönüşüm) uygun sıcaklık olmuştur. Novozym 435, 80 ve 100 °C sıcaklıklarda süperkritik CO₂ ortamında aktif olmuştur.
3. Basıncın etkisi $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak ve $\tau_{\text{substrat}}=17$ dak. kalma sürelerinde incelenmiş; $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak. kalma süresinde basıncın 80 atm'den 200 atm'e kadar artırılması üretimi fazla etkilememiş ve başlangıçta % 95 olan dönüşüm değeri 10 dakika işletimin ardından yavaşça düşmüştür $\tau_{\text{substrat}}=17$ dak. kalma süresinde ise, basıncın 80 atm'den 100 atm'e artırılması üretimi artırmıştır. Düşük kalma süresinde basıncın etkisi daha fazla olmuştur.
4. Belli bir kalma süresinde substrat miktarının % 10'un üzerinde olması durumunda, dönüşüm ve ürün derişimi işletim süresinin artmasıyla düşmüş; substrat-CO₂ karışımı içindeki substrat miktarının artırılması verimliliği etkilememiştir. Belli bir substrat-CO₂ karışımı oranında $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak. kalma süresi ve üzerinde derişim ve ürün derişimi işletim süresi ile değişmemiştir. Kalma süresinin iki kat artmasıyla verimlilik iki kat azalmıştır. Verimlilik basınçtan ve karışım içindeki substrat miktarından fazla etkilenmemiştir. $\tau_{\text{substrat}}=17$ dak. kalma süresinde 10 mmol/g enzim/ h değerinde en yüksek verimlilik elde edilmesine karşın $\tau_{\text{substrat}}=33$ dak. uygun olmuştur.

5. Enzim miktarının 1/2 (0.5 g) ve 1/4 (0.25 g) oranında kullanılması üretimi fazla etkilememiş; 0.25 g enzim kullanıldığında 21 mmol/ g enzim/h değerinde maksimum verimlilik elde edilerek 3.8 kat artma sağlanmıştır.
6. Süperkritik CO₂ ortamında T=50 °C ve P=200 atm'de 8 saat süre ile bekletilen Lipozyme RM IM kararlı ve aktif olmuştur.
7. Novozym 435 süperkritik CO₂ ortamında farklı koşullarda [a) 300 bar, 60 °C'da 30 dak bekletme, ani basınç düşürme ve yükseltme (6 kez); b) Süperkritik CO₂ akımının Q=1 mL/dak akış hızında enzim ile dolu olan kolon üzerinden 3 saat boyunca geçirilmesi] bekletilmiş ve esterleşme aktivitesi incelenmiştir. Başlangıç hızının yaklaşık 2 kat düşmesine karşın, yarım saat gecikme ile aynı denge dönüşümü ve ürün derişimi değerlerine ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Adlercreutz, P., Iborra, J.L., Schmidt, E., and Pedersen, S., 1994. Applications. In: *Applied Biocatalysis*. Eds: J.M.S., Cabral, D. Best, L. Boross, and J. Tramper, Harwood Academic Publishers GmbH, Switzerland, p.109-156
- Adschiri, T., Akiya, H., Chin, L.C., Arai, K. And Fujimoto, K., 1992. Lipase-catalyzed interesterification triglycerides with supercritical carbon dioxide extraction, *J. Chem. Eng. Japan*, 25, 1, 104-105.
- Almedia, M.C., Ruivo, R., Maia, C., Freire, L., de Sampaino, T.C., and Barreiros, S., 1998. Novozyme 435 activity in compressed gases. Water activity and temperature effects, *Enzyme and Microbiol Technology*, 22, 494-499.
- Antczak, T., Hiler, D., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Galas, E. (2001). Mathematical modelling of ester synthesis by lipase in biphasic system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 1043.
- Aracil, J., Martinez, M., Sanchez, N., Corma, A., 1992. Formation of a jojoba oil analog by esterification of oleic acid using zeolites as catalyst, *Zeolites*, 12, 233-236.
- Ballesteros, A., Bornscheuer, A.C., Capawell, A., Combes, D., Condoret, J.-S., Koenig, K., Kolisis, F.N., Marty, A., Mege, U., Scheper, T., Stamatis, H. And Xenakis, A., 1995. Review article: Enzymes in non-conventional phases, *Biocatalysis and Biotransformation*, 13, 1-42.
- Bayraktar, E., 2001. Response Surface Optimization of the Separation of DL-Tryptophan Using an Emulsion Liquid Membrane, *Process Biochemistry*, 37, 169-175.
- Bell, G., Halling, P.J., Moore, B.D., Partridge, J., and Rees, D.G., 1995. Biocatalyst Behaviour In Low-Water Systems, *TIBTECH*, 13, 468-473.
- Benzioni and Forti 1989, . Jojoba. In: *Oil crops of The World*. Eds: G. Robbelen, R.K. Downey, and A. Ashri, McGraw-Hill Publishing Company; New York, 448-461.
- Berg, B.E., Hansen, E.M., Gjørven, S. And Greibrokk, T., 1993. On-line enzymatic reaction, extraction, and chromatography of fatty acids and triglycerides with supercritical carbon dioxide, *HRC*, 16, 358-363.
- Bernard, P. and Bart, D., 1996. Enzymatic reaction in supercritical carbon dioxide internal mass transfer limitation, In: *High Pressure Chemical Engineering*, Ph. Rudolf von Rohr and Ch. Trepp (eds), Elsevier Science, p.103-109.
- Bernard, P., Barth, D. And Nicoud, R.M., 1994. Enzymatic synthesis of glycerides: A comparison between supercritical and liquid operations, In: *Proceeding of the 3rd International Symposium on Supercritical Fluids*, Brunner, G. and Perrut, M. (eds), Strasbourg, France, 137-141.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P. and Mattiasson, B. (1992). Facile synthesis of fatty acids in high yields. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 546-552.
- Bornscheuer, U., Capawell, A., Wendel, V., and Scheper, T., 1996. On-line determination of the conversion in a lipase-catalyzed kinetic resolution in supercritical carbon dioxide, *Journal of Biotechnology*, 46, 139-143
- Bovara, R., Carrea, G. Ottolina, G. and Riva, S., 1993. Effects of water activity on V_{max} and K_m of lipase catalyzed transesterification in organic media. *Biotechnology Letters*, 15(9), 937-942.

- Box, G.E.P., Hunter, W.G. and Hunter, J.S. *Statistics for Experiments*, (John Wiley and Sons, New York, 1978), pp.291-334.
- Capawell, A., Wendel, V., Bornscheuer, U., Meyer, H.H., and Scheper, T., 1996. Lipase-catalyzed kinetic resolution of 3-hydroxy esters in organic solvents and supercritical carbon dioxide, *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 181-186.
- Carta, G., Gainer, J.L. and Benton, A.H., 1991. Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase, *Biotechnology and Bioengineering*, 37, 1004-1009.
- Castillo, E., Marty, A., Condoret, J.S. and Combes, D., 1996. Enzymatic catalysis in nonconventional media using high polar molecules as substrates, *In: Annals of the New York Academy of Science*, Dordick, J.S. and Russell, A.J. (eds), The New York Academy of Sciences, New York, 799, 206-211.
- Castillo, Marty, A., Combes, D. and Condoret, J.S., 1994. Polar substrats for enzymatic reactions in supercritical CO₂ : How to overcome the solubility limitation, *Biotechnology Letters*, 16, 2, 169-174.
- Cernia, E., Palocci, C., Gasparrini, F., Misiti, D., and Fagnano, N., 1994. Enantioselectivity and reactivity of immobilized lipase in supercritical carbon dioxide, *Journal of Molecular Catalysis*, 89, L11-L18.
- Chi, Y.M., Nakamura, K. and Yano, T., 1988. Enzymatic interesterification in supercritical carbon dioxide, *Agric.Biol.Chem.*, 52, 6, 1541-1550.
- Chowdary, G.V., Ramesh, M.N. and Prapulla, S.G., 2000. Enzymatic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* : a multivariate analysis. *Process Biochemistry*, 36, 331.
- Chulalaksananukul, W., Condoret, J.-S., and Combes, D., 1993. Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide, *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 691-698.
- Coteron, A., Sanchez, N., Martinez, M., Aracil, J., 1993. Optimization of the synthesis of an analogue of jojoba oil using a fully central composite design, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 71, 485-488.
- Doddema, H. J., Janssens, R.J.J., de Jong, J.P.J., van der Lugt, J.P. and Oostrom, H.H.M., 1990. Enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide and integrated product-recovery In: 5th European Congress on Biotechnology, Christiansen, C., Munck, L. and Viladsen, J. (eds), Copenhagen, Munksgaard, 239-242.
- Dossat, V., Comdes, D., Marty, A., 1999. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 194-200.
- Dumont, T., Barth, D. and Perrut, M., 1993. Continuous synthesis of ethyl myristate by enzymatic reaction in supercritical carbon dioxide, *J. Supercritical Fluids*, 6, 85-89.
- Dumont, T., Barth, D., Corbier, C., Branlant, G. and Perrut, M., 1992. Enzymatic reaction kinetic: comparison in an organic solvent and in supercritical carbon dioxide, *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 329-333.
- Ericson, J.C., Schyns, P. and Cooney, C., 1990. Effect of pressure on an enzymatic reaction in a supercritical fluid, *AIChE Journal*, 36, 2, 299-301.
- Foster, K.E., Karpiscak, M.M., Taylor, J.G., Wring, N.G., 1983. Gauyule, jojoba, buffalo gourd and Russian thistle: Plant characteristics, products and commercialization potential. *Desert plants*, 5(3), 112-126.

- Gandhi, N.N., Patil, N.S., Sawant, S.B., Joshi, J.B., Wangikar, P.P. and Mukesh, D., (2000). Lipase Catalyze Esterification, *Catal. Rev-Sci. Eng.*, 42(4), 439-480.
- Garcia, J., Rodriguez, F., and Revenga, J.A., 2000. Modelling solubility of solids in supercritical fluids using response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 75, 245-251.
- Garcia, T., Coteron, A., Martinez, M., and Aracil, M., 1996. Kinetic modelling of esterification reactions catalysed by immobilized lipases, *Chemical Engineering Science*, 51, 11, 2841-2846.
- Garcia, T., Martinez, M., and Aracil, M., 1993. Enzymatic synthesis of an analogue of jojoba oil: optimization by stactical analysis, *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 607-611.
- Garcia, T., Sanchez, N., Martinez, M., Aracil, J., 1999. Enzymatic synthesis of fatty esters Part II. Optimizasyon studies, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 591-597.
- Gillies, B., Yamazaki, H. and Armstrong, D.W., 1987. Production of flavor esters by immobilized lipase, *Biotechnology Letters*, 9, (10), 709-714.
- Glowacz, G., Bariszlovich, M., Linke, M., Richter, P., Fuchs, C. and Mörsel, J.-T., 1996. Stereoselectivity of lipases in supercritical carbon dioxide. I. Dependence of the regio- and enantioselectivity of porcine pancreas lipase on the water content during the hydrolysis of triolein and its partial glycerides, *Chem. Phys. Lipids*, 79, 101-106.
- Ghosh P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., and Davidson S., 1996. Microbial lipases: production and applications, *Sci. Prog.*, 79, 2, 119-157.
- Goddard, R., Bosley, J. and Al-Duri, B., 1999. Immobilised lipase esterification of oleic acid and ethanol in plug flow reactor under supercritical conditions: Investigation of kinetics, *CISF 99, fifth Conference on Supercritical Fluids and their Applications*, June, 13-16, Garda, (Verona), Italy.
- Goderis, H.L., Ampe, G., Feyten, M.P., Fouwe, B.L., Guffens, W.M., Van Cauwenbergh, S.M., and Tobback, P.P., 1987. Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnol. Bioeng.*, XXX, 258-266.
- Gunnlaugsdottir, H. And Sivik, B., 1995. Lipase-catalyzed alcoholysis of cod liver oil in supercritical carbon dioxide, *JAACS*, 72,4, 399-405.
- Gunnlaugsdottir, H., 1997. Lipase-Catalysed Lipid Modifications in Süpercritical Carbon Dioxide, Lund University, Lund, Sweden.
- Güvenç, A., Kapucu, N., and Mehmetoğlu, Ü., 2002. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in solvent-free system, *Process Biochemistry*, 38, 379-386.
- Güvenç, A., Kapucu, N., Bayraktar, E. and Mehmetoğlu Ü., 2003. Optimization of The Enzymatic Production of Isoamyl Acetate with Novozym 435 from *Candida antarctic*, *Chemical Engineering Communication*, 190, 948-961.
- Habulin, M., Krmelj, V., and Knez, Z., 1996a. Supercritical Carbon dioxide as a medium for enzymatically catalyzed reaction. *Proceeding of the Third International Symposium on High Pressure Chemical Engineering*, eds:Ph. Rudolf von Rohr and Ch. Trepp, Vol.12, 85-90.
- Habulin, M., Krmelj, V., and Knez, Z., 1996b. Synthesis of Oleic Acid Esters Catalyzed by Immobilized Lipase, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 338-342.

- Habulin, M., Krmelj, V., Knez, Z., 1999. Alternative Media For Enzymic Reactions, *CISF, 99, fifth Conference on Supercritical Fluids and their Applications*, June 13-16, Garda (Verona), Italy, 331-337.
- Habulin, M. and Knez, Z., 2001a. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76, 1260-1266.
- Habulin, M. and Knez, Z., 2001b. Pressure stability of lipases and their use in different systems. *Acta Chim. Slov.*, 48, 521-532.
- Hadzir, N.M., Basri, M., Abd Rahman, M.B., Abdul Razak, C.N., Abd Rahman, R.N.Z., Salleh, A.B. (2001). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(5), 511.
- Hallberg, M.L., Wang, D., and Härröd, M., 1999. Enzymatic synthesis of wax esters from rapeseed fatty acid methyl esters and a fatty alcohol, *JAOCS*, 76, 2, 183-187.
- Halling, P. J., 1992. Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media, *Biotechnology Techniques*, 6, 271-276.
- Halling, P. J., 1994. Thermodynamic predictions for biocatalysis in non-conventional media: Theory, test and recommendations for experimental design and catalysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 178-205.
- Halling, P.J. and Valivety, R.H., 1992. Physical-chemical nature of low water systems for biocatalysis: especially phase behaviour, water activity and pH, *In: Biocatalysis in Non-Conventional Media*, 13-21. Tramper, J., Vermue, M.H., Beeftink, H.H., von Stocker, U. Eds., Elsevier Science Publ. Amsterdam, The Netherlands.
- Halling, P.J., 1990. High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents, *Biochim. Biophys. Acta*, 1040, 225-228.
- Hammond, D.A., Karel, M., Klibanov, A.M. and Krukonis, V.J., 1985. Enzymatic reactions in supercritical gases, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 11, 393-400.
- Hari Krishna, S., Manohar, B., Divakar, S., and Karanth, N.G., 1999. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: Optimization by response surface methodology, *JAOCS*, 76, 12, 1483-1488.
- Hari Krishna, S., Manohar, B., Divakar, S., Prapulla, S.G. and Karanth, N.G., 2000. Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology, *Enzyme Microb. Technol*, 26, 131-136.
- Hari Krishna, S., 2002. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media, *Biotechnology Advances*, 20, 239-267.
- Hari Krishna, S. and Karanth N.G., 2002. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nanaqueous media. *Catal Rev.*, 44, 499-590.
- Harrod, M., Lilja-Hallberg, M. and Elfman, I., 1994. Enzymatic synthesis of phosphatidylcholine with fatty acids, propane, CO₂ and isooctane as solvents, *In: Proceeding of the 3rd International Symposium on Supercritical Fluids*, Brunner, G. and Perrut, M. (eds), Strasbourg, France, 149-154.

- Hernjez, B.J., Chen, M. and Landwehr, M., 1994. Enzymatic esterification of 1,2-Butanediol and 1,3-butanediol in supercritical carbon dioxide: Reaction rate, Regioselectivity and stereoselectivity as a function of pressure, In: *Proceeding of the 3rd International Symposium on Supercritical Fluids*, Brunner, G. and Perrut, M. (eds), Strasbourg, France, 167-171.
- Ikushima, Y., Saito, N., Yokohama, T., 1993. Solvent effects on an enzymatic ester synthesis in supercritical carbon dioxide, *Chemistry Letters*, 109-112.
- Ishii, T., Mori, T., Chen, J., Itoh, Y., Shimura, S., Kirimura, K. and Usami, S. 1990. Ester synthesis by a crude lipase of *Rhizopus oligosporus* in an aqueous system. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **70**(3), 188-189.
- Ismail, A., Soultani, S., and Ghouil, M., 1998. Optimization of the enzymatic synthesis of butyl glucoside using response surface methodology. *Biotechnol. Prog.*, **14**(6), 874-878.
- Isono, Y., Nakajima, M., Nebatani, H., 1998. Solvent-free esterification of oleic acid and oleyl alcohol using membrane reactor and lipase-surfactant complex. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **86**(1), 138-140.
- Jackson, M. A. and King, J.W., 1996. Methanolysis of seed oils in flowing supercritical carbon dioxide, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 353-356.
- Jackson, M. A. and King, J.W., 1997. Lipase-catalysed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 353-356.
- Jaswir I. and Che Man, Y.B., 1999. Use optimization of natural antioxidants in refined, bleached, and deodorized palm olein during repeated deep-fat frying using response surface methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**(3), 341-348.
- Jenssen, L., Moen, P. and Elvevoll, E. O., 1991. Enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide, In: *Proceeding of the 16th Scandinavian Symposium on Lipids*, Herdang, Norway, 237-242.
- Kafarov, V. 1976. *Cybernetic Methods in Chemistry and Chemical Engineering*, Mir Publisher, Moscow, 167-225.
- Kamat, S., Barrene, J., Beckman, E.J. and Russell, A.J., 1992a. Biocatalytic Synthesis of Acrylates in Organic Solvents and Supercritical Fluids: I. Optimization of Enzyme Environment, *Biotechnology and Bioengineering*, **40**, 158-166.
- Kamat, S., Beckman, E.J. and Russell, A.J., 1992b. Role of diffusion in nonaqueous enzymology I. Theory, *Enz. Microb. Technol.*, **14**, 265.
- Kamat, S., Beckman, E.J. and Russell, A.J., 1993a. Control of enzyme enantioselectivity with pressure changes in supercritical fluoroform, *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (19), 8845-8846.
- Kamat, S., Beckman, E.J. and Russell, A.J., 1995. Enzyme activity in supercritical fluids, *Critical Reviews in Biotechnology*, **15** (1), 41-71.
- Kamat, S., Critchley, G., Beckman, E.J. and Russell, A.J., 1995. Biocatalytic Synthesis of Acrylates in Organic Solvents and Supercritical Fluids: III. Does Carbon Dioxide Covalently Modify Enzymes?, *Biotechnology and Bioengineering*, **46**, 610-620.
- Kamat, S., Iwaszkewycz, B., Beckman, E.J. and Russell, A.J., 1993b. Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids: Tuning enzyme activity by changing pressure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2940.
- Kamihira, M., Taniguchi, M., and Kobayashi, T., 1987. Synthesis of aspartame precursors by enzymatic reaction in supercritical carbon dioxide, *Agric. Biol. Chem.* **51**(12), 3427-3428.

- Kaneshiro, T., Nakamura, L.K., Nicholson J.J., Bagby, M.O., 1996. Oleyl oleate and Homologous wax esters synthesized coordinately from oleic acid by *Acinetobacter* and *Coryneform* strains. *Current Microbiology*, 32, 336-342.
- Kapucu H., 2000. Biyotransformasyon ile fenil etanolden fenil asetaldehit üretimi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
- Kapucu, H, Yıldız, N., Gönülşen R., and Çalıklı, A., 2003a. Investigation of benzoic acid adsorption onto ODTMA-bentonite by response surface optimization. *Adsorption Science and Technology*, 20,
- Kapucu, N., Güvenç, A., Kapucu, H., Mehmetoğlu, Ü. and Çalıklı A., 2003b. Lipase Catalyzed Synthesis of Oleyl Oleate : Optimization by Response Surface Methodology, *Chemical Engineering Communication*, 190, 779-796.
- Kasche, V., Schlothauer, R., and Bruner, G., 1988. Enzyme denaturation in supercritical CO₂ : Stabilizing effect of S-S bonds during the depressurization step, *Biotechnol. Lett.*, 10(8), 569-574.
- Khuri, A.I. and Cornell, J.A. *Response Surfaces: Design and Analyses*, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987).
- Kılıç, M., Bayraktar, E., Ateş, S. and Mehmetoğlu, Ü., 2002. Investigation of extractive citric acid fermentation using Response-Surface Methodology, *Process Biochemistry*, 37, 759-767.
- Kırık, R.E. and Othmer, D.F. , 1991. Encyclopedia of Chemical Technology, 23, 452-477.
- Kim, J.E., Han, J.J., Yoon, J.H., Rhee, J.S., 1998. Effect of salt hydrate pair on lipase-catalyzed regioselective monoacylation of sucrose. *Biotechnol. Bioeng.*, 57(1), 121-125.
- King, J.W., Jackson, M.A., List, G.R., Demessie, E.S., Holliday, R.L. and Temelli, F., 1996. Synthetic modification of seed-derived oils utilizing reaction chemistry in supercritical fluids, In: World Conference on Oilseed and Edible Oil Processing, Istanbul, Turkey.
- Kiran, K.R., Karanth, N.G., Divakar, S., 1999. Preparation of stearyl lactic acid esters catalyzed by lipases from *Rhizomucor miehei* and porcine pancreas optimization using response surface methodology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 579-584.
- Kiran, K.R., Manohar, B., Karanth, N.G., Divakar, S., 2000. Response surface methodological study of esterification of lactic acid with palmitic acid catalyzed by immobilized lipases from *Mucor miehei* and porcine pancreas. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 130-135.
- Kivittingen, L., Sjursnes, B., Anthonsen, T., and Halling, P.J., 1992. Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalysed synthesis in organic media: A practical procedure for organic chemists, *Tetrahedron*, 48, 13, 2793-2802.
- Knez, J., and Habulin, M., 2002. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a sort review. *Journal of supercritical fluids*, 23, 29-42.
- Knez, Z., and Habulin, M., 1994. Lipase catalysed esterification at high pressure, *Biocatalysis*, 9, 115-121.
- Knez, Z., Habulin, M., Krmelj, V., 1998. Enzyme catalyzed reactions in dense gases, *Journal of Supercritical Fluids*, 14, 17-29.
- Knez, Z., Rizner, V., Habulin, M. and Bauman, D. 1995. Enzymatic synthesis of oleyl oleate in dense fluids, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 72 (11), 1345-1349.

- Krmelj, V., Habulin, M., Knez, Z., Bauman, D., 1999. Lipase-catalyzed synthesis of oleyl oleate in pressurized and supercritical solvents, *Fett/Lipid*, 1, 34-38.
- Kuhl, P, Eichhorn, U. and Jkubke, H.-D., 1992. Thermolysin- and chymotrypsin-catalysed peptide synthesis in the presence of salt hydrates. In: *Biocatalysis in Non Conventional Media.*, (Ed. J. Tramper), p.513-518.
- Kuhl, P. and Halling, P.J., 1991. Salt hydrates buffer water activity during chymotrypsin-catalysed peptide synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1078, 326-328.
- Langrand, G., Triantaphylides, C., and Baratti, J., 1988. Lipase-catalyzed Formation of Flavour Esters, *Biotech. Lett.*, 10, (8), 549-554.
- Lee, H. S., Ryu, Y.W. and Kim, C., 1993. Hydrolysis of starch by α -amylase and glucoamylase in supercritical carbon dioxide, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 4, 230-232.
- Lee, M-T., Chen, W-C., Chou, C-C., 1999. Optimization and kinetic analysis of cholesterol oxidase production by *Rhodococcus equi* no.23 in submerged cultures, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 598-604.
- Ljunger, G., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., 1994. Enzymatic synthesis of octyl- β -glucoside in octanol at controlled water activity *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 751-755
- Martinez, M. Torrano, E. and Aracil, J., 1988. Synthesis of esters of high molecular weight. an analogue of jojoba oil. a statistical approach, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 27, 2179-2182.
- Martins, J., de Cavalho, I.B., de Sampaio, T.C., and Barreiros, S., 1994. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of glycidol in supercritical carbon dioxide, *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 785-790.
- Marty, A., Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S., Willemot, R.M. and Durand, G., 1990. Comparison of lipase-catalysed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane, *Biotechnology Letters*, 12, 1, 11-16.
- Marty, A., Chulalaksananukul, W., Willemot, R.M., Condoret, J.S., 1992. Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide, *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 273-280.
- Marty, A., Combes, D. and Condoret, J.S., 1994. Continuous reaction-separation process for enzymatic esterification in supercritical carbon dioxide, *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 497-504
- Matsumoto, M., Odachi, D., Kondo, K., 2001. Effect of water activity on rate of esterification by lipase in organic media. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 34(3), 437-440.
- Mesiano, A.J., Beckman, E.J. and Russell, A.J., 1999. Supercritical Biocatalysis, *Chem. Rev.*, 99, 623-633.
- Michor, H., Marr, R., Gamse, T., Schilling, T., Klingsbichel, E., and Schwab, H., 1996. Enzymatic catalysis in supercritical carbon dioxide: Comparison of different lipases and a novel esterase, *Biotechnology Letters*, 18, 1, 79-84.
- Miller, C., Austin, H., Posorske, L. And Gonzalez J. (1988). Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *Journal of American Oil Chemistry Society.*, 65(6), 927.
- Miller, D.A., Blanch, H.W., and Prausnitz, J.M., 1991. Enzyme-catalyzed interesterification of triglycerides in supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 30, 939-946.

- Miwa, T.K., 1971. Jojoba oil wax esters and derived fatty acids and alcohols: Gas chromatographic analysis, *JAOCS*, 48, 259-264.
- Montgomery, D.C. *Design and Analysis of Experiments*, (John Wiley and Sons, New York, 1997, pp.575-651.
- Moshhammer, B., Marr, R., Biladt, A., Fröschl, f. And Preitschopf, W., 1994. Supercritical carbon dioxide as processing medium for enzymatic interesterification, *Dev. Food Eng.: 6th Int. Congr.*, 2-852-854.
- Mukherjee, K.D., and Kiewitt, I., 1988. Preparation of esters resembling natural waxes by lipase-catalyzed reactions. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 1333.
- Muralidhar, R.V., Chirumamila, R.R., Marchant, R., and Nigam, P., 2001. A response surface approach for the comparison of lipase productin by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, 9, 17-23.
- Murthy, M.S.R.C., Swaminathan, T., Rakshit, S.K., and Kosugi, Y. 2000. Statistical optimization of lipase catalyzed hydrolysis of methyloleate by response surface methodology, *Bioprocess Engineering*, 2, 35-39.
- Myers, R.H. *Response Surfaces Methodology*, (Allyn and Bacan Inc., Boston, USA, 1971), pp.67-125.
- Nakamura, K. 1994. Biochemical reactions in supercritical fluids. *In: Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*, Rizvi, S.S.H. (ed.), Chapman and Hall, Glasgow, UK, 54-61.
- Nakamura, K. Chi, Y.M., Yamada, Y. and Yano, T., 1986. Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide, *Cem. Eng. Commun.*, 45, 207-212.
- Nakamura, K., 1989. Supercritical Fluid Bioreactor, *In Bioproducts and Bioprocesses*, (Fiechter, A. Okada, H. and Tanner, R.D., eds.), 257-265, Springer-Verlag..
- Naqvi, H.H., Goldstein, G., Ratnayake, C., Ceccardi, T., and Ting, I.P. 1988. Jojoba breeding and agronomic investigations University of California Riverside. Proceedings : Seventh International Conference on Jojoba and Its Uses. Ed:A.R. Baldwin, American Oil Chemis' Society, Champaign, III, 395-409.
- Noritomi, H., Miyata, M., Kato, S., and Nagahama, K., 1995. Enzymic synthesis of peptide in acetonitril/supercritical carbon dioxide, *Biotechnol. Lett.*, 17, 1323-1328.
- NOVO NORDISK Web sitesi, www.novo.dk.
- Okumura, S., Iwai, M., Tsujisaka, Y., 1979. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 575, 156-165.
- Oliveira, D., Uller, A.M.C., Alves, T.L.M., and Oliveira, J.V., 1999. AQ comparison between organic solvent and SC-CO₂ for enzymic alcoholysis of palm kernel oil, *CISF, 99, fifth Conference on Supercritical Fluids and their Applications*, June 13-16, Garda (Verona), Italy, 389-396.
- Pasta, P., Mazzola, G. and Riva, S., 1989. Subtilisin-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide, *Biotechnology Letters*, II, 9, 643-648.
- Pepin, P., Lortie, R. (1999). Influence of water activity on the enantioselective esterification of (R,S)-Ibuprofen by *Candida antarctica* lipase B in solventless medi. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(4), 502-505.
- Perrut, M. 1994. Enzymatic reactions and cell behaviour in supercritical fluids, *Chem. Biochem, Eng. Q.*, 8(1), 25-30.

- Poisson, L., Jan, S., Vuilleumard, J.C., Sarazin, C., Séguin, J.P., Barbotin, J.N., and Ergon, F., 1999. Lipase-catalyzed synthesis of waxes from milk fat and oleyl alcohol, *JAACS*, 76, 9, 1017-1021.
- Randolph, T.W., Blanch, H.W. and Prausnitz, J.M., 1988b. Enzyme-catalyzed oxidation of cholesterol in supercritical carbon dioxide, *AIChE Journal*, 34, 8, 1354-1360.
- Randolph, T.W., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M., and Wilke, C.R., 1985. Enzymatic catalysis in supercritical fluid, *Biotechnology Letters*, 7, 5, 325-328.
- Randolph, T.W., Clark, D.S., Blanch, H.W. and Prausnitz, J.M., 1988a. Enzymatic oxidation of cholesterol aggregates in supercritical carbon dioxide, *Science*, 238, 387-390.
- Rantakylä, M., Alkio, M., and Aaltonen, O., 1996. Stereospecific hydrolysis of 3-(4-methoxyphenyl)glycidic esters in supercritical carbon dioxide by immobilized lipase, *Biotechnology Letters*, 18, 9, 1089-1094.
- Rantakylä, M., and Aaltonen, O., 1994. Enantioselective esterification of ibuprofen in supercritical carbon dioxide by immobilized lipase, *Biotechnology Letters*, 16, 8, 825-830.
- Rao, H., Valivety, R.H., Halling, P.J. and Macrae, A.R., 1992. Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents, *Biochim. Biophys. Acta*, 1118, 218-222.
- Rao, N.M., and Shanmugam, V.M. (2000). *Journal of American Oil Chemistry Society*, 77(6), 605.
- Rastogi, N.K., Rajesh, G., and Shamala, T.R., 1998. Optimization of enzymatic degradation of coconut residue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(1), 129-134.
- Rizvi, S.S.H., Yu, Z.R., Bhaskar, A.R. and Chidambara, R., 1994. Fundamentals of Processing with Supercritical Fluids. In: *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*, Rizvi, S.S.H. (ed.), Chapman and Hall, Glasgow, UK, 54-61.
- Rosel, C.M. and Vaidya, A.M., 1995. Twin-core packed-bed reactors for organic-phase enzymatic esterification with water activity control. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 283-286.
- Rosell, C.M., Vaidya, A.M. and Halling, P.J. 1996. Continuous insitu water activity control for organic phase biocatalysis in a packed bed hollow fiber reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 284-289.
- Russell, A.J., Beckman, E.J. and Chaudhary, A.K, 1994. Studying enzyme activity in supercritical fluids, *CHEMTECH*, March, 33-37.
- Russell, A.J., and Beckman, E.J., 1991. Should the high diffusivity of supercritical fluids increase the rate of an enzyme catalyzed reaction?, *Enz. Microb. Technol.* 13, 1007.
- Sagel, I., 1975. *Enzyme Kinetics*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Saito, N., Sato, O., Ikushima, Y., Hatakeda, K. and Ito, S., 1994. Productivity of isopropylidenglycerol acyl ester synthesis by enzymatic reaction in supercritical carbon dioxide, In: *Proceeding of the 3rd International Symposium on Supercritical Fluids*, Brunner, G. and Perrut, M. (eds), Strasbourg, France, 179-184.
- Sanchez, N., Coteron, A., Martinez, M. and Aracil, J., 1992. Kinetic analysis and modeling of the esterification of oleic acid and oleyl alcohol using cobalt chloride as catalyst, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 31, 1985-1988.

- Santaniello, E., Ferraboschi, P. And Grisenti, P., 1993. Lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: applications to the preparation of enantiomerically pure compounds, *Enzy. Microb. Technol.*, 15 (2), 367-382.
- Savage, P.E., Gopalan, S., Mizan, T.I., Martino, C.J., Broc, E.E., 1995. Reactions at supercritical conditions: applications and fundamentals, *AIChE Journal*, 41, 7, 1723-1778.
- Schreier, P. 1997. Enzymes and flavour biotechnology, In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol.55, Ed: T.Scheper, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 51-72.
- Shieh, C.-J. and Lou, Y.-H., 2000. Five-factor response surface optimization of the enzymatic synthesis of citronellyl butyrate by lipase IM77 from *Mucor miehei*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, (5), 521-525.
- Shieh, C.-J., Akoh, C.C. and Yee, L.N. 1996. Optimized enzymatic synthesis of geranyl butyrate with lipase AY from *Candida rugosa*, *Biotechnol. Bioeng.*, 51, 371-374.
- Shieh, C.-J., and Chang, S.W., 2001. Optimized synthesis of lipase-catalyzed hexyl acetate in n-hexane by response surface methodology. *J. Agric. Food. Chem.* 49(3), 1203-1207.
- Shishikura, A., Fujimoto, K., Suzuki, T. and Arai, K., 1994. Improved lipase-catalyzed incorporation of long-chain fatty acid into medium-chain triglycerides assisted by supercritical carbon dioxide extraction, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 961-967.
- Sjurnes, B., Kivittingen, L., Anthonsen, T., 1992. Control of water activity by using salt hydrates in enzyme catalysed esterifications in organic media. In: *Biocatalysis in Non Conventional Media.*, (Ed.J.Tramper), p.451-457.
- Steytler, D.C., Moulson, P.S., Reynolds, J. 1991. Biotransformations in near-critical carbon dioxide, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 221-226.
- Svensson, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P. and Mattiasson, B., 1994. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 549-556.
- Taniguchi, M., Kamihira, M. and Kobayashi, T., 1987. Effect of treatment with supercritical carbon dioxide on enzyme activity, *Agric. Biol. Chem.*, 51 (2), 593-594.
- Taragano, V.M. and Pilosof A.M.R., 1999. Application of Doehlert design for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 411-419.
- Telefoncu, A., 1998. Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu, 21-27 Eylül, kuşadası, Aydın, Türkiye.
- Trani, M., Ergan, F., Andre, G., 1991. Lipase-catalyzed production of wax ester. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 68(1), 20-22.
- Ujang, Z., and Vaidya, A.M., 1998. Stepped water activity control for efficient enzymatic interesterification, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 318-322.
- Uosukainen, E., Lämsä, M., Linko, Y.-Y., Leisola, M., 1999. Optimization of enzymatic transesterification of rapeseed oil ester using response surface and principal component methodology, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 236-243.
- Valivety, R.H., Halling, P.J. and Macrae, A.R., 1992a. Effect of water activity on rate of lipase catalysed esterification. In: *Biocatalysis in Non Conventional Media.*, (Ed.J.Tramper), p.549-555.

- Valivety, R.H., Halling, P.J. and Macrae, A.R., 1992b. Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1118,218-222.
- Valivety, R.H., Halling, P.J., Peilow, A.D. and Macrae, A.R., 1992c. Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1122,143-146.
- Valivety, R.H., Halling, P.J. and Macrae, A.R., 1993. Water as a competitive inhibitor of lipase-catalysed esterification in organic media. *Biotechnology Letters*, 15(11), 1113-1138.
- Vallikivi Imre., web sitesi,
(<http://rd1.hitbox.com/rd?acct=WQ500529CCED92EN0&p=s>)
- van Eijs, A.M.M., de Jong, J.P.J., Doddema, H.J. and Lindeboom, D.R., 1988a. Enzymatic transesterification in supercritical carbon dioxide, In: Perrut, M. ed., *Proceeding of International Symposium on Supercritical Fluids* (Nice, France), 933-942.
- van Eijs, A.M.M., de Jong, J.P.J., Oostrom, H.H.M., Doddema, H.J., Visser, M.A. and Stoop, R., 1988b. Enzymatic synthesis of nonylacetate and isoamylacetate in supercritical carbon dioxide and organic solvents In: Breteler, H. et al., eds., *Proceedings 2nd Netherlands Biotechnology Congress*, Amsterdam. Netherlands Biotechnological Science.
- Vermue, M.H., and Tramper, J., 1992. Enzymic transesterification in near-critical carbon dioxide: effect of pressure, Hildebrand solubility parameter and water content, *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 649-655.
- Vija, H., Telling, A. and Tougu, V., 1997. Lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide and in hexane, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7, (3), 259-262.
- Wehtje, E., Costes, D., Adlercreutz, P., 1997a. Enantioselectivity of lipases : effect of water activity. *J. Mol. Cat. B:Enzym.*, 3, 221-230.
- Wehtje, E., Kaur, J., Adlercreutz, P., Chand, S., and Mattiasson, B., 1997b. Water activity control in enzymatic esterification processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 502-510.
- Welsh, F.W, Muray, W.D. and Williams, R.E., 1989a. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 9(2), 105-169.
- Wu, J.-Y., Liu, S.-W., 2000. Influence of alcohol concentration in lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproxen in isooctan : under controlled water activity. *Enzyme and Microbil Technology*, 26, 124-130.
- Wu, W.H., Foglia, T.A., Marmer, W.N., and Phillips, J.G., 1999. Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology, *JAOCs*, 76, 4, 517-521.
- Xu, X., Mu, H., Hoy, C.-E., Adler-Nissen, J., 1998. Production of specific structured lipids by enzymatic interesterification : optimization of the reaction by response surface methodology. *Lipid-Fett*, 100(10), 463-471.
- Xu, X., Mu, H., Hoy, C.-E., Adler-Nissen, J., 1999. Production of specifically structured lipids by enzymatic interesterification in a pilot enzyme bed reactor : process optimization by response surface methodology. *Lipid-Fett*, 101(6), 207-214.

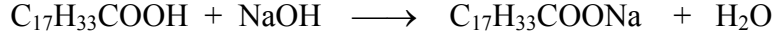
- Yahya, A.R.M., Anderson, W.A. and Moo-Young, M., E. (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, 438-450.
- Yang, Z., Robb, D.A., Halling, P.J., 1992. Variation of tyrosinase activity with solvent at a constant water activity. In: *Biocatalysis in Non Conventional Media*, (Ed.J.Tramper), p.585-592.
- Yıldız, N., Kapucu, H. and Çalimli, A. 2000. Response surface optimization of the phenol adsorption onto HDTMA-Bentonite. *Reviews in Chemical Engineering*, **16**(1), 55-70.
- Yoon, S.-H., Miyawaki, O., Park, K.-H., and Nakamura, K., 1996. Transesterification between triolein and ethylbehenate by immobilized lipase in supercritical carbon dioxide, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **82**, 4, 334-340.
- Yu, Z.-R., Rizvi, S.S.H. and Zollweg, J.A., 1992. Enzymatic esterification of fatty acid mixtures from milk fat and anhydrous milk fat with canola oil in supercritical carbon dioxide, *Biotechnol. Prog.*, **8**, 508-513.
- Zacharis, E., Omar, I.C., Partridge, J., Robb, D.A., Halling, P.J., 1997. Selection of salt hydrate pairs for use in water control in enzyme catalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, **55**(2), 367-374.
- Zaidi, A., Gainer, J.L. and Carta, G., 1995. Fatty acid esterification using nylon-immobilized lipase, *Biotechnology and Bioengineering*, **48**, 601-605.
- Zaks, A and Klibanov, A.M., 1984. Enzymatic catalysis in organic media 100 °C, *Science*, **224**, 1249.
- Zaks, A., and Klibanov, A.M., 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 3192.
- Zaks, A., and Klibanov, A.M., 1988. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents, *J. Biol. Chem.*, **263**, 3194-3201.
- Zaks, A., and Klibanov, A.M., 1988. The effect of water on enzyme action in organic media, *J. Biol. Chem.*, **263** (17), 8017-8021.
- Zheng, Y. and Tsao, G.T., 1996. Avicel hydrolysis by cellulase enzyme in supercritical CO₂, *Biotechnol Lett.*, **18**, 451-454.

EKLER

- EK-1. Oleyik Asit Derişiminin Titrasyon ile Belirlenmesi
- EK-2. Oleyil alkol ve Oleyil Oleat'ın GC Analizi için Örnek Kromatogram
- EK-3. Tepkime ile oluşan su miktarının belirlenmesi
- EK-4. Tepkime başlangıç hızlarının belirlenmesi
- EK-5 Novozym 435 için Gözenek Boyut Dağılımı Analiz Sonuçları
- EK-6 Lipozyme RM IM için Gözenek Boyut Dağılımı Analiz Sonuçları
- EK-7 Mali Bilanço ve Açıklamaları
- EK-8 Yayınlar ve Bilimsel Toplantılar

EK-1 Oleyik Asit Derişiminin Titrasyon ile Belirlenmesi

Bu çalışmada oleyik asit derişimleri, basit, ucuz ve en çok kullanılan yöntem olması, hızlı ve doğru sonuçlar vermesi nedeniyle titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bunun için tepkime ortamından alınan 0.5 g örnek, 10mL etanol (%96'lık etanol içinde kütlece %0.1 fenolftalein çözeltisi) içinde çözülerek 0.1 N NaOH ile titre edilmiştir.



Oleyik asit derişimi aşağıdaki denklemlerle belirlenmiştir.

$$(T-B) \times 0.1 \text{ N NaOH} \times 282.47 / m_{\text{örnek, g}} = \text{mg oleyik asit/g reaksiyon karışımı}$$

$$(T-B) \times 0.1 \text{ N NaOH} / m_{\text{örnek, g}} = \text{mmol oleyik asit/g reaksiyon karışımı}$$

$$\% \text{ oleyik asit} = (T-B) \times 0.1 \text{ N NaOH} \times 282.47 \times 100 / m_{\text{örnek, g}}$$

T : örnek için harcanan 0.1 N NaOH hacmi, ml

B : tanık deney için harcanan 0.1 N NaOH hacmi, ml

Örnek hesaplama

Tanık deney :

- 10 mL kütlece % 0.1 fenolftalein içeren %96'lık etil alkol alınır.
- 0.1 N NaOH ile titre edilir.

Harcanan NaOH, B =18.4 mL

Oleyik Asit İçeren Ortamda Titrasyon:

- 0.5 mL oleyik asit alınır.
- 10 mL kütlece % 0.1 fenolftalein içeren %96'lık etil alkol alınır.
- 0.1 N NaOH ile titre edilir.

Harcanan NaOH, T =34.2 mL

Stokiyometrik olarak 1 mol oleyik asit ($M_w=282.47$) 1 mol NaOH ile tepkimeye girer.

1 N NaOH'in 1 L'si 282.47 g oleyik asite eşdeğerdir. (282.47 mg/mL NaOH)

Bu durumda 0.1 N NaOH'in 1 mL'si 28.247 mg oleyik asite eşdeğerdir.

0.5 mL (445 mg) oleyik asit alınmıştır.

Teorik olarak harcanması gereken NaOH miktarı = $445/28.247 = 15.75$ mL

Deneysel bulunan NaOH miktarı (T-B) = $34.2-18.4 = 15.8$ mL

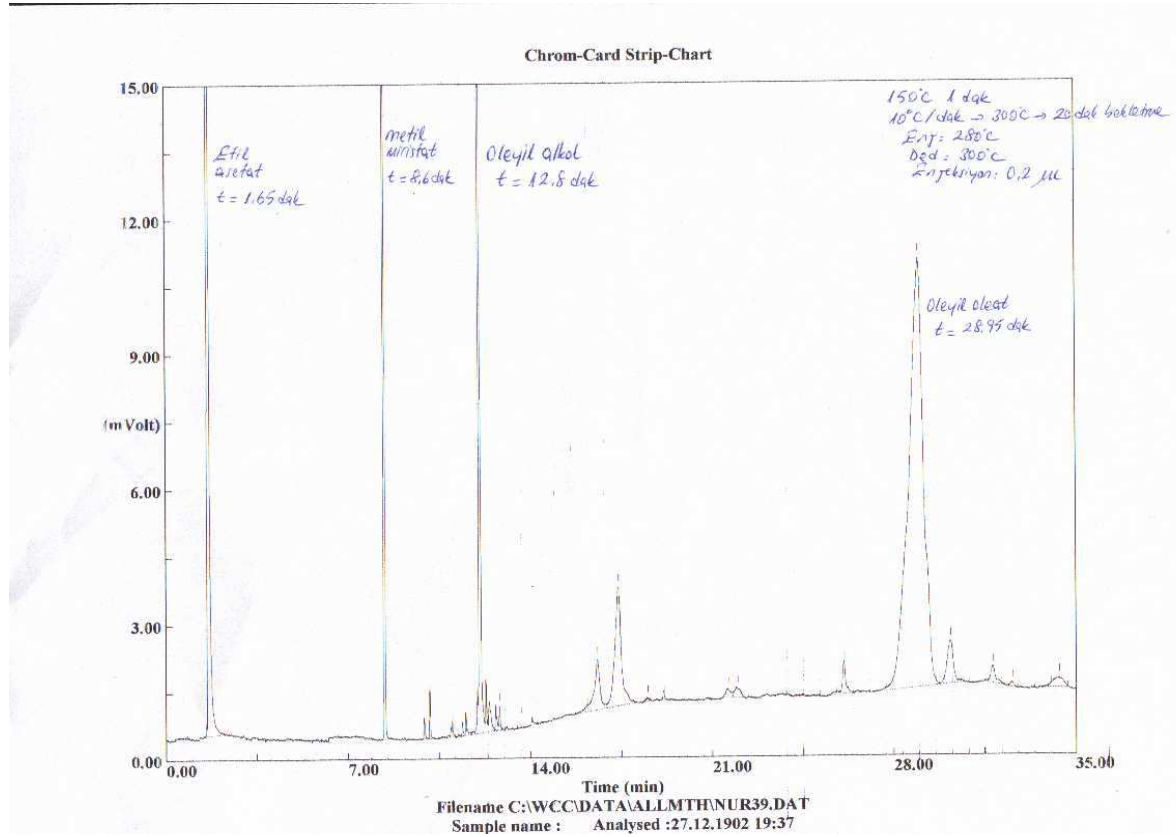
0.5 mL asit içeren ortamda oleyik asit miktarı

$$(T-B) \times 0.1 \text{ N NaOH} \times 282.47 = \dots\dots \text{mg oleyik asit}$$

$$(34.2-18.4) \times 0.1 \times 282.47 = \underline{446.3 \text{ mg} \cong 445 \text{ mg}} \text{ (alınan örnekteki)}$$

Yukarıdaki bulgular titrasyon yönteminin duyarlılığını açıkça göstermektedir.

EK-2 Oleyil alkol ve Oleyil oleat'ın GC analizi için örnek kromatogram



Ek-2.Şekil 1. Oleyil alkol ve Oleyil oleat'ın GC analizi için örnek kromatogram

EK-3. Tepkime ile oluşan su miktarının belirlenmesi

Novozym 435 kullanılarak, mol asit/mol alkol =1/1, E/S=%2, T=50 °C ve N=250 rpm koşullarında 8 ve 6 mL hacimli ağızları septum ile kapalı olan viyallerde deney yapılmış ve her iki hacimdeki reaktörde 2 saat sonunda belirlenen su derişimi 10.855 mg su / g reaksiyon karışımıdır. 24 saat sonunda belirlenen su derişimi de aynı değerde olmuştur. Deneysel olarak belirlenen ve teorik olarak hesaplanan su derişimleri EK.3.çizelge 1.'de verilmiştir. Asit/Alkol mol oranı 1/1 iken erlenlerde ve viyalde yapılan deneyler sonunda tepkime ortamının su içeriği Karl Fischer titrasyon ile belirlenmiştir. 2 saat sonunda C_u=1.471 mmol ester / g karışım değerine sahiptir.

C_{su} = C_u =1.471mmol ester / g karışım 'dır

$$C_{su} = 1.471 \left(\frac{\text{mmol su}}{\text{g karışım}} \right) \left(\frac{18 \text{ g}}{\text{mol}} \right) = 26.478 \frac{\text{mg su}}{\text{g karışım}} \quad (\text{yani } \%2.6478 \text{ su})$$

Görüldüğü gibi hesaplanan ve ve titrasyon ile belirlenen su derişimleri arasında farklılıklar vardır. Deneyler kapak açılmadan yapılmalıdır. Kapak açılmadan yapılan deney ile hesapla belirlenen derişimler arasındaki farklılık ise oluşan suyun bir miktarının enzim desteği tarafından tutulmuş olabileceğinin bir göstergesidir.

EK.3.Çizelge 1. Deneysel olarak belirlenen ve teorik olarak hesaplanan su derişimlerinin karşılaştırılması

	Hesaplanan	Viyal deneyi* KF titrasyon ile	Erlen deneyi** KF titrasyon ile
Su derişimi	%2.6478 (26.478 mg su/ g karışım)	%1.0855 (10.855 mg su/ g karışım)	%0.185 (1.85 mg su / g karışım)

- * : Örnekler alınırken kapak hiç açılmadı
- ** : Örnekler alınırken kapak açılarak alındı

EK-4. Tepkime başlangıç hızlarının belirlenmesi

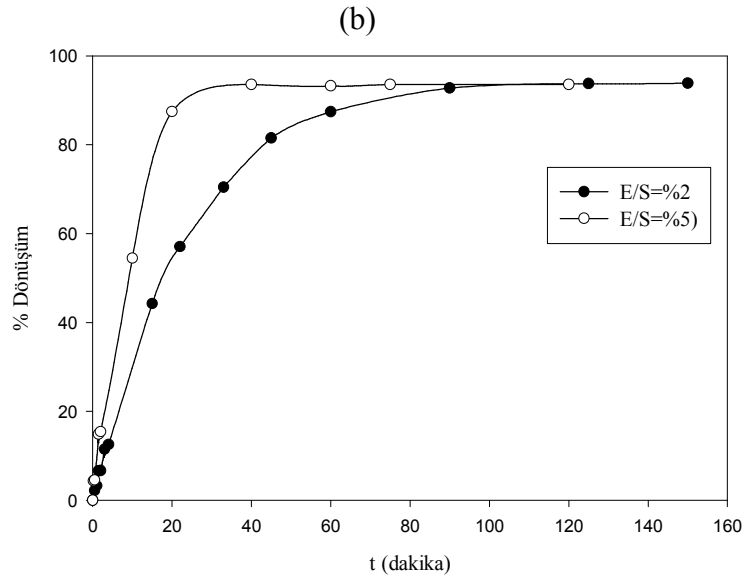
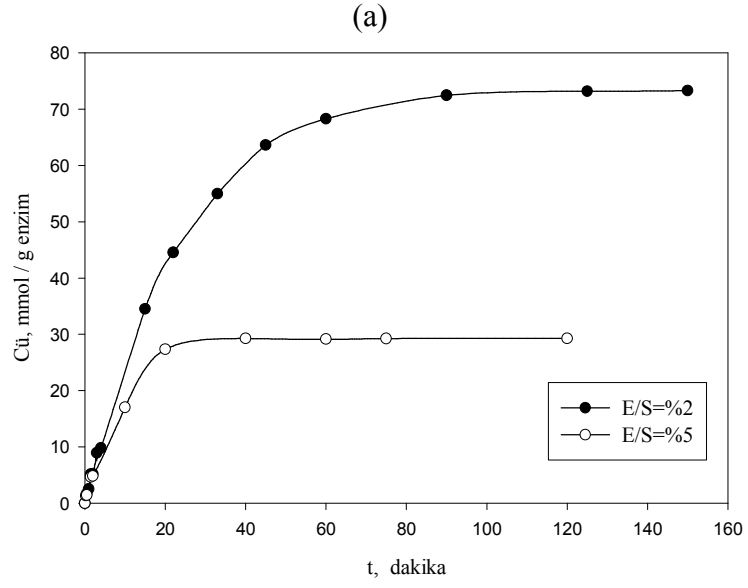
Başlangıç hızlarının belirlenmesi için üç farklı viyalde aynı ortam hazırlanarak farklı zamanlarda deney başlatılmış ve örnekler sık sık bir enjektör yardımı ile kapaklar hiç açılmadan alınmıştır. % 2 enzim ve %5 enzim kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen ürün derişimine enzim miktarının etkisi EK.4.çizelge 1'de, ürün derişimi ve dönüşümün tepkime süresi ile değişimine enzim miktarının etkisi EK.4.şekil.1a ve 1b'de gösterilmiştir. Tepkimenin çok hızlı olması nedeniyle (15 saniyede % 4.3, 30 saniyede % 4.55) enzim miktarı %5'den %2'ye düşürülmüştür.

Bunun için ilk 4 dakika içerisinde alınmış olan 6 örnekteki oleyik asit miktarları belirlenerek oleyil oleat derişimi stokiyometrik olarak hesaplanmıştır. Dönüşümün %10'un altında olduğu lineer bölge için tepkime süresine karşı ürün derişimi grafiğinin ilk 4 dakikası içinde alınan değerleri kullanılarak lineer regresyon ile eğim değerleri hesaplanmıştır. Doğrusallaştırma sonunda elde edilen sonuçlar % 2 enzim ve %5 enzim için sırasıyla EK.4.şekil 2 a ve şekil 2 b'de verilmiştir.

EK.4.Çizelge 1. Novozym 435 ile oleyil oleatın atmosferik koşulda üretimine enzim miktarı etkisi
(Asit/Alkol=1/1, T=50 °C, N=250 rpm, V=6mL, VR=10mL)

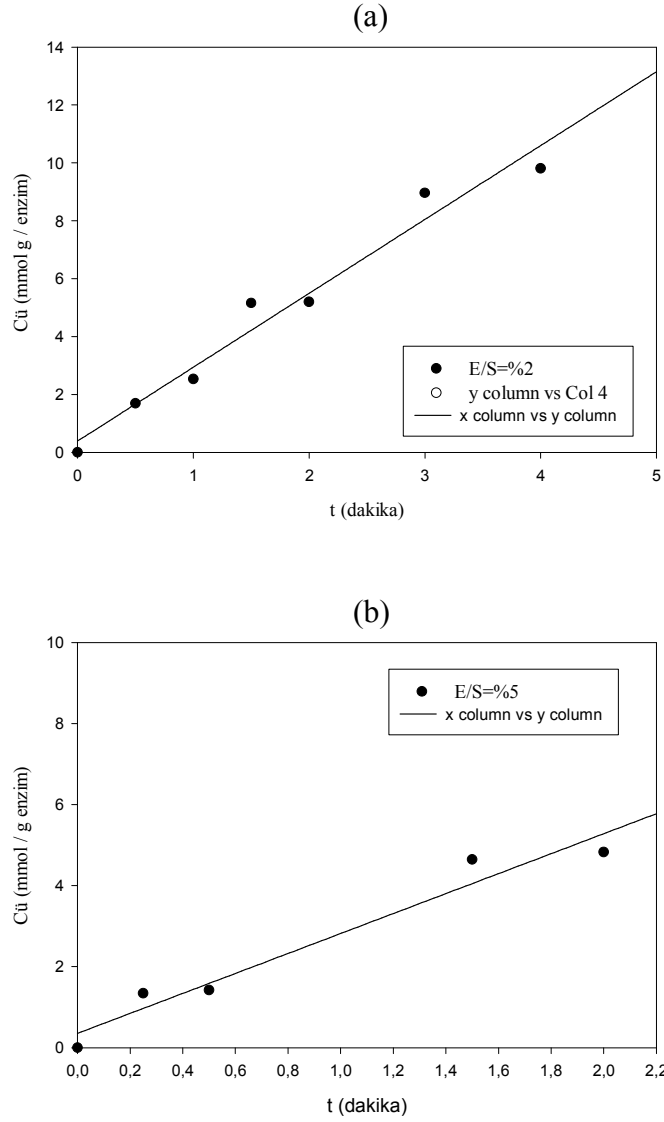
E/S=%2		E/S=%5	
t (dak)	Cü (mmol / g enzim)	t (dak)	Cü (mmol / g enzim)
0	0,0	0	0,0
0,5	1,70	0,25	1,34
1	2,53	0,5	1,42
1	5,15	1,5	4,65
2	5,20	2	4,83
3	8,96	10	17,02
4	9,80	20	27,35
15	34,52	40	29,27
22	44,54	60	29,15
33	54,99	75	29,25
45	63,64	120	29,27
60	68,30		
90	72,47		
125	73,19		
150	73,31		

EK-4 (devam)



EK.4.Şekil 1. Novozym 435 ile oleyil oleatın atmosferik koşulda üretimine enzim miktarı etkisi (Asit/Alkol=1/1, T=50 °C, N=250 rpm, V=6mL, V_R=10mL)
a)Ürün derişimi, b)Dönüşüm

EK-4 (devam)



EK.4.Şekil 2. Novozym 435 ile oleyil oleatın atmosferik koşulda üretimi için başlangıç hızının belirlenmesi a) E/S = %2, b) E/S=%5 (Asit/Alkol=1/1, E/S=5, T=50 oC,N=250 rpm, V=6mL, VR=10mL)

Elde edilen tepkime başlangıç hızları

E/S = %2 için $Cü = 0,384659 + 2,55245t$ $r = 2.55 \text{ mmol / g enzim / dak}$

$R = 0,98268292$ $Rsqr = 0,96566572$ $Adj Rsqr = 0,95879887$

Standard Error of Estimate = 0,7434

E/S = %5 için $Cü = 0,352962 + 2,46334t$ $r = 2.46 \text{ mmol / g enzim / dak}$

$R = 0,97702444$ $Rsqr = 0,95457676$ $Adj Rsqr = 0,93943568$

Standard Error of Estimate = 0,5329

EK-5 Novozym 435 için Gözenek Boyut Dağılımı Analiz Sonuçları

Yüzey Alanı Verileri

BET Yüzey Alanı = **107.7 m²/g katı**

BJH Yöntemi Kümülatif Adsorpsiyon Yüzey Alanı = 132.6 m²/g katı

DH Yöntemi Kümülatif Adsorpsiyon Yüzey Alanı = 132.6 m²/g katı

t-Yöntemi Dış Yüzey Alanı = 107.7 m²/g katı

t-Yöntemi Mikro Gözenek Yüzey Alanı = 0.000 m²/g katı

Gözenek Hacmi Verileri

BJH Yöntemi Kümülatif Adsorpsiyon Gözenek Hacmi = 0.6718 cm³/g katı

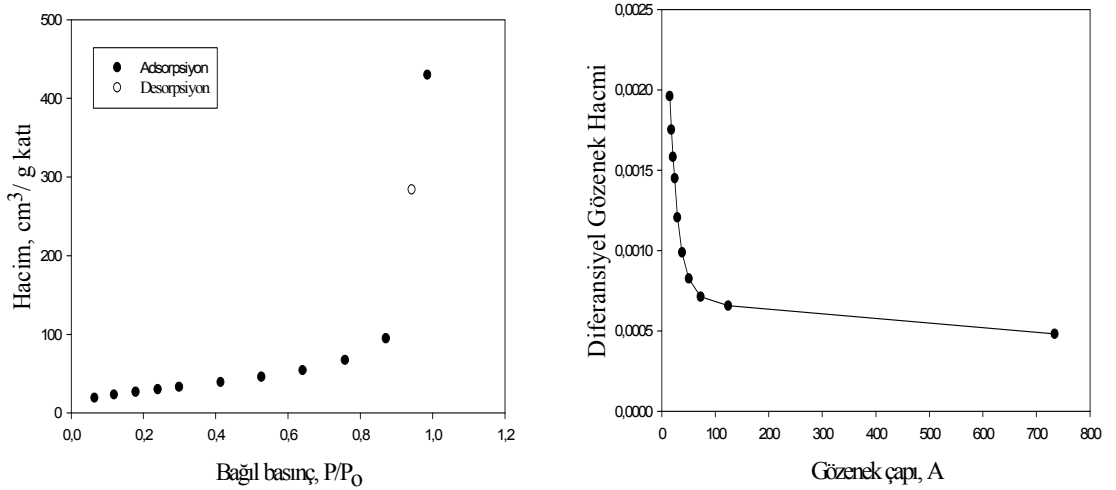
DH Yöntemi Kümülatif Adsorpsiyon Gözenek Hacmi = 0.669 cm³/g katı

t-Yöntemi Mikro Gözenek Hacmi = 0.000 cm³/g katı

Gözenek Boyutu Verileri

BJH Yöntemi Adsorpsiyon Gözenek Çapı = 15.09 Å

DH Yöntemi Adsorpsiyon Gözenek Çapı = 15.09 Å



EK-5.Şekil.1. Novozym 435 için gözenek boyut dağılımı analizi

a) Adsorpsiyon-desorpsiyon izotermi, b) Gözenek boyut dağılımı

EK-6 Lipozyme RM IM için Gözenek Boyut Dağılımı Analiz Sonuçları

Yüzey Alanı Verileri

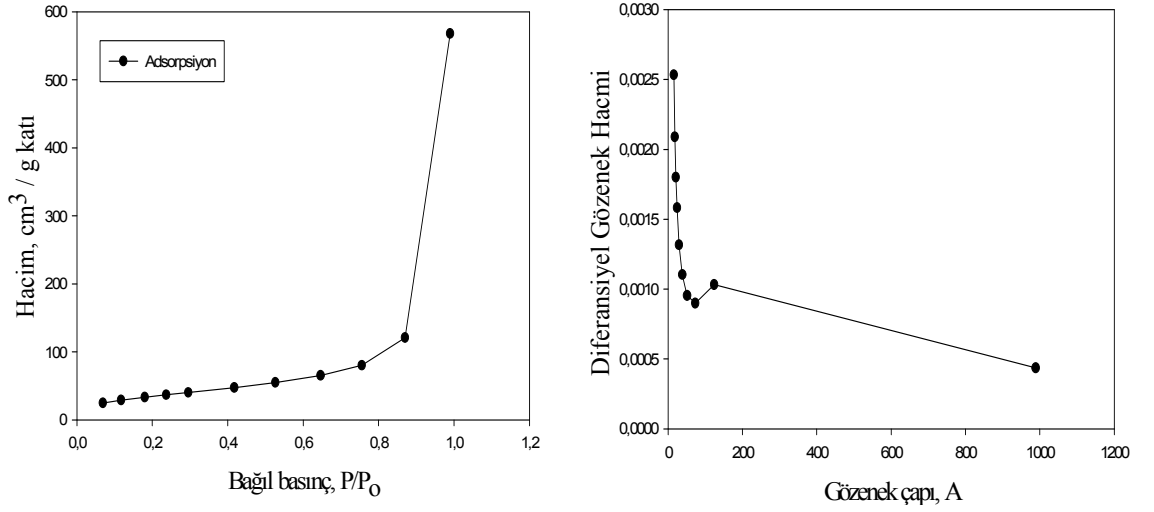
BET Yüzey Alanı = **130.8 m²/g katı**

t-Yöntemi Dış Yüzey Alanı = 130.8 m²/g katı

t-Yöntemi Mikro Gözenek Yüzey Alanı = 0.000 m²/g katı

Gözenek Hacmi Verileri

t-Yöntemi Mikro Gözenek Hacmi = 0.000 cm³/g katı



EK-6.Şekil.1. Lipozyme RM IM için gözenek boyut dağılımı analizi

a) Adsorpsiyon izotermi, b) Gözenek boyut dağılımı

EK-7 Mali Bilanço ve Açıklamaları

Proje, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 15 070 656 400 TL mali desteğiyle 16.10.2001 tarihinde başlamış ve proje kapsamında yapılan harcamalar Çizelge 1'de verilmiştir. Proje ile satın alınan cihaz ve malzemeler Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Süperkritik Akışkan Teknolojisi ve Yeni Teknolojiler laboratuvarlarında bulunmakta ve çeşitli araştırmalarda kullanılmaktadır.

Çizelge 1. Proje kapsamında yapılan harcamalar

Fasıl no	Harcama (TL)	Tarih	Açıklama
300	440 000 000	19.11.2002	1. Reaktör kontrolörü tamiri
	315 000 000	21.11.2002	2. Reaktör başlığı tamiri-I
	400 000 000		3. Reaktör başlığı tamiri-II
400	1 770 000 000	23.11.2001	1. Kimyasal maddeler
	230 000 000	13.12.2001	1. Cam malzeme
	270 000 000	25.7.2002	3.Kırtasiye ve bilgisayar sarf malzemeleri
600	495 600 000	7.11.2001	1. Filtre tutucu (holder) ve filtre membranı (fluoropore fitler)
	141 600 000	15.11.2001	2. Sayısal kontrol cihazı (termostad) ve rezistans termometre (termokupl-Pt 100)
	6 500 000 000	20.11.2001	3. PARR reaktör aksesuarları-bağlantı elemanları ve ısıtıcı bant
	113 427 500	3.12.2001	4. Basınç göstergesi (manometre) ve Karbondioksit gazı dolumu
	590 000 000	11.10.2002	5. Vana ve bağlantı elemanları (valve extension, needle valve, 45 deg ST elbow)
			8.7.2004
Toplam	11 270 000 000 (yaklaşık)		

EK-8 Yayınlar ve Bilimsel Toplantılar

SCI Kapsamındaki Yayınlar

1. N., Kapucu, A., Güvenç, H., Kapucu, Ü., Mehmetoğlu, and A., Çalımlı, 2003. “Lipase Catalyzed Synthesis of Oleyl Oleate : Optimization by Response Surface Methodology” , *Chemical Engineering Communications*, 190, No:5-8, 779-796.

Ulusal Bilimsel Toplantılardaki Etkinlikler

1. N. Kapucu, A. Güvenç, Ü. Mehmetoğlu, A. Çalımlı, 2001. “Tutuklanmış *Candida antarctica* ve *Mucor miehei* Lipazları ile Oleyik Asidin Esterleşmesi”, XII. Biyoteknoloji Kongresi, 17-21 Eylül, Ayvalık-Balıkesir , Bildiriler Kitabı, 210.
2. N. Kapucu, A. Güvenç, Ü. Mehmetoğlu, A. Çalımlı, 2001. “Süperkritik Akışkan Ortamında Enzimatik Tepkimeler”, XII. Biyoteknoloji Kongresi, 17-21 Eylül, Ayvalık-Balıkesir, Poster özetleri Kitabı, 55.
3. N. Kapucu, A. Güvenç, Ü. Mehmetoğlu, A. Çalımlı, 2002. “Çözücüsüz Ortamda Lipaz Katalizli Esterleşmeye Su Aktivitesinin Etkisi”, 5. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-5), 2-5 Eylül, Ankara, Bildiri Özetleri Kitabı, B06.

Uluslararası Bilimsel Toplantılardaki Etkinlikler

1. N., Kapucu, A., Güvenç, H., Kapucu, Ü., Mehmetoğlu, and A., Çalımlı, 2001. “Lipase Catalyzed Synthesis of Oleyl Oleate: Optimization by Response Surface Methodology” , 2nd Eastern Mediterranean Chemical Engineering Conference, EMCC-2, Book of Abstracts, 37-38.
2. N. Kapucu, A. Güvenç, Ü. Mehmetoğlu, A. Çalımlı, 2002. “Esterification of Oleic Acid Using Immobilised Lipase in Supercritical Media” World Conference & Exhibition on Oilseed and Edible, Industrial, and Speciality Oils, August 12-15, İstanbul, Turkey.
3. N. Kapucu, U. Salgın, A. Güvenç, Ü. Mehmetoğlu, A. Çalımlı, 2002. “Lipase Catalyzed Esterification in a Packed Bed Reactor Using Supercritical CO₂”, 1st International Congress on the Chemistry of Natural Products, ICNP-2002, October 16-19, Trabzon, Turkey, Program and Abstracts Book, 92.

Tarih: 25 Kasım 2004

Proje Yürütücüsü: Doç.Dr.Afife Güvenç

İmza: